

# **Charakterisierung von Fibroblasten- vermittelten Veränderungen bei der Gefäßneubildung im SCID-Maus-Modell der rheumatoiden Arthritis**

**Dissertation**

**Zur Erlangung des**

**Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) des  
Fachbereichs Biologie der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Vorgelegt von**

**Corinna Maria Heck, M.Sc.**

**Gießen/Bad Nauheim 2024**



Diese Arbeit wurde am Institut für Rheumatologie und klinische Immunologie des Lehrstuhls für Innere Medizin mit Schwerpunkt Rheumatologie der Justus-Liebig-Universität Gießen angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ivan Manzini

Lehrstuhl für Tierphysiologie und Molekulare Biomedizin

des Fachbereichs Biologie

Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. Ulf Müller-Ladner

Lehrstuhl für Innere Medizin mit Schwerpunkt Rheumatologie

des Fachbereichs Medizin

Justus-Liebig-Universität Gießen

Tag der Disputation: 08.04.2024

Die in der vorliegenden Dissertation verwendeten Begriffe „Patient“ und „Patienten“ schließen sowohl männliche als auch weibliche Patienten ein. Untersuchungen zu Assoziationen mit dem Geschlecht sind explizit erwähnt.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG ..... 8

1.1 Die Rheumatoide Arthritis..... 8

1.1.1 Ätiologie und Risikofaktoren ..... 8

1.1.2 Pathophysiologie und Symptome der RA..... 9

1.1.3 Klassifikationskriterien der RA..... 12

1.1.4 Therapiemöglichkeiten der RA ..... 12

1.1.5 Die Arthrose..... 13

1.2 Anatomie des Gelenks..... 14

1.2.1 Der hyaline Gelenkknorpel ..... 15

1.2.2 Eigenschaft und Funktion des Synoviums ..... 16

1.3 Fibroblasten..... 18

1.3.1 Die Rolle der Fibroblasten bei der Wundheilung ..... 18

1.3.2 Die Rolle von synovialen Fibroblasten in der RA..... 19

1.4 Fibroblasten/Endothelzell-Interaktionen ..... 21

1.4.1 Endothelzellen ..... 21

1.4.2 Die Gefäßneubildung in der RA ..... 22

1.4.3 Vaskulogenese und Arteriogenese..... 27

1.5 Die extrazellulären Matrix ..... 28

1.5.1 Einfluss von EZM-Fragmenten auf die RA ..... 30

1.6 Analyse der RASF-vermittelten Matrixinvasion im SCID-Maus-Modell der RA..... 33

1.6.1 Implantationstechniken..... 33

1.6.2 Analyse der Migration und Invasion im SCID-Maus-Modell ..... 34

1.6.3 Analyse der Angiogenese im SCID-Maus-Modell ..... 35

2. ZIEL DER ARBEIT..... 36

3. MATERIAL ..... 38

3.1 Verwendete Tiere..... 38

3.2 Verwendete Zellen ..... 38

3.3 Medien und Lösungen..... 38

3.4 Enzyme ..... 39

3.5 Antikörper ..... 39

3.5.1 Primäre Antikörper für die immunhistochemischen Analysen ..... 39

3.5.2 Verwendete sekundäre Nachweissysteme ..... 40

3.6 Blockierungsreagenzien..... 40

3.7 Isotypkontrollen ..... 40

3.8 Verbrauchsmaterialien ..... 41

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 3.9   | Geräte.....   | 44 |
| 3.10  | Software .....  | 45 |
| 3.11  | Molekularbiologische und immunologische Kits.....   | 45 |
| 3.12  | Komponenten der extrazellulären Matrix.....   | 45 |
| 3.13  | Primer .....  | 46 |
| 4.    | METHODEN.....   | 47 |
| 4.1   | Methoden zur Standardzellkultur .....   | 47 |
| 4.1.1 | Gewebeentnahme .....  | 47 |
| 4.1.2 | Einfrieren und Lagerung der Synovialgewebe.....   | 47 |
| 4.1.3 | Isolation der synovialen Fibroblasten .....   | 47 |
| 4.1.4 | Passagieren und Kultivieren der synovialen Fibroblasten und der Endothelzellen .....                      | 48 |
| 4.1.5 | Einfrieren der synovialen Fibroblasten und der HUVEC.....   | 49 |
| 4.1.6 | Auftauen der synovialen Fibroblasten und der Endothelzellen.....  | 49 |
| 4.1.7 | Bestimmung der Zellzahl .....   | 50 |
| 4.2   | Zellbiologische Methoden zur Angiogenese und repetitiven Stimulierung <i>in vitro</i> .....               | 50 |
| 4.2.1 | Zell-Tracking mit dem Lebendzellfarbstoff Calcein-AM.....   | 50 |
| 4.2.2 | 2D Tube-Formation-Experiment.....   | 50 |
| 4.2.3 | 3D Sphäroid-basiertes Sprout-Experiment.....  | 57 |
| 4.2.4 | Repetitive Stimulierung der synovialen Fibroblasten .....   | 60 |
| 4.3   | Molekularbiologische Methoden .....   | 62 |
| 4.3.1 | RNA-Isolation.....  | 62 |
| 4.3.2 | Reverse Transkription.....  | 63 |
| 4.3.3 | Semiquantitative real-time PCR .....  | 64 |
| 4.3.4 | RNA-Sequenzierung.....  | 65 |
| 4.3.5 | Hyaluronidaseverdau synovialer Gelenkflüssigkeiten von RA-Patienten .....                                 | 67 |
| 4.3.6 | Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....   | 67 |
| 4.3.7 | Bestimmung der Endotoxizität der verwendeten Matrixfragmente .....  | 68 |
| 4.4   | Charakterisierung der RASF/EZ-Interaktionen bzgl. der Neovaskularisierung im SCID-Maus-Modell der RA..... | 69 |
| 4.4.1 | Vorbereitung der Implantate .....   | 70 |
| 4.4.2 | Schmerztherapie.....  | 72 |
| 4.4.3 | Narkotisieren der SCID-Mäuse .....  | 72 |
| 4.4.4 | Subkutane Implantation .....  | 72 |
| 4.4.5 | Effekte von Canstatin auf die Angiogenese.....  | 73 |
| 4.4.6 | Entnahme der Implantate .....   | 73 |
| 4.4.7 | Analyse der Angiogenese .....   | 74 |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 4.5   | Histologische und immunologische Methoden.....  | 75  |
| 4.5.1 | Anfertigung von Gefrierschnitten.....   | 75  |
| 4.5.2 | Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....   | 75  |
| 4.5.3 | Histologische Auswertung der Implantate .....   | 76  |
| 4.5.4 | Immunhistochemie.....   | 77  |
| 4.6   | Statistische Auswertungen .....   | 80  |
| 5.    | ERGEBNISSE.....   | 82  |
| 5.1   | Kinetik der RASF-vermittelten Entstehung von Helix-ähnlichen Gefäßen im SCID-Maus-Modell der RA.....                          | 82  |
| 5.1.1 | Nachweis der RASF-vermittelten Migration in das kontralaterale Implantat.....   | 88  |
| 5.1.2 | Invasion der RASF in den Knorpel von Tag 12 bis 45.....   | 89  |
| 5.1.3 | Die Rolle von Angiopietin-2 in den SCID-Maus-Implantaten und im humanen Synovialgewebe von RA-Patienten.....                  | 91  |
| 5.2   | Charakterisierung der RASF/EZ-Interaktionen auf funktioneller Ebene .....   | 93  |
| 5.2.1 | Einfluss der RASF auf die Gefäßneubildung im 2D Tube-Formation-Experiment .....   | 94  |
| 5.2.2 | Einfluss der RASF auf die Angiogenese im 3D Sphäroid-basierten Sprout Experiment.....   | 95  |
| 5.3   | Charakterisierung der RASF/EZ-Interaktionen auf molekularer Ebene .....   | 97  |
| 5.3.1 | Einfluss der RASF auf Gefäßregulatoren .....  | 97  |
| 5.3.2 | Einfluss repetitiver Stimulierung auf die Expression angiogener Faktoren in RASF ...  | 100 |
| 5.4   | Einfluss der die Angiogenese modifizierenden Matrixfragmente auf die RASF-Endothelzell-Interaktionen.....                     | 108 |
| 5.4.1 | Canstatin und Endostatin in der Synovialflüssigkeit und im Serum von RA Patienten.....  | 109 |
| 5.4.2 | Einfluss von Canstatin, Arresten, Tumstatin und Endostatin auf die Angiogenese <i>in vitro</i> .....                          | 111 |
| 5.4.3 | Analyse des Canstatin-Effekts auf die RASF/EZ-Interaktionen im 2D Tube-Formation-Experiment .....                             | 113 |
| 5.4.4 | Analyse des Canstatin-Effekts auf die RASF/EZ-Interaktionen im 3D Sphäroid-basierten Sprout-Experiment .....                  | 115 |
| 5.4.5 | ANGPT2-Expression unter Einfluss der RASF/EZ-Interaktionen und Canstatin <i>in vitro</i> .....                                | 117 |
| 5.4.6 | Therapeutischer Effekt von Canstatin bezüglich der RASF-vermittelten veränderten Angiogenese im SCID-Maus-Modell der RA ..... | 118 |
| 6.    | DISKUSSION .....  | 126 |
| 6.1   | Kinetik der RASF-vermittelten Entstehung von Helix-ähnlichen Gefäßen im SCID-Maus-Modell der RA.....                          | 127 |
| 6.1.1 | RASF induzieren spezifisch Helix-ähnliche Gefäße im SCID-Maus-Modell der RA über einen Zeitraum von 3 bis 45 Tagen .....      | 127 |
| 6.1.2 | Die Rolle von ANGPT2 in der RA-vermittelten veränderten Gefäßneubildung .....   | 131 |
| 6.2   | Funktioneller Einfluss der RASF auf die EZ bezüglich der Gefäßneubildung <i>in vitro</i> .....                                | 133 |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 6.3   | Regulierung der Gefäßregulatoren ANGPT2, VEGF, EFNB2 und eNOS unter Einfluss der RASF im Tube-Formation-Experiment.....      | 135 |
| 6.3.1 | Keine RASF-vermittelte Änderung in der Expression von VEGF-, EFNB2 und eNOS im Tube-Formation-Experiment.....                | 136 |
| 6.4   | Gewöhnung der RASF an die repetitive Aktivierung .....   | 139 |
| 6.4.1 | RASF veränderten ihr Expressionsprofil in Folge wiederholter Aktivierung .....   | 140 |
| 6.4.2 | CXCL2 als potentieller Biomarker der RASF-vermittelten veränderten Gefäßneubildung<br>143                                    |     |
| 6.5   | Einfluss der Matrixfragmente auf die RASF-vermittelte Interaktion mit den EZ .....   | 145 |
| 6.5.1 | Effekte von Arresten, Tumstatin und Endostatin auf die RASF und die Gefäßneubildung<br>145                                   |     |
| 6.5.2 | Canstatin als potenzielles neues therapeutisches Molekül für die RASF-vermittelte veränderte Gefäßneubildung in der RA ..... | 147 |
| 7.    | ZUSAMMENFASSUNG.....   | 151 |
| 8.    | ABSTRACT .....   | 152 |
| 9.    | LITERATURVERZEICHNIS .....   | 153 |
| 10.   | ANHANG .....   | 170 |
| 10.1  | Ergänzende Abbildungen.....  | 170 |
| 10.2  | Wissenschaftliche Publikationen.....   | 172 |
|       | Originaltitel.....   | 172 |
|       | Kongressbeiträge.....  | 172 |
| 11.   | VERZEICHNISSE.....   | 174 |
| 11.1  | Abkürzungsverzeichnis .....  | 174 |
| 11.2  | Abbildungsverzeichnis.....   | 177 |
| 11.3  | Tabellenverzeichnis .....  | 187 |

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Die Rheumatoide Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis (RA) gehört zu den am häufigsten vorkommenden chronisch entzündlichen Autoimmunerkrankungen und betrifft primär die Gelenke (Smolen et al. 2016). Die destruktive Progression der RA beginnt meist zunächst in den kleinen Gelenken, z.B. in den Gelenken der Finger oder Zehen. Im weiteren Verlauf befällt die RA meist symmetrisch weitere Gelenke, darunter auch größere Gelenke wie die des Knies, weshalb die RA auch als Polyarthritits bezeichnet wird. Ein charakteristisches Merkmal der RA ist die entzündliche Aktivierung des Synoviums mit einhergehender Hyperplasie, was zu Schwellungen und Schmerzen in den Gelenken führt. Neben Destruktionen von Gelenken und dem darunter liegenden Knochen können auch zahlreiche systemische Komorbiditäten wie kardiovaskuläre, pulmonale, psychologische und muskuloskelettale Erkrankungen auftreten (McInnes und Schett 2011).

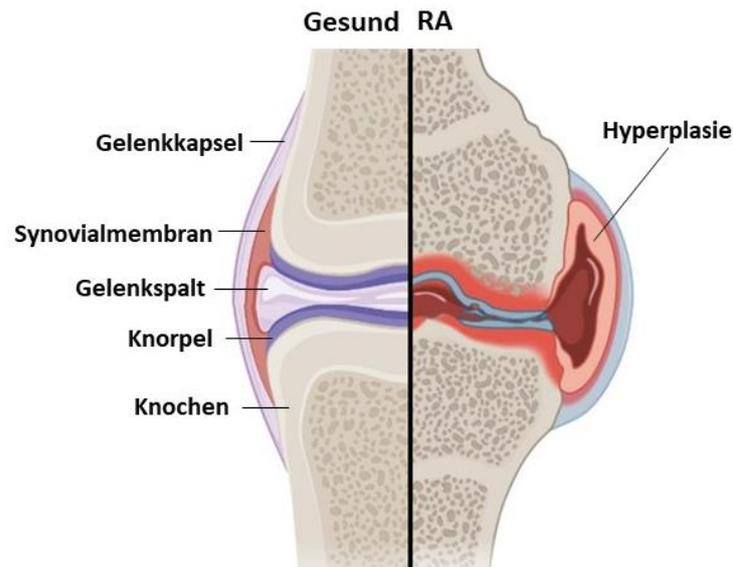
#### 1.1.1 Ätiologie und Risikofaktoren

Die Inzidenz der RA liegt bei 0,5 bis 1% der Weltbevölkerung, wobei sie von Nord nach Süd (in der nördlichen Hemisphäre) und von städtischen zu ländlichen Gebieten abnimmt (Silman 1994; Alamanos und Drosos 2005). Auffällig ist, dass Frauen dreimal häufiger betroffen sind als Männer. Die Ursache hierfür ist nicht abschließend geklärt, jedoch scheinen hormonelle Faktoren eine pathophysiologische Rolle zu spielen. Sowohl bei Männern als auch bei Frauen spielt das Alter eine wichtige Rolle, da die Prävalenz am höchsten bei Patienten ist, die älter als 65 Jahre alt sind (Symmons et al. 2002). Zahlreiche weitere Faktoren, wie zum Beispiel Genotypen und Umwelteinflüsse, die sich in einem komplexen Zusammenspiel beeinflussen, begünstigen den Ausbruch der RA. Genomweite Studien implizieren, dass der Erkrankung immunregulatorische Faktoren zugrunde liegen. Ein Beispiel hierfür ist die spezifische Assoziation mit dem humanen Leukozytenantigen (HLA) DRB1 Locus bei RA Patienten, die positiv für den Rheumafaktor (RF), ACPA (engl. *anti-citrullinated protein antibodies*) oder zyklisch citrullinierte Peptid (CCP) Antikörper sind. Hier sind insbesondere Menschen für RA anfällig, deren Allele ein gemeinsames Aminosäuremotiv (QKRAA) in der HLA-DRB1-Region enthalten, das als gemeinsames Epitop bezeichnet wird (Gregersen et al. 1987; Almeida et al. 2010). Diese Modifikation bewirkt, dass das Enzym Peptidylarginin-Deiminase bei post-translationalen Prozessen vermehrt Argininreste zu Citrullinresten umwandelt und die auf

diese Weise entstandenen citrullinierten Peptide vom Immunsystem nicht mehr als Eigenpeptide erkannt werden können, wodurch Autoantikörper, die ACPA, gegen die citrullinierten Peptide gebildet werden (Hill et al. 2003). Genetische Risikofaktoren, die im Zusammenhang mit der RA stehen, werden häufig mit ACPA-positiver oder ACPA-negativer RA assoziiert. Hier steht besonders der Umwelteinfluss „Rauchen“ im Fokus, der ein signifikantes Risiko darstellt, eine RA zu entwickeln (Scott et al. 2010). Weitere Umweltfaktoren wie der Konsum von Alkohol und Kaffee, der Vitamin D Status, die orale Einnahme von Kontrazeptiva und Einflussfaktoren, die mit einem niedrigen sozioökonomischen Status einher gehen, können den Ausbruch der RA begünstigen, wobei es hierzu bislang nur wenige aussagekräftige Studien gibt (Liao et al. 2009).

### 1.1.2 Pathophysiologie und Symptome der RA

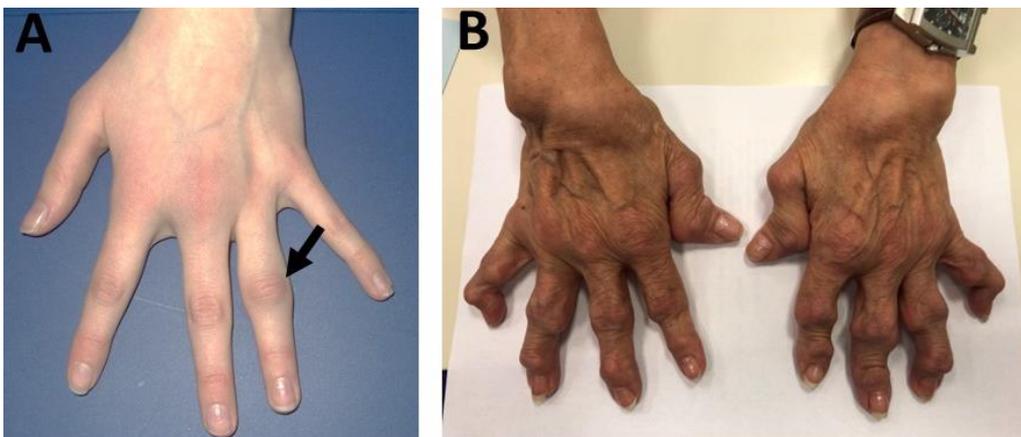
Es wird angenommen, dass die in Kapitel 1.1.1 beschriebenen Risikofaktoren komplexe autoimmune und inflammatorische Prozesse auslösen, bei denen es zum Verlust der Toleranz gegenüber Eigenproteinen kommt und die zum Ausbruch der RA führen (Mahdi et al. 2009). Die Autoimmunität der RA wirkt sich dabei hauptsächlich in der als Synovium bezeichneten Membran aus, die die Gelenkhöhle auskleidet und unter anderem durch die Produktion der Gelenkflüssigkeit für die Beweglichkeit und Gleitfähigkeit der Gelenke zuständig ist. Die genauen Mechanismen, wie es zum systemischen Toleranzverlust und somit Autoimmunität kommt und wie der systemische Toleranzverlust in Verbindung mit der Gelenkentzündung steht, sind bislang nicht geklärt. Die Immunaktivierung führt in einem komplexen Zusammenspiel der Komponenten des angeborenen sowie des adaptiven Immunsystem zu einer Leukozyteninvasion in das Synovium, wodurch es zu einer entzündlichen Hyperplasie des Synoviums und nachfolgenden Knorpel- und Knochenschädigungen kommt (Abbildung 1) (Scott et al. 2010).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung eines gesunden humanen Gelenks (links) und eines entzündlich veränderten RA-Gelenks mit synovialer Hyperplasie (rechts). Abbildung erstellt mit BioRender.com.

Zellen des adaptiven als auch des angeborenen Immunsystems sind an der Initiierung und an der Aufrechterhaltung der RA beteiligt, wobei vor allem T-Zellen, insbesondere bestimmte T-Helfer (TH)-Zellen, TH1 und TH17, im betroffenen Synovium zu finden sind (Bombara et al. 1993; Ye et al. 2021; van Hamburg und Tas 2018). Antigen-präsentierende Zellen präsentieren Autoantigene, die nach Durchbruch der Toleranz von T-Zellen als körperfremd erkannt werden. Dies führt über die T-Zellen zur Aktivierung der B-Zellen und kennzeichnet den Start der Autoimmunität. Es kommt zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine, wodurch ein pro-inflammatorisches Milieu entsteht. Das pro-inflammatorische Milieu aktiviert die Antigen-präsentierenden Zellen und Lymphozyten, was zur Differenzierung von Lymphozyten sowie der Reifung von T- und B-Zellen führt. Die aktivierten T- und B-Zellen infiltrieren in das Synovium und interagieren beispielsweise mit den dort lokalisierten Makrophagen, Fibroblasten, dendritischen Zellen und Osteoklasten, was die Freisetzung weiterer zentraler pro-inflammatorischer Zytokine wie dem Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), des Interleukin (IL)-6 und IL-1 $\beta$  bewirkt. Gleichzeitig wird auch der Knorpel- und Knochenabbau mittels Sekretion Matrix-abbauender Enzyme gefördert (Smolen et al. 2018; Bartok und Firestein 2010). Durch dieses inflammatorische Milieu entsteht das für die RA charakteristische hyperplastische, gefäßreiche und entzündlich aktivierte Synovium, das sich in Form einer Pannusbildung über den Knorpel und Knochen ausbreitet und den darunter liegenden Knorpel und Knochen degradiert (Abbildung 1) (Ouboussad et al. 2019). Zunehmend kann den pro-entzündlichen Prozessen nicht mehr gegengesteuert werden, weshalb sich eine

chronische Entzündung manifestiert, die irreversibel ist und sich in akuten, inflammatorischen Schüben äußert. Diese entzündlichen Prozesse treten bereits früh während der RA auf und äußern sich als sehr schmerzhaft, warme Schwellungen der Gelenke (Abbildung 2, A). Zunächst sind meistens nur die Hand-, Finger- und Fußgelenke betroffen. Unbehandelt breitet sich die Entzündung jedoch innerhalb weniger Monate bis Jahre symmetrisch auf den restlichen Körper aus. Während der Progression der RA kommt es zunehmend zu Gelenkdestruktionen sowie Gelenkveränderungen mit einhergehenden Fehlstellungen und Einschränkungen der Mobilität im betroffenen Gelenk (Abbildung 2, B). Allerdings äußert sich die RA neben Schmerz und Schwellung der Gelenke in weiteren vielfältigen Symptomen wie beispielsweise Morgensteifigkeit der Gelenke, Müdigkeit und Fieber, was die Diagnose erheblich erschwert und um mehrere Monate verzögern kann. Zusätzlich variiert auch der klinische Verlauf der RA stark, da die RA von einer leichten, selbstlimitierenden Arthritis bis hin zu einer schnell fortschreitenden multisystemischen Entzündung mit starker Morbidität und Mortalität verlaufen kann, wobei dies auch maßgeblich vom Zeitpunkt der Diagnose abhängt (Lee und Weinblatt 2001). Es hat sich gezeigt, dass sich eine frühzeitige Diagnose einschließlich frühzeitigem Therapiebeginn positiv auf die Pathogenese auswirken kann. Spezifische Klassifikationskriterien der RA sollen dabei helfen, die RA möglichst frühzeitig zu erkennen.



**Abbildung 2:** Krankheitsbild der RA in den Gelenken der Hand. (A) Zu Beginn der RA treten oftmals schmerzhaftes Schwellungen in den kleinen Gelenken wie den Fingergelenken (schwarzer Pfeil) auf. (B) Bei RA-Patienten mit weit fortgeschrittener RA kann es zu erheblichen Fehlstellungen einschließlich zerstörten und immobilen Gelenken kommen. Bildquelle: Abteilung Rheumatologie; Kerckhoff Klinik Bad Nauheim, mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Uwe Lange.

### 1.1.3 Klassifikationskriterien der RA

Obwohl die RA bereits seit dem 19. Jahrhundert bekannt ist, wurden die Klassifikationskriterien erst vor ca. 60 Jahren entwickelt (Storey et al. 1994; Ropes et al. 1959). Das ACR (engl. *American College of Rheumatology*) legte 1987 die Klassifikationskriterien fest und überarbeitete diese im Jahr 2010, um bereits frühe Stadien der RA diagnostizieren zu können. Die Kriterien werden bei Patienten angewendet, die an mindestens einem Gelenk eine eindeutige klinische Synovitis aufweisen, welche sich nicht durch eine andere Diagnose begründen lässt und definiert eine RA ab Erreichen einer Gesamtpunktzahl von 6 aus 10 Punkten aus 4 Bereichen (Tabelle 1) (Aletaha et al. 2010).

| <b>ACR-Klassifikationskriterien für die RA</b>                       | <b>Score</b> |
|--|--------------|
| <u>Betroffene Gelenke</u>  |              |
| 1 großes Gelenk  | 0            |
| 2-10 große Gelenke   | 1            |
| 1-3 kleine Gelenke (mit/ohne Beteiligung von großen Gelenken)        | 2            |
| 4-10 kleine Gelenke (mit/ohne Beteiligung von großen Gelenken)       | 3            |
| > 10 Gelenke (davon mindestens 1 kleines Gelenk)                     | 5            |
| <u>Serologie (mindestens 1 Testergebnis erforderlich)</u>            |              |
| Negative RF und negative ACPA  | 0            |
| Niedrig-positive RF oder niedrig-positive ACPA                       | 2            |
| Hoch-positive RF oder hoch-positive ACPA                             | 3            |
| <u>Akute-Phase-Reaktion (mindestens 1 Testergebnis erforderlich)</u> |              |
| Unauffälliges CRP und unauffälliges BSG                              | 0            |
| Erhöhtes CRP oder beschleunigte BSG                                  | 1            |
| <u>Dauer der Beschwerden</u>   |              |
| < 6 Wochen   | 0            |
| ≥ 6 Wochen   | 1            |

**Tabelle 1:** ACR-Klassifikationskriterien für die RA. Es liegt eine RA vor, wenn ein Patient eine Gesamtpunktzahl von mindestens 6 aus 10 Punkten aus den Bereichen erzielt. RF: Rheumafaktor, ACPA: anti-citrullinierte Protein-Antikörper, CRP: C-reaktives Protein, BSG: Blutsenkung.

### 1.1.4 Therapiemöglichkeiten der RA

Bis heute ist nicht vollständig geklärt, wie die RA entsteht und auf welchen molekularen Mechanismen die Entstehung der RA beruht. Aus diesem Grund ist es bislang nicht möglich, Therapien zu entwickeln, die zur vollständigen Heilung führen. Deshalb zielt die Behandlung der RA primär darauf ab, eine Remission oder, wenn dies nicht möglich ist, eine möglichst

geringe Krankheitsaktivität zu erreichen. Dabei soll die Behandlung Gelenkschäden entgegenwirken und systemische Manifestationen, wie Herz-Kreislauf-Schäden, vermeiden (Burmester und Pope 2017). Die Zahl an verfügbaren Therapeutika für die Behandlung von RA-Patienten ist in den letzten 30 Jahren stark gestiegen. Derzeit sind für die Behandlung einer RA nicht-steroidale entzündungshemmende Medikamente, Glukokortikoide und DMARDs (engl. *disease modifying anti-rheumatic drug*) zugelassen. Bei den DMARDs unterscheidet man zwischen drei Kategorien: die herkömmlichen, synthetischen DMARDs wie beispielsweise Methotrexat, die zielgerichteten DMARDs wie beispielsweise Januskinase-Inhibitoren und biotechnologisch hergestellte DMARDs, auch bekannt als Biologika, die beispielsweise TNF $\alpha$  und IL-6 inhibieren sowie B-Zellen depletieren (Chatzidionysiou et al. 2017). Zur Behandlung der RA werden sowohl Mono- als auch Kombinationstherapien aus DMARDs und Biologika eingesetzt (Müller-Ladner 2005). Weiterhin stehen auch nicht-pharmakologische Behandlungen wie beispielsweise Physio- und Ergotherapie sowie Beratungen der RA-Patienten hinsichtlich der Änderung des Lebensstils im Fokus, da zum einen die Beweglichkeit der Gelenke erhalten werden und zum anderen die Patienten beispielsweise bei der Raucherentwöhnung oder der Gewichtsabnahme unterstützt werden sollen (Burmester und Pope 2017).

#### 1.1.5 Die Arthrose

Neben der RA und zahlreichen weiteren rheumatischen Erkrankungen spielt vor allem die Arthrose (engl. *osteoarthritis*, OA) eine wichtige Rolle in der Gesellschaft, da 10% der Weltbevölkerung von der OA betroffen sind. Häufig tritt die OA ab einem Alter von 45 Jahren auf und die Prävalenz, an einer OA zu erkranken, erhöht sich zunehmend mit steigendem Alter (Frangos und Maret 2020). Die OA ist klar von der RA abzugrenzen, da es sich im Gegensatz zur RA bei der OA um eine fortschreitende degenerative Erkrankung handelt. Zu den Risikofaktoren, um an einer OA zu erkranken, gehören die Überbelastung von Gelenken, beispielsweise durch Übergewicht oder Leistungssport. Auch die Fehlstellung von Gelenken, angeborene Gelenkdysplasien oder Gelenktraumata können zur Entstehung einer OA führen (Frangos und Maret 2020). Durch die pathologischen Prozesse, aber auch bedingt durch normale Abnutzung, kann der Gelenkknorpel geschädigt werden, wobei die Knorpeloberfläche im Frühstadium der OA noch intakt ist. Es kommt zunächst nur zur Änderung der molekularen Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, da die

Chondrozyten vorübergehend stärker proliferieren und verstärkt Matrixfragmente wie Kollagen II synthetisieren, um den geschädigten Knorpel zu reparieren (Goldring und Goldring 2010). Die Veränderungen in der Zusammensetzung des Gelenkknorpels stimuliert jedoch langfristig die Chondrozyten, vermehrt katabole Faktoren freizusetzen, die am Knorpelabbau beteiligt sind, wodurch die Knorpelintegrität gestört wird. Es kommt zur Apoptose der hypertrophen Chondrozyten und somit schließlich zur Destruktion des Knorpels (Mort und Billington 2001). Durch den Knorpelverlust geht die Gleitfähigkeit der Gelenke verloren und im Verlauf verschmälert sich der Gelenkspalt, sodass die Knochen aufeinander reiben und die Patienten zum einen starke Schmerzen empfinden, zum anderen auch erheblich in der Beweglichkeit der Gelenke eingeschränkt sind. Weiterhin können während der Progression der OA auch Knochenanbauten (Osteophyten) auftreten und es kann zur Lockerung und Schwäche von Muskeln und Sehnen kommen. Im Verlauf der RA kann durch den Verlust des Knorpels zusätzlich eine sekundäre OA entstehen (Xia et al. 2014). Klinisch lassen sich OA und RA durch die Kombination aus Laborparametern und klinischen Untersuchungen differenzieren. Bei der RA können beispielsweise unspezifischen Entzündungswerte wie die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), die Menge an C-reaktivem Protein (CRP) oder ACPA stark erhöht sein, die bei der OA typischerweise nicht erhöht sind (Hartung und Seelig 2007).

## 1.2 Anatomie des Gelenks

Gelenke verbinden die artikulierenden Elemente des Wirbeltierskeletts und ermöglichen durch ihre morphologische Vielfalt ein großes Spektrum an mechanischen Bewegungsprofilen. Kraft und Beweglichkeit werden dabei von der Organisation und den Bestandteilen des Gelenkbindegewebes bestimmt, während die Bewegungsmöglichkeiten von der Gelenkform definiert werden. Man unterscheidet bei Gelenken zwischen drei Hauptklassen: frei bewegliche Synovialgelenke, leicht bewegliche Knorpelgelenke und unbewegliche Fasergelenke. Die drei Klassen weisen unterschiedliche morphologische Charakteristika auf (Salva und Merrill 2017). Im humanen Skelett sind am häufigsten die morphologisch variabelsten Synovialgelenke zu finden. Synovialgelenke bestehen aus einem glasig aussehenden hyalinen Knorpel, der Hyaluronat und Lubricin für reibungsfreie Gelenkbewegungen enthält (Ray et al. 2015). Synovialgelenke zeichnen sich durch eine mit Synovialflüssigkeit gefüllten Gelenkspalt aus, die die artikulierenden Oberflächen der Knochen räumlich voneinander trennt. Die Gelenkhöhle wird von einer aus zwei Schichten bestehenden

Gelenkkapsel ausgekleidet. Die äußere Schicht der Gelenkkapsel besteht zum Schutz des Gelenks aus dichtem fibrösem Bindegewebe und geht meistens in das Kapselband über. In vielen Gelenken, wie beispielsweise im Knie, unterteilt das Kapselgewebe die synoviale Gewebeshöhle als Gelenkscheibe (Meniskus) und puffert so physische Stöße ab. Die innere Schicht der Gelenkkapsel wird von einer dünnen Synovialmembran ausgekleidet, die die viskose Synovialflüssigkeit freisetzt, um das Gelenk zu schmieren und somit Bewegungen zu ermöglichen (Ray et al. 2015; Salva und Merrill 2017; Pitsillides und Ashhurst 2008).

### 1.2.1 Der hyaline Gelenkknorpel

Der hyaline Gelenkknorpel ist die am häufigste im humanen Körper vorkommende Form von Knorpel und ist neben den Synovialgelenken auch in der Wirbelsäule, den Rippen, den äußeren Ohren, der Nase, den Atemwegen sowie in Wachstumsfugen von Kindern und Jugendlichen zu finden. Hauptsächlich kommen im Menschen drei verschiedene Knorpeltypen vor: hyalin, faserig und elastisch. Alle drei Typen weisen eine geringe Dichte an Chondrozyten auf, die in eine avaskuläre, alymphatische und aneurale extrazelluläre Matrix (EZM) eingelagert sind und dort die Hauptkomponenten der EZM synthetisieren und sezernieren (Naba et al. 2016; Stockwell 1967). Die EZM besteht aus drei unterschiedlichen Matrices, der perizellulären, territorialen und der interterritorialen Matrix, wobei die interterritoriale Matrix den Hauptbestandteil des Knorpels ausmacht (Hunziker et al. 1992). Die interterritoriale Matrix enthält hauptsächlich Wasser, das ca. 60-85% des Knorpelgewichts ausmacht, Kollagen Typ II und das Proteoglykan Aggrekan mit kleineren Mengen anderer Kollagene, Proteoglykane, Proteine und Glykoproteine, deren molekulare Wechselwirkungen dem Knorpel auf Gewebeebene Stabilität verleihen und er somit als lasttragendes Gewebe fungieren kann (Hardingham et al. 1994; Mow et al. 1992). Die Zellen des Knorpelgewebes, die Chondrozyten, sind nicht direkt in die EZM eingelagert, sondern werden von einer perizellulären Matrix umgeben, die überwiegend aus Kollagen Typ VI und Proteoglykanen besteht (Poole et al. 1990). Die perizelluläre Matrix bildet einen Knorpelhof, der als Chondron bezeichnet wird und die Chondrozyten vor mechanischen Einflüssen schützt, indem physikalische Kräfte zwischen den Chondrozyten und der umliegenden EZM von der perizellulären Membran übertragen werden (Guilak et al. 2006). Zum Erhalt des gesunden Knorpels findet ein kontinuierlicher Matrixumbau statt, indem die Chondrozyten durch die Sekretion von matrixabbauenden Enzymen die Knorpelmatrix degradieren und durch die

Kollagensynthese neues Knorpelgewebe aufbauen. Auf diese Weise können Chondrozyten unter physiologischer Belastung die Knorpelmatrix erhalten, indem sie permanent ein Gleichgewicht zwischen katabolen und anabolen Prozessen herstellen. Durch abnormale mechanische Stimuli, wie beispielsweise bei übermäßiger Belastung oder einem Gelenktrauma, kann dieses Gleichgewicht gestört werden. Das gestörte Gleichgewicht im Chondrozytenstoffwechsel kann zu einer übermäßigen Matrixdegradation, einschließlich Degeneration des Knorpels, und schließlich zu Entstehung einer OA führen (Griffin und Guilak 2005; Anderson et al. 2011). Degenerative Prozesse werden zusätzlich von einer geringen Proliferationsrate der adulten Chondrozyten gefördert, sodass verletzungsbedingte Knorpelschäden kaum regenerieren können.

### 1.2.2 Eigenschaft und Funktion des Synoviums

Das gesunde Synovium trägt maßgeblich zur Aufrechterhaltung einer intakten, glatten Gewebeoberfläche bei, die den Knorpel beispielsweise durch die Produktion von Hyaluronsäure in der Synovialflüssigkeit vor mechanischen Einflüssen schützt und so reibungsfreie Bewegungsabläufe der Gelenke ermöglicht. Eine weitere wichtige Funktion des Synoviums ist die Diffusion von Nährstoffen und anderen Molekülen aus dem Serum über die Synovialflüssigkeit zum avaskulären Knorpel, um die Chondrozyten zu versorgen (Hui et al. 2012; Smith 2011). Die Synovialmembran kleidet die innere Oberfläche der Gelenkkapsel von Synovialgelenken aus und besteht aus zwei Gewebeschichten. Die Gelenkkapsel geht in die als Sublining bezeichnete Schicht über. Das Sublining kennzeichnet eine zellarme, matrixreiche Struktur, in die versorgende Blutgefäße, Adipozyten, Fibroblasten, Makrophagen aber auch vereinzelt weitere Zelltypen wie Lymphozyten locker eingelagert sind. Das elastische bindegewebige Sublining geht in die synoviale Deckzellschicht über, die direkt mit der Gelenkhöhle in Kontakt steht und im gesunden Gelenk aus zwei bis drei Zellschichten mit wenig Bindegewebe besteht (Smith und Wechalekar 2015; Singh et al. 2004). Die synoviale Deckzellschicht wird auch aus dem englischen „*lining layer*“ als Lininglayer bezeichnet, setzt die gleitfähige Synovialflüssigkeit zum Schmieren der Gelenke frei und besteht hauptsächlich aus zwei morphologisch unterschiedlichen synovialen Zelltypen: dem Makrophagen-ähnlichen Typ A und dem Synovialfibroblasten (SF)-ähnlichen Typ B (Iwanaga et al. 2000). Im Allgemeinen spielen die Makrophagen-ähnlichen Typ A Zellen bei der angeborenen und adaptiven Immunität eine Rolle, während die SF an der Bildung der Synovialflüssigkeit beteiligt

sind (Vandenabeele et al. 2003). Das Lininglayer besteht hauptsächlich aus der EZM, die mit Kollagenfibrillen und anderen Matrixproteinen durchsetzt ist. Diese lockere Anordnung ermöglicht eine Diffusion der Nährstoffe aus dem umliegenden Gewebe zu Chondrozyten und Knorpel (Firestein et al. 2009). Die im Lininglayer lokalisierten SF sind für die Produktion von Hyaluron modifiziert. Sie weisen eine hohe Aktivität des Enzyms UDP Glukose Dehydrogenase (UDPGD) auf, das UDP-Glukose in das von der Hyaluronansynthese benötigte UDP-Glukuronat umwandelt (Wilkinson et al. 1992). Charakteristisch für SF aus dem Lininglayer ist auch die Expression von zahlreichen Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 (engl. *vascular cell adhesion protein 1*), ICAM-1 (engl. *intercellular adhesion molecule 1*), CD44 und  $\beta$ 1-Integrinen, die sie für die Interaktion mit der EZM und anderen Immunzellen wie Makrophagen und Lymphozyten benötigen (Smith 2011; Edwards 1995). SF/EZM-Interaktionen sind von hoher Bedeutung, da durch die physische Beanspruchung des Gelenks ein permanenter Umbau der EZM erforderlich ist (Konttinen et al. 2000). Der permanente Umbau der EZM erfolgt durch die SF-vermittelte Sekretion von Matrixmetalloproteasen (MMP), insbesondere von MMP-1, MMP-8 und MMP-13, deren katalytische Domänen die Kollagene Typ I, II und III degradieren und so die EZM abbauen (Hanemaaijer et al. 1997; Smith 2011). Gleichzeitig produzieren SF auch TIMP (engl. *tissue inhibitor of metalloproteinase*), die natürlichen Inhibitoren der MMP, sowie Komponenten der EZM wie beispielsweise (pro)-Kollagene, Fibronektin und Hyaluronsäure, sodass im gesunden Gelenk ein Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der EZM besteht (DiBattista et al. 1995).

#### 1.2.2.1 Pathophysiologie der synovialen Hyperplasie bei der RA

Die autoimmune Aktivierung des Immunsystems bei der RA hat zur Folge, dass es zur Invasion von Leukozyten, einschließlich B-Zellen, T-Zellen, Makrophagen und Mastzellen, in das Synovium kommt, die eine Vielzahl an inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen sezernieren (Pitzalis et al. 2013). Bedingt durch aktivierte inflammatorische Signalwege wird das Gleichgewicht im Synovium gestört, was zur Entstehung eines entzündlichen Milieus mit erhöhten Matrix-abbauenden und pro-inflammatorischen Prozessen führt. Diese Entzündung des Synoviums wird auch als Synovitis bezeichnet und ist gekennzeichnet durch eine starke Gefäßneubildung sowie einer lokalen synovialen Hyperplasie mit einem verdickten Lininglayer. Die synoviale Hyperplasie stellt ein wichtiges Merkmal der RA dar und trägt

maßgeblich zur Progression der Destruktionen im Gelenkknorpel und Knochen bei (Rivellese et al. 2019).

### 1.3 Fibroblasten

Im Allgemeinen sind Fibroblasten als Zellen mesenchymalen Ursprungs definiert, die das Stroma in Organgeweben bilden und maßgeblich an der Produktion von Molekülen der EZM beteiligt sind (Wei et al. 2021; Eckes et al. 2000). Im nicht aktivierten Zustand exprimieren Fibroblasten spezifische Gene, die für Kollagen Typ I  $\alpha$ -Kette (COL1A), PDGFR $\alpha$  (engl. *platelet derived growth factor receptor alpha*) (CD140 $\alpha$ ) oder THY-1 (CD90) kodieren und für die Aufrechterhaltung der EZM notwendig sind (Lynch und Watt 2018; Buechler und Turley 2018). Fibroblasten interagieren beispielsweise zur Aufrechterhaltung und Umstrukturierung des Bindegewebes und der EZM sowie im Kontext der Gefäßneubildung, aber auch bedingt durch entzündliche Stimulierungen im Rahmen von Erkrankungen über zahlreiche komplexe Signalwege mit einer Vielzahl weiterer Zelltypen wie beispielsweise mit den Endothelzellen (EZ) (Wei et al. 2021).

#### 1.3.1 Die Rolle der Fibroblasten bei der Wundheilung

Eine besonders wichtige Rolle spielen Fibroblasten bei der Wundheilung in Folge einer Verletzung des Gewebes. Der Prozess der Wundheilung besteht aus einer Reihe fortlaufender, teils überlappender Vorgänge, wie der Zellproliferation, -migration sowie Degradation mit anschließendem Aufbauprozess der EZM. Entsteht eine kutane Verletzung des Gewebes, migrieren zunächst Keratinozyten, bekannt als hornbildende Zellen der Epidermis, innerhalb weniger Stunden zur Wunde und bilden zum Wundverschluss eine Art provisorische Matrix (Darby und Hewitson 2007). Mittels lokaler Proliferation der Keratinozyten können auch größere Gewebsverletzungen verschlossen werden. Durch die Aktivierung weiterer lokaler Zellen wie Makrophagen und die Sekretion von Wachstumsfaktoren wie des TGF $\beta$  (engl. *transforming growth factor-beta*), VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*), EGF (engl. *epidermal growth factor*) und KGF (engl. *keratinocyte growth factor*) werden Prozesse der Angiogenese und Fibrogenese stimuliert (Darby und Hewitson 2007). Infolgedessen werden die Fibroblasten aktiviert, migrieren in den aus Keratinozyten bestehenden Wundverschluss und beginnen schnell zu proliferieren, was ein wichtiges frühes Ereignis als Folge einer Gewebsverletzung bei der Fibrogenese darstellt (Darby und Hewitson 2007; Werner et al. 2007). Durch die Expression von Kollagen und Fibronectin entsteht neues

Granulationsgewebe, das der Wunde strukturelle Integrität und Elastizität verleiht. Ein weiterer wichtiger Prozess bei der Wundheilung stellt die Blutversorgung des neu gebildeten Granulationsgewebes dar. Die aktivierten Fibroblasten sezernieren zahlreiche pro-angiogene Wachstumsfaktoren wie VEGF, sodass es mittels spezifischer Fibroblasten/EZ-Interaktionen zur Umstrukturierung und Neubildung des Blutgefäßsystems kommt (Shams et al. 2022). Der Prozess der Fibrogenese bleibt solange bestehen, bis die Verletzung geschlossen und die Fibroblasten bedingt durch dichte Konfluenz in den programmierten Zelltod, die Apoptose, gehen. Die Apoptose kennzeichnet den Übergang zwischen dem neu gebildeten Granulationsgewebe und Heilung bzw. der Narbenbildung (Desmoulière et al. 1995).

### 1.3.2 Die Rolle von synovialen Fibroblasten in der RA

Ähnlich wie bei der Wundheilung, wird auch die Progression der RA maßgeblich von den Fibroblasten und insbesondere mit ihren Wechselwirkungen mit anderen Zelltypen beeinflusst. Hierbei interagieren die Fibroblasten mit verschiedenen Zellen des Immunsystems, wie Makrophagen, B- und T-Zellen, aber auch anderen Stromazellen, wie Osteoblasten und Osteoklasten (Lefevre et al. 2015).

In Folge der Aktivierung des Immunsystems bereits im frühen Stadium der RA differenzieren T-Zellen durch die erhöhte Sekretion von TGF $\beta$ , IL-23 und IL-6 in T-Helfer-17-Zellen (TH17). TH17-Zellen infiltrieren in das RA-Synovium und sezernieren dort IL-17, das die Zellen des innate Immunsystems wie synoviale Makrophagen und Neutrophile aktiviert (Chabaud et al. 1999; Mellado et al. 2015). Dies führt zu einer lokalen Entzündungsaktivität im Synovium, wodurch pro-inflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  exprimiert werden (Alsalameh et al. 1999; Niki et al. 2004). TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  stellen wichtige Schlüsselzytokine in der Progression der RA dar, da beide Zytokine zu einer starken Aktivierung von Entzündungszellen sowie der Synovialfibroblasten von Patienten mit RA (RASf) führen (Harigai et al. 1991; Chen et al. 2019).

Bereits in frühen Stadien der RA kommt es zur RASf-Aktivierung, die zu epigenetischen Modifikationen der RASf führt (Ospelt et al. 2017). Beispielsweise wurden in RASf Veränderungen am TBX5-Lokus identifiziert. Im Vergleich zu SF von OA-Patienten ist die DNA von RASf am TBX5-Promotor demethyliert. Zusätzlich ist die Histon-Acetylierung an der Stelle des TBX5-Promotors erhöht, sodass TBX5 verstärkt transkribiert wird. TBX5 induziert die Expression von Chemokinen wie IL-8, auch als CXC-Motiv-Chemokin 8 (CXCL8) bezeichnet, und CXCL2 (Karouzakis et al. 2014). CXCL2 und CXCL8 rekrutieren B-Zellen ins Synovium, wobei

CXCL2 direkt auf die EZ-Aktivierung wirkt, indem CXCL2 an dessen Rezeptor CXCR2 bindet (Pierer et al. 2004; Urbantat et al. 2021; Bartok und Firestein 2010). Verstärkte Histon-Acetylierungen in RASF wurden auch an den Promotoren von MMP-1, -3, -9 und -13 identifiziert, wodurch es zur erhöhten Freisetzung von MMP und somit einer verstärkten Matrixdegradation kommt (Araki et al. 2016). Auch der IL-6-Promotor weist eine verstärkte Histon-Acetylierung in Folge der RASF-Aktivierung auf, die mit einer verstärkten IL-6-Sekretion assoziiert ist (Wada et al. 2014). Diese epigenetischen Modifikationen in Folge der RASF-Aktivierung werden auch als epigenetisches Priming bezeichnet und führen zu einem veränderten Expressionsprofil sowie der permanenten Aktivierung der RASF. Auf Grund des epigenetischen Primings entwickeln die RASF einen aggressiven, destruktiven Phänotyp, der sich deutlich vom Phänotyp normaler Fibroblasten unterscheidet. RASF zeigen vor allem nach langjähriger Krankheit einen persistierenden aktivierten Phänotyp, der Gelenkdestruktionen und die Persistenz inflammatorischer Infiltrate fördert (Raza et al. 2005). Beispielsweise zeigen RASF ein erhöhtes Potenzial zur Invasion in den Knorpel, auch außerhalb des chronisch-inflammatorischen Milieus und können diesen pathogenen und aggressiven Phänotyp auch ohne inflammatorischen Stimulus über mehrere Passagen aufrechterhalten (Müller-Ladner et al. 1996; Lefèvre et al. 2009). RASF weisen eine reduzierte Apoptose im Vergleich zu normalen Fibroblasten auf. So deuten Studien darauf hin, dass dies auf eine Hemmung der pro-apoptotischen Signalwege in den RASF zurückzuführen ist, da RASF verstärkt Onkogene wie *c-fos*, *ras*, und *myc* exprimieren und gleichzeitig Tumorsuppressorgene wie *PTEN* herunterreguliert sind (Kinne et al. 1995; Pap et al. 2004; Pap et al. 2000).

Charakteristisch für die Progression der RA sind pro-inflammatorische Erkrankungsschübe, die sich mit Phasen inaktiver Erkrankung abwechseln (McInnes und Schett 2011; Walker-Bone und Farrow 2007). In den Phasen der pro-inflammatorischen Schübe kommt es zu einer zusätzlichen Aktivierung der permanent aktivierten RASF. Die RASF-vermittelten Effekte auf andere Zelltypen wie Makrophagen, B-Zellen, T-Zellen, Osteoklasten und EZ tragen maßgeblich zur Aufrechterhaltung und Verstärkung des inflammatorischen Milieus im RA-Synovium bei und bewirken mit zunehmendem Verlauf der RA schmerzhafte Destruktionen von Knorpel und Knochen (Bartok und Firestein 2010). Die Destruktion des Knochens wird vor allem durch die RASF-vermittelte Expression und Freisetzung von RANKL (engl. *receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand*) gefördert (Tunyogi-Csapo et al. 2008; Kim et al. 2007). RANKL fördert wiederum die Bildung von Osteoklasten, den zentralen Zellen der Demineralisierung

und des Abbaus von Knochenmatrix, und trägt so maßgeblich zum Abbau und somit zur Destruktion des Knochens betroffener Gelenke bei (Bartok und Firestein 2010).

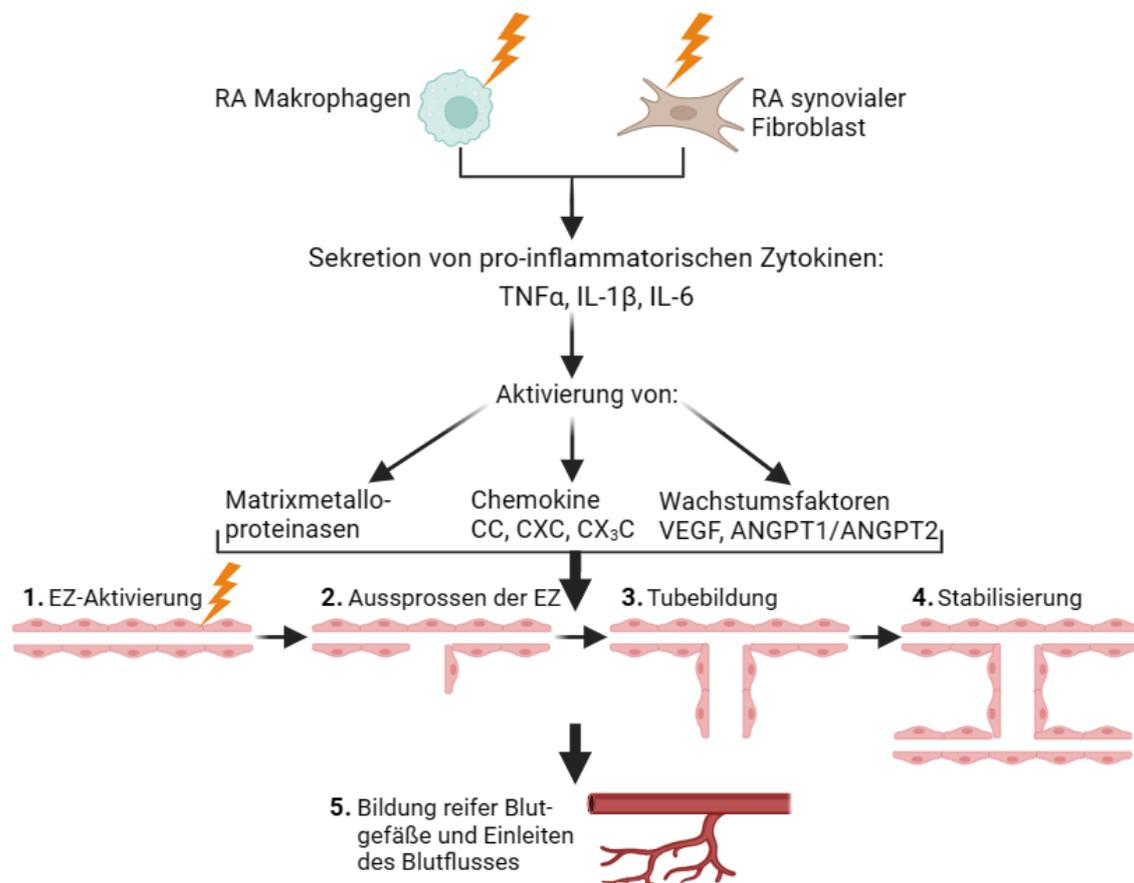
## 1.4 Fibroblasten/Endothelzell-Interaktionen

### 1.4.1 Endothelzellen

Das Endothel ist ein großes, endokrines Organ, welches die Innenfläche von Blut- und Lymphgefäßen auskleidet, wobei es die Schnittstelle zwischen zirkulierendem Blut oder Lymphe im Lumen und der restlichen Gefäßwand bildet (Dyer und Patterson 2010). In einem erwachsenen Menschen besteht das Endothel aus 1 bis  $6 \times 10^{13}$  Zellen, wiegt ca. 1 kg und bedeckt eine Fläche von 1 bis 7 m<sup>2</sup> (Sumpio et al. 2002). Die vaskulären Endothelzellen (EZ) kleiden das gesamte Kreislaufsystem vom Herzen bis zu den kleinsten Kapillaren aus. Dabei stehen die EZ im direkten Kontakt mit dem Blut und fungieren als physikalische Barriere zwischen Gefäßen und Gewebe, in dem EZ die Sekretion von Molekülen und Flüssigkeiten in und aus dem Gewebe steuern. Weitere Funktionen der EZ sind die Gefäßneubildung, die Steuerung des Tonus der Blutgefäße, die Gewebshämostase, die Rekrutierung von Neutrophilen, Interaktion mit Leukozyten sowie der Hormontransport (Trimm und Red-Horse 2023). Zur Ausübung der zahlreichen Funktionen spielen endotheliale Zell-Zell-Verbindungen eine entscheidende Rolle, da EZ nicht nur die interzelluläre Adhäsion aufrechterhalten, sondern auch intrazelluläre Signale übertragen. Die Übertragung von intrazellulären Signalen reguliert die Kontakthemmung des Zellwachstums, die Zellpolarität, die Lumenbildung der Gefäße und die Wechselwirkungen mit den Perizyten sowie den glatten Muskelzellen (Dejana et al. 2009). Die Struktur der adhärenenten Verbindungen besteht aus VE (engl. *vascular endothelial*)-Cadherin, das über dessen zytoplasmatische Domäne mit p120-Catenin,  $\beta$ -Catenin und Plakoglobulin interagiert (Dejana und Vestweber 2013). Die Proteine bilden unterschiedliche Komplexe und können so jeweils die Zell-Zell-Verbindungen beeinflussen. Beispielsweise aktivieren Wechselwirkungen von VE-Cadherin mit VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR2), FGFR1 (engl. *fibroblast growth factor receptor 1*) und dem TGF $\beta$ -R-Komplex deren nachgeschaltete Signalweiterleitung. VE-Cadherin-vermittelte indirekte Wechselwirkungen mit verschiedenen Aktin-bindenden Proteinen wie  $\alpha$ -Catenin regulieren den Umbau des Zytoskeletts. Umgekehrt bewirken Phosphorylierungen von VE-Cadherin eine Schwächung der Zell-Zell-Verbindungen (Giannotta et al. 2013). Diese Prozesse sind zum Beispiel bei Gewebsentzündung oder der Gefäßneubildung von Bedeutung.

#### 1.4.2 Die Gefäßneubildung in der RA

Die Entstehung neuer Blutgefäße aus bereits existierenden Gefäßen wird als Angiogenese bezeichnet und unterliegt einem komplexen Mechanismus, an dem EZ, Fibroblasten, Makrophagen, glatte Muskelzellen und Perizyten beteiligt sind (Wang et al. 2021). Die Angiogenese spielt bei verschiedenen physiologischen Prozessen eine übergeordnete Rolle, wie beispielsweise bei der embryonalen Organentwicklung, Reproduktion und der in Kapitel 1.3.1 beschriebenen Wundheilung einschließlich der Gewebereparatur. Insbesondere zeichnet sich die Angiogenese durch die Abfolge unterschiedlicher Prozesse aus, wobei jeder einzelne Schritt von spezifischen Faktoren reguliert wird. Es wird zwischen der EZ-Aktivierung, der Aussprossung von EZ, der Bildung von Röhren mit Lumen (engl. *tubes*) sowie das Einleiten des Blutflusses unterschieden (Abbildung 3). Im Synovium von RA-Patienten sezernieren aktivierte Makrophagen und RASF zahlreiche pro-inflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6, die zu einer Aktivierung von MMP, Chemokinen der CC, CXC sowie CX3C Familie und Wachstumsfaktoren wie VEGF und Angiopoietin (ANGPT)-1 und -2 führen. Diese aktivierten Faktoren haben einen direkten Einfluss auf die EZ und regulieren die gesamten Prozesse der Angiogenese (Abbildung 3) (Chen et al. 2019).



**Abbildung 3:** Prozesse der Angiogenese im Synovium von RA-Patienten. Entzündlich aktivierte Makrophagen und RASF sezernieren zahlreiche pro-inflammatorische Zytokine, wie beispielsweise  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$  und  $IL-6$ , was zur Freisetzung von MMP, Chemokinen der CC-, CXC- sowie  $CX_3C$ -Familie und Wachstumsfaktoren wie VEGF, ANGPT1 und ANGPT2 führt. Diese Moleküle tragen zur EZ-Aktivierung, Aussprossung der EZ, der Ausbildung von Röhren mit Lumen (Tubes), der Stabilisierung und schließlich zur Bildung reifer Blutgefäße bei, bevor der Blutfluss initiiert wird. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

Der Prozess der Angiogenese wird eingeleitet, indem pro-angiogene Faktoren wie beispielsweise VEGF oder FGF an die EZ-Rezeptoren binden und diese aktivieren, was zur EZ-Aktivierung führt (Abbildung 3, 1.). Die EZ sezernieren daraufhin proteolytische MMP, die zur Degradation der Basalmembran und dem Ablösen der Gefäßwand stabilisierenden Perizyten beitragen. Das Ablösen der Perizyten wird zusätzlich vom pro-angiogenen Wachstumsfaktor ANGPT2 gefördert (Huang et al. 2010; Hammes et al. 2004). Die Degradation der Basalmembran ermöglicht es den EZ zu migrieren und zu proliferieren.

Für die geordnete Aussprossung der EZ in Richtung pro-angiogenen Stimulus werden die EZ über den Notch-Signalweg in Spitzen- (engl. *tip*) und Stiel- (engl. *stalk*) Zellen spezifiziert (Phng und Gerhardt 2009; Eilken und Adams 2010) (Abbildung 3, 2.). Stiel-Zellen zeigen eine hohe Aktivität des Notch-Signalwegs, während der Notch-Signalweg in Spitzen-Zellen

herunterreguliert ist. Charakteristisch für Spitzen-Zellen ist die Expression des Notch-Liganden DLL4 (engl. *delta like canonical notch ligand 4*) (Thurston et al. 2007). VEGF reguliert über einen negativen Feedback Loop zwischen VEGF und DLL4/Notch den VEGFR. Die VEGF/VEGFR2-Interaktion verstärkt die Expression von DLL4 in den Spitzen-Zellen, während die DLL4/Notch-Aktivierung in benachbarten EZ das Spitzen-Zellprofil inhibiert, in dem VEGFR2 herunterreguliert wird (Phng und Gerhardt 2009). Ein weiteres charakteristisches Merkmal der Spitzen-Zellen ist die Expression des EphrinB2 (EPHB2)-Liganden, der gemeinsam mit seinem Rezeptor EPH ein wichtiger Regulator der zellkontaktabhängigen Signalübertragung darstellt. Die EPHB2-Interaktion mit EPH bewirkt eine bidirektionale Signalweiterleitung in den Zellen: vorwärts bei Zellen, die den Rezeptor exprimieren, oder rückwärts bei Zellen, die den Liganden exprimieren. EPHB2 spielt vor allem eine wichtige Rolle bei der Internalisierung von VEGFR und somit der Weiterleitung des VEGF-Signals (Pitulescu und Adams 2010).

Aufgrund ihres Expressionsprofils bilden Spitzen-Zellen verstärkt Filopodien aus und führen die Stiel-Zellen in die richtige Position zur Bildung neuer Blutgefäße. Im Gegensatz dazu besitzen Stiel-Zellen die Fähigkeit, Tubes und Verzweigungen zu bilden (Abbildung 3, 3.). Sie proliferieren stärker als die Spitzen-Zellen und sind dazu in der Lage, Lumen zu bilden (Phng und Gerhardt 2009). Um das Gefäßnetzwerk zu erweitern, durchlaufen EZ im Verlauf der Angiogenese iterative Zyklen des Aussprossens, Verzweigens und der Bildung von Tubes, was dynamische Übergänge der Spitzen- und Stiel-Zellphänotypen erfordert, die unter anderem von der Notch-Signalweiterleitung reguliert werden (Eilken und Adams 2010; Phng und Gerhardt 2009). Gleichzeitig interagieren Spitzen-Zellen mit den Filopodien benachbarter Spitzen-Zellen, um über Ausbildung von VE-Cadherin-Verbindungen zu fusionieren und das Gefäßnetzwerk zu erweitern. Neue Gefäßverbindungen werden durch die Anlagerung der EZM an die Basalmembran, Rekrutierung von Perizyten und verstärkte Zell-Zell-Kontakte stabilisiert (Abbildung 3, 4.) (Potente et al. 2011; Jeansson et al. 2011). Zur Stabilisierung trägt auch maßgeblich die ANGPT1-Interaktion über den Tyrosinkinase-Rezeptor 2 bei (Augustin et al. 2009). Die finale Lumenbildung erfolgt schließlich durch Koaleszenz intrazellulärer Vakuolen, die sich mit Vakuolen benachbarter EZ verbinden (Potente et al. 2011).

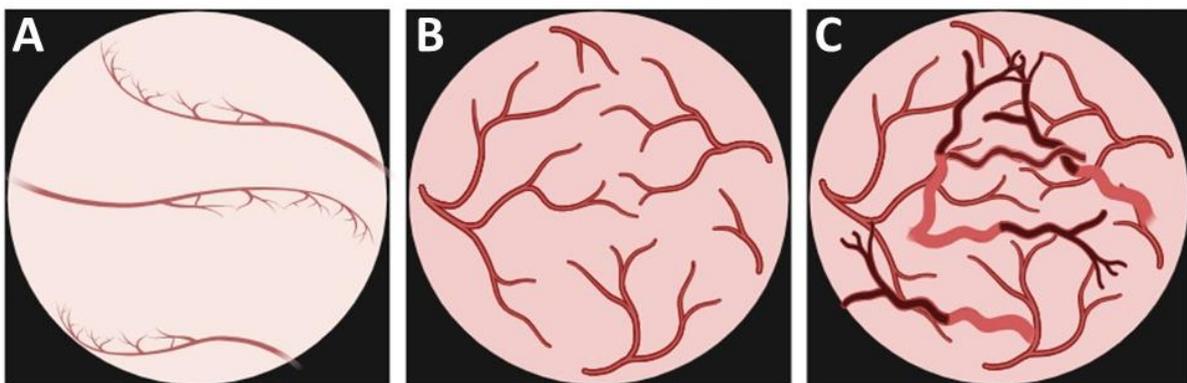
Die Initiation des Blutflusses im neuen Lumen modifiziert Gefäßverbindungen und aktiviert durch den veränderten Scherstress den Transkriptionsfaktor Krüppel-ähnlicher Faktor 2 (KLF2)

(Abbildung 3, 5.). Die neu entstandene Sauerstoff- und Nährstoff-Versorgung reduziert die VEGF-Expression und inaktiviert die endothelialen Sauerstoffsensoren, sodass sich das endotheliale Expressionsmuster in Richtung Ruhe-Phänotyps verschiebt (Potente et al. 2011).

#### 1.4.2.1 RA-vermittelte veränderte Gefäßneubildung im Synovium

Die synoviale Hyperplasie als Folge der lokalen Entzündung und der Invasion von Leukozyten in das entzündete Gelenk erfordert die Bildung neuer Blutgefäße, um das hypertrophe Gelenk mit Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen. Daher stellt die Gefäßneubildung ein frühes Ereignis in der RA dar (MacDonald et al. 2018; Zhang et al. 2017).

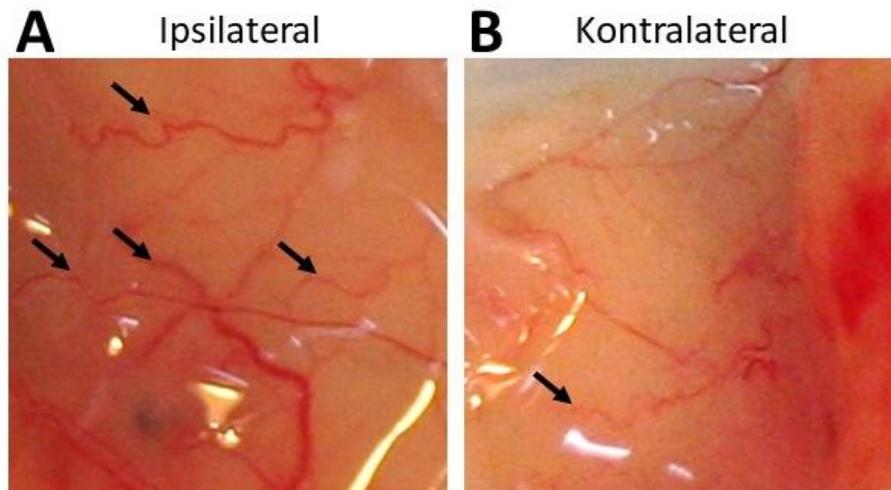
Unkontrollierte Angiogenese trägt maßgeblich zu pathologischen angiogenen Veränderungen bei, wie sie bei der RA, Psoriasis und Artherosklerose, aber auch bei der Tumorbildung zu finden ist. In Bezug auf die RA ist bereits bei Patienten mit einem frühen Stadium eine Veränderung der Angiogenese zu erkennen (Abbildung 4, B) (Orr et al. 2020). Im Vergleich zu Patienten ohne Arthritiden (Abbildung 4, A) ist die synoviale Oberfläche schon bei der frühen RA verändert und das Synovium stellt sich als sehr gefäßreich dar (Orr et al. 2020). Im Verlauf der Progression der RA nimmt die Anzahl an Gefäßen weiter zu und die Gefäße sind zunehmend durch eine diffuse und teilweise Helix-ähnliche Struktur gekennzeichnet (Abbildung 4, C).



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung Blick in das Gelenk. (A) Schematische Darstellung eines gesunden Gelenks, das wenige, gerade Gefäßen enthält. (B) Bereits in einem frühen Stadium der RA nimmt die Anzahl der Gefäße zu und weist eine deutlich veränderte Gefäßneubildung auf. (C) Die fortgeschrittene RA zeichnet sich durch eine starke Zunahme an Gefäßen aus, wobei die Gefäßstruktur teilweise Helix-ähnlich erscheint. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

Dass die RASF eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Helix-ähnlichen Gefäßen spielen, konnte auch in dieser Arbeitsgruppe im Rahmen von Vorarbeiten gezeigt werden

(Zimmermann 2011). Nach Implantation der RASF ins SCID-Maus-Modell der RA (Kapitel 1.6) konnten bereits 3 Tage nach der RASF-Implantation Helix-ähnliche Gefäße an den ipsilateralen und kontralateralen Implantaten nachgewiesen werden (Abbildung 5, A und B).



**Abbildung 5:** RASF-vermittelte Entstehung von Helix-ähnlichen Gefäßen im SCID-Maus-Modell der RA. Helix-ähnliche Gefäße (→) waren bereits nach 3 Tagen an den ipsilateralen (A) und kontralateralen (B) Implantaten zu erkennen. Die kontralateralen Implantate wiesen zu dem Zeitpunkt jedoch weniger Helix-ähnliche Gefäße auf.

Bislang ist jedoch nicht bekannt, wie sich die Kinetik der Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße darstellt und in welchem Zusammenhang die Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße mit der RASF-vermittelten Invasion im SCID-Maus-Modell steht. Auch die Rolle von Gefäßregulatoren wie beispielsweise VEGF, ANGPT2 und EFNB2 im Kontext der veränderten Gefäßstrukturen im RA-Synovium sowie der RASF-induzierten Helix-ähnlichen Gefäße im SCID-Maus-Modell der RA ist bislang unklar. Eine weitere Lücke stellt die Kenntnisse über Biomarker dar, die spezifisch in den pathologisch veränderten Gefäßen bei der RA reguliert sind.

#### 1.4.2.2 Die Rolle von Angiopoietin in der RA-vermittelten Angiogenese

Im gesunden Gewebe wird der Prozess der Gefäßstabilität und -erhaltung durch das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-angiogenen Faktoren reguliert. ANGPT spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts (Wu et al. 2020). Dieses Gleichgewicht ist bei entzündlichen Erkrankungen unter anderem durch eine übermäßige Expression des vaskulären Gefäßregulators ANGPT2 gestört (Scholz et al. 2015). ANGPT2 gehört zu der vaskulären Wachstumsfaktorfamilie der ANGPT, die eine Rolle bei der embryonalen und postnatalen Angiogenese spielen. Bislang wurden vier ANGPT identifiziert:

ANGPT-1, -2, -3 und -4. ANGPT2 wird hauptsächlich von vaskulären EZ, Epithelzellen und Organen wie den Ovarien, des Uterus und der Plazenta exprimiert. ANGPT2 bindet kompetitiv an dessen Rezeptor Tie2, der ebenfalls von ANGPT1 zur Stabilität der Gefäßwände gebunden wird, wobei nur die Bindung von ANGPT1 an Tie2 zu dessen Autophosphorylierung führt (Davis et al. 1996). Die ANGPT2-Tie2 Interaktion bewirkt eine Störung des ANGPT1-Tie2 vermittelten Stabilitätseffekts der EZ, da es durch die Bindung von ANGPT2 zu einer komplexen Formation zwischen Tie2,  $\alpha\beta3$ -Integrin und der fokalen Adhäsionskinase kommt. Dies bewirkt die Phosphorylierung der fokalen Adhäsionskinase, der Internalisierung von  $\alpha\beta3$ -Integrin und schließlich die Destabilisierung der EZ (Thomas et al. 2010). Interessanterweise induziert die synergistische Interaktion zwischen ANGPT2 und VEGF pro-angiogene und inflammatorische Mechanismen, die über den Notch-Signalweg im entzündeten RA-Gelenk vermittelt wird (Gao et al. 2013).

#### 1.4.3 Vaskulogenese und Arteriogenese

Neben der Angiogenese sind noch zwei weitere Formen der Gefäßneubildung bekannt: die Vaskulogenese und die Arteriogenese.

Die Vaskulogenese bezeichnet den Prozess der *de novo*-Differenzierung eines primitiven Gefäßnetzwerks im Embryo aus dem Zusammenbau von aus dem Mesoderm stammenden Endothelvorläuferzellen (EPZ), den Angioblasten (Risau und Flamme 1995). Ähnlich wie bei der Angiogenese wird die Vaskulogenese durch ein pro-angiogenes VEGF-Signal induziert. Hierbei werden die EPZ im Knochenmark mobilisiert, die daraufhin in reife EZ differenzieren (Peichev et al. 2000). Charakteristisch für die EPZ ist die Expression von VEGFR2, CD34, CD133 und das Chemokin CXCR4 (Peichev et al. 2000; Pákozdi et al. 2009; Paleolog 2005).

Die Arteriogenese ist ein seit langem bekannter und gut beschriebener Prozess, bei dem der Blutfluss nach einem arteriellen Verschluss durch Umstrukturierung des zirkulierenden Kollateralsystems wiederhergestellt wird (Christoforidis et al. 2005). Im Gegensatz zur Angiogenese und Vaskulogenese kommt es jedoch nicht zu einer Neubildung der Gefäße, sondern zu einem Gefäßumbau bereits existierender Kollateralgefäße. Die Arteriogenese lässt sich sowohl unter gesunden als auch unter pathologischen Bedingungen finden. Bei einem arteriellen Verschluss kommt es zu einem veränderten Druckgradienten im Blutfluss, sodass ein größeres Blutvolumen durch die präexistierenden Kollateralgefäße fließt (Christoforidis et al. 2005; Wei et al. 2001). Die erhöhten hämodynamischen Kräfte aktivieren die EZ in den

Kollateralgefäßen, was die Expression von Chemokinen, Adhäsionsmolekülen und der endothelialen Stickstoffsynthase (eNOS) in den EZ induziert (Cui et al. 2009). Die Chemokine bewirken die Rekrutierung und Anheftung zirkulierender Monozyten an die aktivierten EZ. Anschließend transmigrieren die Monozyten in den Subintimalraum und differenzieren dort zu TGF $\beta$ -, TNF $\alpha$ -, EGF- (engl. *epidermal growth factor*) und FGF-exprimierenden Makrophagen (Bruce et al. 2014; van Royen et al. 2002; Hofer et al. 2004; Deindl et al. 2003). Die freigesetzten Wachstumsfaktoren und Zytokine diffundieren in die mediale Schicht der Kollateralen und aktivieren die dort für die Gefäßumstrukturierung notwendigen Signalwege der glatten Muskelzellen (engl. *smooth muscle cells*, SMC) (Hofer et al. 2004; Buschmann et al. 2003). Die SMC transformieren ihren ruhenden, kontraktilen Phänotyp zu einem proliferativen, migratorischen und synthetischen Phänotyp und migrieren in den subendothelialen Raum, wo sie die EZM degradieren und schließlich durch die Synthese von EZM-Komponenten wie Kollagen, Elastin und Proteoglykane eine neue SMC-Schicht bilden. Die auf diese Weise entstandenen reifen Kollateralgefäße mit vergrößertem Gefäßdurchmesser bewirken eine Verringerung des Druckgradienten im Blutfluss und normalisieren die mechanischen Belastungen der Gefäßwand (Scholz et al. 2000; Ungerleider et al. 2016). Folglich wird nach Umstrukturierung der EZM und Stabilisierung der Gefäße die EZ-Aktivierung herunterreguliert und die SMC redifferenzieren in ihren kontraktilen, ruhenden Phänotyp, wodurch die Arteriogenese beendet wird (Brown et al. 2005).

### 1.5 Die extrazellulären Matrix

Die EZM ist eine dreidimensionale, nicht-zelluläre Struktur, die in jedem Gewebe vorkommt und unverzichtbar für das lebensfähige humane System ist. Die EZM wird bereits während der frühen Embryonalentwicklung gebildet und zeichnet sich durch eine für jedes Organ einzigartige Struktur und Zusammensetzung aus. Eine wichtige Funktion der EZM ist die physische Unterstützung der Gewebeintegrität und -elastizität, wobei sie sich als dynamische Struktur darstellt, die ständig umstrukturiert wird, um die Homöostase des Gewebes zu kontrollieren (Hynes 2009). Bei Säugetieren besteht die EZM aus ca. 300 Proteinen, die auch als Kernmatrixom bekannt sind und beinhaltet Proteine wie Proteoglykane, Laminine und Glykoproteine. Hauptbestandteil ist das Kollagen, von dem insgesamt 27 Proteine der Kollagenfamilie bekannt sind (Kollagen Typ I-XXVI) (Kusindarta und Wihadmadyatami 2018). In den verschiedenen Geweben werden unterschiedliche Kollagenmoleküle exprimiert (Tabelle 2). Die interstitielle Bindegewebsmatrix umgibt alle Zellen und besteht hauptsächlich

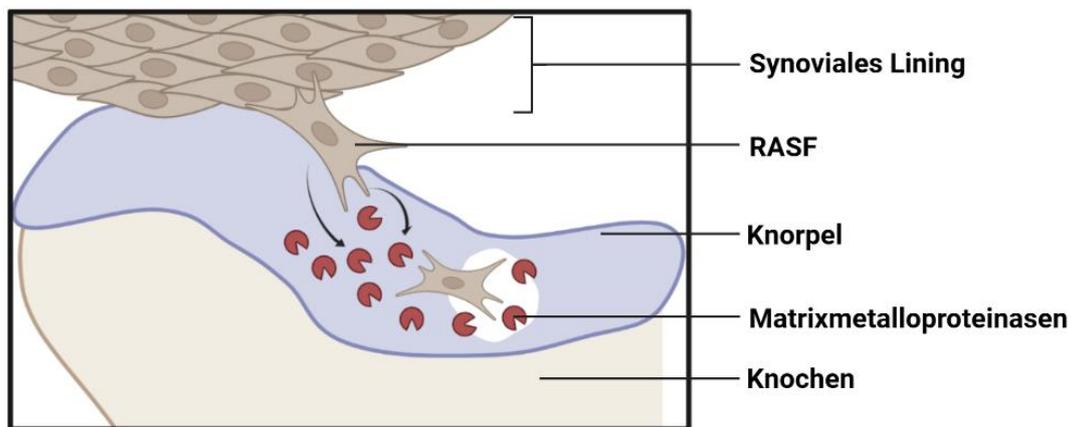
aus Kollagen Typ I sowie Fibronectin, was dem Gewebe ein strukturelles Gerüst verleiht (Theocharis et al. 2016). Die Basalmembran der Endothelien und Epithelien weist im Vergleich zur interstitiellen Matrix eine kompaktere Struktur auf und besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ IV, Laminin, Heperansulfatproteoglykanen und Proteinen wie Nidogen und Entactin, die von Endothelzellen, Epithelzellen und Integrin-exprimierenden Myofibroblasten synthetisiert und freigesetzt werden (Tabelle 2). In der Knochenmatrix ist hauptsächlich Kollagen Typ I zu finden, das von dem Proteoglykan Decorin für die Bildung von Kollagenfasern gebunden wird (Alberts 2017). Die Knorpelmatrix besteht zu 90% aus Kollagen Typ II. Aggrekane binden die in der Knorpelmatrix vorkommende Hyaluronsäure und fungieren so als mechanische Unterstützung (Tabelle 2).

| Gewebe                                  | Zentrale Kollagene            |   | Proteoglykane            |   |
|---|-------------------------------|---|--------------------------|---|
|   | Typ                           | Polymerisiert zu  | Bezeichnung              | Funktion  |
| <b>Knochen, Haut, Sehnen, Bänder</b>    | I und V                       | Fibrillen   | Decorin                  | Kollagen-bindendes Protein für die Bildung von Kollagenfasern |
| <b>Knorpel, Bandscheibe</b>             | 90%: II<br>10%: VI, IX, X, XI | Fibrillen bzw. laterale Verbindungen mit Typ II-Fibrillen | Aggrekan                 | Mechanische Unterstützung, bildet Aggregate mit Hyaluron      |
| <b>Basalmembran</b>                     | IV und XVIII                  | Großflächige Netzwerke, nicht-fibrillär                   | Perlekan (Heperansulfat) | Strukturelle und filternde Funktionen der Basallamina         |
| <b>Interstitielle Bindegewebsmatrix</b> | I                             | Fibrillen   | Decorin                  | Bindet an Typ I-Kollagen und TGFβ                             |

**Tabelle 2:** Zusammensetzungen der Knochen-, Knorpel- und Bindegewebsmatrix (Alberts 2017).

Weiterhin kann die EZM auch Wachstumsfaktoren wie FGF und andere Signalmoleküle wie TGFβ binden und damit das Zellverhalten beeinflussen (Border und Noble 1994; Yu et al. 2016). Die EZM unterliegt in einem gesunden Milieu einem Gleichgewicht aus Zell-vermittelter Synthese, Degradation, Wiederausammenbau und zahlreichen chemischen Modifikationen, das in komplexen Prozessen die Homöostase des Gewebes aufrechterhält. Hierbei sind vor allem die Spaltung und die Degradation sowie die Aktivierung von Wachstumsfaktoren von wichtiger Bedeutung, die über enzymatische Aktivitäten der MMP vermittelt werden. MMP werden entweder als lösliche Enzyme freigesetzt oder liegen als Membran-verankerte Proteinase vor und werden mittels proteolytischer Spaltung oder Modifizierung der

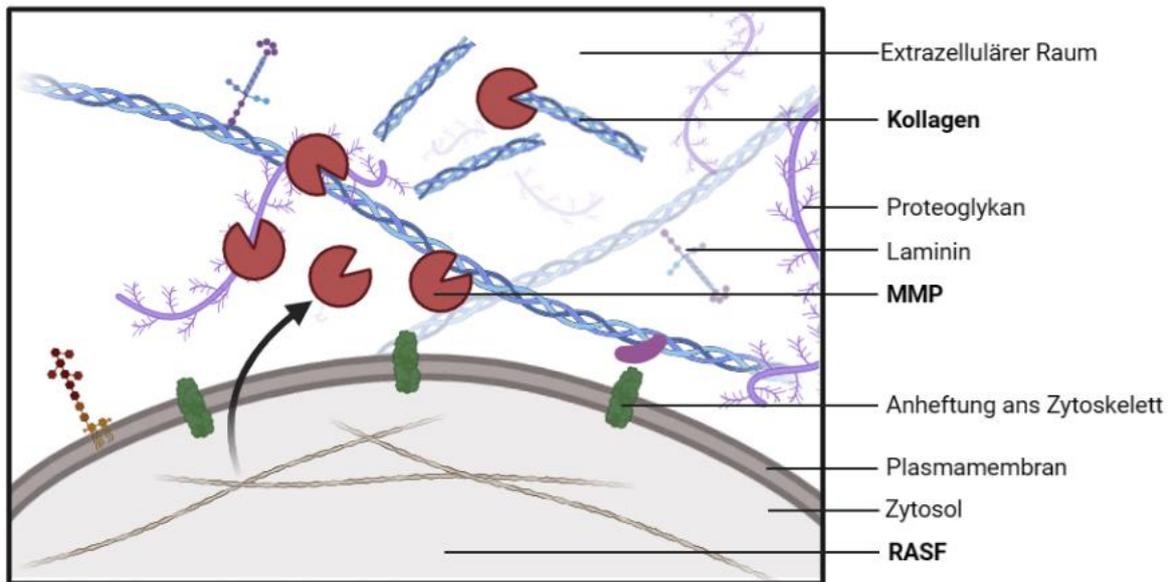
Thiolgruppe durch Oxidation aktiviert. MMP können alle Proteine der EZM spezifisch schneiden. Bislang wurden 23 humane MMP identifiziert, die sich folgende funktionelle Domänen teilen: Signalpeptiddomäne, Propeptiddomäne, katalytische Domäne und Hämapoxin-ähnliche Domäne (mit Ausnahme von MMP7, -23 und -26) (Visse und Nagase 2003; Järveläinen et al. 2009). Unter normalen Bedingungen sind Expression und Aktivität der MMP gering, allerdings steigt beides, beispielsweise bei den Entzündungsprozessen, im Synovium der RA stark an und verschiebt das Gleichgewicht in Richtung EZM-Degradation (Abbildung 6) (Ainola et al. 2005).



**Abbildung 6:** RASF-vermittelte Matrixdegradation. Aktivierte RASF sezernieren zahlreiche Matrixmetalloproteinasen (MMP) wie beispielsweise MMP3 und zersetzen so die Matrix von Knorpel und demineralisiertem Knochen. Dies trägt maßgeblich zur Gelenkdestruktion in RA-Patienten bei. Abbildung erstellt in BioRender.com.

### 1.5.1 Einfluss von EZM-Fragmenten auf die RA

Wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben, sezernieren aktivierte RASF unter pro-inflammatorischen Bedingungen vermehrt MMP, was zur Folge hat, dass sich das unter normalen Bedingungen in der EZM vorherrschende Gleichgewicht verschiebt und es zu einer übermäßigen Matrixdegradation und MMP-Aktivität kommt, wodurch beim Abbau der EZM zahlreiche Matrixfragmente freigesetzt werden. Diese freigesetzten Matrixfragmente aktivieren und beeinflussen wiederum die im Synovium lokalisierten RASF, indem sie die Adhäsion und Migration fördern und somit maßgeblich zur destruktiven Progression der RA beitragen (Lefèvre et al. 2017). Weiterhin werden bei der Degradation bzw. Umstrukturierung der Basalmembran im Kontext der pathologisch induzierten Angiogenese, wie beispielsweise bei der Tumorgenese, Matrixfragmente der Kollagene Typ IV und Typ XVIII freigesetzt, die als Canstatin, Arresten, Tumstatin und Endostatin bekannt sind und anti-angiogene Eigenschaften aufweisen (Abbildung 7) (Mundel und Kalluri 2007; Felbor et al. 2000).



**Abbildung 7:** RASF-vermittelte Freisetzung von Kollagenfragmenten. Aktivierte RASF sezernieren vermehrt Matrixmetalloproteinasen (MMP), wodurch die Matrix degradiert wird. In diesem Zusammenhang werden Matrixfragmente beispielsweise des Kollagens Typ IV und XVIII freigesetzt, die als Canstatin, Tumstatin, Arresten und Endostatin bekannt sind. Abbildung erstellt in BioRender.com.

#### 1.5.1.1 Fragmente des Kollagen Typ IV

Kollagen Typ IV ist der Hauptbestandteil der Basalmembran, somit auch der Basis der vaskulären EZ-Schicht, und besteht aus sechs verschiedenen  $\alpha$ -Ketten,  $\alpha 1$ - $\alpha 6$ , die eine Tripel-Helixstruktur ausbilden. Die Zusammensetzung der  $\alpha$ -Ketten wird durch die C-terminale Domäne von Kollagen Typ IV bestimmt, die auch als nicht-kollagene 1 (NC1) Domäne bezeichnet wird (Hudson et al. 1993; Kühn 1995). Während der Tumorprogression und Metastasierung wird Kollagen IV in Folge der EZM-Degradierung verstärkt von MMP2 und MMP9 degradiert (Zeng et al. 1999). Durch Schneiden an der NC1-Domäne der  $\alpha 1$ -3-Kette von Kollagen IV werden Fragmente freigesetzt, für die in der Literatur eine anti-angiogene Wirkung beschrieben wurde. Zu diesen Fragmenten zählen beispielsweise Canstatin, Arresten und Tumstatin. Diese Fragmente inhibieren die EZ-Proliferation sowie die Migration und induzieren die Apoptose der EZ (Mundel und Kalluri 2007).

Arresten ist ein 26 kDa großes Matrixfragment der NC1-Domäne der  $\alpha 1$ -Kette und inhibiert die Proliferation der EZ über den bFGF (engl. *basic fibroblast growth factor*). Außerdem wirkt Arresten über das Binden des  $\alpha 1\beta 1$ -Integrins und über die damit einhergehende Inhibierung des Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signalwegs anti-angiogen (Colorado et al. 2000). Ein weiteres Matrixfragment von Kollagen IV ist 38 kDa große Tumstatin, das aus der NC1-Domäne der  $\alpha 3$ -Kette stammt und über  $\alpha \beta 3$ -Integrine an EZ bindet (Maeshima et al.

2000). Die Bindung an  $\alpha\beta 3$ -Integrine spielt dabei eine wichtige Rolle für die anti-angiogene Wirkung von Tumstatin (Maeshima et al. 2001). Bei Canstatin handelt es sich um ein 24 kDa großes Kollagen IV-Fragment der  $\alpha 2$ -Kette, das ubiquitär im gesamten Körper exprimiert wird (Kamphaus et al. 2000; Khoshnoodi et al. 2008). Canstatin interagiert wie Tumstatin über  $\alpha\beta 3$ -Integrine, wobei Canstatin zusätzlich  $\alpha\beta 5$ -Integrine bindet (Magnon et al. 2005; Maeshima et al. 2000). Es wird angenommen, dass Canstatin, ebenso wie Arresten, in Folge der Membrantyp (MT)1- MMP und MT2-MMP vermittelten Kollagen IV-Degradation über die Interaktion mit der  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Kette der NC1-Domäne freigesetzt wird (Rebustini et al. 2009). Jedoch konnte bislang nicht geklärt werden, ob MMP2 und MMP9 ebenfalls zur Freisetzung von Canstatin beitragen. Interessanterweise ist Canstatin in der interstitiellen Matrix der Synovialmembran in RA Patienten exprimiert und inhibiert die Tubebildung sowie Migration von lymphatischen EZ mittels Inhibierung der ANGPT1-induzierten Proliferation (Poduval et al. 2007; Hwang-Bo et al. 2012). Allerdings ist bislang sehr wenig über das Expressionsprofil von Canstatin in den Organen und im Serum sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen bekannt.

#### 1.5.1.2 Fragmente des Kollagen Typ XVIII

Das humane Gen des Kollagen Typ XVIII ist auf dem Chromosom 21 lokalisiert und gehört zu einer Gruppe kollagenähnlicher Proteine der EZM, auch bekannt als Multiplexine (Oh et al. 1994b; Marneros und Olsen 2005). Am nächsten verwandt ist das Kollagen XVIII mit dem Kollagen XV, mit dem es sich ein N-terminales Thrombosponin-ähnliches Modul teilt. Kollagen XVIII besitzt eine trimere Struktur mit einem zentralen Bereich aus drei homologen  $\alpha 1$ -Ketten und besteht aus 10 Kollagenregionen, die durch 11 NC-Domänen unterbrochen sind (Halfter et al. 1998; Oh et al. 1994a). Als einer der Hauptbestandteile der epithelialen und vaskulären Basalmembran ist Kollagen XVIII weit verbreitet und spielt insbesondere bei der Gefäßneubildung als negativer Regulator der Angiogenese eine große Rolle (Halfter et al. 1998; Li und Olsen 2004). Viele Studien belegen, dass Kollagen XVIII in zahlreiche pathologische Prozesse wie bei der Arteriosklerose und renalen Ischämie als Mediator des Leukozyteneinstroms involviert ist (Moulton et al. 2004; Zaferani et al. 2014). Kollagen XVIII wird mit hoher Effizienz von den Proteasen Cathepsin L und Elastase geschnitten, wodurch das 22 kDa große Kollagenfragment Endostatin freigesetzt wird (Felbor et al. 2000; Wen et al. 1999). Endostatin besitzt mehrere interagierende Bindungsdomänen, an die Integrine wie

$\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$  sowie  $\alpha v\beta 5$  binden und darüber hinaus über die Bindung wiederum auf EZ wirken (Sudhakar et al. 2003; Rehn 2001). Endostatin kann beispielsweise den  $\alpha v\beta 3$ -Integrin-Liganden Gelatine binden und darüber EZ hemmen (Kim et al. 2000). Weiterhin ist auch ein direkter Einfluss auf die EZ möglich, indem Endostatin an die EZ-Wachstumsfaktorrezeptoren VEGFR1 und VEGFR2 bindet (Kim et al. 2002; Hajitou et al. 2002). Über beide Mechanismen kann Endostatin somit die Gefäßneubildung inhibieren.

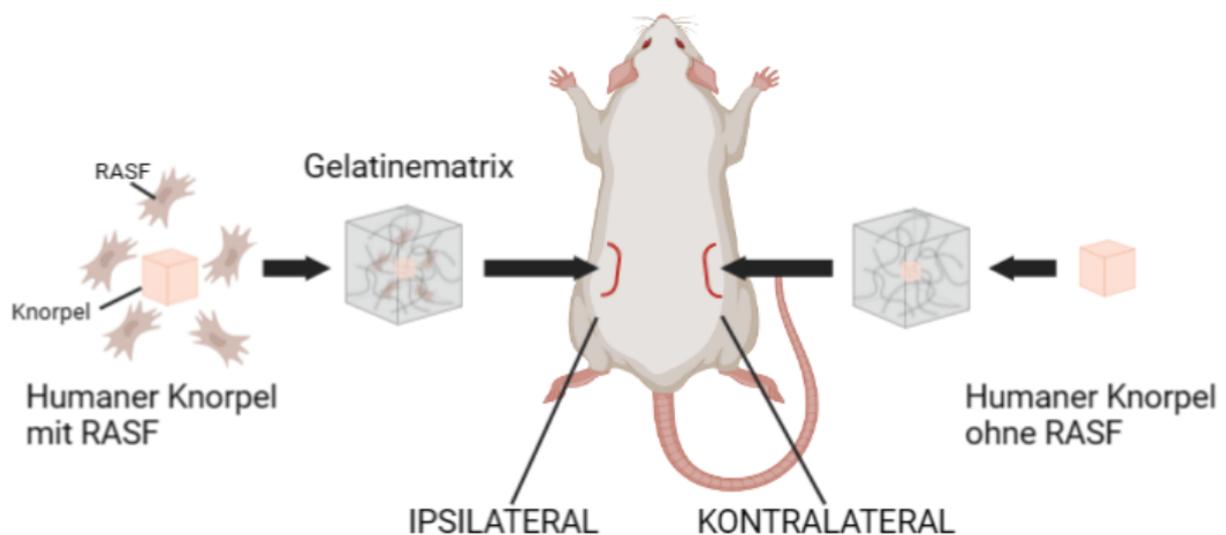
## 1.6 Analyse der RASF-vermittelten Matrixinvasion im SCID-Maus-Modell der RA

Aufgrund der vielfältigen Abläufe, die in komplexen pathogenen Prozessen den Ausbruch der RA induzieren und aufrechterhalten, ist es bisher nicht möglich, die Progression der RA mit allen spezifischen Charakteristika in einem Tiermodell darzustellen. Allerdings lassen sich bestimmte Eigenschaften der RA unter definierten Bedingungen in Tiermodellen analysieren. Ein Beispiel hierfür ist das SCID (engl. *severe combined immunodeficiency*) -Maus-Modell der RA, mit dem es möglich ist, unterschiedliche pathophysiologische Mechanismen der RA unter Abwesenheit von T- und B-Zellen des adaptiven Immunsystems zu untersuchen. Wie der Name des Modells aussagt, weisen SCID-Mäuse in den Genen, die für die Entwicklung und Differenzierung von T-Lymphozyten kodieren, eine Mutation auf, sodass der adaptive Teil des Immunsystems nicht funktionell ausgebildet werden kann. Das bedeutet, dass SCID-Mäuse sehr anfällig für Infektionen sind und unter pathogenarmen Bedingungen gehalten werden müssen. Die Immundefizienz hat allerdings den Vorteil, speziesfremde Gewebe und Zellen implantieren zu können, da diese nicht abgestoßen werden. Das SCID-Maus-Modell wurde daher für Untersuchungen zur Pathophysiologie der RA etabliert, um molekulare Interaktionen von Gewebe und Zellen humanen Ursprungs im Kontext der Knorpel- und Knochendestruktionen detaillierter analysieren zu können.

### 1.6.1 Implantationstechniken

Ursprünglich wurde das SCID-Maus-Modell zunächst für die Co-Implantation des gesamten RA-Synoviums und einem Stück humanen Knorpels entwickelt, um die Interaktionen zwischen Synovium und Knorpel in der Abwesenheit der peripheren humanen Blutkomponenten zu untersuchen (Rendt et al. 1993; Geiler et al. 1994). Zur spezifischeren Analyse des RASF-Phänotyps ohne Einfluss anderer Synovialzellen und humanen Matrixkomponenten bezüglich der Knorpelinteraktion wurden in späteren Versuchen kultivierte RASF zusammen mit einem humanen Knorpel unter die Nierenkapsel implantiert (Müller-Ladner et al. 1996). Im weiteren

Verlauf wurde das SCID-Maus-Modell nochmals weiterentwickelt und die RASF mittels der *inverse wrap*-Technik subkutan statt unter die Nierenkapsel implantiert (Judex et al. 2001). Die Migration der RASF über das Blutssystem mit anschließender Invasion in von der Implantationsstelle entfernt liegende Knorpel konnte anhand des SCID-Maus-Modells von Lefèvre et al. gezeigt werden. Hierfür wurden ipsilateral und kontralateral eine Trägermatrix mit humanem Knorpel subkutan implantiert, wobei nur das ipsilaterale Implantat RASF enthielt (Abbildung 8) (Lefèvre et al. 2009). Somit kann die direkte Invasion der RASF in den co-implantierten Knorpel ipsilateral untersucht werden, wohingegen die RASF zum kontralateral eingesetzten Knorpel erst migrieren müssen.



**Abbildung 8:** SCID-Maus-Modell der RA. Subkutane Co-Implantation von RASF und humanem Knorpel mit einer Gelatinematrix auf der ipsilateralen Seite, während kontralateral nur humaner Knorpel ohne RASF in einer Gelatinematrix implantiert wird. Abbildung erstellt in BioRender.com.

### 1.6.2 Analyse der Migration und Invasion im SCID-Maus-Modell

Mit dem SCID-Maus-Modell konnte demonstriert werden, dass kultivierte RASF sowohl über mehrere Passagen als auch während der 60-tägigen Implantationsperiode ihren aggressiven-destruktiven Phänotyp aufrechterhalten. Somit konnte gezeigt werden, dass RASF auch ohne Anwesenheit von Makrophagen oder Lymphozyten in den co-implantierten Knorpel invadieren und eine perichondrozytäre Knorpeldegradation bewirken können (Neumann et al. 2002; Müller-Ladner et al. 1997). Weiterhin kann dieses Tiermodell auch Aufschluss über der Verbreitung der RA in einem lebenden Organismus geben, da es zeigt, dass RASF als Schlüsselspieler der Matrixdegradation dazu in der Lage sind, ohne zusätzliche Stimuli über das vaskuläre System in entfernte Knorpel zu invadieren und diese zu degradieren (Lefèvre et

al. 2009). RASF können somit ihr aggressives und destruktives Potenzial nicht nur erhalten, sondern es auch auf ein entferntes, bislang nicht betroffenes, Knorpelareal übertragen (Lefèvre et al. 2009).

### 1.6.3 Analyse der Angiogenese im SCID-Maus-Modell

Wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben wurde, ist die verstärkte pathogene Angiogenese ein frühes und charakteristisches Merkmal der RA und trägt maßgeblich zu dessen Progression bei. Auch im SCID-Maus-Modell konnte bereits durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die RASF spezifisch die Angiogenese modifizieren und es bereits 3 Tage nach RASF-Implantation zur Ausbildung Helix-ähnlicher Gefäße an den ipsilateralen und kontralateralen Implantaten kommt. Interessanterweise sind die Helix-ähnlichen Gefäße nur nach der Implantation von RASF und nicht nach Implantation von gesunden SF zu beobachten, was mutmaßen lässt, dass das durch chronische Entzündung veränderte Expressionsprofil der RASF spezifisch die Interaktion mit den EZ und somit die Angiogenese beeinflusst (Zimmermann 2011). Daher wurde das beschriebene SCID-Maus-Modell der RA eingesetzt, um die Interaktion der RASF mit EZ im Kontext der Gefäßneubildung im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchen.

## 2. ZIEL DER ARBEIT

Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass es schon in frühen Stadien der RA zu Veränderungen bei der Angiogenese im Synovium von RA-Patienten kommt. Diese Veränderungen führen im späten Stadium der RA zu einer erheblichen Modifikation der Gefäßstruktur, sodass die Gefäße diffus und teilweise Helix-ähnlich erscheinen (Kapitel 1.4.2). Die Modifikation der Gefäßstrukturen zu Helix-ähnlichen Gefäßen konnte auch im Rahmen von Vorarbeiten im SCID-Maus-Modell der RA beobachtet werden. Hier wurden die Helix-ähnlichen Gefäße RASF-spezifisch induziert, was spezifische RASF/EZ-Interaktionen vermuten lässt. Allerdings wurde die Prozesse der spezifischen RASF/EZ-Interaktionen bislang nicht näher untersucht, sodass keine Kenntnisse darüber vorhanden sind, wie sich die RASF/EZ-Interaktionen sowohl funktionell als auch auf molekularer Ebene auswirken. Auch wurden bislang keine spezifischen Moleküle identifiziert, die in die Entstehung der veränderten Gefäßstruktur bei der RA involviert sind. Weiterhin charakteristisch für die Progression der RA ist das chronisch entzündliche Milieu im hyperplastischen Synovium betroffener Gelenke. Bedingt durch die andauernde chronische Entzündungsreaktion sowie der erhöhten Präsenz von Entzündungszytokinen durch wiederkehrende inflammatorische Stimuli bei entzündlichen Schüben, liegen erhöhte Konzentrationen an Entzündungszytokinen vor, wie z.B. von IL-1 $\beta$  oder TNF $\alpha$ . Dies hat zur Folge, dass die RASF einen aggressiven und destruktiven Phänotyp entwickeln, der es den RASF ermöglicht, verstärkt Matrix zu degradieren und in den Knorpel und darunterliegenden Knochen zu invadieren. Zudem hat die permanente Aktivierung der RASF auch einen Einfluss auf die RASF/EZ-Interaktionen im Synovium, da aktivierte Fibroblasten als Wundheilungszellen einen stimulierenden Effekt auf die EZ haben, zur Angiogenese anregen, aber auch an den Umstrukturierungen der Gefäße beteiligt sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die RASF-vermittelte veränderte Angiogenese zu charakterisieren. Hierfür sollte der Verlauf der Entstehung der Fibroblasten-vermittelten veränderten Angiogenese *in vivo* im SCID-Maus-Modell der RA beschrieben und der Zusammenhang mit der RASF-vermittelten Invasion untersucht werden. Weiterhin sollte die Frage geklärt werden, ob es auch in einem Kurzzeit-*in vitro*-Experiment möglich ist, den Einfluss der RASF auf die EZ zu beschreiben und ob molekulare Faktoren, wie beispielsweise spezifische Gefäßregulatoren, eine veränderte Expression im Kontext der RASF/EZ-Interaktion aufweisen. In diesem Kontext sollten auch die im Kurzzeit-*in vitro*-Experiment identifizierten

Faktoren im SCID-Maus-Modell der RA sowie im Synovium von RA- und OA-Patienten analysiert werden. Zudem sollte untersucht werden, welchen Einfluss eine wiederholte Exposition von RASF mit Entzündungszytokinen auf die Angiogenese hat und wie sich diesbezüglich das Expressionsprofil wiederholt aktivierter RASF verändert. Im Fokus stand deshalb die Expression von pro-inflammatorischen Molekülen und angiogenen Faktoren, die mit der Progression sowie der Angiogenese der RA assoziiert sind. Zuletzt sollte außerdem die Frage geklärt werden, welchen Einfluss die während der RASF-vermittelten Gefäßumstrukturierung freigesetzten Matrixfragmente auf die RASF/EZ-Interaktionen bzw. die RASF-vermittelte Angiogenese *in vitro* und *in vivo* haben. Folgende Punkte wurden im Verlauf der Arbeit bearbeitet:

- 1.) Charakterisierung der RASF-vermittelten veränderten Angiogenese im SCID-Maus-Modell der RA mit Beschreibung der Kinetik der veränderten Angiogenese und Analyse der RASF-vermittelten Invasion
- 2.) Charakterisierung der funktionellen RASF/EZ-Interaktionen bezüglich der veränderten Angiogenese im Kurzzeit-*in vitro*-Experiment
- 3.) Untersuchung der Expression von spezifischen Gefäßregulatoren im Kurzzeit-*in vitro*-Experiment in Bezug auf die RASF/EZ-Interaktionen
- 4.) Analyse der identifizierten Faktoren in der veränderten Angiogenese im SCID-Maus-Modell der RA sowie im Synovium von RA- und OA-Patienten
- 5.) Analyse der wiederholten (= repetitiven) Stimulierung von RASF hinsichtlich des Expressionsprofils von pro-inflammatorischen Zytokinen und Faktoren der Angiogenese
- 6.) Analyse des Einflusses von Matrixfragmenten auf die RASF/EZ-Interaktionen *in vitro* und *in vivo*
- 7.) Testen der Matrixfragmente bzgl. der RASF-vermittelten veränderten Angiogenese

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten Aufschluss über die Rolle von chronisch aktivierten RASF hinsichtlich der veränderten Angiogenese in der RA erbringen und in diesem Zusammenhang die molekularen Mechanismen der spezifischen RASF/EZ-Interaktionen erklärt werden. In diesem Zusammenhang sollte auch geklärt werden, welchen Einfluss anti-angiogene Matrixfragmente auf die RASF/EZ-Interaktionen haben.

### 3. MATERIAL

#### 3.1 Verwendete Tiere

Für die *in vivo*-Analysen der RASF/EZ- sowie RASF/Matrix- Interaktionen auf die Gefäßneubildung wurden Mäuse verwendet, die einen schweren kombinierten Immundefekt (SCID) aufweisen, welcher sowohl die Reifung von B- als auch der T-Lymphozyten betrifft. SCID-Mäuse tragen eine genetisch autosomal-rezessive Mutation, die als *Prkdc<sup>scid</sup>* bezeichnet wird. Diese Mutation bewirkt eine Umordnung einzelner Genelemente der Immunglobulin- und T-Zell-Antigenrezeptor-Gene, wodurch den SCID-Mäusen funktionsfähige Lymphozyten fehlen. SCID-Mäuse besitzen lediglich normale natürliche Killerzellen, Makrophagen und Granulozyten.

Für die in dieser vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vivo*-Experimente wurden 6-8 Wochen alte, weibliche Fox Chase SCID-Mäuse mit der Bezeichnung CB17/Icr-*Prkdc<sup>scid</sup>*/IcrIcoCrl von Charles River (Sulzbach) verwendet. Die SCID-Mäuse wurden unter keimarmen Bedingungen gezüchtet und am Biomedizinischen Forschungszentrum Seltersberg in Gießen ebenfalls keimarm gehalten. Die Durchführung der Tierexperimente nach dem Tierschutzgesetz wurde vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt (Az. V54 – 19 c 20 15 h 01 GI 20/10).

#### 3.2 Verwendete Zellen

| Name   | Hersteller                           |
|--|--------------------------------------|
| <i>Umbilical vein endothelial cells</i> (HUVEC)                        | PromoCell, Heidelberg, Deutschland   |
| Synoviale Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RASF) | Aus der Gewebebank der Arbeitsgruppe |

**Tabelle 3:** Verwendete Zelllinien und primäre Zellen

#### 3.3 Medien und Lösungen

| Bezeichnung        | Bestandteile   |
|--------------------|--|
| Einfriermedium     | FCS, 10% DMSO, gelagert bei 4°C für ca. 1-2 Wochen   |
| Eosin-Lösung       | 1% Eosin, H <sub>2</sub> O (filtriert): dunkel gelagert und vor Gebrauch einige Tropfen 96%ige Essigsäure zugegeben  |
| Hämatoxylin-Lösung | 0,1% Hämatoxylin, 0,2 g/l Natriumjodat, 50 g/l Kaliumaluminiumsulfat: vollständig in H <sub>2</sub> O gelöst; 50 g/l Chloraldehyd; 1 g/l Zitronensäure; filtriert, dunkel gelagert |

|                           |  |
|---------------------------|--|
| TAE-Puffer                | 40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA  |
| Lösemittel Arresten       | 20mM Tris, 150mM NaCl (pH = 8.0)   |
| RASF-Zellkulturmedium     | 500 ml DMEM ( <i>low glucose</i> ), 10% hitzeinaktiviertes FCS, 100 U/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin, 10 mM HEPES, Lagerung bei 4°C für bis zu ca. 1 Monat |
| Endothelzell-Kulturmedium | 50 ml Endothelial Cell Growth Medium 2 + 1,25 ml Supplement Mix  |

**Tabelle 4:** Verwendete Medien und Lösungen.

### 3.4 Enzyme

| Bezeichnung               | Hersteller  | Katalognummer |
|---------------------------|---|---------------|
| Trypsin-EDTA              | Capricorn-Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland | TRY-1B10      |
| AMV Reverse Transkriptase | Promega, Walldorf, Deutschland                    | M510F         |
| Dispase                   | Corning, New York, USA                            | 354235        |
| Proteinase K              | ABclonal, Woburn, USA                             | RP02503LQ     |
| Accutase                  | Capricorn-Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland | ACC-1B        |
| Hyaluronidase (Type III)  | Sigma Aldrich, St. Louis, USA                     | H2126-100mg   |

**Tabelle 5:** Verwendete Enzyme.

### 3.5 Antikörper

#### 3.5.1 Primäre Antikörper für die immunhistochemischen Analysen

| Antigen        | Spezifität                       | Verdünnung | Hersteller                    | Produkt-nummer |
|----------------|----------------------------------|------------|-------------------------------|----------------|
| Vimentin       | Monoklonal Maus anti-human       | 1:100      | DAKO, Hamburg, Deutschland    | M7020          |
| CD31           | Monoklonal Maus anti-human       | 1:50       | R&D Systems, Minneapolis, USA | BBA7           |
| CD63           | Polyklonal Kaninchen anti-human  | 1:200      | Proteintech, Illinois, USA    | 25682-1-AP     |
| Ephrin-B2      | Polyklonal Ziege anti-human/Maus | 1:20       | R&D Systems, Minneapolis, USA | BAF496         |
| Angiopoietin-2 | Monoklonal Maus anti-human/Maus  | 1:50       | R&D Systems, Minneapolis, USA | MAB098         |

|                |                                      |      |                                  |          |
|----------------|--------------------------------------|------|----------------------------------|----------|
| Angiopoietin-2 | Polyklonal<br>Ziege anti-<br>human   | 1:20 | R&D Systems,<br>Minneapolis, USA | AF623    |
| Angiopoietin-2 | Monoklonal<br>Kaninchen<br>anti-Maus | 1:50 | Abcam, Cambridge,<br>UK          | Ab155106 |
| CD31 PE        | Monoklonal<br>Ratte anti-<br>Maus    | 1:50 | Biogend, San<br>Diego, USA       | 561073   |

**Tabelle 6:** Verwendete primäre Antikörper für immunhistochemische Analysen.

### 3.5.2 Verwendete sekundäre Nachweissysteme

| Sekundäre Antikörper /<br>Nachweissysteme            | Verdünnung | Hersteller                               | Produkt-<br>nummer |
|--|------------|--|--------------------|
| Histofine MAX PO (Multi)<br>anti-Maus und -Kaninchen | Unverdünnt | Nichirei Biosciences,<br>Tokoyo, Japan   | 414152F            |
| H.L Cy3 (Esel anti-Ziege)                            | 1:250      | Abcam, Cambridge, UK                     | Ab6949             |
| Alexa Fluor 488 (Ziege anti-<br>Maus)                | 1:500      | Thermofisher Scientific,<br>Waltham, USA | A-11001            |
| IgG H.L Cy3 (Ziege anti-<br>Kaninchen)               | 1:250      | Abcam, Cambridge, UK                     | Ab6939             |

**Tabelle 7:** Verwendete sekundäre Nachweissysteme.

### 3.6 Blockierungsreagenzien

| Bezeichnung           | Verdünnung | Hersteller                           | Produktnummer |
|-----------------------|------------|--------------------------------------|---------------|
| BSA                   | 1%         | Carl Roth, Karlsruhe,<br>Deutschland | 9048-46-8     |
| Magermilchpulver      | 2% - 5%    | Carl Roth, Karlsruhe,<br>Deutschland | T1451         |
| Paraformaldehyd (PFA) | 4%         | Merck, Darmstadt,<br>Deutschland     | F554-4L       |

**Tabelle 8:** Verwendete Blockierungsreagenzien.

### 3.7 Isotypkontrollen

| Bezeichnung     | Verdünnung | Hersteller                             | Produktnummer |
|-----------------|------------|--|---------------|
| Maus IgG1 kappa | 1:100      | eBiosciences, San Diego,<br>USA        | 14-4714-82    |
| Maus IgG1       | 1:25       | BD Biosciences, Franklin<br>Lakes, USA | 550878        |
| Maus IgG kappa  | 1:100      | BD Biosciences, Franklin<br>Lakes, USA | 349040        |

|                |       |                                     |           |
|----------------|-------|-------------------------------------|-----------|
| Maus IgG2a     | 1:100 | BD Biosciences, Franklin Lakes, USA | 553388    |
| Ziege IgG      | 1:100 | Santa Cruz, Santa Cruz, USA         | Sc-2028   |
| Ziege IgG      | 1:100 | R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland | AB-108-C  |
| PE Ratte IgG2a | 1:50  | BD Biosciences, Franklin Lakes, USA | 553930    |
| Kaninchen IgG  | 1:15  | Abcam, Cambridge, UK                | Ab1259389 |

**Tabelle 9:** Verwendete Isotypkontrollen.

### 3.8 Verbrauchsmaterialien

| Bezeichnung                                       | Hersteller   | Katalog-Nummer / PZN |
|---|--|----------------------|
| $\mu$ -Slide 15-Well<br><i>Angiogenesis</i>       | Ibidi, Gräfelfing, Deutschland                         | 81506                |
| $\mu$ -Slide 18-Well <i>Coverslip</i>             | Ibidi, Gräfelfing, Deutschland                         | 81817                |
| 0,9% steriles Natriumchlorid<br>(10 ml Ampullen)  | Fresenius Kabi, Bad Homburg<br>Deutschland             | 06605514             |
| 0,9% steriles Natriumchlorid<br>(500 ml Flaschen) | B. Braun SE, Melsungen,<br>Deutschland                 | 08646871             |
| 12-Well Platte                                    | Cellstar, Greiner Bio-One,<br>Kremsmünster, Österreich | 665180               |
| 1x PBS (steril)                                   | Capricorn-Scientific,<br>Ebsdorfergrund, Deutschland   | PBS-1A               |
| 24-Well Platte                                    | Cellstar, Greiner Bio-One,<br>Kremsmünster, Österreich | 662160               |
| 48-Well Platte                                    | Cellstar, Greiner Bio-One,<br>Kremsmünster, Österreich | 677180               |
| 6-Well-Plate                                      | Corning, Cambridge, UK                                 | 3506                 |
| 96-Well Platte                                    | Cellstar, Greiner Bio-One,<br>Kremsmünster, Österreich | 655180               |
| Aceton  | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                      | CP40.3               |
| AEC-Substrat-Kit                                  | Vector Laboratories, Newark,<br>USA                    | SK-4200              |
| AMV RT-Puffer                                     | Promega, Madison, USA                                  | M515A                |
| BD Microfine Insulinspritzen<br>(0,3 ml U100)     | Becton Dickinson, Franklin<br>Lakes, USA               | 04144150             |
| Bepanthen Augensalbe (5 g)                        | Bayer Vital, Leverkusen,<br>Deutschland                | 01578681             |

|   |  |                          |
|---|--|--------------------------|
| Calcein-AM  | PromoCell, Heidelberg,<br>Deutschland                  | PK-CA707-80011-2         |
| C-Chip Neubauer <i>Improved</i><br>(Einweg-Zählkammer)  | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                      | PK36.1                   |
| <i>Cell Recovery Solution</i>                           | Corning, Cambridge, UK                                 | 354253                   |
| Dispase   | Corning, Cambridge, UK                                 | 354235                   |
| DMEM ( <i>low glucose</i> )                             | GE Healthcare, Chicago, USA                            | SH30021.01               |
| dNTP-Mix  | Roche, Basel, Schweiz                                  | 11814362001              |
| Einfrierröhrchen (2ml)                                  | Greiner, Frickenhausen,<br>Deutschland                 | 122263                   |
| Endothelial Cell Growth<br>Medium                       | PromoCell, Heidelberg,<br>Deutschland                  | C-22010                  |
| Endothelial Cell Growth<br>Medium 2                     | PromoCell, Heidelberg,<br>Deutschland                  | C-22011                  |
| Entellan  | Merck, Darmstadt, Deutschland                          | 107960                   |
| Eosin   | Merck, Darmstadt, Deutschland                          | 1.00121.0500             |
| Falcon (50 ml, 15 ml)                                   | Cellstar, Greiner Bio-One,<br>Kremsmünster, Österreich | 227261<br>188271         |
| Fetales Kälberserum (FCS)                               | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA                          | F7524                    |
| Foliodrape Protect<br>Abdecktücher steril<br>(75x90 cm) | Paul Hartmann, Heidenheim,<br>Deutschland              | 00798185                 |
| Hämatoxilin   | Carl Roth, Karlsruhe,<br>Deutschland                   | CI75290                  |
| HEPES   | GE Healthcare, Chicago, USA                            | SH30237.01               |
| Hyaluronidase (Type III)                                | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA                          | H2126                    |
| Injekt <sup>®</sup> Einmalspritzen<br>(2 ml, 5 ml)      | B. Braun SE, Melsungen,<br>Deutschland                 | 02057895 / 02057903      |
| Interleukin-1 $\beta$                                   | R&D Systems, Minneapolis, USA                          | 201-LB/CF                |
| Kanülen   | B. Braun SE, Melsungen,<br>Deutschland                 | 4670055S-01              |
| Ketamin Injektionslösung<br>(100 mg/ml)                 | Inresa Arzneimittel, Freiburg,<br>Deutschland          | 7714091                  |
| Kombi-Tips <i>advanced</i><br>(2,5 ml, 5 ml)            | Eppendorf, Hamburg,<br>Deutschland                     | 0030089448<br>0030089456 |
| Lugolsche Lösung < 5%<br>(Jodlösung)                    | Unimedica, Kandern,<br>Deutschland                     | 4251662102373            |
| Medium 199 (mit Phenolrot)                              | VWR, Radnor, USA                                       | 392-0421                 |
| Metamizol (500 mg/ml)                                   | Hexal, Holzkirchen,<br>Deutschland                     | 00651252                 |
| Methylcellulose   | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                      | 9032-42-2                |

|  |  |   |
|--|--|---|
| MicroAMP 96-Well<br>Reaktionsplatte                                    | Applied Biosciences, Waltham,<br>USA                 | N8010560                                  |
| MicroAmp™ Folie für<br>Reaktionsplatte                                 | Applied Biosciences, Waltham,<br>USA                 | 4311971                                   |
| Natriumhydroxid (NaOH)   | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                    | 1310-73-2                                 |
| Octeniderm<br>Hautantiseptikum (250 ml)                                | Schülke und Mayr, Norderstedt,<br>Deutschland        | 03673202                                  |
| Pagasling sterile Mulltupfer<br>(pflaumengroß)                         | Paul Hartmann, Heidenheim,<br>Deutschland            | 11113405                                  |
| Pasteurpipetten  | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                    | 4522.1                                    |
| Pipettenspitzen (steril)<br>(10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl,<br>1000 µl) | Corning, Cambridge, UK                               | 4135, 4136, 4137,<br>4138, 4140           |
| Pipettenspitzen (unsteril)<br>(10 µl, 200 µl, 1000 µl)                 | Corning, Cambridge, UK                               | 4110, 4112, 4114                          |
| Random Hexamer Primer  | Roche, Basel, Schweiz                                | 11034731001                               |
| Reaktionsgefäße (0,5 ml,<br>1,5 ml, 2,0 ml)                            | Eppendorf, Hamburg,<br>Deutschland                   | 0030123.301<br>0030120.086<br>0030120.094 |
| RNase freies ddH <sub>2</sub> O  | ThermoFisher Scientific,<br>Waltham, USA             | FERR0582                                  |
| RNasin   | Promega, Madison, USA                                | N2615                                     |
| Rompun® (Wirkstoff:<br>Xylazin, 20 mg/ml<br>Injektionslösung)          | Bayer Animal Health GmbH,<br>Leverkusen, Deutschland | 6293841.00.00                             |
| ROTI® Mount FluorCare<br>DAPI, <i>ready-to-use</i>                     | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                    | HP20                                      |
| Seralon (blau, DSS-13 6/0-<br>EPO,7)                                   | Serag-Wiessner, Naila,<br>Deutschland                | VO07341L                                  |
| Serologische Einweg-<br>Stripetten (2 ml, 5 ml, 10 ml)                 | Corning, Cambridge, UK                               | 4486, 4487, 4488                          |
| Skalpell Aesculap® (steril)  | B. Braun SE, Melsungen,<br>Deutschland               | XC18.1                                    |
| Sodium Citrat Buffer   | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA                        | 1094371000                                |
| Spongostan Standart<br>(70x50x10 mm)                                   | Johnson & Johnson, New<br>Brunswick, USA             | 02484887                                  |
| Sterile Wattestäbchen  | Heinz Herenz, Hamburg,<br>Deutschland                | 1031229                                   |
| Sterile Wundkompressen<br>(5x5 cm)                                     | Paul Hartmann, Heidenheim,<br>Deutschland            | 01407057                                  |

|   |  |                  |
|---|--|------------------|
| Sterillium® <i>classic pure</i> ,<br>Hände-Desinfektionsmittel,<br>(500 ml) | BODE Chemie, Hamburg,<br>Deutschland                           | 00970709         |
| <i>Supplement Mix</i> für ECM   | PromoCell, Heidelberg,<br>Deutschland                          | C-39215          |
| <i>Supplement Mix</i> für ECM2  | PromoCell, Heidelberg,<br>Deutschland                          | C-39216          |
| T75-Flaschen<br>T25-Flaschen  | Cellstar, Greiner Bio-One<br>GmbH, Kremsmünster,<br>Österreich | 658175<br>690175 |
| Tissue Tek O.C.T. Compound  | Plano, Marburg, Deutschland                                    | R1180            |
| TNF $\alpha$  | Peptotech, Hamburg,<br>Deutschland                             | AF-300-01A       |
| Vasco OP Sensitive<br>Handschuhe  | B. Braun SE, Melsungen,<br>Deutschland                         | 04423855         |
| VEGF  | PromoCell, Heidelberg,<br>Deutschland                          | C-64420          |
| Würfelszucker (500 g)   | Südzucker, Mannheim,<br>Deutschland                            | 4006544356005    |
| Zellschaber   | Santa Cruz, Santa Cruz, USA                                    | Sc-395252        |

**Tabelle 10:** Verwendete Chemikalien und sonstige Verbrauchsmaterialien.

### 3.9 Geräte

| Gerät                                   | Hersteller                                |
|---|---|
| Biofuge <i>pico</i>                     | Heraeus, Hanau, Deutschland               |
| CO <sub>2</sub> -Inkubator              | Binder, Neckarsulm, Deutschland           |
| ELISA Reader (Sunrise)                  | Tecan, Zürich, Schweiz                    |
| Leica CM 3050S (Kryostat)               | Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland  |
| Leica DC 200 (Kamera)                   | Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland  |
| Leica DM IRB (Mikroskop)                | Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland  |
| Mikroskop (Axiovert 25)                 | Zeiss, Oberkochen, Deutschland            |
| Mikroskop (BZ-X800)                     | Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland        |
| NanoDrop ND-1000                        | NanoDrop Technologies, Wilmington,<br>USA |
| Pipetboy <i>acu</i>                     | Integra Biosciences, Zizers, Schweiz      |
| Quant Studio 5                          | ThermoFisher Scientific, Waltham, USA     |
| Sicherheitswerkbank (Clean Bench KS 12) | ThermoFisher Scientific, Waltham, USA     |
| Vortexer                                | Bender&Hobein AG, Zürich, Schweiz         |
| Wasserbad                               | GFL, Burgwedel, Deutschland               |
| Zellzähler (Countess R II FL)           | ThermoFisher Scientific, Waltham, USA     |

**Tabelle 11:** Verwendete Geräte.

## 3.10 Software

| Bezeichnung             | Hersteller                                   |
|-------------------------|--|
| BZ-X800 Analyzer        | Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland           |
| Citavi                  | Swiss Academic Software, Swädenswil, Schweiz |
| GraphPad Prism 6.0      | GraphPad Software, Boston, USA               |
| Magellan 5              | Tecan, Zürich, Schweiz                       |
| Microsoft Office        | Microsoft Corporation, Washington, USA       |
| ND-1000 V3.5.2          | Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland |
| Quant Studio 5 Software | Thermofisher Scientific, Waltham, USA        |

**Tabelle 12:** Für Messungen und Quantifizierungen verwendete Software.

## 3.11 Molekularbiologische und immunologische Kits

| Bezeichnung   | Hersteller                                   | Produktnummer |
|---|--|---------------|
| COL4A2 ELISA Kit: Human collagen type IV, alpha 2 ELISA Kit | MyBioSource, San Diego, USA                  | MBS927548     |
| MIP2 (CXCL2) Human SimpleStep ELISA®Kit                     | Abcam, Cambridge, UK                         | ab184862      |
| miRNeasy Mini Kit   | Qiagen, Hilden, Deutschland                  | 217004        |
| Pierce™ chromogenes Endotoxin Quant Kit                     | Thermofisher Scientific, Waltham, USA        | A39552        |
| PowerUp SYBR Green Master Mix                               | Applied Biosystems, Foster City, Deutschland | A25741        |
| Quantikine ELISA Human Angiopoietin-2                       | R&D Systems, Minneapolis, USA                | DANG20        |
| Quantikine ELISA Human Endostatin                           | R&D Systems, Minneapolis, USA                | DNST0         |
| Quantikine ELISA Human VEGF                                 | R&D Systems, Minneapolis, USA                | DVE00         |
| Quantikine ELISA SixPak Human IL-6                          | R&D Systems, Minneapolis, USA                | S6050         |
| RNeasy Mini Kit   | Qiagen, Hilden, Deutschland                  | 74106         |
| RNeasy Plus Micro Kit                                       | Qiagen, Hilden, Deutschland                  | 74034         |

**Tabelle 13:** Verwendete molekularbiologische und immunologische Kits.

## 3.12 Komponenten der extrazellulären Matrix

| Bezeichnung   | Hersteller                    | Produktnummer |
|---|-------------------------------|---------------|
| Arresten (COL4A1)   | Biozol, Eching, Deutschland   | mbs2009356    |
| Canstatin (COL4A2)  | Biozol, Eching, Deutschland   | abx066007     |
| Endostatin  | R&D Systems, Minneapolis, USA | 1098-ES-050   |
| Matrigel (Basement Membrane, Growth Factor reduced (GFR)) | Corning, Cambridge, UK        | 356231        |

|                              |                               |           |
|------------------------------|-------------------------------|-----------|
| Rattenschwanz Kollagen Typ-1 | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA | 08-115    |
| Tumstatin (COL4A3)           | Biozol, Eching, Deutschland   | mbs142942 |

**Tabelle 14:** Verwendete Komponenten der extrazellulären Matrix.

### 3.13 Primer

Folgende Primer wurden von Qiagen (Hilden, Deutschland) als *QuantiTect Primer Assay* bezogen:

| Bezeichnung    | Gen-Symbol  | Produktnummer |
|----------------|---|---------------|
| Hs_ANGPT2_1_SG | Angiopoeitin-2 (ANGPT2)                           | QT00100947    |
| Hs_DLL4_1_SG   | <i>Delta-like Ligand 4</i> (DLL4)                 | QT00081004    |
| Hs_EFNB2_1_SG  | Ephrin-B2 (EFNB2)                                 | QT00024850    |
| Hs_JAG1_1_SG   | Jagged1   | QT00031948    |
| Hs_JAG1_2_SG   | Jagged2   | QT00054397    |
| Hs_MK167_1_SG  | MKI67   | QT00014203    |
| Hs_NOS3_1_SG   | <i>Endothelial nitric oxide synthase 3</i> (eNOS) | QT00089033    |
| Hs_PDGF1B_1_SG | <i>Platelet derived growth factor B</i> (PDGF1B)  | QT00001260    |

**Tabelle 15:** Verwendete Primer.

## 4. METHODEN

### 4.1 Methoden zur Standardzellkultur

#### 4.1.1 Gewebeentnahme

Die Entnahme von Synovialgewebe und Knorpel, die später für immunhistologische Experimente sowie Zellkultur- und Implantationsexperimente verwendet wurden, erfolgte im Rahmen von Routineoperationen (z.B. Gelenkersatz oder Synovektomie) in der Orthopädie des Universitätsklinikums Gießen/Marburg und im Markus-Krankenhaus in Frankfurt nach Aufklärung und schriftlichem Einverständnis aller Patienten zur Verwendung der Gewebeproben für experimentelle Zwecke. Für diese Arbeit wurden Gewebeproben von Patienten mit nachgewiesener RA oder OA verwendet. Die RA-Patienten erfüllten die 1987 vom *American College of Rheumatology* aufgestellten Kriterien. Die entnommenen Gewebeproben wurden entweder zur Isolation der synovialen Fibroblasten verwendet oder Gewebe für immunhistologische Experimente eingebettet. Die verwendeten Synovialgewebe und RASF, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden, wurden aus der Gewebe- und Zellbank der Abteilung zur Verfügung gestellt. Die Entnahme der jeweiligen Gewebe wurde von der Ethikkommission der Universität Gießen genehmigt. Die Entnahme von Blutproben und Gelenkflüssigkeiten erfolgte im Rahmen von Gelenkpunktionen von stationären RA- und OA-Patienten der Kerckhoff-Klinik in Bad Nauheim. Die Verwendung der Gelenkflüssigkeiten für experimentelle Zwecke erfolgte nach Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung aller Patienten.

#### 4.1.2 Einfrieren und Lagerung der Synovialgewebe

Die Synovialgewebe wurden gekühlt transportiert und möglichst am selben Tag oder spätestens am Folgetag (dokumentiert) weiterverarbeitet, um eine Degradation des Gewebes weitestgehend zu verhindern. Das Synovium wurde zunächst von den Knorpel-Knochenplatten präpariert und in OCT TissueTek eingebettet. Das eingebettete Gewebe wurde in ein Dewargefäß mit Flüssigstickstoff überführt und nach vollständigem Durchfrieren des Einbettmediums langfristig in der Gewebebank der Abteilung bei -80°C gelagert.

#### 4.1.3 Isolation der synovialen Fibroblasten

Nach der Entnahme wurde das Synovialgewebe in 0,9 % NaCl überführt, gekühlt gelagert und schnellstmöglich weiter verarbeitet um eine Degradation des Gewebes bzw. der RNA

bestmöglich zu verhindern. Die anschließende Präparation des Synoviums wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt, wobei mittels Begießens mit NaCl das Austrocknen des Gewebes verhindert wurde. Fett, vernarbte und verkalkte Gewebeteile wurden mit Hilfe des Skalpell entfernt und das Gewebe in ca. 1 mm<sup>3</sup> große Stücke zerschnitten. Anschließend erfolgte die Isolation der synovialen Fibroblasten nach den Vorgaben zur Isolation von Synovialfibroblasten für die Zellbank mittels enzymatischem Verdau in steriler 10%iger Dispase-Lösung für 2-3 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Zum Abstoppen des Verdau wurden 20 ml Fibroblastenmedium zugegeben und die Zellsuspension durch ein Zellsieb gegeben. Anschließend wurde das Filtrat für 10 min bei 300 x g zentrifugiert und das Zellpellet in Fibroblastenmedium resuspendiert. Je nach Menge der isolierten synovialen Fibroblasten wurden die Zellen in 25 cm<sup>2</sup> oder 75 cm<sup>2</sup>- Zellkulturflaschen überführt und bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach 24 h wurden die Zellen mit sterilem 1xPBS gewaschen und das Fibroblastenmedium gewechselt, um Gewebereste und Zellüberreste zu entfernen. Die Zellen wurden anschließend weiterkultiviert und das Medium alle 2-3 Tage gewechselt. Die Zellen wurden schließlich in niedrigen Passagen in die Zellbank der Abteilung überführt.

#### 4.1.4 Passagieren und Kultivieren der synovialen Fibroblasten und der Endothelzellen

Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 90% wurden die Fibroblasten und die HUVEC passagiert. Hierfür wurden sie zunächst mit sterilem 1xPBS gewaschen und anschließend mit 3 ml 1xTrypsin/EDTA bei 37°C und 10% bzw. 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach ca. 5 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 6 ml Fibroblasten- bzw. Endothelzellmedium abgestoppt und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 300 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in Fibroblasten- bzw. Endothelzellmedium resuspendiert und jeweils zur Hälfte (1:2) oder zu einem Drittel (1:3) in neuen T75- bzw. T25-Zellkulturflaschen in einem Inkubator kultiviert (Tabelle 16).

Die standardmäßige Kultivierung der Fibroblasten und der HUVEC erfolgte bei 37°C und 10% bzw. 5% CO<sub>2</sub>, wobei alle 2-3 Tage das Medium gewechselt wurde (Tabelle 16). Für die Experimente wurden die synovialen Fibroblasten ausschließlich bis Passage 7 verwendet, da sich bei Fibroblasten ab einem bestimmten Zeitpunkt das Genexpressionsmuster ändert und Ergebnisse nicht mehr vergleichbar sind (Neumann et al. 2010). Die HUVEC wurden ebenfalls bis zur Passage 7 verwendet.

|                                  | <b>Synoviale Fibroblasten</b>                    | <b>HUVEC</b>                                      |
|----------------------------------|--|---|
| <b>Kultivierung</b>              | 10% CO <sub>2</sub>                              | 5% CO <sub>2</sub>                                |
| <b>Medium</b>                    | DMEM (low glucose) + 10% FCS + 1% P/S + 1% HEPES | Endothelium Cell Growth Medium 2 + Supplement Mix |
| <b>Zellkulturflasche</b>         | T75  | T25   |
| <b>Mediumwechsel</b>             | Alle 2-3 Tage                                    | Alle 2-3 Tage                                     |
| <b>Passagieren bei Konfluenz</b> | 90%  | 90%   |

**Tabelle 16:** Kultivierungsbedingungen der RASF und HUVEC.

#### 4.1.5 Einfrieren der synovialen Fibroblasten und der HUVEC

Die Langzeitlagerung von Fibroblasten und HUVEC erfolgte im Flüssigstickstofftank bei einer Temperatur von ca. -196°C. Hierfür wurden die Zellen in einer T75- oder einer T25-Zellkulturflasche bis zu einer Konfluenz von 90% kultiviert und nach zweimaligem Waschen mit sterilem 1xPBS mit 3 ml bzw. 2 ml 1xTrypsin/EDTA abgelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Fibroblasten- bzw. Endothelzellmedium abgestoppt und die Zellsuspension für 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 4 ml Einfriermedium resuspendiert und je 2 ml in ein Einfrierröhrchen gegeben. Die Einfrierröhrchen wurden sofort in eine Einfrierbox gestellt und über Nacht bei -80°C gelagert. Anschließend wurden die Einfrierröhrchen in den Flüssigstickstofftank überführt. Hierbei ist anzumerken, dass ausschließlich auf Mykoplasmen negativ getestete Zellen im Stickstofftank gelagert wurden, um Kontaminationen zu vermeiden.

#### 4.1.6 Auftauen der synovialen Fibroblasten und der Endothelzellen

Nach Entnahme der Einfrierröhrchen mit Fibroblasten bzw. HUVEC aus dem Flüssigstickstofftank wurden die Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad zügig aufgetaut. Sobald kein Eis mehr vorhanden war, wurde die Zellsuspension sofort in 10 ml vorgewärmtes Fibroblasten- oder Endothelzellmedium überführt und für 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet mit dem entsprechenden Medium resuspendiert und die Zellsuspension anschließend in eine T75- oder eine T25-Zellkulturflasche überführt. Nach spätestens 24 h erfolgte ein Mediumwechsel, um abgestorbene Zellen und eventuell vorhandene DMSO-Reste zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen unter Standardbedingungen kultiviert.

#### 4.1.7 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde nach dem Ablösen der Zellen mittels Trypsin oder Accutase ermittelt. Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension entnommen und in eine Kammer des C-Chips gegeben. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte dann mit dem Countess II FL Gerät nach Herstellerangaben.

### 4.2 Zellbiologische Methoden zur Angiogenese und repetitiven Stimulierung *in vitro*

#### 4.2.1 Zell-Tracking mit dem Lebendzellfarbstoff Calcein-AM

Für die Co-Kultur-Experimente von RASF und HUVEC wurden die RASF zuvor mit dem zelldurchlässigen Farbstoff Calcein-AM (AM=Acetoxymethylester) markiert, um die zwei unterschiedlichen Zelltypen voneinander unterscheiden zu können. Lebende Zellen nehmen Calcein-AM über die Zellmembran auf. In der Zelle wird die AM-Gruppe dann enzymatisch von Esterasen abgespalten und in Calcein umgewandelt. Calcein bindet in der Zelle Calciumionen, wodurch ein grünes Fluoreszenzsignal entsteht (Conn 2020). Somit lassen sich mittels Calcein-AM nicht nur Zellen verfolgen (tracken), sondern auch die Zellviabilität bestimmen. Für die Markierung der RASF mit Calcein-AM wurden den RASF 30-60 min vor Versuchsbeginn 2 µl Calcein-AM pro 1 ml Kultivierungsmedium zugegeben und die RASF bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die RASF für die Co-Kultur-Experimente mit Accutase abgelöst (Kapitel 4.1.4).

#### 4.2.2 2D Tube-Formation-Experiment

Das 2D Tube-Formation-Experiment wurde in der Arbeitsgruppe für die *in vitro*-Simulation der Gefäßneubildung etabliert. Ziel war, ein System zu entwickeln, mit dem die veränderte Gefäßneubildung bei der RA bzw. durch RASF auch kurzzeitig mittels *in vitro*-Analysen quantifiziert werden kann und in diesem Zusammenhang auch spezifische Zell-Zell-Interaktionen näher charakterisiert werden können. Das Testsystem wurde im Rahmen dieser Dissertation für die entsprechenden Fragestellungen modifiziert bzw. erweitert.

##### 4.2.2.1 Tube-Formation-Experiment im 96-Well Format

Für die Durchführung des 2D Tube-Formation-Experiments im 96-Well Format wurden RASF und HUVEC unter Standardbedingungen bis zu einer Konfluenz von mind. 70% kultiviert. Ein Tag vor Versuchsbeginn wurden die HUVEC passagiert (Kapitel 4.1.4). Dieser Schritt war

unerlässlich für eine erfolgreiche Tubebildung. Die benötigte Menge an Wachstumsfaktor-reduziertem (engl. *growth factor reduced*, GFR) Matrigel wurde über Nacht bei 4°C aufgetaut. Am Versuchstag wurden die RASF mit Calcein-AM markiert (Kapitel 4.2.1). Eine vorgekühlte 96-Well Platte wurde mit 35-40 µl Matrigel beschichtet und für 30-60 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden mit Accutase abgelöst, für 10 min bei 300 x g zentrifugiert und anschließend in ECM2 resuspendiert. Dabei musste das ECM2 Volumen so gewählt werden, dass die absolute Zellzahl pro ml bei den HUVEC  $2,6 \times 10^5$  Zellen (Z)/ml und bei den RASF  $1,3 \times 10^5$  Z/ml ergab. In jedes Well wurden 50 µl (= 13.000 Z) der HUVEC-Suspension gegeben. Für die Co-Kultur-Experimente wurden zusätzlich 15% RASF (= 1.950 Z), ausgehend von der für das Experiment verwendete HUVEC-Zellzahl, zugegeben. Zur Analyse der Effekte der extrazellulären Matrix auf die Tubebildung wurden die Zellen mit Endostatin, Canstatin, Tumstatin und Arresten stimuliert. Die Zellen wurden für 4 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Gesamtvolumen von 100 µl pro Well kultiviert. Nach 4 h wurde die Tubebildung mit dem Keyence Mikroskop in der 40- und 100-facher Vergrößerung dokumentiert. Für die Aufnahmen der Co-Kultur-Experimente wurden zusätzlich Overlay-Fotos der Zellen im Phasenkontrast mit grün fluoreszierenden Calcein-AM gefärbten RASF angefertigt.

#### 4.2.2.2 Tube-Formation-Experiment auf Mikroobjektträgern

Für die Quantifizierung der Tube-Formation-Experimente unter Verwendung einer Software wurde im Rahmen dieser vorliegenden Dissertation das Protokoll optimiert und für die Verwendung von Mikroobjektträgern angepasst. Der Vorteil der Mikroobjektträger war, dass lediglich 10 µl Matrigel-Beschichtung pro Well benötigt wurden, wodurch eine ebenmäßigere Beschichtung erfolgte und weniger Lufteinschlüsse in der Matrigel-Beschichtung vorhanden waren. Dies ermöglichte eine Fotodokumentation in verbesserter Qualität und somit eine repräsentativere Quantifizierung der Tubes. Der Ablauf des Tube-Formation-Experiments auf den Mikroobjektträgern erfolgte wie unter Kapitel 4.2.2.1 beschrieben. Die HUVEC wurden 20 h vor Beginn des Experimentes mit 0,2 µg/ml Canstatin vorstimuliert. Am Versuchstag wurden die Mikroobjektträger bei Raumtemperatur (RT) für ca. 20 min inkubiert. Die Zellsuspensionen wurden mit dem berechneten Volumen ECM2 verdünnt, sodass die HUVEC eine Gesamtzellzahl von  $2,6 \times 10^5$  Z/ml und die RASF  $1,2 \times 10^5$  Z/ml ergaben. Pro Well wurden 30 µl (= 7800 Z) der HUVEC Zellsuspension und für die Co-Kultur-Experimente 15% RASF in 10 µl (= 1170 Z) zugegeben. Die Zellen wurden mit 0,5 µg/ml Canstatin stimuliert und für 4 bzw. 8 h

bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Gesamtvolumen von 50 µl pro Well kultiviert. Als Kontrolle wurden unstimulierte Zellen mitgeführt. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände gesammelt, für 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert und bei -20°C für spätere Zytokinanalysen gelagert.

#### 4.2.2.3 Score zur Quantifizierung des 2D Tube-Formation-Experiments

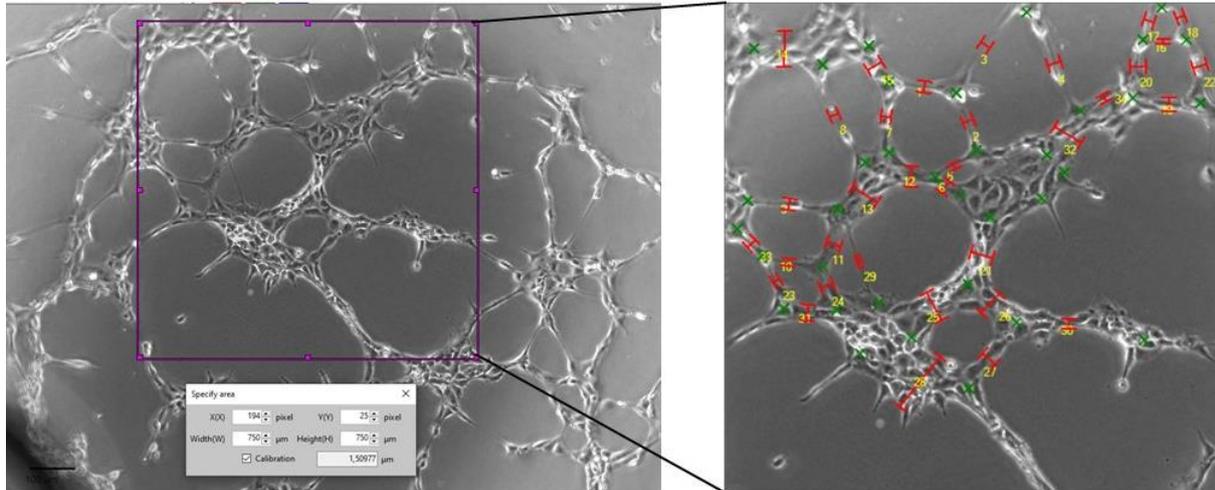
Für die Quantifizierung wurde jedes Well (96-Well-Platte oder Mikroobjektträger) mittig in der 100-fachen Vergrößerung im Phasenkontrast aufgenommen. Für die Co-Kultur-Experimente wurden Overlay-Aufnahmen angefertigt, um die Calcein-AM-markierten RASF innerhalb des HUVEC-Zellnetzwerkes darzustellen. Die Auswertung erfolgte mit der BZ-X800 Analyser-Software von Keyence unter dem Menüpunkt „XY Measure“. Folgende Parameter wurden ausgewertet (Tabelle 17):

| Parameter  | Auswahl Funktion unter „XY Measure“                                      |
|--|--|
| Anzahl der Lumen (gesamte Aufnahme in der 100-fachen Vergrößerung)   | <i>Count</i> (händisch markierte Punkte)                                 |
| Anzahl der Tubes (im 562.500 µm <sup>2</sup> großen Bildausschnitt in der 100-fachen Vergrößerung)           | <i>Count</i> (händisch markierte Punkte)                                 |
| Anzahl der Verzweigungspunkte (im 562.500 µm <sup>2</sup> großen Bildausschnitt der 100-fachen Vergrößerung) | <i>Count</i> (händisch markierte Punkte)                                 |
| Lumenumfang [µm] (gesamte Aufnahme in der 100-fachen Vergrößerung)   | <i>Freehand line</i> (Länge der händisch eingezeichneten Linie)          |
| Tubedicke [µm] (im 562.500 µm <sup>2</sup> großen Bildausschnitt der 100-fachen Vergrößerung)                | <i>Between-2-Points</i> (Länge zwischen zwei händisch gesetzten Punkten) |

**Tabelle 17:** Verwendete Parameter für die Quantifizierung der Tube-Formation-Experimente.

Im Verlauf des Projektes konnte der Parameter Tubedicke als geeigneter Parameter für die RASF- und Canstatin-vermittelten Veränderungen der Tubebildung identifiziert werden, sodass für alle folgenden Experimente ausschließlich der Parameter Tubedicke für die Quantifizierung verwendet wurde. Für die Quantifizierung der Tubedicke wurde ein 750x750 µm großer Bildausschnitt der Aufnahme in der 100-fachen Vergrößerung ausgewählt, da durch Luftblasen oder Unebenheiten in der Matrigel-Beschichtung häufig nicht die gesamte Aufnahme für die Quantifizierung verwendbar war (Abbildung 9). Als Tubes wurden alle dünnen, netzartigen Zellstrukturen definiert, die zwei Areale des Zellnetzwerkes miteinander verbinden und dabei zwei deutliche Enden im Verzweigungsbereich aufweisen. Die Enden der Tubes wurden jeweils mit einer grünen Markierung gekennzeichnet und möglichst mittig zwischen der Markierung die Dicke der Tubes gemessen. Dünne

Zellstrukturen, die nur an einem Ende mit dem Zellnetzwerk verbunden waren, wurden nicht ausgewertet. Alle Zellstrukturen, die eine Dicke von mehr als 4 Zellen aufwiesen und mehrere Ausläufer hatten, wurden als Zellakkumulation (Verzweigungsbereich) definiert und nicht vermessen. Pro quantifizierten Bildausschnitt wurde der Mittelwert aller gemessenen Tubedicken ermittelt (Abbildung 9).



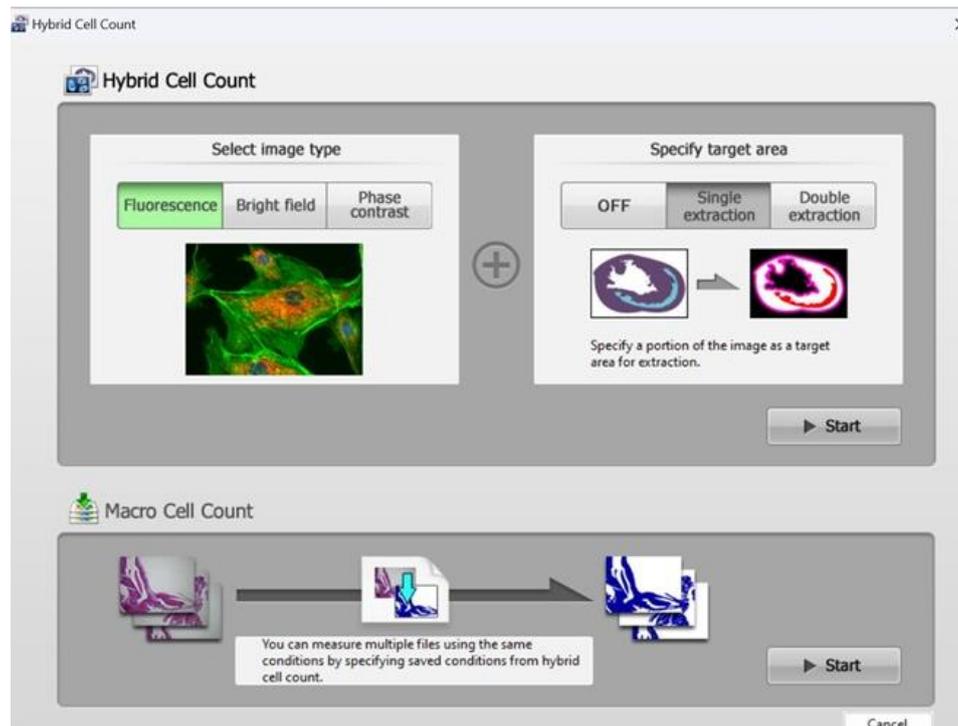
**Abbildung 9:** Quantifizierung der Tube-Formation-Experimente über den Parameter Tubedicke. Dargestellt ist das HUVEC-Zellnetzwerk in der 100-fachen Vergrößerung. Es wurde ein repräsentativer 750x750 µm großer Ausschnitt verwendet. Innerhalb des definierten Bildausschnittes wurden die Enden der Tubes markiert (grün) und möglichst mittig zwischen zwei Markierungen die Dicke der Tubes gemessen (rot). Zellakkumulationen mit einer Dicke aus mehr als 4 Zellen wurden nicht vermessen.

#### 4.2.2.4 Immunzytochemie in den Tube-Formation-Experimenten

Die immunhistologischen Experimente wurden freundlicherweise mit der Unterstützung von Frau Oxana Bechtgoldt durchgeführt. Zur Analyse der Expression des Gefäßregulators Ephrin-B2 (EPHB2) im Verlauf der Tubebildung im Tube-Formation-Experiment *in vitro* wurde zunächst das Tube-Formation-Experiment wie in Kapitel 4.2.2.2 beschrieben durchgeführt. Für die immunzytochemischen Färbungen wurden allerdings anstatt der für die Angiogenese verwendeten 96-Well-Platten 18-Well Mikroobjektträger mit Glasboden verwendet, die mit 25 µl GFR Matrigel beschichtet wurden. Die RASF-/HUVEC-Zellsuspensionen wurden wie in Kapitel 4.2.2.1 beschrieben hergestellt. Im Unterschied zu den in Kapitel 4.2.2.1 und 4.2.2.2 beschriebenen Tube-Formation-Experimenten wurden auf Grund des veränderten Formats 100 µl (= 26.000 Zellen) der HUVEC-Zellsuspension und für die Co-Kultur-Experimente mit 15% RASF zusätzlich 33,3 µl der RASF-Zellsuspension (= 3.996 Zellen) zugegeben. Nach 4- bzw. 8-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde das Medium aus den Wells vorsichtig abgeklöpft und für die Zellfixierung 4% PFA für 10 min bei RT zugegeben. Anschließend wurden

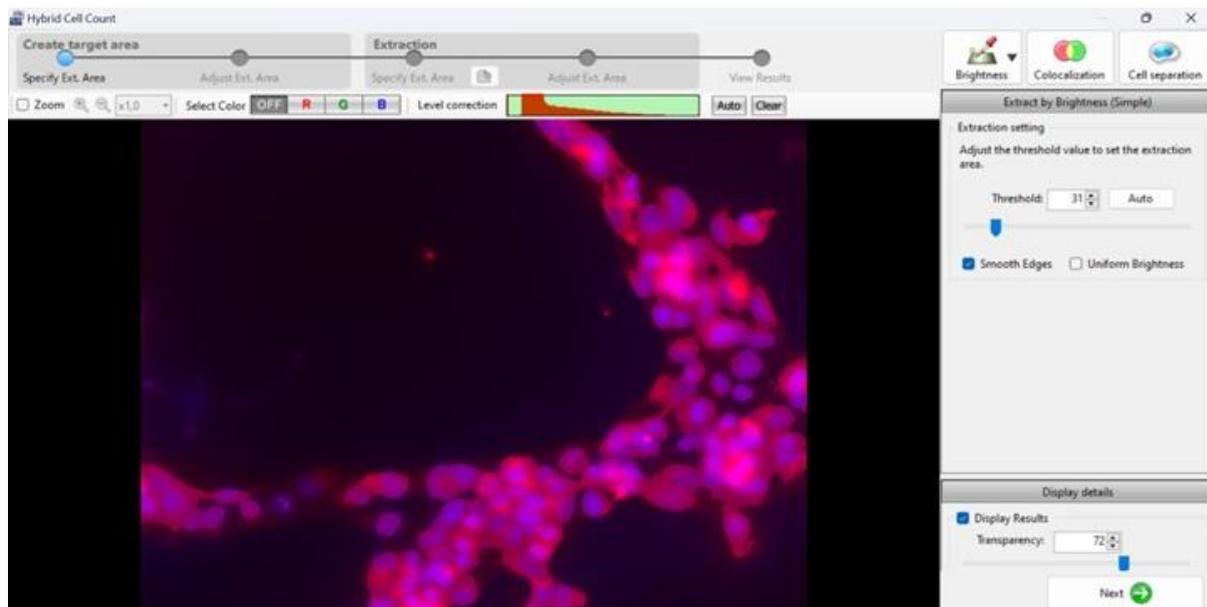
die Zellen 3-mal für 3 min mit 1xPBS gewaschen und die Zellen über Nacht bei RT in PBS stehen lassen. Die Lagerung bei RT war bei diesem Schritt unerlässlich, da sich bei zu niedrigen Temperaturen das Matrigel verflüssigt und die Tubes zerstört werden. Am nächsten Tag erfolgte dann die Permeabilisierung der Zellmembran mit 0,2% TritonX für 15 min bei RT. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift mit 1xPBS für jeweils 3 min, bevor unspezifische Bindungsstellen mit 1% BSA, verdünnt in 1xPBS, für 30 min bei RT geblockt wurden. Die Zellen wurden einmal kurz mit 1xPBS gewaschen und anschließend wurden der Primärantikörper (EPHB2 polyklonal Ziege anti-human/Maus), die übereinstimmende Isotyp- sowie die Negativkontrolle in einem Gesamtvolumen von 100 µl auf die Zellen gegeben und bei 18°C über Nacht inkubiert. Als Negativkontrolle wurde 1xPBS auf die Zellen gegeben. Am nächsten Tag folgte wieder ein dreimaliger Waschschrift mit 1xPBS für jeweils 3 min, bevor der Sekundärantikörper (Esel anti-Ziege H.L Cy3) auf die Zellen gegeben wurde. Der Sekundärantikörper wurde in einer Feuchtekammer (luftdicht verschlossene Plastikbox, die mit feuchten Tüchern ausgekleidet ist, um die Verdunstung der Reagenzien zu verhindern) für 60 min bei RT inkubiert, anschließend folgte wieder ein dreimaliger Waschschrift mit 1xPBS für 3 min. Die Zellen wurden mit jeweils 1 Tropfen pro Well ROTI®Mount FluorCare DAPI-Medium eingedeckt, bei RT trocknen lassen und anschließend fotodokumentiert.

Für die Quantifizierung der Signalintensitäten von EFN2 wurde das Werkzeug „Hybrid Cell Count“ des BZ-X800 Analyzers von Keyence verwendet. Entsprechend der Immunfluoreszenzfärbung wurde die Einstellung „Fluorescence“ gewählt und eine „Single Extraction“ durchgeführt, da eine Einzelfärbung durchgeführt wurde (Abbildung 10).



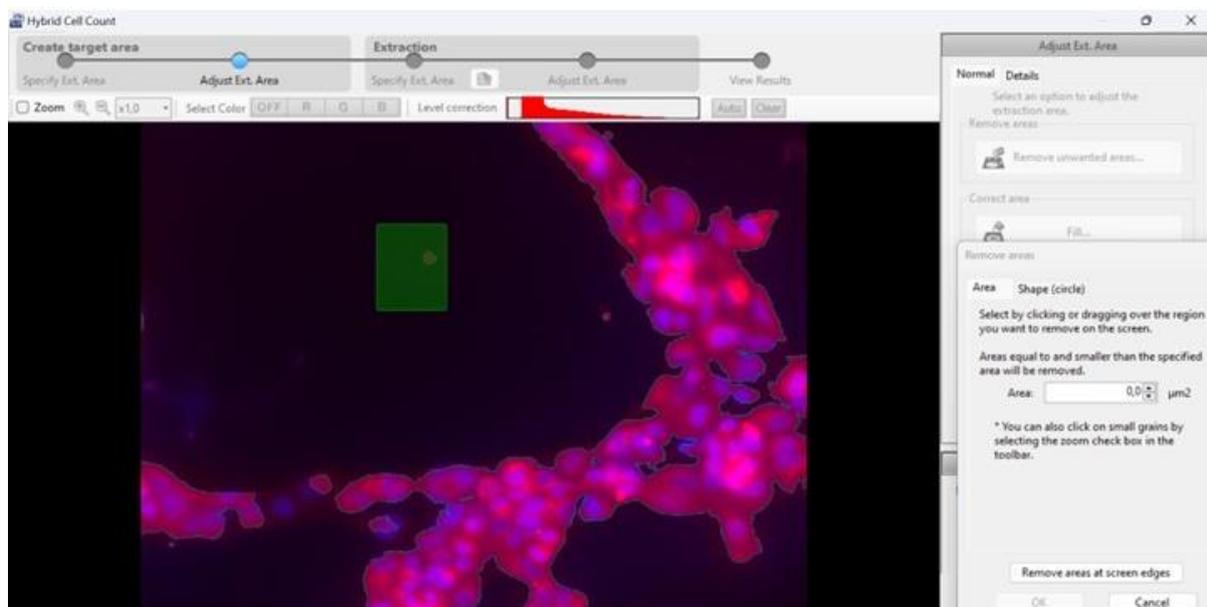
**Abbildung 10:** Verwendete Einstellung für die Software-basierte Quantifizierung der ANGPT2- und EFNB2-Expression im Tube-Formation-Experiment. Für die Quantifizierung wurde als Fotoquelle "Fluorescence" und als Extraktion des Zielbereichs „Single extraction“ gewählt, da eine Einzelfärbung durchgeführt wurde.

Im nächsten Schritt wurde das Zellnetzwerk als der Bereich im Foto bestimmt, der von der Software extrahiert werden sollte. Somit konnte gewährleistet werden, dass ausschließlich Signalintensitäten der Antikörper innerhalb des Zellnetzwerkes gemessen und keine Signale außerhalb des definierten Zellnetzwerkes erfasst wurden. Da für EFNB2 ein rot fluoreszierender Antikörper verwendet wurde, wurde der Rotfilter ausgewählt und der Schwellenwert („Threshold“) so angepasst, dass die Software ausschließlich rot fluoreszierende Bereiche innerhalb des Zellnetzwerkes extrahierte (Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Definition des für die Quantifizierung gewünschten Zielbereichs. Auf Grund der verwendeten rot fluoreszierenden Antikörper wurde der Rotfilter für die Evaluation gewählt und der Threshold so angepasst, dass nur Bereiche innerhalb des Zellnetzwerks ausgewertet wurden.

Anschließend wurden rot fluoreszierende Signale markiert, die außerhalb des Zellnetzwerkes lagen und/oder eindeutig keiner spezifischen Antikörperfärbung zugeordnet werden konnten wie beispielsweise Staubkörner. Die markierten Signale wurden von der Software für die Bestimmung der Antikörpersignalintensitäten ausgeschlossen (Abbildung 12).



**Abbildung 12:** Ausschluss von unspezifischen rot fluoreszierenden Bereichen. Um zu gewährleisten, dass die Software ausschließlich die Rotintensität von spezifischen Signalen innerhalb des Zellnetzwerks berechnete, wurden unspezifische rot fluoreszierende Signale markiert (grüner Kasten) und so von der Quantifizierung ausgeschlossen.

Für die Analyse der EFN2-Expression im Tube-Formation-Experiment wurde der von der Software ermittelte Wert der Rotintensität innerhalb des Zellnetzwerks als definiertes Areal verwendet. Dieser Wert ist ein von der Software berechneter Mittelwert aus der maximalsten und der minimalsten Rotintensität.

#### 4.2.3 3D Sphäroid-basiertes Sprout-Experiment

Zur Charakterisierung der RASF/EZ-Interaktionen auch unter Einfluss von Canstatin in einer dreidimensionalen extrazellulären Matrix, wurde ein 3D Sphäroid-basiertes Sprout-Experiment eingesetzt. Im 3D-Modell sprießen (engl. *sprout*) EZ als dreidimensionale Ausläufer aus zuvor generierten Sphäroiden in die umgebende Gelatinematrix ein. Die Optimierung des Sprout-Experiments für die Co-Kultur aus HUVEC und RASF wurde für die spezifische Fragestellung der RASF/EZ-Interaktionen im Rahmen dieser Dissertation angepasst. Dieser Test wurde eingesetzt, um zu klären, ob und wie RASF die Gefäßneubildung beeinflussen und ob sich RASF in oder an die entstehenden Tubes anlagern.

Wie beim Tube-Formation-Experiment wurden für das Sprout-Experiment RASF und HUVEC bis Passage 7 verwendet, die bis zu einer Konfluenz von max. 90% in Fibroblasten- bzw. ECM2 unter Standardbedingungen kultiviert wurden. Die HUVEC wurden einen Tag vor Versuchsbeginn passagiert. Die RASF wurden 30-60 min vor Versuchsbeginn zur Unterscheidung von den EZ mit Calcein-AM markiert (Kapitel 4.2.1).

##### 4.2.3.1 Vorbereitung der hängenden Sphäroidtropfen

Im ersten Schritt wurden die Sphäroide generiert. Hierfür wurden die RASF und HUVEC mit auf 37°C erwärmter Accutase abgelöst, für 10 min bei 300 x g zentrifugiert und anschließend in ECM2 resuspendiert. Das Volumen wurde so gewählt, dass die absolute Zellzahl pro ml bei den HUVEC  $2,5 \times 10^4$  Z/ml und bei den RASF  $1,2 \times 10^5$  Z/ml ergab. Es wurden 4 Ansätze aus jeweils 4 ml Zellsuspension vorbereitet und pro Ansatz mit 1 ml Methocel vermischt. Bei Methocel handelt es sich um ein Gemisch aus ECM und 1,2% Methylcellulose und wurde benötigt, um der Zellsuspension Viskosität zu verleihen, damit die Zellsuspension später als hängende Tropfen inkubiert werden konnte. Für die Co-Kultur-Experimente wurden 15% RASF zu der HUVEC-Methocel-Suspension gegeben. Zwei Ansätze wurden außerdem entsprechend Tabelle 18 mit 0,5 µg/ml Canstatin stimuliert.

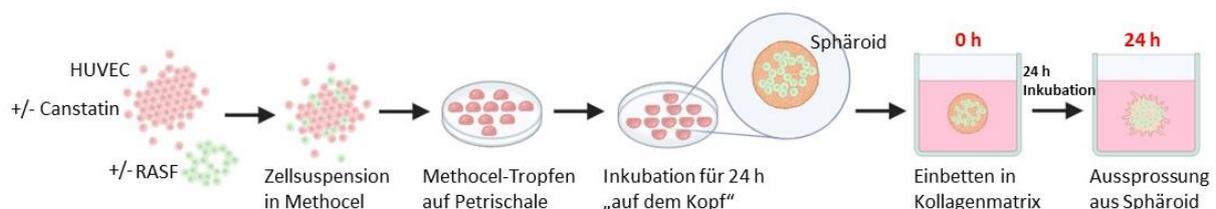
|                 |  |
|-----------------|--|
| <b>Ansatz 1</b> | HUVEC Kontrolle (Ktr)                  |
| <b>Ansatz 2</b> | HUVEC Ktr + 15% RASF                   |
| <b>Ansatz 3</b> | HUVEC + 0,5 µg/ml Canstatin            |
| <b>Ansatz 4</b> | HUVEC + 0,5 µg/ml Canstatin + 15% RASF |

**Tabelle 18:** Ansätze für das 3D Sphäroid-basierte Sprout-Experiment

Anschließend wurden die 4 Ansätze in 25 µl Tropfen mittels Multikanalpipette auf sterile Petrischalen verteilt, die Petrischalen geschlossen und umgedreht, sodass die Tropfen hängend bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 24 h inkubiert werden konnten (Abbildung 13).

#### 4.2.3.2 Einbetten der Sphäroide

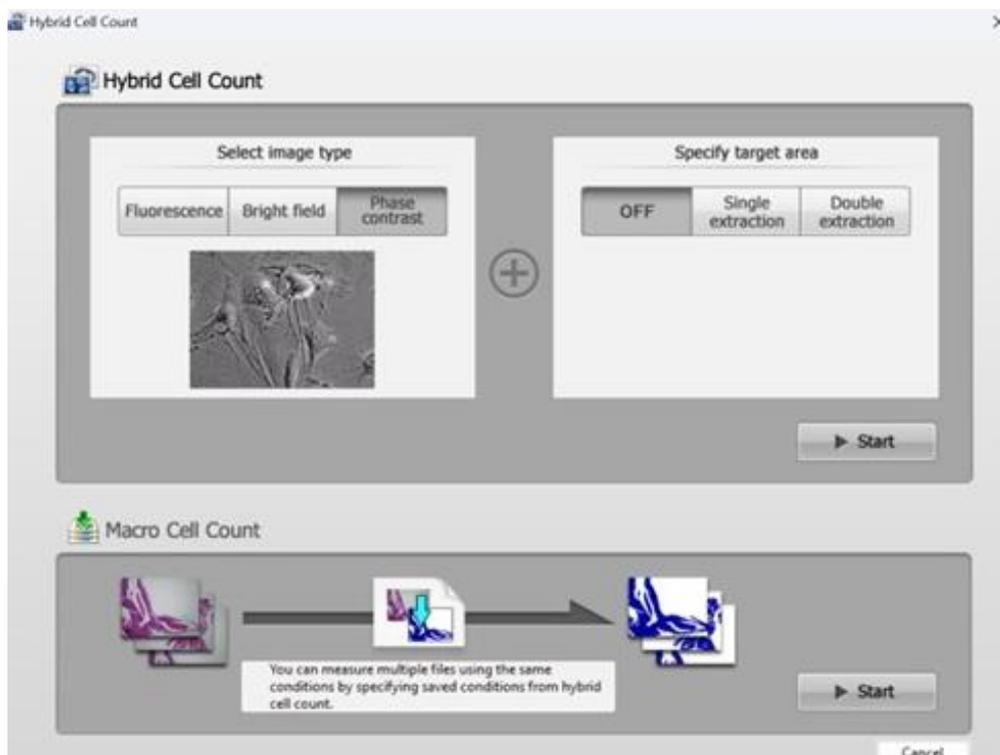
Nach 24-stündiger Inkubation der Tropfen wurden die Tropfen mit sterilem 1xPBS von der Petrischale gespült und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Sphäroide wurden bei 200 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Sphäroide vorsichtig in 1 ml Methocel mit 20% FCS resuspendiert. Es wurde 1 ml einer Rattenschwanzkollagen Typ 1-Lösung bestehend aus 10xMedium 199, 1xPBS und 0,2 N NaOH zum Einstellen eines neutralen pH-Werts von 7,0 mit einer Kollagenkonzentration von 2 mg/ml zugegeben und die Lösung auf eine 24-Well-Platte gegeben. Die zwei Ansätze aus Tabelle 18 mit Canstatin wurden erneut mit 0,5 µg/ml Canstatin stimuliert. Es folgte eine 30-minütige Polymerisierung bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Anschließend wurden die Sphäroide mit dem Keyence-Mikroskop in der 100-fachen Vergrößerung fotodokumentiert. Dieser Zeitpunkt wurde als 0 h definiert. Die Sphäroide wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für weitere 24 h inkubiert und anschließend erneut fotodokumentiert. Dieser Zeitpunkt wurde als 24 h definiert (Abbildung 13). Das verwendete Keyence-Mikroskop ermöglicht die exakte Speicherung der einzelnen Sphäroid-Positionen in der Kollagenmatrix, sodass die Sphäroide nach dem Fotografieren nach 0 h zum späteren Analysezeitpunkt nach 24 h erneut im identischen Bildausschnitt fotografiert werden konnten. Das erlaubte die Quantifizierung der Veränderungen innerhalb desselben Sphäroids ohne Verzerrung durch unterschiedliche Bildausschnitte.



**Abbildung 13:** Schematische Darstellung des Ablaufs zur Durchführung des 3D Sphäroid-basierten Sprout-Experiments. Abbildung erstellt in BioRender.com.

#### 4.2.3.3 Quantifizierung der Sphäroide

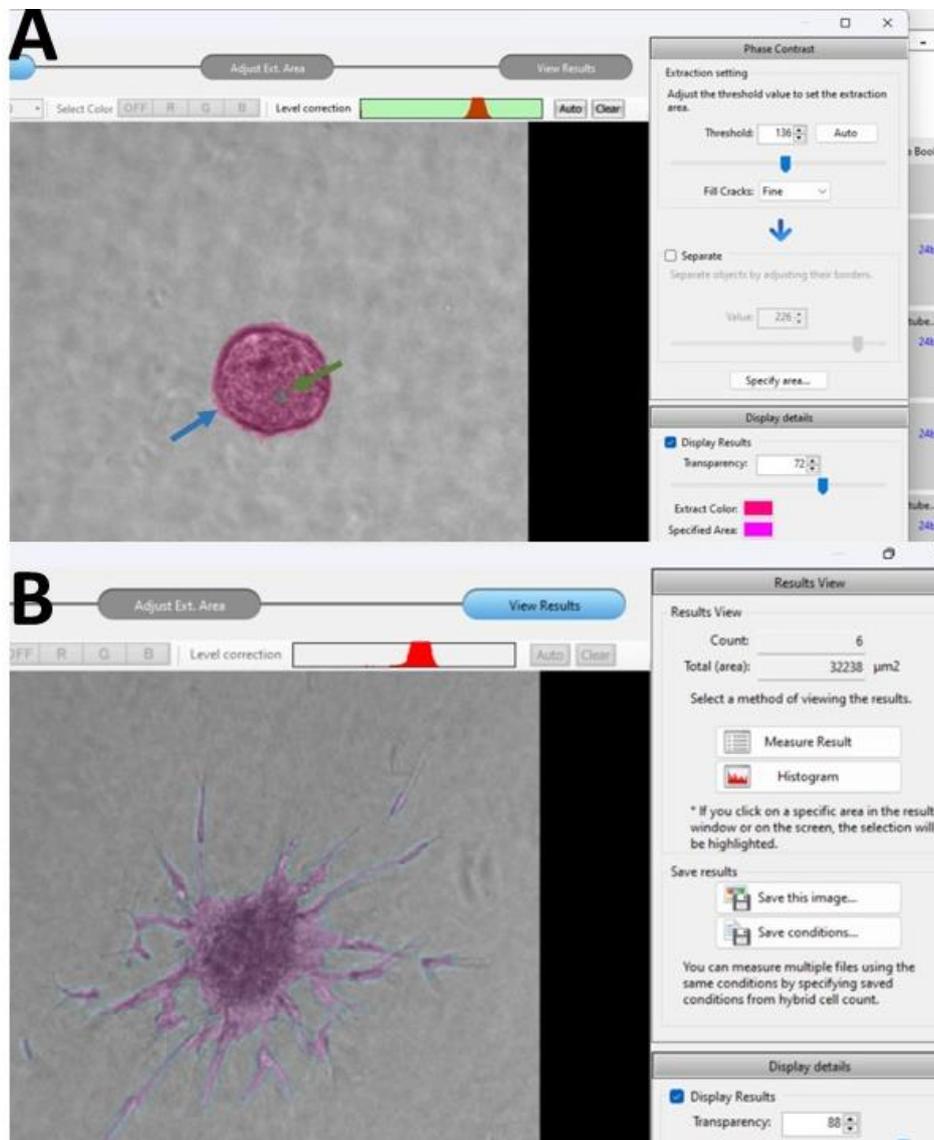
Die Fotos der Sphäroide wurden in der 100-fachen Vergrößerung nach 0 und 24 h mit dem BZ-X-700 Analyzer unter der Verwendung des „Hybrid Cell Count“ Werkzeuges quantifiziert (Abbildung 14). Mit diesem Werkzeug ist es möglich, die Fläche der Sphäroide inklusive der aus den Sphäroiden migrierten Zellen automatisiert zu bestimmen und diese sowohl innerhalb als auch zwischen den Zeitpunkten zu vergleichen. Für die Evaluation wurde die Einstellung „Phase contrast“ verwendet und keine Extraktion eines spezifizierten Ausschnitts durchgeführt, da die Quantifizierung der gesamten Sphäroidfläche möglich war (Abbildung 15).



**Abbildung 14:** Verwendete Einstellungen der Software Analyzer BZ-X00 für die Ermittlung der Sphäroidfläche. Da die Sphäroidaufnahmen im Phasenkontrast aufgenommen wurden, wurde entsprechend für die Quantifizierung bei der Software „Phase contrast“ gewählt. Es wurde keine Extraktion eines spezifischen Zielbereichs durchgeführt, da die Fläche des gesamten Sphäroids in der 100-fachen Vergrößerung möglich war und somit keine Auswahl eines Bildausschnitts benötigt wurde.

Im nächsten Schritt wurde der Schwellenwert („Threshold“) so angepasst, dass die Fläche des Sphäroids markiert war und somit die Software für die Flächenberechnung ausschließlich die Fläche des Sphäroids verwendet. Kleinere nicht markierte Bereiche innerhalb der zu analysierenden Sphäroidfläche (Abbildung 15, A, grüner Pfeil) sowie markierte unspezifische Bereiche, die nicht zur Sphäroidfläche gehören (Abbildung 15, A, blauer Pfeil), wurden manuell

präzisiert, sodass eine exakte Berechnung der Sphäroidfläche gewährleistet werden konnte. Die berechneten Flächen wurden dann zwischen dem Zeitpunkt 0 h (Abbildung 15, A) und dem Zeitpunkt 24 h (Abbildung 15, B) verglichen.

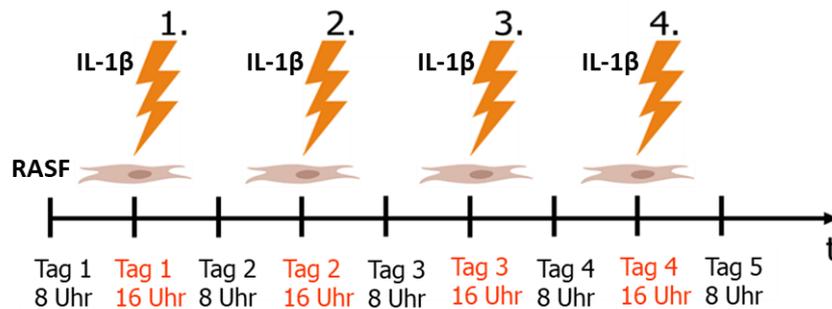


**Abbildung 15:** Definition der zu berechnenden Sphäroidfläche. Zunächst wurde der Schwellenwert ("Threshold") so bestimmt, dass die Umrisse des Sphäroids markiert waren, da die Software nur die Fläche der markierten Bereiche bestimmt. Anschließend wurden manuell nicht markierte Lücken innerhalb der Sphäroidfläche (grüner Pfeil) nachmarkiert und unspezifische Markierungen am Rand des Sphäroids (blauer Pfeil) ausgeschlossen. (A) Sphäroid nach dem Einbetten in die Kollagenmatrix zum Zeitpunkt 0 h. (B) Sphäroid nach dem Aussprossen zum Zeitpunkt 24 h.

#### 4.2.4 Repetitive Stimulierung der synovialen Fibroblasten

Bei Patienten mit RA kommt es neben der chronischen Entzündung zu wiederkehrenden inflammatorischen Schüben, die unter anderem zu einer zusätzlichen temporären Aktivierung des Synoviums und somit zur Aktivierung der synovialen Fibroblasten und anderen Zellen

führen (Kapitel 1.3.2). Diese wiederkehrenden inflammatorischen Schübe sollten *in vitro* nachgestellt werden, um zu analysieren, welchen Effekt eine repetitive Stimulierung bzw. Aktivierung auf RASF bezüglich der Expression von Genen im Kontext der Angiogenese hat. Hierfür im Rahmen der vorliegenden Dissertation ein repetitives Stimulierungsschema etabliert, bei dem sich Erholungsphasen und Stimulierungsphasen abwechseln und vor den 2D Tube-Formation-Experimenten durchgeführt werden konnten (Abbildung 16). Die RASF wurden zunächst in einer T75-Zellkulturflasche bis zu einer Konfluenz von ca. 70-80% unter Standardbedingungen kultiviert. An Tag 1 wurden die RASF mit Trypsin abgelöst, für 10 min bei 300 x g zentrifugiert und anschließend in Fibroblastenmedium resuspendiert. Die RASF wurden mit einer Konfluenz von 50% und einem Gesamtvolumen von 2 ml pro Well in eine 6-Well-Platte ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert. Nach 8 h wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit sterilem 1xPBS gewaschen und anschließend mit 0,05 ng/ml IL-1 $\beta$  oder 5 ng/ml TNF $\alpha$  für 16 h stimuliert. An Tag 2 (16 h nach der Stimulierung) wurde der Überstand abgenommen, die Zellen mit sterilem 1xPBS gewaschen und jeweils 2 ml Fibroblastenmedium ohne Stimulanzen zugegeben und für 8 h zur unter Standardbedingungen kultiviert. Nach 8 h Stimulationsfreier Kultur folgte ein weiterer Mediumwechsel und für 16 h ein erneuter Stimulierungsschritt wie oben beschrieben. Insgesamt wurden die Zellen nach diesem Schema 4-mal stimuliert (Abbildung 16). Die abgenommenen Überstände zwischen den einzelnen Phasen wurde immer direkt für 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert, aliquotiert und für die spätere IL-6-Quantifizierung mittels ELISA bei -20°C gelagert. Nach Abschluss des Stimulierungsexperimentes wurde jeweils nach dem ersten und nach dem letzten Stimulierungszeitpunkt RNA-Zell-Lysate für spätere Sequenzierungsanalysen angefertigt (Kapitel 4.3.4). Als Kontrolle wurden unstimulierte RASF mitgeführt. Im weiteren Verlauf des Projektes wurde das Stimulierungsschema der Fragestellung angepasst und die Zellen 3-malig stimuliert, insbesondere für die Generierung der Lysate für die RNA-Sequenzierungsanalysen.



**Abbildung 16:** Schematische Darstellung der repetitiven Stimulierung der RASF mit IL-1 $\beta$ . Die Zellen wurden an Tag 1 um 8 Uhr ausgesät und nach 8 h das erste Mal mit 0,05 ng/ml IL-1 $\beta$  stimuliert. Nach 16 h wurden an Tag 2 um 8 h die Überstände abgenommen und die RASF erhielten Medium ohne IL-1 $\beta$ -Stimulierung. Nach 8 h wurden die RASF an Tag 2 für 16 h das zweite Mal für 8 h mit 0,05 ng/ml IL-1 $\beta$  stimuliert. Dieses Schema wurde bis Tag 5 fortgeführt.

## 4.3 Molekularbiologische Methoden

### 4.3.1 RNA-Isolation

#### 4.3.1.1 Gewinnung der RNA von Zellen auf einer Matrigel-Beschichtung

Für die RNA-Gewinnung aus den Zellen auf der Matrigel-Beschichtung von den Tube-Formation-Experimenten (Kapitel 4.2.2) wurde für die vorliegende Dissertation mit freundlicher Unterstützung von Stephanie Schmitt ein Protokoll etabliert. Die Etablierung war notwendig, da das Matrigel eine hohe Proteinkonzentration enthielt (> 9 mg/ml), wodurch sowohl die RNA-Ausbeute als auch die RNA-Qualität mangelhaft waren und die RNA für weitere Analysen nicht verwendet werden konnte. Um der Proteinkontamination in den Zell-Lysaten entgegen zu wirken, wurde ein Dispase-Verdau vor der eigentlichen Anfertigung der Zell-Lysate durchgeführt. Hierfür wurden die auf der Matrigel-Beschichtung gebildeten Tubes bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 20 min mit jeweils 10 U/cm<sup>2</sup> (= 50  $\mu$ l) Dispase pro Well verdaut. Dies bewirkte eine Verflüssigung des polymerisierten Matrigels. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, steriles 1xPBS zugegeben und nochmals für 3 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen und das Zellpellet in 350  $\mu$ l RLT Plus Puffer (RNeasy Plus Mikro Kit) resuspendiert. Die folgende RNA-Isolation wurde nach Herstellerangaben mit dem RNeasy Plus Micro Kit von Qiagen durchgeführt. Alternativ wurden die Lysate bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 4.3.1.2 RNA-Isolation aus den repetitiven Stimulierungs-Experimenten

Die RASF wurden in 6-Well-Platten kultiviert und entsprechend des Stimulierungsschemas behandelt (Kapitel 4.2.4). Nach Stimulierung der Zellen wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit sterilem 1xPBS gewaschen und pro Well 350  $\mu$ l RLT-Puffer (RNeasy Mini Kit) zugegeben. Anschließend folgte das Abschaben der Zellen mit einem Zellschaber und der Transfer des Zell-Lysats in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß. Das Lysat wurde für ca. 30 sec gevortext und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert oder sofort mit der RNA-Isolation gestartet. Die RNA-Isolation wurde entsprechend der Herstellervorgaben durchgeführt. Im Rahmen der Isolation wurde ein 30-minütiger DNase-Verdau durchgeführt. Hierfür wurde das RNase-freie DNase Kit verwendet. Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit dem NanoDrop bestimmt und die RNA bis zur weiteren Analyse bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 4.3.2 Reverse Transkription

Für das Umschreiben isolierter RNA in cDNA wurde eine Gesamtmenge von 500 ng RNA verwendet. Zunächst wurde ein Mastermix hergestellt (Tabelle 19):

|                           |            |                       |
|---------------------------|------------|-----------------------|
| 5x AMV-RT-Puffer          | 10 $\mu$ l |                       |
| PCR dNTP-Mix              | 5 $\mu$ l  | 10 mM                 |
| AMV Reverse Transkriptase | 2 $\mu$ l  | 10 U/ $\mu$ l         |
| Random Hexamer Primer     | 1 $\mu$ l  | 2 $\mu\text{g}/\mu$ l |

**Tabelle 19:** Ansatz für die reverse Transkription zum Umschreiben isolierter RNA in cDNA.

Die RNA wurde auf 500 ng in 31  $\mu$ l mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  verdünnt und 1  $\mu$ l RNase Inhibitor (RNasin, 40 U/ $\mu$ l) hinzugefügt. Es folgte die Hitzedenaturierung bei  $70^{\circ}\text{C}$  für 2 min mit anschließendem Kälteschock in Eiswasser. Die 18  $\mu$ l Mastermix wurden hinzugefügt (Gesamtvolumen 50  $\mu$ l) und die Reaktion bei folgendem reverse Transkription PCR-Programm gestartet (Tabelle 20):

|      |          |  |
|------|----------|--|
| 25°C | 15 min   | Bindung der Oligonukleotide an die RNA       |
| 37°C | 5 min    |  |
| 42°C | 60 min   | Transkription der RNA in cDNA                |
| 55°C | 30 min   |  |
| 70°C | 10 min   | Inaktivierung der AMV Reversen Transkriptase |
| 4°C  | $\infty$ |  |

**Tabelle 20:** Reaktionsprogramm der reversen Transkription.

Die synthetisierte cDNA wurde bis zur Verwendung in weiteren Analysen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 4.3.3 Semiquantitative real-time PCR

Für die weitere molekulare Analyse der in cDNA umgeschriebenen RNA wurde der PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix von ThermoFisher Scientific verwendet. Das Prinzip des SYBR™ Green Systems basiert auf Fluoreszenz und ermöglicht so die Detektion von PCR-Produkten. Während der PCR amplifiziert die DNA-Polymerase die komplementäre Zielsequenz zur cDNA, wodurch die PCR-Produkte entstehen. Der SYBR™ Green-Farbstoff bindet an jede Kopie der doppelsträngigen DNA, wodurch ein Fluoreszenzsignal erzeugt wird. Mit fortschreitender PCR werden mehr PCR-Produkte erzeugt, sodass sich die Fluoreszenzintensität proportional zur Menge des erzeugten PCR-Produktes erhöht. Für eine relative Quantifizierung wurde parallel die Expression eines etablierten Referenzgens mitgemessen. Als Referenzgen in dieser Arbeit wurde die 18S ribosomale RNA (rRNA) verwendet. 18S rRNA ist eine Komponente der eukaryotischen ribosomalen kleinen Untereinheit (40S).

Direkt im Anschluss an die PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Bindung von SYBR™ Green an unspezifische Produkte auszuschließen bzw. zu detektieren, da SYBR™ Green unspezifisch an alle DNA-Doppelstränge bindet. Hierfür wurden durch Erhitzen auf bis zu 95°C die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen der DNA-Helix aufgetrennt, sodass der Doppelstrang in 2 Einzelstränge dissoziiert bzw. aufgeschmolzen wird. Die Schmelzkurve verläuft sigmoid, wobei der mathematische Wendepunkt der Kurve der spezifischen Schmelztemperatur des erwarteten Produkts entspricht. An diesem Wendepunkt denaturiert der Doppelstrang, wodurch der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt wird und somit das SYBR™ Green Signal abnimmt. Der Schmelzpunkt eines PCR-Produktes ist unter anderem davon abhängig, wie hoch der jeweilige Anteil an G-C- bzw. A-T-Paarungen ist, da G-C-Bindungen, im Gegensatz zu A-T-Bindungen, über drei Wasserstoffbrückenbindungen verfügen und somit eine höhere Schmelztemperatur haben. Die kurzen Primer-Dimere haben meistens eine geringere Schmelztemperatur als die zu erwartenden PCR-Produkte. Somit sind die Primer-Dimere als frühere Peaks mit niedrigeren Schmelzpunkten als die erwarteten PCR-Produkte in der Schmelzkurvenanalyse zu erkennen. Sollten unspezifische Produkte bzw. Dimere in der Reaktion detektiert werden, kann die real-time PCR nicht ausgewertet werden. In diesem Fall ist es unerlässlich, die Primer und/oder die real-time PCR-Bedingungen zu optimieren (Springer, Lexikon der medizinischen Laboratoriumsdiagnostik, 2019)

Für die Durchführung der real-time PCR wurde zunächst folgender Ansatz hergestellt (Tabelle 21):

|  | <b>Pro Reaktion</b> |
|--|---------------------|
| <b>PowerUP SYBR Green Master Mix</b>                                       | 10 µl               |
| <b>Primer Mix 10 µM (vorwärts und rückwärts)</b>                           | 2 µl                |
| <b>Wasser</b>  | 6 µl                |
| <b>cDNA-Template (umgeschrieben aus 500 ng RNA in einem 50 µl Volumen)</b> | 2 µl                |

**Tabelle 21:** Ansatz für die quantitative real-time PCR

Als Negativkontrolle wurde statt des cDNA-Templates ddH<sub>2</sub>O eingesetzt. Der Ansatz wurde in eine PCR-Mikrotiterplatte pipettiert, abzentrifugiert und die PCR mit dem Thermocycler von Thermofisher Scientific (Quantstudio 5) durchgeführt. Folgendes Programm wurde verwendet (Tabelle 22):

| <b>Schritt</b>            | <b>Temperatur</b> | <b>Dauer</b> | <b>Zyklen</b> |
|---------------------------|-------------------|--------------|---------------|
| UDG-Aktivierung           | 50°C              | 2 Min        | Hold          |
| Dual-Lock DNA-Polymerase  | 95°C              | 2 Min        | Hold          |
| Denaturierung             | 95°C              | 15 Sec       | 40            |
| Primerbindung (Annealing) | 57°C              | 15 Sec       | 40            |
| Extension                 | 72°C              | 60 Sec       | 40            |
| Schmelzkurvenanalyse      | 95°C              | 15 Sec       |               |
|                           | 60°C              | 1 Min        |               |
|                           | 95°C              | 1 Sec        |               |

**Tabelle 22:** Reaktionsprogramm der quantitativen real-time PCR

Die Ergebnisse wurden anschließend mit der Quantstudio 5-Software ausgewertet.

#### 4.3.4 RNA-Sequenzierung

In der vorliegenden Dissertation wurde die Expression von Genen nach repetitiver Stimulierung der RASF im Vergleich zu einmal stimulierten RASF mit 0,05 ng/ml IL-1 $\beta$  sowie den entsprechenden unstimulierten Kontrollen untersucht (Kapitel 4.2.4). Hierfür wurde die Gesamt-RNA der RASF nach Stimulation isoliert und quantifiziert. Anschließend erfolgte die RNA-Sequenzierung sowie die bioinformatischen Auswertungen der Sequenzierung an der Bioinformatik Core Unit des Max-Planck-Institutes für Herz- und Lungenforschung. Das am MPI durchgeführte Vorgehen der Sequenzierung und Auswertung ist nachfolgend beschrieben.

Um die RNA sequenzieren zu können, wurde zunächst eine Sequenzierungs-Bibliothek erstellt. Hierfür wurde die RNA in cDNA umgeschrieben, fragmentiert und Adapter-Sequenzen an den

5'-Ende der cDNA-Moleküle eingefügt. An dieser Adapter-Sequenz wurde dann bei der darauffolgenden cDNA-Amplifizierung der für die RNA-Sequenzierung benötigte Adapter eingebaut. Anschließend erfolgten die Aufreinigung und die Quantifizierung der Qualität des PCR-Produktes. Nach Generierung der Sequenzierungs-Bibliothek folgte die Cluster-Amplifizierung. Bei der Cluster Amplifizierung wurde jedes Fragment der Bibliothek in tausende identische Kopien geklont. Zunächst wurde eine Fließzelle mit der generierten Sequenzierungsbibliothek beladen. Die auf der Oberfläche der Fließzelle lokalisierten Primer hybridisierten mit den Adaptoren der Sequenzierungs-Bibliotheken. Eine Polymerase synthetisierte dann den reversen Strang. Dieses Amplifikationsverfahren wurde mehrere Male wiederholt, sodass zahlreiche Cluster entstanden. Für die Sequenzierung wurden den Sequenzierungsreagenzien Fluoreszenz-markierte Nukleotide hinzugefügt. Diese wurden dann während der Synthese der komplementären Stränge der Cluster eingebaut und durch spezifische Intensitätssignale von eindeutiger Wellenlänge identifizierbar gemacht, wodurch die Sequenzen bestimmt werden konnten. Bevor die Sequenzierung analysiert wurde, musste zunächst eine Qualitätskontrolle der Rohdaten durchgeführt werden, um auszuschließen, dass Fehler bei der Generierung der Sequenzierungs-Bibliothek oder beim Sequenzieren aufgetreten sind, die die Daten beeinflussen. Diesen Prozess nennt man in der Bioinformatik FastQC und beinhaltet beispielsweise auch das Entfernen der Adapter. Um herauszufinden, wo die ermittelten Sequenzen im humanen Genom ihren Ursprung haben, wurden im nächsten Schritt die Sequenzen mit Hilfe von STAR (engl. *spliced transcripts to a reference*) mit einem humanen Referenzgenom verglichen. Mittels *feature Counts* wurde dann die Anzahl der mit dem Referenzgenom übereinstimmenden Sequenzen gezählt (= Counts), wobei neben Genen auch Exons, Promoter, Genkörper und chromosomale Positionen mitgezählt wurden. Auf diese Weise wurden die Rohdaten der in den Proben unterschiedlich exprimierten Gene ermittelt. Um herauszufinden, welche Gene zwischen den unterschiedlichen Bedingungen signifikant differenziell exprimiert waren, wurden die Rohdaten mathematisch berechnet. Hierfür wurden die signifikant differenziell exprimierten Gene (DEG) unter Einbezug der absoluten Expression (engl. *basemean*), der Abweichung in der Expression (engl. *log2 fold change*, Log2FC) und der Signifikanz (engl. *adjusted pvalue*, Padj) ermittelt. Der Log2FC berechnete sich wie folgt:

$$\text{Log2}(\text{Mittelwert (Anzahl Counts Probe 1)} / \text{Mittelwert (Counts Probe 2)})$$

Der p-Wert wurde über die Multiparameter-Korrektur nach Benjamini-Hochberg angepasst, um die Anzahl der falsch-positiven Ergebnisse zu reduzieren und wird deshalb als Padj bezeichnet. Die Multiparameter-Korrektur ist auf 5% limitiert, wenn der Padj auf 0,05 eingestellt wird, was bedeutet, dass bei 20 Kandidaten mit einem Padj = 0,05 ein Kandidat falsch-signifikant ist.

Die signifikant angereicherten DEG innerhalb der Signalwege, Gengruppen und Erkrankungen wurden über den Webserver KOBAS aus der Datenbank KEGG PATHWAY ermittelt und nach Rücksprache zu den relevanten Vergleichsgruppen an der Bioinformatik Core Unit des Max-Planck-Institutes für Herz- und Lungenforschung graphisch dargestellt. Die von Bioinformatik Core Unit des Max-Planck-Institutes für Herz- und Lungenforschung erstellten Graphiken dienten als Basis für die in der vorliegenden Dissertation dargestellten modifizierten Abbildungen und angepassten Auswertungen zur Subgruppen-Analyse der Top 50 DEG zwischen einmal und repetitiv stimulierten RASF.

#### 4.3.5 Hyaluronidaseverdau synovialer Gelenkflüssigkeiten von RA-Patienten

Zum Bestimmen der Canstatin-Konzentration in synovialen Gelenkflüssigkeiten wurden die Gelenkflüssigkeiten zunächst mit Hyaluronidase aus Schafshoden verdaut. Hierfür wurden 250 U Hyaluronidase pro ml Synovialflüssigkeit (20 µl Hyaluronidase + 400 µl synoviale Gelenkflüssigkeit) manuell vermischt und für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler bei 200 x g inkubiert. Anschließend wurde der Verdau für 45 min bei 5°C bei 2000 x g zentrifugiert. Die verdaute synoviale Gelenkflüssigkeit wurde aliquotiert, bei -80°C gelagert und für ELISA-Messungen verwendet (Kapitel 4.3.6).

#### 4.3.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

In den Stimulierungsexperimenten wurden RASF mittels TNF $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Stimulierung repetitiv aktiviert (Kapitel 4.2.4). Die Aktivierung von RASF lässt sich unter anderem durch die Sekretion von IL-6 nachweisen. Zum Nachweis der Aktivierung wurden Zellkulturüberstände der RASF gesammelt, zentrifugiert und mittels ELISA (R&D Systems) die IL-6 Konzentration sowie von CXCL2 nach Herstellerangaben bestimmt. Zur Bestimmung der Canstatin-Konzentrationen in humanen synovialen Gelenkflüssigkeiten (siehe Hyaluronidase-Verdau) bzw. der Canstatin- und Endostatin-Konzentration im Serum von RA-, OA- und gesunden Patienten wurden jeweils ELISA Kits von R&D Systems nach Herstellerangaben verwendet. Zur

Analyse der Sekretion der Gefäßregulatoren während der Tube-Formatio-Experimente (Kapitel 4.2.2) wurde in den Überständen nach 4 bzw. 8 h die Konzentrationen von ANGPT2 und VEGF bestimmt. Hierfür wurden ebenfalls ELISA-Kits von R&D Systems verwendet.

#### 4.3.7 Bestimmung der Endotoxizität der verwendeten Matrixfragmente

Um eine Endotoxin-Kontamination in den Matrixfragmenten Tumstatin, Arresten, Canstatin und Endostatin auszuschließen, wurde ein chromogenes Endpunkt-Experiment zum Nachweis von Endotoxin auf Grundlage der Limulus-Amöbozyten-Lysat-Methode durchgeführt. Die Methode basiert auf dem Prinzip der Endotoxin-Interaktion mit dem Proenzym Faktor C in den zirkulierenden Amöbozyten des Pfeilschwanzkrebses. Dieses Proenzym wird in Gegenwart von Endotoxinen wie LPS (Lipopolysacchariden) aktiviert, die aus der äußeren Zellmembran gram-negativer Bakterien stammen. Mittels Messung der Aktivität von Faktor C in Gegenwart eines Peptidsubstrates, welches nach der Proteolyse p-Nitroanilin sezerniert und durch diese enzymatische Reaktion eine gelbe Farbe erzeugt, können die Endotoxinwerte ermittelt werden. Der Farbumschlag wird bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Für die Bestimmung der Endotoxinwerte wurde das Pierce™ chromogenes Endotoxin Quant Kit entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

Zum Messen des Endotoxins in den verwendeten Matrixfragmenten wurden dieselben Proteinkonzentrationen verwendet, die auch in den Experimenten eingesetzt wurden, was bei Canstatin 0,5 µg/ml, Endostatin 0,5 µg/ml, Arresten 2 µg/ml und Tumstatin 0,5 µg/ml entsprach. Als Standardreihe wurde eine Verdünnungsreihe aus 0,1; 0,05; 0,025 und 0,01 EU/ml hergestellt. Es wurden jeweils 3 Replikate der Standardreihe und der Proben bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen (Tabelle 23 und Tabelle 24). Die Messwerte wurden zwischen Standardreihe und Proben verglichen und anhand der Messwerte der Standardreihe die Endotoxinkonzentration in den Matrixfragmenten bestimmt. Somit konnte gezeigt werden, dass die LPS-Konzentration bei der verwendeten Proteinmengen von Canstatin unter 0,05 EU/ml, von Endostatin unter 0,01 EU/ml und von Arresten sowie Tumstatin unter 0,1 EU/ml lag (Tabelle 24).

| Endotoxin [EU/ml] | Messwerte (405 nm) |        |        |       |      |
|-------------------|--------------------|--------|--------|-------|------|
|                   | R1                 | R2     | R3     | MW    | STAB |
| 0,1               | 0,67               | 0,629  | 0,67   | 0,66  | 0,02 |
| 0,05              | 0,33               | 0,291  | 0,096  | 0,24  | 0,10 |
| 0,025             | 0,098              | 0,038  | 0,114  | 0,08  | 0,03 |
| 0,01              | 0,01               | -0,056 | -0,082 | -0,04 | 0,04 |

**Tabelle 23:** Standardreihe des Endotoxintest. Es wurden folgende Verdünnungen eingesetzt: 0,1; 0,05; 0,025 und 0,01 EU/ml. Die Standardreihe wurde in Triplikaten (R1-3) bei 405 nm gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STAB).

| Proteine   | Messwerte (405 nm) |        |        |       |      | Ergebnis |         |
|------------|--------------------|--------|--------|-------|------|----------|---------|
|            | R1                 | R2     | R3     | MW    | STAB | EU/ml    | ng/ml   |
| Canstatin  | 0,383              | 0,101  | 0,15   | 0,21  | 0,12 | < 0,05   | < 0,005 |
| Endostatin | 0,08               | -0,093 | -0,078 | -0,03 | 0,08 | < 0,01   | < 0,001 |
| Arresten   | 0,45               | 0,482  | 0,395  | 0,44  | 0,04 | < 0,1    | < 0,01  |
| Tumstatin  | 0,572              | 0,423  | 0,344  | 0,45  | 0,1  | < 0,1    | < 0,01  |

**Tabelle 24:** Endotoxinkonzentrationen [EU/ml] in den in dieser Arbeit verwendeten Matrixfragmenten. Es wurden folgende Proteinkonzentrationen auf Endotoxizität getestet: 0,5 µg/ml Canstatin, 0,5 µg/ml Endostatin, 2 µg/ml Arresten und 0,5 µg/ml Tumstatin. Die Proteine wurden jeweils in Triplikaten (R1-3) bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (STAB) sowie die anhand der in Tabelle 23 dargestellten Messwerte der über die Standardreihe eingeordneten Endotoxinkonzentrationen [EU/ml].

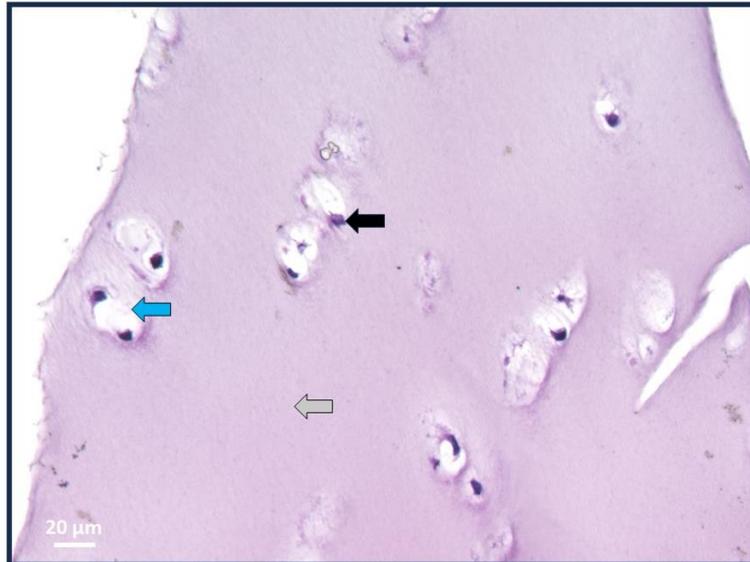
Eine LPS-Kontamination des für die Stimulierungsexperimente verwendete IL-1 $\beta$  wurde durch Erhitzen von IL-1 $\beta$  auf 70°C für 2 h und anschließender Stimulierung der RASF mit dem Hitze-inaktivierten IL-1 $\beta$  ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt).

#### 4.4 Charakterisierung der RASF/EZ-Interaktionen bzgl. der Neovaskularisierung im SCID-Maus-Modell der RA

Wie in Kapitel 3.1 beschrieben, wurden für das in der vorliegenden Arbeit angewandte Tiermodell SCID-Mäuse verwendet, denen das adaptive Immunsystem (B- und T-Zellen) fehlt, sodass humane RASF sowie humaner Knorpel ohne Abwehrreaktionen subkutan implantiert werden können. Dies bietet den Vorteil, dass co-implantierte synoviale Zellen mit Knorpel unter physiologisch ähnlichen Gegebenheiten im Gelenk von RA-Patienten analysiert werden können. Für die vorliegende Arbeit wurde das etablierte SCID-Maus-Modell zur Analyse der RASF-Migration der Arbeitsgruppe (Lefèvre et al. 2009) verwendet und teilweise für die präzise Beantwortung der Fragestellungen bzgl. der RASF/EZ- bzw. RASF/Matrix-Interaktionen modifiziert, da hier insbesondere die Kinetik der RASF-vermittelten Angiogenese im Zeitverlauf im Fokus stand. Die Experimente wurden entsprechend der Genehmigung vom Regierungspräsidium Gießen (Az. V54 – 19 c 20 15 h 01 GI 20/10) nach dem Tierschutzgesetz durchgeführt.

#### 4.4.1 Vorbereitung der Implantate

Für die Implantation wurde Knorpel aus Kniegelenk-Ersatzoperationen von OA-Patienten verwendet. Hierbei war darauf zu achten, dass der Knorpel direkt nach Entnahme vollständig in 0,9% sterile NaCl-Lösung überführt wurde und bis zur Vorbereitung der Implantate max. für eine Nacht bei max. 15°C gelagert wurde, um ein Absterben der Chondrozyten und Degradieren der Knorpelmatrix zu verhindern. Vor der Präparation für die Implantate wurde der Knorpel zunächst makroskopisch auf pathologische Veränderungen und Destruktionen untersucht. Für die Implantate wurde ausschließlich Knorpelareale verwendet, die eine glatte Struktur ohne farbliche Veränderungen aufwiesen. Anschließend wurde die oberste Schicht des Knorpels inklusive der dünnen Proteinschicht, die sich zum Schutz des Knorpels auf der Knorpeloberfläche befindet, mit einem Skalpell abgetragen und der Knorpel von der Knochenplatte präpariert. Wichtig hierbei war, dass alle Kanten des Knorpels glatt geschnitten waren, damit die Knorpelmatrix für die RASF-Knorpelinvasion glattkantig frei lag und so die Invasion der RASF klar definiert werden kann. Der Knorpel wurde mit einem Skalpell in ca. 1 mm<sup>3</sup> große Knorpelstücke geschnitten. Um zu gewährleisten, dass für die Implantation ausschließlich intakter Knorpel mit vitalen Chondrozyten verwendet wurde, wurden 2-3 Knorpelstücke vom nicht verwendeten Rand in TissueTek Einfriermedium eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde wie in Kapitel 4.5.1 beschrieben, 5 µm Gefrierschnitte angefertigt, diese kurz luftgetrocknet und eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung mit reduzierten Zeiten zur Entwässerung (Kapitel 4.5.2.2) durchgeführt, anhand derer die Homogenität der Knorpelmatrix sowie die Chondrozyten bzw. Chondrozytenhöfe beurteilt wurde. Es wurde ausschließlich Knorpel implantiert, der eine homogene Knorpelmatrix (Abbildung 17, grauer Pfeil), vitale Chondrozyten (Abbildung 17, schwarzer Pfeil) und normal große Chondrozytenhöfe (Abbildung 17, blauer Pfeil) aufwies.



**Abbildung 17:** Histologische Darstellung des implantierten humanen Knorpels in die SCID-Mäuse in der 200-fachen Vergrößerung. Der Knorpel weist eine homogene Knorpelmatrix (grauer Pfeil), vitale Chondrozyten (schwarzer Pfeil) sowie normal große Chondrozytenhöfe (blauer Pfeil) auf.

Für die Implantation wurde eine resorbierbare, wasserunlösliche sterile porcine Gelatinematrix in Schwammform mit poröser Textur (GELFOAM® oder SPONGOSTAN®) vorbereitet. Die Gelatinematrix wurde mit einem Skalpell in möglichst gleichmäßige Stücke mit je 6 mm Kantenlänge geschnitten. Hierbei war darauf zu achten, dass die Stücke mittig bis zur Hälfte eingeschnitten wurden, damit anschließend die Knorpelstücke möglichst mittig eingesetzt werden konnten. Es wurde jeweils ein Knorpelstück pro Gelatinematrix eingebracht. Um ein Austrocknen des Knorpels zu verhindern, wurden direkt nach Einsetzen in die Gelatinematrix die vorbereitete (Zellsuspensions-) Lösungen zugegeben (Abbildung 8). Die poröse, formbare und wasserunlösliche Schwammstruktur der Gelatinematrix ermöglicht die Zugabe wässriger Lösungen, die von der Gelatinematrix aufgenommen werden und somit als Komplex subkutan in die SCID-Mäuse eingebracht werden können.

Die für die Tierversuche verwendeten RASF wurden wie in Kapitel 4.1.4 beschrieben unter Standardbedingungen in Passage 7 bis zu einer max. Konfluenz von 90% kultiviert. Am Tag der Implantatvorbereitung wurden die Zellen mit 0,9% steriler NaCl-Lösung gewaschen, trypsinisiert, gezählt und bei 300 x g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in dem berechneten Volumen 0,9% steriler NaCl-Lösung resuspendiert, sodass die Zellsuspension eine Konzentration von  $2,5 \times 10^7$  Z/ml aufwies. Für die kontralaterale Implantationsseite wurde 0,9% sterile NaCl-Lösung bereitgestellt. Pro Knorpel-Gelatinematrix-Kombination wurde für die ipsilaterale Implantationsseite jeweils 50  $\mu$ l

Zellsuspension in 0,9% NaCl-Lösung und für die kontralaterale Implantationsseite jeweils 50 µl 0,9% NaCl-Lösung zugegeben (Abbildung 8). Dies entsprach ipsilateral einer Zellzahl von  $5 \times 10^5$  RASF pro Implantat.

#### 4.4.2 Schmerztherapie

Zur Vorbeugung gegen eventuell durch den operativen Eingriff verursachte Schmerzen wurde den SCID-Mäusen 1 bzw. am Tag vor und bis 3 Tage nach dem operativen Eingriff 1,25 mg/ml Metamizol über das Trinkwasser in lichtgeschützten Wasserflaschen verabreicht. Da Metamizol einen leicht bitteren Geschmack hat, wurde das Trinkwasser zusätzlich mit Sucrose gesüßt. Die Metamizol-/Sucrose-/Trinkwasserkombination wurde täglich frisch angesetzt sowie die aufgenommene Wassermenge überwacht und dokumentiert. Eine weitere Schmerztherapie im Falle einer Entzündung oder offenen Wunde mit erhöhter Schmerzlast stand zur Verfügung, wurde in den durchgeführten Versuchsreihen jedoch nicht benötigt.

#### 4.4.3 Narkotisieren der SCID-Mäuse

Die SCID-Mäuse wurden mit 100 mg/kg Körpergewicht (KG) Ketamin und 15 mg/kg KG Xylazin narkotisiert. Dies entspricht 2 mg Ketamin und 0,3 mg Xylazin bei einer Maus mit einem durchschnittlichen KG von 20 g. Die Narkose wurde intraperitoneal mit einer Insulinspritze appliziert. Die narkotisierte Maus wurde bis zum vollständigen Wirken der Narkose in einen separaten Käfig gesetzt. Die Narkosedauer variierte zwischen 15 und 30 min.

#### 4.4.4 Subkutane Implantation

Die subkutane Implantation der RASF mit Knorpel in der Trägermatrix erfolgte unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank. Es wurde die *inverse wrap*-Technik angewendet und im erweiterten „SCID-Maus Migrationsmodell“ verwendet (Lefèvre et al. 2009). Hierfür wurde den narkotisierten SCID-Mäusen zunächst die Haut desinfiziert, die Haare von der Einschnittstelle entfernt und ipsilateral an der Flanke ein ca. 0,5 cm langer Schnitt gesetzt, sodass die Haut vollständig durchtrennt war. Das Bauchfell blieb unversehrt. Im nächsten Schritt wurde die eröffnete Haut angehoben und mit einer Schere vorsichtig eine subkutane Tasche präpariert. In die Tasche wurden jeweils 4 Gelatinematrizes mit RASF und Knorpel eingesetzt (ipsilateral: I). Anschließend wurde die Haut durch Vernähen der Wundränder mit 2-3 Nähten verschlossen und auf Dichtigkeit geprüft. Dieser Vorgang wurde kontralateral wiederholt und in die Tasche jeweils 4 Gelatinematrizes mit 0,9% steriler NaCl-Lösung ohne

RASF (kontralateral: IL) implantiert. Nach der subkutanen Implantation wurden die Mäuse bis zum Erwachen aus der Narkose auf eine Wärmeplatte transferiert. Zusätzlich wurden die Augen der Mäuse vor dem Austrocknen geschützt. Nach dem Erwachen wurden die Mäuse zurück in den Käfig gesetzt und so lange beobachtet, bis sie typische Verhaltensweisen wie Fellpflege, Fressen und neugieriges Erkunden ihrer Umgebung zeigten. Die dokumentierte Kontrolle der Wundheilung an den Nähten und des Gewichtes erfolgten die ersten 3 Tage nach der Operation 2-mal täglich, dann zwei Wochen lang alle 2 Tage und anschließend 2-3-mal wöchentlich.

#### 4.4.5 Effekte von Canstatin auf die Angiogenese

Neben der Analyse des RASF-vermittelten Effekts auf die Angiogenese an den Implantaten sollte auch der Canstatin-Effekt auf die RASF/EZ-Interaktionen untersucht werden. Daten aus der Literatur demonstrieren eine anti-angiogene Wirkungsweise von Canstatin, was in der vorliegenden Arbeit in den *in vitro*-Experimenten bestätigt werden konnte, weshalb Canstatin für das Tiermodell ausgewählt wurde. Für die Canstatin-Behandlung im Tiermodell wurden die Implantate wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben vorbereitet. Für die ipsilaterale Implantationsseite wurde der in Kapitel 4.4.1 beschriebenen vorbereiteten Zellsuspensionslösung 0,5 µg/ml Canstatin, gelöst in 0,9% steriler NaCl-Lösung, zugegeben (IC). Der 0,9% sterilen NaCl-Lösung für die Behandlung der kontralateralen Implantationsseite mit Canstatin wurde ebenfalls 0,5 µg/ml Canstatin zugefügt (ILC). Das Gesamtvolumen pro Implantat blieb jedoch bei 50 µl pro Gelatinematrix. Die anschließende subkutane Implantation erfolgte dann wie in Kapitel 4.4.4 beschrieben. Als Kontrolle wurden 2 SCID-Mäuse mitgeführt, denen ipsilateral und kontralateral jeweils 4 Gelatinematrizes inkl. Knorpel getränkt mit 50 µl 0,9% steriler NaCl-Lösung ohne RASF sowie ohne Canstatin implantiert wurden. Canstatin wurde nur initial zu den Implantaten zugegeben. Weitere Applikationen erfolgten nicht.

#### 4.4.6 Entnahme der Implantate

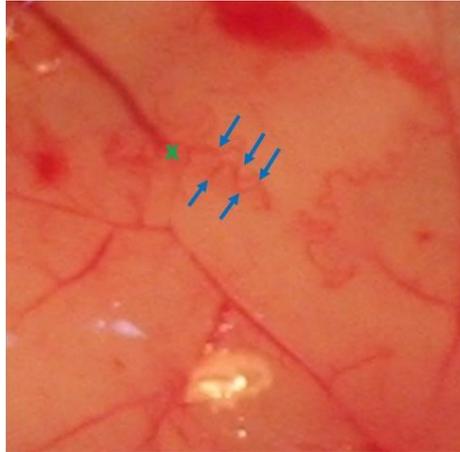
Um eine Aussage über den zeitlichen Verlauf der RASF/EZ-Interaktionen bzgl. der Angiogenese zu erhalten und in dem Kontext den Canstatin-Effekt auf die RASF/EZ-Interaktionen beurteilen zu können, wurden die Implantate an Tag 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 40 und 45 nach der Operation entnommen. Pro Zeitpunkt und Versuchsserie wurden im Rahmen der Arbeit Implantate von je 2 Mäusen ohne Canstatin- und 2 Mäusen mit Canstatin-Behandlung ausgewertet. Da

insgesamt 3 Versuchsserien mit jeweils 3 unterschiedlichen RASF-Populationen durchgeführt wurden, wurden pro Zeitpunkt Implantate von 6 Mäusen ohne Canstatin- und 6 Mäusen mit Canstatin-Behandlung entnommen und ausgewertet, was einem biologischen Replikat von  $n = 3$  entspricht, da die Mittelwerte aller ausgewerteten Implantate pro Tier für die Statistik verwendet wurden. Insgesamt wurden im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit 864 Implantate aus den Versuchsserien entnommen und histologisch analysiert.

Für die Entnahme der Implantate wurden die Mäuse wie in Kapitel 4.4.3 beschrieben narkotisiert und die Implantate mit der umliegenden Haut aus den Flanken der Tiere isoliert. Hierbei wurde möglichst eine Perforation des Bauchfells vermieden, in dem die Implantate durch vorsichtige Schnitte vom anliegenden Bindegewebe abgetrennt wurden. Anschließend erfolgte die Tötung der narkotisierten Mäuse unter Entbluten der Tiere. Die präparierten Implantate wurden mit 0,9% NaCl-Lösung gespült, in Petrischalen überführt und die Angiogenese von der Haut in die Implantate fotodokumentiert. Die Implantate wurden anschließend zügig von der Haut abgelöst, in TissueTek Einfriermedium eingebettet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für die histologische Auswertung gelagert.

#### 4.4.7 Analyse der Angiogenese

Zur Quantifizierung der RASF-vermittelten Angiogenese und des Canstatin-Effekts wurden die in Kapitel 4.4.6 angefertigten Fotos der Implantate ausgewertet. Hierfür wurden 4 je  $36\text{ mm}^2$  große repräsentative Areale am Implantat ausgewählt und die Anzahl der im Areal erkennbaren Helix-ähnlichen Gefäße gezählt. Die Helix-ähnlichen Gefäße waren anhand ihrer zahlreichen Windungen von normal ausgebildeten geraden und wenig verzweigten Blutgefäßen differenzierbar. Die Windungen wurden ebenfalls gezählt (Abbildung 18, blaue Pfeile). Ein Gefäß wurde als Helix-ähnlich definiert, wenn es 3 oder mehr Windungen aufwies (Abbildung 18, grünes Kreuz).



**Abbildung 18:** Quantifizierung der Helix-ähnlichen Gefäße in den SCID-Maus-Implantaten. Dargestellt ist ein 36 mm<sup>2</sup> großer repräsentativer Bildausschnitt von Blutgefäßen neben dem SCID-Maus-Implantat. Die Helix-ähnlichen Gefäße wurden in 4 Bereichen gezählt. Ein Gefäß wurde als Helix-ähnlich definiert, wenn es 3 oder mehr Windungen (blaue Pfeile) aufwies. Ein repräsentatives Helix-ähnliches Gefäß ist zur Veranschaulichung mit einem grünen Kreuz markiert.

## 4.5 Histologische und immunologische Methoden

### 4.5.1 Anfertigung von Gefrierschnitten

Die Anfertigung der Gefrierschnitte von Synovialgeweben, Knorpeln für Implantate, Implantaten und murinen Geweben bzw. Organen erfolgte an einem Kryostat. Die Gewebe wurden mit einer Schnittdicke von 5 µm angefertigt, auf einen Objektträger überführt und in -20°C kaltem Aceton für 10 min fixiert. Anschließend erfolgte die Abdampfung des Acetons von den fixierten Gewebeschnitten unter einem Abzug bei RT für 30 min. Die Gewebeschnitte wurden für die histologischen und immunhistologischen Analysen bei -20°C für maximal 5 Tage gelagert.

### 4.5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

#### 4.5.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gefrierschnitten

Gefrierschnitte für die histologische Analysen wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (HE-Färbung). Für die HE-Färbung wurden entweder kurz zuvor geschnittene und in Aceton fixierte oder vorbereitete bei -20°C (max. 7 Tage) gelagerte Aceton-fixierte Gewebeschnitte verwendet. Zunächst wurden die Zellkerne angefärbt (blau/lila) und hierfür die Gewebeschnitte für 10 min in 0,1%iger Hämatoxylin-Lösung inkubiert. Anschließend erfolgten ein Waschschrift in H<sub>2</sub>O und das Anfärben von Matrix und Zytoplasma (rosa/pink) mittels 10-minütiger Inkubation in 1%iger Eosin-Lösung. Die Gewebeschnitte wurden erneut in H<sub>2</sub>O

gewaschen und zum Dehydrieren durch eine aufsteigende Ethanolreihe (50%, 70%, 96%, 100% Ethanol für je 3-5 min) geführt. Anschließend wurden die dehydrierten Gewebeschnitte 3-mal für 5 min in Xylol geklärt. Zur Konservierung und mikroskopischen Dokumentation wurden die Gewebeschnitte mit Eindeckmedium (Entellan) und einem Deckglas eingedeckt.

#### 4.5.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung zur Beurteilung der Knorpelqualität für die Implantation in die SCID-Mäuse

Um zu gewährleisten, dass in die SCID-Mäuse humaner Knorpel mit einer homogenen Knorpelmatrix sowie vitale Chondrozyten implantiert wird, wurde vor der Vorbereitung für die Implantation eine verkürzte HE-Färbung zur Beurteilung der Knorpelqualität durchgeführt (Kapitel 4.4.1). Hierfür wurde ein ca. 1 mm<sup>3</sup> großes Knorpelstück (meist ein Randstück) in TissueTek eingebettet und 5 µm Schnitte am Kryostat hergestellt. Der Objektträger mit den Knorpelschnitten wurde für 5 min luftgetrocknet und anschließend für 10 min in Hämalaunlösung zum Anfärben der Zellkerne inkubiert. Es folgte ein 5 min Waschschriff in Leitungswasser und die 5 min Inkubation in der Eosinlösung zum Anfärben des Zytoplasmas sowie der Matrix. Nach der Färbung wurde der Gewebeschnitt in aufsteigender Alkoholreihe entwässert. Hierfür wurden die Schnitte jeweils 5-mal in 70% Ethanol, 95% Ethanol und in 100% Ethanol eingetaucht. Anschließend erfolgte die 1-minütige Inkubation in Xylol. Die Schnitte wurden mit Entellan eingedeckt und am Mikroskop beurteilt (Abbildung 17).

#### 4.5.3 Histologische Auswertung der Implantate

Zur Analyse des Invasionspotenzials der RASF in den humanen Knorpel im Rahmen der in Kapitel 4.4 beschriebenen Tierversuche wurden 5 oder 10 µm-Gefrierschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden wie in Kapitel 4.5.1 beschrieben fixiert und eine HE-Färbung durchgeführt (Kapitel 4.5.2). Anhand der HE-Färbung erfolgte die Quantifizierung der Invasion verblindet von 8 geschulten WissenschaftlerInnen bzw. Technischen Angestellten nach einem etablierten und mehrfach publiziertem Score (Tabelle 25) (Müller-Ladner et al. 1996; Neumann et al. 2002; Knedla et al. 2009; Lefèvre et al. 2009; Neumann et al. 2018). Für die Evaluation der Invasion wurden aufgrund von Vorkenntnissen zu Beginn der Invasion die an Tag 45, 40, 30, 24, 18 und 12 entnommenen Implantate verwendet. Auffälligkeiten in der Trägermatrix, der Qualität der Knorpelmatrix sowie der Vitalität der Chondrozyten wurden ebenfalls dokumentiert.

| Score | Invasion                          |
|-------|-----------------------------------|
| 0     | Keine oder minimale Invasion      |
| 1     | Sichtbare Invasion (2 Zelltiefen) |
| 2     | Invasion (5 Zelltiefen)           |
| 3     | Tiefe Invasion (> 10 Zelltiefen)  |

**Tabelle 25:** Score für die Quantifizierung der Invasion der RASF in den humanen Knorpel. Beim Scoring konnten Werte von 0-3 in ganzen Zahlen oder in 0,5-Schritten vergeben werden.

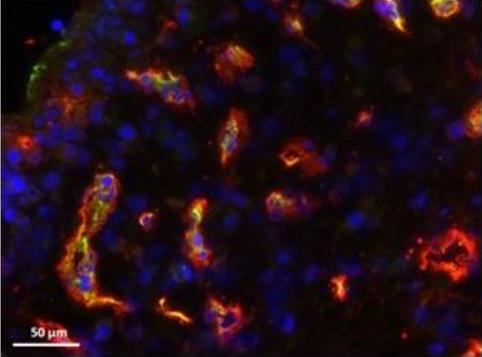
#### 4.5.4 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Analysen wurden zur Charakterisierung der veränderten Blutgefäßbildung bei der RA durchgeführt. In diesem Kontext sollte der Gefäßmarker Angiopoietin-2 (ANGPT2) im humanen Synovialgewebe von RA- und OA-Patienten sowie in den SCID-Maus-Implantaten zu verschiedenen Zeitpunkten nachgewiesen und die Expressionsstärke bestimmt werden. Hierfür wurden wie in Kapitel 4.5.1 beschrieben Gefrierschnitte von humanem Synovialgewebe und SCID-Maus-Implantaten angefertigt und für 5 min in 1xPBS rehydriert. Alle immunhistochemischen Arbeiten zur Analyse der 864 Implantate wurden mit freundlicher Unterstützung von Frau Oxana Bechtgoldt durchgeführt.

##### 4.5.4.1 Angiopoietin-2/CD31 Co-Färbung im humanen Synovialgewebe

Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte mittels 5% Magermilchpulver in 1xPBS für 1 h in einer Feuchtekammer. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper bei 4°C über Nacht. Als Kontrollen wurden zum einen Isotypkontrollen aus Isotyp-übereinstimmenden IgG-Seren aus der Ziege mitgeführt. Zum anderen wurden als Negativkontrollen die Gewebeschnitte nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert, um unspezifische Bindungen oder Kreuzreaktivitäten des Sekundärantikörpers auszuschließen. Nach Inkubation des primären Antikörpers wurden die Gewebeschnitte dreimal mit 1xPBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit den Sekundärantikörpern für 60 min bei Raumtemperatur in der Feuchtekammer. Anschließend wurden die Gewebeschnitte erneut dreimal mit 1xPBS gewaschen und für die Co-Färbung der CD31 Primärantikörper sowie die übereinstimmende Isotypkontrolle aus der Maus zugegeben. Die Gewebeschnitte wurden in der Feuchtekammer für 60 min bei RT inkubiert, anschließend folgte ein dreimaliger Waschschrift für je 3 min mit 1xPBS. Dann wurde der Sekundärantikörper für 60 min zugegeben und die Gewebeschnitte in der Feuchtekammer bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 3 min mit 1xPBS wurden die Gewebeschnitte mit dem

ROTI®Mount FluorCare DAPI-Medium eingedeckt, bei RT getrocknet und anschließend in der 400-fachen Vergrößerung mit dem BZ-X800-Mikroskop fotodokumentiert. Für die Quantifizierung der ANGPT2-Signale im humanen Synovium wurde für die vorliegende Dissertation ein Score etabliert. Hierfür wurden die ANGPT2-Signale in den Overlay-Aufnahmen der 400-fachen Vergrößerung über Zuhilfenahme der CD31-Färbung ermittelt und pro Blutgefäß ein Score von 1-4 vergeben (Abbildung 19). Anschließend wurde aus allen in der Aufnahme vorhandenen Blutgefäßen der Mittelwert gebildet und mit weiteren quantifizierten Arealen des Gewebes verrechnet. Anhand des folgenden Scores wurden die ANGPT2-Signale bestimmt:



| Färbung Blutgefäß im Overlay-Aufnahme | Beschreibung   | Score |
|---------------------------------------|--|-------|
|                                       | Gefäß überwiegend CD31 positiv, Färbung eindeutig grün                 | 1     |
|                                       | Gefäß sowohl CD31 als auch ANGPT2 positiv, keine Expression überwiegt  | 2     |
|                                       | Gefäß sowohl CD31 als auch ANGPT2 positiv, ANGPT2-Expression überwiegt | 3     |
|                                       | ANGPT2-Expression überwiegt deutlich, Gefäß leuchtet eindeutig rot     | 4     |

**Abbildung 19.** Beispiel einer Overlay-Aufnahme der ANGPT2- (rot) /CD31- (grün) Färbung in der 400-fachen Vergrößerung. Für die Quantifizierung der ANGPT2-Signale im humanen Synovialgewebe wurde nebenstehender Score verwendet. Anhand der ANGPT2- und CD31-Färbung in der Overlay-Aufnahme wurde pro Blutgefäß ein Score zwischen 1-4 vergeben. Der vergebene Score richtete sich dabei danach, welche Signale überwogen.

#### 4.5.4.2 Angiotensin-2-/CD31-Färbung in den SCID-Maus-Implantaten

Für die murine Angiotensin-2 Färbung der murinen Gefäßen in den SCID-Maus-Implantaten, wurden die Schnitte statt mit Aceton mit 4% PFA für 5 min fixiert. Anschließend wurden die Schnitte in 1xPBS für 5 min rehydriert. Für die Permeabilisierung der Zellen wurden die Schnitte mit 0,2% TritonX für 15 min bei RT inkubiert und anschließend 2-mal für 3 min mit 1xPBS gewaschen. Die Blockierung unspezifischer Bindestellen erfolgte mit 1% BSA für 30 min bei RT. Nachfolgend wurden 100 µl der primären Antikörperlösung (Angiotensin-2 monoklonal Kaninchen) oder der Isotypkontrolle (Isotyp monoklonal Kaninchen IgG) zugegeben und über Nacht bei 4°C in einer Feuchtekammer inkubiert. Als Negativkontrolle wurden 100 µl 1xPBS verwendet. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3-mal für 3 min in 1xPBS gewaschen und der sekundäre Antikörper (Ziege anti-Kaninchen H.L Cy3) für 60 min bei RT in der Feuchtekammer zugegeben. Anschließend folgte ein 3-maliger Waschschrift für

jeweils 3 min mit 1xPBS. Die Schnitte wurden mit ROTI®Mount FluorCare DAPI-Medium eingedeckt und bis zur mikroskopischen Auswertung in einer Feuchtekammer bei RT waagrecht gelagert. Die Fotodokumentation erfolgte mit dem BZ-X800-Mikroskop in der 400-fachen Vergrößerung.

Zum Nachweis der murinen Gefäße in den SCID-Maus-Implantaten wurde zusätzlich zur Angiopoietin-2-Färbung im seriellen Schnitt eine CD31-Färbung durchgeführt. Die Schnitte wurden in 4% PFA für 5 min bei RT fixiert, anschließend in 1xPBS für 5 min inkubiert und über Nacht in 1xPBS bei 4°C rehydriert. Am nächsten Tag wurden 100 µl der Antikörperlösung (CD31 PE Ratte anti-Maus) oder der Isotypkontrolle (Isotyp PE Ratte IgG2a) zugegeben und in einer Feuchtekammer für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend folgte ein 3-maliger Waschschrift für jeweils 3 min mit 1xPBS. Die Schnitte wurden mit ROTI®Mount FluorCare DAPI-Medium eingedeckt und bis zur mikroskopischen Auswertung in einer Feuchtekammer bei RT waagrecht gelagert. Die Fotodokumentation erfolgte mit dem BZ-X800-Mikroskop in der 400-fachen Vergrößerung.

#### 4.5.4.3 CD63 -Färbung der humanen RASF in den SCID-Maus-Implantaten

Zum Nachweis der humanen RASF-Migration in die Implantate wurde eine CD63-Färbung inkl. DAPI-Färbung der Zellkerne durchgeführt. Hierfür wurden wie in Kapitel 4.5.1 beschrieben Schnitte von ipsilateralen und kontralateralen Implantaten von Tag 3 angefertigt, für 10 min in Aceton fixiert und anschließend für 30 min getrocknet. Es folgte zum Rehydrieren ein 5-minütiger Inkubationsschritt in 1xPBS. Für die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde 5% Magermilchpulver in 1xPBS verwendet. Pro Schnitt wurden 100 µl Blockierungsreagenz zugegeben und für 1 h bei RT in einer Feuchtekammer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit 100 µl der primären Antikörper-Lösung (CD63 polyklonal Kaninchen anti-human) bzw. der entsprechenden Isotypkontrolle (Isotyp polyklonal Ziege IgG) oder 1xPBS als Kontrolle bei 4°C über Nacht in einer Feuchtekammer inkubiert. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift in 1xPBS für jeweils 3 min. Im nächsten Schritt wurde 1 Tropfen der Sekundär-Antikörper (Histofine Simple Stain MAX PO (G) anti-Kaninchen) zugegeben und die Schnitte für 30 min bei RT in einer Feuchtekammer inkubiert. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift in 1xPBS für jeweils 3 min. Für die Detektion der CD63-Signale wurde die AEC-Entwicklerlösung (AEC-Substrat-Kit) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. 100 µl der angesetzten AEC-Lösung wurde auf die Schnitte gegeben und die Färbung unter

dem Mikroskop verfolgt. Nach ca. 3-minütiger Entwicklungszeit wurde die Färbung mittels 1xPBS abgestoppt, die Schnitte mit ROTI®Mount FluorCare DAPI-Medium eingedeckt und bis zur mikroskopischen Auswertung in einer Feuchtekammer bei RT waagrecht gelagert. Die Fotodokumentation erfolgte mit dem BZ-X800-Mikroskop in der 400-fachen Vergrößerung.

#### 4.6 Statistische Auswertungen

Soweit nicht anders angegeben, wurde aufgrund der Verteilung der Stichproben eine nicht-parametrisch Verteilung angenommen. Folgende Testverfahren wurden für die Berechnungen der statistischen Signifikanzen unter der Verwendung von der Software GraphPad Prism 6 angewendet (Tabelle 26):

| Art und Umfang der Stichprobe | Angewendetes Testverfahren   |
|-------------------------------|------------------------------|
| 2 unabhängige Stichproben     | Mann Whitney U-Test          |
| > 2 unabhängige Stichproben   | Kruskal-Wallis-Test (H-Test) |
| 2 verbundene Stichproben      | Wilcoxon-Test                |
| > 2 verbundene Stichproben    | Friedman-Test                |

**Tabelle 26:** Angewendete Testverfahren für die Berechnungen der statistischen Signifikanzen.

Die statistische Signifikanzgrenze lag bei  $p \leq 0,05$ . Das bedeutet, dass wenn der p-Wert kleiner als das vorgegebene Signifikanzniveau  $\alpha$  von 0,05 ist, die Nullhypothese (es existiert kein Unterschied zwischen den Stichproben) verworfen und ein signifikanter Unterschied zwischen den Stichproben angenommen wurde. Das Signifikanzniveau  $\alpha$  begrenzt dabei die Wahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art, dass die Nullhypothese fälschlicherweise abgelehnt wurde. Bei  $\alpha = 0,05$  und 20 Tests erhält man folglich mindestens ein falsch signifikantes Ergebnis. Die Begrenzung der Irrtumswahrscheinlichkeit auf höchstens  $\alpha$  gilt jedoch nur für das Testen einer Hypothese. Werden zur Analyse einer Hypothese mehrere Tests mit Begrenzung von  $\alpha$  durchgeführt, steigt mit jedem Test die versuchsbezogene Irrtumswahrscheinlichkeit, sodass die Irrtumswahrscheinlichkeit größer als  $\alpha$  sein kann. Daher wurde in der vorliegenden Dissertation bei Vergleichen von mehr als 2 Stichproben ein multiples Testverfahren (Multiparameterkorrektur), der Dunn's-Test, angewendet, um  $\alpha$  zu kontrollieren. Multiple Signifikanzniveaus sind definiert als die maximale Wahrscheinlichkeit, mindestens eine der einzelnen Nullhypothesen abzulehnen (Bender et al. 2002). Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und sind mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet. Die Anzahl der in die statistischen Analysen eingeschlossenen

biologischen Replikate ( $n = x$ ) wurde jeweils in den Abbildungslegenden vermerkt. Die spezifischen statistischen Analyseverfahren der RNA-Sequenzierungsdaten sind in Kapitel 4.3.4 beschrieben.

## 5. ERGEBNISSE

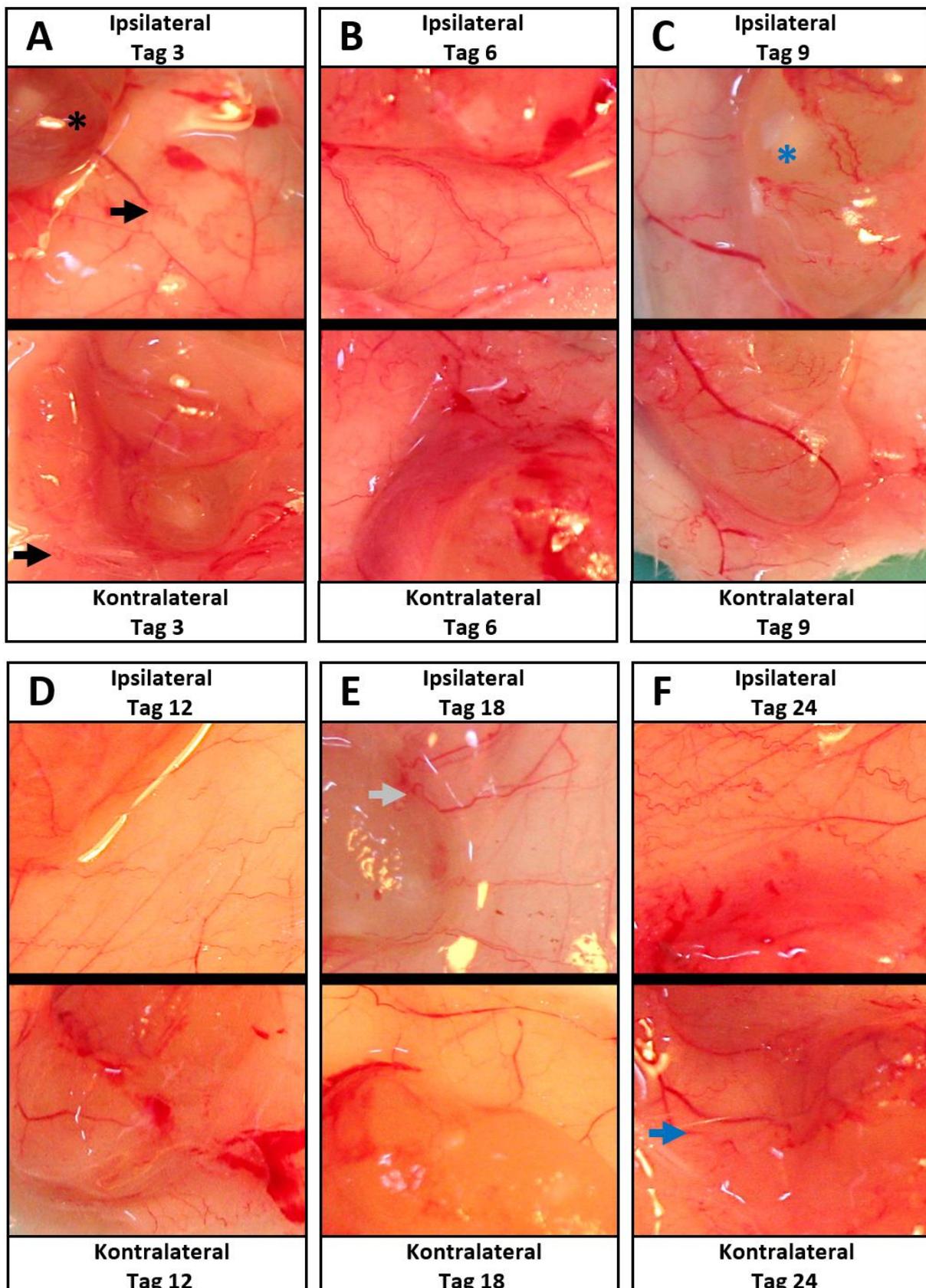
RASF spielen eine wichtige Schlüsselrolle bei der Progression der RA und tragen maßgeblich zu Destruktionen von Knorpel und Knochen bei. Weiterhin gibt es Hinweise dafür, dass die RASF auch bei der veränderten Gefäßneubildung im Synovium von RA-Patienten eine Rolle spielen und für die Entstehung von Helix-ähnlichen Gefäßen im SCID-Maus-Modell der RA verantwortlich sind. Allerdings ist bislang unklar, wie sich das Auftreten der Helix-ähnlichen Gefäße im zeitlichen Verlauf verhält und in welchem Zusammenhang die Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße mit der Invasion der RASF in die Implantate steht. Auch ist bislang nicht bekannt, wie sich im Kontext der Gefäßneubildung die RASF-vermittelte Interaktion mit den EZ funktionell sowie auf molekularer Ebene auswirkt und welche Gefäßregulatoren hierbei eine Rolle spielen.

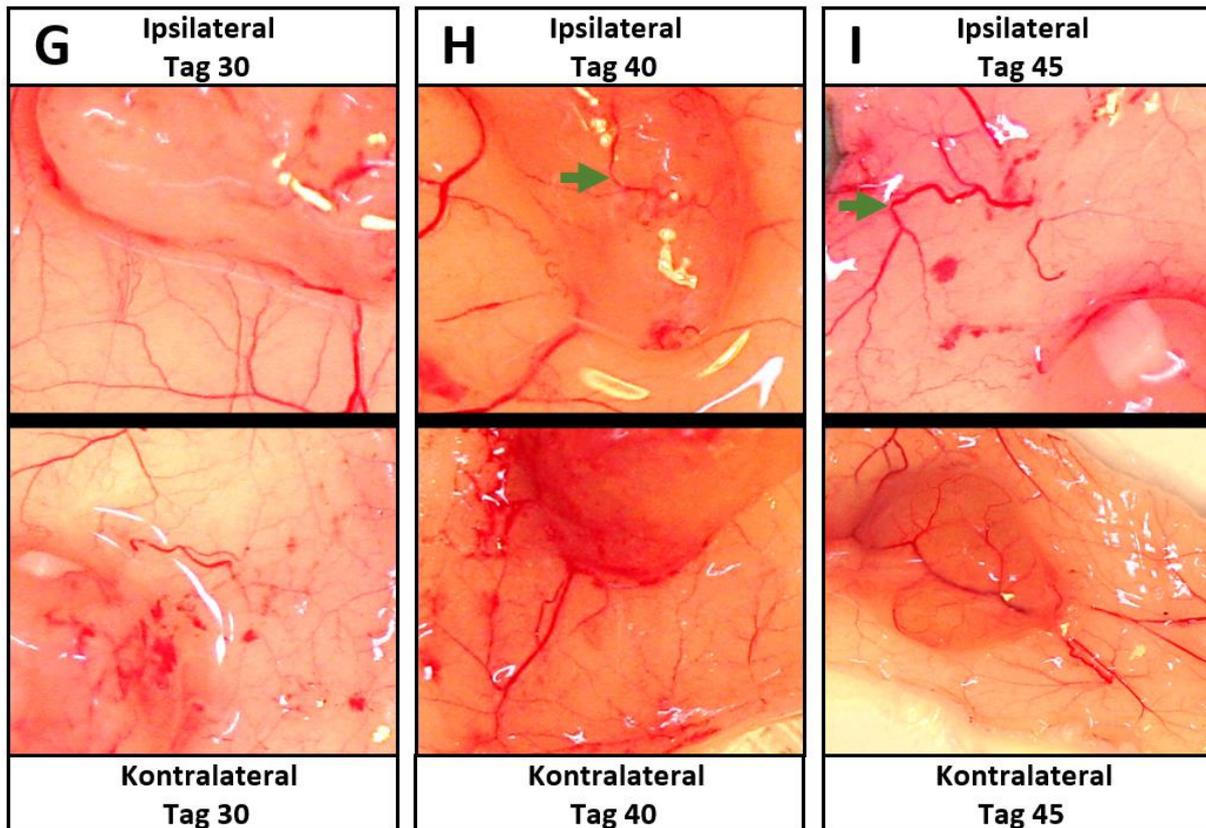
### 5.1 Kinetik der RASF-vermittelten Entstehung von Helix-ähnlichen Gefäßen im SCID-Maus-Modell der RA

Um zu verstehen, wie sich die RASF-induzierten Helix-ähnlichen Gefäße entwickeln, wurde zunächst der zeitliche Verlauf der Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße über einen Zeitraum von 45 Tagen im SCID-Maus-Modell der RA analysiert. Hierfür wurden die Implantate an Tag 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 40 und 45 nach der Implantation entnommen und auf die Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße zum Implantat hin untersucht.

Die Abbildung 20 zeigt repräsentativ die Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße an den Implantaten in dem Zeitraum von 3 bis 45 Tagen nach der OP. Interessanterweise konnten bereits an Tag 3 nicht nur zahlreiche Helix-ähnliche Gefäße am ipsilateralen, sondern auch schon am kontralateralen Implantat identifiziert werden. Die Helix-ähnlichen Gefäße stellten sich zu diesem frühen Zeitpunkt als dünn und schwach durchblutet dar (Abbildung 20, A, schwarze Pfeile). An Tag 6 waren vermehrt Helix-ähnliche Gefäße am ipsilateralen Implantat im Vergleich zu Tag 3 erkennbar. Dieser Effekt konnte auch kontralateral beobachtet werden, wobei kontralaterale Implantate im Vergleich zu den ipsilateralen Implantaten insgesamt weniger Helix-ähnliche Gefäße zeigten. Ab Tag 18 konnten ipsilateral Helix-ähnliche Gefäße beobachtet werden, die einen größeren Durchmesser und stärker durchblutet waren (Abbildung 20, E, grauer Pfeil). Dieser Effekt zeigte sich auch kontralateral, allerdings verzögert ab Tag 24 (Abbildung 20, F, blauer Pfeil). Tag 40 und 45 waren ipsilateral und kontralateral durch stark durchblutete, große Helix-ähnliche Gefäße gekennzeichnet (Abbildung 20, H und

I, grüne Pfeile). Hierbei lagen im Vergleich zu den frühen Zeitpunkten weniger dünne, schwach durchblutete Gefäße vor.



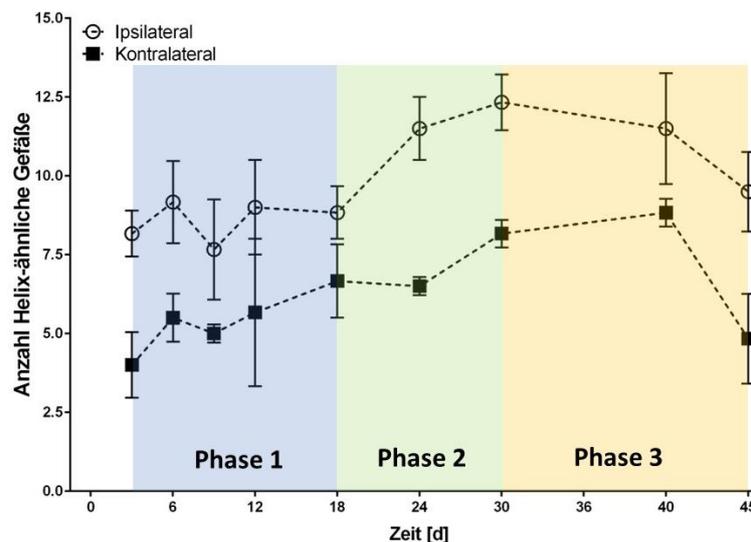


**Abbildung 20:** Entstehung Helix-ähnlicher Gefäße im SCID-Maus-Modell der RA über einen Zeitraum von 3 bis 45 Tagen (A) – (I). An Tag 3 zeigten sich die Helix-ähnlichen Gefäße als dünne und schwach durchblutete Gefäße (A, schwarze Pfeile). Ab Tag 18 konnten ipsilateral größere Helix-ähnliche Gefäße beobachtet werden, die deutlich stärker durchblutet waren (E, grauer Pfeil). Dieser Effekt zeigte sich kontralateral verzögert ab Tag 24 (F, blauer Pfeil). An Tag 40 und 45 waren ipsilateral und kontralateral stark durchblutete große Helix-ähnliche Gefäße zu erkennen (H und I, grüne Pfeile). (A) und (C) zeigen beispielhaft die Gelatinematrix des Implantats (\* schwarz) mit darunter liegendem implantiertem Knorpel (\* blau).

Zur weiteren Analyse der Entstehung von Helix-ähnlichen Gefäßen im SCID-Maus-Modell wurden die Helix-ähnlichen Gefäße entsprechend Kapitel 4.4.7 quantifiziert (Abbildung 21). Basierend auf dem ipsilateralen Verlauf wurde die Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße von Tag 3 bis Tag 45 in drei Phasen unterteilt.

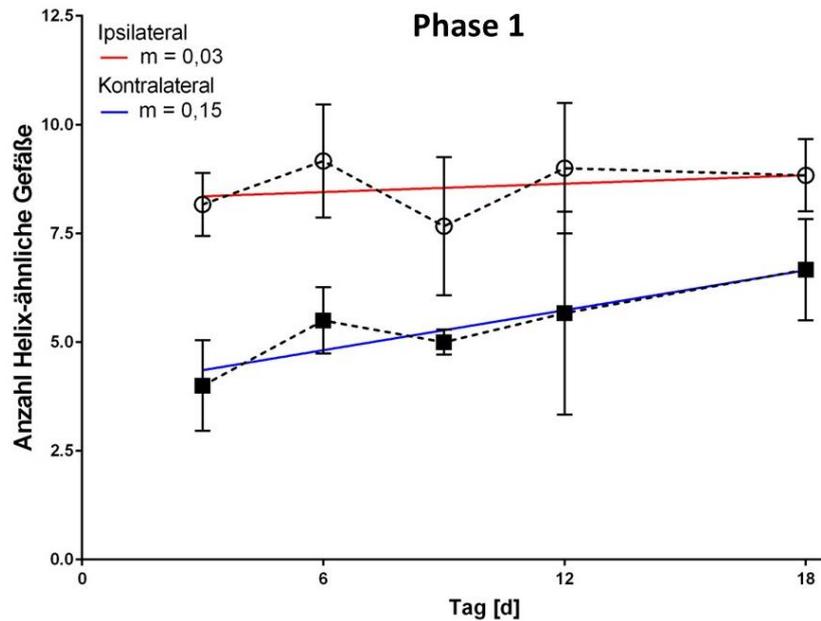
In Phase 1 kam es an Tag 3 bis 18 zur vermehrten Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße. An Tag 3 lagen ipsilateral bereits im Mittel  $8,2 \pm 1,0$  Helix-ähnliche Gefäße vor. Kontralateral wurden an Tag 3 im Mittel  $4,0 \pm 1,5$  Helix-ähnliche Gefäße identifiziert (Abbildung 21, kontralateraler (■) Verlauf der Helix-ähnlichen Gefäße). Auffällig während Phase 1 war, dass sowohl ipsilateral als auch kontralateral an Tag 9 ein Rückgang der Helix-ähnlichen Gefäße zu erkennen war. Ipsilateral nahm die Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße im Vergleich zu Tag 6 von  $9,2 \pm 1,8$  auf  $7,7 \pm 2,3$  ab, während die Helix-ähnlichen Gefäße kontralateral lediglich um im Mittel von 0,5 zurückgingen (Abbildung 21). Zwischen Tag 12 und 18 stagnierte die

Zunahme der Helix-ähnlichen Gefäße an den ipsilateralen Implantaten ( $9,0 \pm 2,1$  vs.  $8,8 \pm 1,4$  Helix-ähnliche Gefäße), bevor es zwischen Tag 18 und Tag 30 zur stärksten Zunahme der Helix-ähnlichen Gefäße während Phase 2 kam. Im Mittel wurden an Tag 30  $12,3 \pm 1,3$  Helix-ähnliche Gefäße identifiziert (Abbildung 21, ipsilateraler (o) Verlauf der Helix-ähnlichen Gefäße). Interessanterweise stagnierte auch an den kontralateralen Implantaten die Zunahme der Helix-ähnlichen Gefäße zeitverzögert zwischen Tag 18 und 24 ( $6,7 \pm 1,7$  vs.  $6,5 \pm 0,4$  Helix-ähnliche Gefäße). Die Zunahme der Helix-ähnlichen Gefäße auf das Maximum erfolgte in den kontralateralen Implantaten ebenfalls zeitverzögert zwischen Tag 24 und 40 auf im Mittel  $8,3 \pm 0,6$  Helix-ähnliche Gefäße. Phase 3 kennzeichnete sowohl ipsilateral als auch kontralateral die Endphase der Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße. Ab Tag 30 nahm die Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße in den ipsilateralen Implantaten stetig ab. Ein Rückgang wurde in den kontralateralen Implantaten erst zeitverzögert ab Tag 40 beobachtet. An Tag 45 kam es an den ipsilateralen Implantaten zu einem Rückgang auf  $9,5 \pm 1,8$  und an den kontralateralen Implantaten zu einem Rückgang auf  $4,8 \pm 2,0$  Helix-ähnlichen Gefäße (Abbildung 21).



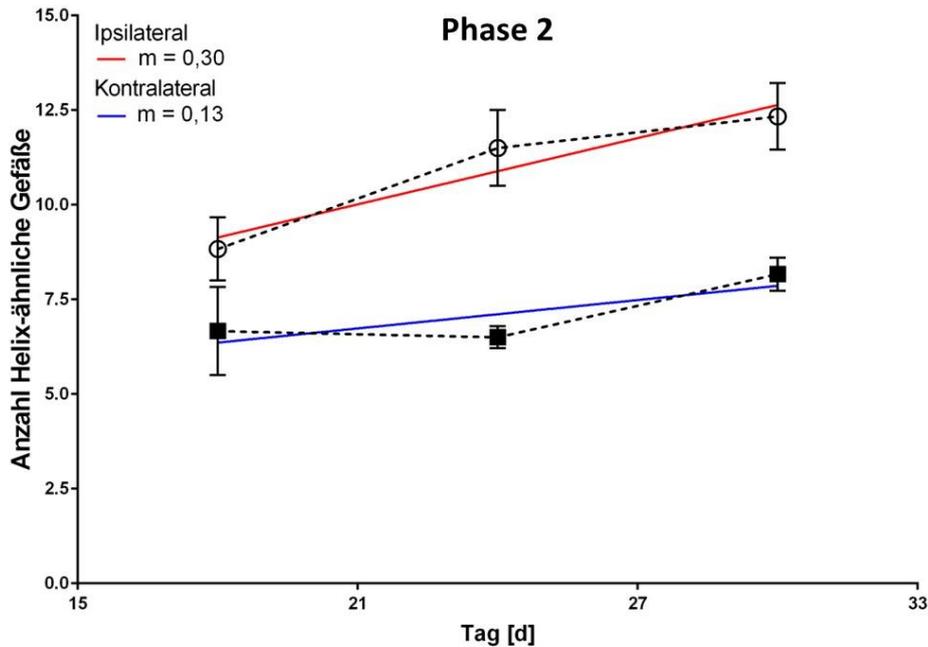
**Abbildung 21:** Kinetik der RASF-vermittelten Entstehung von Helix-ähnlichen Gefäßen in einem Zeitraum von 45 Tagen. Dargestellt ist der Mittelwert ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes) der Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße in ipsilateralen und kontralateralen Implantaten. Die Helix-ähnlichen Gefäße wurden an Tag 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 40 und 45 nach der OP quantifiziert. Pro Zeitpunkt wurde die Gefäßneubildung in 6 Mäusen aus drei Experimenten mit RASF von 3 unterschiedlichen RA-Patienten analysiert ( $n = 3$ ). Bereits 3 Tage nach der OP waren Helix-ähnliche Gefäße ipsilateral und kontralateral identifizierbar. An Tag 30 waren in den ipsilateralen Implantaten die meisten Helix-ähnlichen Gefäße erkennbar, bevor die Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße an Tag 45 wieder abnahm. Kontralateral waren an Tag 40 die meisten Helix-ähnlichen Gefäße identifizierbar. Der Verlauf der Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße wurde anhand der Kinetik in Phase 1-3 unterteilt. ○ Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße an ipsilateralen Implantaten; ■ Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße an kontralateralen Implantaten.

Die Analyse von Phase 1 (Tag 3-18) ergab, dass es in den kontralateralen Implantaten (Abbildung 22, blaue Regressionsgerade,  $m = 0,15 \pm 0,1$ ) zu einer stärkeren Zunahme der Helix-ähnlichen Gefäße kam im Vergleich zu den ipsilateralen Implantaten (Abbildung 22, rote Regressionsgerade,  $m = 0,03 \pm 0,1$ ).



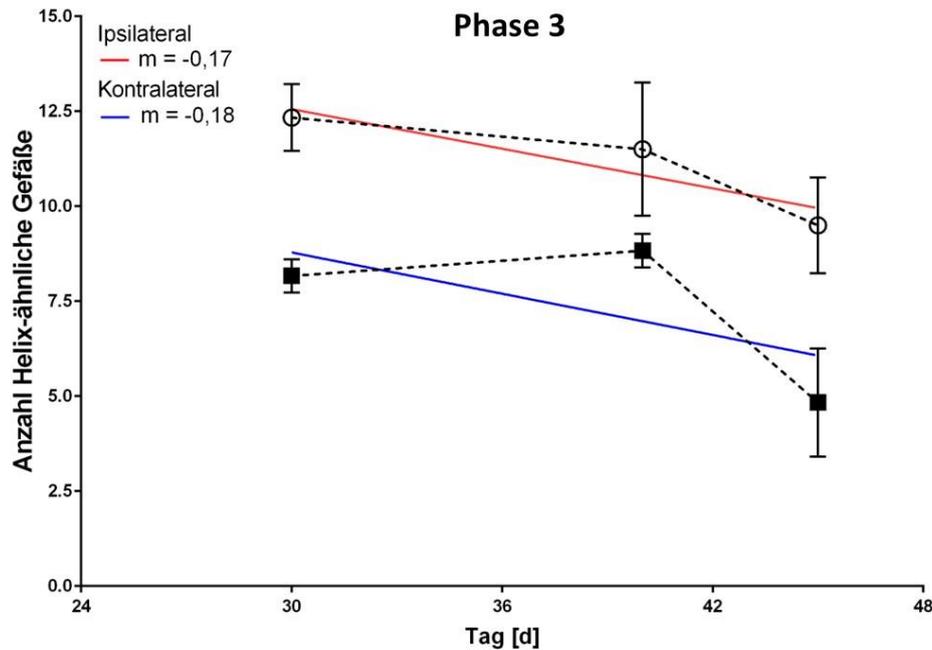
**Abbildung 22:** Verlauf der Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße während Phase 1 in einem Zeitraum von 3-18 Tagen nach der OP. Dargestellt ist der Mittelwert ( $\pm$  SEM) der Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße in ipsilateralen und kontralateralen Implantaten. Die Helix-ähnlichen Gefäße wurden an Tag 3, 6, 9, 12 und 18 nach der OP quantifiziert. Pro Zeitpunkt wurde die Gefäßneubildung in 6 Mäusen aus drei Experimenten mit RASF aus 3 unterschiedlichen RA-Patienten analysiert ( $n = 3$ ). Die Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße stieg langsam an, wobei die Helix-ähnlichen Gefäße in den ipsilateralen Implantaten mit einer Steigung von  $m = 0,03 \pm 0,10$  (rote Regressionsgerade) und in den kontralateralen Implantaten mit einer Steigung von  $m = 0,15 \pm 0,10$  (blaue Regressionsgerade) zunahm.  $\circ$  Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße an ipsilateralen Implantaten;  $\blacksquare$  Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße an kontralateralen Implantaten.

Auch während Phase 2 (Tag 18-30) war eine unterschiedlich starke Zunahme der Helix-ähnlichen Gefäße zwischen den ipsilateralen und den kontralateralen Implantaten zu beobachten. In den ipsilateralen Implantaten nahm die Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße mit einer Steigung von  $m = 0,30 \pm 0,11$  zu und steigerte sich somit um das 10-fache im Vergleich zu Phase 1 (Abbildung 23, rote Regressionsgerade). In den kontralateralen Implantaten nahm die Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße im Vergleich zu ipsilateral mit einer Steigung von  $0,13 \pm 0,10$  weniger stark zu und war vergleichbar mit der für Phase 1 berechneten Steigung (Abbildung 23, blaue Regressionsgerade).



**Abbildung 23:** Verlauf der Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße während Phase 2 in einem Zeitraum von 18 bis 30 Tagen nach der OP. Dargestellt ist der Mittelwert ( $\pm$  SEM) der Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße in ipsilateralen und kontralateralen Implantaten. Die Helix-ähnlichen Gefäße wurden an Tag 18, 24 und 30 nach der OP quantifiziert. Pro Zeitpunkt wurde die Gefäßneubildung in 6 Mäusen aus drei Experimenten mit RASF aus 3 unterschiedlichen RA-Patienten analysiert ( $n = 3$ ). Die Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße stieg stark an, wobei die Helix-ähnlichen Gefäße in den ipsilateralen Implantaten mit einer Steigung von  $m = 0,30 \pm 0,11$  (rote Regressionsgerade) und in den kontralateralen Implantaten mit einer Steigung von  $m = 0,13 \pm 0,10$  (blaue Regressionsgerade) zunahm.  $\circ$  Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße an ipsilateralen Implantaten;  $\blacksquare$  Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße an kontralateralen Implantaten.

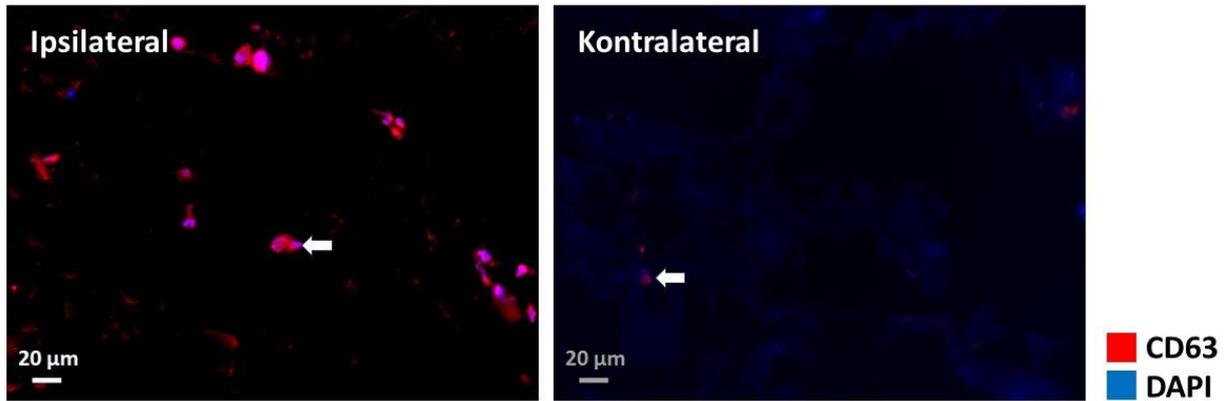
Während Phase 3 zwischen Tag 30-45 ging die Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße sowohl in den ipsilateralen als auch in den kontralateralen Implantaten zurück. In den ipsilateralen Implantaten nahm die Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße mit einer Steigung von  $m = -0,17 \pm 0,12$  ab (Abbildung 24, rote Regressionsgerade). Dieser Rückgang war vergleichbar mit dem Rückgang der Helix-ähnlichen Gefäße in den kontralateralen Implantaten, die eine Steigung von  $m = -0,18 \pm 0,11$  aufwies (Abbildung 24, blaue Regressionsgerade).



**Abbildung 24:** Verlauf der Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße während Phase 3 in einem Zeitraum von 30 bis 45 Tagen nach der OP. Dargestellt ist der Mittelwert ( $\pm$  SEM) der Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße in ipsilateralen und kontralateralen Implantaten. Die Helix-ähnlichen Gefäße wurden an Tag 30, 40 und 45 nach der OP quantifiziert. Pro Zeitpunkt wurde die Gefäßneubildung in 6 Mäusen aus drei Experimenten mit RASF aus 3 unterschiedlichen RA-Patienten analysiert ( $n = 3$ ). Die Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße ging in dieser Phase zurück, wobei die Helix-ähnlichen Gefäße in den ipsilateralen Implantaten mit einer Steigung von  $m = -0,17 \pm 0,12$  (rote Regressionsgerade) und in den kontralateralen Implantaten mit einer Steigung von  $m = -0,18 \pm 0,11$  (blaue Regressionsgerade) ähnlich stark abnahmen.  $\circ$  Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße an ipsilateralen Implantaten;  $\blacksquare$  Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße an kontralateralen Implantaten.

### 5.1.1 Nachweis der RASF-vermittelten Migration in das kontralaterale Implantat

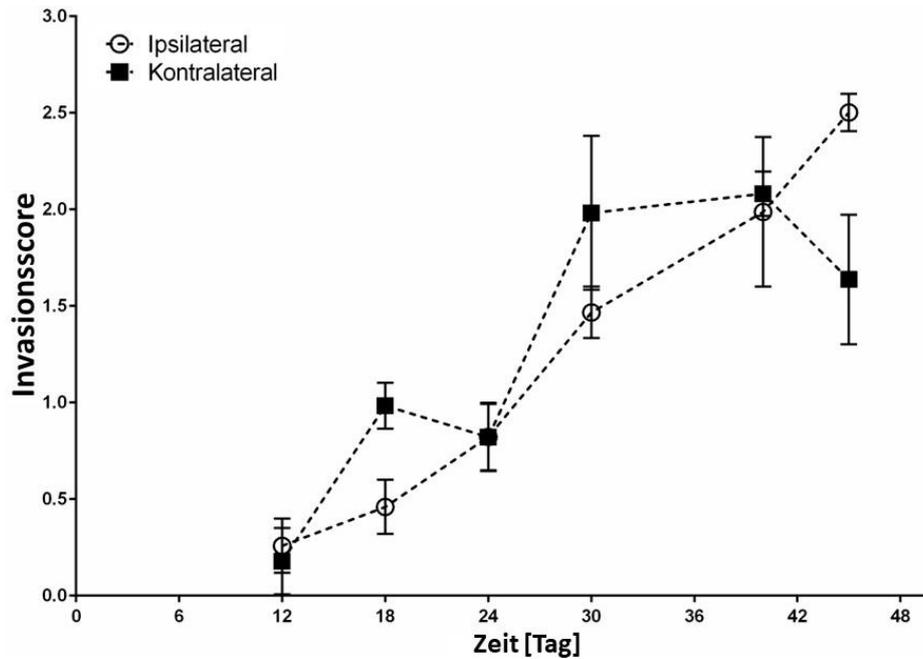
Da bereits an Tag 3 Helix-ähnliche Gefäße auch am kontralateralen Implantat identifiziert werden konnten, sollte die Frage geklärt werden, ob diese Helix-ähnlichen Gefäße im Zusammenhang mit der RASF-spezifischen Induktion stehen. Aus diesem Grund wurde eine anti-humanes CD63-Färbung der humanen RASF an den ipsilateralen sowie kontralateralen Implantaten an Tag 3 durchgeführt, um herauszufinden, ob die RASF bereits an Tag 3 zum kontralateralen Implantat migriert waren. CD63 gehört zur Familie der Tetraspanine, die Transmembranproteine bilden und beispielsweise in die Zelladhäsion involviert sind. Die Färbung ergab, dass ipsilateral wie erwartet zahlreiche CD63-positive Zellen identifiziert werden konnten (Abbildung 25, ipsilateral). Auch die kontralateralen Implantate wiesen an Tag 3 bereits CD63-positive Zellen auf, auch wenn hier, wie erwartet, deutlich weniger Zellen im Vergleich zu den ipsilateralen Implantaten zu erkennen waren (Abbildung 25, kontralateral), da die RASF erst zur kontralateralen Seite migrieren müssen.



**Abbildung 25:** CD63-Färbung der humanen RASF in den ipsilateralen und kontralateralen Implantaten an Tag 3 nach der OP. Es wurden Gewebeschnitte der ipsilateralen und kontralateralen Implantate angefertigt und die RASF wurden mit CD63 in Rot sowie mit DAPI zum Nachweis der Zellkerne in blau gefärbt. Die Fotos sind in der 400-fachen Vergrößerung dargestellt. Im ipsilateralen Implantat sind wie erwartet zahlreiche CD63-positive RASF zu erkennen. Aber auch kontralateral konnten bereits vereinzelt CD63-positive RASF identifiziert werden.

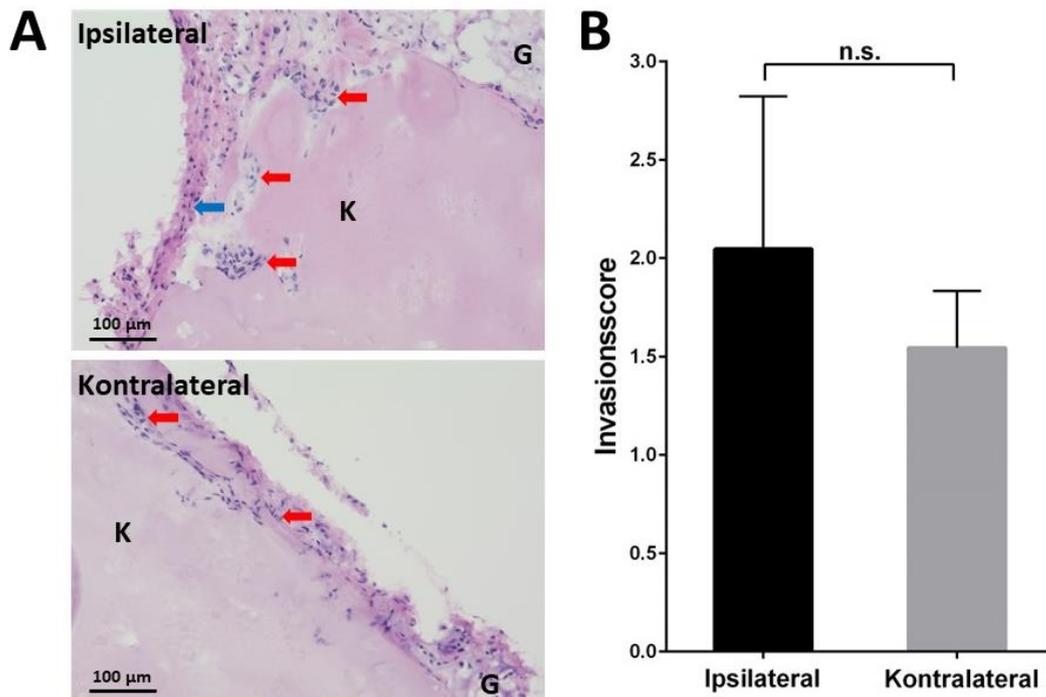
### 5.1.2 Invasion der RASF in den Knorpel von Tag 12 bis 45

Nachdem der Verlauf der Entstehung der RASF-induzierten Helix-ähnlichen Gefäße beschrieben werden konnte, wurde im nächsten Schritt überprüft, ob ein Zusammenhang der Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße mit der RASF-vermittelten Invasion in den Knorpel besteht. Da die stärkste Zunahme der Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße ab Tag 18 beobachtet werden konnte, wurde der Verlauf der Invasion der RASF in den Knorpel ab Tag 12 evaluiert und in Abbildung 26 dargestellt. Der Invasionsverlauf zeigte, dass an Tag 12 sowohl ipsilateral als auch kontralateral die Invasion ein Score von  $0,3 \pm 0,1$  bzw.  $0,2 \pm 0,1$  vorlag. Ipsilateral konnte eine Zunahme der Invasion zwischen Tag 12-30 auf einen Score von  $1,5 \pm 0,1$  beobachtet werden und war somit mit der Zunahme der Helix-ähnlichen Gefäße in den kontralateralen Implantaten zwischen Tag 12 und 30 vergleichbar (Abbildung 20). Kontralateral nahm die Invasion ebenfalls von Tag 12 bis Tag 30 zu und lag bei einem Score von  $2,0 \pm 0,3$ . Bis Tag 45 nahm die Invasion in den ipsilateralen Implantaten weiter zu und erreichte einen Score von  $2,5 \pm 0,1$ , während die Invasion in den kontralateralen Implantaten an Tag 45 bei einem Score von  $1,6 \pm 0,2$  lag. Allerdings lagen bis zur Abgabe der vorliegenden Dissertation die Invasionsergebnisse über den Zeitraum 12-45 Tage von zwei der drei durchgeführten Tierserien ( $n = 2$ ) mit jeweils 4 Mäusen pro Zeitpunkt und jeweils 1-2 quantifizierbare Knorpel pro ipsilaterales und kontralaterales Implantat vor, sodass keine abschließenden statistischen Analysen durchgeführt werden konnten.



**Abbildung 26:** Kinetik der Invasion der RASF in den Knorpel im SCID-Maus-Modell der RA in einem Zeitraum von 12 bis 45 Tagen. Die Invasion in den Knorpel wurde an Tag 12, 18, 24, 30, 40 und 45 Tage nach der OP quantifiziert ( $n = 2$  pro Zeitpunkt). Pro Zeitpunkt wurde die Invasion in jeweils 1-2 Knorpel pro ipsilaterales und kontralaterales Implantat von jeweils 4 Mäusen evaluiert. Die Invasion war ipsilateral und kontralateral an Tag 12 noch gering ausgeprägt und steigerte sich wie erwartet bis Tag 45, wobei die Steigerung in kontralaterale Knorpel zeitverzögert erfolgte (je  $n = 2$ ). ○ Invasion der RASF in ipsilaterale Knorpel; ■ Invasion der RASF in kontralaterale Knorpel.

An Tag 45 war die Invasion der RASF in die ipsilateralen und die kontralateralen Knorpel weit fortgeschritten (Abbildung 27, A, rote Pfeile). Die Invasionscores lagen ipsilateral bei  $2,1 \pm 0,6$  und kontralateral  $1,6 \pm 0,2$ , wobei wie erwartet kein signifikanter Unterschied festgestellt wurde (Abbildung 27, B).

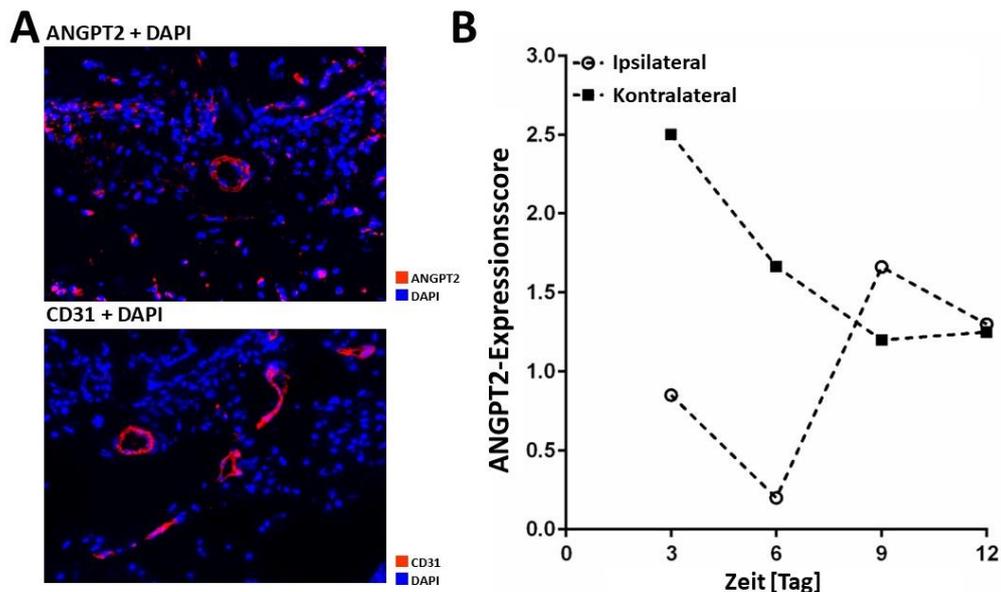


**Abbildung 27:** Invasion der RASF in die ipsilateralen und kontralateralen Knorpel an Tag 45 nach der OP. (A) HE-Färbung: Dargestellt ist die Invasion der RASF in die ipsilateralen und kontralateralen Knorpel (rote Pfeile) in 20-facher Vergrößerung. K: Knorpel; G: Gelatinematrix; blauer Pfeil: murines Bindegewebe. (B) Dargestellt ist die Invasion der RASF an Tag 45 nach der OP, die mittels eines etablierten Scores quantifiziert wurde. Pro Zeitpunkt wurde die Invasion der RASF in 6 Mäusen aus drei Experimenten mit RASF aus 3 unterschiedlichen RA-Patienten analysiert. Pro Maus wurden jeweils 1-2 Knorpel ipsilateral und kontralateral evaluiert. Dargestellt sind die Mittelwerte inkl. Standardabweichungen des Invasionscores für Tag 45. Die statistischen Analysen wurden mit dem Mann-Whitney U-Test durchgeführt (n.s.: nicht signifikant, n=3).

### 5.1.3 Die Rolle von Angiopoietin-2 in den SCID-Maus-Implantaten und im humanen Synovialgewebe von RA-Patienten

Im nächsten Schritt sollte herausgefunden werden, welche molekularen Mechanismen bei der Entstehung der RASF-induzierten Helix-ähnlichen Gefäße eine Rolle spielen und ob diese molekularen Mechanismen möglicherweise auch in der RA bezüglich der pathologisch veränderten Gefäßneubildung im Synovium von RA-Patienten involviert sind. Aus diesem Grund wurde zunächst der Gefäßregulator Angiopoietin-2 (ANGPT2) in den SCID-Maus-Implantaten analysiert. Hierfür wurden von den ipsilateralen und kontralateralen Implantaten der SCID-Mäuse an Tag 3, 6, 9 und 12 serielle Schnitte angefertigt und eine ANGPT2-Färbung sowie CD31-Färbung durchgeführt (Abbildung 28, A). CD31 ist ein spezifischer EZ-Marker, mit dem es möglich ist, Blutgefäße innerhalb der Implantate zu detektieren. Für die Evaluation wurde ein quantitativer Score angewendet, der zum einen ANGPT2-positive sowie -negative Gefäße erfasste, zum anderen die Stärke des ANGPT2-Signals im Vergleich zum CD31-Signal

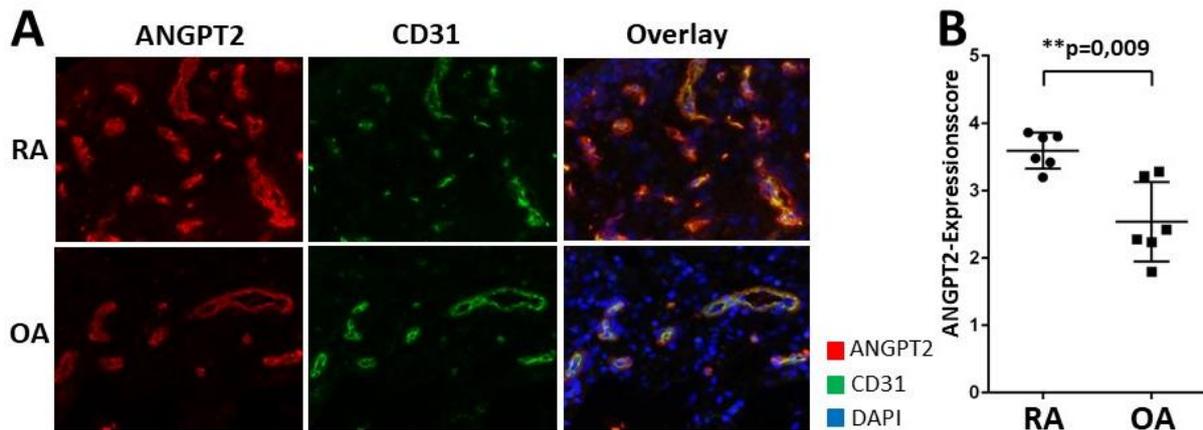
mit einbezog. Es konnte gezeigt werden, dass in ipsilateralen Implantaten an Tag 3 und 6 weniger ANGPT2 vorhanden war im Vergleich zu kontralateralen Implantaten. An Tag 9 und 12 war sowohl ipsilateral als auch kontralateral die ANGPT2-Expression identisch (Abbildung 28, B). Allerdings lag bis zur Abgabe der vorliegenden Dissertation die Auswertung von nur einer Tierserie (n = 1) mit jeweils 1-2 Mäusen pro Zeitpunkt vor, sodass keine finale statistische Auswertung durchgeführt werden konnte.



**Abbildung 28:** Angiopoietin-2 in den SCID-Maus-Implantaten. (A) Repräsentative Darstellung der ANGPT2- und CD31-Färbung (rot) sowie der Zellkerne (blau) in der 400-fachen Vergrößerung. (B) ANGPT2-Expression im SCID-Maus-Modell der RA in einem Zeitraum von 3-12 Tagen in ipsilateralen und kontralateralen Implantaten. Die ANGPT2-Expression war kontralateral im Vergleich zu ipsilateral an Tag 3 und 6 stärker ausgeprägt. Pro Zeitpunkt wurde die ANGPT2-Expression in den Implantaten von jeweils 1-2 Mäusen evaluiert. Zusätzlich wurde für die Evaluation eine CD31-Färbung der EZ durchgeführt. Folgender Score wurde für die Quantifizierung der ANGPT2-Expression in den Blutgefäßen angewendet: 0 = ANGPT2-negativ; 1 = ANGPT2-positiv, CD31-Färbung überwiegt; 2 = ANGPT2-positiv, ANGPT2-Signal identisch zu CD31; 3 = ANGPT2-positiv, ANGPT2-Signal stärker als das CD31-Signal. ○ ANGPT2-Expression in ipsilateralen Implantaten; ■ ANGPT2-Expression in kontralateralen Implantaten.

Da die Analyse der SCID-Maus-Implantate hinsichtlich der ANGPT2-Expression schon erste Hinweise bezüglich einer RASF-vermittelten veränderten ANGPT2-Expression lieferte, sollte im weiteren Verlauf herausgefunden werden, ob ANGPT2 auch humanen Synovialgewebe von RA-Patienten eine veränderte Expression aufwies. Hierfür wurde die ANGPT2-Expression im Synovialgewebe aus Kniegelenken von Patienten mit weit fortgeschrittener RA bzw. OA analysiert. Zur Kontrolle wurden die Gefäße mit dem EZ-Marker CD31 (grün) und die Zellkerne mit DAPI (blau) angefärbt. Für die Evaluation der ANGPT2-Expression wurden die Overlay-

Aufnahmen anhand der Stärke der ANGPT2- und CD31-Färbung wie in Kapitel 4.5.3 beschrieben ausgewertet. Die ANGPT2-Expression war im humanen Synovium von RA-Patienten im Vergleich zu OA-Patienten stärker ausgeprägt (Abbildung 29, B). Nach Anwendung eines quantitativen ANGPT2-Expressionscores konnte eine signifikant stärkere ANGPT2-Expression im RA-Synovium im Vergleich zur OA festgestellt werden (Abbildung 29, A).



**Abbildung 29:** ANGPT2-Expression im humanen Synovialgewebe von RA- und OA-Patienten. (A) Dargestellt ist die immunhistochemische Fluoreszenzfärbung von ANGPT2 (rot), dem EZ-Marker CD31 (grün) und DAPI (blau) zum Anfärben der Zellkerne in der 200-fachen Vergrößerung. (B) Evaluation der ANGPT2-Expression im Synovium unter Anwendung des ANGPT2-Expressionscores. Für die Quantifizierung wurden die Overlay-Aufnahmen verwendet. ANGPT2 war signifikant stärker im RA-Synovium als im OA-Synovium exprimiert. Für die statistischen Analysen wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet (RA: n = 6; OA: n = 6).

## 5.2 Charakterisierung der RASF/EZ-Interaktionen auf funktioneller Ebene

Nachdem der zeitliche Verlauf der Entstehung von RASF-induzierten Helix-ähnlichen Gefäße im SCID-Maus-Modell über 45 Tage beschrieben wurde und darüber hinaus gezeigt werden konnte, dass ANGPT2 sowohl im SCID-Maus-Modell der RA als auch im Synovium von RA-Patienten verändert exprimiert wurde, stand im nächsten Schritt die RASF-vermittelte Interaktion mit den EZ im Fokus. Es sollte herausgefunden werden, ob und wie sich die RASF-vermittelte Interaktion funktionell auf die EZ *in vitro* auswirkt und welchen Einfluss die Interaktion auf die Entstehung von veränderten Gefäßstrukturen hat, die evtl. zu den im SCID-Maus-Modell beobachteten Helix-ähnlichen Gefäßen bzw. der veränderten Gefäßneubildung bei RA-Patienten (Kapitel 1.4.2) entsprechen könnte. Zudem sollte die Frage geklärt werden, ob die RASF-vermittelten Effekte bereits in kurzzeitigen *in vitro*-Experimenten auftreten und so der Einfluss auf die Gefäßneubildung *in vitro* simuliert werden kann. Hierfür wurde die

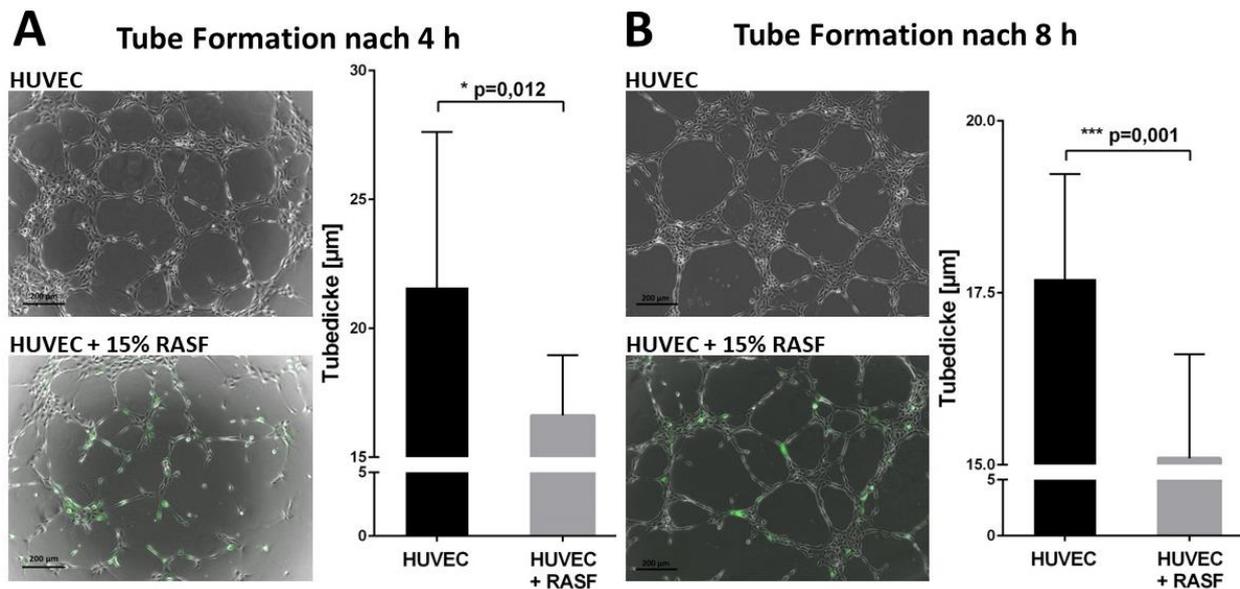
RASF-vermittelte Interaktion mit den EZ im 2D Tube-Formation-Experiment sowie im 3D Sphäroid-basierten Sprout-Experiment analysiert.

### 5.2.1 Einfluss der RASF auf die Gefäßneubildung im 2D Tube-Formation-Experiment

Um Hinweise dafür zu bekommen, ob die RASF-Interaktionen mit den EZ bereits in einem *in vitro*-Kurzzeitexperiment nachweisbar sind, wurden die RASF gemeinsam mit HUVEC kultiviert und die Gefäßneubildung im Tube-Formation-Experiment nach 4 bzw. 8 h untersucht. Zur Differenzierung der RASF von den HUVEC wurden die RASF zuvor mit Calcein-AM grün angefärbt (Kapitel 4.2.1).

Nach 4 bzw. 8 h bildeten die HUVEC auf dem Matrigel ein Zellnetzwerk aus, welches aus Lumen, Tubes, Verzweigungspunkten und Zellakkumulationen bestand (Abbildung 30, A und B). Für die Analyse des Einflusses der RASF auf die Angiogenese im Tube-Formation-Experiment wurden nach 4 h die Parameter Anzahl der gebildeten Lumen, Anzahl der Verzweigungspunkte, Lumenumfang, die Anzahl der Tubes sowie die Tubedicke wie in Kapitel 4.2.2.3 beschrieben quantifiziert. Interessanterweise beeinflusste die Zugabe von RASF zu den HUVEC bereits nach 4 h die Gefäßneubildung, indem die RASF signifikant die Tubedicke von  $21,6 \mu\text{m} \pm 5,7 \mu\text{m}$  auf  $16,6 \mu\text{m} \pm 2,2 \mu\text{m}$  im Vergleich zur HUVEC Monokultur (ohne RASF) reduzierten ( $p = 0,015$ ) (Abbildung 30, A). Nach 8 h bewirkte die Co-Kultivierung der HUVEC mit den RASF im Tube-Formation-Experiment eine weiter verstärkte Ausdünnung des Zellnetzwerkes, indem die Tubedicke signifikant von  $17,7 \pm 1,5 \mu\text{m}$  auf  $15,1 \pm 1,4 \mu\text{m}$  reduziert wurde ( $p < 0,001$ ) (Abbildung 30, B).

Die Gesamtzahl der Tubes oder der Lumen wurden durch die Zugabe der RASF hingegen nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt), sodass für alle folgenden Experimente der Parameter „Tubedicke“ dargestellt wird. Tubes können nicht dünner als eine Zelldicke von ca.  $8 \mu\text{m}$  sein. Dies entspricht etwa dem Durchmesser einer Zelle.



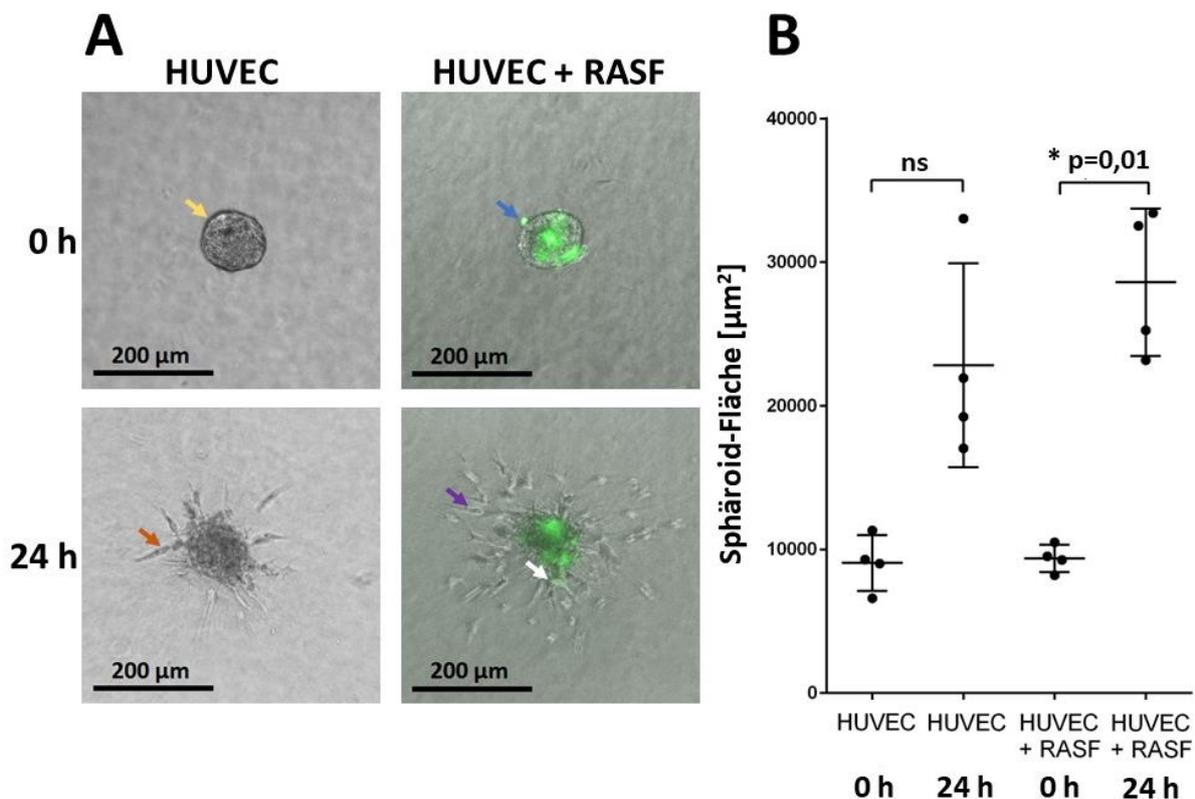
**Abbildung 30:** RASF-vermittelter Einfluss auf die Endothelzellen im Tube-Formation-Experiment. HUVEC wurden mit ± 15% Calcein-AM gefärbter RASF (grün) auf einer Matrigel-Beschichtung kultiviert und die Ausbildung der Tubes nach 4 (A) bzw. 8 (B) h mittels Quantifizierung der Tubedicke evaluiert. Darstellung in 100-facher Vergrößerung. Dargestellt sind die Mittelwerte der Tubedicken inkl. Standardabweichungen. Zu beiden Zeitpunkten erfolgte eine signifikante Reduktion der Tubedicke durch RASF. Für die statistischen Analysen wurde der Mann Whitney U-Test angewendet. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und sind mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet (jeweils  $n = 10$ ).

### 5.2.2 Einfluss der RASF auf die Angiogenese im 3D Sphäroid-basierten Sprout Experiment

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die RASF bereits nach einem kurzen Zeitraum von 4 bzw. 8 h signifikant die Gefäßneubildung beeinflussten, sollte im nächsten Schritt die Frage geklärt werden, wie sich die RASF/EZ-Interaktionen in Bezug auf die Gefäßneubildung im 3D Sphäroid-basierten Sprout-Experiment über 24 h auswirken. Hierfür wurden zunächst Sphäroide bestehend aus HUVEC oder einer Kombination aus HUVEC und 15% Calcein-AM-gefärbter RASF (grün) generiert, die in eine Kollagenmatrix eingebettet und durch VEGF-Stimulierung zur Aussprossung angeregt wurden. Anschließend erfolgte die Aussprossung für 24 h. Sowohl nach der Generierung der Sphäroide (definiert als 0 h) als auch 24 h nach Aussprossung (definiert als 24 h) wurden die Sphäroide mittels Software-basierter Quantifizierung der Sphäroid-Fläche entsprechend Kapitel 4.2.3 evaluiert.

Die HUVEC bildeten zum Zeitpunkt 0 h ein gleichmäßig geformtes, kugelförmiges Sphäroid, das eine kompakte Zellstruktur aufwies (Abbildung 31, A, gelber Pfeil). Die Sphäroide aus HUVEC mit RASF (in grün) lagen zum Zeitpunkt 0 h zusammen mit den HUVEC gleichmäßig verteilt innerhalb des Sphäroids vor. Auffällig war, dass die RASF teilweise an der Oberfläche des Sphäroids vorlagen (Abbildung 31, A, blauer Pfeil). Nach 24 h zeigte das Sphäroid

bestehend aus HUVEC ohne RASF eine Aussprossung der HUVEC aus dem Sphäroid. Die HUVEC formten dabei wie erwartet Röhren-ähnliche dreidimensionale Strukturen (Abbildung 31, A, orangefarbener Pfeil), wobei sich die Fläche des Sphäroids auf Grund der aussprossenden Zellen von  $9061 \mu\text{m}^2 \pm 1677 \mu\text{m}^2$  auf  $22.812 \mu\text{m}^2 \pm 6149 \mu\text{m}^2$  nicht signifikant vergrößerte (Abbildung 31, B). Im Vergleich dazu zeigten Sphäroide bestehend aus HUVEC und RASF keine Bildung von Röhren-ähnlichen Strukturen (= Tubes) nach 24 h. Die HUVEC wanderten zwar stärker aus dem Sphäroid aus verglichen mit Sphäroiden, die nur HUVEC enthielten (Abbildung 31, A, lilafarbener Pfeil), allerdings war die Auswanderung der EZ diffuser und zeigte keine geordnete Anordnung in Tubes. Dies zeigte sich in der signifikanten Vergrößerung der Sphäroid-Fläche von  $9378 \mu\text{m}^2 \pm 816 \mu\text{m}^2$  auf  $28.600 \mu\text{m}^2 \pm 4450 \mu\text{m}^2$  ( $p = 0,01$ ). Auffällig war, dass nur wenige RASF aus dem Sphäroid migrierten (Abbildung 31, A, weißer Pfeil).



**Abbildung 31:** Einfluss der RASF auf die Angiogenese im 3D Sphäroid-basierten Sprout-Experiment. Dargestellt sind die Mittelwerte der Sphäroid-Flächen inkl. Standardabweichungen zum Zeitpunkt unmittelbar nach Generierung der Sphäroide nach 0 h sowie 24 h nach der Aussprossung. (A) Darstellung der Sphäroide in 100-facher Vergrößerung: Gelber Pfeil: Die HUVEC formten ein gleichmäßig rundes Sphäroid; blauer Pfeil: RASF (grün) verteilten sich innerhalb des Sphäroids, ordneten sich aber auch an der Sphäroid-Oberfläche an; orangefarbener Pfeil: Die HUVEC sprossen aus dem Sphäroid aus und bildeten dabei Röhren-ähnliche Strukturen; lilafarbener Pfeil: HUVEC sprossen diffus aus dem Sphäroid aus, ohne Röhren zu bilden; weißer Pfeil: RASF lagerten sich hauptsächlich innerhalb des Sphäroids an und wandern nur vereinzelt aus. (B) Nach 24 h war die Fläche der Sphäroide ohne RASF wie erwartet durch die Aussprossung vergrößert. Die Zugabe der RASF zu den HUVEC vergrößerte die Fläche der Sphäroide jedoch zusätzlich, allerdings ohne die Ausbildung von

Tubes. Für die statistischen Analysen wurde der Friedman-Test angewendet und die Dunn's-Multiparameter-Korrektur durchgeführt. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet, n.s.: nicht signifikant (jeweils  $n = 4$ ).

### 5.3 Charakterisierung der RASF/EZ-Interaktionen auf molekularer Ebene

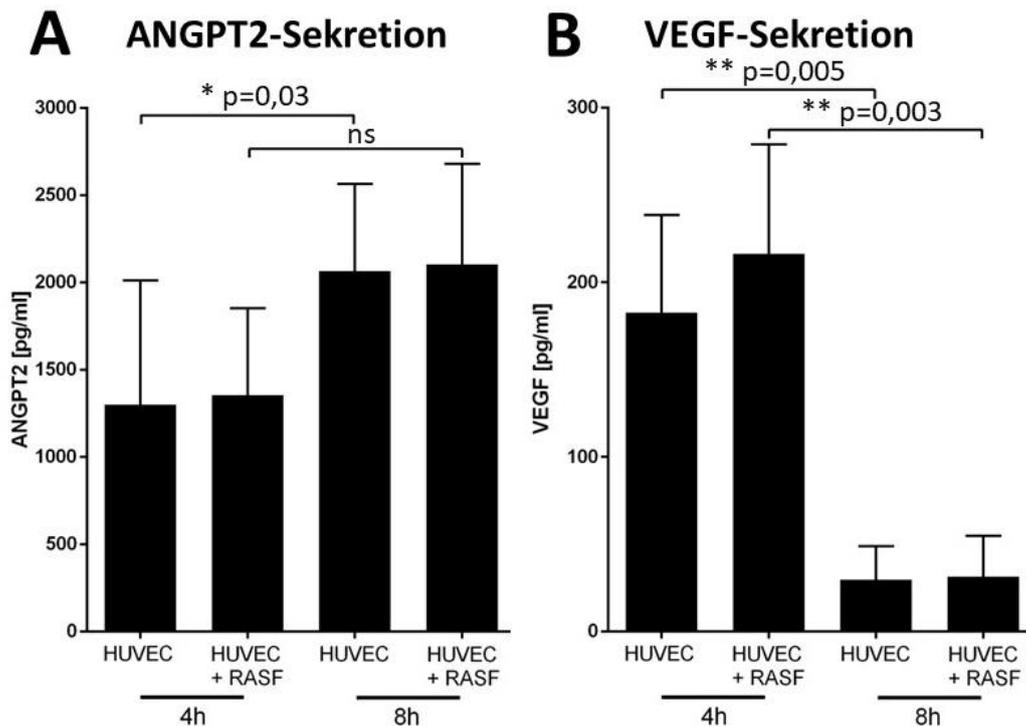
Es konnte mit den 2D- sowie 3D-basierten *in vitro*-Experimenten zur Gefäßneubildung gezeigt werden, dass die RASF die EZ-vermittelte Gefäßneubildung auch *in vitro* beeinflussten. Daher ergab sich die Frage, welchen molekularen Einfluss die RASF auf die EZ nehmen und ob mit den kurzfristigen *in vitro*-Experimenten auch eine Veränderung der Gefäßregulatoren feststellbar war. Hierfür sollte im ersten Schritt geklärt werden, welchen Einfluss die RASF auf die Sekretion und Expression der Gefäßregulatoren ANGPT2, VEGF, EFNB2 sowie eNOS haben. Im zweiten Schritt sollte analysiert werden, welchen Einfluss die chronische Entzündung auf die RASF bezüglich der spezifischen Expression und Sekretion von Faktoren hat, die zur veränderten Gefäßneubildung beitragen könnten.

#### 5.3.1 Einfluss der RASF auf Gefäßregulatoren

Um auf molekularer Ebene verstehen zu können, welche RASF-vermittelten angiogene Faktoren in die Modifikation der Gefäßneubildung bzw. die Interaktion mit den EZ involviert sind, wurde zunächst die Sekretion bzw. Expression der Gefäßregulatoren VEGF, ANGPT2, EFNB2 und eNOS im Anschluss an die Tube-Formation-Experimente nach 4 bzw. 8 h bestimmt.

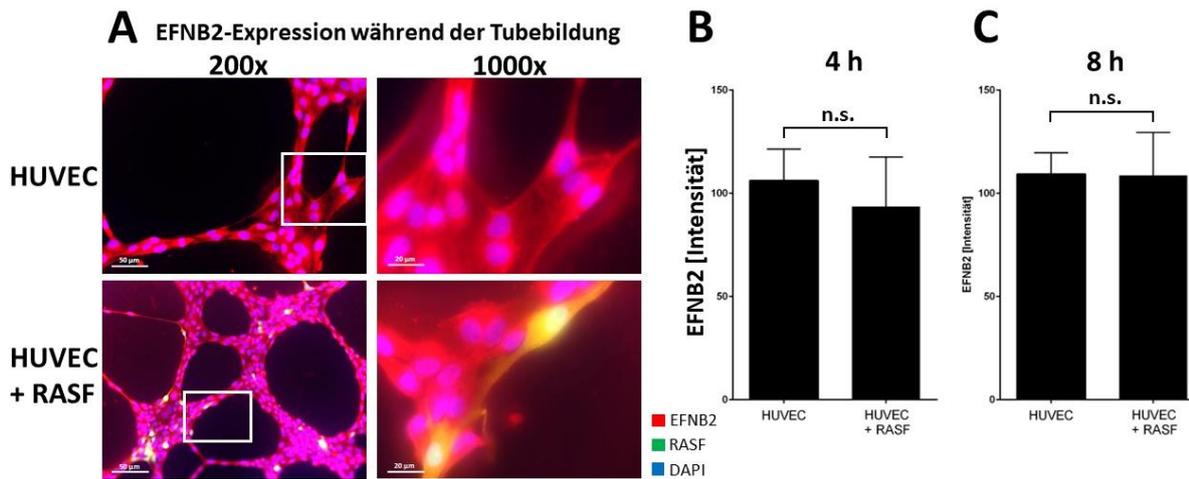
##### 5.3.1.1 Die Gefäßregulatoren VEGF, ANGPT2 und EFNB2 unter Einfluss von RASF *in vitro*

Für die Analyse der ANGPT2- und VEGF-Sekretion im Tube-Formation-Experiment wurde nach 4 bzw. 8 h die ANGPT2- und VEGF-Konzentration in den Überständen bestimmt. Die ANGPT2-Sekretion war in der HUVEC Monokultur nach 8 h im Vergleich zu 4 h signifikant von  $1300 \text{ pg/ml} \pm 650 \text{ pg/ml}$  auf  $2065 \text{ pg/ml} \pm 475 \text{ pg/ml}$  erhöht ( $p = 0,03$ ) (Abbildung 32, A). Derselbe Effekt, wenn auch nicht signifikant, war auch nach Zugabe der RASF zu den HUVEC erkennbar. Es konnte kein Unterschied in der ANGPT2-Sekretion unter Einfluss der RASF festgestellt werden. HUVEC sezernierten ohne die Zugabe von RASF  $182 \text{ pg/ml} \pm 50 \text{ pg/ml}$  VEGF nach 4 h. Die VEGF-Sekretion war nach Zugabe der RASF mit  $216 \text{ pg/ml} \pm 56 \text{ pg/ml}$  nicht signifikant erhöht (Abbildung 32, B). Nach 8 h war die VEGF-Sekretion der HUVEC sowohl mit als auch ohne Zugabe der RASF signifikant niedriger als nach 4 h ( $p = 0,005$  vs.  $p = 0,003$ ) (Abbildung 32, B). Ein RASF-vermittelter Unterschied in der VEGF-Sekretion konnte somit nach 4 oder 8 Stunden nicht festgesellt werden.



**Abbildung 32:** ANGPT2- (A) und VEGF-Sekretion (B) während der Tubebildung nach 4 und 8 h. Die ANGPT2- (A) und VEGF-Konzentrationen (B) wurden nach Abschluss der Tube-Formation-Experimente in den Überständen mittels ELISA-Messung bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte inkl. Standardabweichungen. Für die statistischen Analysen wurde der Friedman-Test durchgeführt und die Dunn's-Multiparameter-Korrektur angewendet. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet, n.s.: nicht signifikant (4 h: n = 5; 8 h: n = 10).

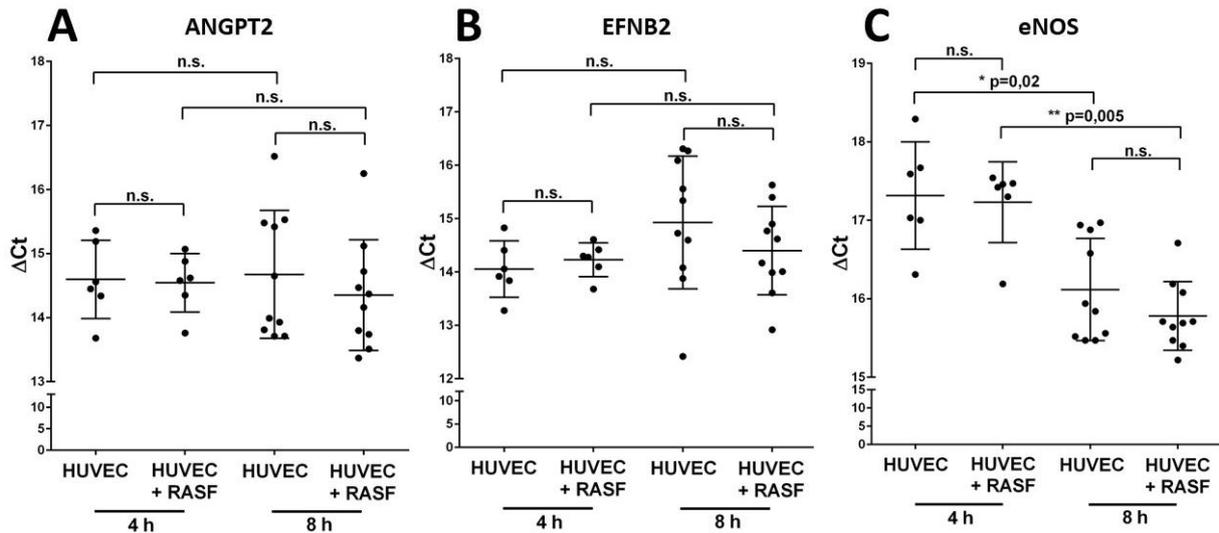
Zusätzlich wurde der RASF-vermittelte Einfluss auf einen weiteren Gefäßregulator, das Transmembranprotein EFNB2, untersucht. Für den Nachweis von EFNB2 wurde eine immunzytochemische Färbung im Anschluss an die Tubebildung nach 4 und 8 h durchgeführt und das EFNB2-Signal mittels Software-basierter Intensitätsmessung bestimmt. Auch bei EFNB2 konnte sowohl nach 4 als auch nach 8 h keine Veränderung unter Einfluss von RASF festgestellt werden (Abbildung 33, B und C). Allerdings zeigte die immunzytochemische Färbung die Anlagerung der RASF (grün) an das von den EFNB2-sezernierenden HUVEC (rot) gebildete Zellnetzwerk, wobei sich überlappende Signale aus RASF (grün) und EFNB2-positive HUVEC (rot) gelb darstellen (Abbildung 33, A, 1000-fache Vergrößerung).



**Abbildung 33:** EFNB2 im Tube-Formation-Experiment unter Einfluss von RASF nach 4 und 8 h. (A) Dargestellt ist die immunzytochemische EFNB2-Färbung (rot) der HUVEC  $\pm$  RASF (grün) in der 200-fachen und 1000-fachen Vergrößerung. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Die Intensität der EFNB2-Färbung wurde mit der Keyence-Software BZ X-800 nach 4 h (B) und 8 h (C) ausgewertet. Es konnten keine EFNB2-Intensitätsunterschiede nach Zugabe der RASF festgestellt werden. Für die statistischen Analysen wurde der Mann Whitney U-Test durchgeführt. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet, n.s.: nicht signifikant (4 h: n = 3; 8 h: n = 3).

### 5.3.1.2 Expression der Gefäßregulatoren ANGPT2, EFNB2 und eNOS unter Einfluss von RASF *in vitro*

Nachdem auf Proteinebene keine Veränderungen der Gefäßregulatoren ANGPT2, VEGF und EFNB2 unter Einfluss von RASF *in vitro* festgestellt werden konnten, wurde die Genexpression von ANGPT2 sowie EFNB2 und zusätzlich von eNOS im Tube-Formation-Experiment nach 4 bzw. 8 h untersucht. Hierbei sollte analysiert werden, ob die RASF in den *in vitro*-Kurzzeitexperimenten nicht nur funktionell signifikant die Gefäßneubildung modifizieren, sondern auch, ob nach diesen frühen Zeitpunkten die Expression der spezifischen Gefäßregulatoren auf Genexpressionsebene beeinflusst wird. Für die Analyse der Expression der Gefäßregulatoren wurde nach 4 bzw. 8 h die RNA aus den Tubes isoliert und die Expression mittels semi-quantitativer qPCR gemessen. Abbildung 34 (A-C) zeigt die gemessenen CT-Werte der Gefäßregulatoren nach 4 bzw. 8 h. Allerdings konnten wie bei den Proteinbestimmungen weder nach 4 noch nach 8 h eine RASF-vermittelte signifikante Veränderungen der Expression der Gefäßregulatoren ANGPT2, EFNB2 und eNOS festgestellt werden.



**Abbildung 34:** Expression der Gefäßregulatoren ANGPT2, EFNB2 und eNOS unter Einfluss von RASF nach 4 und 8 h. Dargestellt sind die Mittelwerte inkl. der Standardabweichungen der Messungen der Ct-Werte von ANGPT2 (A), EFNB2 (B) und eNOS (C) nach Durchführung der Tube-Formation-Experimente nach 4 und 8 h abzüglich der Ct-Werte des House-Keeping-Gens 18S ( $\Delta$ Ct). Für die statistischen Analysen wurde der H-Test nach Kruskal und Wallis durchgeführt und die Dunn's-Multiparameter-Korrektur angewendet. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\*, n.s.: nicht signifikant gekennzeichnet (4 h: n = 6; 8 h: n = 10).

### 5.3.2 Einfluss repetitiver Stimulierung auf die Expression angiogener Faktoren in RASF

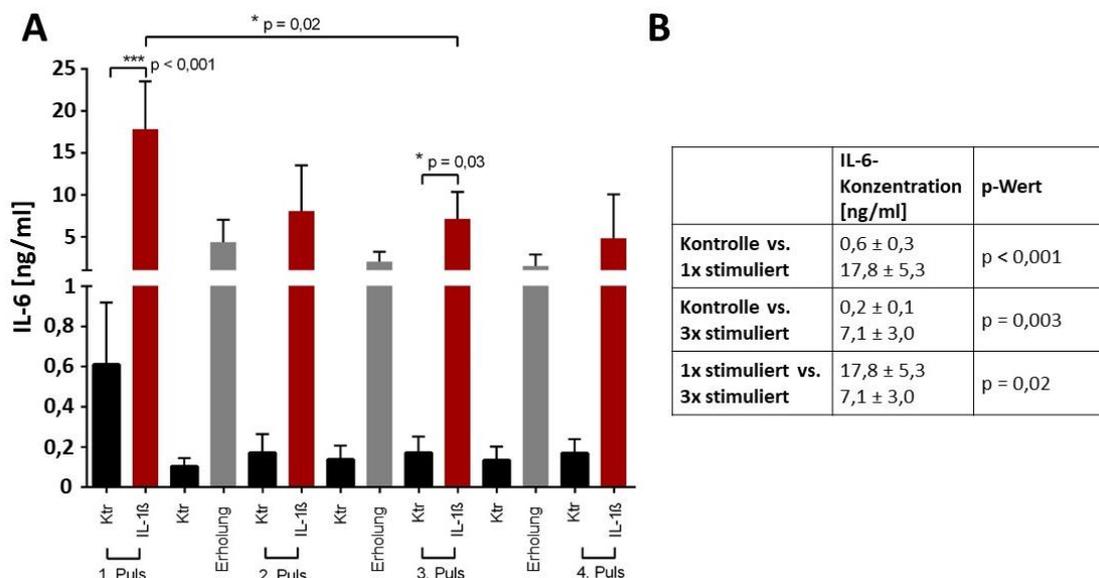
Die RA ist durch die chronische Entzündung im Synovium charakterisiert, die zudem in Schüben verläuft und so zur wiederholten Aktivierung der RASF führt. Die damit einhergehende Sekretion pro-inflammatorischer und pro-angiogener Faktoren trägt zur verstärkten Interaktion mit den EZ und folglich einer verstärkten Gefäßneubildung im hyperplastischen Synovium von RA-Patienten bei. Im nächsten Schritt sollte daher untersucht werden, welche molekularen Mechanismen unter Einfluss von Entzündungsfaktoren zur RASF-vermittelten veränderten Gefäßneubildung beitragen.

#### 5.3.2.1 Einfluss der repetitiven Stimulierung auf die Aktivierung der RASF

RASF werden in Folge der entzündlichen Aktivierung epigenetisch modifiziert, sodass sie ihren Phänotyp verändern und dadurch beispielsweise eine verstärkte Invasion und die vermehrte Freisetzung pro-inflammatorischer Faktoren aufweisen sowie durch ihren Einfluss auf die Gefäßneubildung die Progression der RA fördern (Ospelt et al. 2017; Lefèvre et al. 2009). Durch wiederkehrende Erkrankungsschübe, die sich mit Phasen inaktiver Krankheitsaktivität abwechseln, werden die epigenetisch modifizierten RASF zusätzlich aktiviert und erhöhen beispielsweise die IL-6-Sekretion. Allerdings ist bislang nicht bekannt, wie sich die wiederholte

Aktivierung in Folge der wiederkehrenden Erkrankungsschübe auf das Expressionsprofil der RASF bezüglich pro-inflammatorischer und pro-angiogener Faktoren auswirkt.

Zur Analyse des Expressionsprofils von wiederholt aktivierten RASF wurden die wiederkehrenden Erkrankungsschübe *in vitro* simuliert. Hierfür wurde ein Stimulierungsschema mit Entzündungsstimuli und Erholungsphasen) im Wechsel etabliert. Die RASF wurden vier Mal repetitiv mit 0,05 ng/ml IL-1 $\beta$  für 16 h stimuliert. Zwischen den Stimulierungsschritten erhielten die RASF eine jeweils 8-stündige Erholungsphase ohne Zugabe von IL-1 $\beta$ . Nach jeder Stimulierungs- und Erholungsphase wurde die IL-6-Konzentration bestimmt. Die einmalige Stimulierung der RASF bewirkte wie erwartet eine signifikante IL-6-Induktion im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abbildung 35, A und B). Interessanterweise wiesen die repetitiv stimulierten RASF bereits nach der dreimaligen Stimulierung im Vergleich zur einmaligen Stimulierung eine signifikant schwächere Induktion der IL-6-Sekretion auf, wobei die IL-6-Sekretion noch deutlich über die der unstimulierten Kontrollen lag (Abbildung 35, A und B). Da die RASF bereits nach der dreimaligen Stimulierung eine signifikante schwächere Induktion der IL-6-Sekretion im Vergleich zur einmaligen Stimulierung zeigten, wurde das repetitive Stimulierungsschema der Fragestellung angepasst und die RASF für die folgenden Analysen drei Mal repetitiv stimuliert.



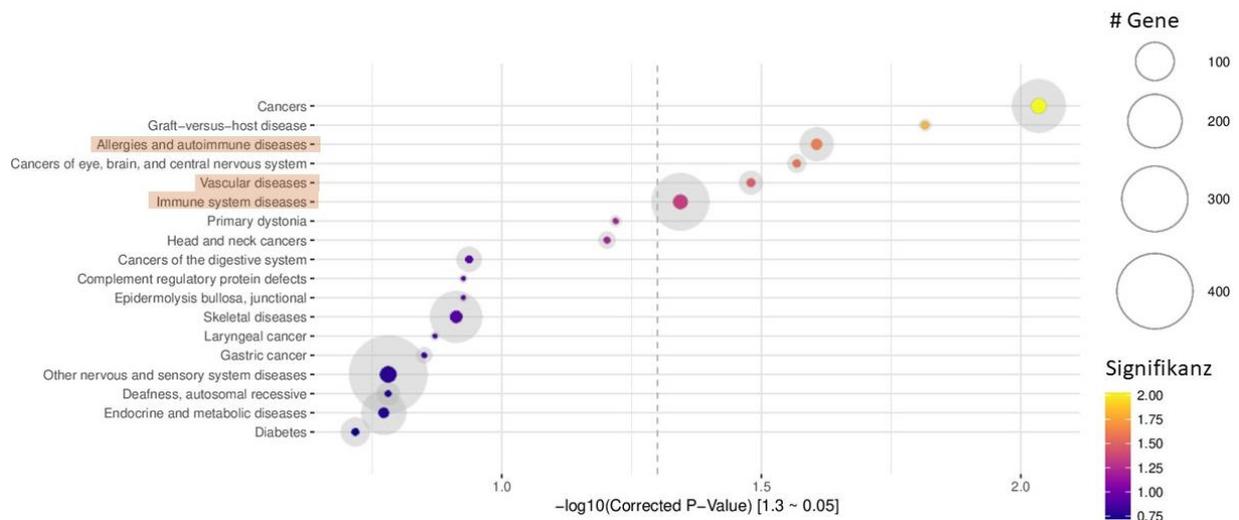
**Abbildung 35:** IL-6-Sekretion im Verlauf der repetitiven Stimulierung der RASF mit IL-1 $\beta$ . Die RASF wurden 4x für jeweils 16 h mit 0,05 ng/ml IL-1 $\beta$  stimuliert. Zwischen den Stimulierungsphasen erhielten die Zellen eine jeweils 8-stündige Erholungsphase ohne IL-1 $\beta$  (Erholung, graue Balken). Die Aktivierung der RASF wurde mittels IL-6-ELISA nachgewiesen. (A) und (B): Die erste Stimulierung (= 1. Puls, roter Balken) zeigte wie erwartet eine signifikante Induktion der IL-6-Sekretion im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle (Ktr, schwarze Balken). Die drei- und viermalige Stimulierung (= 3. und 4. Puls,

jeweils rote Balken) bewirkte eine weiterhin ausgeprägte aber signifikant schwächere Induktion der IL-6-Sekretion im Vergleich zum 1. Puls. Es wurden Mittelwerte 7 biologischer Replikate (= RASF von 7 unterschiedlichen RA-Patienten) mit ihren Standardabweichungen sowie die Signifikanzlevel bestimmt. Zur statistischen Evaluation wurde zum Vergleich innerhalb der 4 Pulse der Wilcoxon-Test angewendet. Für Vergleiche zwischen den Kontrollen und den stimulierten RASF wurde der H-Test nach Kruskal und Wallis verwendet inkl. der Dunn's-Multiparameter-Korrektur. Signifikante Effekte sind durch \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet (\* p-Wert  $\leq 0,05$ ; \*\* p-Wert  $\leq 0,01$ ; \*\*\* p-Wert  $\leq 0,001$ ; n = 7).

### 5.3.2.2 Analyse des Expressionsprofils von repetitiv stimulierten RASF

Zur Analyse der veränderten Aktivierung der RASF in Folge der repetitiven Stimulierung wurde eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. Hierfür wurde sowohl nach der einmaligen als auch nach der dreimaligen Stimulierung mit 0,05 ng/ml IL-1 $\beta$  die RNA isoliert und eine Sequenzierung der gesamten RNA durchgeführt. Die RNA-Sequenzierung sowie die Auswertung der Rohdaten der Genexpression wurden von einem Bioinformatiker durchgeführt und die Gene und Signalweganalysen zusammengestellt, die signifikant zwischen der einmaligen und der dreimaligen Stimulierung unterschiedlich reguliert waren.

Basierend darauf wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation zunächst analysiert, welche Gengruppen nach repetitiver Aktivierung der RASF signifikant unterschiedlich reguliert waren. Dabei lag der Fokus auf der Analyse, welche Erkrankungen mit den Top 18 signifikant unterschiedlich regulierten Gengruppen assoziiert waren. Es zeigte sich, dass unter den Top 6 Erkrankungen vor allem Gengruppen aus dem Bereich Autoimmunerkrankungen, Erkrankungen, die das Immunsystem betreffen, aber auch vaskuläre Erkrankungen signifikant unterschiedlich reguliert waren (Abbildung 36). Vergleicht man die signifikant unterschiedlich regulierten Gene innerhalb dieser 3 Erkrankungen, fällt auf, dass ca. 200 Gene aus dem Bereich Immunsystem assoziierte Erkrankungen unterschiedlich reguliert waren, während in dem Bereich vaskuläre Erkrankungen unter 100 Gene signifikant unterschiedlich exprimiert waren. Die am stärksten unterschiedlich regulierten Gene waren mit einem Signifikanzwert von ca. 1,6 bei den Autoimmunerkrankungen zu finden, wozu auch die RA gehört (Abbildung 36). Der Signifikanzwert wurde mittels des negativen dekadischen Logarithmus des korrigierten p-Wertes errechnet, wobei 2 das stärkste und 0,75 das niedrigste Signifikanzniveau kennzeichnete.

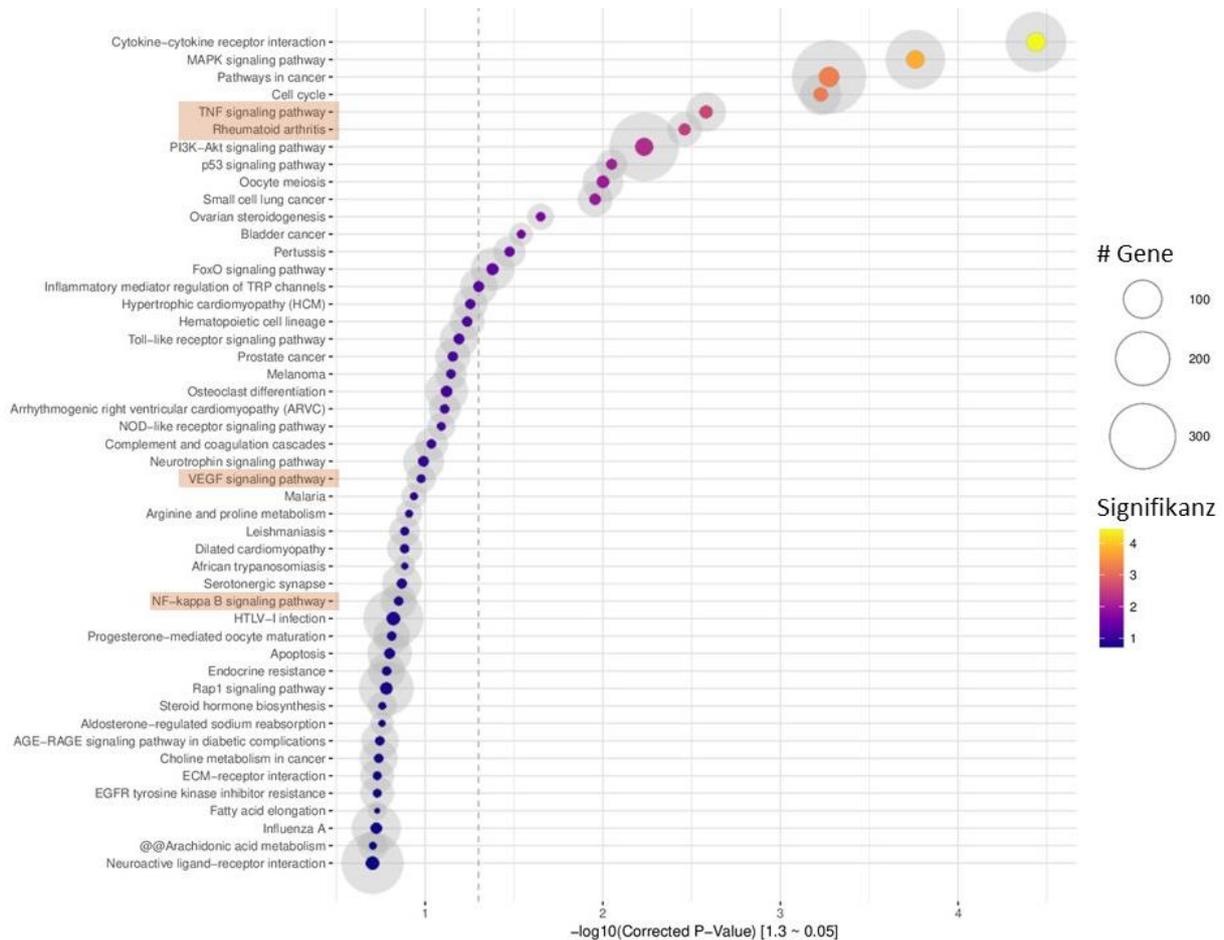


**Abbildung 36:** Erkrankungen, die mit den Top 18 signifikant unterschiedlich regulierten Gengruppen zwischen einmaliger und repetitiver Aktivierung der RASF assoziiert sind. In grauer Schattierung ist die Anzahl der signifikant unterschiedlich regulierten Gene dargestellt, die mit einer bestimmten Erkrankung assoziiert sind. Die signifikant angereicherten Gengruppen innerhalb der Erkrankungen wurden über den Webserver KOBAS aus der Datenbank KEGG PATHWAY ermittelt. Die gestrichelte Linie markiert die signifikant unterschiedlichen Gengruppen zwischen einmalig und repetitiv aktivierten RASF. Gengruppen, die rechts neben der gestrichelten Linie liegen, weisen ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  auf. Die Signifikanzwerte anhand der unteren Skala ergeben sich aus dem negativen dekadischen Logarithmus des korrigierten p-Wertes. 2 entspricht dem höchsten und 0,75 dem niedrigsten Signifikanzniveau.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die repetitive Aktivierung der RASF zu signifikant unterschiedlichen Regulierungen von Genen führt, die sowohl bei Autoimmunerkrankungen als auch bei vaskulären Erkrankungen eine Rolle spielen, wurden im nächsten Schritt die Top 48 signifikant unterschiedlich regulierten Signalwege analysiert. Dies sollte Aufschluss darüber geben, über welche potenzielle Signalwege die RASF spezifisch die Gefäßneubildung im Kontext der RA modulieren.

Auffällig war, dass unter den Top 5 der zwischen einmalig und dreimalig stimulierten RASF signifikant unterschiedlichen Signalwege der  $\text{TNF}\alpha$ -Signalweg zu finden war (Abbildung 37), während die repetitive  $\text{TNF}\alpha$ -Stimulierung der RASF keine signifikanten Unterschiede bei der IL-6-Sekretion zwischen einmaliger und repetitiver Aktivierung bei dem verwendeten Stimulationsschema aufwies (siehe Anhang: Abbildung 54). Weiterhin zeigte die Signalweganalyse eine Anreicherung von signifikant unterschiedlich regulierten Genen, die mit der RA assoziiert sind (Abbildung 37). Interessanterweise waren innerhalb der VEGF-vermittelten Signalweiterleitung, welche die wichtigste molekulare Regulierung der Gefäßneubildung darstellt, keine signifikanten Unterschiede der Genexpression zwischen einmaliger und repetitiver Aktivierung der RASF zu finden. Ebenso verhielt es sich mit dem NF-

kappa B-induzierten Signalweg, der vor allem bei der IL-1 $\beta$ -vermittelten Zellaktivierung eine Rolle spielt (Abbildung 37).



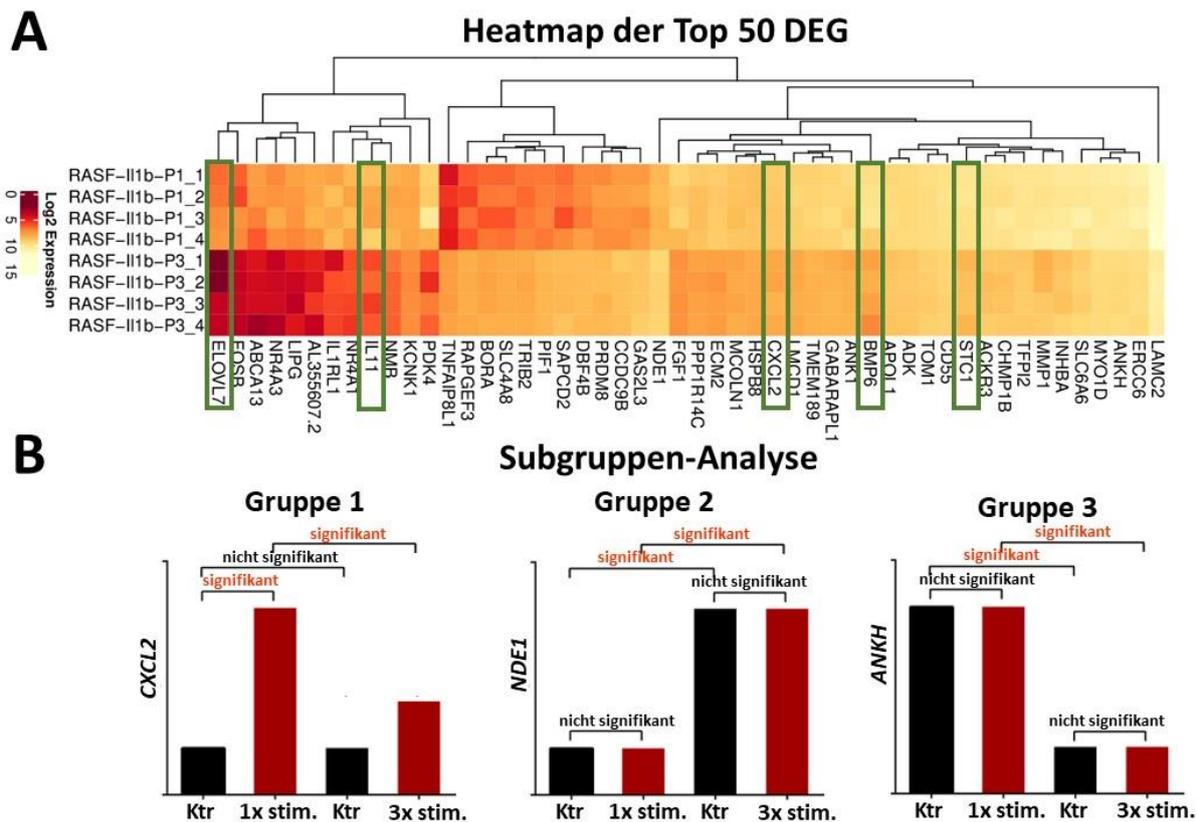
**Abbildung 37:** Darstellung der Top 48 signifikant unterschiedlich regulierten Signalwege zwischen einmaliger und repetitiver Stimulierung der RASF. In grauer Schattierung ist die Anzahl der signifikant differenziell exprimierten Gene dargestellt, die mit bestimmten Signalwegen assoziiert sind. Die signifikant angereicherten differenziell exprimierten Gene innerhalb der Signalwege wurden über den Webserver KOBAS aus der Datenbank KEGG PATHWAY ermittelt. Die gestrichelte Linie markiert die signifikant unterschiedlichen Gengruppen zwischen einmalig und repetitiv aktivierten RASF. Gengruppen, die rechts neben der gestrichelten Linie liegen, weisen ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  auf. Die Signifikanzwerte anhand der unteren Skala ergeben sich aus dem negativen dekadischen Logarithmus des korrigierten p-Wertes, wobei 4 dem höchsten und 1 dem niedrigsten Signifikanzniveau entspricht.

### 5.3.2.3 Subgruppenanalyse des Expressionsprofils von repetitiv stimulierten RASF

Auf Grund der zahlreichen signifikant unterschiedlich regulierten Gene in Folge der repetitiven Stimulierung lag der nächste Fokus in der vorliegenden Dissertation auf der Analyse der Top 50 signifikant unterschiedlich regulierten Genen zwischen der einmaligen und der dreimaligen Stimulierung (im Folgenden nur noch als Top 50 differenziell exprimierte Gene (DEG) bezeichnet). Zur weiteren Analyse wurde eine Subgruppenanalyse der jeweiligen Expressionsprofile der Top 50 DEG durchgeführt. Hierfür wurde für jedes der Top 50 Gene die

Expressions- sowie die Signifikanzwerte nach einmaliger bzw. nach dreimaliger Stimulierung der RASF und den dazugehörigen Kontrollen aus den RNA-Sequenzierungsdaten entnommen, graphisch dargestellt und innerhalb der Top 50 Gene verglichen (Abbildung 38, A).

Interessanterweise stellte sich heraus, dass sich in den Top 50 DEG drei unterschiedliche Expressionsprofile, im Folgenden als Gruppe 1-3 bezeichnet, finden ließen (Abbildung 38, B). Die erste Gruppe zeigte eine signifikante Induktion der entsprechenden Genexpression nach einmaliger Stimulierung mit IL-1 $\beta$  (= 1. Puls) im Vergleich zur Kontrolle. Gleichzeitig war die Genexpression nach dreimaliger Stimulierung (= 3. Puls) im Vergleich zur einmaligen Stimulierung signifikant schwächer induziert, weshalb dieser Effekt als „Gewöhnung“ an die repetitive IL-1 $\beta$ -Stimulierung definiert wurde. Die erste Gruppe spiegelte auch die Beobachtungen der veränderten IL-6-Sekretion in Folge der repetitiven Stimulierung von RASF aus Kapitel 5.3.3.1 wider und stand somit neben der gezielten Parameteranalyse Angiogenesemodifizierender Faktoren der Top 50 DEG im Fokus der weiterführenden Analysen. Gruppe 2 und 3 wurden als „nicht IL-1 $\beta$  induziert“ bezeichnet, da bei Gruppe 2 sowohl in der Kontrolle als auch nach dreimaliger Stimulierung die Genexpression signifikant im Vergleich zur einmaligen Stimulierung hochreguliert war und somit kein spezifischer Stimulierungs-Effekt vorlag. Ähnlich verhielt es sich auch mit Gruppe 3 mit dem Unterschied, dass hier die Genexpression in der Kontrolle sowie nach dreimaliger Stimulierung im Vergleich zur einmaligen Stimulierung signifikant schwächer induziert war. Da bei beiden Gruppen die veränderte Genexpression nicht auf die IL-1 $\beta$ -Stimulierung zurückzuführen war, wurden die zugeordneten Gene der Gruppen 2 und 3 bei den nachfolgenden Analysen nicht berücksichtigt.



**Abbildung 38:** Subgruppen-Analyse der Top 50 differenziell exprimierten Gene (DEG) zwischen einmaliger und dreimaliger IL-1 $\beta$ -Stimulierung der RASF. (A) Dargestellt ist die Heatmap der Top 50 DEG. In grünen Kästen sind die Gene markiert, die eine signifikant schwächere Induktion der Genexpression nach dreimaliger (3x stim.) im Vergleich zur einmaligen Stimulierung (1x stim.) mit IL-1 $\beta$  aufwiesen. (B) Anhand der Expressionsprofile der Top 50 DEG wurde eine Subgruppenanalyse durchgeführt. Die Expressionsprofile aller Top 50 DEG konnte einer der drei folgenden Gruppen zugeordnet werden: Gruppe 1 beinhaltet alle Gene, die im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Ktr) eine signifikant schwächere Induktion der Genexpression nach wiederholter Stimulierung mit IL-1 $\beta$  (= Gewöhnung) zeigten (dargestellt am Beispiel *CXCL2*). Gruppe 2 (dargestellt am Beispiel *NDE1*) und 3 (dargestellt am Beispiel *ANKH*) zeigten keine signifikant unterschiedliche Genregulierung in Folge der repetitiven Stimulierung.

### 5.3.2.4 Genanalyse aus der Gruppe 1 der Top 50 Gene

Zum besseren Verständnis des Einflusses der repetitiven Stimulierung auf die veränderte Genexpression bezüglich der veränderten Gefäßneubildung in der RA wurden alle Gene näher analysiert, die innerhalb der Top 50 Genen zur Subgruppe 1 „Gewöhnung an IL-1 $\beta$ -Stimulierung“ zugeordnet werden konnten. Dazu zählten die fünf Gene *STC1* (engl. *stanniocalcin-1*), *BMP6* (engl. *bone morphogenetic protein 6*), *CXCL2* (engl. *C-X-C motif chemokine ligand 2*), *IL-11* (engl. *interleukin 11*) und *ELOVL7* (engl. *elongase 7*), für die Pubmed-Literaturrecherchen in Kombination mit Stichpunkten jeweils zu *inflammation*, *arthritis*, *fibroblast* und *angiogenesis* durchgeführt wurden, um unterschiedlich regulierte Gene zu identifizieren, die im Zusammenhang mit RA und/oder Angiogenese beschrieben sind

(Tabelle 27). Die Literaturrecherche ergab, dass für *IL-11* und *CXCL2* mit jeweils allen 4 Suchbegriffen die meisten Treffer erzielt werden konnten. *IL-11* und *CXCL2* standen im Fokus der weiteren Analysen, da bereits in Kapitel 5.3.1 und 5.3.2.2 gezeigt werden konnte, dass die RASF die Gefäßneubildung zusätzlich VEGF-unabhängig zu verändern scheinen und für beide Gene ein VEGF-unabhängiger Effekt auf die Gefäßneubildung in der Literatur beschrieben ist (Urbantat et al. 2021; Elshabrawy et al. 2018). Aus diesem Grund wurden *STC1* und *BMP6* nicht weiter analysiert, da es in der Literatur für beide Gene Hinweise für einen VEGF-vermittelten Einfluss auf die Gefäßneubildung gibt (He et al. 2011; Pulkkinen et al. 2021). *ELOVL7* wurde ebenfalls für die weiteren Analysen im Rahmen dieser Arbeit ausgeschlossen, da in der Literatur keine Hinweise auf einen Zusammenhang mit der Gefäßneubildung gefunden werden konnten (Tabelle 27).

|                  |                     | STC1                         | BMP6        | IL-11   | CXCL2    | ELOVL7     |
|------------------|---------------------|------------------------------|-------------|---------|----------|------------|
| Funktion         |                     | Glykoprotein                 | TGFβ-Ligand | Zytokin | Chemokin | Elongase 7 |
|                  |                     | Anzahl der Treffer in Pubmed |             |         |          |            |
| Pubmed-Recherche | <i>inflammation</i> | 57                           | 101         | 438     | 1787     | 1          |
|                  | <i>arthritis</i>    | 7                            | 41          | 101     | 91       | 1          |
|                  | <i>fibroblast</i>   | 49                           | 98          | 284     | 157      | 3          |
|                  | <i>angiogenesis</i> | 42                           | 35          | 47      | 121      | 0          |

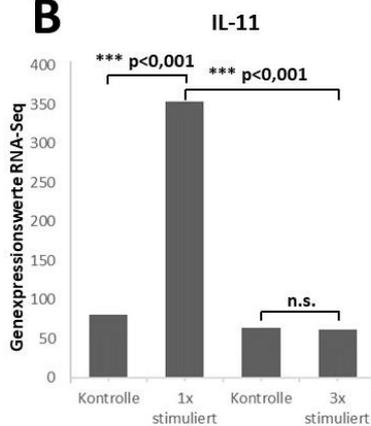
**Tabelle 27:** Pubmed-Literaturrecherche zu den 5 DEG aus Gruppe 1 (Stand 30.10.2023).

Für die weitere Untersuchung der im Rahmen der RNA-Sequenzierung identifizierten Gene *IL-11* und *CXCL2* im Kontext der RASF-vermittelten veränderten Gefäßneubildung wurde die Kinetik der Expressionswerte aus der RNA-Sequenzierung analysiert. In Abbildung 39 sind die Expressionswerte aus der RNA-Sequenzierung von *IL-11* und *CXCL2* tabellarisch (Abbildung 39, A) sowie graphisch (Abbildung 39, B und C) dargestellt. Wie bereits in Abbildung 38 gezeigt wurde, wiesen repetitiv stimulierte RASF eine signifikant schwächere Induktion von *IL-11* und *CXCL2* im Vergleich zur einmaligen Stimulierung auf (Abbildung 39). Interessanterweise zeigten repetitiv stimulierte RASF bei der *IL-11*-Expression keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (Abbildung 39, A und B). Im Gegensatz dazu war bei der *CXCL2*-Expression ein signifikanter Unterschied zwischen repetitiv stimulierten RASF und der Kontrolle vorhanden. Dies konnte auch auf Proteinebene bestätigt werden (Ktr. vs. 3. Puls:  $p = 0.023$ ) (Abbildung 39, C). Funktionelle Analysen zu *IL-11* und *CXCL2* im Kontext der spezifischen RASF/EZ-Interaktionen wurden als Projekte von medizinischen Doktorarbeiten weiter analysiert, die im Rahmen des Projekts der vorliegenden Dissertation betreut wurden und aus diesem Grund hier nicht beschrieben sind.

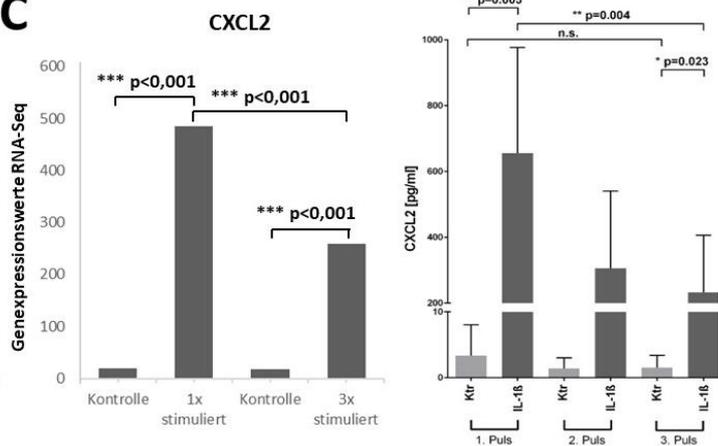
**A**

|       | Kontrolle | 1x stimuliert | Kontrolle | 3x stimuliert | p-Wert<br>(1x vs.<br>3x stimuliert) | p-Wert<br>(Kontrolle vs.<br>1x stim.) | p-Wert<br>(Kontrolle vs.<br>3x stim.) |
|-------|-----------|---------------|-----------|---------------|-------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| IL-11 | 80        | 354           | 63        | 61            | < 0,001                             | < 0,001                               | > 0,9<br>(nicht signifikant)          |
| CXCL2 | 19        | 485           | 17        | 258           | < 0,001                             | < 0,001                               | < 0,001                               |

**B**



**C**



**Abbildung 39:** Vergleich der IL-11- und CXCL2-Expression von repetitiv stimulierten RASF. Dargestellt ist die Analyse der Genexpression von IL-11 und CXCL2 zwischen einmalig (1x stim.) und repetitiv stimulierten (3x stim.) RASF sowie den entsprechenden Kontrollen tabellarisch (A) und graphisch (B, C). Die Werte wurden aus der RNA-Sequenzierung entnommen (je n = 4). Nach repetitiver Stimulierung (3x stimuliert) war bei IL-11 im Gegensatz zu CXCL2 kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle vorhanden. (C) Bei CXCL2 zeigte die einmalige Stimulierung (= 1. Puls) eine signifikante Induktion der CXCL2-Sekretion im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle (Ktr). Nach dreimaliger Stimulierung (= 3. Puls) war die CXCL2-Induktion signifikant schwächer im Vergleich zum 1. Puls. Zwischen dreimaliger Stimulierung und der Kontrolle war ein signifikanter Unterschied in der CXCL2-Sekretion vorhanden. Zur statistischen Evaluation wurde zum Vergleich innerhalb der 3 Pulse der Wilcoxon-Test angewendet. Für Vergleiche zwischen den Kontrollen und den stimulierten RASF wurde der H-Test nach Kruskal und Wallis inkl. der Dunn’s-Multiparameter-Korrektur verwendet. Signifikante Effekte sind durch \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet (\* p-Wert ≤ 0,05; \*\* p-Wert ≤ 0,01; \*\*\* p-Wert ≤ 0,001; n.s.: nicht signifikant; n = 8).

**5.4 Einfluss der die Angiogenese modifizierenden Matrixfragmente auf die RASF-Endothelzell-Interaktionen**

Aktivierte RASF sezernieren verstärkt Matrixmetalloproteasen, wodurch es im Synovium von RA-Patienten zur Degradation der EZM kommt (Lefèvre et al. 2017; Lefèvre et al. 2009). Durch diesen Prozess werden Matrixfragmente wie beispielsweise Endostatin, ein anti-angiogenes Kollagen Typ XVIII Fragment, freigesetzt. Im Kontext der verstärkten Gefäßneubildung im hyperplastischen RA-Synovium werden zudem aufgrund der Umstrukturierungen der Blutgefäße die anti-angiogenen Fragmente des Kollagen Typs IV Canstatin, Arresten und Tumstatin freigesetzt. Es ist bereits bekannt, dass Matrixfragmente auf RASF aktivierend wirken, allerdings fehlen bislang Kenntnisse darüber, welche Effekte die einzelnen

Matrixfragmente funktionell sowie auf molekularer Ebene auf die RASF haben (Lefèvre et al. 2017). Da in dieser Arbeit der Fokus auf der RASF-vermittelten Interaktion mit den EZ in Bezug auf die veränderte Gefäßneubildung in der RA lag, wurde der Einfluss von in der Literatur als anti-angiogen beschriebenen Matrixfragmenten auf die RASF/EZ-Interaktionen sowie die RASF-Aktivierung der RASF durch die Fragmente untersucht.

#### 5.4.1 Canstatin und Endostatin in der Synovialflüssigkeit und im Serum von RA Patienten

Um zu klären, wie hoch die physiologische Konzentration der Matrixfragmente Canstatin, Endostatin, Arresten und Tumstatin in RA-Patienten ist, wurde die Konzentration von Canstatin und Endostatin im Serum und in der Synovialflüssigkeit gemessen. Zum Vergleich wurde die Canstatin-Konzentration in der Synovialflüssigkeit und im Serum von Patienten mit OA sowie im Serum von gesunden Probanden bestimmt. Dies sollte Aufschluss darüber geben, in welchen physiologischen Konzentrationen Canstatin in RA sowie OA, aber auch in gesunden Probanden vorkommt, um alle folgenden Experimente unter möglichst physiologisch nahen Bedingungen durchzuführen.

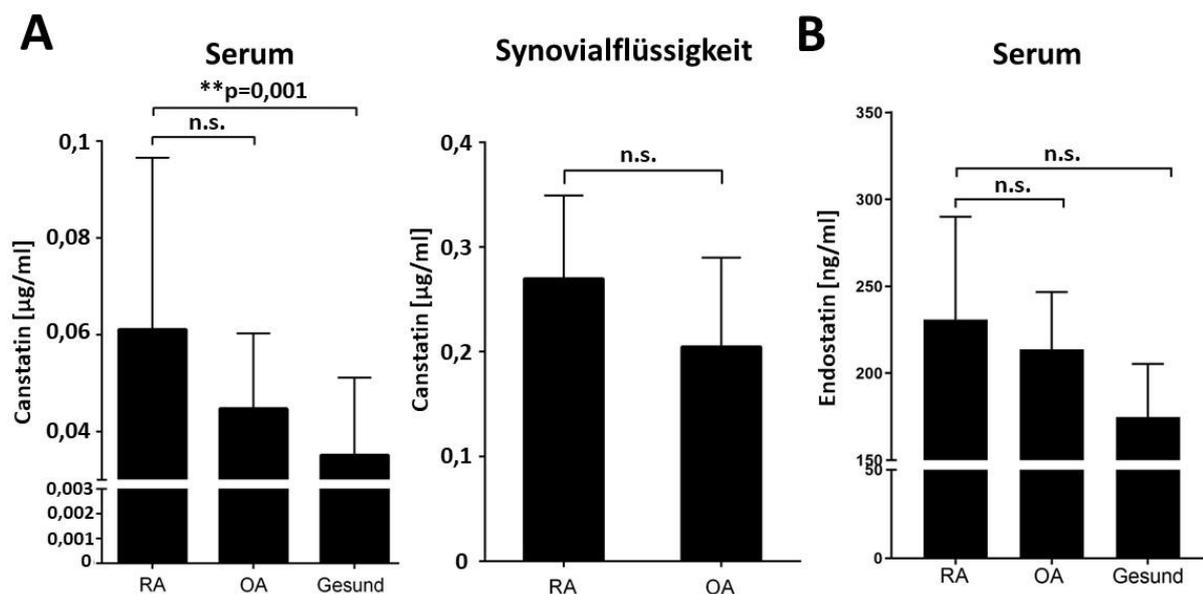
Die Messung der Canstatin-Konzentration im Serum zeigte, dass Canstatin bei RA-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöht war ( $p = 0,001$ ) (Abbildung 40, A). RA-Patienten zeigten im Mittel Canstatin-Konzentrationen von  $0,06 \mu\text{g/ml}$ , wobei die höchste gemessene Konzentration bei  $0,2 \mu\text{g/ml}$  und die niedrigste Konzentration bei  $0,004 \mu\text{g/ml}$  lag. Im Vergleich dazu wiesen gesunde Probanden im Mittel eine Canstatin-Konzentration von  $0,04 \mu\text{g/ml}$  auf. Die höchste Canstatin-Konzentration lag bei  $0,08 \mu\text{g/ml}$ , während die niedrigste Konzentration bei  $0,01 \mu\text{g/ml}$  lag. OA-Patienten wiesen mit einem Mittelwert von  $0,05 \mu\text{g/ml}$  im Vergleich zu den RA-Patienten ebenfalls eine niedrigere, jedoch nicht signifikante, Canstatin-Konzentration im Serum auf (Abbildung 40, A).

Die Analyse der Canstatin-Konzentration in der Synovialflüssigkeit von RA- und OA-Patienten ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen (Abbildung 40, A). Auffällig war, dass die Canstatin-Konzentration bei den RA-Patienten in der Synovialflüssigkeit höher war als im Serum, da der Mittelwert der Synovialflüssigkeit bei  $0,27 \mu\text{g/ml}$  lag und somit 4-fach höher als im Serum bei  $0,06 \mu\text{g/ml}$  war.

Für die weitere Analyse des Canstatin-Effekts wurde auf Grund von gemessenen Einzelwerten in der Synovialflüssigkeit von über  $0,3 \mu\text{g/ml}$  für die weiteren Stimulierungen eine Canstatin-

Konzentration von 0,5 µg/ml verwendet, um den kurzfristigen Canstatin-Effekt auf die RASF/EZ-Interaktionen unter möglichst physiologischen Bedingungen ähnlich zum humanen RA-Synovium zu untersuchen. Für die Vorstimulierung der EZ mit Canstatin vor Zugabe der RASF wurde die Canstatin-Konzentration 0,2 µg/ml gewählt, da dies zum einen dem höchsten gemessenen Einzelwert im Serum entsprach, zum anderen nahe dem Mittelwert der gemessenen Canstatin-Konzentration in der Synovialflüssigkeit lag.

Die Messung der Endostatin-Konzentration ergab, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen RA-, OA- und gesunden Patienten festgestellt werden konnten (Abbildung 40, B). Die mittlere Endostatin-Konzentration von gesunden Patienten lag bei 180 ng/ml, bei RA-Patienten bei 220 ng/ml und bei OA-Patienten bei 210 ng/ml. Die niedrigste gemessene Endostatin-Konzentration lag bei RA-Patienten bei 170 ng/ml und die höchste bei knapp 400 ng/ml. Aus diesem Grund wurden für die weiteren Analysen die Endostatin-Konzentration 250 ng/ml (= 0,25 µg/ml) und 500 ng/ml (= 0,5 µg/ml) verwendet, um den Endostatin-Effekt auf die RASF/EZ-Interaktionen unter möglichst physiologischen Bedingungen zu testen.



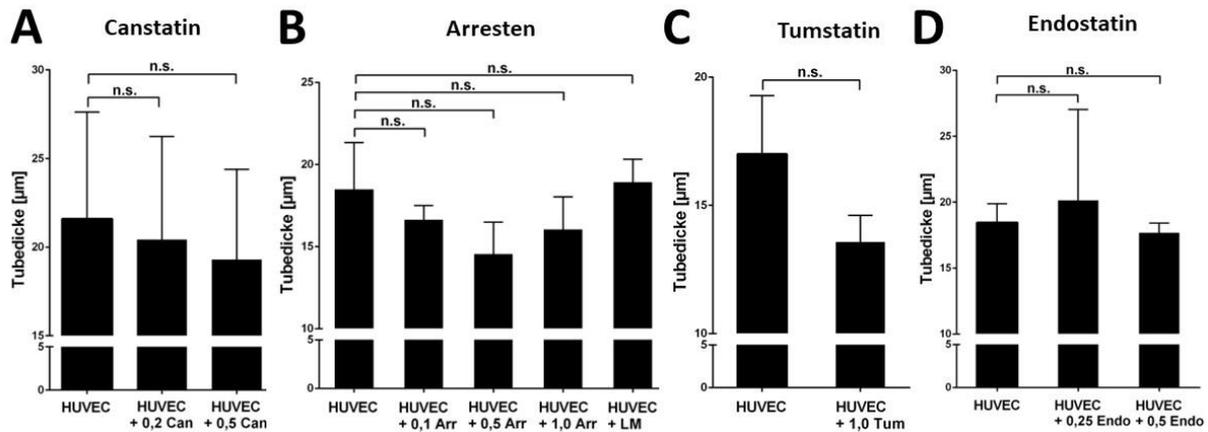
**Abbildung 40:** Canstatin- und Endostatin-Sekretion im Serum und in der Synovialflüssigkeit von RA- und OA-Patienten. (A) Mittelwerte inkl. Standardabweichungen der gemessenen Canstatin-Sekretion im Serum und in der Synovialflüssigkeit von RA- und OA-Patienten sowie gesunde Probanden im Serum. (B) Mittelwerte inkl. Standardabweichungen der gemessenen Endostatin-Sekretion im Serum von RA- und OA-Patienten sowie gesunde Probanden. Für die statistischen Analysen wurde der H-Test nach Kruskal und Wallis inkl. Dunn's-Multiparameter-Korrektur (A: Serum und B) und der Mann Whitney U-Test (A: Synovialflüssigkeit) angewendet. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet, ns: nicht signifikant (A: Serum: RA: n = 27, OA: n = 8, gesund: n = 20; Synovialflüssigkeit: RA: n = 6, OA: n = 7; B: RA, gesund: n = 17, OA: n = 5).

Für Arresten wurden in der Literatur Hinweise dafür gefunden, dass Arresten erst ab einer Konzentration von 0,8 µg/ml einen signifikanten Effekt auf die HUVEC-Migration hat (Lv und Zheng 2012). Allerdings reduzierten bereits 0,1 µg/ml Arresten die EZ-Proliferation (Nyberg et al. 2008), sodass für die folgenden Analysen der vorliegenden Dissertation die Konzentrationen 0,1; 0,5 und 1,0 µg/ml Arresten gewählt wurden. Tumstatin wurde in der Literatur in höheren Konzentrationen eingesetzt. Beispielsweise zeigte erst eine Behandlung mit 2,5 bis 10 µg/ml Tumstatin eine Wirkung auf das Tumorstadium im Mausmodell (Hamano und Kalluri 2005). Jedoch zeigte Tumstatin bereits ab einer Konzentration von 1,0 µg/ml einen signifikanten Effekt auf die Zellproliferation (Hwang-Bo et al. 2015), sodass für die folgenden Analysen der vorliegenden Dissertation die Tumstatin-Konzentration 1,0 µg/ml eingesetzt wurde.

#### 5.4.2 Einfluss von Canstatin, Arresten, Tumstatin und Endostatin auf die Angiogenese *in vitro*

Um im nächsten Schritt einen Kandidaten für weitere Versuche zu ermitteln, wurde der funktionelle Effekt der Matrixfragmente in Bezug auf die Gefäßneubildung *in vitro* analysiert. Hierfür wurden HUVEC im Tube-Formation-Experiment mit 0,2 und 0,5 µg/ml Canstatin, 0,1, 0,5 und 1 µg/ml Arresten, 1 µg/ml Tumstatin sowie 0,25 und 0,5 µg/ml Endostatin für 4 h stimuliert und anschließend der Einfluss der Matrixfragmente vergleichend auf die Gefäßneubildung ermittelt. Für die Quantifizierung wurden der Parameter „Tubedicke“ verwendet, da in Kapitel 5.2.1 gezeigt werden konnte, dass die RASF diesen Parameter signifikant beeinflussten.

Die Stimulierung mit Canstatin, Arresten und Tumstatin zeigte im Auswahlversuch mit n = 3 Proben einen Trend zur Reduktion der Tubedicke im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abbildung 41, A, B und C). Die Stimulierung mit Endostatin bewirkte keine Reduktion der Tubedicke (Abbildung 41, D).



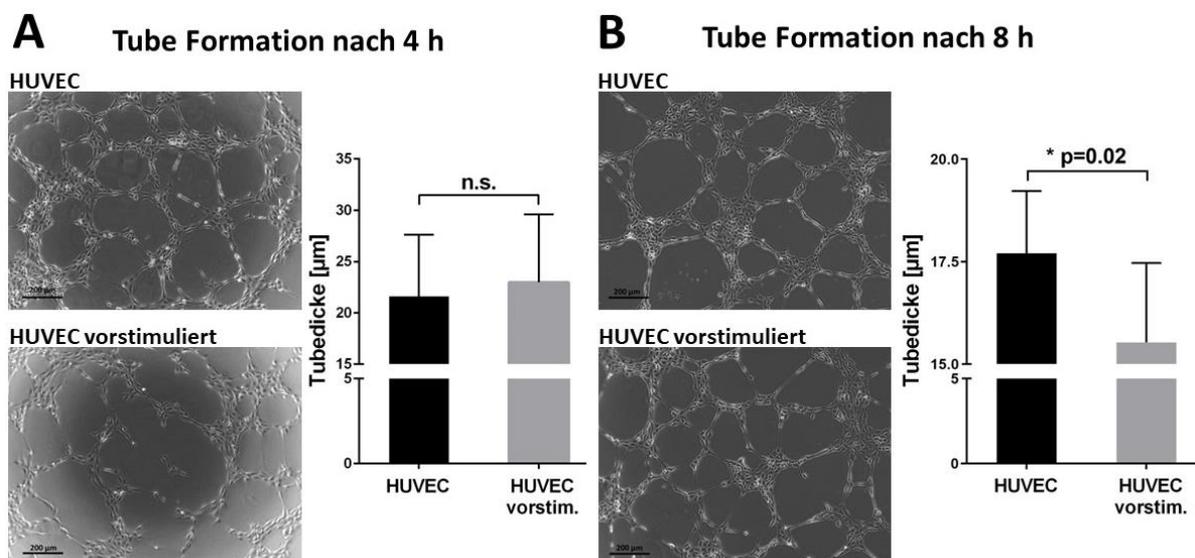
**Abbildung 41:** Effekte der Matrixfragmente Arresten, Tumstatin, Endostatin und Canstatin auf die Tubebildung. Canstatin (Can) (A), Arresten (Arr) (B), Tumstatin (Tum) (C) und Endostatin (Endo) (D) zeigten keine Effekte auf die Tubedicke im Tube-Formation-Experiment nach 4 h. Dargestellt sind die Mittelwerte der Tubedicken inkl. Standardabweichungen. Für die statistischen Analysen wurde der H-Test nach Kruskal und Wallis inkl. der Dunn's-Multiparameter-Korrektur (A, B und D) oder der Mann Whitney U-Test (C) angewendet. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet, n.s.: nicht signifikant ( $n = 3$ ).

Zusätzlich wurde die Endotoxizität der Matrixfragmente bestimmt, um LPS- oder andere Endotoxin-vermittelte Effekte auszuschließen (Kapitel 4.3.7). Zum Messen des Endotoxins in den verwendeten Matrixfragmenten wurden die höchsten Proteinkonzentrationen eingesetzt, die auch in den Tube-Formation-Experimenten verwendet wurden. Es zeigte sich, dass Endostatin mit  $< 0,01$  EU/ml den niedrigsten Endotoxinwert aufwies. Canstatin erzielte mit  $< 0,05$  EU/ml den zweitniedrigsten Endotoxinwert, wohingegen die Endotoxinwerte von Arresten und Tumstatin am höchsten waren (Tabelle 24).

Endostatin erzielte zwar den niedrigsten Endotoxinwert, zeigte jedoch keinen Trend zur Veränderung der Tubedicke im Tube-Formation-Experiment. Außerdem zeigte auch die 24-stündige Stimulierung der RASF mit Endostatin keinen Einfluss auf die RASF-Aktivierung (Anhang: Abbildung 55, A). Somit wurde die Analyse von Endostatin nicht fortgesetzt. Die Analyse von Arresten und Tumstatin wurde auf Grund der Endotoxin-Werte hintenangestellt. Canstatin erzielte niedrige Endotoxinwerte (Tabelle 24), zeigte einen Trend zur Reduktion der Tubedicke (Abbildung 41) und hatte auch das Potenzial, die RASF zu aktivieren (Anhang: Abbildung 55, D), sodass für die folgenden Analysen bzgl. der RASF/EZ-Interaktionen Canstatin ausgewählt wurde.

### 5.4.3 Analyse des Canstatin-Effekts auf die RAS/EZ-Interaktionen im 2D Tube-Formation-Experiment

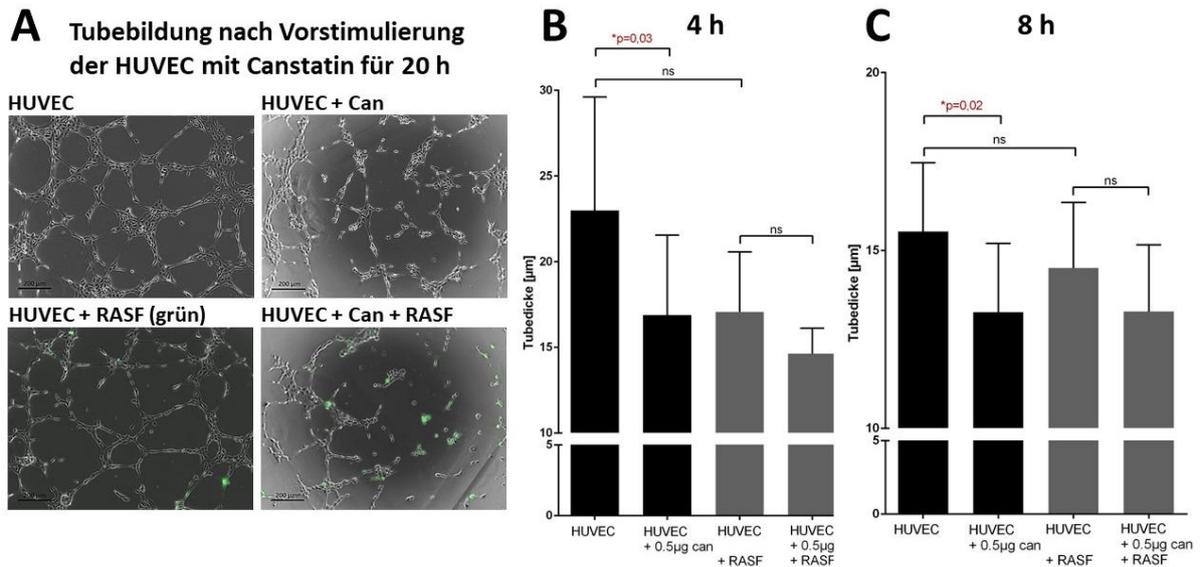
Da Canstatin im Vorversuch eine dosisabhängige Reduktion der Tubedicke nach 4 h im Tube-Formation-Experiment vermuten ließ (Abbildung 41), sollte im nächsten Schritt in höherer Fallzahl und nach einer längeren Stimulierungsdauer herausgefunden werden, ob und welchen Einfluss Canstatin auf die Gefäßneubildung *in vitro* hat. Hierfür wurden die HUVEC 20 h vor der Durchführung des Tube-Formation-Experiments mit 0,2 µg/ml Canstatin vorstimuliert. Anschließend wurde das Tube-Formation-Experiment gestartet und die Tubebildung nach 4 bzw. 8 h mittels Quantifizierung der Tubedicke evaluiert, sodass der Canstatin-Effekt auf die EZ über 24 bzw. 28 h anstatt von 4 h (Abbildung 41) ermittelt werden konnte. Die 20-stündige Vorstimulierung mit Canstatin gefolgt von 4 h Tubebildung bewirkte einen nicht signifikanten Anstieg der Tubedicke von  $21,6 \pm 5,7 \mu\text{m}$  auf  $23,0 \pm 6,3 \mu\text{m}$  (Abbildung 42, A). Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Tubedicke nach 8 h in Folge der 20-stündigen Vorstimulierung mit Canstatin im Vergleich zu nicht vorstimulierten HUVEC von  $17,5 \pm 0,9 \mu\text{m}$  auf  $13,4 \pm 2,0 \mu\text{m}$  signifikant reduziert war ( $p = 0,023$ , jeweils  $n=10$ ) (Abbildung 42, B).



**Abbildung 42:** Canstatin-Effekt auf die HUVEC im Tube-Formation-Experiment nach 20-stündiger Vorstimulierung mit Canstatin. Dargestellt ist der Einfluss von Canstatin auf die Tubedicke (Mittelwert inkl. Standardabweichung) nach 20-stündiger Vorstimulierung der HUVEC und anschließendem Tube-Formation-Experiment für 4 h (A) bzw. für 8 h (B). Nach 8 h konnte ein signifikanter Effekt von Canstatin in Folge der 20-stündigen Vorstimulierung festgestellt werden, in dem die Tubedicke signifikant reduziert war. Für die statistischen Analysen wurde der Mann Whitney U-Test angewendet. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet, n.s.: nicht signifikant (4 h:  $n = 10$ ; 8 h:  $n = 10$ ).

Im inflammatorischen Synovium von RA-Patienten sind neben den RASF auch die EZ der chronischen Entzündung und durch die erhöhte Matrixdegradation auch Matrixfragmenten wie Canstatin ausgesetzt. Da bereits in Kapitel 5.3.2 demonstriert werden konnte, dass die repetitive Stimulierung von RASF einen signifikanten Einfluss auf die Expression von Genen hat, die in die Gefäßneubildung involviert sind, wurden im nächsten Schritt HUVEC wiederholt stimuliert und die Interaktion mit den RASF untersucht. Hierfür wurden die HUVEC zunächst mit 0,2 µg/ml Canstatin für 20 h vorstimuliert und anschließend im Tube-Formation-Experiment zusätzlich mit weiteren 0,5 µg/ml Canstatin für die Dauer des Tube-Formation-Experiments stimuliert. Zusätzlich wurden RASF zugegeben und die Tubebildung unter Einfluss der RASF nach Vorstimulierung der HUVEC mit Canstatin und zusätzlicher Stimulierung der HUVEC während der Tubebildung mit Canstatin verglichen.

Die wiederholte Stimulierung der HUVEC mit Canstatin während der Tubebildung reduzierte nach 4 h von  $23,0 \pm 6,3 \mu\text{m}$  auf  $16,9 \pm 4,4 \mu\text{m}$  ( $p = 0,03$ ) (Abbildung 43, B) und nach 8 h von  $15,5 \pm 1,8 \mu\text{m}$  auf  $13,3 \pm 1,8 \mu\text{m}$  ( $p = 0,02$ ) (Abbildung 43, C) signifikant die Tubedicke im Vergleich zu vorstimulierten HUVEC, die kein zusätzliches Canstatin während der Tubebildung erhielten. Die Zugabe von RASF zu vorstimulierten HUVEC bewirkte ebenfalls eine Reduktion der Tubedicke auf  $17,1 \pm 3,3 \mu\text{m}$  nach 4 h im Vergleich zu den vorstimulierten HUVEC, die jedoch nicht signifikant war. Folglich konnte die Zugabe der RASF zu den vorstimulierten HUVEC die Canstatin-vermittelte signifikante Reduktion der Tubedicke nicht beeinflussen (Abbildung 43, B). Derselbe Effekt wurde auch nach 8 h beobachtet (Abbildung 43, C).

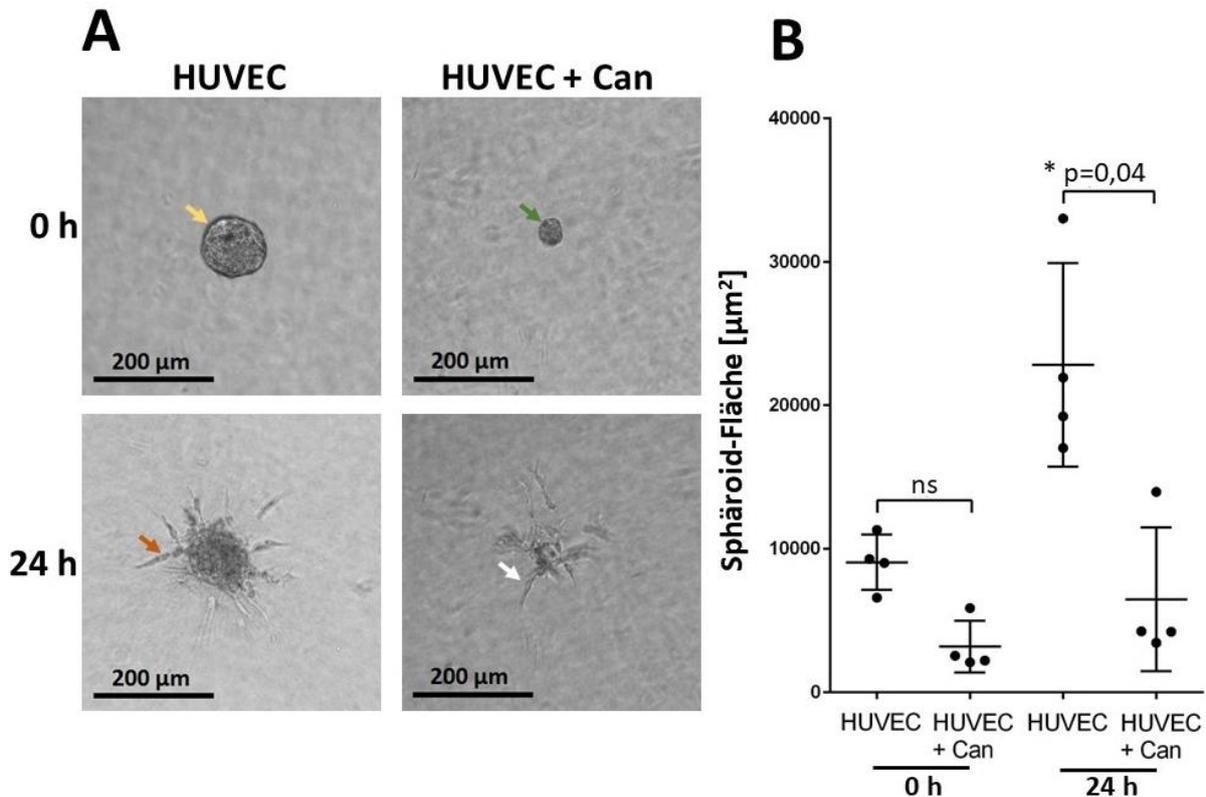


**Abbildung 43:** Einfluss der 20-stündigen Vorstimulierung der HUVEC mit Canstatin (Can) auf die RASF/Endothelzell-Interaktionen. (A) Dargestellt sind repräsentative Fotos der Tubebildung unter Einfluss der 20-stündigen Vorstimulierung der HUVEC mit 0,2 µg/ml Canstatin (HUVEC); der 20-stündigen Vorstimulierung der HUVEC mit Canstatin und zusätzlicher Zugabe von 0,5 µg/ml Canstatin im Tube-Formation-Experiment (HUVEC + Can); der 20-stündigen Vorstimulierung der HUVEC mit Canstatin und Zugabe der RASF (grün) im Tube-Formation-Experiment (HUVEC + RASF) sowie der 20-stündigen Vorstimulierung der HUVEC mit Canstatin, zusätzlicher Zugabe von 0,5 µg/ml Canstatin und Zugabe der RASF im Tube-Formation-Experiment (HUVEC + Can +RASF). Das Tube-Formation-Experiment wurde für 4 h (B) und 8 h (C) durchgeführt. Die Tubedicke war nach zusätzlicher Stimulierung der vorstimulierten HUVEC nach 4 und 8 h signifikant reduziert. Für die statistischen Analysen wurde der H-Test nach Kruskal und Wallis angewendet und die Dunn’s-Multiparameter-Korrektur durchgeführt. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet, n.s.: nicht signifikant (4 h: n = 10; 8 h: n = 10).

#### 5.4.4 Analyse des Canstatin-Effekts auf die RASF/EZ-Interaktionen im 3D Sphäroid-basierten Sprout-Experiment

Nachdem in Kapitel 5.4.3 gezeigt werden konnte, dass die Vorstimulierung der HUVEC mit Canstatin signifikant die Tubedicke reduzierte, sollte die Wirkung von Canstatin auch im 3D Sphäroid-basierten Sprout-Experiment im Kontext der RASF/EZ-Interaktionen evaluiert werden. Die HUVEC wurden hierfür zunächst ohne Zugabe der RASF während der Generierung der Sphäroide mit 0,5 µg/ml Canstatin stimuliert. Die Einbettung der Sphäroide erfolgte dann in eine Kollagenmatrix, die ebenfalls 0,5 µg/ml Canstatin enthielt. Nach der Generierung der Sphäroide nach 0 h sowie nach Aussprossung der Zellen aus den Sphäroiden nach 24 h wurden die Sphäroide mittels Quantifizierung der Sphäroidfläche evaluiert (Kapitel 4.2.3). Nach Generierung der Sphäroide nach 0 h reduzierte sich die Fläche der Sphäroide in Folge der Canstatin-Stimulierung nicht signifikant von  $9.061 \pm 1.677 \mu\text{m}^2$  auf  $3.188 \pm 1.558 \mu\text{m}^2$  im Vergleich zu den unstimulierten HUVEC. Interessanterweise beeinflusste Canstatin die

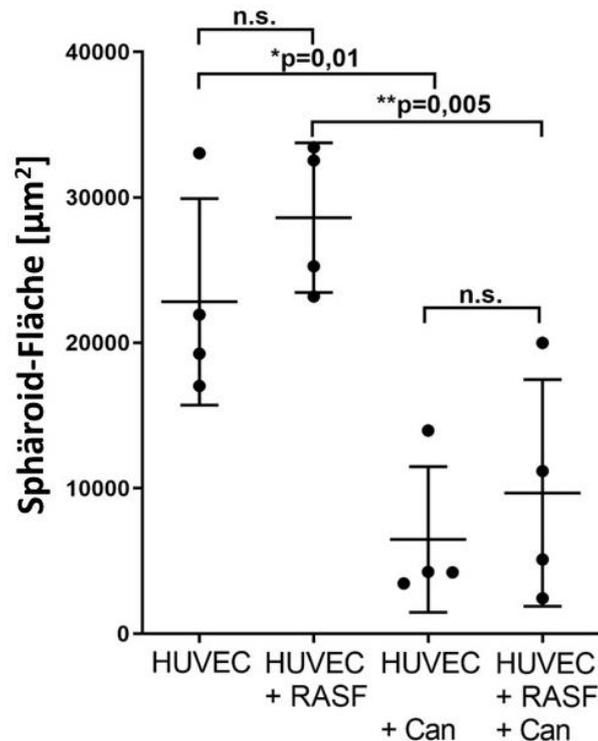
Aussprossung der Zellen aus den Sphäroiden nach 24 h, da hier die Fläche der mit Canstatin stimulierten Sphäroide im Vergleich zu den unstimulierten Sphäroiden von  $22.812 \pm 6.149 \mu\text{m}^2$  auf  $6.476 \pm 4.335 \mu\text{m}^2$  signifikant reduziert war ( $p = 0,04$ ) (Abbildung 44, B).



**Abbildung 44:** Einfluss von Canstatin auf die Gefäßneubildung im 3D Sphäroid-basierten Sprout-Experiment. (A) Darstellung der Sphäroide in 10-facher Vergrößerung: Die unstimulierten HUVEC formten ein gleichmäßig rundes Sphäroid zum Zeitpunkt 0 h (gelber Pfeil). Die unstimulierten HUVEC sprossen über 24 h aus dem Sphäroid aus und bildeten dabei Röhren-ähnliche Strukturen (orangefarbener Pfeil). Unter Einfluss von Canstatin (Can) waren die Sphäroide nach ihrer Generierung zum Zeitpunkt 0 h kleiner im Vergleich zu unstimulierten Sphäroiden (grüner Pfeil). Unter Einfluss von Canstatin sprossen nach 24 h weniger HUVEC aus dem Sphäroid aus (weißer Pfeil). (B) Dargestellt sind die Mittelwerte inkl. Standardabweichungen der Sphäroid-Flächen unmittelbar nach Generierung der Sphäroide nach 0 h sowie 24 h nach der Aussprossung. Nach 0 h war die Fläche der Sphäroide mit Canstatin (Can) leicht reduziert, während nach 24 h die Fläche der Sphäroide mit Canstatin im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle signifikant reduziert war. Für die statistischen Analysen wurde der H-Test nach Kruskal und Wallis angewendet und die Dunn's-Multiparameter-Korrektur durchgeführt. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet, ns: nicht signifikant ( $n=4$ ).

Nachdem im Tube-Formation-Experiment in Kapitel 5.4.3 gezeigt werden konnte, dass die RASF den Canstatin-vermittelten anti-angiogenen signifikanten Effekt auf die Tubedicke nicht beeinflussen, sollte im 3D Sphäroid-basierten Sprout-Experiment untersucht werden, wie sich die Zugabe von Canstatin zu den Sphäroiden, die neben HUVEC auch RASF enthielten, auf das Aussprossen der EZ auswirkte. Die Zugabe von Canstatin zu den HUVEC bewirkte eine

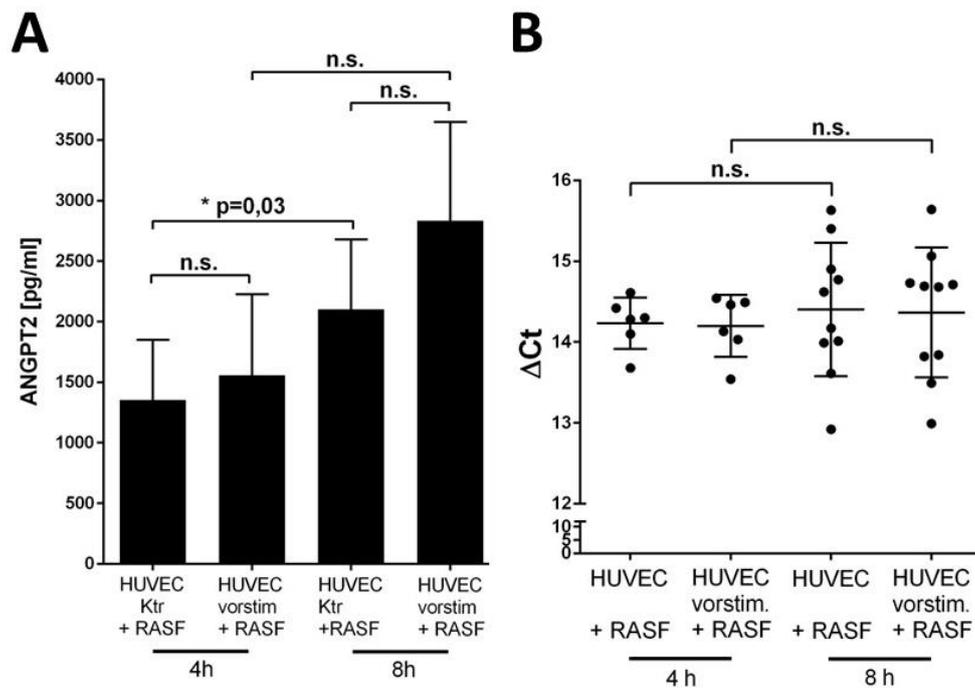
signifikante Reduktion der Sphäroidfläche ( $p = 0,01$ ) (Abbildung 45). Derselbe Canstatin-Effekt konnte auch bei Sphäroiden beobachtet werden, die RASF enthielten ( $p = 0,005$ ) (Abbildung 45). Allerdings konnte kein Unterschied in der Sphäroidfläche zwischen HUVEC allein und HUVEC mit RASF unter Einfluss von Canstatin gezeigt werden (Abbildung 45).



**Abbildung 45:** Einfluss der RASF auf die Stimulierung mit Canstatin im 3D Sphäroid-basierten Sprout-Experiment. Dargestellt sind die Mittelwerte inkl. Standardabweichungen der Sphäroid-Flächen unmittelbar 24 h nach der Aussprossung. Nach Stimulierung mit Canstatin sprossen nach 24 signifikant weniger HUVEC unter Einfluss aus dem Sphäroid aus. Für die statistischen Analysen wurde der One-Way-ANOVA-Test inkl. der Dunn's-Multiparameterkorrektur angewendet. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet, n.s.: nicht signifikant ( $n = 4$ ).

#### 5.4.5 ANGPT2-Expression unter Einfluss der RASF/EZ-Interaktionen und Canstatin *in vitro*

Da demonstriert werden konnte, dass ANGPT2 sowohl im RA-Synovium als auch in den SCID-Maus-Implantaten verändert exprimiert wurde, sollte im nächsten Schritt herausgefunden werden, ob Canstatin auf molekularer Ebene einen Einfluss auf die Expression von ANGPT2 im Kontext der RASF/EZ-Interaktionen hat. Hierfür wurde ANGPT2 in den Überständen und auf Expressionsebene im Anschluss an die Tube-Formation-Experimente nach 4 und 8 h (Kapitel 5.4.3) gemessen. Allerdings konnten sowohl auf Proteinebene (Abbildung 46, A) als auch auf Genexpressionsebene keine Änderungen in der ANGPT2-Expression unter Einfluss von Canstatin im Kontext der RASF/EZ-Interaktionen identifiziert werden (Abbildung 46, B).



**Abbildung 46:** Einfluss von Canstatin auf die ANGPT2-Expression im Kontext der RASF/EZ-Interaktionen im Tube-Formation-Experiment nach 4 und 8 h. (A) Mittelwerte inkl. Standardabweichungen der Messung der ANGPT2-Sekretion in den Überständen der Tube-Formation-Experimente nach 4 und 8 h. (B) Mittelwerte inkl. Standardabweichungen der Messungen der Ct-Werte von ANGPT2 nach Durchführung der Tube-Formation-Experimente nach 4 und 8 h abzüglich der Ct-Werte des House-Keeping-Gens 18S ( $\Delta$ Ct). Für die statistischen Analysen wurde der H-Test nach Kruskal und Wallis durchgeführt und die Dunn’s-Multiparameter-Korrektur angewendet. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet, n.s.: nicht signifikant (4 h: n = 6; 8 h: n = 10).

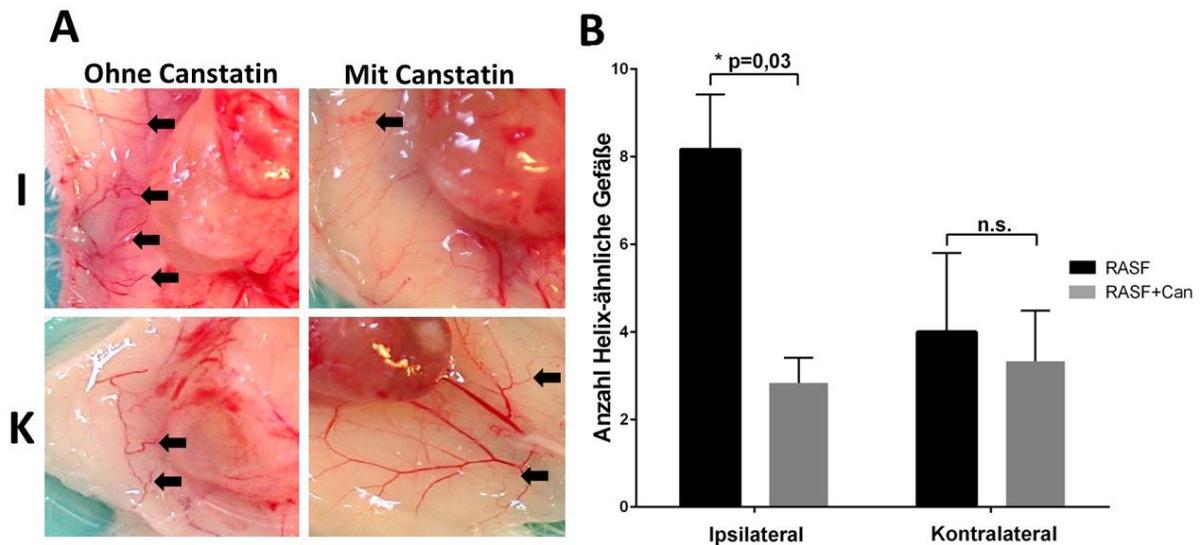
#### 5.4.6 Therapeutischer Effekt von Canstatin bezüglich der RASF-vermittelten veränderten Angiogenese im SCID-Maus-Modell der RA

In den *in vivo*-Experimenten konnte bereits der Verlauf der RASF-vermittelten Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße über einen Zeitraum von 45 Tagen beschrieben sowie der RASF-spezifische Effekt auf die EZ im Kontext der Gefäßneubildung auf funktioneller und molekularer Ebene demonstriert werden (Kapitel 5.2 und 5.3). Weiterhin konnte in den *in vitro*-Experimenten auch gezeigt werden, dass Canstatin signifikant die Gefäßneubildung mittels Reduktion der Tubedicke beeinflusste (Kapitel 5.4.3). Allerdings konnte in den *in vitro*-Experimenten nicht eindeutig geklärt werden, wie sich Canstatin auf die RASF/EZ-Interaktionen auswirkt. Aus diesem Grund sollte im weiteren Verlauf der Einfluss von Canstatin auf die spezifischen RASF-vermittelte Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße im SCID-Maus-Modell der RA analysiert werden sollte. Hierbei stand neben der Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße unter Einfluss von Canstatin auch die RASF-vermittelte Invasion im Fokus. Wie in Kapitel 4.4.5 beschrieben, wurden in 3 unabhängigen Experimenten jeweils 18

SCID-Mäusen ipsilateral RASF zusammen mit einem humanen Knorpel in einer Gelatinematrix und kontralateral humaner Knorpel in einer Gelatinematrix implantiert. Zusätzlich wurden sowohl die ipsilateralen als auch die kontralateralen Implantate mit 0,5 µg/ml Canstatin getränkt. Die Implantate wurden nach 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 40 und 45 Tagen von jeweils 2 Mäusen pro Zeitpunkt entnommen, sodass 6 Mäuse pro Zeitpunkt für die Auswertung zur Verfügung standen. Die Implantate wurden auf die Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße hin untersucht sowie die Invasion der RASF unter Einfluss von Canstatin an Tag 12, 18, 24, 30, 40 und 45 nach der OP analysiert.

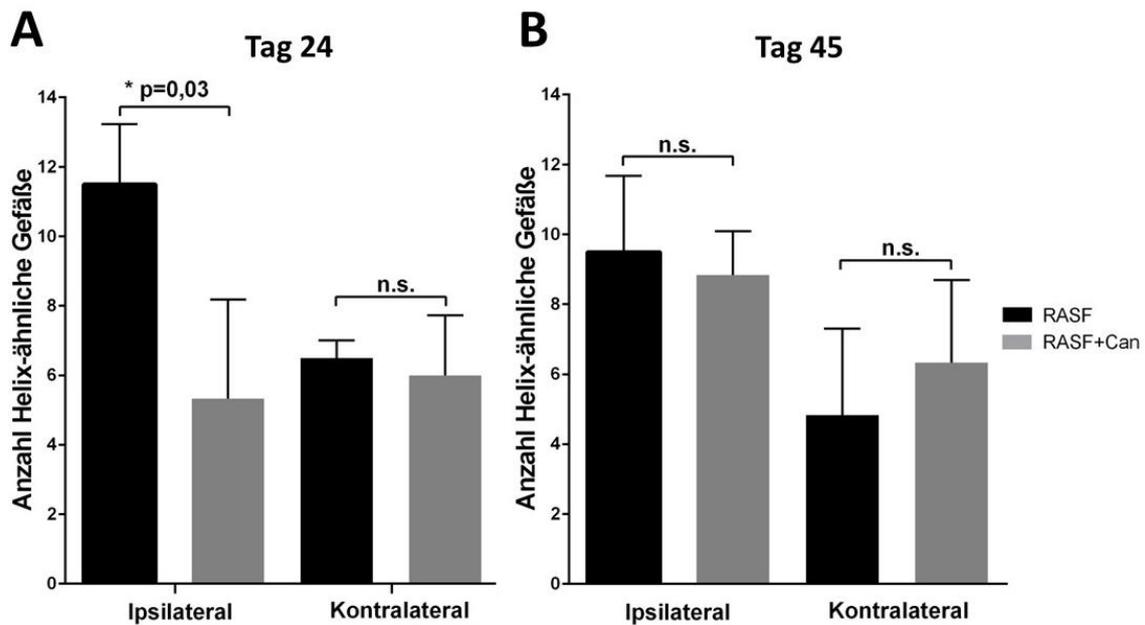
#### 5.4.6.1 Canstatin-Effekt auf die Helix-ähnlichen Gefäße

Zunächst wurde die RASF-vermittelte Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße an Tag 3 nach der OP, dem frühesten Zeitpunkt, untersucht. Interessanterweise waren an Tag 3 in ipsilateralen Implantaten unter Einfluss von Canstatin im Vergleich zu ipsilateralen Implantaten, die kein Canstatin enthielten, signifikant weniger Helix-ähnliche Gefäße zu beobachten (Abbildung 47, A). Unter Einfluss von Canstatin reduzierte sich die Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße signifikant von  $8,2 \pm 1,0$  auf  $2,8 \pm 0,5$  Helix-ähnliche Gefäße ( $p = 0,03$ ) (Abbildung 47, A und B). Insgesamt war keine allgemeine Reduktion der Gefäßneubildung zu beobachten. Allerdings war die Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße nur an den ipsilateralen Implantaten signifikant reduziert, da die kontralateralen Implantate mit Canstatin keinen Unterschied in der Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße im Vergleich zu kontralateralen Implantaten ohne Canstatin zeigten ( $4,0 \pm 1,5$  vs.  $3,3 \pm 0,9$  Helix-ähnliche Gefäße) (Abbildung 47, B).



**Abbildung 47:** Einfluss von Canstatin auf die RASF-induzierten Helix-ähnlichen Gefäße im SCID-Maus-Modell der RA nach 3 Tagen. (A) Zahlreiche Helix-ähnliche Gefäße waren in ipsilateralen (I) und kontralateralen (K) Implantaten vorhanden, die kein Canstatin enthielten. Unter Canstatin-Behandlung war die Anzahl der Helix-ähnliche Gefäße ipsilateral deutlich reduziert (schwarze Pfeile: Helix-ähnliche Gefäße). (B) Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße. Die Helix-ähnlichen Gefäße wurden an Tag 3 nach der OP unter Einfluss mit und ohne Canstatin quantifiziert. Pro Zeitpunkt wurde die Gefäßneubildung in 6 Mäusen aus drei Experimenten mit RASF aus 3 unterschiedlichen RA-Patienten analysiert. Für die statistischen Analysen wurde der H-Test nach Kruskal und Wallis durchgeführt und die Dunn's-Multiparameter-Korrektur angewendet. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet, n.s.: nicht signifikant ( $n = 3$ ).

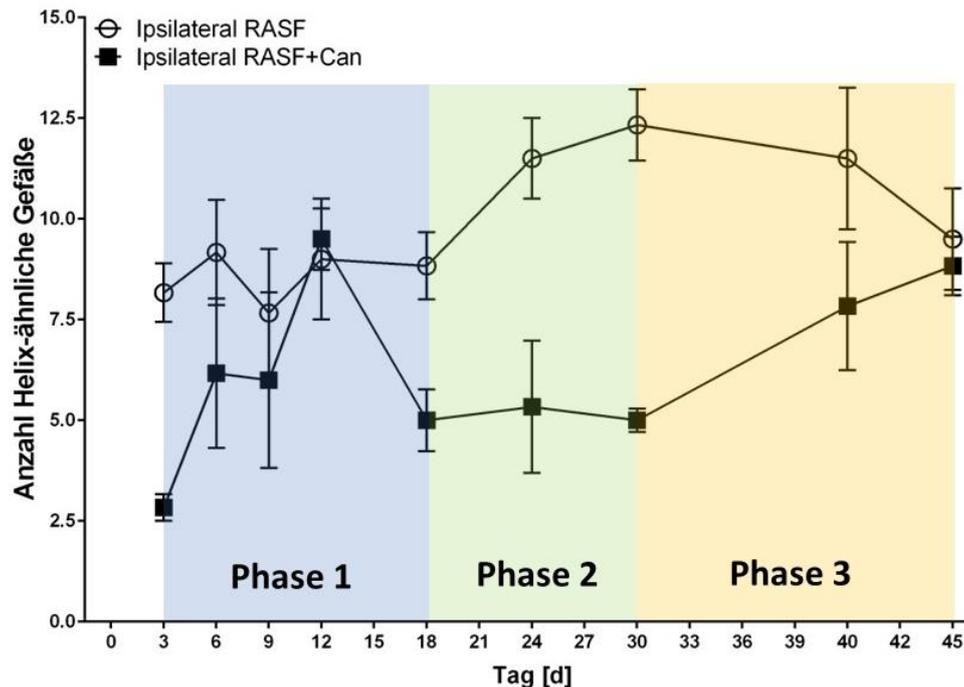
Auch nach ungefähr der Hälfte des untersuchten Zeitraumes an Tag 24 war ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße in den ipsilateralen Implantaten unter Einfluss von Canstatin zu erkennen. Ipsilaterale Implantate enthielten im Mittel  $11,5 \pm 1,4$  Helix-ähnliche Gefäße, während bei ipsilateralen Implantaten mit Canstatin im Mittel  $5,3 \pm 2,3$  Helix-ähnliche Gefäße identifiziert werden konnten ( $p = 0,03$ ) (Abbildung 48, A). Die kontralateralen Implantate zeigten wie auch schon an Tag 3 keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße unter Einfluss von Canstatin ( $6,5 \pm 0,4$  vs.  $5 \pm 1,4$ ) Helix-ähnliche Gefäße) (Abbildung 48, A). Interessanterweise war an Tag 45 kein signifikanter Unterschied mehr in der Anzahl der Helix-ähnlichen zwischen den ipsilateralen Implantaten mit und ohne Canstatin erkennbar (Abbildung 48, B). In den ipsilateralen Implantaten waren im Mittel  $9,5 \pm 1,8$  Helix-ähnliche Gefäße enthalten, während in ipsilateralen Implantaten mit Canstatin im Mittel  $8,8 \pm 1,0$  Helix-ähnliche Gefäße evaluiert wurden (Abbildung 48, B).



**Abbildung 48:** Einfluss von Canstatin auf die RASF-induzierten Helix-ähnlichen Gefäße im SCID-Maus-Modell der RA in ipsilateralen und kontralateralen Implantaten nach 24 (A) und 45 Tagen (B). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße. Die Helix-ähnlichen Gefäße wurden an Tag 24 und 45 nach der OP unter Einfluss mit und ohne Canstatin (Can) quantifiziert. Pro Zeitpunkt wurde die Gefäßneubildung in 6 Mäusen aus drei Experimenten mit RASF aus 3 unterschiedlichen RA-Patienten analysiert. Für die statistischen Analysen wurde der H-Test nach Kruskal und Wallis durchgeführt und die Dunn’s-Multiparameter-Korrektur angewendet. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet, n.s.: nicht signifikant ( $n = 3$ ).

Weiterhin wurde der Verlauf der Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße unter Einfluss von Canstatin über den gesamten Zeitraum von 3 bis 45 Tagen in den ipsilateralen Implantaten evaluiert und mit dem Verlauf der Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße in den ipsilateralen Implantaten ohne Einfluss von Canstatin anhand der in Kapitel 5.1.1 beschriebenen Phasen 1-3 verglichen (Abbildung 49). Es konnte gezeigt werden, dass in Phase 1 der Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße (Tag 3 bis 18) zwischen Tag 3 und 9 weniger Helix-ähnliche Gefäße in den Implantaten mit Canstatin vorhanden waren im Vergleich zu ipsilateralen Implantaten ohne Canstatin. Allerdings stieg die Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße unter Einfluss von Canstatin in Phase 1 stärker an im Vergleich zu den Implantaten ohne Canstatin (Abbildung 49). An Tag 12 war die Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße in den Implantaten mit und ohne Canstatin nahezu ausgeglichen ( $9,0 \pm 2,1$  vs.  $9,5 \pm 1,1$  Helix-ähnliche Gefäße). Interessanterweise kam es ab Tag 12 während der gesamten Phase 2 der Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße (Tag 18 bis 30) in den Implantaten mit Canstatin zu einem Rückgang der Helix-ähnlichen Gefäße auf im Mittel  $5,0 \pm 1,1$  Helix-ähnliche Gefäße und blieb während der gesamten Phase 1 auf diesem Level. Im Gegensatz dazu stieg die Anzahl der Helix-ähnlichen

Gefäße in ipsilateralen Implantaten ohne Canstatin während Phase 2 bis Tag 30 auf eine Anzahl von im Mittel  $12,3 \pm 1,3$  Helix-ähnliche Gefäße an (Abbildung 49). Während Phase 3 der Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße (Tag 30 – 45) kam es bis Tag 45 schließlich wieder zu einer Zunahme der Helix-ähnlichen Gefäße in den ipsilateralen Implantaten mit Canstatin auf im Mittel  $8,8 \pm 1,0$  Helix-ähnliche Gefäße, während die Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße in den ipsilateralen Implantaten ohne Canstatin bis Tag 45 abnahm (Abbildung 49).

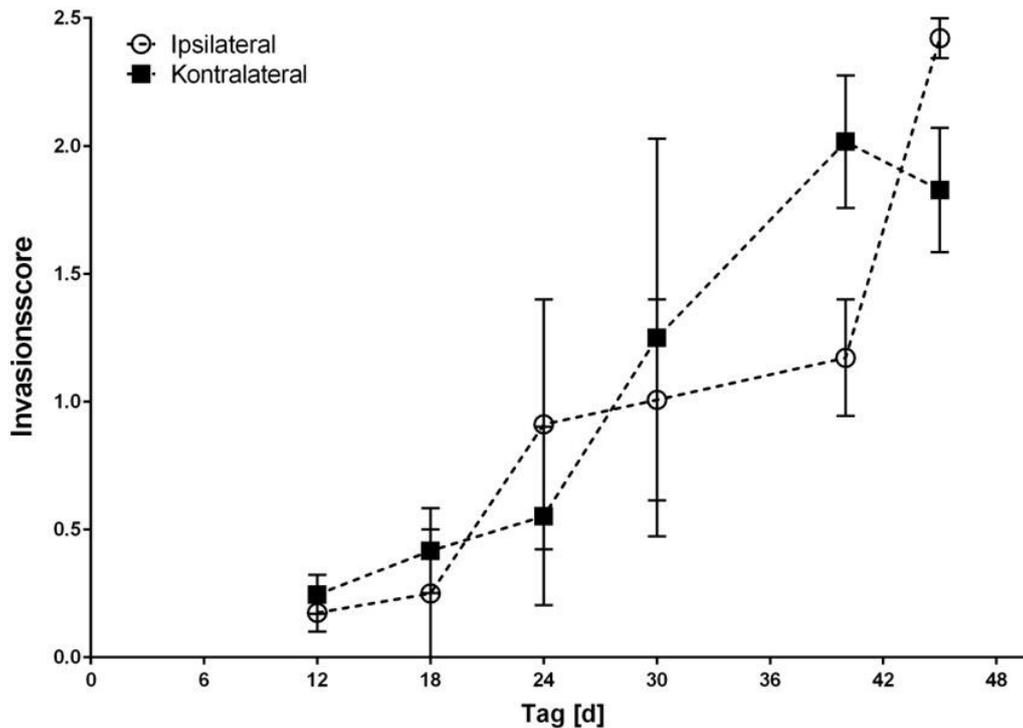


**Abbildung 49:** Kinetik der RASF-vermittelten Entstehung von Helix-ähnlichen Gefäßen in einem Zeitraum von 45 Tagen unter Einfluss von Canstatin. Dargestellt ist der Mittelwert ( $\pm$ SEM) der Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße in ipsilateralen Implantaten mit und ohne Canstatin. Die Helix-ähnlichen Gefäße wurden an Tag 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 40 und 45 nach der OP quantifiziert. Pro Zeitpunkt wurde die Gefäßneubildung in 6 Mäusen aus drei Experimenten mit RASF aus 3 unterschiedlichen RA-Patienten analysiert. ○ Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße an ipsilateralen Implantaten, die kein Canstatin enthielten; ■ Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße an ipsilateralen Implantaten unter Einfluss von Canstatin.

#### 5.4.6.2 Canstatin-vermittelter Einfluss auf die Invasion

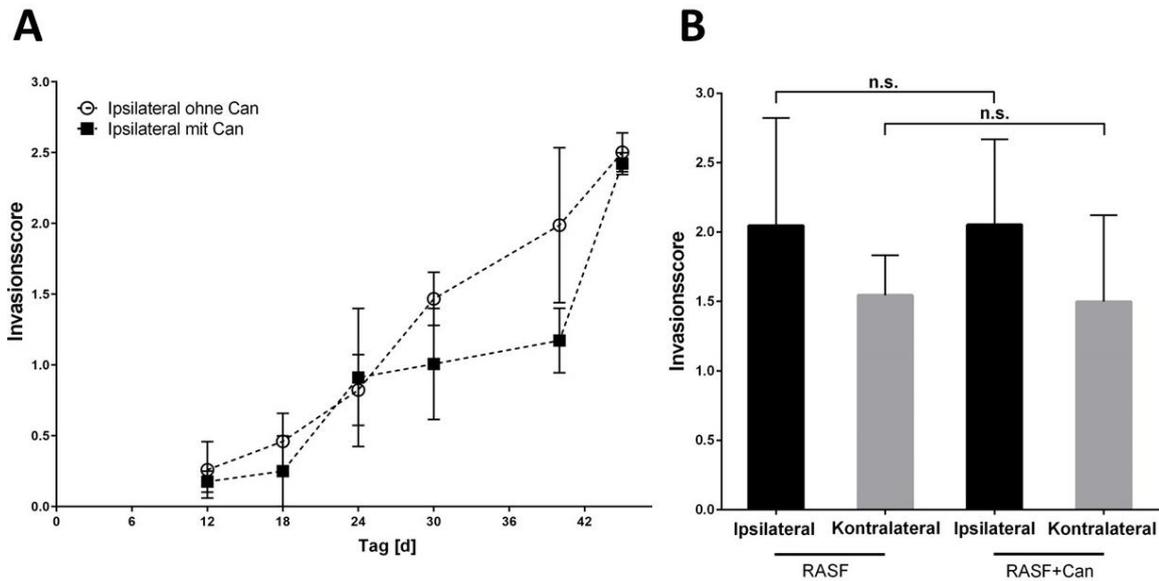
Nachdem gezeigt werden konnte, dass Canstatin signifikant die Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße in den ipsilateralen Implantaten reduzierte und einen Einfluss auf die in Kapitel 5.1.1 beschriebene Kinetik der RASF-induzierten Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße hatte, wurde im nächsten Schritt auch der Canstatin-vermittelte Einfluss auf die Invasion der RASF in den Knorpel in einem Zeitraum von Tag 12-45 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Invasion in ipsilaterale und kontralaterale Knorpel unter Einfluss eine ähnliche Kinetik zu ipsilateralen und kontralateralen Knorpeln ohne Einfluss von Canstatin

aufwiesen (Abbildung 50). Die Invasion wurde an Tag 12 initiiert, wobei die Scores bei  $0,2 \pm 0,1$  bzw.  $0,3 \pm 0,1$  lagen. Ipsilateral stieg die Invasion bis Tag 24 auf im Mittel  $0,9 \pm 0,5$  an und nahm bis Tag 45 auf im Mittel  $2,4 \pm 0,1$  zu. Kontralateral setzte die Invasion etwas zeitverzögert und stieg bis Tag 40 auf im Mittel  $2,0 \pm 0,2$  an. An Tag 45 nahm die Invasion in den kontralateralen Implantaten leicht ab ( $1,8 \pm 0,2$ ) (Abbildung 50).



**Abbildung 50:** Kinetik der Invasion der RASF in den Knorpel im SCID-Maus-Modell der RA in einem Zeitraum von 12-45 Tagen unter Einfluss von Canstatin. Die Invasion in den Knorpel wurde an Tag 12, 18, 24, 30, 40 und 45 Tage nach der OP unter Einfluss von Canstatin quantifiziert. Pro Zeitpunkt wurde die Invasion von jeweils 4 Mäusen ( $n = 2$ ) evaluiert. Dargestellt ist der Mittelwert inkl. Standardabweichung der Invasion aus jeweils 4 Mäusen ( $n = 2$ ). Die Invasion wurde ipsilateral und kontralateral ab Tag 12 initiiert und steigerte sich bis Tag 45, wobei die Steigerung in kontralaterale Knorpel zeitverzögert erfolgte. ○ Invasion der RASF in ipsilaterale Knorpel; ■ Invasion der RASF in kontralaterale Knorpel, jeweils unter Einfluss von Canstatin.

Im direkten Vergleich der RASF-Invasion in die ipsilateralen Knorpel unter Einfluss von Canstatin mit der Invasion der RASF in die ipsilateralen Knorpel ohne Einfluss von Canstatin über einen Zeitraum von 12 bis 45 Tage nach der OP konnte demonstriert werden, dass Canstatin keinen Einfluss auf die Kinetik der RASF-Invasion hatte (Abbildung 51, A). Auch an Tag 45 zeigten sich keine Unterschiede in der Invasion zwischen Knorpel, die Canstatin enthielten und Knorpel, die nicht unter Einfluss von Canstatin waren (Abbildung 51, B).

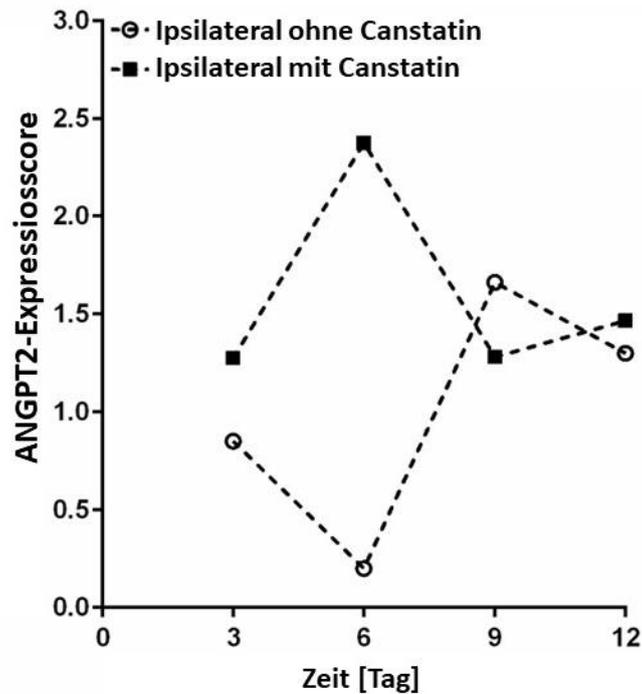


**Abbildung 51:** Kinetik der Invasion der RASF in ipsilaterale Knorpel im SCID-Maus-Modell der RA in einem Zeitraum von 12-45 Tagen mit und ohne Einfluss von Canstatin. Die Invasion in den Knorpel wurde an Tag 12, 18, 24, 30, 40 und 45 Tage nach der OP mit und ohne Einfluss von Canstatin (Can) quantifiziert. Pro Zeitpunkt wurde die Invasion von jeweils 4 Mäusen aus 2 Tierserien evaluiert. (A) Dargestellt ist der Mittelwert inkl. Standardabweichung der Invasion aus jeweils 4 Mäusen (n = 2). Die Kinetik der Invasion der RASF unter Einfluss von Canstatin war vergleichbar mit der Invasion der RASF ohne Einfluss von Canstatin. ○ Invasion der RASF in ipsilaterale Knorpel ohne Canstatin; ■ Invasion der RASF in ipsilaterale Knorpel unter Einfluss von Canstatin. (B) Die Invasion der RASF wurde an Tag 45 nach der OP mit und ohne Canstatin quantifiziert. Pro Zeitpunkt wurde die Invasion der RASF in 6 Mäusen aus drei Experimenten mit RASF aus 3 unterschiedlichen RA-Patienten analysiert. Pro Maus wurden jeweils 1-2 Knorpel ipsilateral und kontralateral evaluiert. Die statistischen Analysen wurden mit dem H-Test nach Kruskal und Wallis durchgeführt und die Dunn’s-Multiparameter-Korrektur angewendet, n.s.: nicht signifikant (n = 3).

#### 5.4.6.3 Canstatin-vermittelter Einfluss auf Angiopoietin-2 in den SCID-Maus-Implantaten

Da bereits gezeigt werden konnte, dass ANGPT2 in ipsilateralen und kontralateralen Implantaten unterschiedlich exprimiert wird (Kapitel 5.4.1) und Canstatin einen signifikanten Einfluss auf die Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße in ipsilateralen Implantaten hat (Kapitel 5.4.6.1), sollte in diesem Zusammenhang untersucht werden, ob der Canstatin-vermittelte Effekt in den ipsilateralen Implantaten auch ANGPT2 beeinflusst. Hierfür wurde von Mäusen, denen Canstatin implantiert wurde (Kapitel 4.4.5), serielle Schnitte von ipsilateralen Implantaten angefertigt und eine ANGPT2- sowie eine CD31-Färbung als Kontrolle an Tag 3, 6, 9 und 12 durchgeführt. Für die Evaluation wurde ein quantitativer Score angewendet, der in Kapitel 4.5.4.2 beschrieben ist. Der direkte Vergleich mit der ANGPT2-Expression in ipsilateralen Implantaten von Mäusen, die kein Canstatin erhielten, zeigte, dass ANGPT2 unter Einfluss von Canstatin an Tag 3 und 6 stärker exprimiert war als in ipsilateralen Implantaten, die kein Canstatin enthielten (Abbildung 52). An Tag 9 und 12 war die ANGPT2-

Expression unter beiden Bedingungen nahezu identisch (Abbildung 52). Allerdings wurde bis zur Fertigstellung der vorliegenden Dissertation lediglich eine Tierserie mit 1-2 Mäusen pro Zeitpunkt evaluiert, sodass abschließend keine statistische Analyse durchgeführt werden konnte.



**Abbildung 52:** Angiopoietin-2 unter Einfluss von Canstatin in ipsilateralen SCID-Maus-Implantaten. Dargestellt ist die ANGPT2-Expression im SCID-Maus-Modell der RA in einem Zeitraum von 3-12 Tagen mit und ohne Einfluss von Canstatin. Die ANGPT2-Expression war unter Einfluss von Canstatin an Tag 3 und 6 stärker im Vergleich zu Implantaten, die kein Canstatin enthielten. Pro Zeitpunkt wurde die ANGPT2-Expression in ipsilateralen Implantaten mit und ohne Canstatin von jeweils 1-2 Mäusen evaluiert. Zusätzlich wurde für die Evaluation eine CD31-Färbung der EZ durchgeführt. Folgender Score wurde für die Quantifizierung der ANGPT2-Expression in den Blutgefäßen angewendet: 0 = ANGPT2-negativ; 1 = ANGPT2-positiv, CD31-Färbung überwiegt; 2 = ANGPT2-positiv, ANGPT2-Signal identisch zu CD31; 3 = ANGPT2-positiv, ANGPT2-Signal überwiegt CD31-Färbung. ○ ANGPT2-Expression in ipsilateralen Implantaten ohne Canstatin; ■ ANGPT2-Expression in ipsilateralen Implantaten unter Einfluss von Canstatin.

## 6. DISKUSSION

In der vorliegenden Dissertation konnten die funktionellen sowie molekularen Effekte der RASF-vermittelten Interaktionen mit den EZ in Bezug auf die RASF-induzierten Helix-ähnlichen Gefäße im SCID-Maus-Modell der RA charakterisiert werden. Des Weiteren wurden erstmals Änderungen im Expressionsprofil von wiederholt aktivierten RASF bezüglich der Gefäßneubildung aufgezeigt und Gene identifiziert, die direkt in die pathologische Gefäßneubildung der RA involviert sein könnten. Die vorliegende Dissertation demonstriert weiterhin einen neuen Therapieansatz zur Auflösung der RASF-induzierten veränderten Gefäßneubildung im Kontext der RA und rückt mit Canstatin ein bislang wenig bekanntes Molekül in den Fokus.

Die Angiogenese stellt bereits in frühen Stadien der RA ein sehr wichtiges Ereignis im Kontext der pathologischen synovialen Hyperplasie sowie der Bildung eines aggressiven Pannus dar (MacDonald et al. 2018; Zhang et al. 2017). Durch die Entstehung zahlreicher neuer diffuser Blutgefäße mit veränderter Struktur wird der Leukozyteneinstrom in das Synovium erleichtert und so maßgeblich die Aufrechterhaltung des inflammatorischen Milieus mit einhergehender Destruktion von Knorpel und Knochen begünstigt (siehe Kapitel 1.4.2). Im chronisch entzündlichen Milieu des Synoviums von RA-Patienten haben neben den Makrophagen vor allem chronisch aktivierte RASF durch spezifische Interaktionen mit den EZ einen erheblichen Einfluss auf die pathologische Gefäßneubildung (Chen et al. 2019). Aus diesem Grund lag in der vorliegenden Dissertation der Fokus auf der Analyse der RASF/EZ-Interaktionen. Hier stand die Analyse des zeitlichen Verlaufs der Entstehung von Helix-ähnlichen Gefäßen im SCID-Maus-Modell der RA und dem Zusammenhang mit der RASF-vermittelten Invasion im Vordergrund. Der Einfluss der RASF auf die EZ sollte zu verschiedenen Zeitpunkten funktionell sowie molekular *in vivo* und *in vitro* untersucht werden.

Ein weiterer wichtiger Punkt war die Analyse der Effekte von Matrixfragmenten auf die RASF/EZ-Interaktionen. Hierfür wurden Analysen *in vitro* sowie bezüglich der Matrixfragment-abhängigen Inhibierung der RASF-vermittelten Entstehung Helix-ähnlicher Gefäße im SCID-Maus-Modell der RA untersucht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation liefern Aufschlüsse über die funktionellen und molekularen Mechanismen der RASF-vermittelten Interaktionen mit den EZ in Bezug auf die pathologische Gefäßneubildung in der RA und identifizieren Ansatzpunkte für neue

Therapiestrategien, die die RASF-vermittelte pathologische Gefäßneubildung inhibieren und so ergänzend zur anti-entzündlichen Behandlung einen therapeutischen Ansatz zur Hemmung der veränderten Gefäßneubildung im Gelenk bei der RA bieten.

### 6.1 Kinetik der RASF-vermittelten Entstehung von Helix-ähnlichen Gefäßen im SCID-Maus-Modell der RA

Untersuchungen in dieser Arbeitsgruppe zeigten, dass die RASF im SCID-Maus-Modell der RA vom ipsilateralen Implantat über das Blutssystem zum kontralateralen Implantat migrierten und dort bis Tag 45 nach der Implantation sowohl in den ipsilateralen als auch in den kontralateralen Knorpel invadierten (Lefèvre et al. 2009). Gleichzeitig kam es an den Implantaten zur Entstehung von Helix-ähnliche Gefäßen, was auf eine spezifische Interaktion der RASF mit den EZ schließen lässt (Zimmermann 2011). Im ersten Schritt der vorliegenden Dissertation sollte daher der zeitliche Ablauf der Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße beschrieben und der Zusammenhang mit der RASF-vermittelten Invasion analysiert werden.

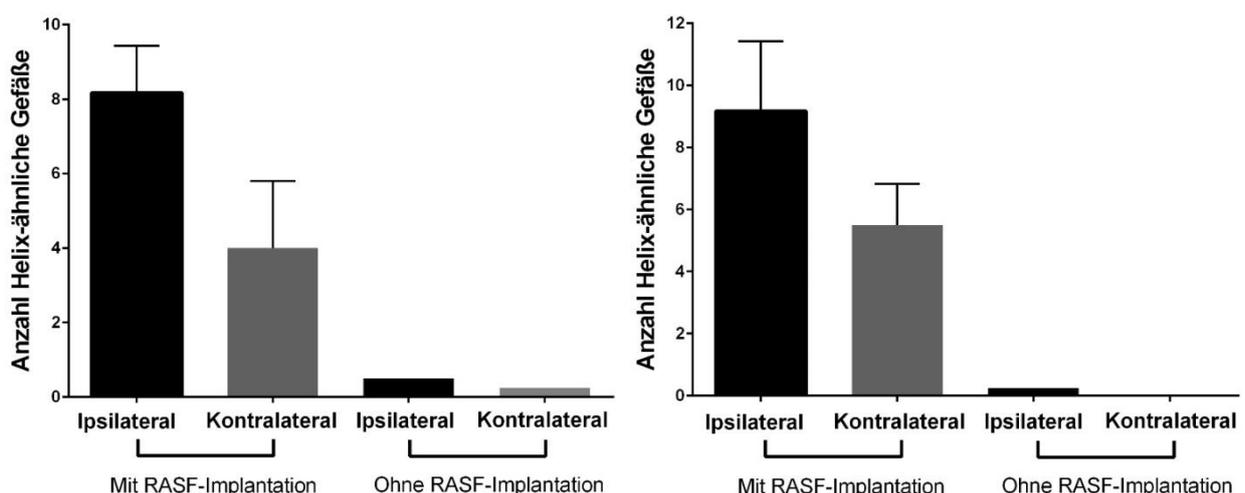
#### 6.1.1 RASF induzieren spezifisch Helix-ähnliche Gefäße im SCID-Maus-Modell der RA über einen Zeitraum von 3 bis 45 Tagen

In der vorliegenden Dissertation konnte erstmals der zeitliche Verlauf der Entstehung der RASF-vermittelten Helix-ähnlichen Gefäße charakterisiert werden. In den in Kapitel 5.1 beschriebenen Ergebnissen konnte demonstriert werden, dass die Helix-ähnlichen Gefäße von Tag 3 bis Tag 45 nach der OP in ipsilateralen und kontralateralen Implantaten auftraten, wobei in den ipsilateralen Implantaten über den gesamten Zeitverlauf mehr Helix-ähnliche Gefäße vorhanden waren. Basierend auf diesen Ergebnissen ließ sich die Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße in 3 Phasen einteilen:

- Phase 1 (Tag 3-12 nach der OP): Frühe Phase der RASF-vermittelten Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße im Kontext der Angiogenese
- Phase 2 (Tag 12-30 nach der OP): Anreicherung der Helix-ähnlichen Gefäße im Kontext der Arteriogenese
- Phase 3 (Tag 30-45 nach der OP): Reduktion der Anreicherung der Helix-ähnlichen Gefäße

Während Phase 1 kam es bereits von Tag 3 bis 18 nach RASF-Implantation zur Entstehung zahlreicher Helix-ähnlicher Gefäße in ipsilateralen und kontralateralen Implantaten. Ein Ansatzpunkt für die Erklärung der Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße war die Analyse der

Gefäßstruktur. In der Literatur lassen sich Hinweise auf das Auftreten von Gefäßen mit Helix-ähnlicher Struktur im Kontext der Wundheilung finden (Rege et al. 2012; Chong et al. 2017). Diese Assoziation ist deshalb interessant, da Fibroblasten als Wundheilungszellen eine wichtige Rolle spielen (Kapitel 1.3.1). In der Studie von Chong *et al.* wurden Mäusen an den Ohren kleine Wunden induziert und die Wundheilung über 39 Tage quantifiziert (Chong et al. 2017). Mit dieser Studie von Chong *et al.* konnte demonstriert werden, dass Helix-ähnliche Gefäße in Folge der in die Wundheilung involvierte Angiogenese schon nach 3 Tagen in der Nähe der Wunde auftraten (Chong et al. 2017). Allerdings wurden in der vorliegenden Dissertation die Helix-ähnlichen Gefäße nicht in der Nähe der subkutanen Einschnitte in die Haut, sondern direkt am Implantat identifiziert. Für die RASF-Implantation wurde eine subkutane Tasche präpariert, in welche die Implantate geschoben wurden. Aus diesem Grund waren die subkutanen Einschnitte und die Implantate voneinander räumlich entfernt, sodass im Gegensatz zur Studie von Chong *et al.* kein Bezug zwischen Auftreten der Helix-ähnlichen Gefäße und der Wundheilung hergestellt werden kann. Für eine RASF-spezifische Induktion der Helix-ähnlichen Gefäße ohne direkten Bezug zur Wundheilung in Folge der Gewebsverletzung spricht auch, dass nach Implantation ohne RASF keine Helix-ähnlichen Gefäße identifiziert werden konnten (Abbildung 53).



**Abbildung 53:** Anzahl Helix-ähnlicher Gefäße an Tag 3 (links) und Tag 6 (rechts) nach der OP. Dargestellt ist der Mittelwert inkl. Standardabweichung der Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße in ipsilateralen und kontralateralen Implantaten an Tag 3 mit ( $n = 3$ ) und ohne RASF-Implantation ( $n = 1$ ). Nach RASF-Implantation waren mehr Helix-ähnliche Gefäße vorhanden im Vergleich zur Implantation ohne RASF.

In der Literatur lassen sich insbesondere in Bezug auf die pathologische Gefäßneubildung Hinweise darüber finden, dass Gefäße mit Helix-ähnlichen Strukturen auch im Kontext anderer Erkrankungen auftreten. Ein Beispiel hierfür sind Erkrankungen der Herzkranzgefäße und peripheren Arterien, bei denen es zur Reifung von pathologischen Kollateralgefäßen mit Helix-ähnlicher Struktur kommt (Faber et al. 2014; Nishijima et al. 2015; Ginsberg 2018; Schaper 2009). Beispielsweise in Folge eines arteriellen Verschlusses werden bereits existierende, schwach durchblutete Kollateralgefäße stärker durchblutet und die EZ werden in Folge des veränderten Drucks durch den erhöhten Blutfluss in den Kollateralen aktiviert. Die Aktivierung der EZ bewirkt schließlich die Reifung der Kollateralgefäße mit einer Helix-ähnlichen Struktur (Schirmer et al. 2009). Im Gegensatz zu normalen arteriellen Gefäßen weisen pathologische Kollateralgefäße eine korkenzieherartige gewundene Gefäßform auf, die große Ähnlichkeiten mit den Helix-ähnlichen Strukturen der veränderten Gefäße im RA-Synovium, aber auch mit den Helix-ähnlichen Gefäßen nach der RASF-Implantation ins SCID-Maus-Modell der RA, zeigen. Vergleicht man die Kollateralgefäße aus der Literatur mit dem Auftreten der Helix-ähnlichen Gefäße bereits 3 Tage nach der RASF-Implantation in der vorliegenden Dissertation, fällt auf, dass Kollateralgefäße in der Literatur erst 6-16 Wochen nach Induktion analysiert wurden (Zhang et al. 2019; Cai et al. 2004). Dies könnte damit zu begründen sein, dass die Entstehung der Kollateralgefäße auf dem Prozess der Arteriogenese basiert und somit voraussetzt, dass bereits Blutgefäße bestehen müssen, die dann in Folge pathologischer Modifikationen eine Helix-ähnliche Struktur entwickeln. Da es sich bei den Kollateralen von Zhang *et al.* wie auch bei den Helix-ähnlichen Gefäßen in der vorliegenden Dissertation um sehr kleine Blutgefäße aus der Maus mit einem Durchmesser von ca. 30 µm handelte, könnte möglicherweise die Kinetik der Entstehung der Kollateralen bzw. der Helix-ähnlichen Gefäße vergleichbar sein (Zhang et al. 2019). Aus diesem Grund wäre zu erwarten gewesen, dass sich während Phase 1 neue Gefäße im Kontext der Angiogenese an den Implantaten bilden, diese jedoch erst in Phase 2 oder 3 in Folge von arteriellen Umstrukturierungen Helix-ähnliche Strukturen ausbilden. Eine Erklärung für die Ausbildung von Helix-ähnlichen Gefäßen bereits vor bzw. während Phase 1 könnte sein, dass RASF ein verändertes Expressionsprofil aufweisen und Faktoren wie beispielsweise VEGF verstärkt exprimieren (Ospelt et al. 2017). In der Literatur wurde beschrieben, dass VEGF-A überexprimierende Mäuse zwischen Tag 13,5 und 14,5 der Embryogenese mehr Kollateralgefäße bildeten im Vergleich zu Mäusen, die reduziert VEGF-A exprimierten (Lucitti et al. 2012). Demzufolge könnte die verstärkte VEGF-Expression

der RASF einen positiven Effekt auf die Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße haben und die Entstehung vielleicht sogar beschleunigen.

Während Phase 2 der Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße konnte eine Zunahme der Helix-ähnlichen Gefäße zwischen Tag 24 und 30 in den ipsilateralen sowie zwischen Tag 12 und 40 in den kontralateralen Implantaten beobachtet werden. Möglicherweise modifizierten die aktivierten RASF die während Phase 1 entstandenen Gefäße weiter zu Kollateralgefäßen, wodurch es zum verstärkten Anstieg der Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße in Phase 2 kam. In Phase 3 der Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße kam es ab Tag 30 in den ipsilateralen und ab Tag 40 in den kontralateralen Implantaten zu einem Rückgang der Helix-ähnlichen Gefäße. Der zeitversetzte Anstieg und Rückgang der Helix-ähnlichen Gefäße lässt sich mit der zeitversetzten Migration und Invasion der RASF ins kontralaterale Implantat erklären, da die RASF zunächst vom ipsilateralen zum kontralateralen Implantat migrieren müssen (Lefèvre et al. 2009). Dies könnte bedeuten, dass der RASF-vermittelte Einfluss auf die Gefäßneubildung im kontralateralen Implantat zeitverzögert startet und deshalb länger anhält. Allerdings konnte in der vorliegenden Dissertation keine zeitversetzte Invasion der RASF ins kontralaterale Implantat beobachtet werden (Abbildung 26). An Tag 18 waren sowohl ipsilateral als auch kontralateral RASF invadiert, wobei die RASF kontralateral stärker invadiert waren. Erst an Tag 45 war erstmalig eine stärkere RASF-Invasion in das ipsilaterale Implantat feststellbar. Dieses Ergebnis war unerwartet, da basierend auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe erwartet wurde, dass die kontralaterale RASF-Invasion erst ab Tag 24 sichtbar und die ipsilaterale RASF-Invasion bis Tag 60 stärker ausgeprägt ist (Zimmermann 2011). Vergleicht man die Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäßen mit der RASF-Invasion in ipsilateralen Implantaten, fällt auf, dass zwischen Tag 18 und 40 eine ähnliche Kinetik zu beobachten ist, da in diesem Zeitraum sowohl die Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße als auch die RASF-Invasion zunahm. Hier scheint folglich ein Zusammenhang zwischen Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße und der Invasion zu bestehen. Dieser Zusammenhang zwischen Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße und RASF-Invasion war allerdings in den kontralateralen Implantaten nicht erkennbar, da zwischen Tag 18 und 40 die Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße weniger stark zunahm, die Invasion jedoch stärker ausgeprägt war im Vergleich zu ipsilateral. Eine Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse könnte sein, dass auf Grund der zeitversetzten Migration bis Tag 18 immer noch weniger RASF kontralateral als ipsilateral vorhanden waren und deshalb trotz gestarteter Invasion weniger Helix-ähnliche Gefäße

entstanden. Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass bei Abgabe der vorliegenden Dissertation die Invasions-Daten auf 2 Tierserien mit unterschiedlichen RASF zweier Patienten ( $n = 2$ ) basieren und deshalb abschließend keine statistischen Analysen durchgeführt werden konnten.

### 6.1.2 Die Rolle von ANGPT2 in der RA-vermittelten veränderten Gefäßneubildung

Um herauszufinden, ob die Helix-ähnlichen Gefäße nicht nur strukturell vergleichbar mit Kollateralgefäßen sind, sondern auch über ähnliche molekulare Mechanismen entstehen, war es notwendig, die Helix-ähnlichen Gefäße auf molekularer Ebene zu analysieren. Interessanterweise wurde in der Literatur für die pathologisch-induzierten Kollateralgefäße ein signifikant verändertes Expressionsprofil demonstriert (Zhang et al. 2019). In der Literatur zeigen erste Analysen der Kollateralgefäße auf molekularer Ebene, dass Kollateralgefäße im Vergleich zu normalen arteriellen Gefäßen unter anderem verstärkt ANGPT2 exprimieren und somit ein spezifisches Expressionsprofil aufweisen (Zhang et al. 2019).

Mit den SCID-Maus-Experimenten konnte gezeigt werden, dass an Tag 3 bis 12 ANGPT2 ipsilateral und kontralateral nachweisbar war. Dieses Ergebnis demonstriert, dass nach RASF-Implantation in die SCID-Mäuse ANGPT2 in den Blutgefäßen an den Implantaten genau wie in den murinen Kollateralgefäßen aus der Studie von Zhang *et al.* nachgewiesen werden konnte (Zhang et al. 2019). In der Studie von Zhang *et al.* wurden murine Kollateralgefäße untersucht, die ca. 4 Monate gereift waren und das Expressionsprofil der Kollateralgefäße mit dem von normalen arteriellen Gefäßen verglichen (Zhang et al. 2019). In der vorliegenden Dissertation wurde allerdings die ANGPT2-Expression in maximal 3-12 Tage alten Blutgefäßen analysiert, was eine erhebliche zeitliche Differenz zur Studie von Zhang *et al.* in Hinblick auf die verschiedenen Stadien der Blutgefäßbildung im Rahmen der Arteriogenese darstellt. Die Entstehung von Kollateralgefäßen erfolgt im Kontext der Arteriogenese. Zunächst kommt es zur Proliferation des Endotheliums, gefolgt von der Mitose der glatten Muskelzellen. Anschließend findet eine Phase der Umstrukturierung statt, indem Gewebe abgebaut wird und die vaskulären glatten Muskelzellen Lumen des neuen arteriellen Gefäßes bilden (siehe Kapitel 1.4.1 und 1.4.2) (Rizzi et al. 2017). Um Aufschluss über die ANGPT2-Expression in diesen frühen Stadien der Blutgefäßbildung zu bekommen, standen deshalb in der vorliegenden Arbeit die frühen Zeitpunkte im Fokus. Es konnte gezeigt werden, dass an Tag 3 und 6 mehr ANGPT2 in den kontralateralen als in den ipsilateralen Implantaten vorhanden

war. An Tag 9 und 12 war dieser Unterschied nicht mehr messbar. Dieser Effekt könnte mit der zeitversetzten Kinetik der Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße in ipsilateralen und kontralateralen Implantaten erklärt werden. An Tag 3 waren zwar sowohl ipsilateral als auch kontralateral Helix-ähnliche Gefäße vorhanden, jedoch wurden kontralateral weniger Helixgefäße identifiziert, da dort die Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße möglicherweise auf Grund der zeitversetzten RASF-Migration später begann (Lefèvre et al. 2009). Dies könnte bedeuten, dass die Prozesse zur arteriellen Gefäßneubildung, beispielsweise die Proliferation des Endotheliums und die Umstrukturierung, kontralateral später starteten und aus diesem Grund an Tag 3 und 6 ANGPT2 kontralateral stärker als ipsilateral exprimiert wurde. Folglich scheint ANGPT2 in den unterschiedlichen Phasen der Gefäßneubildung unterschiedlich reguliert zu sein. Für diese Hypothese spricht auch, dass an Tag 9 und 12 keine Unterschiede in der ANGPT2-Expression mehr messbar waren. Dies könnte bedeuten, dass sich ab Tag 9 das durch die zeitversetzte RASF-Migration entstandene Ungleichgewicht angeglichen haben könnte. In der Literatur sind keine Hinweise auf ANGPT2-Expressionsanalysen zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu finden, sodass die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation nicht mit anderen Studien verglichen werden können. Allerdings ist von ANGPT2 bekannt, dass es besonders bei der Destabilisierung von Blutgefäßen von Blutgefäßen eine entscheidende Rolle spielt (Lekas et al. 2012). Die Destabilisierung von Blutgefäßen stellt einen sehr frühen Zeitpunkt bei der Gefäßneubildung dar, weshalb sich die in der vorliegenden Dissertation beobachtete erhöhte ANGPT2-Expression an Tag 3 und 6 mit diesem Prozess erklären lassen könnte.

Weiterhin deuten die in der vorliegenden Dissertation gezeigten Ergebnisse zur ANGPT2-Expression in den SCID-Maus-Implantaten auch auf eine spezifische Rolle von ANGPT2 in der RA hin. Um dies zu klären, wurde eine ANGPT2-Färbung im humanen Synovium von RA- und OA-Patienten durchgeführt und miteinander verglichen. ANGPT2 war signifikant stärker im RA- als in OA-Synovium exprimiert, was für eine Rolle von ANGPT2 in der RA spricht. Dieses Ergebnis zeigt aber auch, dass ANGPT2 nicht nur in die frühe Phase der Gefäßneubildung involviert ist. Das analysierte Synovialgewebe beider Patientengruppen stammte aus Kniegelenken, die im Rahmen von Gelenkersatzoperationen entfernt wurden. Das bedeutet, dass die zahlreichen pathologischen Prozesse, die an der veränderten Gefäßneubildung beteiligt waren, teilweise seit Jahren bestanden und als langfristige Effekte auf die Gefäßneubildung wirkten. Folglich wäre es möglich, dass ANGPT2 ein Marker für die

Identifikation von langfristigen Gefäßveränderungen darstellt. ANGPT2 und VEGF induzieren synergistisch pro-angiogene und inflammatorische Mechanismen, die über den Notch-Signalweg im entzündeten RA-Gelenk vermittelt werden und so zur veränderten Gefäßneubildung im RA-Synovium beitragen (Gao et al. 2013). Es wäre möglich, dass ein langfristig bestehender Synergismus zwischen ANGPT2 und VEGF im RA-Gelenk zur Entstehung von veränderten Blutgefäßen mit Helix-ähnlicher Struktur beiträgt. Allerdings lassen sich in der Literatur auch zwei Studien finden, die belegen, dass ANGPT2 im Serum von RA-Patienten hochreguliert war, die eine Assoziation zu kardiovaskulären Erkrankungen aufwiesen (Westra et al. 2011; López-Mejías et al. 2013). Demzufolge kann abschließend nicht geklärt werden, ob ANGPT2 ein spezifischer Marker für die Gefäßveränderungen bei der RA ist.

## 6.2 Funktioneller Einfluss der RASF auf die Endothelzellen bezüglich der Gefäßneubildung *in vitro*

Nach der Analyse der RASF/EZ-Interaktionen im SCID-Maus-Modell der RA wurde im nächsten Schritt die RASF/EZ-Interaktionen funktionell im Tube-Formation-Experiment *in vitro* untersucht. In den in Kapitel 5.2 dargestellten Ergebnissen konnte im Tube-Formation-Experiment gezeigt werden, dass die RASF die Gefäßneubildung *in vitro* auch kurzfristig bereits nach 4 bzw. 8 h beeinflussten, da nach Zugabe der RASF zu den HUVEC die Tubedicke signifikant reduziert war. Interessant hierbei war, dass keine RASF außerhalb des Zellnetzwerkes zu finden waren und die RASF scheinbar an der Ausbildung der Tubes beteiligt waren, indem sie sich an die HUVEC anlagerten.

Diese Beobachtungen stimmen mit einer Studie von Yamaguchi *et al.* überein, die zeigen konnte, dass VEGF-aktivierte RASF VE-Cadherin hochregulieren und Tube-ähnliche Strukturen ausbilden (Yamaguchi et al. 2019). VE-Cadherin wird unter nicht-pathologischen Bedingungen von den EZ während der Gefäßneubildung exprimiert und ist in die Regulierung der vaskulären Permeabilität involviert. Allerdings zeigt eine Studie, dass die VE-Cadherin-Expression von nicht-endothelialen Zellen unter pathologischen Bedingungen zur Ausbildung von Gefäßen in malignen Tumoren beiträgt (Seftor et al. 2012). Hier könnte ein direkter Zusammenhang mit der RA bestehen, da RASF ähnliche Eigenschaften aufweisen, wie ein erhöhtes Potenzial zur Migration und Invasion, was auch charakteristisch für die Tumorbildung ist (Bottini und Firestein 2013). Da in dem Medium, das für die Tube-Formation-Experimente der

vorliegenden Arbeit verwendet wurde, VEGF enthalten war, könnte dies dazu geführt haben, dass die RASF VE-Cadherin hochregulierten und so bei der Ausbildung des Zellnetzwerkes beteiligt waren. Allerdings war die Ausbildung des Zellnetzwerkes durch Zugabe der RASF verändert, indem signifikant die Tubedicke reduziert war. VE-Cadherin könnte bei der RASF-vermittelten Reduktion der Tubedicke im Tube-Formation-Experiment somit ebenfalls eine wesentliche Rolle spielen. RASF exprimieren auch in Kultur ohne zusätzliche Stimulierung verstärkt Wachstumsfaktoren und pro-inflammatorische Zytokine wie bFGF und IL-6 (Bartok und Firestein 2010). In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass bFGF und IL-6 signifikant die Expression von VE-Cadherin in HUVEC reduzieren (Wu et al. 2008; Kayakabe et al. 2012). Dieser Prozess bewirkt, dass die Zell-Zell-Interaktionen zwischen den EZ gestört wird und sich die Zellverbindungen vermutlich durch Internalisierung von VE-Cadherin auflösen (Kayakabe et al. 2012). Aus diesem Grund könnte postuliert werden, dass die RASF-vermittelte Sekretion von bFGF und IL-6 im Tube-Formation-Experiment die VE-Cadherin-Expression der HUVEC reduzierte und es folglich zur Reduktion der Tubedicke kam, da sich die Zellverbindungen unter Einfluss der RASF zwischen den HUVEC auflösten. Um diese Hypothese abschließend zu klären, wäre allerdings ein Nachweis für die RASF-vermittelte Reduktion von VE-Cadherin im Tube-Formation-Experiment, beispielsweise über Analyse der VE-Cadherin-Genexpression oder Immunzytochemie, notwendig.

Auch im Synovium von RA-Patienten kommt es bedingt durch die chronischen Entzündungsprozesse zu einem Anstieg der VEGF-Konzentration, wodurch die Gefäßneubildung angeregt wird. Dieser Anstieg der VEGF-Konzentration könnte auch im humanen Synovium dazu führen, dass die RASF VE-Cadherin hochregulieren und so nicht nur indirekt über die Sekretion von pro-inflammatorischer und pro-angiogener Moleküle die Gefäßneubildung beeinflussen, sondern auch funktionell über direkte VE-Cadherin-vermittelte Interaktion mit den EZ aktiv an der Gefäßneubildung beteiligt sind und diese verändern. Die direkte Interaktion der RASF mit den EZ im Kontext der Gefäßneubildung im SCID-Maus-Modell der RA konnte bereits in vorherigen Studien dieser Arbeitsgruppe gezeigt werden. Das Milieu innerhalb der Blutgefäße induzierte CD15s in den RASF, wodurch es ihnen möglich war, über E-Selektin an die EZ zu binden und darüber, ähnlich wie Leukozyten, das Gefäßsystem zu verlassen (Zimmermann-Geller et al. 2019). Folglich lässt sich basierend auf den *in vitro*-Ergebnissen zur RASF-vermittelten Reduktion der Tubedicke die Hypothese aufstellen, dass die RASF durch die Interaktion mit den EZ die Gefäßstruktur verändern, indem

möglicherweise über die Internalisierung von VE-Cadherin die Dicke der Gefäßwand reduziert wird, was zur Ausbildung von pathologischen Gefäßen mit Helix-ähnlichen Gefäßen beitragen könnte.

Der RASF-vermittelte Einfluss auf die Gefäßneubildung konnte auch im 3D Sphäroid-basierten Sprout-Experiment demonstriert werden (Kapitel 5.2.2). Nach Zugabe der RASF zu den HUVEC sprossen signifikant mehr HUVEC aus dem Sphäroid im Vergleich zu Sphäroiden, die keine RASF enthielten. Eine mögliche Erklärung dafür könnte auch hier sein, dass RASF verstärkt pro-angiogene Faktoren wie VEGF exprimieren (Smolen et al. 2016; Kim et al. 2020). Als pro-angiogener Faktor stimuliert VEGF die Proliferation und Migration von EZ, sodass die RASF-vermittelte VEGF-Sekretion das verstärkte Aussprossen der HUVEC bewirkt haben könnte. Überträgt man diesen Effekt auf die im SCID-Maus-Modell beobachteten RASF-vermittelte Veränderungen in der Angiogenese, könnte dies ein Hinweis dafür sein, warum bereits nach 3 Tagen Helix-ähnliche Gefäße auftraten. Die RASF-vermittelte verstärkte VEGF-Sekretion könnte hier dazu beigetragen haben, dass die Prozesse der Gefäßneubildung beschleunigt wurden. Diese Hypothese setzt jedoch voraus, dass die RASF auch ohne direkten Zellkontakt die EZ und somit die Gefäßneubildung beeinflussen können. In weiteren Analysen der Arbeitsgruppe wurde in dem Tube-Formation-Experiment statt der RASF konditioniertes Medium von RASF verwendet. Nach 4-stündiger Inkubation war ein Ausdünnen des Zellnetzwerkes feststellbar wie auch nach der Zugabe der RASF (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis zeigt, dass die von den RASF sezernierten Faktoren das Zellnetzwerk veränderten und der direkte Zellkontakt nicht notwendig ist.

### 6.3 Regulierung der Gefäßregulatoren ANGPT2, VEGF, EFNB2 und eNOS unter Einfluss der RASF im Tube-Formation-Experiment

Nachdem in den SCID-Maus-Implantaten und im humanen RA-Synovium eine veränderte ANGPT2-Expression nachgewiesen werden konnte (Kapitel 5.1.3), wurde im nächsten Schritt untersucht, ob der Einfluss der RASF auf die EZ auch in kurzfristigen *in vitro*-Experimenten anhand veränderter Expression von Gefäßregulatoren nachweisbar ist. Hierfür wurden im Anschluss an die Tube-Formation-Experimente nach 4 bzw. 8 h die Überstände gesammelt sowie die RNA aus den Tubes extrahiert und ANGPT2, aber auch andere Gefäßregulatoren wie VEGF, EFNB2 und eNOS untersucht.

### 6.3.1 Keine RASF-vermittelte Änderung in der Expression von VEGF-, EFNB2 und eNOS im Tube-Formation-Experiment

Die Messung der ANGPT2-Konzentration in den Überständen der Tube-Formation-Experimente nach 4 bzw. 8 h ergab, dass sich die ANGPT2-Sekretion unter Einfluss der RASF nicht änderte (Kapitel 5.3.1). Wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben, sezernieren RASF pro-inflammatorische Faktoren wie bFGF und VEGF (Smolen et al. 2016). VEGF und bFGF induzieren alleine, aber vor allem verstärkt in Kombination, eine bis zu 4-fach erhöhte ANGPT2-Expression in EZ (Mandriota und Pepper 1998). Demzufolge wäre auch eine erhöhte ANGPT2-Expression im Tube-Formation-Experiment nach Zugabe der RASF zu erwarten gewesen. Allerdings wurden die EZ in der Arbeit von Mandriota und Pepper mit VEGF und bFGF, allein oder in Kombination, über 15 h stimuliert (Mandriota und Pepper 1998), während in der vorliegenden Dissertation die ANGPT2-Expression *in vitro* nach 4 bzw. 8 h analysiert wurden. Weiterhin konnte in der vorliegenden Dissertation in den SCID-Maus-Implantaten und im humanen RA-Synovium eine Änderung in der ANGPT2-Expression gezeigt werden (Kapitel 5.1.3), was auch auf molekularer Ebene auf eine Ähnlichkeit der Helix-ähnlichen Gefäße mit den Kollateralgefäßen schließen lässt. Dies konnte jedoch in den kurzzeitigen *in vitro*-Experimenten nicht beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung könnte der Analyse-Zeitraum sein. Zhang *et al.* stellte eine erhöhte ANGPT2-Expression in reifen Kollateralgefäßen nach einer Entwicklungszeit von 3-4 Monaten in Mäusen fest (Zhang et al. 2019). In der vorliegenden Dissertation wurde die ANGPT2-Expression bereits nach 4 bzw. 8 h gemessen. Dies könnte bedeuten, dass eine Änderung der ANGPT2-Expression möglicherweise noch nicht nach 4 bzw. 8 h feststellbar ist und somit nicht als Marker geeignet ist, um RASF-vermittelte pathologische Gefäßveränderungen nach kurzfristigen Zeitpunkten über wenige Stunden zu identifizieren. Mit Hilfe des Tube-Formation-Experiments kann zwar die Lumen- und Tubebildung simuliert werden, wichtige Prozesse wie die Gefäßreifung sowie -umstrukturierung in Folge der arteriellen Kollateralgefäßreifung können jedoch nicht abgebildet werden. Da aus der Literatur bekannt ist, dass ANGPT2 in diese Prozesse involviert ist (Gale et al. 2002; Lekas et al. 2012), kann möglicherweise mit dem Tube-Formation-Experiment keine RASF-vermittelte Änderung von ANGPT2 im Kontext der Gefäßneubildung identifiziert werden.

Die Analyse der VEGF-Sekretion im Tube-Formation-Experiment nach 4 bzw. 8 h unter Einfluss der RASF zeigte wie ANGPT2 keine RASF-vermittelten Änderungen. Dies steht im Widerspruch

zu den aus der Literatur bekannten Daten. So ist die VEGF-Expression im Serum und in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten in einigen Studien deutlich erhöht und stellt einen entscheidenden Faktor in der Pathogenese der RA dar (Lee et al. 2001; Yoo et al. 2008). An der erhöhten VEGF-Expression im pathologischen Milieu im Synovium von RA-Patienten sind maßgeblich RASF beteiligt, die verstärkt pro-angiogene Faktoren wie VEGF sezernieren und so die Bildung neuer Blutgefäße fördern (Kim et al. 2020; Smolen et al. 2016). Somit wäre zu erwarten gewesen, dass die VEGF-Expression unter Einfluss der RASF im Tube-Formation-Experiment erhöht worden wäre. In der Studie von Kim *et al.* wurde eine verstärkte VEGF-Sekretion im Serum von 157 RA-Patienten festgestellt, von denen 103 Patienten eine moderate oder hohe Krankheitsaktivität zeigten (Kim et al. 2020). Dies bedeutet, dass zahlreiche inflammatorische Prozesse schon über einen langen Zeitraum bestehen. Im Gegensatz dazu wurde jedoch in der vorliegenden Dissertation die VEGF-Sekretion nur über einen 4- bzw. 8-stündigen Zeitraum evaluiert. Da in den Co-Kultur-Experimenten der vorliegenden Dissertation 15% RASF eingesetzt wurden, waren pro Well weniger als 2000 RASF vorhanden, was möglicherweise in Kombination mit den kurzzeitigen Inkubationszeiten nicht ausreichend war, um RASF-vermittelte Änderungen in der VEGF-Sekretion zu erfassen. Weitere Probleme bei der Messung der VEGF-Sekretion in der vorliegenden Dissertation waren auch, dass in dem für das Tube-Formation-Experiment verwendete Medium ebenfalls VEGF vorhanden war, um die HUVEC zur Tube-Bildung anzuregen und das experimentelle Format zudem sehr klein war, sodass nur kleine Volumina mit ungünstigem Zell/Volumen-Verhältnis aufgrund des Kammeraufbaus für die Messungen zur Verfügung standen. Um diese Problematiken zu umgehen, wäre eine Messung der VEGF-Expression in Zelllysaten notwendig gewesen. Allerdings ergab bereits die RNA-Sequenzierungsanalyse der repetitiv aktivierten RASF (Kapitel 5.3.2), dass weder Gene des VEGF-Signalweges (Abbildung 37) noch die VEGF-Expression (Daten nicht gezeigt) von der repetitiven Aktivierung der RASF beeinflusst wurden. Demzufolge wäre es möglich, dass es zusätzlich einen VEGF-unabhängigen Prozess im Kontext der RASF-vermittelten veränderten Gefäßneubildung geben könnte und aus diesem Grund keine veränderte VEGF-Sekretion im Tube-Formation-Experiment unter Einfluss der RASF festgestellt werden konnte.

Auch EFN2 und eNOS zeigten keine veränderte Expression auf Gen- und Proteinebene unter Einfluss der RASF nach 4 bzw. 8 h. Die Studie von Zhang *et al.* konnte bezüglich der Charakterisierung der Kollateralgefäße zeigen, dass EFN2 und eNOS verstärkt in den

Kollateralgefäßen im Vergleich zu gesunden Arterien exprimiert wird (Zhang et al. 2019). Allerdings wurde dieser Unterschied nach Reifung von murinen Kollateralgefäße nach 3-4 Monaten festgestellt. Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Dissertation im Tube-Formation-Experiment bereits nach 4 bzw. 8 h die Konzentrationen von EFNB2 und eNOS gemessen, was eine erhebliche zeitliche Differenz darstellt. Möglicherweise war dieser Zeitraum zu kurz gewählt, um RASF-vermittelte Änderungen der EFNB2- und eNOS-Expression identifizieren zu können. In Bezug auf EFNB2 wurde in der Studie von Zhang *et al.* zwar eine erhöhte EFNB2-Expression in den Kollateralgefäßen festgestellt, allerdings war der Unterschied knapp nicht signifikant, sodass noch nicht vollständig geklärt ist, ob und welche Rolle EFNB2 in der Entstehung von Kollateralgefäßen und somit auch bei Helix-ähnlichen Gefäßen spielt (Zhang et al. 2019). Aus der Literatur ist auch bekannt, dass EFNB2 im Kontext der Gefäßneubildung verstärkt in den Spitzen-Zellen exprimiert wird (Pitulescu und Adams 2010). Folglich exprimieren im Verhältnis zu den Stiel-Zellen nur sehr wenig EZ bei der Gefäßneubildung EFNB2, sodass ein Unterschied in der Expression nur sehr schwer quantifiziert werden kann, insbesondere nach einem kurzen Zeitraum wie 4 bzw. 8 h. Um dennoch einen Eindruck über die EFNB2-Expression unter Einfluss der RASF zu bekommen, wurde die EFNB2-Expression auch auf Proteinebene untersucht und eine immunzytometrische EFNB2-Färbung der Tube-Bildung nach 4 bzw. 8 h durchgeführt. Auch hier konnte keine Änderung der EFNB2-Expression festgestellt werden, sodass geschlussfolgert werden kann, dass die in der vorliegenden Dissertation verwendeten kurzfristigen Zeitpunkte von 4 und 8 h noch zu keiner RASF-vermittelten EFNB2-Expression führten und für weitere Analysen längere Zeitpunkte gewählt werden müssten. Ob EFNB2 eine spezifische Rolle bei der RASF-induzierten veränderten Gefäßneubildung spielt, z.B. in den genannten Spitzen-Zellen bei der Gefäßneubildung, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. In Bezug auf eNOS gibt es abgesehen von der Studie von Zhang *et al.* in der Literatur weitere Hinweise dafür, dass eNOS spezifisch bei der Entstehung der Kollateralgefäße hochreguliert wird. Die Studie von Cai *et al.* beschreibt eine über 6-fache Hochregulierung von eNOS im Endothelium wachsender Kollateralgefäßen im Vergleich zu normalen arteriellen Gefäßen. Interessanterweise war diese Hochregulierung nach Reifung der Kollateralgefäße wieder aufgehoben. Die eNOS-Expression wurde 6-8 Wochen nach Auslösen eines arteriellen Verschlusses in Hundeherzen gemessen (Cai et al. 2004). Diese Daten postulieren, dass eNOS auch in den Helix-ähnlichen Gefäßen verstärkt reguliert werden

müsste, insbesondere während der ersten Phase der Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße. Allerdings wurde die eNOS-Expression in der vorliegenden Dissertation nur in den *in vitro*-Experimenten zur Gefäßneubildung nach 4 und 8 h analysiert, während die Studie von Zhang *et al.* und Cai *et al.* erst eine verstärkte eNOS-Expression in 6-16 Wochen gereiften Kollateralgefäßen gemessen haben (Zhang *et al.* 2019; Cai *et al.* 2004) Die kurzfristigen Zeitpunkte reichen entsprechend wie bei EFNB2 vermutlich nicht aus, um eine Aussage über einen Einfluss der RASF auf die eNOS-Expression zu treffen. Aufschluss könnte hier eine immunhistochemische eNOS-Färbung der Gefäße in den SCID-Maus-Implantaten geben.

#### 6.4 Gewöhnung der RASF an die repetitive Aktivierung

Zur Klärung der Frage, welchen Einfluss entzündliche Schübe auf die RASF insbesondere im Kontext der Aktivierbarkeit und der Gefäßneubildung haben, wurde in der vorliegenden Dissertation ein Stimulierungsschema etabliert, bei dem gezeigt werden konnte, dass RASF in Folge wiederholter Aktivierung mit IL-1 $\beta$  signifikant weniger IL-6 sezernieren im Vergleich zu einmalig aktivierten RASF. Dieser Effekt wurde als „Gewöhnung“ der RASF an den pro-inflammatorischen Stimulus bezeichnet. In der Literatur lassen sich einige Studien finden, die einen ähnlichen Effekt, beispielsweise bei Makrophagen, zeigen, die eine Toleranz gegenüber Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte TLR-Immunantwort entwickeln und nach wiederholter Aktivierung mit LPS weniger pro-inflammatorische Gene exprimieren. Die LPS-Toleranz beruht auf Änderungen in der Signalweiterleitung sowie epigenetischen Modifikationen, welche die Induktion pro-inflammatorischer Genen unterdrücken (Biswas und Lopez-Collazo 2009; Seeley und Ghosh 2013; Foster *et al.* 2007; Foster und Medzhitov 2009).

Allerdings beschreiben die Studien von Friščić *et al.* und Crowley *et al.*, dass synoviale Fibroblasten nach zweimaliger Stimulierung mit TNF $\alpha$  signifikant mehr IL-6 im Vergleich zu einmalig stimulierten synovialen Fibroblasten sezernieren und somit kein Gewöhnungseffekt eintritt (Friščić *et al.* 2021; Crowley *et al.* 2017). Diese Beobachtungen stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation, da hier bereits nach der zweimaligen Stimulierung der RASF eine Reduktion der IL-6-Sekretion erkennbar war. Ein Ansatzpunkt für die widersprüchlichen Ergebnisse könnten die verwendeten Stimulierungsschemata sein. In den Studien von Friščić *et al.* und Crowley *et al.* wurden die synovialen Fibroblasten für 24 h mit TNF $\alpha$  stimuliert, anschließend erhielten die synovialen Fibroblasten eine Erholungsphase von 24 h ohne Stimulierung, bevor sie ein zweites Mal mit TNF $\alpha$  stimuliert wurden (Crowley

et al. 2017; Friščić et al. 2021). Im Gegensatz dazu steht das für die vorliegende Dissertation etablierte Stimulierungsschema, bei dem die RASF dreimal für jeweils 16 h mit IL-1 $\beta$  stimuliert wurden und dazwischen jeweils eine Erholungszeit von 8 h erhielten (Kapitel 4.2.4). Um die Frage nach dem Einfluss des Stimulierungsschemas zu beantworten, wurde in der vorliegenden Dissertation ein Ansatz mit dreimaliger TNF $\alpha$ -Stimulierung der RASF nach dem Stimulierungsschema der vorliegenden Dissertation durchgeführt (siehe Anhang: Abbildung 54). Es konnte gezeigt werden, dass die wiederholte Stimulierung der RASF mit TNF $\alpha$  nach der dreimaligen Stimulierung eine leichte Steigerung der IL-6-Sekretion im Vergleich zur ersten Stimulierung zeigte. Ein Gewöhnungseffekt an die wiederholte TNF $\alpha$ -Stimulierung mit einer reduzierten IL-6-Induktion konnte hingegen für TNF $\alpha$  nicht festgestellt werden. Dies bedeutet zum einen, dass sowohl das Stimulierungsschema als auch das für die Stimulierung verwendete Zytokin einen Einfluss auf die Reaktion der RASF in Folge der wiederholten Stimulierung haben könnte. Da im Gegensatz zu der repetitiven Stimulierung mit IL-1 $\beta$  kein TNF $\alpha$ -vermittelter Gewöhnungseffekt mit dem Stimulierungsschema der vorliegenden Dissertation beobachtet werden konnte, wird postuliert, dass der beschriebene IL-6-Gewöhnungseffekt in Folge der wiederholten Aktivierung mit IL-1 $\beta$  spezifisch über die IL-1 $\beta$ -vermittelte Signalweiterleitung reguliert wird. Diese Hypothese wird auch von den Daten bestätigt, die im Rahmen des Projektes der vorliegenden Dissertation betreuten medizinischen Doktorarbeit generiert wurden. Im Rahmen der medizinischen Doktorarbeit konnte funktionell im Tube-Formation-Experiment gezeigt werden, dass nach Zugabe von einmalig stimulierten RASF zu den HUVEC die Fläche des Zellnetzwerkes im Vergleich zu unstimulierten RASF signifikant reduziert war und dieser Effekt nach Zugabe von dreimalig stimulierten RASF vollständig aufgehoben wurde (Abstract: Heck et al. 2023). Dies demonstrierte erstmalig, dass die wiederholte Aktivierung der RASF auch einen signifikanten Einfluss auf die funktionellen Interaktionen mit den EZ im Kontext der Gefäßneubildung hat.

#### 6.4.1 RASF veränderten ihr Expressionsprofil in Folge wiederholter Aktivierung

Die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung von wiederholt aktivierten RASF ergaben, dass die wiederholte Aktivierung nicht nur Einfluss auf Protein-, sondern auch auf Genexpressionsebene hatte. Es konnte gezeigt werden, dass nach wiederholter Aktivierung der RASF Gene von Signalwegen differenziell exprimiert waren, die beispielsweise mit Autoimmunerkrankungen, vaskulären Erkrankungen, aber auch Erkrankungen, die das

Immunsystem betreffen, assoziiert waren (Kapitel 5.3.2). Interessanterweise ergab die weitere Analyse, dass in Folge der wiederholten RASF-Aktivierung zwar Gene des TNF-Signalwegs signifikant unterschiedlich reguliert waren, es jedoch keine signifikanten Unterschiede im NF- $\kappa$ B-assoziierten Signalweg gab. Dieses Ergebnis war überraschend, da NF- $\kappa$ B über eine negative Rückkopplungsschleife mit dessen Inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  pro-inflammatorischen Stimuli entgegen wirkt und anti-inflammatorische Mechanismen auslöst, um die Entzündung zu regulieren (van Loo und Beyaert 2011). Pro-inflammatorische Stimuli bewirken den Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$ , wodurch NF- $\kappa$ B frei in den Zellkern wandert und die Transkription pro-inflammatorischer Mediatorgene fördern kann. Weiterhin transkribiert NF- $\kappa$ B auch das Gen NF- $\kappa$ B-Inhibitor- $\alpha$ , welches für I $\kappa$ B $\alpha$  kodiert und NF- $\kappa$ B wieder aus dem Zellkern transportiert. Somit wird NF- $\kappa$ B inaktiviert und dem pro-inflammatorischen Stimulus entgegengewirkt (van Loo und Beyaert 2011; Ruland 2011). In der Studie von Crowley *et al.* wurde NF- $\kappa$ B als möglicher Regulator identifiziert, der eine Rolle bei dem Priming von RASF in Folge wiederholter TNF $\alpha$ -Aktivierung spielen könnte (Crowley et al. 2017). Dies konnte mit den Studien der vorliegenden Dissertation nicht beobachtet werden. NF- $\kappa$ B scheint bei der veränderten Genexpression in Folge wiederholter IL-1 $\beta$ -Aktivierung keine Rolle zu spielen. Stattdessen scheint die Genexpression nach wiederholter IL-1 $\beta$ -Aktivierung vor allem über signifikant veränderte Gene des MAPK-Signalwegs verändert zu werden. Interessanterweise zeigte die RNA-Sequenzierungsanalyse der Signalwege auch, dass es keine signifikanten Änderungen in der Genexpression gab, die mit dem VEGF-Signalweg assoziiert sind. Dies bestätigen auch die Ergebnisse aus Kapitel 5.3.1, die zeigten, dass die VEGF-Sekretion der HUVEC unter Einfluss der RASF nicht verändert war. Folglich kann postuliert werden, dass VEGF nicht in Folge wiederholter RASF-Aktivierung verändert wird und bei der pathologischen Gefäßneubildung im Kontext der RA auch VEGF-unabhängige Prozesse eine Rolle spielen müssen.

Zur Analyse der Auswirkung der veränderten Signalweiterleitung auf die Genexpression wurde eine Subgruppenanalyse der Top 50 DEG durchgeführt (Kapitel 5.3.2.3). Die Subgruppenanalyse ergab, dass alle Top 50 DEG jeweils einer von drei Gruppen mit unterschiedlichem Expressionsprofil zugeordnet werden konnten (Abbildung 38). Gene der Gruppe 1 wiesen eine signifikante Induktion nach einmaliger Stimulierung der RASF sowie eine signifikant verringerte Induktion nach dreimaliger Stimulierung der RASF auf, was als Gewöhnung definiert wurde. Gene der Gruppe 2 und 3 zeigten keine Expressionsunterschiede zur Kontrolle

und keine veränderte Expression in Folge der Stimulierung. Interessanterweise gab es in den Top 50 DEG keine Gene, die ein Expressionsprofil mit einer signifikant gesteigerten Induktion nach dreimaliger im Vergleich zur einmaligen Stimulierung aufwiesen. Basierend auf den Ergebnissen der Studien von Friščić *et al.* und Crowley *et al.*, die eine Steigerung der IL-6-Sekretion in Folge zweimaliger Stimulierung der RASF mit TNF $\alpha$  für jeweils 24 h zeigen konnten (Friščić *et al.* 2021; Crowley *et al.* 2017), wäre zu erwarten gewesen, dass eine ähnliche Kinetik auch bei Genen der Top 50 DEG der vorliegenden Dissertation auftritt. Möglicherweise ist die Analyse begrenzt auf die Top 50 DEG nicht ausreichend, um alle Expressionsprofile erfassen zu können. Somit müsste die Analyse beispielsweise auf die Top 100 DEG ausgeweitet werden, um abschließend beurteilen zu können, ob Expressionskinetiken vergleichbar zur Studie von Friščić *et al.* und Crowley *et al.* vorhanden sind. Dies war jedoch nicht Ziel der vorliegenden Arbeit. Des Weiteren spielt auch hier, wie in Kapitel 6.4 beschrieben, die Diskussion zum verwendeten Zytokin sowie des Stimulierungsschemas eine Rolle. Beides könnte dazu beitragen, dass eine wiederholte IL-1 $\beta$ -Aktivierung der RASF zu einer signifikant verringerten Induktion der Genexpression nach dreimaliger Stimulierung führt, die in anderen Studien in dieser Form nicht beobachtet wurde.

In der vorliegenden Dissertation lag der Fokus auf Genen, die der Subgruppe mit dem Expressionsprofil der Gewöhnung zugeordnet werden konnten. Dazu gehören die fünf Gene STC1, BMP6, CXCL2, IL-11 sowie ELOVL7. Hier war insbesondere der Bezug zur Gefäßneubildung von Interesse, da Gene identifiziert werden sollten, die einen Einfluss auf die pathologische Gefäßneubildung in der RA haben. Die Literaturrecherche ergab, dass STC1 und BMP6 über VEGF die Gefäßneubildung regulieren (Law und Wong 2013; Pulkkinen *et al.* 2021). Da jedoch die Daten der RASF/EZ-Interaktionen und der RNA-Sequenzierung von repetitiv aktivierten RASF darauf schließen lassen, dass auch VEGF-unabhängige Prozesse bei der Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße eine Rolle zu spielen scheinen, wurden STC1 und BMP6 nicht weiter analysiert. ELOVL7 wurde ebenfalls von den weiteren Analysen ausgeschlossen, da in der Literatur keine Hinweise zu finden waren, dass ELOVL7 in den Prozess der Gefäßneubildung involviert ist.

Interessanterweise wurde in der Literatur für IL-11 und CXCL2 ein direkter Einfluss auf die EZ und somit auf die Gefäßneubildung beschrieben. IL-11 gehört zur IL-6-Familie der Zytokine und wird von verschiedenen Zelltypen wie Fibroblasten, Osteoblasten, EZ und Epithelzellen

sezerniert. IL-11 aktiviert den JAK/STAT und Pi3K/AKT/mTORC1 Signalwege (Du und Williams 1997). In Bezug auf die Gefäßneubildung und die RA konnte eine Publikation gefunden, die auf eine duale Rolle von IL-11 in der Pathogenese von RA hindeutet. IL-11 verstärkte die Infiltration sowohl synovialer Fibroblasten als auch der Blutgefäße ins hyperplastische RA-Synovium, indem IL-11 direkt an dessen endothelialen Rezeptor IL-11R $\alpha$  bindet (Elshabrawy et al. 2018). CXCL2 gehört zur Familie der CXC-Chemokine und wird ebenfalls von verschiedenen Zelltypen wie EZ, T-Lymphozyten und Mastzellen exprimiert. CXCL2 kann über dessen Rezeptor CXCR2 direkt mit den EZ interagieren und somit die Gefäßneubildung VEGF-unabhängig beeinflussen (Urbantat et al. 2021). In der Studie von Urbantat *et al.* konnte gezeigt werden, dass CXCL2 die Proliferation, Migration und Aussprossung von HUVEC anregte, während nach CXCR2-Blockade die Aussprossung der HUVEC reduziert war (Urbantat et al. 2021). IL-11 im Kontext der RASF-vermittelten veränderten Gefäßneubildung wurde in einer medizinischen Doktorarbeit, die im Rahmen der vorliegenden Dissertation betreut wurde, weiter analysiert und wurde daher in der vorliegenden Dissertation nicht weiter fokussiert. CXCL2 stand im Fokus der weiteren Analysen der vorliegenden Dissertation sowie einer nachfolgenden medizinischen Doktorarbeit.

#### 6.4.2 CXCL2 als potentieller Biomarker der RASF-vermittelten veränderten Gefäßneubildung

Die Daten aus der RNA-Sequenzierung der vorliegenden Dissertation demonstrieren, dass das Chemokin CXCL2 zu den TOP 50 DEG gehörte und eine Gewöhnung an die wiederholte IL-1 $\beta$ -Aktivierung der RASF zeigte. CXCL2 wird von Monozyten freigesetzt und kann über dessen Rezeptor CXCR2 direkt an die EZ binden (Urbantat et al. 2021), wodurch CXCL2 stark in den Fokus der weiteren Analysen rückte. Die CXCL2/CXCR2-vermittelte Signalweiterleitung spielt eine wesentliche Rolle in der Chemotaxis der Neutrophile und EZ, die bei der Entwicklung von Tumoren Angiogenese induziert, in dem CXCL2 die Proliferation und Migration von EZ fördert (Urbantat et al. 2021). Dies war ein erster Hinweis dafür, dass die RASF-vermittelte Sekretion von CXCL2 einen Einfluss auf die veränderte pathologische Gefäßneubildung in der RA haben könnte. Die RNA-Sequenzierungsdaten zeigten, dass CXCL2 nach einmaliger Stimulierung der RASF mit IL-1 $\beta$  signifikant stärker exprimiert wurde im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Dieses Ergebnis wurde erwartet, da aus der Literatur bereits die erhöhte CXCL2-Expression in Folge der Zytokin-induzierten Zellantwort bekannt ist (Burke et al. 2014; Reich et al. 2011). Interessanterweise kam es nach dreimaliger Stimulierung der RASF mit IL-1 $\beta$  zu einem

Gewöhnungseffekt der CXCL2-Expression, da hier im Vergleich zur einmaligen Stimulierung der RASF CXCL2 signifikant herunterreguliert war. Dieser Gewöhnungseffekt wurde auch schon für IL-6 beschrieben (siehe Kapitel 5.3.2.1).

Auch anhand der Analyse der CXCL2-Expression auf Proteinebene konnte ein signifikanter Gewöhnungseffekt der CXCL2-Expression beobachtet werden, sodass sich die Frage nach dem funktionellen Einfluss der repetitiven Stimulierung der RASF auf die Gefäßneubildung ergab. Die im Rahmen des Projektes der vorliegenden Dissertation betreute medizinische Doktorarbeit konnte demonstrieren, dass einmalig mit IL-1 $\beta$  stimulierte RASF signifikant verstärkt die Tube-Bildung im Tube-Formation-Experiment im Vergleich zu unstimulierten RASF störte. Interessanterweise wurde dieser Effekt nach dreimaliger Stimulierung der RASF aufgehoben (Abstract: Heck et al. 2023). Dies bestärkt die Hypothese, dass wiederholt aktivierte RASF beispielsweise über die veränderte Expression von CXCL2 einen direkten Einfluss auf pathologische Prozesse wie die veränderte Gefäßneubildung bei der RA haben könnten.

Bislang ist sehr wenig über CXCL2 als pro-angiogenes Chemokin im Kontext RA oder der RASF bekannt. Die weitere Literaturrecherche ergab, dass sich Stand heute (30.10.2023) weniger als 10 Studien mit den Zusammenhängen zwischen der RA und der Expression von CXCL2 beschäftigten, sodass im Rahmen der vorliegenden Dissertation ein neuer Ansatz zur Erklärung der spezifischen RASF-vermittelten veränderten Gefäßneubildung in der RA erbracht werden konnte. Eine interessante Studie von Reich *et al.* fand heraus, dass kleine Membran-Vesikel, die in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten akkumulieren, spezifisch die verstärkte Expression von CXCL2 und weiteren Mitgliedern der CXC-Familie in RASF induzierten, während andere Gefäßregulatoren in ihrer Expression nicht beeinflusst wurden (Reich et al. 2011). Dies lieferte einen Hinweis über eine potenzielle spezifische Rolle von CXCL2 in der pathologischen Gefäßneubildung in der RA unabhängig von VEGF. Einen wesentlichen Hinweis zum in der vorliegenden Dissertation beschriebenen Gewöhnungseffekt der CXCL2-Expression auf Proteinebene lieferte die Studie von Hogan *et al.*, die zeigen konnte, dass die CXCL2-Expression in RASF reduziert war im Vergleich zu Fibroblasten, die aus nicht-inflammatorischen oder OA-Synovien isoliert wurden (Hogan et al. 1994). Diese Studie stimmt somit nicht nur mit den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation überein, dass die wiederholte Aktivierung der RASF die CXCL2-Expression herunterregulierte, sondern belegt

außerdem, dass der in der vorliegenden Dissertation beschriebene CXCL2-Gewöhnungseffekt aus den *in vitro*-Experimenten möglicherweise auch auf die RA-Pathogenese im Patienten übertragen werden kann. Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation und aus der Literatur bekannten Daten wird postuliert, dass die Herunterregulierung der CXCL2-Expression in den RASF in Folge einer wiederholten Aktivierung einen erheblichen Einfluss auf die pathologische Gefäßneubildung in der RA hat.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation ein Folgeprojekt entwickelt, das im Rahmen einer medizinischen Doktorarbeit die Frage klären soll, wie sich der Einfluss von CXCL2 funktionell und auf molekularer Ebene in den *in vitro*-Angiogenese-Experimenten verhält und ob die verringerte CXCL2-Expression in Folge einer Antagonisierung die Gefäßneubildung verändert.

## 6.5 Einfluss der Matrixfragmente auf die RASF-vermittelte Interaktion mit den Endothelzellen

Matrixfragmente werden verstärkt in Folge der RASF-vermittelten Matrixdegradation im Kontext der Gefäßumstrukturierungen, aber auch während der Destruktion von Knorpel und Knochen freigesetzt. Diese Matrixfragmente wirken wiederum aktivierend auf die RASF (Lefèvre et al. 2017). Allerdings ist bislang nicht bekannt, welchen Effekt die einzelnen Matrixfragmente auf die RASF insbesondere im Zusammenhang mit der EZ-Interaktion und der Gefäßneubildung haben. Aus diesem Grund standen in der vorliegenden Dissertation vor allem anti-angiogene Matrixfragmente im Fokus, deren Einfluss auf die RASF/EZ-Interaktionen molekular und funktionell in Angiogenese-Experimenten untersucht wurde.

### 6.5.1 Effekte von Arresten, Tumstatin und Endostatin auf die RASF und die Gefäßneubildung

Die Kollagenfragmente Canstatin, Arresten, Tumstatin und Endostatin zeigten in den 4-stündigen Tube-Formation-Experimenten (Kapitel 5.4.2) keinen Einfluss auf die Gefäßneubildung, da die Tubedicke nicht signifikant reduziert war. Dieses Ergebnis war unerwartet, da sich in der Literatur einige Studien finden lassen, die einen inhibierenden Effekt von Arresten (Zhu et al. 2022; Colorado et al. 2000), Tumstatin (Li et al. 2014) und Endostatin (Burton et al. 2007; Xu et al. 2011; Bai et al. 2013; Urbich et al. 2002) auf die Tube-Bildung im Tube-Formation-Experiment beschreiben.

In der Literatur wurden die HUVEC im Tube-Formation-Experiment mit 20 µg/ml Arresten stimuliert und anschließend das Tube-Formation-Experiment für 12 h inkubiert (Zhu et al. 2022). Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Dissertation die HUVEC mit 0,1-1 µg/ml Arresten stimuliert, da in der Literatur Hinweise dafür gefunden wurden, dass Arresten bereits ab 0,1 µg/ml die EZ-Proliferation und ab 0,8 µg/ml die EZ-Migration beeinflusst (Lv und Zheng 2012; Nyberg et al. 2008). Arresten wurde in der vorliegenden Dissertation im Tube-Formation-Experiment für 4 h inkubiert, sodass sowohl die Menge der verwendeten Arresten-Konzentration als auch die Dauer der Inkubation des Tube-Formation-Experiments ursächlich für das Ausbleiben des anti-angiogenen Effekts im Tube-Formation-Experiment sein könnten. Möglicherweise wäre eine längere Inkubation des Tube-Formation-Experiments oder eine Vorstimulierung der HUVEC mit Arresten notwendig gewesen, um den anti-angiogenen Arresten-Effekt im Tube-Formation-Experiment zu zeigen. Für diese Hypothese spricht, dass insbesondere 0,5 µg/ml Arresten einen deutlichen Trend der Reduktion der Tubedicke bewirkte (Abbildung 41, A).

Tumstatin wurde in der vorliegenden Dissertation mit einer Konzentration von 1,0 µg/ml eingesetzt, da in der Literatur eine Studie gezeigt hat, dass 1,0 µg/ml Tumstatin nach 24-stündiger Stimulierung die Zellproliferation signifikant beeinflusste (Hwang-Bo et al. 2015). In der vorliegenden Dissertation wurden die HUVEC im Tube-Formation-Experiment jedoch nur für 4 h mit Tumstatin inkubiert, sodass dieser Zeitraum möglicherweise nicht ausreichend war und ähnlich wie bei Arresten eine längere Inkubation des Tube-Formation-Experimentes oder die Vorstimulierung der HUVEC mit Tumstatin notwendig gewesen wäre. Dafür spricht, dass Tumstatin in der vorliegenden Dissertation bereits nach 4 h einen deutlichen Trend bei der Reduktion der Tubedicke zeigte (Abbildung 41).

Für die Stimulierung mit Endostatin im Tube-Formation-Experiment wurden Konzentrationen von 0,25 und 0,5 µg/ml gewählt, da diese Konzentrationen vergleichbar mit den gemessenen physiologischen Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit und im Serum von RA-Patienten waren. Allerdings war Endostatin das einzige der 4 analysierten Matrixfragmente, das weder einen Trend bei der Reduktion der Tubedicke (Abbildung 41), noch einen Effekt auf die RASF-Aktivierung (siehe Anhang: Abbildung 55, A) zeigte. Möglicherweise war in Bezug auf Endostatin der Parameter Tubedicke nicht der geeignete Parameter, um den anti-angiogenen Effekt von Endostatin nach 4-stündigem Tube-Formation-Experiment detektieren zu können.

Ein Hinweis dafür lässt sich in der Studie von Bai *et al.* finden. In dieser Studie wurde der Parameter Tubelänge für die Quantifizierung des Tube-Formation-Experiments verwendet (Bai et al. 2013). Um diese Hypothese zu bestätigen, müssten in Bezug auf Endostatin weitere Parameter wie die Tubelänge gemessen werden.

### 6.5.2 Canstatin als potenzielles neues therapeutisches Molekül für die RASF-vermittelte veränderte Gefäßneubildung in der RA

Basierend auf dem Effekt auf die Tubedicke im Tube-Formation-Experiment, der Aktivierbarkeit der RASF sowie der Endotoxinanalyse zeigte Canstatin deutliche Hinweise auf eine Rolle bei RASF/EZ-Interaktionen im Kontext der veränderten Gefäßneubildung in der RA. Aus diesem Grund lag der Fokus der nachfolgenden Analysen auf Canstatin.

#### 6.5.2.1 Canstatin-vermittelter Effekt auf die Gefäßneubildung *in vitro*

Die Stimulierung der HUVEC mit Canstatin im Tube-Formation-Experiment zeigte weder nach 4 noch nach 8 h einen Einfluss auf die Gefäßneubildung. Erst nach Vorstimulierung der HUVEC mit Canstatin über 20 h und anschließender Durchführung des Tube-Formation-Experiments konnte ein Canstatin-vermittelter Effekt auf die Gefäßneubildung beobachtet werden, in dem die Tubedicke signifikant reduziert und somit die Gefäßneubildung verändert war (Kapitel 5.4.3).

Kollagen IV kommt ubiquitär im gesamten Körper in der Basalmembran der vaskulären EZ-Schicht vor (Kamphaus et al. 2000). In Folge der Kollagen IV-vermittelten Degradation über Interaktionen mit der  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Kette der NC1-Domäne wird das anti-angiogene Kollagen IV-Fragment Canstatin freigesetzt (Rebustini et al. 2009). Obwohl Canstatin bislang ein relativ unbekanntes Molekül insbesondere im Zusammenhang mit der RA ist, lassen sich in der Literatur einige Studien über einen anti-angiogenen Canstatin-Effekt auf die EZ finden (Hwang-Bo et al. 2012; Kamphaus et al. 2000; Hou et al. 2004; Zhu et al. 2022; Magnon et al. 2007). Diese Studien stimmen mit den in der vorliegenden Dissertation gezeigten Ergebnissen zur Canstatin-vermittelten Hemmung der Gefäßneubildung überein. Interessanterweise konnte die Studie von Zhu *et al.* zeigen, dass Canstatin bereits nach 12 h eine signifikante Hemmung der Gefäßneubildung im Tube-Formation-Experiment bewirkte, während in der vorliegenden Dissertation erst ein anti-angiogener Canstatin-Effekt im Tube-Formation-Experiment nach 20-stündiger Vorstimulierung der HUVEC detektiert werden konnte (Zhu et

al. 2022). Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass in der Studie von Zhu *et al.* 20 µg/ml Canstatin für die Stimulierungsexperimente verwendet wurden (Zhu *et al.* 2022). Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Dissertation 0,2 bzw. 0,5 µg/ml Canstatin eingesetzt, da gezeigt werden konnte, dass die physiologische Canstatin-Konzentration im Serum bzw. in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten in einem Bereich von 0,04 bis 0,3 µg/ml lagen (Kapitel 5.4.1). Weiterhin beschreibt Zhu *et al.*, dass Canstatin über Integrine an die HUVEC-Oberfläche bindet und so die VEGF-vermittelte Signalweiterleitung über den PI3K/AKT-Signalweg inhibiert wird, wodurch es zur Hemmung der Migration, Proliferation sowie Bildung der Tubes kommt (Zhu *et al.* 2022). Auch der in der vorliegenden Dissertation beobachtete anti-angiogene Canstatin-Effekt könnte auf die von Zhu *et al.* beschriebene über Integrine blockierte VEGF-Signalweiterleitung zurückzuführen sein, da hier die Tube-Bildung über VEGF im Zellkulturmedium angeregt wurde und die HUVEC zum korrekten Ausbilden des Zellnetzwerkes VEGF benötigen.

Im 3D Sphäroid-basierten Sprout-Experiment wurde ebenfalls ein Canstatin-vermittelter Effekt auf die Gefäßneubildung festgestellt, da Canstatin signifikant die Fläche der Sphäroide nach 24 h nach der Aussprossung reduzierte (Kapitel 5.4.4). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass Canstatin in EZ, aber auch in Tumorzellen Apoptose auslöst (Okada *et al.* 2016; Xing *et al.* 2014; Kanazawa *et al.* 2017; Kamphaus *et al.* 2000; Panka und Mier 2003). Die Studien von Panka und Mier sowie Kanazawa *et al.* demonstrierten, dass Canstatin möglicherweise über Interaktion mit  $\alpha\beta3$ - und/oder  $\alpha\beta5$ -Integrinen die Phosphorylierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) bewirkt und es so zur Phosphorylierung von AKT kommt. Dies hat zur Folge, dass die Kaspase-3-Kaskade aktiviert und die Apoptose eingeleitet wird (Panka und Mier 2003; Kanazawa *et al.* 2017). Möglicherweise könnte diese Signalkaskade in den Sphäroid-Experimenten dazu geführt haben, dass die EZ nach Behandlung mit Canstatin weniger proliferierten, möglicherweise in Apoptose gingen und in der Folge die Flächen der Sphäroide reduziert war.

#### 6.5.2.2 Einfluss von Canstatin auf die RASF-induzierten Helix-ähnliche Gefäße und Angiopoietin-2 im SCID-Maus-Modell der RA

In Kapitel 5.4.6.1 konnte demonstriert werden, dass Canstatin von Tag 3 bis Tag 40, mit Ausnahme von Tag 12, signifikant die Entstehung der RASF-induzierten Helix-ähnlichen Gefäße in den ipsilateralen Implantaten reduzierte. Dieses Ergebnis war überraschend, da

Canstatin zum einen in den *in vitro*-Angiogenese-Experimenten keinen zusätzlichen Effekt auf die RASF zeigte, zum anderen Canstatin bis Tag 40 die Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße signifikant reduzierte, obwohl Canstatin nicht nachträglich erneut appliziert wurde. Aus der Literatur ist bekannt, dass Canstatin bereits nach 9 Tagen nicht mehr im Serum von Mäusen nachweisbar ist. In der Studie von Magnon *et al.* wurden Mäusen entweder in den Tumor oder direkt ins Serum Canstatin injiziert (Magnon *et al.* 2005). Demzufolge wäre zu erwarten gewesen, dass die Anzahl an Helix-ähnlichen Gefäßen in den Implantaten, die Canstatin enthielten, spätestens ab Tag 9 stetig zunehmen und sich der Anzahl an Helix-ähnlichen Gefäßen in den Implantaten ohne Canstatin annähern. Der Abbau von Kollagen Typ IV erfolgt enzymatisch über MMP9, das mit MMP2 interagiert. Nach 4-stündigem Kollagen Typ 4 Verdau bei 37°C war laut einer Studie kein Kollagen Typ IV mehr vorhanden (Gioia *et al.* 2009). Allerdings wurden für den Verdau umgerechnet über 13.000 ng/ml MMP9 eingesetzt, während bei gesunden Kontrollen physiologische MMP9-Konzentration von  $8200 \pm 244$  ng/ml vorkommen (Lotfi *et al.* 2015). Möglicherweise wird Kollagen Typ IV deshalb unter physiologischen Bedingungen langsamer degradiert und ist deshalb erst nach 9 Tagen im Serum nicht mehr nachweisbar. Eine weitere Erklärung für den langanhaltenden Canstatin-Effekt in Bezug auf die Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße könnte sein, dass das Canstatin in der Gelatinematrix mit dem humanen Knorpel und den RASF implantiert wurde. Folglich kam das Canstatin zwar mit MMP in Kontakt, die von den RASF sezerniert wurden, jedoch war Canstatin möglicherweise vor dem enzymatischen Abbau durch das Serum geschützt, da die Blutgefäße erst gebildet werden mussten. Die Gelatinematrix war erst nach 24-45 Tagen vollständig mit Blutgefäßen durchwachsen, was möglicherweise die Canstatin-Degradation deutlich verzögert hat.

Interessanterweise zeigte Canstatin keinen Effekt auf die RASF-Invasion in die ipsilateralen und kontralateralen Implantate. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass Canstatin primär auf die EZ und weniger auf die RASF wirkt. Ein Ansatzpunkt für diese Hypothese stellt der Tie2-Rezeptor dar, über den sowohl ANGPT1 als auch das in die pathologische Gefäßneubildung involvierte ANGPT2 binden, was zu dessen Autophosphorylierung führt (Davis *et al.* 1996). Interessanterweise kann Canstatin die Expression des Tie2-Rezeptors in HUVEC reduzieren, wodurch ANGPT1 und ANGPT2 nicht mehr binden können (Hwang-Bo *et al.* 2012; Akwii *et al.* 2019). Demzufolge könnte Canstatin die RASF-vermittelte verstärkte ANGPT2-Expression direkt an den EZ entgegenwirken und so zur Aufhebung der Helix-ähnlichen Gefäßstrukturen

beitragen. Dies könnte auch erklären, warum zwar die Helix-ähnlichen Strukturen aufgelöst, jedoch nicht die Gefäßneubildung inhibiert wurde. Die Canstatin-vermittelte Inhibierung von Tie2 unterbindet zwar die ANGPT2-Signalweiterleitung, die VEGF-Signalweiterleitung zur Gefäßneubildung ist von der Canstatin-Inhibierung jedoch nicht betroffen. Zur weiteren Analyse des Canstatin-Effekts auf ANGPT2 im Kontext der RASF-vermittelten veränderten Gefäßneubildung wurde ANGPT2 in den SCID-Maus-Implantaten analysiert. Wie auch schon bei der Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße konnte unter Einfluss von Canstatin eine veränderte ANGPT2-Expression in den ipsilateralen Implantaten festgestellt werden. Dies bestärkt die Hypothese, dass Canstatin über ANGPT2 die RASF-vermittelte Gefäßneubildung beeinflusst, was zur Auflösung der Helix-ähnlichen Gefäßstrukturen im SCID-Maus-Modell der RA führen könnte.

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

Die veränderte Gefäßneubildung stellt ein wichtiges pathologisches Merkmal der Pathogenese der chronisch entzündlichen Autoimmunerkrankung rheumatoide Arthritis (RA) dar. Charakteristisch für die RA ist eine verstärkte Gefäßneubildung mit diffuser, teils Helix-ähnlicher Struktur im aktivierten und entzündeten Synovium von RA-Patienten. Schlüsselspieler bei der RA-Progression sind RA synoviale Fibroblasten (RASf), die über Matrixdegradation Knorpel und Knochen zerstören und dabei Matrixfragmente, beispielsweise das anti-angiogene Canstatin, freisetzen. RASf induzieren im SCID-Maus-Modell der RA spezifisch Helix-ähnliche Gefäße, was auf spezifische RASf/Endothelzell (EZ)-Interaktionen schließen lässt. Bislang ist jedoch wenig über die Kinetik der RASf-induzierten Helix-ähnlichen Gefäße sowie über spezifische Gefäßregulatoren und molekulare Mechanismen bekannt, die bei der Entstehung von RASf-vermittelten Helix-ähnlichen Gefäßen eine Rolle spielen.

In der vorliegenden Dissertation konnte erstmals gezeigt werden, dass die Entstehung der RASf-induzierten Helix-ähnlichen Gefäße im SCID-Maus-Modell der RA über 45 Tage in 3 Phasen abläuft. In diesem Zusammenhang war der Gefäßregulator Angiopoietin-2 (ANGPT2) an Tag 3 und 6 unterschiedlich in ipsilateralen und kontralateralen Implantaten induziert. Im RA-Synovium war ANGPT2 im Vergleich zum OA-Synovium signifikant stärker exprimiert. Funktionelle *in vitro*-Analysen zu den RASf/EZ-Interaktionen im 2D Tube-Formation-Experiment sowie im 3D Sphäroid-basierten Sprout-Experiment demonstrierten erstmals, dass die RASf bereits nach 4 h signifikant die Gefäßneubildung veränderten, indem die RASf die EZ möglicherweise auch ohne direkten Zellkontakt beeinflussten. Mit den kurzfristigen *in vitro*-Experimenten zur Gefäßneubildung konnte jedoch kein Unterschied in der Expression der Gefäßregulatoren ANGPT2, VEGF, EFNB2 und eNOS unter Einfluss der RASf identifiziert werden. Zur Analyse des Einflusses wiederkehrender Erkrankungsschübe auf die RASf in Bezug auf die veränderte Gefäßneubildung wurde in der vorliegenden Dissertation ein repetitives Stimulierungsschema der RASf etabliert. Repetitiv IL-1 $\beta$ -aktivierte RASf zeigten nach dreimaliger Stimulierung eine signifikant schwächere IL-6-Induktion im Vergleich zur einmaligen Stimulierung, was als Gewöhnung an IL-1 $\beta$  definiert wurde. Mittels RNA-Sequenzierungsanalysen konnten IL-11 und CXCL2 als potenzielle Kandidaten für eine mögliche RASf-vermittelte veränderte Gefäßneubildung identifiziert werden, die VEGF-unabhängig erfolgen könnte. Die Analyse der anti-angiogenen Matrixfragmente Canstatin, Endostatin, Arresten und Tumstatin in Bezug auf die RASf/EZ-Interaktionen ergab, dass ausschließlich Canstatin die Gefäßneubildung *in vitro* signifikant beeinflusste. Canstatin konnte die RASf-induzierten Veränderungen am Zellnetzwerk sowie in den Sphäroiden nicht aufheben. Allerdings bewirkte Canstatin im SCID-Maus-Modell eine signifikante Reduktion der Helix-ähnlichen Gefäße in den ipsilateralen Implantaten, ohne die Gefäßneubildung zu inhibieren.

Zusammenfassend liefert die vorliegende Dissertation neue Erkenntnisse zu den spezifischen RASf/EZ-Interaktionen auf funktioneller und molekularer Ebene in Bezug auf die pathologisch veränderte Gefäßneubildung in der RA. Diese Arbeit beweist, dass die im SCID-Maus-Modell der RA identifizierten Helix-ähnlichen Gefäße nicht nur strukturell, sondern auch auf Grund der Ergebnisse zur ANGPT2-Expression vergleichbar sind mit Kollateralgefäßen. Des Weiteren konnte mit Canstatin ein potenzielles therapeutisches Molekül identifiziert werden, das *in vivo* die RASf-induzierten Helix-ähnlichen Gefäße aufhebt.

## 8. ABSTRACT

Altered vascularization is an important pathological feature in the pathogenesis of the chronic inflammatory autoimmune disease rheumatoid arthritis (RA). RA is characterized by increased vascularization with a diffuse, helix-like structure in the activated and inflamed synovium of RA patients. Key players in RA progression are RA synovial fibroblasts (RASf), which destroy cartilage and bone by degrading matrix. This results in a release of matrix fragments, for example the anti-angiogenic canstatin. RASf specifically induce helix-like vessels in the SCID mouse model of RA, suggesting specific RASf/endothelial cell (EC) interactions. However, to date, little is known about the kinetics of RASf-induced helix-like vessels as well as specific vascular regulators and molecular mechanisms involved in the development of RASf-mediated helix-like vessels.

In the present dissertation, it was shown for the first time that the formation of RASf-induced helix-like vessels in the SCID mouse model of RA occurs in 3 phases over 45 days. In this context, the vascular regulator angiopoietin-2 (ANGPT2) was differentially induced in ipsilateral and contralateral implants on day 3 and 6. ANGPT2 was significantly more expressed in RA synovium compared to OA synovium. Functional *in vitro* analyses of RASf/EZ interaction in the 2D tube formation experiment and in the 3D spheroid-based sprout experiment demonstrated for the first time that RASf significantly altered new vessel formation already after 4 h by influencing EC even without direct cell contact. However, no differences in the expression of the vascular regulators ANGPT2, VEGF, EFNB2 and eNOS were identified in the short-term *in vitro* experiments on vascularization influenced by RASf. To analyze the influence of recurrent disease episodes on RASf in relation to altered vascularization, a repetitive stimulation scheme of RASf was established. Repetitively IL-1 $\beta$ -activated RASf showed significantly weaker IL-6 induction after three times of stimulation compared to once stimulation, which was defined as habituation to IL-1 $\beta$ . Using RNA sequencing analysis, IL-11 and CXCL2 were identified as potential candidates for RASf-mediated altered vascularization, which could occur in a VEGF-independent manner. Analysis of the anti-angiogenic matrix fragments canstatin, endostatin, arresten and tumstatin in relation to the RASf/EZ interaction revealed that only canstatin significantly influenced vascularization *in vitro*. Canstatin could not reverse the RASf-induced alterations in the cell network and in the spheroids. However, in the SCID mouse model, canstatin significantly reduced the number of helix-like vessels in the ipsilateral implants without inhibiting the formation of new vessels.

In summary, this dissertation provides new insights into specific RASf/EZ interactions functionally and on the molecular level in relation to pathologically altered vascularization in RA. This dissertation showed that, helix-like vessels identified in the SCID mouse model of RA are structurally and on the molecular level based on the results of ANGPT2 expression comparable to collateral vessels. Furthermore, canstatin was identified as new potential therapeutic molecule that reduces RASf-induced helix-like vessels in the SCID mouse model of RA.

## 9. Literaturverzeichnis

- Ainola, M. M.; Mandelin, J. A.; Liljeström, M. P.; Li, T. F.; Hukkanen, M. V. J.; Konttinen, Y. T. (2005): Pannus invasion and cartilage degradation in rheumatoid arthritis: involvement of MMP-3 and interleukin-1beta. In: *Clinical and experimental rheumatology* 23 (5), S. 644–650.
- Akwii, Racheal G.; Sajib, Md S.; Zahra, Fatema T.; Mikelis, Constantinos M. (2019): Role of Angiopoietin-2 in Vascular Physiology and Pathophysiology. In: *Cells* 8 (5). DOI: 10.3390/cells8050471.
- Alamanos, Yannis; Drosos, Alexandros A. (2005): Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. In: *Autoimmunity reviews* 4 (3), S. 130–136. DOI: 10.1016/j.autrev.2004.09.002.
- Alberts, Bruce (2017): *Molecular biology of the cell*. Sixth edition. [New York]: W.W. Norton & Company.
- Aletaha, Daniel; Neogi, Tuhina; Silman, Alan J.; Funovits, Julia; Felson, David T.; Bingham, Clifton O. et al. (2010): 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. In: *Arthritis & Rheumatism* 62 (9), S. 2569–2581. DOI: 10.1002/art.27584.
- Almeida, Denise E. de; Ling, Song; Pi, Xiujun; Hartmann-Scruggs, Anne M.; Pumpens, Paul; Holoshitz, Joseph (2010): Immune dysregulation by the rheumatoid arthritis shared epitope. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185 (3), S. 1927–1934. DOI: 10.4049/jimmunol.0904002.
- Alsalameh, S.; Winter, K.; Al-Ward, R.; Wendler, J.; Kalden, J. R.; Kinne, R. W. (1999): Distribution of TNF-alpha, TNF-R55 and TNF-R75 in the rheumatoid synovial membrane: TNF receptors are localized preferentially in the lining layer; TNF-alpha is distributed mainly in the vicinity of TNF receptors in the deeper layers. In: *Scandinavian journal of immunology* 49 (3), S. 278–285. DOI: 10.1046/j.1365-3083.1999.00458.x.
- Anderson, Donald D.; Chubinskaya, Susan; Guilak, Farshid; Martin, James A.; Oegema, Theodore R.; Olson, Steven A.; Buckwalter, Joseph A. (2011): Post-traumatic osteoarthritis: improved understanding and opportunities for early intervention. In: *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 29 (6), S. 802–809. DOI: 10.1002/jor.21359.
- Araki, Yasuto; Tsuzuki Wada, Takuma; Aizaki, Yoshimi; Sato, Kojiro; Yokota, Kazuhiro; Fujimoto, Kenta et al. (2016): Histone Methylation and STAT-3 Differentially Regulate Interleukin-6-Induced Matrix Metalloproteinase Gene Activation in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. In: *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 68 (5), S. 1111–1123. DOI: 10.1002/art.39563.
- Augustin, Hellmut G.; Koh, Gou Young; Thurston, Gavin; Alitalo, Kari (2009): Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 10 (3), S. 165–177. DOI: 10.1038/nrm2639.
- Bai, Yu-jing; Huang, Lv-zhen; Zhou, Ai-yi; Zhao, Min; Yu, Wen-zhen; Li, Xiao-xin (2013): Antiangiogenesis effects of endostatin in retinal neovascularization. In: *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics* 29 (7), S. 619–626. DOI: 10.1089/jop.2012.0225.
- Bartok, Beatrix; Firestein, Gary S. (2010): Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. In: *Immunological reviews* 233 (1), S. 233–255. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2009.00859.x.
- Bender, R.; Lange, St; Ziegler, A. (2002): Multiples Testen - - Artikel Nr. 12 der Statistik-Serie in der DMW - -. In: *Dtsch Med Wochenschr* 127 (Suppl. Statistik), T 4-T 7. DOI: 10.1055/s-2002-32816.

- Biswas, Subhra K.; Lopez-Collazo, Eduardo (2009): Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. In: *Trends in immunology* 30 (10), S. 475–487. DOI: 10.1016/j.it.2009.07.009.
- Bombara, M. P.; Webb, D. L.; Conrad, P.; Marlor, C. W.; Sarr, T.; Ranges, G. E. et al. (1993): Cell contact between T cells and synovial fibroblasts causes induction of adhesion molecules and cytokines. In: *Journal of leukocyte biology* 54 (5), S. 399–406. DOI: 10.1002/jlb.54.5.399.
- Border, W. A.; Noble, N. A. (1994): Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. In: *The New England journal of medicine* 331 (19), S. 1286–1292. DOI: 10.1056/NEJM199411103311907.
- Bottini, Nunzio; Firestein, Gary S. (2013): Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. In: *Nature reviews. Rheumatology* 9 (1), S. 24–33. DOI: 10.1038/nrrheum.2012.190.
- Brown, David J.; Rzucidlo, Eva M.; Merenick, Bethany L.; Wagner, Robert J.; Martin, Kathleen A.; Powell, Richard J. (2005): Endothelial cell activation of the smooth muscle cell phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway promotes differentiation. In: *Journal of vascular surgery* 41 (3), S. 509–516. DOI: 10.1016/j.jvs.2004.12.024.
- Bruce, Anthony C.; Kelly-Goss, Molly R.; Heuslein, Joshua L.; Meisner, Joshua K.; Price, Richard J.; Peirce, Shayn M. (2014): Monocytes are recruited from venules during arteriogenesis in the murine spinotrapezius ligation model. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 34 (9), S. 2012–2022. DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.303399.
- Buechler, Matthew B.; Turley, Shannon J. (2018): A short field guide to fibroblast function in immunity. In: *Seminars in immunology* 35, S. 48–58. DOI: 10.1016/j.smim.2017.11.001.
- Burke, Susan J.; Lu, Danhong; Sparer, Tim E.; Masi, Thomas; Goff, Matthew R.; Karlstad, Michael D.; Collier, J. Jason (2014): NF- $\kappa$ B and STAT1 control CXCL1 and CXCL2 gene transcription. In: *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 306 (2), E131-49. DOI: 10.1152/ajpendo.00347.2013.
- Burmester, Gerd R.; Pope, Janet E. (2017): Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis. In: *Lancet (London, England)* 389 (10086), S. 2338–2348. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31491-5.
- Burton, Paul R.; Clayton, David G.; Cardon, Lon R.; Craddock, Nick; Deloukas, Panos; Duncanson, Audrey et al. (2007): Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. In: *Nature genetics* 39 (11), S. 1329–1337. DOI: 10.1038/ng.2007.17.
- Buschmann, Ivo; Heil, Matthias; Jost, Marco; Schaper, Wolfgang (2003): Influence of inflammatory cytokines on arteriogenesis. In: *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)* 10 (3-4), S. 371–379. DOI: 10.1038/sj.mn.7800199.
- Cai, Wei-Jun; Kocsis, Elisabeth; Luo, Xuegang; Schaper, Wolfgang; Schaper, Jutta (2004): Expression of endothelial nitric oxide synthase in the vascular wall during arteriogenesis. In: *Molecular and cellular biochemistry* 264 (1-2), S. 193–200. DOI: 10.1023/b:mcbi.0000044388.27953.a0.
- Chabaud, Martine; Durand, Jean Marc; Buchs, Nicolas; Fossiez, Francois; Page, Guillaume; Frappart, Lucien; Miossec, Pierre (1999): Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. In: *Arthritis & Rheumatism* 42 (5), S. 963–970. DOI: 10.1002/1529-0131(199905)42:5<963::AID-ANR15>3.0.CO;2-E.
- Chatzidionysiou, Katerina; Emamikia, Sharzad; Nam, Jackie; Ramiro, Sofia; Smolen, Josef; van der Heijde, Désirée et al. (2017): Efficacy of glucocorticoids, conventional and targeted synthetic disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the 2016 update of the EULAR

- recommendations for the management of rheumatoid arthritis. In: *Annals of the rheumatic diseases* 76 (6), S. 1102–1107. DOI: 10.1136/annrheumdis-2016-210711.
- Chen, Zhu; Bozec, Aline; Ramming, Andreas; Schett, Georg (2019): Anti-inflammatory and immune-regulatory cytokines in rheumatoid arthritis. In: *Nature reviews. Rheumatology* 15 (1), S. 9–17. DOI: 10.1038/s41584-018-0109-2.
- Chong, Diana C.; Yu, Zhixian; Brighton, Hailey E.; Bear, James E.; Bautch, Victoria L. (2017): Tortuous Microvessels Contribute to Wound Healing via Sprouting Angiogenesis. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 37 (10), S. 1903–1912. DOI: 10.1161/ATVBAHA.117.309993.
- Christoforidis, Gregory A.; Mohammad, Yousef; Kehagias, Dimitris; Avutu, Bindu; Slivka, Andrew P. (2005): Angiographic assessment of pial collaterals as a prognostic indicator following intra-arterial thrombolysis for acute ischemic stroke. In: *AJNR. American journal of neuroradiology* 26 (7), S. 1789–1797.
- Colorado, P. C.; Torre, A.; Kamphaus, G.; Maeshima, Y.; Hopfer, H.; Takahashi, K. et al. (2000): Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen. In: *Cancer research* 60 (9), S. 2520–2526.
- Conn, H. J. (2020): Conn's biological stains. A handbook of dyes, stains and fluorochromes for use in biology and medicine. 10th edition. Hg. v. Richard W. Horobin und J. A. Kiernan. London: Taylor & Francis.
- Crowley, Thomas; O'Neil, John D.; Adams, Holly; Thomas, Andrew M.; Filer, Andrew; Buckley, Christopher D.; Clark, Andrew R. (2017): Priming in response to pro-inflammatory cytokines is a feature of adult synovial but not dermal fibroblasts. In: *Arthritis research & therapy* 19 (1), S. 35. DOI: 10.1186/s13075-017-1248-6.
- Cui, X.; Chopp, M.; Zacharek, A.; Zhang, C.; Roberts, C.; Chen, J. (2009): Role of endothelial nitric oxide synthetase in arteriogenesis after stroke in mice. In: *Neuroscience* 159 (2), S. 744–750. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.12.055.
- Darby, Ian A.; Hewitson, Tim D. (2007): Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. In: *International review of cytology* 257, S. 143–179. DOI: 10.1016/S0074-7696(07)57004-X.
- Davis, S.; Aldrich, T. H.; Jones, P. F.; Acheson, A.; Compton, D. L.; Jain, V. et al. (1996): Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. In: *Cell* 87 (7), S. 1161–1169. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81812-7.
- Deindl, Elisabeth; Hofer, Imo E.; Fernandez, Borja; Barancik, Miroslav; Heil, Matthias; Strniskova, Monika; Schaper, Wolfgang (2003): Involvement of the fibroblast growth factor system in adaptive and chemokine-induced arteriogenesis. In: *Circulation research* 92 (5), S. 561–568. DOI: 10.1161/01.RES.0000061181.80065.7D.
- Dejana, Elisabetta; Orsenigo, Fabrizio; Molendini, Cinzia; Baluk, Peter; McDonald, Donald M. (2009): Organization and signaling of endothelial cell-to-cell junctions in various regions of the blood and lymphatic vascular trees. In: *Cell and tissue research* 335 (1), S. 17–25. DOI: 10.1007/s00441-008-0694-5.
- Dejana, Elisabetta; Vestweber, Dietmar (2013): The role of VE-cadherin in vascular morphogenesis and permeability control. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 116, S. 119–144. DOI: 10.1016/B978-0-12-394311-8.00006-6.
- Desmoulière, A.; Redard, M.; Darby, I.; Gabbiani, G. (1995): Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. In: *The American Journal of Pathology* 146 (1), S. 56–66.

- DiBattista, J. A.; Pelletier, J. P.; Zafarullah, M.; Fujimoto, N.; Obata, K.; Martel-Pelletier, J. (1995): Coordinate regulation of matrix metalloproteases and tissue inhibitor of metalloproteinase expression in human synovial fibroblasts. In: *The Journal of rheumatology. Supplement* 43, S. 123–128.
- Du, X.; Williams, D. A. (1997): Interleukin-11: review of molecular, cell biology, and clinical use. In: *Blood* 89 (11), S. 3897–3908.
- Dyer, Laura A.; Patterson, Cam (2010): Development of the endothelium: an emphasis on heterogeneity. In: *Seminars in thrombosis and hemostasis* 36 (3), S. 227–235. DOI: 10.1055/s-0030-1253446.
- Eckes, B.; Zigrino, P.; Kessler, D.; Holtkötter, O.; Shephard, P.; Mauch, C.; Krieg, T. (2000): Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis. In: *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 19 (4), S. 325–332. DOI: 10.1016/s0945-053x(00)00077-9.
- Edwards, J. C. (1995): Synovial intimal fibroblasts. In: *Annals of the rheumatic diseases* 54 (5), S. 395–397. DOI: 10.1136/ard.54.5.395.
- Eilken, Hanna M.; Adams, Ralf H. (2010): Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. In: *Current opinion in cell biology* 22 (5), S. 617–625. DOI: 10.1016/j.ceb.2010.08.010.
- Elshabrawy, Hatem A.; Volin, Michael V.; Essani, Abdul B.; Chen, Zhenlong; McInnes, Iain B.; van Raemdonck, Katrien et al. (2018): IL-11 facilitates a novel connection between RA joint fibroblasts and endothelial cells. In: *Angiogenesis* 21 (2), S. 215–228. DOI: 10.1007/s10456-017-9589-y.
- Faber, James E.; Chilian, William M.; Deindl, Elisabeth; van Royen, Niels; Simons, Michael (2014): A brief etymology of the collateral circulation. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 34 (9), S. 1854–1859. DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.303929.
- Felbor, U.; Dreier, L.; Bryant, R. A.; Ploegh, H. L.; Olsen, B. R.; Mothes, W. (2000): Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. In: *The EMBO journal* 19 (6), S. 1187–1194. DOI: 10.1093/emboj/19.6.1187.
- Foster, Simmie L.; Hargreaves, Diana C.; Medzhitov, Ruslan (2007): Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. In: *Nature* 447 (7147), S. 972–978. DOI: 10.1038/nature05836.
- Foster, Simmie L.; Medzhitov, Ruslan (2009): Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. In: *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 130 (1), S. 7–15. DOI: 10.1016/j.clim.2008.08.015.
- Frangos, Theoharris; Maret, Wolfgang (2020): Zinc and Cadmium in the Aetiology and Pathogenesis of Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis. In: *Nutrients* 13 (1). DOI: 10.3390/nu13010053.
- Friščić, Jasna; Böttcher, Martin; Reinwald, Christiane; Bruns, Heiko; Wirth, Benjamin; Popp, Samantha-Josefine et al. (2021): The complement system drives local inflammatory tissue priming by metabolic reprogramming of synovial fibroblasts. In: *Immunity* 54 (5), 1002-1021.e10. DOI: 10.1016/j.immuni.2021.03.003.
- Gale, Nicholas W.; Thurston, Gavin; Hackett, Sean F.; Renard, Roumiana; Wang, Quan; McClain, Joyce et al. (2002): Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. In: *Developmental cell* 3 (3), S. 411–423. DOI: 10.1016/s1534-5807(02)00217-4.
- Gao, Wei; Sweeney, Catherine; Walsh, Ceara; Rooney, Peadar; McCormick, Jennifer; Veale, Douglas J.; Fearon, Ursula (2013): Notch signalling pathways mediate synovial angiogenesis in response to vascular endothelial growth factor and angiopoietin 2. In: *Annals of the rheumatic diseases* 72 (6), S. 1080–1088. DOI: 10.1136/annrheumdis-2012-201978.

- Geiler, T.; Kriegsmann, J.; Keyszer, G. M.; Gay, R. E.; Gay, S. (1994): A new model for rheumatoid arthritis generated by engraftment of rheumatoid synovial tissue and normal human cartilage into SCID mice. In: *Arthritis & Rheumatism* 37 (11), S. 1664–1671. DOI: 10.1002/art.1780371116.
- Giannotta, Monica; Trani, Marianna; Dejana, Elisabetta (2013): VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. In: *Developmental cell* 26 (5), S. 441–454. DOI: 10.1016/j.devcel.2013.08.020.
- Ginsberg, Myron D. (2018): The cerebral collateral circulation: Relevance to pathophysiology and treatment of stroke. In: *Neuropharmacology* 134 (Pt B), S. 280–292. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.08.003.
- Gioia, Magda; Monaco, Susanna; van den Steen, Philippe E.; Sbardella, Diego; Grasso, Giuseppe; Marini, Stefano et al. (2009): The collagen binding domain of gelatinase A modulates degradation of collagen IV by gelatinase B. In: *Journal of molecular biology* 386 (2), S. 419–434. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.12.021.
- Goldring, Mary B.; Goldring, Steven R. (2010): Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1192, S. 230–237. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.05240.x.
- Gregersen, P. K.; Silver, J.; Winchester, R. J. (1987): The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. In: *Arthritis and rheumatism* 30 (11), S. 1205–1213. DOI: 10.1002/art.1780301102.
- Griffin, Timothy M.; Guilak, Farshid (2005): The role of mechanical loading in the onset and progression of osteoarthritis. In: *Exercise and sport sciences reviews* 33 (4), S. 195–200. DOI: 10.1097/00003677-200510000-00008.
- Guilak, Farshid; Alexopoulos, Leonidas G.; Upton, Maureen L.; Youn, Inchan; Choi, Jae Bong; Cao, Li et al. (2006): The pericellular matrix as a transducer of biomechanical and biochemical signals in articular cartilage. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1068, S. 498–512. DOI: 10.1196/annals.1346.011.
- Hajitou, Amin; Grignet, Christine; Devy, Laetitia; Berndt, Sarah; Blacher, Silvia; Deroanne, Christophe F. et al. (2002): The antitumoral effect of endostatin and angiostatin is associated with a down-regulation of vascular endothelial growth factor expression in tumor cells. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16 (13), S. 1802–1804. DOI: 10.1096/fj.02-0109fje.
- Halfter, Willi; Dong, Sucai; Schurer, Barbara; Cole, Gregory J. (1998): Collagen XVIII Is a Basement Membrane Heparan Sulfate Proteoglycan. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (39), S. 25404–25412. DOI: 10.1074/jbc.273.39.25404.
- Hamano, Yuki; Kalluri, Raghu (2005): Tumstatin, the NC1 domain of alpha3 chain of type IV collagen, is an endogenous inhibitor of pathological angiogenesis and suppresses tumor growth. In: *Biochemical and biophysical research communications* 333 (2), S. 292–298. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.05.130.
- Hammes, Hans-Peter; Lin, Jihong; Wagner, Patrick; Feng, Yuxi; vom Hagen, Franziska; Krzizok, Thomas et al. (2004): Angiopoietin-2 causes pericyte dropout in the normal retina: evidence for involvement in diabetic retinopathy. In: *Diabetes* 53 (4), S. 1104–1110. DOI: 10.2337/diabetes.53.4.1104.
- Hanemaaijer, R.; Sorsa, T.; Konttinen, Y. T.; Ding, Y.; Sutinen, M.; Visser, H. et al. (1997): Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor-alpha and doxycycline. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (50), S. 31504–31509. DOI: 10.1074/jbc.272.50.31504.

- Hardingham, T. E.; Fosang, A. J.; Dudhia, J. (1994): The structure, function and turnover of aggrecan, the large aggregating proteoglycan from cartilage. In: *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry : journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies* 32 (4), S. 249–257.
- Harigai, M.; Hara, M.; Kitani, A.; Norioka, K.; Hirose, T.; Hirose, W. et al. (1991): Interleukin 1 and tumor necrosis factor-alpha synergistically increase the production of interleukin 6 in human synovial fibroblast. In: *Journal of clinical & laboratory immunology* 34 (3), S. 107–113.
- Hartung, K.; Seelig, H-P (2007): Labordiagnostik der systemischen Autoimmunerkrankungen. Teil II: Rheumatoide Arthritis und Vaskulopathien. In: *Zeitschrift für Rheumatologie* 66 (3), 225-37; quiz 238. DOI: 10.1007/s00393-007-0165-5.
- He, Ling-fang; Wang, Ting-ting; Gao, Qian-ying; Zhao, Guang-feng; Huang, Ya-hong; Yu, Li-ke; Hou, Ya-yi (2011): Stanniocalcin-1 promotes tumor angiogenesis through up-regulation of VEGF in gastric cancer cells. In: *Journal of biomedical science* 18 (1), S. 39. DOI: 10.1186/1423-0127-18-39.
- Heck, C.; Haun, S.; Kürsammer, D.; Frommer, K.; Arnold, M.; Rehart, S. et al. (2023): OP0209 IMPACT OF CHRONIC INFLAMMATION AND COLLAGEN IV FRAGMENT CANSTATIN ON RHEUMATOID ARTHRITIS SYNOVIAL FIBROBLASTS AND ENDOTHELIAL CELL INTERACTIONS IN VITRO AND IN VIVO. In: *Annals of the rheumatic diseases* 82 (Suppl 1), 137.2-138. DOI: 10.1136/annrheumdis-2023-eular.3941.
- Hill, Jonathan A.; Southwood, Scott; Sette, Alessandro; Jevnikar, Anthony M.; Bell, David A.; Cairns, Ewa (2003): Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1\*0401 MHC class II molecule. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 171 (2), S. 538–541. DOI: 10.4049/jimmunol.171.2.538.
- Hoefer, Imo E.; van Royen, Niels; Rectenwald, John E.; Deindl, Elisabeth; Hua, Jing; Jost, Marco et al. (2004): Arteriogenesis proceeds via ICAM-1/Mac-1- mediated mechanisms. In: *Circulation research* 94 (9), S. 1179–1185. DOI: 10.1161/01.RES.0000126922.18222.F0.
- Hogan, M.; Sherry, B.; Ritchlin, C.; Fabre, M.; Winchester, R.; Cerami, A.; Bucala, R. (1994): Differential expression of the small inducible cytokines GRO alpha and GRO beta by synovial fibroblasts in chronic arthritis: possible role in growth regulation. In: *Cytokine* 6 (1), S. 61–69. DOI: 10.1016/1043-4666(94)90009-4.
- Hou, Wei-Hong; Wang, Tian-Yun; Yuan, Bao-Mei; Chai, Yu-Rong; Jia, Yan-Long; Tian, Fang et al. (2004): Recombinant mouse canstatin inhibits chicken embryo chorioallantoic membrane angiogenesis and endothelial cell proliferation. In: *Acta biochimica et biophysica Sinica* 36 (12), S. 845–850. DOI: 10.1093/abbs/36.12.845.
- Huang, Hanhua; Bhat, Abhijit; Woodnutt, Gary; Lappe, Rodney (2010): Targeting the ANGPT-TIE2 pathway in malignancy. In: *Nature reviews. Cancer* 10 (8), S. 575–585. DOI: 10.1038/nrc2894.
- Hudson, B. G.; Reeders, S. T.; Tryggvason, K. (1993): Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (35), S. 26033–26036.
- Hui, Alexander Y.; McCarty, William J.; Masuda, Koichi; Firestein, Gary S.; Sah, Robert L. (2012): A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease. In: *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine* 4 (1), S. 15–37. DOI: 10.1002/wsbm.157.
- Hwang-Bo, Jeon; Park, Jong-Hwa; Chung, In Sik (2015): Tumstatin induces apoptosis mediated by Fas signaling pathway in oral squamous cell carcinoma SCC-VII cells. In: *Oncology Letters* 10 (2), S. 1016–1022. DOI: 10.3892/ol.2015.3261.

- Hwang-Bo, Jeon; Yoo, Ki Hyun; Park, Jong-Hwa; Jeong, Han-Sin; Chung, In Sik (2012): Recombinant canstatin inhibits angiopoietin-1-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. In: *International journal of cancer* 131 (2), S. 298–309. DOI: 10.1002/ijc.26353.
- Hynes, Richard O. (2009): The extracellular matrix: not just pretty fibrils. In: *Science (New York, N.Y.)* 326 (5957), S. 1216–1219. DOI: 10.1126/science.1176009.
- Iwanaga, T.; Shikichi, M.; Kitamura, H.; Yanase, H.; Nozawa-Inoue, K. (2000): Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. In: *Archives of histology and cytology* 63 (1), S. 17–31. DOI: 10.1679/aohc.63.17.
- Järveläinen, Hannu; Sainio, Annele; Koulu, Markku; Wight, Thomas N.; Penttinen, Risto (2009): Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. In: *Pharmacological reviews* 61 (2), S. 198–223. DOI: 10.1124/pr.109.001289.
- Jeansson, Marie; Gawlik, Alexander; Anderson, Gregory; Li, Chengjin; Kerjaschki, Dentscho; Henkelman, Mark; Quaggin, Susan E. (2011): Angiopoietin-1 is essential in mouse vasculature during development and in response to injury. In: *The Journal of clinical investigation* 121 (6), S. 2278–2289. DOI: 10.1172/JCI46322.
- Judex, M.; Neumann, E.; Fleck, M.; Pap, T.; Mountz, J. D.; Gay, R. E. et al. (2001): "Inverse wrap": an improved implantation technique for virus-transduced synovial fibroblasts in the SCID mouse model for rheumatoid arthritis. In: *Modern Rheumatology* 11 (2), S. 145–150. DOI: 10.1007/s101650170027.
- Kamphaus, G. D.; Colorado, P. C.; Panka, D. J.; Hopfer, H.; Ramchandran, R.; Torre, A. et al. (2000): Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (2), S. 1209–1215. DOI: 10.1074/jbc.275.2.1209.
- Kanazawa, Hiroki; Imoto, Keisuke; Okada, Muneyoshi; Yamawaki, Hideyuki (2017): Canstatin inhibits hypoxia-induced apoptosis through activation of integrin/focal adhesion kinase/Akt signaling pathway in H9c2 cardiomyoblasts. In: *PloS one* 12 (2), e0173051. DOI: 10.1371/journal.pone.0173051.
- Karouzakis, Emmanuel; Trenkmann, Michelle; Gay, Renate E.; Michel, Beat A.; Gay, Steffen; Neidhart, Michel (2014): Epigenome analysis reveals TBX5 as a novel transcription factor involved in the activation of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. In: *The Journal of Immunology* 193 (10), S. 4945–4951. DOI: 10.4049/jimmunol.1400066.
- Kayakabe, Ken; Kuroiwa, Takashi; Sakurai, Noriyuki; Ikeuchi, Hidekazu; Kadiombo, Anastasie Tshilela; Sakairi, Toru et al. (2012): Interleukin-6 promotes destabilized angiogenesis by modulating angiopoietin expression in rheumatoid arthritis. In: *Rheumatology* 51 (9), S. 1571–1579. DOI: 10.1093/rheumatology/kes093.
- Khoshnoodi, Jamshid; Pedchenko, Vadim; Hudson, Billy G. (2008): Mammalian collagen IV. In: *Microscopy research and technique* 71 (5), S. 357–370. DOI: 10.1002/jemt.20564.
- Kim, Ji-Won; Kong, Jin-Sun; Lee, Saseong; Yoo, Seung-Ah; Koh, Jung Hee; Jin, Jingchun; Kim, Wan-Uk (2020): Angiogenic cytokines can reflect the synovitis severity and treatment response to biologics in rheumatoid arthritis. In: *Experimental & molecular medicine* 52 (5), S. 843–853. DOI: 10.1038/s12276-020-0443-8.
- Kim, Kyoung-Woon; Cho, Mi-La; Lee, Sang-Heon; Oh, Hye-Joa; Kang, Chang-Min; Ju, Ji Hyeon et al. (2007): Human rheumatoid synovial fibroblasts promote osteoclastogenic activity by activating RANKL via TLR-2 and TLR-4 activation. In: *Immunology letters* 110 (1), S. 54–64. DOI: 10.1016/j.imlet.2007.03.004.

- Kim, Y. M.; Jang, J. W.; Lee, O. H.; Yeon, J.; Choi, E. Y.; Kim, K. W. et al. (2000): Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase. In: *Cancer research* 60 (19), S. 5410–5413.
- Kim, Young-Mi; Hwang, Sewook; Kim, Young-Myoeng; Pyun, Bo-Jeong; Kim, Tae-Yoon; Lee, Seung-Taek et al. (2002): Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (31), S. 27872–27879. DOI: 10.1074/jbc.M202771200.
- Kinne, R. W.; Boehm, S.; Iftner, T.; Aigner, T.; Vornehm, S.; Weseloh, G. et al. (1995): Synovial fibroblast-like cells strongly express jun-B and C-fos proto-oncogenes in rheumatoid- and osteoarthritis. In: *Scandinavian journal of rheumatology. Supplement* 101, S. 121–125. DOI: 10.3109/03009749509100913.
- Knedla, A.; Riepl, B.; Lefèvre, S.; Kistella, S.; Grifka, J.; Straub, R. H. et al. (2009): The therapeutic use of osmotic minipumps in the severe combined immunodeficiency (SCID) mouse model for rheumatoid arthritis. In: *Annals of the rheumatic diseases* 68 (1), S. 124–129. DOI: 10.1136/ard.2007.086116.
- Kontinen, Y. T.; Li, T. F.; Hukkanen, M.; Ma, J.; Xu, J. W.; Virtanen, I. (2000): Fibroblast biology. Signals targeting the synovial fibroblast in arthritis. In: *Arthritis research* 2 (5), S. 348–355. DOI: 10.1186/ar111.
- Kühn, K. (1995): Basement membrane (type IV) collagen. In: *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 14 (6), S. 439–445. DOI: 10.1016/0945-053X(95)90001-2.
- Kusindarta, Dwi Liliek; Wihadmadyatami, Hevi (2018): The Role of Extracellular Matrix in Tissue Regeneration. In: Mariana Esteves Vieira (Hg.): *Synovia-Derived Mesenchymal Stem Cell Application in Musculoskeletal injuries. A Review*. [s.l.]: IntechOpen.
- Law, Alice Y. S.; Wong, Chris K. C. (2013): Stanniocalcin-1 and -2 promote angiogenic sprouting in HUVECs via VEGF/VEGFR2 and angiopoietin signaling pathways. In: *Molecular and cellular endocrinology* 374 (1-2), S. 73–81. DOI: 10.1016/j.mce.2013.04.024.
- Lee, D. M.; Weinblatt, M. E. (2001): Rheumatoid arthritis. In: *The Lancet* 358 (9285), S. 903–911. DOI: 10.1016/S0140-6736(01)06075-5.
- Lee, S. S.; Joo, Y. S.; Kim, W. U.; Min, D. J.; Min, J. K.; Park, S. H. et al. (2001): Vascular endothelial growth factor levels in the serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. In: *Clinical and experimental rheumatology* 19 (3), S. 321–324.
- Lefevre, S.; Meier, F. M. P.; Neumann, E.; Muller-Ladner, U. (2015): Role of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. In: *Current pharmaceutical design* 21 (2), S. 130–141. DOI: 10.2174/1381612820666140825122036.
- Lefèvre, Stephanie; Knedla, Anette; Tennie, Christoph; Kampmann, Andreas; Wunrau, Christina; Dinsler, Robert et al. (2009): Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. In: *Nature medicine* 15 (12), S. 1414–1420. DOI: 10.1038/nm.2050.
- Lefèvre, Stephanie; Schwarz, Maria; Meier, Florian M. P.; Zimmermann-Geller, Birgit; Tarner, Ingo H.; Rickert, Markus et al. (2017): Disease-Specific Effects of Matrix and Growth Factors on Adhesion and Migration of Rheumatoid Synovial Fibroblasts. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 198 (12), S. 4588–4595. DOI: 10.4049/jimmunol.1600989.
- Lekas, Michael; Lekas, Poli; Mei, Shirley H. J.; Deng, Yupu; Dumont, Daniel J.; Stewart, Duncan J. (2012): Tie2-dependent neovascularization of the ischemic hindlimb is mediated by angiopoietin-2. In: *PLoS one* 7 (9), e43568. DOI: 10.1371/journal.pone.0043568.

- Li, Juan; Luo, Jing; Luo, Yi-Qin; Zhou, Ming; Zhao, Liang; Yao, Li-Juan et al. (2014): Overexpression of tumstatin in genetically modified megakaryocytes changes the proangiogenic effect of platelets. In: *Transfusion* 54 (8), S. 2106–2117. DOI: 10.1111/trf.12617.
- Li, Qing; Olsen, Bjorn R. (2004): Increased angiogenic response in aortic explants of collagen XVIII/endostatin-null mice. In: *The American Journal of Pathology* 165 (2), S. 415–424. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63307-X.
- Liao, Katherine P.; Alfredsson, Lars; Karlson, Elizabeth W. (2009): Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. In: *Current opinion in rheumatology* 21 (3), S. 279–283. DOI: 10.1097/BOR.0b013e32832a2e16.
- López-Mejías, Raquel; Corrales, Alfonso; Genre, Fernanda; Hernández, José L.; Ochoa, Rodrigo; Blanco, Ricardo et al. (2013): Angiopoietin-2 serum levels correlate with severity, early onset and cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. In: *Clinical and experimental rheumatology* 31 (5), S. 761–766.
- Lotfi, Alireza; Mohammadi, Ghodrat; Tavassoli, Atena; Mousaviagdas, Mehrnoosh; Chavoshi, Hadi; Saniee, Lale (2015): Serum levels of MMP9 and MMP2 in patients with oral squamous cell carcinoma. In: *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 16 (4), S. 1327–1330. DOI: 10.7314/apjcp.2015.16.4.1327.
- Lucitti, Jennifer L.; Mackey, Jessica K.; Morrison, Jeffrey C.; Haigh, Jody J.; Adams, Ralf H.; Faber, James E. (2012): Formation of the collateral circulation is regulated by vascular endothelial growth factor-A and a disintegrin and metalloprotease family members 10 and 17. In: *Circulation research* 111 (12), S. 1539–1550. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.279109.
- Lv, Yi; Zheng, Jin-Ping (2012): The inhibitory effects of arresten protein on tumor formation. In: *Chinese medical sciences journal = Chung-kuo i hsueh k'o hsueh tsa chih* 27 (1), S. 11–17. DOI: 10.1016/s1001-9294(12)60016-9.
- Lynch, Magnus D.; Watt, Fiona M. (2018): Fibroblast heterogeneity: implications for human disease. In: *The Journal of clinical investigation* 128 (1), S. 26–35. DOI: 10.1172/JCI93555.
- MacDonald, Iona J.; Liu, Shan-Chi; Su, Chen-Ming; Wang, Yu-Han; Tsai, Chun-Hao; Tang, Chih-Hsin (2018): Implications of Angiogenesis Involvement in Arthritis. In: *International journal of molecular sciences* 19 (7). DOI: 10.3390/ijms19072012.
- Maeshima, Y.; Colorado, P. C.; Kalluri, R. (2000): Two RGD-independent alpha vbeta 3 integrin binding sites on tumstatin regulate distinct anti-tumor properties. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (31), S. 23745–23750. DOI: 10.1074/jbc.C000186200.
- Maeshima, Y.; Manfredi, M.; Reimer, C.; Holthaus, K. A.; Hopfer, H.; Chandamuri, B. R. et al. (2001): Identification of the anti-angiogenic site within vascular basement membrane-derived tumstatin. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (18), S. 15240–15248. DOI: 10.1074/jbc.M007764200.
- Magnon, Claire; Galaup, Ariane; Mullan, Brian; Rouffiac, Valérie; Bouquet, Céline; Bidart, Jean-Michel et al. (2005): Canstatin acts on endothelial and tumor cells via mitochondrial damage initiated through interaction with alphavbeta3 and alphavbeta5 integrins. In: *Cancer research* 65 (10), S. 4353–4361. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3536.
- Magnon, Claire; Opolon, Paule; Ricard, Marcel; Connault, Elisabeth; Ardouin, Patrice; Galaup, Ariane et al. (2007): Radiation and inhibition of angiogenesis by canstatin synergize to induce HIF-1 $\alpha$ -mediated tumor apoptotic switch. In: *Journal of Clinical Investigation* 117 (7), S. 1844–1855. DOI: 10.1172/JCI30269.

- Mahdi, Hiba; Fisher, Benjamin A.; Källberg, Henrik; Plant, Darren; Malmström, Vivianne; Rönnelid, Johan et al. (2009): Specific interaction between genotype, smoking and autoimmunity to citrullinated alpha-enolase in the etiology of rheumatoid arthritis. In: *Nature genetics* 41 (12), S. 1319–1324. DOI: 10.1038/ng.480.
- Mandriota, S. J.; Pepper, M. S. (1998): Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia. In: *Circulation research* 83 (8), S. 852–859. DOI: 10.1161/01.res.83.8.852.
- Marneros, Alexander G.; Olsen, Bjorn R. (2005): Physiological role of collagen XVIII and endostatin. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (7), S. 716–728. DOI: 10.1096/fj.04-2134rev.
- McInnes, Iain B.; Schett, Georg (2011): The pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: *The New England journal of medicine* 365 (23), S. 2205–2219. DOI: 10.1056/nejmra1004965.
- Mellado, Mario; Martínez-Muñoz, Laura; Cascio, Graciela; Lucas, Pilar; Pablos, José L.; Rodríguez-Frade, José Miguel (2015): T Cell Migration in Rheumatoid Arthritis. In: *Frontiers in immunology* 6, S. 384. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00384.
- Mort, J. S.; Billington, C. J. (2001): Articular cartilage and changes in arthritis: matrix degradation. In: *Arthritis research* 3 (6), S. 337–341. DOI: 10.1186/ar325.
- Moulton, Karen S.; Olsen, Bjorn R.; Sonn, Silvia; Fukai, Naomi; Zurakowski, David; Zeng, Xiaokun (2004): Loss of collagen XVIII enhances neovascularization and vascular permeability in atherosclerosis. In: *Circulation* 110 (10), S. 1330–1336. DOI: 10.1161/01.CIR.0000140720.79015.3C.
- Mow, V. C.; Ratcliffe, A.; Poole, A. R. (1992): Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. In: *Biomaterials* 13 (2), S. 67–97. DOI: 10.1016/0142-9612(92)90001-5.
- Müller-Ladner, U.; Kriegsmann, J.; Franklin, B. N.; Matsumoto, S.; Geiler, T.; Gay, R. E.; Gay, S. (1996): Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. In: *The American Journal of Pathology* 149 (5), S. 1607–1615.
- Müller-Ladner, U.; Roberts, C. R.; Franklin, B. N.; Gay, R. E.; Robbins, P. D.; Evans, C. H.; Gay, S. (1997): Human IL-1Ra gene transfer into human synovial fibroblasts is chondroprotective. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 158 (7), S. 3492–3498.
- Müller-Ladner, Ulf (2005): Evidenzbasierte Therapie in der Rheumatologie. 1. Aufl. Bremen: Uni-Med (UNI-MED SCIENCE).
- Mundel, Thomas M.; Kalluri, Raghu (2007): Type IV collagen-derived Angiogenesis Inhibitors. In: *Microvascular research* 74 (0), S. 85–89. DOI: 10.1016/j.mvr.2007.05.005.
- Naba, Alexandra; Clauser, Karl R.; Ding, Huiming; Whittaker, Charles A.; Carr, Steven A.; Hynes, Richard O. (2016): The extracellular matrix: Tools and insights for the "omics" era. In: *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 49, S. 10–24. DOI: 10.1016/j.matbio.2015.06.003.
- Neumann, E.; Judex, M.; Kullmann, F.; Grifka, J.; Robbins, P. D.; Pap, T. et al. (2002): Inhibition of cartilage destruction by double gene transfer of IL-1Ra and IL-10 involves the activin pathway. In: *Gene therapy* 9 (22), S. 1508–1519. DOI: 10.1038/sj.gt.3301811.
- Neumann, Elena; Riepl, Birgit; Knedla, Anette; Lefèvre, Stephanie; Tarner, Ingo H.; Grifka, Joachim et al. (2010): Cell culture and passaging alters gene expression pattern and proliferation rate in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. In: *Arthritis research & therapy* 12 (3), R83. DOI: 10.1186/ar3010.

- Neumann, Elena; Schwarz, Maria C.; Hasseli, Rebecca; Hülser, Marie-Lisa; Classen, Simon; Sauerbier, Michael et al. (2018): Tetraspanin CD82 affects migration, attachment and invasion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. In: *Annals of the rheumatic diseases* 77 (11), S. 1619–1626. DOI: 10.1136/annrheumdis-2018-212954.
- Niki, Yasuo; Yamada, Harumoto; Kikuchi, Toshiyuki; Toyama, Yoshiaki; Matsumoto, Hideo; Fujikawa, Kyosuke; Tada, Norihiro (2004): Membrane-associated IL-1 contributes to chronic synovitis and cartilage destruction in human IL-1 alpha transgenic mice. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 172 (1), S. 577–584. DOI: 10.4049/jimmunol.172.1.577.
- Nishijima, Yasuo; Akamatsu, Yosuke; Weinstein, Phillip R.; Liu, Jialing (2015): Collaterals: Implications in cerebral ischemic diseases and therapeutic interventions. In: *Brain research* 1623, S. 18–29. DOI: 10.1016/j.brainres.2015.03.006.
- Nyberg, Pia; Xie, Liang; Sugimoto, Hikaru; Colorado, Pablo; Sund, Malin; Holthaus, Kathryn et al. (2008): Characterization of the anti-angiogenic properties of arresten, an alpha1beta1 integrin-dependent collagen-derived tumor suppressor. In: *Experimental cell research* 314 (18), S. 3292–3305. DOI: 10.1016/j.yexcr.2008.08.011.
- Oh, S. P.; Kamagata, Y.; Muragaki, Y.; Timmons, S.; Ooshima, A.; Olsen, B. R. (1994a): Isolation and sequencing of cDNAs for proteins with multiple domains of Gly-Xaa-Yaa repeats identify a distinct family of collagenous proteins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (10), S. 4229–4233. DOI: 10.1073/pnas.91.10.4229.
- Oh, S. P.; Warman, M. L.; Seldin, M. F.; Cheng, S. D.; Knoll, J. H.; Timmons, S.; Olsen, B. R. (1994b): Cloning of cDNA and genomic DNA encoding human type XVIII collagen and localization of the alpha 1(XVIII) collagen gene to mouse chromosome 10 and human chromosome 21. In: *Genomics* 19 (3), S. 494–499. DOI: 10.1006/geno.1994.1098.
- Okada, Muneyoshi; Morioka, Suiri; Kanazawa, Hiroki; Yamawaki, Hideyuki (2016): Canstatin inhibits isoproterenol-induced apoptosis through preserving mitochondrial morphology in differentiated H9c2 cardiomyoblasts. In: *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 21 (8), S. 887–895. DOI: 10.1007/s10495-016-1262-1.
- Orr, Carl Kieran; Vieira-Sousa, Elsa; Fonseca, João Eurico; Veale, Douglas (2020): Arthroscopic Guided Synovial Biopsies. In: *Frontiers in medicine* 7, S. 604582. DOI: 10.3389/fmed.2020.604582.
- Ospelt, Caroline; Gay, Steffen; Klein, Kerstin (2017): Epigenetics in the pathogenesis of RA. In: *Seminars in immunopathology* 39 (4), S. 409–419. DOI: 10.1007/s00281-017-0621-5.
- Ouboussad, Lylia; Burska, Agata N.; Melville, Andrew; Buch, Maya H. (2019): Synovial Tissue Heterogeneity in Rheumatoid Arthritis and Changes With Biologic and Targeted Synthetic Therapies to Inform Stratified Therapy. In: *Frontiers in medicine* 6, S. 45. DOI: 10.3389/fmed.2019.00045.
- Pákozdi, Angéla; Besenyi, Tímea; Paragh, György; Koch, Alisa E.; Szekanecz, Zoltán (2009): Endothelial progenitor cells in arthritis-associated vasculogenesis and atherosclerosis. In: *Joint bone spine* 76 (6), S. 581–583. DOI: 10.1016/j.jbspin.2009.04.007.
- Paleolog, Ewa (2005): It's all in the blood: circulating endothelial progenitor cells link synovial vascularity with cardiovascular mortality in rheumatoid arthritis? In: *Arthritis research & therapy* 7 (6), S. 270–272. DOI: 10.1186/ar1850.
- Panka, David J.; Mier, James W. (2003): Canstatin inhibits Akt activation and induces Fas-dependent apoptosis in endothelial cells. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (39), S. 37632–37636. DOI: 10.1074/jbc.M307339200.

- Pap, T.; Franz, J. K.; Hummel, K. M.; Jeisy, E.; Gay, R.; Gay, S. (2000): Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis: lack of Expression of the tumour suppressor PTEN at sites of invasive growth and destruction. In: *Arthritis research* 2 (1), S. 59–64. DOI: 10.1186/ar69.
- Pap, Thomas; Nawrath, Michael; Heinrich, Jochen; Bosse, Magnus; Baier, Anja; Hummel, Klaus M. et al. (2004): Cooperation of Ras- and c-Myc-dependent pathways in regulating the growth and invasiveness of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. In: *Arthritis & Rheumatism* 50 (9), S. 2794–2802. DOI: 10.1002/art.20461.
- Peichev, M.; Naiyer, A. J.; Pereira, D.; Zhu, Z.; Lane, W. J.; Williams, M. et al. (2000): Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. In: *Blood* 95 (3), S. 952–958.
- Phng, L-K; Gerhardt, Holger (2009): Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. In: *Developmental cell* 16 (2), S. 196–208. DOI: 10.1016/j.devcel.2009.01.015.
- Pierer, Matthias; Rethage, Janine; Seibl, Reinhart; Lauener, Roger; Brentano, Fabia; Wagner, Ulf et al. (2004): Chemokine secretion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts stimulated by Toll-like receptor 2 ligands. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 172 (2), S. 1256–1265. DOI: 10.4049/jimmunol.172.2.1256.
- Pitsillides, A. A.; Ashhurst, Doreen E. (2008): A critical evaluation of specific aspects of joint development. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 237 (9), S. 2284–2294. DOI: 10.1002/dvdy.21654.
- Pitulescu, Mara E.; Adams, Ralf H. (2010): Eph/ephrin molecules--a hub for signaling and endocytosis. In: *Genes & development* 24 (22), S. 2480–2492. DOI: 10.1101/gad.1973910.
- Pitzalis, Costantino; Kelly, Stephen; Humby, Frances (2013): New learnings on the pathophysiology of RA from synovial biopsies. In: *Current opinion in rheumatology* 25 (3), S. 334–344. DOI: 10.1097/BOR.0b013e32835fd8eb.
- Poduval, P.; Sillat, T.; Beklen, A.; Kouri, V. P.; Virtanen, I.; Konttinen, Y. T. (2007): Type IV collagen alpha-chain composition in synovial lining from trauma patients and patients with rheumatoid arthritis. In: *Arthritis & Rheumatism* 56 (12), S. 3959–3967. DOI: 10.1002/art.23072.
- Poole, C. A.; Honda, T.; Skinner, S. J.; Schofield, J. R.; Hyde, K. F.; Shinkai, H. (1990): Chondrons from articular cartilage (II): Analysis of the glycosaminoglycans in the cellular microenvironment of isolated canine chondrons. In: *Connective tissue research* 24 (3-4), S. 319–330. DOI: 10.3109/03008209009152158.
- Potente, Michael; Gerhardt, Holger; Carmeliet, Peter (2011): Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. In: *Cell* 146 (6), S. 873–887. DOI: 10.1016/j.cell.2011.08.039.
- Pulkkinen, H. H.; Kiema, M.; Lappalainen, J. P.; Toropainen, A.; Beter, M.; Tirronen, A. et al. (2021): BMP6/TAZ-Hippo signaling modulates angiogenesis and endothelial cell response to VEGF. In: *Angiogenesis* 24 (1), S. 129–144. DOI: 10.1007/s10456-020-09748-4.
- Ray, Ayan; Singh, Pratik Narendra Pratap; Sohaskey, Michael L.; Harland, Richard M.; Bandyopadhyay, Amitabha (2015): Precise spatial restriction of BMP signaling is essential for articular cartilage differentiation. In: *Development (Cambridge, England)* 142 (6), S. 1169–1179. DOI: 10.1242/dev.110940.
- Raza, Karim; Falciani, Francesco; Curnow, S. John; Ross, Emma J.; Lee, Chi-Yeung; Akbar, Arne N. et al. (2005): Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine

- profile of T cell and stromal cell origin. In: *Arthritis research & therapy* 7 (4), R784-95. DOI: 10.1186/ar1733.
- Rebustini, Ivan T.; Myers, Christopher; Lassiter, Keyonica S.; Surmak, Andrew; Szabova, Ludmila; Holmbeck, Kenn et al. (2009): MT2-MMP-dependent release of collagen IV NC1 domains regulates submandibular gland branching morphogenesis. In: *Developmental cell* 17 (4), S. 482–493. DOI: 10.1016/j.devcel.2009.07.016.
- Rege, Abhishek; Thakor, Nitish V.; Rhie, Kevin; Pathak, Arvind P. (2012): In vivo laser speckle imaging reveals microvascular remodeling and hemodynamic changes during wound healing angiogenesis. In: *Angiogenesis* 15 (1), S. 87–98. DOI: 10.1007/s10456-011-9245-x.
- Rehn, M. (2001): Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (3), S. 1024–1029. DOI: 10.1073/pnas.031564998.
- Reich, Nicole; Beyer, Christian; Gelse, Kolja; Akhmetshina, Alfiya; Dees, Clara; Zwerina, Jochen et al. (2011): Microparticles stimulate angiogenesis by inducing ELR(+) CXC-chemokines in synovial fibroblasts. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 15 (4), S. 756–762. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2010.01051.x.
- Rendt, K. E.; Barry, T. S.; Jones, D. M.; Richter, C. B.; McCachren, S. S.; Haynes, B. F. (1993): Engraftment of human synovium into severe combined immune deficient mice. Migration of human peripheral blood T cells to engrafted human synovium and to mouse lymph nodes. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 151 (12), S. 7324–7336.
- Risau, W.; Flamme, I. (1995): Vasculogenesis. In: *Annual review of cell and developmental biology* 11, S. 73–91. DOI: 10.1146/annurev.cb.11.110195.000445.
- Rivellese, Felice; Rossi, Francesca Wanda; Galdiero, Maria Rosaria; Pitzalis, Costantino; Paulis, Amato de (2019): Mast Cells in Early Rheumatoid Arthritis. In: *International journal of molecular sciences* 20 (8). DOI: 10.3390/ijms20082040.
- Rizzi, Anna; Benagiano, Vincenzo; Ribatti, Domenico (2017): Angiogenesis versus arteriogenesis. In: *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie* 58 (1), S. 15–19.
- Ropes, Marian W.; Bennett, Granville A.; Cobb, Sidney; Jacox, Ralph; Jessar, Ralph A. (1959): 1958 Revision of diagnostic criteria for rheumatoid arthritis. In: *Arthritis & Rheumatism* 2 (1), S. 16–20. DOI: 10.1002/1529-0131(195902)2:1<16::AID-ART1780020104>3.0.CO;2-9.
- Ruland, Jürgen (2011): Return to homeostasis: downregulation of NF-κB responses. In: *Nature immunology* 12 (8), S. 709–714. DOI: 10.1038/ni.2055.
- Salva, Joanna E.; Merrill, Amy E. (2017): Signaling networks in joint development. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 246 (4), S. 262–274. DOI: 10.1002/dvdy.24472.
- Schaper, Wolfgang (2009): Collateral circulation: past and present. In: *Basic Research in Cardiology* 104 (1), S. 5–21. DOI: 10.1007/s00395-008-0760-x.
- Schirmer, S. H.; van Nooijen, F. C.; Piek, J. J.; van Royen, N. (2009): Stimulation of collateral artery growth: travelling further down the road to clinical application. In: *Heart (British Cardiac Society)* 95 (3), S. 191–197. DOI: 10.1136/hrt.2007.136119.

- Scholz, Alexander; Plate, Karl H.; Reiss, Yvonne (2015): Angiopoietin-2: a multifaceted cytokine that functions in both angiogenesis and inflammation. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1347, S. 45–51. DOI: 10.1111/nyas.12726.
- Scholz, D.; Ito, W.; Fleming, I.; Deindl, E.; Sauer, A.; Wiesnet, M. et al. (2000): Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis). In: *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 436 (3), S. 257–270. DOI: 10.1007/s004280050039.
- Scott, David L.; Wolfe, Frederick; Huizinga, Tom W. J. (2010): Rheumatoid arthritis. In: *The Lancet* 376 (9746), S. 1094–1108. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60826-4.
- Seeley, J. J.; Ghosh, S. (2013): Tolerization of Inflammatory Gene Expression. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 78 (0), S. 69–79. DOI: 10.1101/sqb.78.020040.
- Seftor, Richard E. B.; Hess, Angela R.; Seftor, Elisabeth A.; Kirschmann, Dawn A.; Hardy, Katharine M.; Margaryan, Naira V.; Hendrix, Mary J. C. (2012): Tumor cell vasculogenic mimicry: from controversy to therapeutic promise. In: *The American Journal of Pathology* 181 (4), S. 1115–1125. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.07.013.
- Shams, Forough; Moravej, Hamideh; Hosseinzadeh, Simzar; Mostafavi, Ebrahim; Bayat, Hadi; Kazemi, Bahram et al. (2022): Overexpression of VEGF in dermal fibroblast cells accelerates the angiogenesis and wound healing function: in vitro and in vivo studies. In: *Scientific reports* 12 (1), S. 18529. DOI: 10.1038/s41598-022-23304-8.
- Silman, A. J. (1994): Epidemiology of rheumatoid arthritis. In: *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 102 (10), S. 721–728. DOI: 10.1111/j.1699-0463.1994.tb05226.x.
- Singh, J. A.; Arayssi, T.; Duray, P.; Schumacher, H. R. (2004): Immunohistochemistry of normal human knee synovium: a quantitative study. In: *Annals of the rheumatic diseases* 63 (7), S. 785–790. DOI: 10.1136/ard.2003.013383.
- Smith, Malcolm D. (2011): The normal synovium. In: *The open rheumatology journal* 5, S. 100–106. DOI: 10.2174/1874312901105010100.
- Smith, Malcolm D.; Wechalekar, Mihir D. (2015): The synovium. In: *Rheumatology: Sixth Edition*, S. 27–32. DOI: 10.1016/B978-0-323-09138-1.00004-8.
- Smolen, Josef S.; Aletaha, Daniel; Barton, Anne; Burmester, Gerd R.; Emery, Paul; Firestein, Gary S. et al. (2018): Rheumatoid arthritis. In: *Nature reviews. Disease primers* 4, S. 18001. DOI: 10.1038/nrdp.2018.1.
- Smolen, Josef S.; Aletaha, Daniel; McInnes, Iain B. (2016): Rheumatoid arthritis. In: *The Lancet* 388 (10055), S. 2023–2038. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)30173-8.
- Stockwell, R. A. (1967): The cell density of human articular and costal cartilage. In: *Journal of Anatomy* 101 (Pt 4), S. 753–763.
- Storey, G. O.; Comer, M.; Scott, D. L. (1994): Chronic arthritis before 1876: early British cases suggesting rheumatoid arthritis. In: *Annals of the rheumatic diseases* 53 (9), S. 557–560. DOI: 10.1136/ard.53.9.557.
- Sudhakar, Akulapalli; Sugimoto, Hikaru; Yang, Changqing; Lively, Julie; Zeisberg, Michael; Kalluri, Raghu (2003): Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (8), S. 4766–4771. DOI: 10.1073/pnas.0730882100.

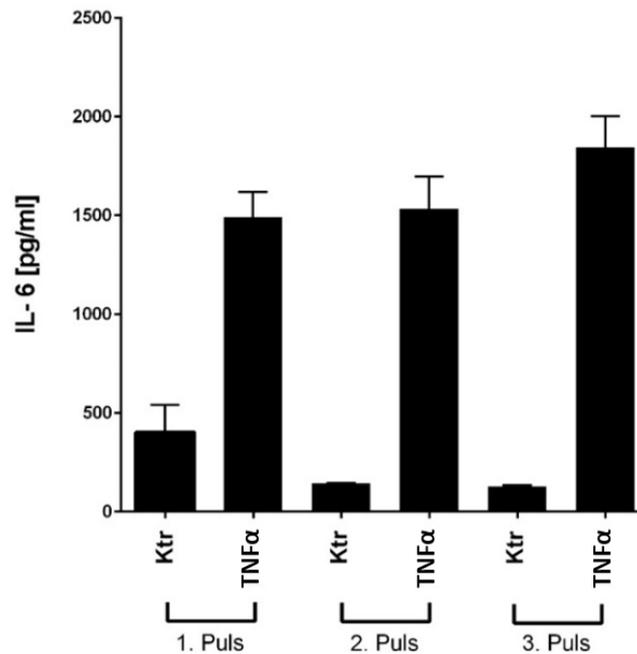
- Sumpio, Bauer E.; Riley, J. Timothy; Dardik, Alan (2002): Cells in focus: endothelial cell. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 34 (12), S. 1508–1512. DOI: 10.1016/s1357-2725(02)00075-4.
- Symmons, D.; Turner, G.; Webb, R.; Asten, P.; Barrett, E.; Lunt, M. et al. (2002): The prevalence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: new estimates for a new century. In: *Rheumatology (Oxford, England)* 41 (7), S. 793–800. DOI: 10.1093/rheumatology/41.7.793.
- Theocharis, Achilleas D.; Skandalis, Spyros S.; Gialeli, Chrysostomi; Karamanos, Nikos K. (2016): Extracellular matrix structure. In: *Advanced drug delivery reviews* 97, S. 4–27. DOI: 10.1016/j.addr.2015.11.001.
- Thomas, Markus; Felcht, Moritz; Kruse, Karoline; Kretschmer, Stella; Deppermann, Carleen; Biesdorf, Andreas et al. (2010): Angiopoietin-2 stimulation of endothelial cells induces alphavbeta3 integrin internalization and degradation. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (31), S. 23842–23849. DOI: 10.1074/jbc.M109.097543.
- Thurston, Gavin; Noguera-Troise, Irene; Yancopoulos, George D. (2007): The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth. In: *Nature reviews. Cancer* 7 (5), S. 327–331. DOI: 10.1038/nrc2130.
- Trimm, Emily; Red-Horse, Kristy (2023): Vascular endothelial cell development and diversity. In: *Nature reviews. Cardiology* 20 (3), S. 197–210. DOI: 10.1038/s41569-022-00770-1.
- Tunyogi-Csapo, Miklos; Kis-Toth, Katalin; Radacs, Marianna; Farkas, Balint; Jacobs, Joshua J.; Finnegan, Alison et al. (2008): Cytokine-controlled RANKL and osteoprotegerin expression by human and mouse synovial fibroblasts: fibroblast-mediated pathologic bone resorption. In: *Arthritis & Rheumatism* 58 (8), S. 2397–2408. DOI: 10.1002/art.23653.
- Ungerleider, Jessica L.; Johnson, Todd D.; Hernandez, Melissa J.; Elhag, Dean I.; Braden, Rebecca L.; Dzieciatkowska, Monika et al. (2016): Extracellular Matrix Hydrogel Promotes Tissue Remodeling, Arteriogenesis, and Perfusion in a Rat Hindlimb Ischemia Model. In: *JACC. Basic to translational science* 1 (1-2), S. 32–44. DOI: 10.1016/j.jacbts.2016.01.009.
- Urbantat, Ruth M.; Blank, Anne; Kremenetskaia, Irina; Vajkoczy, Peter; Acker, Güliz; Brandenburg, Susan (2021): The CXCL2/IL8/CXCR2 Pathway Is Relevant for Brain Tumor Malignancy and Endothelial Cell Function. In: *International journal of molecular sciences* 22 (5). DOI: 10.3390/ijms22052634.
- Urbich, Carmen; Reissner, Agnes; Chavakis, Emmanouil; Dernbach, Elisabeth; Haendeler, Judith; Fleming, Ingrid et al. (2002): Dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase contributes to the anti-angiogenic effects of endostatin. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16 (7), S. 706–708. DOI: 10.1096/fj.01-0637fje.
- van Hamburg, Jan Piet; Tas, Sander W. (2018): Molecular mechanisms underpinning T helper 17 cell heterogeneity and functions in rheumatoid arthritis. In: *Journal of autoimmunity* 87, S. 69–81. DOI: 10.1016/j.jaut.2017.12.006.
- van Loo, Geert; Beyaert, Rudi (2011): Negative regulation of NF- $\kappa$ B and its involvement in rheumatoid arthritis. In: *Arthritis research & therapy* 13 (3), S. 221. DOI: 10.1186/ar3324.
- van Royen, Niels; Hofer, Imo; Buschmann, Ivo; Heil, Matthias; Kostin, Sawa; Deindl, Elisabeth et al. (2002): Exogenous application of transforming growth factor beta 1 stimulates arteriogenesis in the peripheral circulation. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16 (3), S. 432–434. DOI: 10.1096/fj.01-0563fje.

- Vandenabeele, F.; Bari, C. de; Moreels, M.; Lambrichts, I.; Dell'Accio, F.; Lippens, P. L.; Luyten, F. P. (2003): Morphological and immunocytochemical characterization of cultured fibroblast-like cells derived from adult human synovial membrane. In: *Archives of histology and cytology* 66 (2), S. 145–153. DOI: 10.1679/aohc.66.145.
- Visse, Robert; Nagase, Hideaki (2003): Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. In: *Circulation research* 92 (8), S. 827–839. DOI: 10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D.
- Wada, Takuma Tsuzuki; Araki, Yasuto; Sato, Kojiro; Aizaki, Yoshimi; Yokota, Kazuhiro; Kim, Yoon Taek et al. (2014): Aberrant histone acetylation contributes to elevated interleukin-6 production in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. In: *Biochemical and biophysical research communications* 444 (4), S. 682–686. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.01.195.
- Walker-Bone, Karen; Farrow, Sarah (2007): Rheumatoid arthritis. In: *BMJ clinical evidence* 2007.
- Wang, Yan; Wu, Hong; Deng, Ran (2021): Angiogenesis as a potential treatment strategy for rheumatoid arthritis. In: *European journal of pharmacology* 910, S. 174500. DOI: 10.1016/j.ejphar.2021.174500.
- Wei, Kevin; Nguyen, Hung N.; Brenner, Michael B. (2021): Fibroblast pathology in inflammatory diseases. In: *The Journal of clinical investigation* 131 (20). DOI: 10.1172/JCI149538.
- Wei, L.; Erinjeri, J. P.; Rovainen, C. M.; Woolsey, T. A. (2001): Collateral growth and angiogenesis around cortical stroke. In: *Stroke* 32 (9), S. 2179–2184. DOI: 10.1161/hs0901.094282.
- Wen, W.; Moses, M. A.; Wiederschain, D.; Arbiser, J. L.; Folkman, J. (1999): The generation of endostatin is mediated by elastase. In: *Cancer research* 59 (24), S. 6052–6056.
- Werner, Sabine; Krieg, Thomas; Smola, Hans (2007): Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. In: *The Journal of investigative dermatology* 127 (5), S. 998–1008. DOI: 10.1038/sj.jid.5700786.
- Westra, Johanna; Groot, Lodewijk de; Plaxton, Shannon L.; Brouwer, Elisabeth; Posthumus, Marcel D.; Kallenberg, Cornelis G. M.; Bijl, Marc (2011): Angiotensin-2 is highly correlated with inflammation and disease activity in recent-onset rheumatoid arthritis and could be predictive for cardiovascular disease. In: *Rheumatology* 50 (4), S. 665–673. DOI: 10.1093/rheumatology/keq378.
- Wilkinson, L. S.; Pitsillides, A. A.; Worrall, J. G.; Edwards, J. C. (1992): Light microscopic characterization of the fibroblast-like synovial intimal cell (synoviocyte). In: *Arthritis & Rheumatism* 35 (10), S. 1179–1184. DOI: 10.1002/art.1780351010.
- Wu, Jen-Chine; Yan, Horng-Chin; Chen, Wei-Teing; Chen, Wei-Hwa; Wang, Chia-Jen; Chi, Ying-Chih; Kao, Woei-Yau (2008): JNK signaling pathway is required for bFGF-mediated surface cadherin downregulation on HUVEC. In: *Experimental cell research* 314 (3), S. 421–429. DOI: 10.1016/j.yexcr.2007.10.002.
- Wu, Qian; Xu, Wang-Dong; Huang, An-Fang (2020): Role of angiotensin-2 in inflammatory autoimmune diseases: A comprehensive review. In: *International immunopharmacology* 80, S. 106223. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106223.
- Xia, Bingjiang; Di Chen; Zhang, Jushi; Hu, Songfeng; Jin, Hongting; Tong, Peijian (2014): Osteoarthritis pathogenesis: a review of molecular mechanisms. In: *Calcified tissue international* 95 (6), S. 495–505. DOI: 10.1007/s00223-014-9917-9.
- Xing, Ya-Nan; Deng, Peng; Xu, Hui-Mian (2014): Canstatin induces apoptosis in gastric cancer xenograft growth in mice through the mitochondrial apoptotic pathway. In: *Bioscience reports* 34 (2). DOI: 10.1042/BSR20140012.

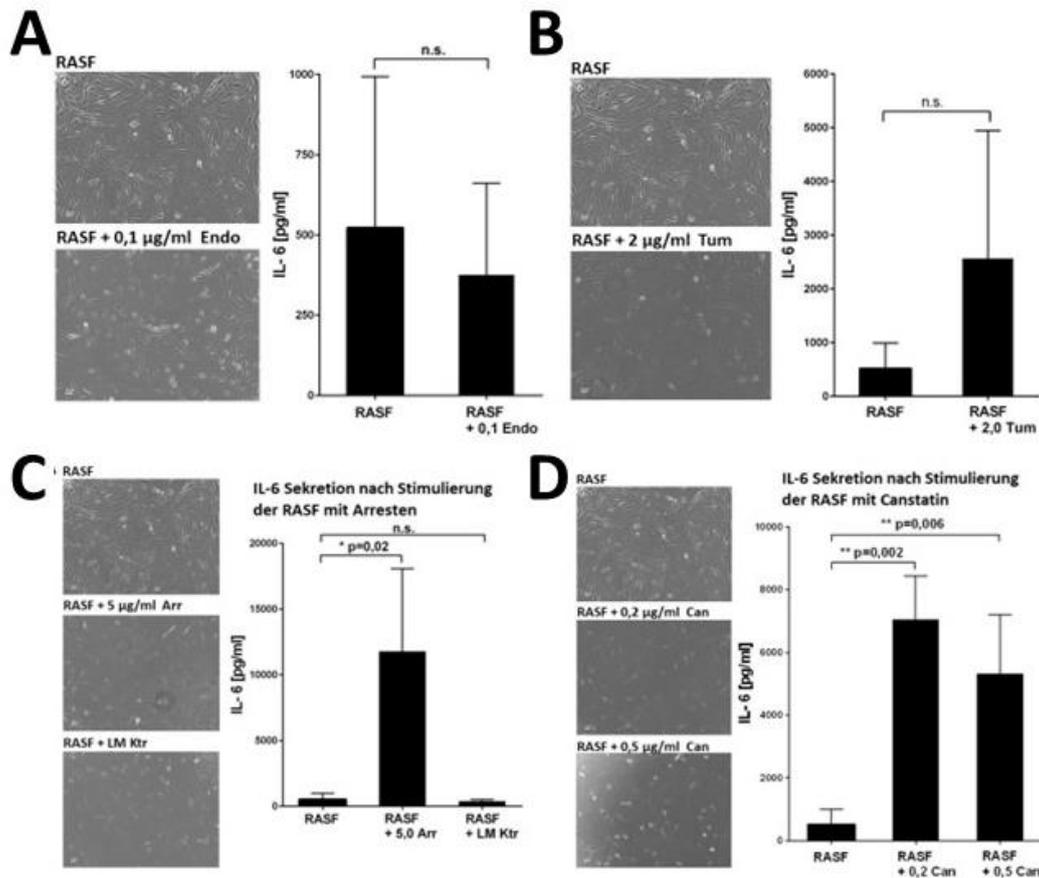
- Xu, Wen-Jing; Huang, Chun; Wang, Jing; Jiang, Ri-Cheng; Wang, Liu-Chun; Lin, Li et al. (2011): Comparison of the effects of recombinant human endostatin and docetaxel on human umbilical vein endothelial cells in different growth states. In: *Chinese medical journal* 124 (18), S. 2883–2889.
- Yamaguchi, Kosuke; Sudo, Haruka; Imai, Kazushi (2019): Vascular endothelial growth factor signaling in VE-cadherin expression and tube-like formation by rheumatoid arthritic synovial fibroblast-like cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 508 (2), S. 405–409. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.11.116.
- Ye, Hua; Fu, Dongdong; Fang, Xiangyu; Xie, Yang; Zheng, Xi; Fan, Wenqiang et al. (2021): Casein Kinase II exacerbates rheumatoid arthritis via promoting Th1 and Th17 cell inflammatory responses. In: *Expert opinion on therapeutic targets* 25 (11), S. 1017–1024. DOI: 10.1080/14728222.2021.2010190.
- Yoo, Seung-Ah; Kwok, Seung-Ki; Kim, Wan-Uk (2008): Proinflammatory role of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: prospects for therapeutic intervention. In: *Mediators of inflammation* 2008, S. 129873. DOI: 10.1155/2008/129873.
- Yu, Xiaolan; Sha, Jingfeng; Xiang, Shao; Qin, Sanhai; Conrad, Patricia; Ghosh, Santosh K. et al. (2016): Suppression of KSHV-induced angiopoietin-2 inhibits angiogenesis, infiltration of inflammatory cells, and tumor growth. In: *Cell Cycle* 15 (15), S. 2053–2065. DOI: 10.1080/15384101.2016.1196303.
- Zaferani, Azadeh; Talsma, Ditmer T.; Yazdani, Saleh; Celie, Johanna W. A. M.; Aikio, Mari; Heljasvaara, Ritva et al. (2014): Basement membrane zone collagens XV and XVIII/proteoglycans mediate leukocyte influx in renal ischemia/reperfusion. In: *PloS one* 9 (9), e106732. DOI: 10.1371/journal.pone.0106732.
- Zeng, Z. S.; Cohen, A. M.; Guillem, J. G. (1999): Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis. In: *Carcinogenesis* 20 (5), S. 749–755. DOI: 10.1093/carcin/20.5.749.
- Zhang, Hua; Chalothorn, Dan; Faber, James E. (2019): Collateral Vessels Have Unique Endothelial and Smooth Muscle Cell Phenotypes. In: *International journal of molecular sciences* 20 (15). DOI: 10.3390/ijms20153608.
- Zhang, Juan; Li, Chunling; Zheng, Yining; Lin, Zhiguo; Zhang, Yue; Zhang, Zhiyi (2017): Inhibition of angiogenesis by arsenic trioxide via TSP-1-TGF- $\beta$ 1-CTGF-VEGF functional module in rheumatoid arthritis. In: *Oncotarget* 8 (43), S. 73529–73546. DOI: 10.18632/oncotarget.19867.
- Zhu, Lingyu; Guo, Zitao; Zhang, Ji; Yang, Yuliang; Liu, Chunyu; Zhang, Liang et al. (2022): Recombinant Human Arresten and Canstatin Inhibit Angiogenic Behaviors of HUVECs via Inhibiting the PI3K/Akt Signaling Pathway. In: *International journal of molecular sciences* 23 (16). DOI: 10.3390/ijms23168995.
- Zimmermann, Birgit (2011): Charakterisierung der transendothelialen Migration von synovialen Fibroblasten bei der rheumatoiden Arthritis. Online verfügbar unter <http://d-nb.info/106311070X/34>.
- Zimmermann-Geller, Birgit; Köppert, Sina; Kesel, Nina; Hasseli, Rebecca; Ullrich, Sebastian; Lefèvre, Stephanie et al. (2019): Interactions between rheumatoid arthritis synovial fibroblast migration and endothelial cells. In: *Immunology and cell biology* 97 (2), S. 178–189. DOI: 10.1111/imcb.12208.

## 10. ANHANG

### 10.1 Ergänzende Abbildungen



**Abbildung 54:** IL-6-Sekretion im Verlauf der repetitiven Stimulierung der RASF mit TNF $\alpha$ . Die RASF wurden 3-mal für jeweils 16 h mit 0,05 ng/ml TNF $\alpha$  stimuliert, zwischen den Stimulierungsphasen erhielten die Zellen eine jeweils 8-stündige Erholungsphase. Die Aktivierung der RASF wurde mittels IL-6 ELISA nachgewiesen. Die erste Stimulierung (= 1. Puls) zeigte wie erwartet eine Induktion der IL-6-Sekretion im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle (Ktr). Die zwei- und dreimalige Stimulierung (= 2. und 3. Puls) bewirkte eine ähnliche IL-6-Sekretion im Vergleich zum 1. Puls. Dargestellt sind die Mittelwerte 3 technischer Replikate (n=3) mit ihren Standardabweichungen.



**Abbildung 55:** Stimulierung der RASF mit Endostatin (A), Tumstatin (B), Arresten (C) und Canstatin (D). (A) Endostatin: Die RASF wurden mit 0,1 µg/ml Endostatin (Endo) für 24 h stimuliert. Morphologisch zeigte sich ein leichter Proliferationsunterschied zur unstimulierten Kontrolle. Die Aktivierung der RASF wurde mittels Bestimmung der IL-6-Konzentration im Überstand bestimmt. Endostatin bewirkte keine erhöhte IL-6-Sekretion der RASF. (B) Tumstatin: Die RASF wurden mit 2 µg/ml Tumstatin stimuliert. Morphologisch zeigte sich ein Proliferationsunterschied zur unstimulierten Kontrolle. Tumstatin bewirkte eine erhöhte, nicht signifikante, IL-6-Sekretion der RASF. (C) Arresten mit dem Lösemittel 20mM Tris, 150mM NaCl (pH = 8.0). Die RASF wurden mit 5 µg/ml Arresten stimuliert. Morphologisch zeigte sich mit Arresten sowie der Lösemittelkontrolle (LM Ktr) ein großer Proliferationsunterschied zur unstimulierten Kontrolle. Arresten bewirkte im Gegensatz zur LM Ktr eine signifikante IL-6-Sekretion der RASF ( $p = 0,02$ ). (D) Canstatin: Die RASF wurden mit 0,2 und 0,5 µg/ml Canstatin für 24 h stimuliert. Morphologisch zeigten sich nach der Stimulierung mit Canstatin vermehrt kugelförmige Zellen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, was auf vermehrte Apoptose hindeutet. Beide Canstatin-Konzentrationen bewirkten eine signifikante IL-6-Sekretion der RASF ( $p = 0,002$  und  $p = 0,006$ ). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der IL-6-Konzentrationen inkl. Standardabweichungen. Für die statistischen Analysen wurde für Endostatin und Tumstatin der Mann Whitney U-Test, für Arresten und Canstatin der H-Test nach Kruskal und Wallis inkl. der Dunn's Multiparameter-Korrektur angewendet. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet, n.s.: nicht signifikant ( $n = 3$ ).

## 10.2 Wissenschaftliche Publikationen

### Originaltitel

Neumann E, Heck C, Müller-Ladner U. Recent developments in the synovial fibroblast pathobiology field in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2023, doi: 10.1097/BOR.0000000000000978

### Kongressbeiträge

Bei Erstautorenschaft wurde der Vortrag bzw. das Poster selbst präsentiert.

Heck C, Kürsammer D., Frommer K., Arnold M., Rehart S., Müller-Ladner U., Neumann E. Rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and collagen IV alpha 2 alter neovascularization *in vitro*. EWRR 2022 (Poster)

Heck C, Kürsammer D., Frommer K., Arnold M., Rehart S., Müller-Ladner U., Neumann E. Rheumatoide Arthritis synoviale Fibroblasten (RASf) und Canstatin verändern die Neovaskularisierung *in vivo* und *in vitro*. Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie, 2022 (Vortrag und Poster)

Heck C, Kürsammer D., Frommer K., Arnold M., Rehart S., Müller-Ladner U., Neumann E. Neovascularization is altered by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and canstatin *in vitro* and *in vivo*. American College of Rheumatology, 2022 (Poster)

Heck C, Kürsammer D., Frommer K., Arnold M., Rehart S., Müller-Ladner U., Neumann E. Neovascularization and angiopoietin-2 are altered by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and canstatin *in vitro* and *in vivo*. Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin, 2023 (Poster)

Haun S., Heck C, Frommer K., Kürsammer D., Rehart S., Müller-Ladner U., Neumann E. Impact of chronic inflammation on synovial fibroblasts regarding angiogenesis. Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin, 2023 (Poster)

Inderthal A., Knothe A., Frommer K., Heck C, Arnold M., Tarner I., Hermann W., Meneses C., Müller-Ladner U., Hasseli R., Neumann E. Untersuchung ausgewählter Autoantikörper bei Psoriasis Arthritis und deren Assoziation mit Komorbiditäten. Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin, 2023 (Poster)

Knothe A., Hermann K., Frommer K., Inderthal A., Heck C, Arnold M., Tarner I., Hermann W., Meneses C., Neumann E., Müller-Ladner U., Hasseli R. Ultrasound as a tool for early detection of juxtaarticular new bone formation in psoriatic arthritis and the association of selected biomarkers with new bone formation. Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin, 2023 (Poster)

Heck C, Haun S., Kürsammer D., Frommer K., Arnold M., Rehart S., Müller-Ladner U., Neumann E. Impact of chronic inflammation and collagen IV fragment canstatin on rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and endothelial cell interactions *in vitro* and *in vivo*. Annual European Congress of Rheumatology, 2023 (Vortrag)

Arnold M., Rehart S., Sauerbier M., Biehl C., Heck C., Müller-Ladner U., Neumann E. Focal adhesion proteins kindling 1,2 and talin-1 are regulated in IL-1 $\beta$  stimulated rheumatoid arthritis synovial fibroblast. Annual European Congress of Rheumatology, 2023 (Poster)

Inderthal A., Knothe A., Frommer K., Heck C., Arnold M., Tarner I., Hermann W., Meneses C., Müller-Ladner U., Hasseli R., Neumann E. Investigation of selected autoantibodies in psoriatic arthritis and their association with comorbidities. Annual European Congress of Rheumatology, 2023 (Abstract-Band)

Knothe A., Hermann K., Frommer K., Inderthal A., Heck C., Arnold M., Tarner I., Hermann W., Meneses C., Neumann E., Müller-Ladner U., Hasseli R. Ultrasound as a tool for early detection of juxtaarticular new bone formation in psoriatic arthritis and the association of selected biomarkers with new bone formation. Annual European Congress of Rheumatology, 2023 (Abstract-Band)

Heck C., Haun S., Kürsammer D., Frommer K., Arnold M., Rickert M., Lips K., Rehart S., Müller-Ladner U., Neumann E. Canstatin as a potential therapeutic molecule for rheumatoid arthritis synovial fibroblast mediated altered angiogenesis. Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie, 2023 (Poster)

Inderthal A., Knothe A., Frommer K., Heck C., Arnold M., Tarner I., Hermann W., Meneses C., Müller-Ladner U., Hasseli R., Neumann E. Untersuchung ausgewählter Autoantikörper bei Psoriasis Arthritis und deren Assoziation mit Komorbiditäten. Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie, 2023 (Poster)

Knothe A., Hermann K., Frommer K., Inderthal A., Heck C., Arnold M., Tarner I., Hermann W., Meneses C., Neumann E., Müller-Ladner U., Hasseli R. Ultraschalldiagnostik als mögliches Tool zur Detektion von Osteoproliferationen bei Psoriasis Arthritis und mögliche Assoziation ausgewählter Autoantikörper mit Osteoproliferationen. Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie, 2023 (Poster)

Knothe A., Hermann K., Weise T., Frommer K., Inderthal A., Heck C., Arnold M., Tarner I., Hermann W., Meneses C., Neumann E., Müller-Ladner U., Hasseli R. Ultraschalldiagnostik als mögliches Tool zur Detektion von Osteoproliferationen bei Psoriasis Arthritis. Deutsche Gesellschaft für Ultraschall in der Medizin, 2023

Huber M., Franke J., Knothe A., Heck C., Müller-Ladner U., Lange U., Tarner I. Therapierefraktärer muskuloskelettaler Schmerz – es muss nicht immer Rheuma sein. Osteologie 2023; 32(03): S10

Heck C., Haun S., Kürsammer D., Frommer K., Arnold M., Rickert M., Lips K., Rehart S., Müller-Ladner U., Neumann E. Chronic inflammation and collagen IV fragment canstatin influence rheumatoid arthritis synovial fibroblast and endothelial cell interactions *in vitro* and *in vivo*. American College of Rheumatologie, 2023 (Poster, nicht selbst präsentiert)

## 11. VERZEICHNISSE

### 11.1 Abkürzungsverzeichnis

|                    |   |
|--------------------|---|
| µg                 | Mikrogramm                                      |
| µl                 | Mikroliter                                      |
| µm                 | Mikrometer                                      |
| 2D                 | Zweidimensional                                 |
| 3D                 | Dreidimensional                                 |
| ACPA               | anti-citrullinierte Protein-Antikörper          |
| ACR                | Engl. <i>American College of Rheumatology</i>   |
| AEC                | Aminoethylcarbazol                              |
| AMV                | Avian Myeloblastosis Virus                      |
| ANGPT              | Angiopoietin                                    |
| Arr                | Arresten  |
| bFGF               | Engl. <i>basic fibroblast growth factor</i>     |
| bp                 | Basenpaare                                      |
| BSA                | Bovines Serum Albumin                           |
| bzw.               | Beziehungsweise                                 |
| Can                | Canstatin                                       |
| cDNA               | komplementäre DNA                               |
| Cm                 | Zentimeter                                      |
| CO <sub>2</sub>    | Kohlenstoffdioxid                               |
| COL4A1             | Arresten  |
| COL4A2             | Canstatin                                       |
| COL4A3             | Tumstatin                                       |
| CRP                | C-reaktives Protein                             |
| ct                 | Engl. <i>cycle treshold</i>                     |
| CXCL               | Chemokin  |
| DAPI               | 4',6'-diamidino-2-phenyl indole                 |
| ddH <sub>2</sub> O | (doppelt destilliertes) Wasser                  |
| DEG                | Differentiell exprimierte Gene                  |
| DLL4               | Delta-like 4 Ligand                             |
| DMEM               | Engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> |
| DMSO               | Dimethylsulfoxid                                |
| DNA                | Desoxyribonukleinsäure                          |
| dNTP               | Desoxyribonukleosidtriphosphate                 |
| ECM2               | Engl. <i>Endothelial cell growth medium 2</i>   |
| EDTA               | Ethylendiamintetraessigsäure                    |
| EFNB2              | Ephrin-B2                                       |
| EGF                | Engl. <i>epidermal growth factor</i>            |
| ELISA              | Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay               |
| Endo               | Endostatin                                      |
| eNOS               | Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase         |
| EPZ                | Endothelvorläuferzellen                         |
| EU                 | Engl. <i>endotoxin units</i>                    |
| EZ                 | Endothelzell(en)                                |
| EZM                | Extrazelluläre Matrix                           |
| FCS                | Fötales Kälberserum                             |
| g                  | Gramm, Zentrifugalbeschleunigung                |
| GFR                | Wachstumsfaktor-reduziert                       |

|        |   |
|--------|---|
| h      | Stunde  |
| HE     | Hämatxyolin-Eosin   |
| HEPES  | 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure                             |
| HRP    | Meerrettichperoxidase   |
| HUVEC  | Engl. <i>human umbilical vein endothelial cell</i>                          |
| I      | Ipsilateral   |
| i.p.   | Intraperitoneal   |
| ICAM   | Engl. <i>Intercellular adhesion molecule</i>                                |
| Ig     | Immunglobulin   |
| IHC    | Immunhistochemie  |
| IL     | Interleukin   |
| kDa    | Kilodalton  |
| KG     | Körpergewicht   |
| Kg     | Kilogramm   |
| KGF    | Engl. <i>keratinocyte growth factor</i>                                     |
| KLF2   | Krüppel-ähnlicher Faktor 2  |
| Ktr    | Kontrolle   |
| L      | Liter   |
| Lg     | Logarithmus   |
| LM     | Lösemittel  |
| m      | Steigung  |
| mg     | Milligramm  |
| min    | Minute  |
| ml     | Milliliter  |
| MMP    | Matrixmetalloproteinase   |
| MT-MMP | Membrane-type MMP   |
| MW     | Mittelwert  |
| Myc    | Myelocytomatose   |
| n.s.   | Nicht signifikant   |
| NaCl   | Natriumchlorid  |
| NaOH   | Natriumhydroxid   |
| NC     | Nicht-kollagen  |
| NF-kB  | Engl. <i>nuclear factor kappa-light chain-enhancer of activated B cells</i> |
| ng     | Nanogramm   |
| nm     | Nanometer   |
| OA     | Osteoarthritis  |
| OASF   | Synoviale Fibroblasten aus OA-Patienten                                     |
| P/S    | Penicillin/Streptomycin   |
| padj   | Korrigierter / angepasster p-Wert   |
| PBS    | Phosphat-gepufferte Salzlösung  |
| PCR    | Polymerase Kettenreaktion   |
| PDGF   | Engl. <i>platelet-derived growth factor</i>                                 |
| PDGFR  | Engl. <i>platelet-derived growth factor receptor</i>                        |
| PFA    | Paraformaldehyd   |
| pg     | Pikogramm   |
| PTEN   | Engl. <i>phosphatase and tensin homolog</i>                                 |
| RA     | Rheumatoide Arthritis   |
| RANKL  | Engl. <i>receptor activator of NF-kB ligand</i>                             |
| Ras    | Engl. <i>rat sarcoma</i>  |
| RASF   | Synoviale Fibroblasten aus RA-Patienten                                     |
| Rf     | Rheumafaktor  |

|              |  |
|--------------|--|
| RNA          | Ribonukleinsäure                                   |
| rpm          | Engl. <i>revolutions per minute</i>                |
| rRNA         | Ribosomale RNA                                     |
| RT           | Reverse Transkription                              |
| s.c.         | Subkutan   |
| SCID         | Engl. <i>severe combined immunodeficiency</i>      |
| SD           | Standardabweichung                                 |
| SF           | Synovialfibroblast                                 |
| SMC          | Engl. <i>Smooth muscle cells</i>                   |
| STAB         | Standardabweichung                                 |
| TAE          | Tris-Acetat-EDTA-Puffer                            |
| TGFb         | Engl. <i>transforming growth factor b</i>          |
| Th           | T-Helferzellen                                     |
| TIMP         | Engl. <i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i> |
| TNF $\alpha$ | Tumornekrosefaktor $\alpha$                        |
| Tum          | Tumstatin  |
| U            | Engl. <i>unit</i>                                  |
| UDPGD        | Enzyms UDP Glucose Dehydrogenase                   |
| V            | Volt   |
| VCAM-1       | Engl. <i>vascular cell adhesion molecule 1</i>     |
| VEGF         | Engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>    |
| WNT          | Wingless und Int-1                                 |
| Z            | Zellen   |
| z.B.         | Zum Beispiel                                       |

11.2 Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1:** Schematische Darstellung eines gesunden humanen Gelenks (links) und eines entzündlich veränderten RA-Gelenks mit synovialer Hyperplasie (rechts). Abbildung erstellt in BioRender.com.. 10

**Abbildung 2:** Krankheitsbild der RA in den Gelenken der Hand. (A) Zu Beginn der RA treten oftmals schmerzhafte Schwellungen in den kleinen Gelenken wie den Fingergelenken (schwarzer Pfeil) auf. (B) Bei RA-Patienten mit weit fortgeschrittener RA kann es zu erheblichen Fehlstellungen einschließlich zerstörten und immobilisierenden Gelenken kommen. Bildquelle: Abteilung Rheumatologie; KerckhoffKlinik Bad Nauheim, mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Uwe Lange. .... 11

**Abbildung 3:** Prozesse der Angiogenese im Synovium von RA-Patienten. Entzündlich aktivierte Makrophagen und RASF sezernieren zahlreiche pro-inflammatorische Zytokine, wie beispielsweise TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6, was zur Freisetzung von MMP, Chemokinen der CC-, CXC- sowie CX3C-Familie und Wachstumsfaktoren wie VEGF, ANGPT1 und ANGPT2 führt. Diese Moleküle tragen zur EZ-Aktivierung, Aussprossung der EZ, der Ausbildung von Röhren mit Lumen (Tubes), der Stabilisierung und schließlich zur Bildung reifer Blutgefäße bei, bevor der Blutfluss initiiert wird. Abbildung erstellt mit BioRender.com..... 23

**Abbildung 4:** Schematische Darstellung Blick in das Gelenk. (A) Schematische Darstellung eines gesunden Gelenks, das wenige, gerade Gefäße enthält. (B) Bereits in einem frühen Stadium der RA nimmt die Anzahl der Gefäße zu und weist eine deutlich veränderte Gefäßneubildung auf. (C) Die fortgeschrittene RA zeichnet sich durch eine starke Zunahme an Gefäßen aus, wobei die Gefäßstruktur teilweise Helix-ähnlich erscheint. Abbildung erstellt mit BioRender.com..... 25

**Abbildung 5:** RASF-vermittelte Entstehung von Helix-ähnlichen Gefäßen im SCID-Maus-Modell der RA. Helix-ähnliche Gefäße (→) waren bereits nach 3 Tagen an den ipsilateralen (A) und kontralateralen (B) Implantaten zu erkennen. Die kontralateralen Implantate wiesen zu dem Zeitpunkt jedoch weniger Helix-ähnliche Gefäße auf. .... 26

**Abbildung 6:** RASF-vermittelte Matrixdegradation. Aktivierte RASF sezernieren zahlreiche Matrixmetalloproteinasen (MMP) wie beispielsweise MMP3 und zersetzen so die Matrix von Knorpel und demineralisiertem Knochen. Dies trägt maßgeblich zur Gelenkdestruktion in RA-Patienten bei. Abbildung erstellt in BioRender.com. .... 30

**Abbildung 7:** RASF-vermittelte Freisetzung von Kollagenfragmenten. Aktivierte RASF sezernieren vermehrt Matrixmetalloproteinasen (MMP), wodurch die Matrix degradiert wird. In diesem Zusammenhang werden Matrixfragmente beispielsweise des Kollagens Typ IV und XVIII freigesetzt, die als Canstatin, Tumstatin, Arresten und Endostatin bekannt sind. Abbildung erstellt in BioRender.com. .... 31

**Abbildung 8:** SCID-Maus-Modell der RA. Subkutane Co-Implantation von RASF und humanem Knorpel mit einer Gelatinematrix auf der ipsilateralen Seite, während kontralateral nur humaner Knorpel ohne RASF in einer Gelatinematrix implantiert wird. Abbildung erstellt in BioRender.com. .... 34

**Abbildung 9:** Quantifizierung der Tube-Formation-Experimente über den Parameter Tubedicke. Dargestellt ist das HUVEC-Zellnetzwerk in der 100-fachen Vergrößerung. Es wurde ein repräsentativer 750x750  $\mu$ m großer Ausschnitt verwendet. Innerhalb des definierten Bildausschnittes wurden die Enden der Tubes markiert (grün) und möglichst mittig zwischen zwei Markierungen die Dicke der Tubes gemessen (rot). Zellakkumulationen mit einer Dicke aus mehr als 4 Zellen wurden nicht vermessen.53

**Abbildung 10:** Verwendete Einstellung für die Software-basierte Quantifizierung der ANGPT2- und EFNB2-Expression im Tube-Formation-Experiment. Für die Quantifizierung wurde als Fotoquelle "Fluorescence" und als Extraktion des Zielbereichs „Single extraction“ gewählt, da eine Einzelfärbung durchgeführt wurde. .... 55

**Abbildung 11:** Definition des für die Quantifizierung gewünschten Zielbereichs. Auf Grund der verwendeten rot fluoreszierenden Antikörper wurde der Rotfilter für die Evaluation gewählt und der Threshold so angepasst, dass nur Bereiche innerhalb des Zellnetzwerks ausgewertet wurden..... 56

- Abbildung 12:** Ausschluss von unspezifischen rot fluoreszierenden Bereichen. Um zu gewährleisten, dass die Software ausschließlich die Rotintensität von spezifischen Signalen innerhalb des Zellnetzwerks berechnete, wurden unspezifische rot fluoreszierende Signale markiert (grüner Kasten) und so von der Quantifizierung ausgeschlossen. .... 56
- Abbildung 13:** Schematische Darstellung des Ablaufs zur Durchführung des 3D Sphäroid-basierten Sprout-Experiments. Abbildung erstellt in BioRender.com. .... 58
- Abbildung 14:** Verwendete Einstellungen der Software Analyzer BZ-X00 für die Ermittlung der Sphäroidfläche. Da die Sphäroidaufnahmen im Phasenkontrast aufgenommen wurden, wurde entsprechend für die Quantifizierung bei der Software „Phase contrast“ gewählt. Es wurde keine Extraktion eines spezifischen Zielbereichs durchgeführt, da die Fläche des gesamten Sphäroids in der 100-fachen Vergrößerung möglich war und somit keine Auswahl eines Bildausschnitts benötigt wurde. .... 59
- Abbildung 15:** Definition der zu berechnenden Sphäroidfläche. Zunächst wurde der Schwellenwert ("Threshold") so bestimmt, dass die Umrisse des Sphäroids markiert waren, da die Software nur die Fläche der markierten Bereiche bestimmt. Anschließend wurden manuell nicht markierte Lücken innerhalb der Sphäroidfläche (grüner Pfeil) nachmarkiert und unspezifische Markierungen am Rand des Sphäroids (blauer Pfeil) ausgeschlossen. (A) Sphäroid nach dem Einbetten in die Kollagenmatrix zum Zeitpunkt 0 h. (B) Sphäroid nach dem Aussprossen zum Zeitpunkt 24 h. .... 60
- Abbildung 16:** Schematische Darstellung der repetitiven Stimulierung der RASF mit IL-1 $\beta$ . Die Zellen wurden an Tag 1 um 8 Uhr ausgesät und nach 8 h das erste Mal mit 0,05 ng/ml IL-1 $\beta$  stimuliert. Nach 16 h wurden an Tag 2 um 8 h die Überstände abgenommen und die RASF erhielten Medium ohne IL-1 $\beta$ -Stimulierung. Nach 8 h wurden die RASF an Tag 2 für 16 h das zweite Mal für 8 h mit 0,05 ng/ml IL-1 $\beta$  stimuliert. Dieses Schema wurde bis Tag 5 fortgeführt. .... 62
- Abbildung 17:** Histologische Darstellung des implantierten humanen Knorpels in die SCID-Mäuse in der 200-fachen Vergrößerung. Der Knorpel weist eine homogene Knorpelmatrix (grauer Pfeil), vitale Chondrozyten (schwarzer Pfeil) sowie normal große Chondrozytenhöfe (blauer Pfeil) auf. .... 71
- Abbildung 18:** Quantifizierung der Helix-ähnlichen Gefäße in den SCID-Maus-Implantaten. Dargestellt ist ein 36 mm<sup>2</sup> großer repräsentativer Bildausschnitt von Blutgefäßen neben dem SCID-Maus-Implantat. Die Helix-ähnlichen Gefäße wurden in 4 Bereichen gezählt. Ein Gefäß wurde als Helix-ähnlich definiert, wenn es 3 oder mehr Windungen (blaue Pfeile) aufwies. Ein repräsentatives Helix-ähnliches Gefäß ist zur Veranschaulichung mit einem grünen Kreuz markiert. .... 75
- Abbildung 19:** Beispiel einer Overlay-Aufnahme der ANGPT2- (rot) /CD31- (grün) Färbung in der 400-fachen Vergrößerung. Für die Quantifizierung der ANGPT2-Signale im humanen Synovialgewebe wurde nebenstehender Score verwendet. Anhand der ANGPT2- und CD31-Färbung in der Overlay-Aufnahme wurde pro Blutgefäß ein Score zwischen 1-4 vergeben. Der vergebene Score richtete sich dabei danach, welche Signale überwogen. .... 78
- Abbildung 20:** Entstehung Helix-ähnlicher Gefäße im SCID-Maus-Modell der RA über einen Zeitraum von 3 bis 45 Tagen (A) – (I). An Tag 3 zeigten sich die Helix-ähnlichen Gefäße als dünne und schwach durchblutete Gefäße (A, schwarze Pfeile). Ab Tag 18 konnten ipsilateral größere Helix-ähnliche Gefäße beobachtet werden, die deutlich stärker durchblutet waren (E, grauer Pfeil). Dieser Effekt zeigte sich kontralateral verzögert ab Tag 24 (F, blauer Pfeil). An Tag 40 und 45 waren ipsilateral und kontralateral stark durchblutete große Helix-ähnliche Gefäße zu erkennen (H und I, grüne Pfeile). (A) und (C) zeigen beispielhaft die Gelatinematrix des Implantats (\* schwarz) mit darunter liegendem implantiertem Knorpel (\* blau). .... 84
- Abbildung 21:** Kinetik der RASF-vermittelten Entstehung von Helix-ähnlichen Gefäßen in einem Zeitraum von 45 Tagen. Dargestellt ist der Mittelwert ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes) der Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße in ipsilateralen und kontralateralen Implantaten. Die Helix-ähnlichen Gefäße wurden an Tag 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 40 und 45 nach der OP quantifiziert. Pro Zeitpunkt wurde

die Gefäßneubildung in 6 Mäusen aus drei Experimenten mit RASF von 3 unterschiedlichen RA-Patienten analysiert (n = 3). Bereits 3 Tage nach der OP waren Helix-ähnliche Gefäße ipsilateral und kontralateral identifizierbar. An Tag 30 waren in den ipsilateralen Implantaten die meisten Helix-ähnlichen Gefäße erkennbar, bevor die Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße an Tag 45 wieder abnahm. Kontralateral waren an Tag 40 die meisten Helix-ähnlichen Gefäße identifizierbar. Der Verlauf der Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße wurde anhand der Kinetik in Phase 1-3 unterteilt. ○ Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße an ipsilateralen Implantaten; ■ Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße an kontralateralen Implantaten. .... 85

**Abbildung 22:** Verlauf der Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße während Phase 1 in einem Zeitraum von 3-18 Tagen nach der OP. Dargestellt ist der Mittelwert ( $\pm$  SEM) der Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße in ipsilateralen und kontralateralen Implantaten. Die Helix-ähnlichen Gefäße wurden an Tag 3, 6, 9, 12 und 18 nach der OP quantifiziert. Pro Zeitpunkt wurde die Gefäßneubildung in 6 Mäusen aus drei Experimenten mit RASF aus 3 unterschiedlichen RA-Patienten analysiert (n = 3). Die Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße stieg langsam an, wobei die Helix-ähnlichen Gefäße in den ipsilateralen Implantaten mit einer Steigung von  $m = 0,03 \pm 0,10$  (rote Regressionsgerade) und in den kontralateralen Implantaten mit einer Steigung von  $m = 0,15 \pm 0,10$  (blaue Regressionsgerade) zunahm. ○ Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße an ipsilateralen Implantaten; ■ Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße an kontralateralen Implantaten. .... 86

**Abbildung 23:** Verlauf der Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße während Phase 2 in einem Zeitraum von 18 bis 30 Tagen nach der OP. Dargestellt ist der Mittelwert ( $\pm$  SEM) der Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße in ipsilateralen und kontralateralen Implantaten. Die Helix-ähnlichen Gefäße wurden an Tag 18, 24 und 30 nach der OP quantifiziert. Pro Zeitpunkt wurde die Gefäßneubildung in 6 Mäusen aus drei Experimenten mit RASF aus 3 unterschiedlichen RA-Patienten analysiert (n = 3). Die Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße stieg stark an, wobei die Helix-ähnlichen Gefäße in den ipsilateralen Implantaten mit einer Steigung von  $m = 0,30 \pm 0,11$  (rote Regressionsgerade) und in den kontralateralen Implantaten mit einer Steigung von  $m = 0,13 \pm 0,10$  (blaue Regressionsgerade) zunahm. ○ Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße an ipsilateralen Implantaten; ■ Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße an kontralateralen Implantaten. .... 87

**Abbildung 24:** Verlauf der Entstehung der Helix-ähnlichen Gefäße während Phase 3 in einem Zeitraum von 30 bis 45 Tagen nach der OP. Dargestellt ist der Mittelwert ( $\pm$  SEM) der Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße in ipsilateralen und kontralateralen Implantaten. Die Helix-ähnlichen Gefäße wurden an Tag 30, 40 und 45 nach der OP quantifiziert. Pro Zeitpunkt wurde die Gefäßneubildung in 6 Mäusen aus drei Experimenten mit RASF aus 3 unterschiedlichen RA-Patienten analysiert (n = 3). Die Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße ging in dieser Phase zurück, wobei die Helix-ähnlichen Gefäße in den ipsilateralen Implantaten mit einer Steigung von  $m = -0,17 \pm 0,12$  (rote Regressionsgerade) und in den kontralateralen Implantaten mit einer Steigung von  $m = -0,18 \pm 0,11$  (blaue Regressionsgerade) ähnlich stark abnahmen. ○ Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße an ipsilateralen Implantaten; ■ Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße an kontralateralen Implantaten. .... 88

**Abbildung 25:** CD63-Färbung der humanen RASF in den ipsilateralen und kontralateralen Implantaten an Tag 3 nach der OP. Es wurden Gewebeschnitte der ipsilateralen und kontralateralen Implantate angefertigt und die RASF wurden mit CD63 in Rot sowie mit DAPI zum Nachweis der Zellkerne in blau gefärbt. Die Fotos sind in der 400-fachen Vergrößerung dargestellt. Im ipsilateralen Implantat sind wie erwartet zahlreiche CD63-positive RASF zu erkennen. Aber auch kontralateral konnten bereits vereinzelt CD63-positive RASF identifiziert werden. .... 89

**Abbildung 26:** Kinetik der Invasion der RASF in den Knorpel im SCID-Maus-Modell der RA in einem Zeitraum von 12 bis 45 Tagen. Die Invasion in den Knorpel wurde an Tag 12, 18, 24, 30, 40 und 45 Tage nach der OP quantifiziert (n = 2 pro Zeitpunkt). Pro Zeitpunkt wurde die Invasion in jeweils 1-2 Knorpel pro ipsilaterales und kontralaterales Implantat von jeweils 4 Mäusen evaluiert. Die Invasion war

- ipsilateral und kontralateral an Tag 12 noch gering ausgeprägt und steigerte sich wie erwartet bis Tag 45, wobei die Steigerung in kontralaterale Knorpel zeitverzögert erfolgte (je n = 2). ○ Invasion der RASF in ipsilaterale Knorpel; ■ Invasion der RASF in kontralaterale Knorpel. .... 90
- Abbildung 27:** Invasion der RASF in die ipsilateralen und kontralateralen Knorpel an Tag 45 nach der OP. (A) HE-Färbung: Dargestellt ist die Invasion der RASF in die ipsilateralen und kontralateralen Knorpel (rote Pfeile) in 20-facher Vergrößerung. K: Knorpel; G: Gelatinematrix; blauer Pfeil: murines Bindegewebe. (B) Dargestellt ist die Invasion der RASF an Tag 45 nach der OP, die mittels eines etablierten Scores quantifiziert wurde. Pro Zeitpunkt wurde die Invasion der RASF in 6 Mäusen aus drei Experimenten mit RASF aus 3 unterschiedlichen RA-Patienten analysiert. Pro Maus wurden jeweils 1-2 Knorpel ipsilateral und kontralateral evaluiert. Dargestellt sind die Mittelwerte inkl. Standardabweichungen des Invasionscores für Tag 45. Die statistischen Analysen wurden mit dem Mann-Whitney U-Test durchgeführt (n.s.: nicht signifikant, n=3). .... 91
- Abbildung 28:** Angiopoietin-2 in den SCID-Maus-Implantaten. (A) Repräsentative Darstellung der ANGPT2- und CD31-Färbung (rot) sowie der Zellkerne (blau) in der 400-fachen Vergrößerung. (B) ANGPT2-Expression im SCID-Maus-Modell der RA in einem Zeitraum von 3-12 Tagen in ipsilateralen und kontralateralen Implantaten. Die ANGPT2-Expression war kontralateral im Vergleich zu ipsilateral an Tag 3 und 6 stärker ausgeprägt. Pro Zeitpunkt wurde die ANGPT2-Expression in den Implantaten von jeweils 1-2 Mäusen evaluiert. Zusätzlich wurde für die Evaluation eine CD31-Färbung der EZ durchgeführt. Folgender Score wurde für die Quantifizierung der ANGPT2-Expression in den Blutgefäßen angewendet: 0 = ANGPT2-negativ; 1 = ANGPT2-positiv, CD31-Färbung überwiegt; 2 = ANGPT2-positiv, ANGPT2-Signal identisch zu CD31; 3 = ANGPT2-positiv, ANGPT2-Signal stärker als das CD31-Signal. ○ ANGPT2-Expression in ipsilateralen Implantaten; ■ ANGPT2-Expression in kontralateralen Implantaten. .... 92
- Abbildung 29:** ANGPT2-Expression im humanen Synovialgewebe von RA- und OA-Patienten. (A) Dargestellt ist die immunhistochemische Fluoreszenzfärbung von ANGPT2 (rot), dem EZ-marker CD31 (grün) und DAPI (blau) zum Anfärben der Zellkerne in der 200-fachen Vergrößerung. (B) Evaluation der ANGPT2-Expression im Synovium unter Anwendung des ANGPT2-Expressionscores. Für die Quantifizierung wurden die Overlay-Aufnahmen verwendet. ANGPT2 war signifikant stärker im RA-Synovium als im OA-Synovium exprimiert. Für die statistischen Analysen wurde der Mann Whitney U-Test angewendet. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet (RA: n = 6; OA: n = 6). .... 93
- Abbildung 30:** RASF-vermittelter Einfluss auf die Endothelzellen im Tube-Formation-Experiment. HUVEC wurden mit  $\pm 15\%$  Calcein-AM gefärbter RASF (grün) auf einer Matrigel-Beschichtung kultiviert und die Ausbildung der Tubes nach 4 (A) bzw. 8 (B) h mittels Quantifizierung der Tubedicke evaluiert. Darstellung in 100-facher Vergrößerung. Dargestellt sind die Mittelwerte der Tubedicken inkl. Standardabweichungen. Zu beiden Zeitpunkten erfolgte eine signifikante Reduktion der Tubedicke durch RASF. Für die statistischen Analysen wurde der Mann Whitney U-Test angewendet. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und sind mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet (jeweils n = 10). .... 95
- Abbildung 31:** Einfluss der RASF auf die Angiogenese im 3D Sphäroid-basierten Sprout-Experiment. Dargestellt sind die Mittelwerte der Sphäroid-Flächen inkl. Standardabweichungen zum Zeitpunkt unmittelbar nach Generierung der Sphäroide nach 0 h sowie 24 h nach der Aussprossung. (A) Darstellung der Sphäroide in 100-facher Vergrößerung: Gelber Pfeil: Die HUVEC formten ein gleichmäßig rundes Sphäroid; blauer Pfeil: RASF (grün) verteilten sich innerhalb des Sphäroids, ordneten sich aber auch an der Sphäroid-Oberfläche an; orangefarbener Pfeil: Die HUVEC sprossen aus dem Sphäroid aus und bildeten dabei Röhren-ähnliche Strukturen; lilafarbener Pfeil: HUVEC sprossen diffus aus dem Sphäroid aus, ohne Röhren zu bilden; weißer Pfeil: RASF lagerten sich hauptsächlich innerhalb des Sphäroids an und wandern nur vereinzelt aus. (B) Nach 24 h war die Fläche der

Sphäroide ohne RASF wie erwartet durch die Aussprossung vergrößert. Die Zugabe der RASF zu den HUVEC vergrößerte die Fläche der Sphäroide jedoch zusätzlich, allerdings ohne die Ausbildung von Tubes. Für die statistischen Analysen wurde der Friedman-Test angewendet und die Dunn's-Multiparameter-Korrektur durchgeführt. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet, n.s.: nicht signifikant (jeweils  $n = 4$ ). ..... 96

**Abbildung 32:** ANGPT2- (A) und VEGF-Sekretion (B) während der Tubebildung nach 4 und 8 h. Die ANGPT2- (A) und VEGF-Konzentrationen (B) wurden nach Abschluss der Tube-Formation-Experimente in den Überständen mittels ELISA-Messung bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte inkl. Standardabweichungen. Für die statistischen Analysen wurde der Friedman-Test durchgeführt und die Dunn's-Multiparameter-Korrektur angewendet. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet, n.s.: nicht signifikant (4 h:  $n = 5$ ; 8 h:  $n = 10$ )..... 98

**Abbildung 33:** EFNB2 im Tube-Formation-Experiment unter Einfluss von RASF nach 4 und 8 h. (A) Dargestellt ist die immunzytochemische EFNB2-Färbung (rot) der HUVEC  $\pm$  RASF (grün) in der 200-fachen und 1000-fachen Vergrößerung. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Die Intensität der EFNB2-Färbung wurde mit der Keyence-Software BZ X-800 nach 4 h (B) und 8 h (C) ausgewertet. Es konnten keine EFNB2-Intensitätsunterschiede nach Zugabe der RASF festgestellt werden. Für die statistischen Analysen wurde der Mann Whitney U-Test durchgeführt. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet, n.s.: nicht signifikant (4 h:  $n = 3$ ; 8 h:  $n = 3$ ). ..... 99

**Abbildung 34:** Expression der Gefäßregulatoren ANGPT2, EFNB2 und eNOS unter Einfluss von RASF nach 4 und 8 h. Dargestellt sind die Mittelwerte inkl. der Standardabweichungen der Messungen der Ct-Werte von ANGPT2 (A), EFNB2 (B) und eNOS (C) nach Durchführung der Tube-Formation-Experimente nach 4 und 8 h abzüglich der Ct-Werte des House-Keeping-Gens 18S ( $\Delta$ Ct). Für die statistischen Analysen wurde der H-Test nach Kruskal und Wallis durchgeführt und die Dunn's-Multiparameter-Korrektur angewendet. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\*, n.s.: nicht signifikant gekennzeichnet (4 h:  $n = 6$ ; 8 h:  $n = 10$ ). ..... 100

**Abbildung 35:** IL-6-Sekretion im Verlauf der repetitiven Stimulierung der RASF mit IL-1 $\beta$ . Die RASF wurden 4x für jeweils 16 h mit 0,05 ng/ml IL-1 $\beta$  stimuliert. Zwischen den Stimulierungsphasen erhielten die Zellen eine jeweils 8-stündige Erholungsphase ohne IL-1 $\beta$  (Erholung, graue Balken). Die Aktivierung der RASF wurde mittels IL-6-ELISA nachgewiesen. (A) und (B): Die erste Stimulierung (= 1. Puls, roter Balken) zeigte wie erwartet eine signifikante Induktion der IL-6-Sekretion im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle (Ktr, schwarze Balken). Die drei- und viermalige Stimulierung (= 3. und 4. Puls, jeweils rote Balken) bewirkte eine weiterhin ausgeprägte aber signifikant schwächere Induktion der IL-6-Sekretion im Vergleich zum 1. Puls. Es wurden Mittelwerte 7 biologischer Replikate (= RASF von 7 unterschiedlichen RA-Patienten) mit ihren Standardabweichungen sowie die Signifikanzlevel bestimmt. Zur statistischen Evaluation wurde zum Vergleich innerhalb der 4 Pulse der Wilcoxon-Test angewendet. Für Vergleiche zwischen den Kontrollen und den stimulierten RASF wurde der H-Test nach Kruskal und Wallis verwendet inkl. der Dunn's-Multiparameter-Korrektur. Signifikante Effekte sind durch \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet (\* p-Wert  $\leq 0,05$ ; \*\* p-Wert  $\leq 0,01$ ; \*\*\* p-Wert  $\leq 0,001$ ;  $n = 7$ )..... 101

**Abbildung 36:** Erkrankungen, die mit den Top 18 signifikant unterschiedlich regulierten Gengruppen zwischen einmaliger und repetitiver Aktivierung der RASF assoziiert sind. In grauer Schattierung ist die Anzahl der signifikant unterschiedlich regulierten Gene dargestellt, die mit einer bestimmten Erkrankung assoziiert sind. Die signifikant angereicherten Gengruppen innerhalb der Erkrankungen wurden über den Webserver KOBAS aus der Datenbank KEGG PATHWAY ermittelt. Die gestrichelte Linie markiert die signifikant unterschiedlichen Gengruppen zwischen einmalig und repetitiv

- aktivierten RASF. Gengruppen, die rechts neben der gestrichelten Linie liegen, weisen ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  auf. Die Signifikanzwerte anhand der unteren Skala ergeben sich aus dem negativen dekadischen Logarithmus des korrigierten p-Wertes. 2 entspricht dem höchsten und 0,75 dem niedrigsten Signifikanzniveau..... 103
- Abbildung 37:** Darstellung der Top 48 signifikant unterschiedlich regulierten Signalwege zwischen einmaliger und repetitiver Stimulierung der RASF. In grauer Schattierung ist die Anzahl der signifikant differenziell exprimierten Gene dargestellt, die mit bestimmten Signalwegen assoziiert sind. Die signifikant angereicherten differenziell exprimierten Gene innerhalb der Signalwege wurden über den Webserver KOBAS aus der Datenbank KEGG PATHWAY ermittelt. Die gestrichelte Linie markiert die signifikant unterschiedlichen Gengruppen zwischen einmalig und repetitiv aktivierten RASF. Gengruppen, die rechts neben der gestrichelten Linie liegen, weisen ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  auf. Die Signifikanzwerte anhand der unteren Skala ergeben sich aus dem negativen dekadischen Logarithmus des korrigierten p-Wertes, wobei 4 dem höchsten und 1 dem niedrigsten Signifikanzniveau entspricht..... 104
- Abbildung 38:** Subgruppen-Analyse der Top 50 differenziell exprimierten Gene (DEG) zwischen einmaliger und dreimaliger IL-1 $\beta$ -Stimulierung der RASF. (A) Dargestellt ist die Heatmap der Top 50 DEG. In grünen Kästen sind die Gene markiert, die eine signifikant schwächere Induktion der Genexpression nach dreimaliger (3x stim.) im Vergleich zur einmaligen Stimulierung (1x stim.) mit IL-1 $\beta$  aufwiesen. (B) Anhand der Expressionsprofile der Top 50 DEG wurde eine Subgruppenanalyse durchgeführt. Die Expressionsprofile aller Top 50 DEG konnte einer der drei folgenden Gruppen zugeordnet werden: Gruppe 1 beinhaltet alle Gene, die im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Ktr) eine signifikant schwächere Induktion der Genexpression nach wiederholter Stimulierung mit IL-1 $\beta$  (= Gewöhnung) zeigten (dargestellt am Beispiel CXCL2). Gruppe 2 (dargestellt am Beispiel NDE1) und 3 (dargestellt am Beispiel ANKH) zeigten keine signifikant unterschiedliche Genregulierung in Folge der repetitiven Stimulierung..... 106
- Abbildung 39:** Vergleich der IL-11- und CXCL2-Expression von repetitiv stimulierten RASF. Dargestellt ist die Analyse der Genexpression von IL-11 und CXCL2 zwischen einmalig (1x stim.) und repetitiv stimulierten (3x stim.) RASF sowie den entsprechenden Kontrollen tabellarisch (A) und graphisch (B, C). Die Werte wurden aus der RNA-Sequenzierung entnommen (je  $n = 4$ ). Nach repetitiver Stimulierung (3x stimuliert) war bei IL-11 im Gegensatz zu CXCL2 kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle vorhanden. (C) Bei CXCL2 zeigte die einmalige Stimulierung (= 1. Puls) eine signifikante Induktion der CXCL2-Sekretion im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle (Ktr). Nach dreimaliger Stimulierung (= 3. Puls) war die CXCL2-Induktion signifikant schwächer im Vergleich zum 1. Puls. Zwischen dreimaliger Stimulierung und der Kontrolle war ein signifikanter Unterschied in der CXCL2-Sekretion vorhanden. Zur statistischen Evaluation wurde zum Vergleich innerhalb der 3 Pulse der Wilcoxon-Test angewendet. Für Vergleiche zwischen den Kontrollen und den stimulierten RASF wurde der H-Test nach Kruskal und Wallis inkl. der Dunn's-Multiparameter-Korrektur verwendet. Signifikante Effekte sind durch \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet (\* p-Wert  $\leq 0,05$ ; \*\* p-Wert  $\leq 0,01$ ; \*\*\* p-Wert  $\leq 0,001$ ; n.s.: nicht signifikant;  $n = 8$ ). ..... 108
- Abbildung 40:** Canstatin- und Endostatin-Sekretion im Serum und in der Synovialflüssigkeit von RA- und OA-Patienten. (A) Mittelwerte inkl. Standardabweichungen der gemessenen Canstatin-Sekretion im Serum und in der Synovialflüssigkeit von RA- und OA-Patienten sowie gesunde Probanden im Serum. (B) Mittelwerte inkl. Standardabweichungen der gemessenen Endostatin-Sekretion im Serum von RA- und OA-Patienten sowie gesunde Probanden. Für die statistischen Analysen wurde der H-Test nach Kruskal und Wallis inkl. Dunn's-Multiparameter-Korrektur (A: Serum und B) und der Mann Whitney U-Test (A: Synovialflüssigkeit) angewendet. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet, ns: nicht signifikant (A: Serum:

RA: n = 27, OA: n = 8, gesund: n = 20; Synovialflüssigkeit: RA: n = 6, OA: n = 7; B: RA, gesund: n = 17, OA: n = 5)..... 110

**Abbildung 41:** Effekte der Matrixfragmente Arresten, Tumstatin, Endostatin und Canstatin auf die Tubebildung. Canstatin (Can) (A), Arresten (Arr) (B), Tumstatin (Tum) (C) und Endostatin (Endo) (D) zeigten keine Effekte auf die Tubedicke im Tube-Formation-Experiment nach 4 h. Dargestellt sind die Mittelwerte der Tubedicken inkl. Standardabweichungen. Für die statistischen Analysen wurde der H-Test nach Kruskal und Wallis inkl. der Dunn's-Multiparameter-Korrektur (A, B und D) oder der Mann Whitney U-Test (C) angewendet. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet, n.s.: nicht signifikant (n = 3). ..... 112

**Abbildung 42:** Canstatin-Effekt auf die HUVEC im Tube-Formation-Experiment nach 20-stündiger Vorstimulierung mit Canstatin. Dargestellt ist der Einfluss von Canstatin auf die Tubedicke (Mittelwert inkl. Standardabweichung) nach 20-stündiger Vorstimulierung der HUVEC und anschließendem Tube-Formation-Experiment für 4 h (A) bzw. für 8 h (B). Nach 8 h konnte ein signifikanter Effekt von Canstatin in Folge der 20-stündigen Vorstimulierung festgestellt werden, in dem die Tubedicke signifikant reduziert war. Für die statistischen Analysen wurde der Mann Whitney U-Test angewendet. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet, n.s.: nicht signifikant (4 h: n = 10; 8 h: n = 10). ..... 113

**Abbildung 43:** Einfluss der 20-stündigen Vorstimulierung der HUVEC mit Canstatin (Can) auf die RASF/Endothelzell-Interaktionen. (A) Dargestellt sind repräsentative Fotos der Tubebildung unter Einfluss der 20-stündigen Vorstimulierung der HUVEC mit 0,2 µg/ml Canstatin (HUVEC); der 20-stündigen Vorstimulierung der HUVEC mit Canstatin und zusätzlicher Zugabe von 0,5 µg/ml Canstatin im Tube-Formation-Experiment (HUVEC + Can); der 20-stündigen Vorstimulierung der HUVEC mit Canstatin und Zugabe der RASF (grün) im Tube-Formation-Experiment (HUVEC + RASF) sowie der 20-stündigen Vorstimulierung der HUVEC mit Canstatin, zusätzlicher Zugabe von 0,5 µg/ml Canstatin und Zugabe der RASF im Tube-Formation-Experiment (HUVEC + Can +RASF). Das Tube-Formation-Experiment wurde für 4 h (B) und 8 h (C) durchgeführt. Die Tubedicke war nach zusätzlicher Stimulierung der vorstimulierten HUVEC nach 4 und 8 h signifikant reduziert. Für die statistischen Analysen wurde der H-Test nach Kruskal und Wallis angewendet und die Dunn's-Multiparameter-Korrektur durchgeführt. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet, n.s.: nicht signifikant (4 h: n = 10; 8 h: n = 10). ..... 115

**Abbildung 44:** Einfluss von Canstatin auf die Gefäßneubildung im 3D Sphäroid-basierten Sprout-Experiment. (A) Darstellung der Sphäroide in 10-facher Vergrößerung: Die unstimulierten HUVEC formten ein gleichmäßig rundes Sphäroid zum Zeitpunkt 0 h (gelber Pfeil). Die unstimulierten HUVEC sprossen über 24 h aus dem Sphäroid aus und bildeten dabei Röhren-ähnliche Strukturen (orangefarbener Pfeil). Unter Einfluss von Canstatin (Can) waren die Sphäroide nach ihrer Generierung zum Zeitpunkt 0 h kleiner im Vergleich zu unstimulierten Sphäroiden (grüner Pfeil). Unter Einfluss von Canstatin sprossen nach 24 weniger HUVEC aus dem Sphäroid aus (weißer Pfeil). (B) Dargestellt sind die Mittelwerte inkl. Standardabweichungen der Sphäroid-Flächen unmittelbar nach Generierung der Sphäroide nach 0 h sowie 24 h nach der Aussprossung. Nach 0 h war die Fläche der Sphäroide mit Canstatin (Can) leicht reduziert, während nach 24 h die Fläche der Sphäroide mit Canstatin im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle signifikant reduziert war. Für die statistischen Analysen wurde der H-Test nach Kruskal und Wallis angewendet und die Dunn's-Multiparameter-Korrektur durchgeführt. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet, ns: nicht signifikant (n=4)..... 116

**Abbildung 45:** Einfluss der RASF auf die Stimulierung mit Canstatin im 3D Sphäroid-basierten Sprout-Experiment. Dargestellt sind die Mittelwerte inkl. Standardabweichungen der Sphäroid-Flächen unmittelbar 24 h nach der Aussprossung. Nach Stimulierung mit Canstatin sprossen nach 24 signifikant weniger HUVEC unter Einfluss aus dem Sphäroid aus. Für die statistischen Analysen wurde der One-

Way-ANOVA-Test inkl. der Dunn's-Multiparameterkorrektur angewendet. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet, n.s.: nicht signifikant (n = 4). ..... 117

**Abbildung 46:** Einfluss von Canstatin auf die ANGPT2-Expression im Kontext der RASF/EZ-Interaktionen im Tube-Formation-Experiment nach 4 und 8 h. (A) Mittelwerte inkl. Standardabweichungen der Messung der ANGPT2-Sekretion in den Überständen der Tube-Formation-Experimente nach 4 und 8 h. (B) Mittelwerte inkl. Standardabweichungen der Messungen der Ct-Werte von ANGPT2 nach Durchführung der Tube-Formation-Experimente nach 4 und 8 h abzüglich der Ct-Werte des House-Keeping-Gens 18S ( $\Delta Ct$ ). Für die statistischen Analysen wurde der H-Test nach Kruskal und Wallis durchgeführt und die Dunn's-Multiparameter-Korrektur angewendet. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet, n.s.: nicht signifikant (4 h: n = 6; 8 h: n = 10). ..... 118

**Abbildung 47:** Einfluss von Canstatin auf die RASF-induzierten Helix-ähnlichen Gefäße im SCID-Maus-Modell der RA nach 3 Tagen. (A) Zahlreiche Helix-ähnliche Gefäße waren in ipsilateralen (I) und kontralateralen (K) Implantaten vorhanden, die kein Canstatin enthielten. Unter Canstatin-Behandlung war die Anzahl der Helix-ähnliche Gefäße ipsilateral deutlich reduziert (schwarze Pfeile: Helix-ähnliche Gefäße). (B) Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße. Die Helix-ähnlichen Gefäße wurden an Tag 3 nach der OP unter Einfluss mit und ohne Canstatin quantifiziert. Pro Zeitpunkt wurde die Gefäßneubildung in 6 Mäusen aus drei Experimenten mit RASF aus 3 unterschiedlichen RA-Patienten analysiert. Für die statistischen Analysen wurde der H-Test nach Kruskal und Wallis durchgeführt und die Dunn's-Multiparameter-Korrektur angewendet. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet, n.s.: nicht signifikant (n = 3). ..... 120

**Abbildung 48:** Einfluss von Canstatin auf die RASF-induzierten Helix-ähnlichen Gefäße im SCID-Maus-Modell der RA in ipsilateralen und kontralateralen Implantaten nach 24 (A) und 45 Tagen (B). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße. Die Helix-ähnlichen Gefäße wurden an Tag 24 und 45 nach der OP unter Einfluss mit und ohne Canstatin (Can) quantifiziert. Pro Zeitpunkt wurde die Gefäßneubildung in 6 Mäusen aus drei Experimenten mit RASF aus 3 unterschiedlichen RA-Patienten analysiert. Für die statistischen Analysen wurde der H-Test nach Kruskal und Wallis durchgeführt und die Dunn's-Multiparameter-Korrektur angewendet. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet, n.s.: nicht signifikant (n = 3). ..... 121

**Abbildung 49:** Kinetik der RASF-vermittelten Entstehung von Helix-ähnlichen Gefäßen in einem Zeitraum von 45 Tagen unter Einfluss von Canstatin. Dargestellt ist der Mittelwert ( $\pm$ SEM) der Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße in ipsilateralen Implantaten mit und ohne Canstatin. Die Helix-ähnlichen Gefäße wurden an Tag 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 40 und 45 nach der OP quantifiziert. Pro Zeitpunkt wurde die Gefäßneubildung in 6 Mäusen aus drei Experimenten mit RASF aus 3 unterschiedlichen RA-Patienten analysiert. ○ Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße an ipsilateralen Implantaten, die kein Canstatin enthielten; ■ Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße an ipsilateralen Implantaten unter Einfluss von Canstatin. .... 122

**Abbildung 50:** Kinetik der Invasion der RASF in den Knorpel im SCID-Maus-Modell der RA in einem Zeitraum von 12-45 Tagen unter Einfluss von Canstatin. Die Invasion in den Knorpel wurde an Tag 12, 18, 24, 30, 40 und 45 Tage nach der OP unter Einfluss von Canstatin quantifiziert. Pro Zeitpunkt wurde die Invasion von jeweils 4 Mäusen (n = 2) evaluiert. Dargestellt ist der Mittelwert inkl. Standardabweichung der Invasion aus jeweils 4 Mäusen (n = 2). Die Invasion wurde ipsilateral und kontralateral ab Tag 12 initiiert und steigerte sich bis Tag 45, wobei die Steigerung in kontralaterale Knorpel zeitverzögert erfolgte. ○ Invasion der RASF in ipsilaterale Knorpel; ■ Invasion der RASF in kontralaterale Knorpel, jeweils unter Einfluss von Canstatin. .... 123

- Abbildung 51:** Kinetik der Invasion der RASF in ipsilaterale Knorpel im SCID-Maus-Modell der RA in einem Zeitraum von 12-45 Tagen mit und ohne Einfluss von Canstatin. Die Invasion in den Knorpel wurde an Tag 12, 18, 24, 30, 40 und 45 Tage nach der OP mit und ohne Einfluss von Canstatin (Can) quantifiziert. Pro Zeitpunkt wurde die Invasion von jeweils 4 Mäusen aus 2 Tierserien evaluiert. (A) Dargestellt ist der Mittelwert inkl. Standardabweichung der Invasion aus jeweils 4 Mäusen (n = 2). Die Kinetik der Invasion der RASF unter Einfluss von Canstatin war vergleichbar mit der Invasion der RASF ohne Einfluss von Canstatin. ○ Invasion der RASF in ipsilaterale Knorpel ohne Canstatin; ■ Invasion der RASF in ipsilaterale Knorpel unter Einfluss von Canstatin. (B) Die Invasion der RASF wurde an Tag 45 nach der OP mit und ohne Canstatin quantifiziert. Pro Zeitpunkt wurde die Invasion der RASF in 6 Mäusen aus drei Experimenten mit RASF aus 3 unterschiedlichen RA-Patienten analysiert. Pro Maus wurden jeweils 1-2 Knorpel ipsilateral und kontralateral evaluiert. Die statistischen Analysen wurden mit dem H-Test nach Kruskal und Wallis durchgeführt und die Dunn's-Multiparameter-Korrektur angewendet, n.s.: nicht signifikant (n = 3). ..... 124
- Abbildung 52:** Angiopoietin-2 unter Einfluss von Canstatin in ipsilateralen SCID-Maus-Implantaten. Dargestellt ist die ANGPT2-Expression im SCID-Maus-Modell der RA in einem Zeitraum von 3-12 Tagen mit und ohne Einfluss von Canstatin. Die ANGPT2-Expression war unter Einfluss von Canstatin an Tag 3 und 6 stärker im Vergleich zu Implantaten, die kein Canstatin enthielten. Pro Zeitpunkt wurde die ANGPT2-Expression in ipsilateralen Implantaten mit und ohne Canstatin von jeweils 1-2 Mäusen evaluiert. Zusätzlich wurde für die Evaluation eine CD31-Färbung der EZ durchgeführt. Folgender Score wurde für die Quantifizierung der ANGPT2-Expression in den Blutgefäßen angewendet: 0 = ANGPT2-negativ; 1 = ANGPT2-positiv, CD31-Färbung überwiegt; 2 = ANGPT2-positiv, ANGPT2-Signal identisch zu CD31; 3 = ANGPT2-positiv, ANGPT2-Signal überwiegt CD31-Färbung. ○ ANGPT2-Expression in ipsilateralen Implantaten ohne Canstatin; ■ ANGPT2-Expression in ipsilateralen Implantaten unter Einfluss von Canstatin. .... 125
- Abbildung 53:** Anzahl Helix-ähnlicher Gefäße an Tag 3 (links) und Tag 6 (rechts) nach der OP. Dargestellt ist der Mittelwert inkl. Standardabweichung der Anzahl der Helix-ähnlichen Gefäße in ipsilateralen und kontralateralen Implantaten an Tag 3 mit (n = 3) und ohne RASF-Implantation (n = 1). Nach RASF-Implantation waren mehr Helix-ähnliche Gefäße vorhanden im Vergleich zur Implantation ohne RASF..... 128
- Abbildung 54:** IL-6-Sekretion im Verlauf der repetitiven Stimulierung der RASF mit TNF $\alpha$ . Die RASF wurden 3-mal für jeweils 16 h mit 0,05 ng/ml TNF $\alpha$  stimuliert, zwischen den Stimulierungsphasen erhielten die Zellen eine jeweils 8-stündige Erholungsphase. Die Aktivierung der RASF wurde mittels IL-6 ELISA nachgewiesen. Die erste Stimulierung (= 1. Puls) zeigte wie erwartet eine Induktion der IL-6-Sekretion im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle (Ktr). Die zwei- und dreimalige Stimulierung (= 2. und 3. Puls) bewirkte eine ähnliche IL-6-Sekretion im Vergleich zum 1. Puls. Dargestellt sind die Mittelwerte 3 technischer Replikate (n=1) mit ihren Standardabweichungen. .... 170
- Abbildung 55:** Stimulierung der RASF mit Endostatin (A), Tumstatin (B), Arresten (C) und Canstatin (D). (A) Endostatin: Die RASF wurden mit 0,1  $\mu$ g/ml Endostatin (Endo) für 24 h stimuliert. Morphologisch zeigte sich ein leichter Proliferationsunterschied zur unstimulierten Kontrolle. Die Aktivierung der RASF wurde mittels Bestimmung der IL-6-Konzentration im Überstand bestimmt. Endostatin bewirkte keine erhöhte IL-6-Sekretion der RASF. (B) Tumstatin: Die RASF wurden mit 2  $\mu$ g/ml Tumstatin stimuliert. Morphologisch zeigte sich ein Proliferationsunterschied zur unstimulierten Kontrolle. Tumstatin bewirkte eine erhöhte, nicht signifikante, IL-6-Sekretion der RASF. (C) Arresten mit dem Lösemittel 20mM Tris, 150mM NaCl (pH = 8.0). Die RASF wurden mit 5  $\mu$ g/ml Arresten stimuliert. Morphologisch zeigte sich mit Arresten sowie der Lösemittelkontrolle (LM Ktr) ein großer Proliferationsunterschied zur unstimulierten Kontrolle. Arresten bewirkte im Gegensatz zur LM Ktr eine signifikante IL-6-Sekretion der RASF (p = 0,02). (D) Canstatin: Die RASF wurden mit 0,2 und 0,5  $\mu$ g/ml Canstatin für 24 h stimuliert. Morphologisch zeigten sich nach der Stimulierung mit Canstatin vermehrt kugelförmige

Zellen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, was auf vermehrte Apoptose hindeutet. Beide Canstatin-Konzentrationen bewirkten eine signifikante IL-6-Sekretion der RASF ( $p = 0,002$  und  $p = 0,006$ ). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der IL-6-Konzentrationen inkl. Standardabweichungen. Für die statistischen Analysen wurde für Endostatin und Tumstatin der Mann Whitney U-Test, für Arresten und Canstatin der H-Test nach Kruskal und Wallis inkl. der Dunn's Multiparamter-Korrektur angewendet. Die Signifikanzniveaus wurden unterteilt in  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  und  $p \leq 0,001$  und mit \*, \*\* oder \*\*\* gekennzeichnet, n.s.: nicht signifikant ( $n = 3$ ). ..... 171

### 11.3 Tabellenverzeichnis

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabelle 1:</b> ACR-Klassifikationskriterien für die RA. Es liegt eine RA vor, wenn ein Patient eine Gesamtpunktzahl von mindestens 6 aus 10 Punkten aus den Bereichen erzielt. RF: Rheumafaktor, ACPA: anti-citrullinierte Protein-Antikörper, CRP: C-reaktives Protein, BSG: Blutsenkung. ....  | 12  |
| <b>Tabelle 2:</b> Zusammensetzungen der Knochen-, Knorpel- und Bindegewebsmatrix (Alberts 2017). ....   | 29  |
| <b>Tabelle 3:</b> Verwendete Zelllinien und primäre Zellen.....   | 38  |
| <b>Tabelle 4:</b> Verwendete Medien und Lösungen. ....  | 39  |
| <b>Tabelle 5:</b> Verwendete Enzyme. ....   | 39  |
| <b>Tabelle 6:</b> Verwendete primäre Antikörper für immunhistochemische Analysen. ....  | 40  |
| <b>Tabelle 7:</b> Verwendete sekundäre Nachweissysteme. ....  | 40  |
| <b>Tabelle 8:</b> Verwendete Blockierungsreagenzien.....  | 40  |
| <b>Tabelle 9:</b> Verwendete Isotypkontrollen. ....   | 41  |
| <b>Tabelle 10:</b> Verwendete Chemikalien und sonstige Verbrauchsmaterialien.....   | 44  |
| <b>Tabelle 11:</b> Verwendete Geräte. ....  | 44  |
| <b>Tabelle 12:</b> Für Messungen und Quantifizierungen verwendete Software.....   | 45  |
| <b>Tabelle 13:</b> Verwendete molekularbiologische und immunologische Kits. ....  | 45  |
| <b>Tabelle 14:</b> Verwendete Komponenten der extrazellulären Matrix. ....  | 46  |
| <b>Tabelle 15:</b> Verwendete Primer. ....  | 46  |
| <b>Tabelle 16:</b> Kultivierungsbedingungen der RASF und HUVEC.....   | 49  |
| <b>Tabelle 17:</b> Verwendete Parameter für die Quantifizierung der Tube-Formation-Experimente. ....  | 52  |
| <b>Tabelle 18:</b> Ansätze für das 3D Sphäroid-basierte Sprout-Experiment .....   | 58  |
| <b>Tabelle 19:</b> Ansatz für die reverse Transkription zum Umschreiben isolierter RNA in cDNA. ....  | 63  |
| <b>Tabelle 20:</b> Reaktionsprogramm der reversen Transkription. ....   | 63  |
| <b>Tabelle 21:</b> Ansatz für die quantitative real-time PCR.....   | 65  |
| <b>Tabelle 22:</b> Reaktionsprogramm der quantitativen real-time PCR.....   | 65  |
| <b>Tabelle 23:</b> Standardreihe des Endotoxintest. Es wurden folgende Verdünnungen eingesetzt: 0,1; 0,05; 0,025 und 0,01 EU/ml. Die Standardreihe wurde in Triplikaten (R1-3) bei 405 nm gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STAB).....  | 69  |
| <b>Tabelle 24:</b> Endotoxinkonzentrationen [EU/ml] in den in dieser Arbeit verwendeten Matrixfragmenten. Es wurden folgende Proteinkonzentrationen auf Endotoxizität getestet: 0,5 µg/ml Canstatin, 0,5 µg/ml Endostatin, 2 µg/ml Arresten und 0,5 µg/ml Tumstatin. Die Proteine wurden jeweils in Triplikaten (R1-3) bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (STAB) sowie die anhand der in Tabelle 23 dargestellten Messwerte der über die Standardreihe eingeordneten Endotoxinkonzentrationen [EU/ml]. .... | 69  |
| <b>Tabelle 25:</b> Score für die Quantifizierung der Invasion der RASF in den humanen Knorpel. Beim Scoring konnten Werte von 0-3 in ganzen Zahlen oder in 0,5-Schritten vergeben werden. ....  | 77  |
| <b>Tabelle 26:</b> Angewendete Testverfahren für die Berechnungen der statistischen Signifikanzen. ....   | 80  |
| <b>Tabelle 27:</b> Pubmed-Literaturrecherche zu den 5 DEG aus Gruppe 1. ....  | 107 |

## Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Bad Nauheim, den 11.01.2024

Corinna Heck

## Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen Menschen bedanken, die mich auf dem Weg meiner Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben!

Ein großer Dank geht an Herrn Prof. Müller-Ladner, der es mir ermöglicht hat, meine Doktorarbeit an seinem Lehrstuhl anzufertigen und meine Doktorarbeit begutachtet hat. Weiterhin möchte ich mich auch für die Möglichkeit bedanken, an zahlreichen (internationalen) Kongressen teilnehmen und die Ergebnisse dieser Arbeit präsentieren zu dürfen.

Herr Prof. Dr. Ivan Manzini danke ich, der freundlicherweise die Betreuung und Begutachtung dieser Doktorarbeit im Fachbereich Biologie übernommen hat.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau PD Dr. Elena Neuman für die exzellente Unterstützung und Betreuung meiner Doktorarbeit sowie der Publikation bedanken. Dank unserer zahlreichen konstruktiven Gespräche und Diskussionen konnte ich viel lernen, um eigenständig das Projekt weiterzuentwickeln.

Mein spezieller Dank geht auch an Stephanie Schmitt für unsere wunderbare Zusammenarbeit bei den Maus-OPs und den zahlreichen Tube-Formation-Experimenten. Danke, dass du zu jeder Tages- und Nachtzeit unterstützt hast!

Ich möchte mich auch bei Oxana Bechtgoldt für ihre tatkräftige Unterstützung bei den Tierexperimenten und den histologischen Analysen bedanken.

Carina Schreyäck danke ich ebenfalls für die tolle Unterstützung im Labor, bei den Auswertungen und das Lösen vieler Probleme.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Mona Arnold und Selina Ohl für die wunderschöne, freundschaftliche Zeit in unserem Dreier-Büro bedanken. Dank euch gab es immer etwas zu lachen, immer ein nettes Gespräch und immer aufmunternde Worte (oder Kuchen :-D) an stressigen Tagen. Ich werde unsere gemeinsamen Mittagspausen und Traditionen (selbst gebastelter Adventskalender, Spiele-Abende uvm.) sehr vermissen.

Bei meiner langjährigen Studienfreundin Sarah Wisser möchte ich mich ganz herzlich fürs Korrekturlesen meiner Doktorarbeit bedanken. Wir haben uns damals am ersten Tag unseres Bachelor-Biologiestudiums kennengelernt und alle Herausforderungen des Studiums gemeinsam gemeistert, aber auch andere Dinge wie unsere USA-Reise und den Umzug nach München zusammen erlebt. Deshalb freut es mich umso mehr, dass du mich auch bei meiner Doktorarbeit begleitet hast.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, meiner Schwester Madleen und Étienne für eure großartige Unterstützung während der gesamten letzten Jahre danken. Ihr musstet so oft ertragen, dass ich gestresst und am Rande der Verzweiflung war und habt mich mental wieder aufgebaut. Papa, danke, dass du in Rekordzeit meine Doktorarbeit auf Rechtschreibung Korrektur gelesen hast, obwohl das für dich alles Fachchinesisch war. Étienne, du musstest dir hunderte Male meine Vorträge anhören und ständig Rücksicht nehmen, wenn ich wieder mit Schreiben beschäftigt war. Und du hast mir den Rücken freigehalten, damit ich mehr Zeit für meine Doktorarbeit habe. Dafür danke ich dir von Herzen!