

Matrix-mediated activation of fibroblasts in rheumatoid arthritis

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Isabel Zeinert

aus Hagen

Köln, 2023

Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is an inflammatory autoimmune disease affecting synovial joints and leading to cartilage damage and bone loss. This destruction is promoted by activated fibroblast-like synoviocytes (FLS) that show an invasive and migratory phenotype. The mechanisms of FLS activation are unknown, but evidence suggests that pre-damaged extracellular matrix (ECM) of the cartilage could trigger the FLS activation. Moreover, integrin $\alpha 11\beta 1$ might be involved in the activation, as it is highly increased in the synovium of RA patients and hTNFtg mice, an RA mouse model.

In this thesis a culture system was established, that allows investigation of the FLS activation in response to damaged chondrocyte matrix. A damaged, RA-like matrix was deposited by murine chondrocytes treated with TNF α . Comparison to undamaged, healthy chondrocyte matrix revealed decreased ECM proteins, including several collagens and proteoglycans, increased matrix-degrading proteins, including MMPs and ADAMTSs, and elevated inflammatory cytokine secretion. Published data describing the RA profile correlate with those results and confirm a suitable culture system for the investigation of FLS-matrix interaction.

FLS responded to those differences in the damaged chondrocyte matrix with a matrix-remodeling and pro-inflammatory phenotype characterized by matrix degrading and regenerating gene expression and increased CLL11 and CCL19 secretion. Moreover, damaged chondrocyte matrix induced increased *Itga11* expression in FLS, which correlates with the increased $\alpha 11\beta 1$ amounts in RA patients and confirms an impact of chondrocyte matrix in RA disease progression. Deficiency of $\alpha 11$ reduced cytokine secretion of FLS in response to damaged chondrocyte matrix, including CLL11 and CCL19 secretion, leading to a less inflammatory phenotype in $\alpha 11^{-/-}$ FLS.

Wt FLS differ to skin fibroblasts and showed only a low expression of integrin $\alpha 11\beta 1$ compared to dermal fibroblasts. This resulted in a similar morphology, adhesion and migration behavior of wt and $\alpha 11^{-/-}$ FLS. In contrast, hTNFtg FLS, which express high levels of $\alpha 11\beta 1$, showed increased stress fiber and cell adhesion formation, which was normalized in $\alpha 11$ -deficient hTNFtg FLS indicating an important role for $\alpha 11\beta 1$ in FLS in pathological condition.

Conclusively, the composition of the extracellular matrix in RA has an impact on the FLS and can lead to a modified cell response or even drive pathological conditions. Integrin $\alpha 11\beta 1$ plays an important role to mediate these cell-matrix interactions.

Zusammenfassung

Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine entzündliche Autoimmunerkrankung, die hauptsächlich Synovialgelenke befällt und zu Knorpelschäden und Knochenverlust führt. Diese Zerstörung wird durch aktivierte synoviale Fibroblasten (FLS) gefördert, die einen invasiven und migrierenden Phänotyp aufweisen. Die Mechanismen der FLS-Aktivierung sind nicht bekannt, es gibt aber Hinweise darauf, dass eine vorgeschädigte extrazelluläre Matrix (ECM) des Knorpels die Aktivierung der FLS auslösen könnte. Außerdem zeigen vorherige Daten, dass Integrin $\alpha 11\beta 1$ in der Synovia von RA-Patienten und hTNFtg-Mäusen, einem RA-Mausmodell, stark erhöht ist und daher an der Aktivierung beteiligt sein könnte.

In dieser Arbeit wurde ein Kultursystem etabliert, das die Untersuchung der FLS-Aktivierung als Reaktion auf eine beschädigte Chondrozytenmatrix ermöglicht. Eine geschädigte, RA-ähnliche Matrix wurde von murinen Chondrozyten abgelagert, die mit TNF α behandelt wurden. Der Vergleich mit einer unbeschädigten, gesunden Chondrozytenmatrix ergab eine Verringerung der ECM-Proteine, einschließlich verschiedener Kollagene und Proteoglykane, eine Zunahme der matrixdegradierenden Proteine, einschließlich MMPs und ADAMTSs, und eine erhöhte Sekretion von inflammatorischen Zytokinen. Veröffentlichte Daten, die das RA-Profil beschreiben, stimmten mit diesen Ergebnissen überein und bestätigten, dass das hier entwickelte und charakterisierte *in vitro* System ein geeignetes Kultursystem für die Untersuchung der Interaktion zwischen FLS und Matrix ist.

FLS reagierten auf die Veränderungen in der geschädigten Chondrozytenmatrix mit einem Matrix-umstrukturierenden und proinflammatorischen Phänotyp, der durch Expression von Matrix-degradierenden und Matrix-regenerierenden Genen, so wie einer vermehrten CLL11 und CCL19 Sekretion gekennzeichnet war. Darüber hinaus induzierte eine geschädigte Chondrozytenmatrix eine erhöhte *Itga11* Expression in FLS, was mit den erhöhten $\alpha 11\beta 1$ -Mengen bei RA-Patienten übereinstimmt und einen Einfluss der Chondrozytenmatrix auf die Entwicklung der RA-Erkrankung bestätigt. Das Fehlen von Integrin $\alpha 11$ reduzierte die Zytokinsekretion der FLS als Reaktion auf beschädigte Chondrozytenmatrix, einschließlich der Sekretion von CLL11 und CCL19, was zu einem weniger entzündlichen Phänotyp in $\alpha 11^{-/-}$ FLS führt.

In wt FLS wurde Integrin $\alpha 11\beta 1$ im Vergleich zu dermalen Fibroblasten nur gering exprimiert. Dieses erklärt die unveränderte Morphologie, Adhäsions- und Migrationsverhalten von wt und $\alpha 11^{-/-}$ FLS. Im Gegensatz dazu zeigten hTNFtg FLS, die hohe Mengen an $\alpha 11\beta 1$ exprimieren, eine erhöhte Stressfaser- und Zelladhäsionsbildung, die in $\alpha 11$ -defizienten hTNFtg FLS wieder normalisiert war. Dieses weist auf eine wichtige Rolle von $\alpha 11\beta 1$ in FLS im pathologischen Zustand hin.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix in RA einen Einfluss auf die FLS hat und zu einer veränderten Zellantwort oder sogar zu pathologischen Zuständen führen kann. Dabei spielen Rezeptoren wie Integrin $\alpha11\beta1$ eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Zell-Matrix-Interaktionen.