Aus dem Interfakultären Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung der
Universität Greifswald, Abteilung Humangenetik.
Institut für Humangenetik der Universitätsmedizin Greifswald
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Ute Felbor

Thema:

Modulation angiogenetischer Eigenschaften von CCM3-defizienten Endothelzellen durch die matrizellulären Proteine FBLN5 und POSTN

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des akademischen
Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)
der
Universitätsmedizin
der
Universität Greifswald

2020

vorgelegt von:
Patricia Dellweg,
geb. am 04.10.1994
in Mainz

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich
1. Gutachter: Frau Prof. Ute Felbor
2. Gutachter: Herr Prof. Andreas Fischer
Ort, Raum: Greifswald, Hörsaal Pathologie
Tag der Disputation: 21.11.2022

Inhaltsverzeichnis IV
Abkürzungsverzeichnis VI
1. Einleitung 1
1.1. Zerebrale kavernöse Malformationen 1
1.2. Interaktionspartner und Auswirkungen des Verlustes von CCM3 2
1.3. Die extrazelluläre Matrix als zentraler Regulator der Angiogenese 5
1.4. Matrizelluläre Proteine 7
1.4.1. Das matrizelluläre Protein FBLN5 und sein Einfluss auf Endothelzellen 7
1.4.2. Funktion und Interaktion des matrizellulären Proteins POSTN 11
1.5. Zielsetzung 14
2. Material 15
2.1. Zelllinien 15
2.2. Laborgeräte 15
2.3. Verbrauchsmaterialien 17
2.4. Chemikalien 18
2.5. Kits 21
2.6. siRNAs und Primer 22
2.7. Fluoreszenzfarbstoff 22
2.8. Softwareprogramme 23
2.9. Online-Datenbanken und-Programme 23
3. Methoden 25
3.1. Zellbiologische Verfahren 25
3.1.1. Kultivierung von immortalisierten Endothelzellen 25
3.1.2. Generierung von *CCM3*$^{-/-}$ Zelllinien 25
3.1.3. Transfektion von siRNA 26
3.1.4. *Tube Formation Assay* 27
3.1.6. Trypsinierung im Zeitverlauf 28
3.2. Molekularbiologische Methoden 28
3.2.1. Präparative RNA-Isolation 28
3.2.2. cDNA-Synthese 29
3.2.3. Digitale Polymerasekettenreaktion zum Nachweis der Herunterregulation von *FBLN5* und *POSTN* 29
3.2.4. Quantitative Real-Time PCR zum Nachweis der Herunterregulation von *FBLN5* und *POSTN* 30
3.2.5. Immunfluoreszenz 31
3.2.6. Polymerasekettenreaktion der genomischen Zielregion 32
3.2.7. Sanger-Sequenzierung 33

3.2.8. Analyse der Transkriptome von *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVEC 34
3.3. Statistische Auswertung 34
4. Ergebnisse 35
4.1. Veränderte Zellmorphologie nach Verlust von CCM3 in CI-huVECs 35
4.2. Verringerte Stabilität gefäßähnlicher Strukturen nach Verlust von CCM3 in CI-huVECs 36
4.3. Verringerte Expression von *FBLN5* bzw. *POSTN* in *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs 38
4.4. Funktionelle Folgen der akuten Herunterregulation von *FBLN5* und *POSTN* 38
4.4.1. Inhibitorischer Effekt auf die Ausbildung gefäßähnlicher Strukturen nach akuter Herunterregulation von *FBLN5* 38
4.4.2. Inhibitorischer Effekt auf die Ausbildung gefäßähnlicher Strukturen nach akuter Herunterregulation von *POSTN* 40
4.5. Auswirkungen der Hinzugabe von rekombinanten Protein auf *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs 43
4.5.1. Veränderter Phänotyp von *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs durch die Hinzugabe von rFBLN5 43
4.5.2. Stabilitätssteigernde Wirkung von rPOSTN auf gefäßähnliche Strukturen in *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs 45
4.6. Auswirkungen der Hinzugabe von rekombinantem Protein auf *CCM3*$^{+/+}$ CI-huVECs 48
4.6.1. Unveränderte Morphologie von *CCM3*$^{+/+}$ CI-huVECs durch die Hinzugabe von rFBLN5 48
4.6.2. Stabilitätssteigernde Wirkung von rPOSTN auf gefäßähnliche Strukturen in *CCM3*$^{+/+}$ CI-huVECs 49
5. Diskussion 51
5.1. Auswirkungen des Verlustes von CCM3 auf Endothelzellen 51
5.2. Die matrizellulären Proteine FBLN5 und POSTN 54
5.2.1. Modulatorische Eigenschaften von FBLN5 auf *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen 55
5.2.2. Rettender Einfluss von POSTN auf die angiogenetischen Eigenschaften 58
6. Zusammenfassung 62
7. Literaturverzeichnis 63
8. Anhang 72
9. Abbildungsverzeichnis 90
10. Tabellenverzeichnis 91
11. Eidesstattliche Erklärung 92
12. Danksagung 93

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Varianzanalyse *(Analysis of Variance)*
bp	Basenpaare
Cas9	CRISPR-assoziiertes Protein 9
CCM	Zerebrale kavernöse Malformation *(Cerebral cavernous malformation)*
CCM1	*Cerebral cavernous malformation 1*
CCM2	*Cerebral cavernous malformation 2*
CCM3	*Cerebral cavernous malformation 3*
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CI-huVEC	Immortalisierte humane Nabelschnurvenenendothelzelle *(Constitutive immortalised human umbilical vein endothelial cell)*
CRISPR	*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*
crRNA	CRISPR-RNA
DANCE	*Developmental arteries and neural crest EGF-like*
DAPI	4′,6-Diamidino-2-Phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dPCR	Digitale Polymerase-Kettenreaktion
ECGM	*Endothelial cell growth medium*
EDTA	Ethylendiamtetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor *(Epidermal growth factor)*
ERK	Extrazelluläre Signal-regulierende Kinase *(Extracellular signal-regulated kinase)*
EVEC	Embryonales Gefäßprotein mit EGF-ähnlichen Wiederholungen *(Embryonic vascular EGF-like repeat-containing protein)*
FAS-I	Fasciculin-I
FAT-H	*Focal adhesion targeting* homologe Domäne
FBLN5	Fibulin 5
FBS	Fetales Kälberserum *(Fetal bovine serum)*
FN1	Fibronektin-1
GCKIII	*Germinal centre kinase III*
HUVEC	Humane Nabelschnurvenenendothelzelle *(human umbilical vein endothelial cell)*

ICAP-1	*Integrin cytoplasmatic-associated protein-1*
kDa	Kilodalton
MAP-Kinase	*Mitogen-activated protein-Kinase*
MMP-2, -9, -13	Matrixmetalloproteinase-2, -9, 13
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
OSF2	*Osteoblast specific factor 2*
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung *(Phosphate buffered saline)*
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDCD10	*Programmed cell death 10*
PFA	Paraformaldehyd
POSTN	Periostin
qPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
rFBLN5	Rekombinantes Fibulin5
RGD-Domäne	Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Domäne
Rho-A	*Ras homolog family member A*
Rho-Kinase	*Ras homolog*-Kinase
RNA	Ribonukleinsäure
RPLP0	*Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0*
rPOSTN	Rekombinantes Periostin
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
S. p.	*Streptococcus pyogenes*
SD	Standardabweichung
shRNA	*Small hairpin* Ribonukleinsäure
siRNA	*Small interferring* Ribonukleinsäure
STK24-26	Serin/Threoninkinase 24-26
STRIPAK	*Striatin-interacting phosphatase and kinase*
TBP	*TATA-box binding protein*
TGF-β	*Transforming growth factor*-β
tracrRNA	*Trans-activating crRNA*
TSP-1	Thrombospondin-1
VEGF	*Vascular endothelial growth factor*
VEGFR2	*Vascular endothelial growth factor receptor 2*
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Zerebrale kavernöse Malformationen

Zerebrale kavernöse Malformationen (CCMs, *Cerebral cavernous malformations*) sind dünnwandige, abnormal dilatierte Gefäßfehlbildungen, die zwischen wenigen Millimetern und mehreren Zentimetern groß werden können und von einer veränderten Gewebematrix umgeben sind (Baumann et al. 2007; Gault et al. 2004; Rigamonti et al. 1987). Sie können sowohl in Gehirn und Rückenmark als auch außerhalb des ZNS in der Retina lokalisiert sein (Labauge et al. 2007). Morphologisch stellen sie sich als maulbeerartiges endotheliales Gefäßkonvolut dar (Cavalcanti et al. 2012; Spiegler et al. 2018), das in der Bildgebung von einem dunklen Rand aus Hämosiderin begleitet sein kann. Die Hämosiderinablagerung lässt auf eine chronische Mikroblutung oder rezidivierende Blutungsereignisse rückschließen (Batra et al. 2009; Wong et al. 2000; Zabramski et al. 1994). Der langsame Blutfluss innerhalb der Läsionen erhöht das Risiko für die Entstehung von Thromben und Kalzifikationen (Batra et al. 2009; Fischer et al. 2013). Die dilatierten Gefäßabschnitte zeichnen sich außerdem durch Fehlen von intervenierendem Hirnparenchym und durch eine gesteigerte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke aus (Clatterbuck et al. 2001; Rigamonti et al. 1987; Schneider et al. 2011).

Man unterscheidet zwischen einer sporadischen und einer hereditären Form der Kavernomatose. Patienten der sporadischen Variante haben üblicherweise eine solitäre Läsion, während sich die familiäre Form durch multiple Läsionen manifestiert (Labauge et al. 1998; Zabramski et al. 1994). Die hereditäre Variante folgt dem autosomal dominanten Erbgang und zählt mit einer Prävalenz von 1:3300 bis 1:3800 zu den seltenen Erkrankungen (Spiegler et al. 2018). Eine pathogene Keimbahnvariante in einem der drei Gene *CCM1* (OMIM: 604214)*, CCM2/ malcavernin* (OMIM: 607929) oder *CCM3/ PDCD10* (OMIM: 609118) prädisponiert für eine Kavernomatose. Ausschlaggebend für die Kavernomentstehung ist die zweite somatische Mutation, der sogenannte *second hit* (Spiegler et al. 2019). Mit Hilfe der Standarddiagnostik wurden 60 % der detektierten Keimbahnvarianten in *CCM1,* 18 % in *CCM2* und 22 % in *CCM3* nachgewiesen (Spiegler et al. 2014). Die lokusspezifische Penetranz liegt für *CCM1* bei 63 %, für *CCM2* 55 % und für *CCM3* 68 % (Denier et al.

2006). Größere CCM Läsionen zeigen ein Mosaik ähnliches Muster. Hierbei beziehen die Zellen mit inaktivierter CCM-Expression Zellen mit noch erhaltener CCM-Expression in die Gefäßmalformation mit ein (Detter et al. 2018; Malinverno et al. 2019; Rath et al. 2020).

Das Auftreten erster Krankheitssymptome liegt meistens zwischen der zweiten und vierten Lebensdekade (Felbor et al. 2006; Fischer et al. 2013; Riant et al. 2013). 40 % der Variantenträger bleiben ihr Leben lang asymptomatisch (Denier et al. 2006; Spiegler et al. 2018). Klinisch manifestieren sich die Läsionen in Form von migräneähnlichen Kopfschmerzen, fokalen neurologischen Defiziten, epileptischen Anfällen und zerebralen Blutungen (Batra et al. 2009; Fischer et al. 2013; Siegel et al. 2005). Die Magnetresonanztomographie (MRT) mit suszeptibilitäts-gewichteten und Gradientenechosequenzen gilt als Goldstandard für die Diagnose der CCM (Akers et al. 2017; Spiegler et al. 2018). Entscheidend für Blutungsrate, Schwere der neurologischen Ausfälle und Mortalitätsrate ist die Lokalisation der jeweiligen Läsion (Felbor et al. 2006; Fischer et al. 2013; Porter et al. 1997). Der bisher einzige gezielte Behandlungsansatz stellt die chirurgische Resektion der Malformationen dar, jedoch wird nur nach Versagen der symptomatischen Pharmakotherapie und progressiven neurologischen Defiziten eine Operation in Erwägung gezogen (Akers et al. 2017; Batra et al. 2009; Baumann et al. 2007; Fischer et al. 2013; Wang et al. 2003)

Pathogene Varianten im *CCM3*-Gen sind mit einem früheren Erkrankungsbeginn teilweise schon vor dem zehnten Lebensjahr vergesellschaftet. Sowohl eine erhöhte Anzahl an Malformationen als auch ein erhöhtes Blutungsrisiko, das mit dem frühzeitigen Einsetzen hämorrhagischer Schlaganfälle verbunden ist, sind hiermit assoziiert (Denier et al. 2006; Merello et al. 2016; Riant et al. 2013; Shenkar et al. 2015; Stahl et al. 2008).

1.2. Interaktionspartner und Auswirkungen des Verlustes von CCM3

Das auf dem langen Arm von Chromosom 3 (3q26.1) lokalisierte *CCM3*-Gen besteht aus sieben kodierenden Exonen, die für das aus 212 Aminosäuren bestehende und 25 kDa große Protein CCM3/PDCD10 kodieren (Cavalcanti et al. 2012; Labauge et al. 2007; Riant et al. 2010). Bergametti et al. (2005) beschrieben *CCM3* im Rahmen der

CCM-Pathogenese als erste. Das Protein wird ubiquitär exprimiert und besitzt am Amino-terminalen Ende eine Serin/Threoninkinase Bindungs- und Phosphorylierungsdomäne sowie eine Dimerisierungsdomäne. Diese Domäne interagiert mit einem zweiten CCM3-Protein, wodurch ein Homodimer entsteht. Am Carboxy-terminalen Ende befindet sich eine FAT-homologe (FAT-H; *focal adhesion targeting*) Domäne. Amino- und Carboxy-terminales Ende sind durch eine flexible Linker-Region miteinander verbunden (Fisher & Boggon 2014; Li et al. 2010b).

Im Rahmen eines *in vitro* Experiments konnte gezeigt werden, dass CCM3 innerhalb eines ternären CCM1/CCM2/CCM3 Komplexes vorliegen kann. CCM2 fungiert hier als Linkerprotein. Die Funktion des Komplexes ist noch nicht vollständig aufgeklärt (Fisher & Boggon 2014; Hilder et al. 2007; Voss et al. 2007). Zwischen den Proteinen sind keine strukturellen Ähnlichkeiten oder Sequenzhomologien festzustellen (Fischer et al. 2013).

Die Interaktion von CCM3 mit Proteinen der GCKIII-Familie (*Germinal centre kinase III*), wie STK24, STK25 und STK26 (Serin/ Threoninkinasen 24-26) ist bisher am besten erforscht (Draheim et al. 2015; Fidalgo et al. 2010; Xu et al. 2013). Diese Proteine sind an der Modulation der Apoptose, Proliferation, Migration und Polarität von Zellen beteiligt (Fischer et al. 2013; Lu et al. 2006; Nogueira et al. 2008; Preisinger et al. 2004). CCM3 bildet beispielsweise zusammen mit STK24 einen Komplex, der die Liganden-stimulierte Exozytose reguliert (Zhou et al. 2016). Für intakte Zell-Zell-Kontakte ist dagegen die Interaktion zwischen CCM3 und STK25 essentiell (Zheng et al. 2010). Die Zellproliferation wiederum wird durch das Zusammenspiel mit STK26 und der nachfolgenden Aktivierung des ERK-Signalweges beeinflusst (Ma et al. 2007). Die GCKIII-Kinasen sind wie das CCM3-Protein Teil des STRIPAK-Komplexes (*Striatin-Interacting phosphatase and kinase complex*). Der STRIPAK-Komplex ist verantwortlich für die Polarisation des Golgi-Apparates (Fischer et al. 2013; Kean et al. 2011). Während 80 % von CCM3 im STRIPAK-Komplex gebunden vorliegen, sind 20 % im CCM1/CCM2/CCM3 Komplex lokalisiert (Goudreault et al. 2009). Des Weiteren greift CCM3 in den Angiogenese-stiumlierenden VEGF (*Vascular endothelial growth factor)*-Signalweg ein, indem es den VEGFR2 (*Vascular endothelial growth factor receptor 2*) stabilisiert (He et al. 2010).

Der Verlust von CCM3 führt zu einer gesteigerten Aktivierung von Rho-A (*Ras homolog family member A)*, welche ihrerseits die Rho-Kinase (*Ras homolog-kinase*) aktiviert. Auf diese Art und Weise werden Proteine phosphoryliert, die an der Stressfaserformation, der Zellpolarität, der Migration und der Permeabilität beteiligt sind. In diesem Mechanismus liegt die veränderte Morphologie des Aktinzytoskeletts der CCM3-defizienten Endothelzellen mit kleinen, kurzen Stressfasern begründet (Fischer et al. 2013). Am Schlussleistenkomplex (*Tight junctions*) haben die drei CCM-Proteine unterschiedliche Zielstrukturen. Der Verlust von CCM3 führt an dieser Stelle zu einer dauerhaften Aktivierung der MAP-Kinasen (*Mitogen-activated protein-Kinase*) ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinase)*. Zusätzlich wirkt die Herunterregulation von CCM3 auf Endothelzellen antiapoptotisch (Chen et al. 2009). Die Dauer der Inaktivierung von CCM3 scheint ebenfalls eine entscheidende Rolle auf diverse Zelleigenschaften zu haben. Nach dauerhafter Inaktivierung zeigen die Endothelzellen neben einem gehemmten angiogenetischen Verhalten auch eine veränderte Morphologie. Die Zellen sind kompakter, größer und weniger verformbar. Nach akuter Herunterregulation von CCM3 ist der Effekt nicht zu beobachten, weshalb diese Auswirkung ein Langzeiteffekt zu sein scheint (Schwefel et al. 2019). Grundsätzlich bedingt Zellsteifheit außerdem eine Destabilisierung von Zell-Zell-Verbindungen und führt dadurch auch zu einer gesteigerten Permeabilität der interzellulären Kontakte (Huveneers et al. 2015). Die Auswirkungen nach dauerhaftem Verlust von CCM3 sind in Abbildung 1 dargestellt.

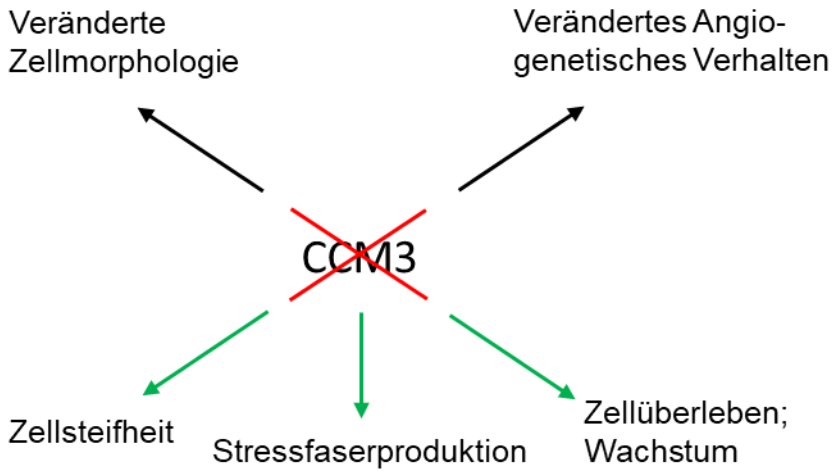

Abbildung 1: Auswirkungen des chronischen Verlustes von CCM3. Rote Linien: gehemmt; grüne Pfeile: erhöht/ steigert; schwarze Pfeile: führt zu/ bedingt

1.3. Die extrazelluläre Matrix als zentraler Regulator der Angiogenese

Das Lumen von Blutgefäßen ist durch eine dreischichtige Gefäßwand, bestehend aus der inneren Endothelzellschicht, der darauffolgenden glatten Muskelzellschicht und der sie umgebenden extrazellulären Matrix (EZM) begrenzt (Raines 2000). Die EZM stellt eine dreidimensionale, unlösliche, dynamische und lebensnotwendige Struktur dar. Sie besteht aus über 300 Proteinen, Hauptbestandteil ist das Kollagen (Bonnans et al. 2014; Hynes & Naba 2012). Die Kollagene können Zugkräfte auf benachbarte Endothelzellen, auch wenn diese nicht untereinander in Verbindung stehen, übertragen (Bonnans et al. 2014; Senger & Davis 2011). Weitere Bestandteile der EZM sind Proteoglykane wie Aggrecan, Versican, Perlecan und Decorin. Mit ihren Glykosaminoglykan-Seitenketten stellen sie ebenfalls zentrale Proteine der EZM dar (Bonnans et al. 2014). Jedes Gewebe hat eine individuelle Komposition der EZM, welche essentiell für die embryonale Organentwicklung und für die Gewebshomöostase ist (Bonnans et al. 2014; Hynes 2009).

Der Vorgang der Bildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Gefäßen wird Angiogenese genannt. Innerhalb von Kavernomen, welche durch den Verlust der Genexpression einer der drei CCM-Gene, *CCM1, CCM2* oder *CCM3*, entstehen, ist die Angiogenese pathologisch verändert (Fischer et al. 2013). Der Vorgang der Angiogenese gliedert sich in drei Teilschritte (Brooks 1996; Senger & Davis 2011):
Zunächst werden in der Initiationsphase die vaskulären Zellen durch proangiogene Zytokine und andere physiologische Mediatoren aktiviert. Währenddessen wird die EZM der Endothelzellen abgebaut und zusätzlich ruhende Endothelzellen rekrutiert. Im zweiten Schritt kommt es zur Proliferation, Migration, Invasion und der Ausbildung von kapillarähnlichen Strukturen (*Tube Formation*). Außerdem wird die Sekretion von proteolytischen Enzymen gesteigert, um die Bestandteile der EZM neu anzuordnen. Zuletzt kommt es zur Ausreifung und Differenzierung der entstandenen Strukturen durch die Ausbildung eines Lumens innerhalb der tubulären Strukturen. Die zuvor abgebauten Bestandteile, wie EZM und Perizyten, lagern sich in neuer Ordnung um die Gefäße.

Die Differenzierung der Endothelzellen und die Ausbildung tubulärer Strukturen kann durch den *Tube Formation Assay in vitro* visualisiert werden. Hierdurch können Einflüsse auf diesen Schritt innerhalb der Angiogenese untersucht werden (Ponce

2009). Die Angiogenese stellt die Schlüsselrolle sowohl in der physiologischen Gefäßentwicklung als auch in der Reparatur des Gewebes dar (Carmeliet & Jain 2000). Essentiell für eine reibungslos verlaufende Angiogenese sind sowohl das Auflösen von interzellulären Kontakten (Dye et al. 2004) als auch die Eigenorganisation der Endothelzellen. Die EZM fungiert hier als Orientierung, wodurch die gerichtete Motilität der nachfolgend rekrutierten Endothelzellen während der Angiogenese gewährleistet wird (Daub & Merks 2013).

Die Angiogenese wird durch viele verschiedene Faktoren reguliert (Klagsbrun & D'Amore 1991). Thrombospondin-1 (TSP-1) zum Beispiel ist ein endogener Inhibitor der Angiogenese (Good et al. 1990) und hemmt diese durch Induktion der Apoptose von Endothelzellen (Hynes 2007; Sottile 2004). MMP-9 gehört zu der Gruppe der Matrixmetalloproteinasen. Sie bauen diverse Bestandteile der EZM proteolytisch ab und nehmen so Einfluss auf den Vorgang der Angiogenese (Rundhaug 2005). Die MMP-9 stimuliert die Angiogenese durch Freisetzen von VEGF aus Speicherdepots (Hynes 2002; Rodriguez-Manzaneque et al. 2001). VEGF seinerseits ist ein starker endogener Stimulator der Angiogenese (Pepper et al. 1992) und induziert zusätzlich die Expression von $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ (Carmeliet 2002). Diese Zelloberflächenrezeptoren zählen zu der Gruppe der Integrine und sind neben sieben weiteren Integrinen am Vorgang der Angiogenese mit beteiligt. Aufgrund dessen schlussfolgert man, dass in den einzelnen Stadien der Angiogenese verschiedene EZM-Bestandteile rekrutiert werden und binden (Hynes 2007).

Die EZM beeinflusst Endothelzellen auf zwei Arten. Zum einen wandern Endothelzellen durch den Vorgang der Haptotaxis entlang lokaler Gradienten an den Ort der höheren EZM-Konzentration (Lamalice et al. 2007). Zum anderen können Endothelzellen aufgrund der Haptokinese ihre Beweglichkeit anhand der EZM-Konzentration vermindern oder steigern (Daub & Merks 2013). Alle Zellen haben entweder dauerhaft oder während bestimmter Phasen der Entwicklung engen Kontakt zu ihrer EZM (Hynes 2009). Der Verlust der Matrixzugehörigkeit führt in vielen Zelltypen zur Apoptose (Giancotti & Ruoslahti 1999). Integrine sind für die Verbindung zwischen der Zelle und der EZM verantwortlich (Brooks 1996). Sie können sowohl durch die Induktion intrazellulärer Signalwege proangiogene Prozesse stimulieren als auch die Angiogenese durch eine erleichterte Migration der Endothelzellen beeinflussen, in dem der Abbau der EZM durch proteolytische Enzyme induziert wird (Carmeliet 2002). Eine

deregulierte Organisation der EZM kann nicht nur durch den Verlust der Zelldifferenzierung sondern auch durch eine gesteigerte Proliferation und Invasion der Zellen zur Entstehung von Tumoren führen (Bonnans et al. 2014; Lu et al. 2011).

1.4. Matrizelluläre Proteine

Extrazelluläre Proteine, die keine strukturbildende Funktion innehaben, aber dennoch an vielen verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt sind, stellen die Gruppe der matrizellulären Proteine dar (Sage & Bornstein 1991). Durch Bindung an Zelloberflächenrezeptoren, sogenannte Integrine, können sie sowohl Einfluss auf die EZM als auch auf intrazelluläre Signalkaskaden nehmen (Bornstein & Sage 2002). Typisch für diese Proteine sind hohe Expressionsraten während der embryonalen Entwicklung und geringe Konzentrationen im adulten Gewebe. Die Expression dieser Proteine wird während der Wundheilung und anderen gewebeerneuernden Prozessen, die mit einer gesteigerten Angiogenese einhergehen, reaktiviert (Bornstein 2000; Bornstein & Sage 2002). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass der Verlust einzelner matrizellulärer Proteine eher mit einem mild ausgeprägten Phänotyp assoziiert ist und nicht in embryonaler Letalität resultiert (Chapman et al. 2010; Nakamura et al. 2002; Norris et al. 2008).

1.4.1. Das matrizelluläre Protein FBLN5 und sein Einfluss auf Endothelzellen

FBLN5 (OMIM: * 604580; Fibulin 5) gehört zu der Proteinfamilie der Fibuline. Seit 2009 werden die Fibuline aufgrund ihrer zahlreichen zellulären und biologischen Funktionen, die sowohl die Matrix als auch die benachbarten Zellen betreffen, zu den matrizellulären Proteinen gezählt (Yanagisawa et al. 2009). Das erste Fibulin wurde 1989 entdeckt (Argraves et al. 1989). Bis heute sind sieben Mitglieder der Fibulin Proteinfamilie beschrieben. Die Fibulin-Familie beeinflusst die Stabilität von Strukturen der EZM. Hierzu zählen die elastischen Fasern und der Aufbau der Basalmembran (Argraves et al. 2003). Alle Proteine dieser Gruppe besitzen am Amino-terminalen Ende eine Region mit insgesamt sechs möglichen Calcium-bindenden EGF (*epithelial growth factor-like)*- ähnlichen Bindungsstellen. Fibuline werden in zwei Untergruppen

eingeteilt. Die erste Gruppe wird durch FBLN1, FBLN2 und FBLN6 gebildet. Die sechs Calcium-bindenden EGF-ähnlichen Domänen dieser Fibuline sind länger als die der Fibuline der zweiten Gruppe. Sie weisen eine zusätzliche Amino-terminale Domäne auf, welche je nach Protein eine Anaphylatoxin-ähnliche oder Immunglobulin-Domäne sein kann (Chu & Tsuda 2004; Yanagisawa et al. 2009). FBLN3, FBLN4, FBLN5 und FBLN7 bilden die zweite Gruppe dieser Proteinfamilie. Die erste der insgesamt sechs Calcium-bindenden Domänen ist durch eine Prolin-haltige Insertionssequenz von den anderen fünf Calcium-bindenden Wiederholungen getrennt. Die sechste Domäne weist acht Cysteinreste auf (Kowal et al. 1999; Yanagisawa et al. 2009).

FBLN5 wurde durch zwei unabhängige Arbeitsgruppen bereits 1999 erstmalig beschrieben (Kowal et al. 1999; Nakamura et al. 1999). Durch die Untersuchung der cDNA von Mäusen, Ratten und Menschen konnte ein hoch konserviertes, aus 448 Aminosäuren bestehendes, 63 kDa großes Protein namens DANCE (*developmental arteries and neural crest epidermal growth factor* (*EGF-*) *like*) (Nakamura et al. 1999) beziehungsweise EVEC (*embryonic vascular EGF-like repeat-containing protein*) (Kowal et al. 1999) identifiziert werden, welches nachfolgend in die Gruppe der Fibuline einsortiert wurde (Nakamura et al. 2002). FBLN5 wird hauptsächlich in vaskulären Endothelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert. Aufgrund seiner typischen Amino-terminalen Signalsequenz zählt es zu den sezernierten Proteinen (Kowal et al. 1999; Nakamura et al. 1999). Das humane *FBLN5*-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 14 (14q32.12) lokalisiert (Nakamura et al. 1999). Entsprechend der Eigenschaften von matrizellulären Proteinen ist die FBLN5-Expression im adulten Gewebe stark verringert. Während der Wundheilung und anderen angiogenetischen Prozessen wird die Expression reaktiviert (Nakamura et al. 1999). Das Protein besitzt eine RGD-Sequenz, wobei diese Abkürzung die Aminosäuresequenz Arginin, Glycin und Asparaginsäure repräsentiert (Kowal et al. 1999; Nakamura et al. 1999). Durch die Bindung dieser Sequenz an Integrine wie $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ und $\alpha_9\beta_1$ werden die adhäsiven Eigenschaften von Endothelzellen verändert (Nakamura et al. 2002; Nakamura et al. 1999; Ruoslahti & Pierschbacher 1987; Schiemann et al. 2002). FBLN5 wirkt durch die Beeinflussung von Wachstum, Migration, Differenzierung und Überleben von Endothelzellen als Bestandteil der EZM auf die vaskuläre Reorganisation (Nakamura et al. 1999).

Des Weiteren stellt die FBLN5-Expression in Tumorgeneseprozessen ein Dignitätskriterium dar (Shi et al. 2014), zeigt allerdings kontroverse Ergebnisse. Beispielsweise ist die FBLN5-Expression in Tumoren des Magens hochreguliert und gilt in diesem Zusammenhang als Zeichen für Malignität (Shi et al. 2014). In den meisten anderen malignen Tumoren, vor allem denen der Niere, der Brust, des Ovars und des Kolons, ist die FBLN5-Expression herunterreguliert (Schluterman et al. 2010). Außerdem ist FBLN5 ein essentieller Faktor für die Organisation elastischer Fasern. In Mäusen führt der Verlust von FBLN5 deshalb zu Emphysembildung innerhalb der Lunge, überdehnbarer Haut und Gefäßanomalien (Nakamura et al. 2002; Yanagisawa et al. 2002). Er ist jedoch nicht letal, ein Überleben der Mäuse bis ins Erwachsenenalter ist typisch (Nakamura et al. 2002). Im Rahmen der Angiogenese zeigte der Verlust von FBLN5 uneinheitliche Ergebnisse, teilweise wurde die Angiogenese gesteigert teilweise durch Apoptose gehemmt (Schluterman et al. 2010; Zheng et al. 2006). Vermutet wird, dass eine geringe FBLN5-Konzentration die Angiogenese durch eine hohe Bindungsaffinität zu Integrinen bei gleichzeitig geringer Dichte von Integrinen fördert. Der hemmende Einfluss soll durch eine geringe Bindungsaffinität bei hoher Rezeptordichte eines bis dahin noch unbekannten Rezeptors vermittelt werden (Albig & Schiemann 2005). Die Expression und die Wirkung von FBLN5 unterliegen diversen Einflussfaktoren, wodurch Prozesse wie Adhäsion, Stressfaserproduktion, Angiogenese und Degradation von interzellulären Kontakten beeinflusst werden (Abbildung 2). Durch TGF-β wird die FBLN5-Expression dosis- und zeitabhängig stimuliert (Albig & Schiemann 2004; Kuang et al. 2003; Kuang et al. 2006), während der proangiogene Faktor VEGF (Carmeliet & Collen 2000) die FBLN5-Expression inhibiert (Albig & Schiemann 2004). Daraus schließt man, dass proangiogene Signale einen hemmenden Einfluss auf die FBLN5-Expression haben (Albig & Schiemann 2004). FBLN5 seinerseits steigert die Expression des endogenen Angiogeneseinhibitors TSP-1 (Albig & Schiemann 2004; Good et al. 1990). Aufgrund dieser Wechselwirkungen wird VEGF und TSP-1 eine reziproke Beziehung in Bezug auf die Aktivierung der Angiogenese zugeschrieben (Albig & Schiemann 2004). Die Überexpression von FBLN5 zeigte über die RGD-vermittelte Aktivierung an Integrin-Kaskaden eine Hemmung der MMP-9-Expression (Guo et al. 2016; Manders et al. 2018). Die MMP-9-Expression wird unter anderem durch TSP-1 gehemmt (Rodriguez-Manzaneque et al. 2001). Die Hemmung führt zu einer herabgesetzten Permeabilität, da vermutlich Bestandteile des interzellulären

Schlussleistenkomplexes (*Tight junction*) vermindert abgebaut werden (Guo et al. 2016; Rundhaug 2005). Auf diese Art und Weise nimmt FBLN5 indirekt Einfluss auf die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und mildert bereits bestehende Membrandefekte ab (Guo et al. 2016).

Nachdem sowohl eine pathologisch veränderte Angiogenese als auch eine gesteigerte Permeabilität mit der Kavernomatose einhergehen, schien die Untersuchung von FBLN5 im Zusammenhang der CCM3-Pathogenese vielversprechend zu sein.

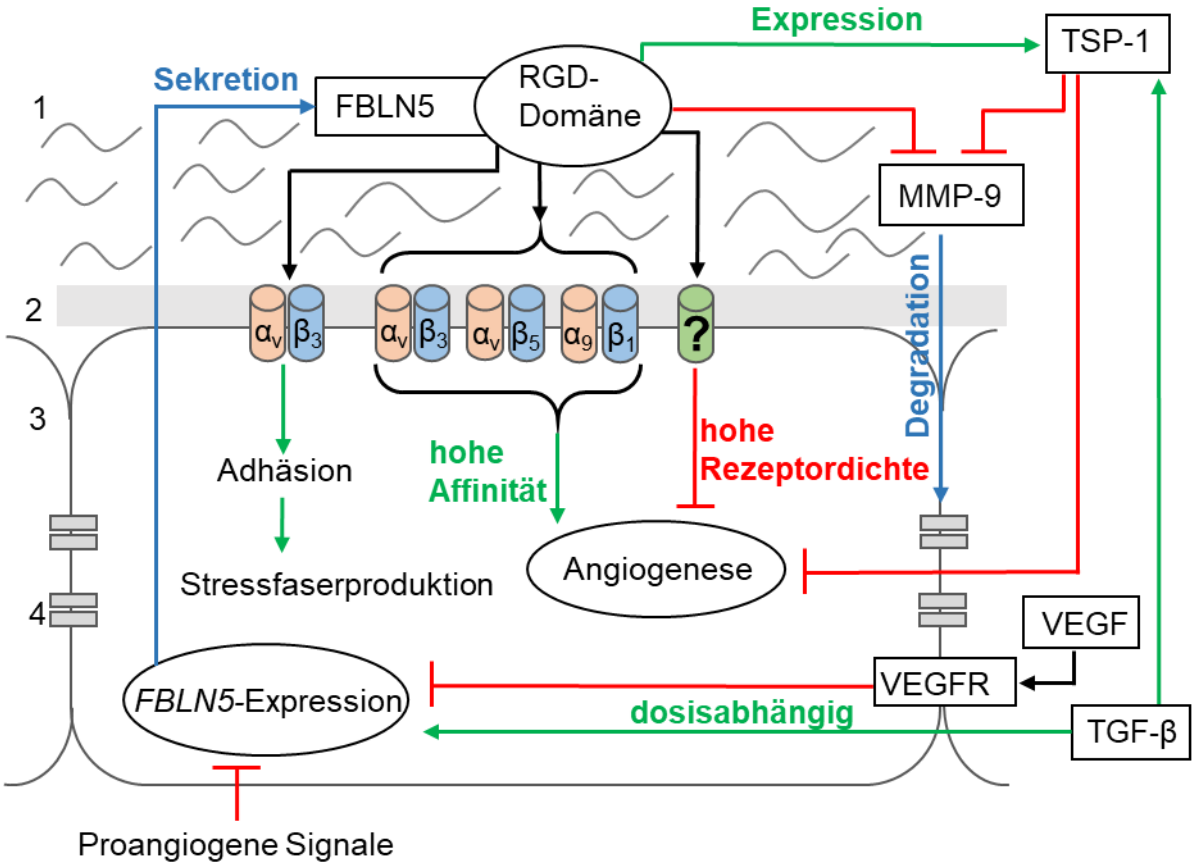

Abbildung 2: Modulation der *FBLN5*-Expression und seine Auswirkung auf Zelleigenschaften. 1: zellspezifische EZM, **2**: Basalmembran, **3**: Zelle mit Zellkern, **4**: interzelluläre Kontakte; grüne Pfeile: induziert/ steigert, rote Linien: hemmt/ verringert, schwarze Pfeile: bindet an/ reagiert über; $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ und $\alpha_9\beta_1$: Integrine; MMP: Matrixmetalloproteinase RGD-Domäne: Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Domäne; TGF-β: *Transforming growth factor β;* TSP-1: Thrombospondin-1; VEGF: *Vascular endothelial growth factor*; VEGFR: *Vascular endothelial growth factor* receptor; ?: bisher unbekannter Rezeptor

1.4.2. Funktion und Interaktion des matrizellulären Proteins POSTN

POSTN (OMIM: * 608777; Periostin) wurde ursprünglich in einer Mauszelllinie als *Osteoblast-specific factor 2* (OSF2) identifiziert (Takeshita et al. 1993). Das für POSTN kodierende Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 13 (13q13.3) lokalisiert und umfasst 36 kb (Gonzalez-Gonzalez & Alonso 2018; Hamilton 2008). Insgesamt kodieren 23 Exons für das aus 836 Aminosäuren bestehende Protein mit einer atomaren Masse von 93 kDa (Gonzalez-Gonzalez & Alonso 2018; Takeshita et al. 1993). Das Fehlen einer Transmembran-Domäne sowie die typische Amino-terminale Signalsequenz implizieren, dass POSTN zu der Gruppe der Proteine zählt, die in die EZM sezerniert werden (Horiuchi et al. 1999; Takeshita et al. 1993). Zusätzlich ist die Amino-terminale Sequenz für die Interaktion mit anderen EZM-Proteinen verantwortlich (Gonzalez-Gonzalez & Alonso 2018). Bevorzugt wird POSTN von Osteoblasten und Osteoblasten-ähnlichen Zelllinien sezerniert. Aufgrund der Tatsache, dass POSTN hauptsächlich im Periost und in den parodontalen Bändern der Zähne zu finden ist, wird dem Protein eine strukturerhaltende Funktion von Knochen- und Zahnanordnung zugeschrieben (Horiuchi et al. 1999). Der Amino-terminalen Sequenz folgen eine Cysteinreiche-Domäne und vier homologe hoch konservierte Wiederholungen, die Fasciclin-I-(FAS-I) ähnlichen Domänen, welche die Interaktionen mit Integrinen vermitteln (Gonzalez-Gonzalez & Alonso 2018; Horiuchi et al. 1999; Siriwardena et al. 2006; Takeshita et al. 1993). Auf die FAS-I-ähnlichen Domänen von POSTN folgt die hydrophile Carboxy-terminale Sequenz, welche zwischen Exon 17 und 21 dem alternativen Spleißen unterliegt. Hierdurch entstehen vier Proteinisoformen mit einer atomaren Masse zwischen 83 kDa und 93 kDa (Gonzalez-Gonzalez & Alonso 2018; Horiuchi et al. 1999; Siriwardena et al. 2006). Sowohl die hohe Expressionsrate von POSTN im fetalen Gewebe als auch die Tatsache, dass der Verlust von POSTN sich in einem milden Phänotyp äußert, waren 2008 mitbegründend für die Einordnung des Proteins in die Familie der matrizellulären Proteine (Gillan et al. 2002; Norris et al. 2008).

Das Vorhandensein von TGF-β führt zur vermehrten Expression von POSTN (Abbildung 3). POSTN ist auch in anderen Zelllinien zu finden und nimmt hier Einfluss auf diverse Zelleigenschaften wie Angiogenese, Zellüberleben, Migration, Adhäsion und Abbau von Bestandteilen der EZM. Bisher wurden die Auswirkungen von POSTN

auf diese Zelleigenschaften fast ausnahmslos in verschiedenen Tumortypen untersucht. Innerhalb des Mammakarzinoms hat POSTN einen stimulierenden Einfluss auf die Angiogenese und steigert das Tumorwachstum (Shao et al. 2004). Der proangiogene Effekt auf Endothelzellen wird der Wechselwirkung von POSTN mit dem $\alpha_v\beta_3$ Integrin zugeschrieben. Diese Interaktion führt zu einer verstärkten Expression des auf Endothelzellen lokalisierten VEGFR2 und zu einem gesteigerten Ansprechen des ERK/VEGF-Signalweges (Liu et al. 2016; Shao et al. 2004; Siriwardena et al. 2006). Die Herunterregulation von POSTN hemmt die Angiogenese von HUVECs (*Human umbilical vein endothelial cells)* (Liu et al. 2016). Die Schlüsselmechanismen eines progredienten Tumorwachstums sind neben einer gesteigerten Angiogenese ein gesteigertes Zellüberleben beziehungsweise ein Verhindern der Apoptose. Es scheint, dass POSTN Zellen gegenüber zellulärem Stress resistenter werden lässt und sie hierdurch vor stressinduzierter Apoptose schützt (Nakazawa et al. 2004; Takanami et al. 2008). Antikörper gegen POSTN steigern hingegen die Apoptose in Tumorzelllinien (Ruan et al. 2009; Tai et al. 2005; Zhu et al. 2010). Hieraus resultiert ein Überlebensvorteil für Tumorzellen mit POSTN und das Wachstum von Metastasen wird dramatisch gesteigert (Nakazawa et al. 2004). Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nimmt POSTN mittels seiner ersten FAS-I-ähnlichen Domäne nicht nur auf die Ausbildung röhrenartiger Strukturen, sondern auch auf die Migration von Endothelzellen einen stimulierenden Einfluss (Hakuno et al. 2010; Kim et al. 2014; Kim et al. 2017; Zhang et al. 2015). Der Verlust der kompletten Carboxy-terminalen Sequenz von POSTN führt zu einer Inhibition der Zellmotilität und Migration (Kim et al. 2005). Des Weiteren ist POSTN an der Regulation der Adhäsion beteiligt. Die Adhärenz gegenüber ihrer Oberfläche wird gesteigert, wenn HUVECs auf POSTN beschichteten Oberflächen wachsen (Zhu et al. 2010). Dies konnte auch bei Ovarepithelzellen beobachtet werden (Gillan et al. 2002), weshalb POSTN die Adhäsion, unabhängig des Zelltyps, zu stimulieren scheint. Der adhäsionssteigernde Effekt kann mit der Hilfe von Antikörpern gegen $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ gehemmt werden, weshalb eine Interaktion von POSTN mit diesen Integrinen hoch wahrscheinlich ist (Gillan et al. 2002; Li et al. 2010a; Zhu et al. 2010). Diese Integrine spielen ebenfalls im Kontext der Angiogenese eine entscheidende Rolle (Hynes 2007). Eine weitere Eigenschaft von POSTN ist die Einflussnahme auf die MMP-9-Expression. Die Überexpression von POSTN steigert sowohl die Sekretion von MMP-2 und MMP-9 als auch die Aktivität von MMP-9

(Hakuno et al. 2010; Yan & Shao 2006). Beide Matrixmetalloproteinasen sind am Abbau einzelner Bestandteile der EZM beteiligt und werden zusätzlich für das Auflösen interzellulärer Kontakte im Rahmen der Angiogenese verantwortlich gemacht (Rundhaug 2005).

Aufgrund der Einflussnahme von POSTN auf Angiogenese, Adhäsion und indirekt der EZM-Degradation wurde der Fokus dieser Arbeit auf die möglichen modulatorischen Einflüsse im Rahmen der CCM3-Pathogenese gelegt.

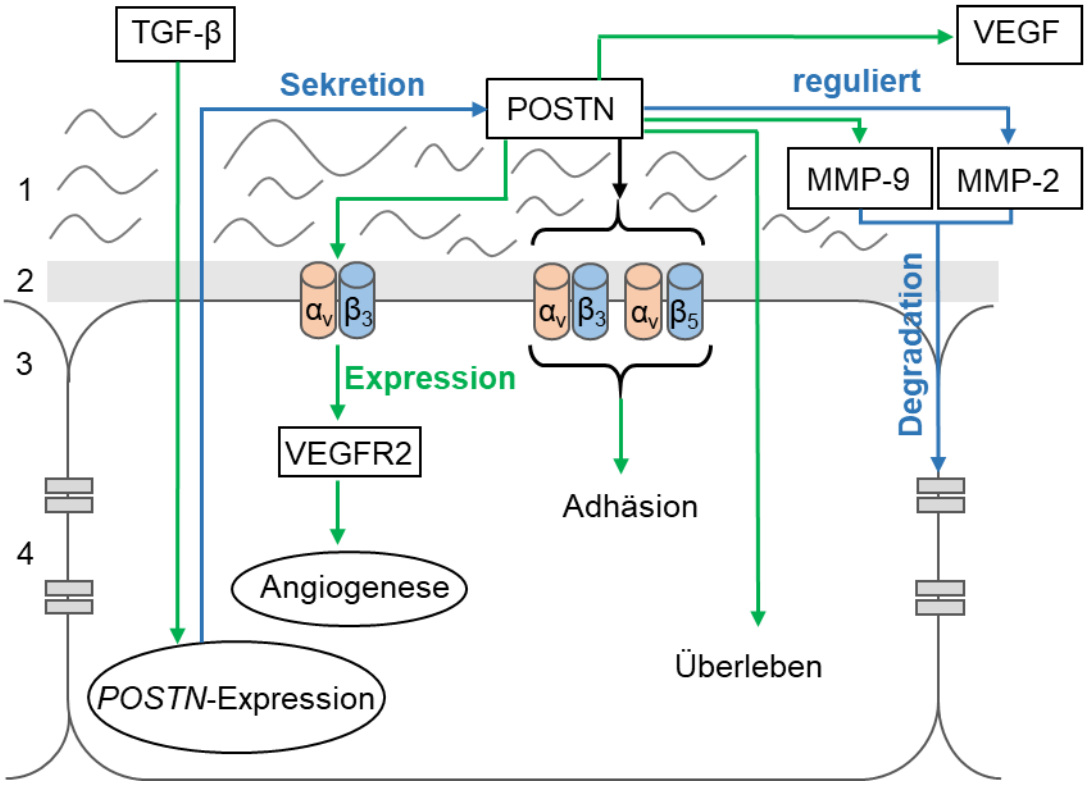

Abbildung 3: Auswirkungen von POSTN auf Zelleigenschaften. 1: zellspezifische EZM**, 2:** Basalmembran**, 3:** Zelle mit Zellkern**, 4:** interzelluläre Kontakte; grüne Pfeile: induziert/ steigert, rote Linien: hemmt/ verringert, schwarze Pfeile: bindet an/ reagiert über; $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$: Integrine; ; MMP: Matrixmetalloproteinase TGF-β: *Transforming growth factor β;* VEGF: *Vascular endothelial growth factor*; VEGFR2: *Vascular endothelial growth factor receptor 2*

1.5. Zielsetzung

Humane Endothelzellen zeigen nach CRISPR/Cas9-vermittelter Inaktivierung der *CCM3*-Expression einen stark aberranten Phänotyp. Hierzu zählen insbesondere ein verändertes Wachstumsmuster, eine Umorganisation des Aktinzytoskeletts zu Stressfasern und eine von der normalen Endothelzellgestalt stark abweichende Zellmorphologie. Die molekularen Grundlagen dieser Auffälligkeiten sind bisher kaum verstanden. Aufbauend auf den Ergebnissen von vergleichenden Transkriptom-analysen für *CCM3*$^{+/+}$ und *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, erstmals die modulatorischen Eigenschaften der nach CCM3-Inaktivierung stark herunterregulierten Gene *FBLN5* und *POSTN* zu untersuchen. Hierzu wurden sowohl eine siRNA-vermittelte Inhibition der Proteinexpression als auch eine Supplementier-ung mit rekombinanten Proteinen genutzt.

2. Material

2.1. Zelllinien

Für *in vitro* Untersuchungen dienten immortalisierte humane Nabelschnurvenen-endothelzellen (CI-huVECs, *constitutive immortalised human vein endothelial cells*), die von der Firma InSCREENeX (Braunschweig, Deutschland) bezogen wurden (Katalognummer: INS-CI-1002). Außerdem wurde die Zielsequenz in Exon 3 von CI-huVECs mittels CRISPR/Cas9 genetisch verändert (Tabelle 1).

Tabelle 1: Verwendete *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs

Kolonie	cDNA	Protein
16, 20, 21, 22, 30, 32	c.[73_89delGTCATGTATCCTGTGTT]; [88_91delTTTA]	p.[Val25*];[Phe30Metfs*3]
26, 27, 33	c.[88_94delTTTAATG]; [86_92delinsCATGAGG]	p.[Phe30Serfs*2];[Val29_Asn31delinsAla*]

2.2. Laborgeräte

Produkt	Hersteller
Brutschrank: Serie CB, CO_2 Inkubator	BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Eppendorf Research® Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Feinwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Gelelektrophorese Apparatur	
Sub-Cell® Model 192	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA
GeneAmp PCR System 9700	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Heizplatte, Thermoplatte S	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

LightCycler® 480 II	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Mikroskope	
Axiovert 25, inverses Mikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
EVOS™ FL Imaging System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Wilovert S	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikrowelle privileg 8520	Bauknecht Hausgeräte GmbH, Stuttgart, Deutschland
Mili-Q® Advantage A10 Wasseraufbereitungssystem	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
MiSeq® Sequenzierplattform	Illumina, San Diego, Kalifornien, USA
Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS + Imaging System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
NanoPhotometer®	Implen, München, Deutschland
Neubauer-improved Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda, Königshofen, Deutschland
Pipettierhilfen	
neoLAB®	Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
LABSOLUTE®	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
QuantStudio™ 3D Digital PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Schüttler	
3D Sundflower Mini-Shaker	bioSan, Riga, Lettland
JK IKA-VIBRAX-VXR	IKA®-Werke GmbH & Co. KG; Staufen, Deutschland
Reax 2000	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
RS-VA 10	Phoenix Instrument, Garbsen, Deutschland
Vortex Mixer Lab Dancer	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

Sicherheitswerkbank	
HerSafe™KS 12	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
HerSafe™KS 15	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
HeraSafe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
UV-Lampe	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland
Wasserbad GFL 1002	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Wasserbad w6	Medingen Labortechnik, Arnsdorf, Deutschland
Zentrifugen	
Centrifuge 5417C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5702	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5804 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Galaxy Mini und Mini Star	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
MiniSpin®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Sprout Minizentrifuge	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

2.3. Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Einmalpipettenspitzen Sur Phob SafeSeal-Tips®	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Einmalpipettenspitzen SafeSeal® professional	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Elutionsröhrchen 15ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Falcon® 50 ml Tube	Corning Inc., Corning, NY, USA
Glasflaschen 200 ml, 500 ml, 1000 ml, 2000 ml	Schott AG, Mainz, Deutschland
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
µ-slides Angiogenesis ibidi	Ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland
Parafilm	Pechniey, Northbrook, Illinois, USA
PCR-Streifen mit Deckel	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Protein Lobind Reaktionsgefäß, 2ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße Safe Look Tubes (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten 2 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturgefäße	
CELLSTAR® Zellkultur Multiwell Platten, 6-Well	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
24-Well-Platten	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
96-Well Platten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zellkulturflasche (25 cm^2, 75 cm^2)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht Deutschland

2.4. Chemikalien

Produkt	Hersteller
5x Puffer für Sequenzmarkierungsreaktionen	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Alt-R™ *S. p.* Cas9 Nuclease	Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, Iowa, USA

Agarose	Bio&Sell, Feucht bei Nürnberg, Deutschland
Ambion® Nuklease-freies Wasser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Aqua bidestillata (A. bidest.)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Cryo-SFM; Medium zur Kryokonservierung	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DNA Loading Dye (6x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Endothelial cell basal medium (ECBM)	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Endothelial cell growth medium (ECGM) supplement pack	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Ethanol (70 % vergällt, 99,8 % vergällt, 99,5 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck Chemicals Darmstadt, Deutschland
ExoSAP-IT	Affymetrix, Santa Clara, Kalifornien, USA
Fetales Kälberserum (FBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
GeneRuler 1kb Plus Leiter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
gibco® 0,05 % Trypsin/EDTA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
HiDi™ Formamide	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Ibidi Mounting Medium	Ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Methanol (99,9 %)	Merck Chemicals Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck Chemicals Darmstadt, Deutschland
Oligofectamine™ Reagent Transfektionsreagenz	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
OneTaq® DNA Polymerase	NewEngland BioLabs, Ipswitch, Massachusetts, USA
OneTaq® Standard Reaction Buffer Pack	NewEngland BioLabs, Ipswitch, Massachusetts, USA
Opti®-MEM reduced serum medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Rekombinantes Protein	
Human FBLN5 (Recombinant GST)	LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, Washington, USA
Recombinant Periostin (POSTN)	Cloud-clone Corp., Houston, Texas
RNAseZap®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Roti®-C/I	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris Base	New England Biolabs® Inc., Ipswich, Massachusetts, USA
Tris buffered saline (20x)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tris-EDTA Puffer, pH 8	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Triton X-100	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Trypanblau	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.5. Kits

Produkt	Hersteller
Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Direct-zol™ RNA MiniPrep	ZYMO Research Europe, Freiburg, Deutschland
Direct-zol™ RNA MiniPrep Plus	ZYMO Research Europe, Freiburg, Deutschland
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
MiSeq® Reagent Kit v2/3	Illumina, San Diego, Kalifornien, USA
peqGold TriFast™	NewEngland BioLabs Inc., Ipswitch, Massachusetts, USA
QuantStudio™ 3D Digital PCR 20K Chip Kit v2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
TaqMan® Gene Expression Assays	
Assay ID *FBLN5*: Hs01056636_m1 Assay ID *POSTN*: Hs01566734_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Trizol® Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

2.6. siRNAs und Primer

Tabelle 2: siRNAs zur Herunterregulation von *FBLN5* bzw. *POSTN*

siRNA	Sequenz (5'-3 ')	Hersteller
Silencer® Select s20608 (*FBLN5*)	F: GAUCUGCAUCAAUACUGAAtt R: UUCAGUAUUGAUGCAGAUCtg	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Silencer® Select s20887 (*POSTN*)	F: GCACUUGUAAGAACUGGUAtt R: UACCAGUUCUUACAAGUGCtg	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Tabelle 3: Primer für Amplifikation der CRISPR/Cas9 Zielregion im *CCM3*-Gen

Exon	Bezeichnung	Sequenz (5' -3')	Amplikonlänge
3	Fors-CCM3-Ex-F1/R	F1: TGCTTTGTGAAGTAGTACCTAACCAAGGACT R: CTTCATAGTACTTCATCACCATTGTTCATTC	711 bp

Tabelle 4: Primer für qPCR

Exon	Bezeichnung	Sequenz (5' -3')
4-5	NM_006329 (*FBLN5*)	F: CCCGCCTTCAGTATTGATGC R: CCTCTTATATGCCGCTTTGGA
4-5	NM_001135936 (*POSTN*)	F: GTTGCTCTCCAAACCTCTACG R: CGCTATTCTGACGCCTCAA
3	NM_001002.3 (*RPLP0)*	F: TCGACAATGGCAGCATCTAC R: ATCCGTCTCCACAGACAAGG

2.7. Fluoreszenzfarbstoff

Farbstoff	Hersteller
Phalloidin-iFluor 488 ab176753	Abcam plc.; Cambridge United Kingdom

2.8. Softwareprogramme

Softwareprogramm	Hersteller
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA
ImageJ 1.52	https://imagej.nih.gov/ij/
ImageLab 5.1	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
SeqPilot Software	JSI medical systems GmbH, Ettenheim, Deutschland

2.9. Online-Datenbanken und-Programme

Datenbank oder Programm	Link oder Hersteller; Zugriffsdatum
GeneCards® Human Gene Database	*FBLN5:* https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FBLN5&keywords=fbln5; 03/2019 *POSTN:* https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=POSTN&keywords=postn; 03/2019
Kegg Pathway Database	TGF-β: https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map04350&keyword=tgf; 03/2019 VEGF: https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map04370&keyword=vegf; 03/2019

	Integrin: https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map04512&keyword=integrin; 03/2019 https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map04510&keyword=integrin; 03/2019
Pubmed	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed 04/2018-07/2020
QuantStudio 3D AnalysisSuite Cloud Software	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA; 04/2018-05/2019
The Human Protein Atlas 18.1	FBLN5: http://www.proteinatlas.org/ENSG00000140092-FBLN5/tissue; 03/2019 POSTN: http://www.proteinatlas.org/ENSG00000133110-POSTN/tissue; 03/2019

3. Methoden

3.1. Zellbiologische Verfahren

3.1.1. Kultivierung von immortalisierten Endothelzellen

Die CI-huVE-Zellen wurden bei 37 °C und 5 %-igem CO_2-Gehalt in *Endothelial cell growth medium* (ECGM) mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS) als adhärente Zellschicht kultiviert. Das ECGM wurde nach Herstellerangaben aus *Endothelial cell basal medium* und *Endothelial cell growth supplements* (*Epidermal Growth Factor*, *Basic Fibroblast Growth Factor*, *Heparin*, *Hydrocortisone*) zusammengesetzt. Je nach Wachstum wurden die Zellen in einem regelmäßigen Abstand von zwei bis drei Tagen subkultiviert. Nach der Abnahme des alten Mediums wurden die Zellen zunächst zweimal mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, ohne Zusatz von Calcium und Magnesium) gewaschen und anschließend mit einer 0,05 %-igen Trypsin/EDTA-Lösung behandelt. Nach dem Ablösen der Zellen wurde die Reaktion mit Medium abgestoppt und die Zellen für 3,5 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und das Zellgemisch in ein neues Kulturgefäß überführt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer und einer Trypanblau-Vitalfärbung.

3.1.2. Generierung von *CCM3*$^{-/-}$ Zelllinien

Für die Generierung einer *CCM3*$^{-/-}$ Zelllinie aus CI-huVEC, wurden die Zellen zunächst mit einem CRISPR/Cas9-Ribonukleoprotein-Komplex aus *S. p.* Cas9, tracrRNA und crRNA gegen Exon 3 des *CCM3*-Gens transfiziert (Schwefel et al. 2019). Die anschließende Zellvereinzelung erfolgte bezugnehmend auf das von Maldonado und Kollegen beschriebene Protokoll über eine serielle Verdünnung auf einer Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen (Maldonado & Meléndez-Zajgla 2007). Die einzelnen Vertiefungen wurden nach im Wachstum befindlichen klonal expandierten Zellen untersucht und das Medium regelmäßig erneuert. Nach Erreichen einer Mindestkonfluenz von 80 % wurden die Zellen auf das nächsthöhere Format

passagiert. So wurden die klonalen Zelllinien weitergeführt, mittels Sanger-Sequenzierung (siehe 3.2.7.) analysiert und kryokonserviert.

3.1.3. Transfektion von siRNA

Eine Transfektion beschreibt das Einbringen von Fremd-DNA oder -RNA in eukaryotische Zellen. Anhand vorheriger Experimente wurden die Transfektionsbedingungen optimiert und alle nachfolgenden Versuche unter diesen Bedingungen standardisiert durchgeführt. Die Transfektion erfolgte 24 Stunden nach Aussaat der Zellen auf 24-, bzw. 6-Multititerplatten bei einer Konfluenz zwischen 70 und 85 %. Es wurden 10 nM der *small interferring* RNA (siRNA) gegen *FBLN5* bzw. *POSTN* mittels Oligofectamine in die Zellen gebracht. Eine gleichartige nichtbindende siRNA wurde als Negativkontrolle eingesetzt.

Für die Durchführung auf einer Zellkulturplatte mit 24 bzw. 6 Vertiefungen wurden 2 µl bzw. 8 µl Oligofectamine mit 8 µl bzw. 17 µl Opti-MEM gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In einem gesonderten Ansatz wurden die siRNAs mit Opti-MEM gemischt und ebenfalls für 5 Minuten inkubiert, sodass ein Volumen von 40 µl für das Format mit 24 Vertiefungen bzw. 175 µl für das Format mit 6 Vertiefungen erreicht wurde. Anschließend wurden beide Ansätze miteinander vermischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das auf den Zellen befindliche Medium abgenommen und gegen 0,3 ml Opti-MEM im Format mit 24 Vertiefungen bzw. 1,3 ml Opti-MEM im Format mit 6 Vertiefungen ausgetauscht. Nachfolgend wurde das Transfektionsreagenz hinzugegeben. Nach 4 Stunden wurde das gesamte Gemisch abgenommen und 2 ml frisches ECGM mit 10 % FBS hinzugegeben. Das anschließende Vorgehen unterschied sich für den Ansatz der Herunterregulation von *FBLN5* bzw. *POSTN*.

Im Rahmen der Doppeltransfektion, die mit der siRNA s20608 gegen *FBLN5* durchgeführt wurde, erfolgte 24 Stunden nach der ersten Transfektion eine erneute Aussaat der Zellen. 48 Stunden nach der ersten Transfektion wurden die Zellen nochmals, wie bereits beschrieben, transfiziert. 24 Stunden nach der Doppeltransfektion gegen *FLBN5* wurden die Zellen mit 0,05 %-igem Trypsin/EDTA-Gemisch abgelöst und

ebenfalls für die *Tube Formation* (siehe 3.1.4.) und Immunfluoreszenz (siehe 3.2.5.) ausgesät. Auch hier wurden die restlichen Zellen in Trizol aufgenommen.

Die Zellen wurden 48 Stunden nach siRNA (s20887)-Transfektion gegen *POSTN* mit 0,05 %-igem Trypsin/EDTA-Gemisch abgelöst und anschließend für den *Tube Formation Assay* (siehe 3.1.4.) und die Immunfluoreszenz (siehe 3.2.5.) ausgesät. Die restlichen Zellen wurden zur Bestätigung der Herunterregulation auf RNA-Ebene in Trizol geerntet.

3.1.4. *Tube Formation Assay*

Durch Ponce (2009) konnte gezeigt werden, dass der *Tube Formation Assay* eine geeignete Variante zur Untersuchung der Angiogenese von Endothelzellen darstellt. Für die *in vitro* Untersuchung wurden die CI-huVECs in Kulturmedium auf einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen oder *Angiogenesis slides* von ibidi®, welche zuvor mit viskösem Matrigel beschichtet wurden, ausgesät. Es wurden 1,7 µl Matrigel pro mm^2 Fläche aufgetragen und die *Angiogenesis slides* bzw. Zellkulturplatten für mindestens 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 20.000 Zellen je Vertiefung benötigt. Lediglich bei der *Tube Formation* im Rahmen der Herunterregulation von *FBLN5* wurden 30.000 Zellen aufgetragen, da sich bei einer geringeren Zellzahl keine Netze ausbildeten. Die gebildeten Netze wurden in allen Konditionen händisch ausgezählt und aus den technischen Triplikaten anschließend das arithmetische Mittel bestimmt.

3.1.5. Untersuchung des Einflusses von rekombinantem FBLN5 und POSTN

Zur Überprüfung der Hypothese, dass die Hinzugabe von rekombinantem Protein das angiogenetische Verhalten oder das zellmorphologische Bild der *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs beeinflusst, wurden zwei unterschiedliche Methoden angewandt.

Zum einen wurde der unter 3.1.4. beschriebene *Tube Formation Assay* angewandt. Die hierzu benötigte Proteinkonzentration wurde in das Kulturmedium supplementiert und die Zellen anschließend darin resuspendiert. Für die Behandlung der Zellen mit rekombinantem FBLN5 wurde eine Konzentration von 30 µg/ml auf einer Platte mit 96

Vertiefungen eingesetzt. Die Behandlung mit rekombinantem POSTN wurde ebenfalls auf einer Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen durchgeführt, allerdings in den verschiedenen Konzentrationen 0,5 µg/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml.

Im zweiten Ansatz wurde die Veränderung der Zellmorphologie untersucht. Hierzu wurden 20.000 Zellen auf einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen ausgesät. Die Resuspension der Zellen erfolgte auch hier in Kulturmedium mit den bereits genannten Proteinkonzentrationen. Nach 48 Stunden im Wachstum wurden die Zellen für spätere Immunfluoreszenzfärbungen mit 4 %-igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert.

3.1.6. Trypsinierung im Zeitverlauf

Das 0,05 %-ige Trypsin/EDTA-Gemisch löste die Zellen aus ihrer adhärenten Zellschicht und somit auch aus ihrer sie umgebenden EZM. Damit ein Effekt des Zeitpunktes der Trypsinierung auf das mRNA-Expressionslevel der beiden Gene *FBLN5* und *POSTN* ausgeschlossen werden konnte, wurden 200.000 genetisch unveränderte CI-huVE-Zellen auf einer Multititerplatte mit 6 Vertiefungen ausgesät. Zum Zeitpunkt 0 Stunden wurden ebenfalls 200.000 Zellen als Kontrolle ohne erneute Aussaat direkt in Trizol geerntet. Die Zellen wurden im Zeitverlauf 6 Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden nach Aussaat direkt aus der jeweiligen Vertiefung in Trizol geerntet. Ohne das vorherige Ablösen durch die 0,05 %-ige Trypsin/EDTA-Lösung der Zellen wurde ein erneutes Zerstören der EZM und ihrer Bestandteile verhindert. Die anschließende Messung der mRNA-Expression dieser beiden Gene erfolgte mittels qPCR.

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. Präparative RNA-Isolation

Zunächst erfolgte eine Zugabe von 200 µl Chloroform zu den in Trizol (800 µl) geernteten Proben und eine anschließende Zentrifugation für 15 Minuten bei 12.000 g. Dabei bildeten sich drei Phasen heraus. Für die RNA-Isolation wurde die obere klare Flüssigkeitsphase verwendet. Es wurden sowohl das Direct-zol™ RNA MiniPrep-Kit als auch das Direct-zol™ RNA MiniPrep Plus-Kit genutzt und nach Herstellerangaben

verfahren. Es wurden 30 µl Nuklease-freies Wasser zum Eluieren der RNA eingesetzt, um eine höhere RNA-Konzentration zu erreichen. Die Konzentrationsmessung der RNA und die Messung der Absorptionsquotienten (260 nm/280 nm und 260 nm/230 nm) erfolgten mittels Nanophotometer. Hierbei wurde ein Verhältnis von ≥ 1,8 angestrebt. Abschließend wurde die RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt, um eine Degradation oder DNA-Kontamination ausschließen zu können.

3.2.2. cDNA-Synthese

Verwendet wurde das First Strand cDNA Synthesis Kit von ThermoFisher Scientific. Als Template für die cDNA-Synthese dienten mindestens 250 ng RNA. Das Reaktionsvolumen wurde mit DNase/RNase-freiem Wasser auf 10 µl aufgefüllt und anschließend 1 µl eines unspezifischen Hexamerprimers hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 5 Minuten bei 65 °C denaturiert und danach direkt auf Eis gebracht. Nachfolgend wurden 4 µl 5x Reaktionspuffer, 2 µl 10 mM Desoxyribonukleosidtriphosphate, 2 µl M-MuLV Reverse Transkriptase und 1 µl RiboLock RNase Inhibitor zugegeben, sodass ein Gesamtreaktionsvolumen von 20 µl entstand. Dieses Gemisch wurde anschließend für 5 Minuten bei 25 °C, für 60 Minuten bei 37 °C und für 5 Minuten bei 70 °C inkubiert.

3.2.3. Digitale Polymerasekettenreaktion zum Nachweis der Herunterregulation von *FBLN5* und *POSTN*

Die digitale Polymerasekettenreaktion (dPCR) ist eine Variante der PCR, die eine absolute Quantifizierung der Ziel-DNA ermöglicht. Die Amplifikation erfolgt auf der Grundlage vereinzelter DNA-Moleküle. Es wurde eine finale cDNA-Konzentration von 1,25 ng/µl in einem Gesamtvolumen von 1,8 µl für die Untersuchung von *FBLN5* und eine Konzentration von 2,5 ng/µl in einem Gesamtvolumen von 3,6 µl für die Untersuchung von *POSTN* eingesetzt. Hinzu kamen 9 µl Digital PCR MasterMix und jeweils 0,9 µl FAM™ bzw. VIC™ Sonden. Zum Schluss wurde das Gemisch durch Nuklease-freies Wasser auf ein Volumen von 18 µl ergänzt. Die Chips zur Untersuchung wurden nach Herstellerangaben beladen und die anschließende PCR erfolgte nach dem in Tabelle 5 dargestellten Programm. Die sequenzspezifischen TaqMan Sonden für die

zu untersuchenden Gene *FBLN5* bzw. *POSTN* und das Referenzgen *TBP* (*TATA-box binding Protein)*, waren mit Fluorophoren, FAM™ respektive VIC™ markiert. Die Freisetzung des fluoreszierenden Farbstoffes der jeweiligen Sonde bei der PCR-Reaktion führt zu einem Fluoreszenzsignal, welches proportional zur Menge des synthetisierten Amplikons ist. Die Auswertung und Visualisierung der erhobenen Werte erfolgte mittels des QuantStudio™ 3D Digital PCR Systems und der QuantStudio™ 3D AnalysisSuite Cloud Software von ThermoFisher Scientific. Um die Expression des ausgewählten Gens bestimmen zu können, wurde die Kopienanzahl pro Mikroliter von FAM, welches das Zielgen markiert hat, durch die Kopienanzahl von VIC, welches das Referenzgen markiert hat, dividiert. Die relative Expression wurde anschließend im Vergleich zur Kontrollkondition ermittelt.

Tabelle 5: PCR-Programm zur Amplifikation von *FBLN5* bzw. *POSTN*

Prozess	**Temp.**	**Zeit in s**	**Zyklus-Anzahl**
Initiale Denaturierung	96 °C	600	
Primer-Annealing und Extension	60 °C	120	39
Denaturierung	98 °C	30	
Finale Extension	60 °C	120	
Pause	10 °C		

3.2.4. Quantitative Real-Time PCR zum Nachweis der Herunterregulation von *FBLN5* und *POSTN*

Die quantitative Real Time PCR (qPCR) beruht ebenfalls auf dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion und ermöglicht eine Quantifizierung der umgeschriebenen RNA. Während eines PCR-Zyklus wird durch die Messung eines Fluoreszenzsignals die Quantifizierung realisiert. Die Fluoreszenzintensität wächst proportional mit der Menge der PCR-Produkte. Verwendet wurden sowohl der Forget-me-not™ als auch der Maxima SYBR Green Master Mix. Es wurde ein Gesamtreaktionsvolumen von 10 µl eingesetzt. Dieses setzte sich aus 1,5 µl H_2O, 0,5 µl Vorwärts- und 0,5 µl Rückwärtsprimer, mit einer Konzentration von je 10 µM, und 5 µl des Master Mixes zusammen. Die cDNA wurde auf eine Konzentration von 0,4 ng/µl verdünnt und anschließend 2,5 µl zu dem oben genannten Gemisch hinzugegeben. Die Zielgene *FBLN5* und *POSTN* wurden mit dem *Housekeeping*-Gen *RPLP0* verglichen. Hierzu

wurden für alle Gene Primer der Firma *Integrated DNA Technologies* (IDT) verwendet. Die Proben wurden auf Eis pipettiert, anschließend zentrifugiert und im *LightCycler* 480 amplifiziert (Tabelle 6). Für die Auswertung wurde die $2^{-\Delta\Delta Ct}$-Methode angewandt (Rao et al. 2013). Diese Methode verwendet die Zahl des Schwellenzyklus (*threshold cycle;* Ct), welche durch die qPCR generiert wird. Anhand dessen kann das relative Genexpressionslevel verschiedener Konditionen bestimmt werden. Für jedes Replikat wird die Differenz des Schwellenzyklus des Zielgens *FBLN5* bzw. *POSTN* und des Referenzgens *RPLP0* gebildet. Anschließend wurde die ermittelte Differenz des Zielgens mit der der Kontrolle subtrahiert, um auf die jeweilige Kontrolle zu normalisieren.

ΔCt= Ct (Zielgen) – Ct (Referenzgen)

$\Delta\Delta Ct$ = ΔCt (Zielkondition) – ΔCt (Kontrollkondition)

Nachfolgend wurde der Potenzwert mit dem negativen $\Delta\Delta Ct$-Wert als Exponent zur Basis 2 ermittelt, welche die relative Expression widerspiegelt. Zum Schluss wurde aus den biologischen Replikaten den Mittelwert gebildet.

Tabelle 6: PCR-Programm zur Amplifikation der Zielgene *POSTN* bzw. *FBLN5* und des *Housekeeping*-Gens *RPLP0*. Die Zielgene wurden bei 58 °C und das *Housekeeping*-Gen bei 60 °C inkubiert.

Prozess	Temp.	Zeit in s	Zyklus-Anzahl
Initiale Denaturierung	95 °C	120	1
Denaturierung	95 °C	5	
Primer-Annealing	58/ 60 °C	10	50
Extension	72 °C	15	
Kühlung	40 °C	10	1

3.2.5. Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz wurde nach Standardprotokoll der Arbeitsgruppe mit einer Zellzahl von 20.000 Zellen je Vertiefung und einer Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen durchgeführt. Im Anschluss an die Fixierung der Zellen in 4 %-igem PFA für 10 Minuten bei Raumtemperatur folgte nach zweimaligem Waschen mit PBS die Permeabilisierung zur Markierung intrazellulärer Epitope mit 100 µl PBS versetzt mit 0,1 % Triton X-100. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden

die Zellen mit 2 %-igen normalen Ziegenserum versetzten PBS (Blockierlösung) zunächst gewaschen und dann für 60 Minuten darin blockiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal mit dieser Blockierlösung gewaschen. Das Anfärben des Aktinzytoskeletts wurde mit Phalloidin realisiert, welches unmittelbar an Fluorophor gekoppelt war. Es wurden je Vertiefung 30 µl Phalloidin-iFluor 488 mit einer 1:1000 Verdünnung auf die Zellen gegeben. Danach folgte eine einstündige Inkubation abgedunkelt bei Raumtemperatur. Vor der Zellkernfärbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) wurden die Zellen zweimal mit Blockierlösung gewaschen. Für das Anfärben der Zellkerne wurden 30 µl DAPI mit einer Konzentration von 0,1 µg/ml für 15 Minuten hinzugegeben. Bevor ibidi Mounting Medium zugegeben wurde, folgte zum Schluss ein zweimaliger Waschschritt mit der Blockierlösung. Die Bilder wurden mit dem Evos Fluoreszenzmikroskop aufgenommen.

3.2.6. Polymerasekettenreaktion der genomischen Zielregion

Um die genomische Zielregion des *CCM3*-Gens, die durch die CRISPR/Cas9-Editierung verändert wurde, zu amplifizieren, wurden die Reagenzien auf Eis pipettiert, im Thermocycler inkubiert und zur Überprüfung auf Spezifität gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der PCR-Ansatz ist in Tabelle 7 aufegführt.

Tabelle 7: PCR-Ansatz und -Programm zur Amplifikation der Zielregionen mittels OneTaq®-Polymerase.

Reagenz	Menge in µl	PCR Programm	Temp.	Zeit in s
OneTaq 5X Standard Reaction Buffer	5,0	Initiale Denaturierung	94 °C	240
dNTPs (10 mM)	0,5	Denaturierung	94 °C	20
10 µM Primer Vorwärts	0,5	Annealing	63 °C	45
10 µM Primer Rückwärts	0,5	Extension	68 °C	60
ddH2O	14,3	Finale Extension	68 °C	300
OneTaq Polymerase (5 U/µl)	0,2	Pause	4 °C	
DNA (2-30 ng/µl)	4			
		35 Zyklen Denaturierung, Annealing und Extension		

3.2.7. Sanger-Sequenzierung

Für die Sequenzierung nach Sanger wurden die PCR-Proben zunächst mit ExoSAP-IT gereinigt. Hierfür wurden 0,75 µl ExoSAP-IT mit 3,25 µl ddH_2O und 1 µl des PCR-Produkts gemischt und für 20 Minuten bei 37 °C, für weitere 15 Minuten bei 80 °C inkubiert und anschließend auf 4 °C abgekühlt.

Die anschließende Sequenzmarkierung erfolgte mittels BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequenzing Kit. Zu dem gereinigten PCR-Produkt wurden die in Tabelle 8 aufgeführten Reagenzien hinzugegeben und durchmischt.

Tabelle 8: Reaktionsansatz für die Markierung einer Probe zur Sanger-Sequenzierung und PCR-Programm.

Reagenz	Menge in µl	PCR Programm	Temp.	Zeit in s
10 µM Primer Rückwärts	0,5	Initiale Denaturierung	96 °C	60
5x Puffer	1,5	Denaturierung	96 °C	10
ddH2O	1,5	Annealing	50 °C	5
Sequenzmix (BigDye)	1,0	Extension	60 °C	90
Dimethylsulfoxid (DMSO)	0,5	Pause	12 °C	
Gereinigtes PCR-Produkt	5,0			
		32 Zyklen Denaturierung, Annealing und Extension		

Im Anschluss an die Markierungsreaktion wurden je 1 µl 3M Natriumacetat und 25 µl 100 %-iger Ethanol zu den Proben gegeben. Die Reagenzien wurden gemischt und für 20 Minuten bei 4 °C und 2250 g zentrifugiert. Hinterher wurde der flüssige Überstand dekantiert. Es folgte ein Waschschritt mit 100 µl 70 %-igem Ethanol und eine erneute Zentrifugation. Nach dem Entfernen des Ethanols wurden die Proben auf einer Heizplatte bei 37 °C bis zum vollständigen Verdunsten des restlichen Ethanols inkubiert. Durch die Hinzugabe von 20 µl HiDi-Formamid zu jeder Probe, wurden diese gelöst und für mindestens 15 Minuten abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Schluss wurden die Proben nochmals gut durchmischt und auf einem ABI3130xl Sequenziergerät analysiert. Mittels SeqPilot-Software erfolgte die Auswertung der Sequenzen.

3.2.8. Analyse der Transkriptome von *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVEC

Zunächst erfolgte eine präparative RNA-Isolation, wie es unter 3.2.1. beschrieben wurde. Die Integrität der RNA-Proben wurden mittels Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent, Santa Clara, USA) auf einem 2100 Bioanalyzer überprüft. Nachfolgend wurden die RNA-Konzentrationen mit dem Qubit RNA HS Assay Kit (Q32852, Thermo Fisher Scientific) an einem Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Die gesamte Transkriptomanalyse wurde in Kooperation mit dem Helmholtz Zentrum München durchgeführt. Transkripte, die einen $|\log2FC| > 2$ und $padj < 0,05$ hatten, galten als stark regulierte Gene. Hierbei fielen besonders *FBLN5* und *POSTN* auf.

3.3. Statistische Auswertung

Die in den verschiedenen Experimenten ausgewerteten Daten wurden hinsichtlich ihrer statistischen Signifikanz analysiert. Ein Vergleich zwischen einer behandelten Kondition und der Kontrollkondition wurde durch einen Zweistichproben-t-Test hergestellt. Um mehr als zwei Konditionen miteinander zu vergleichen, wurde eine Varianzanalyse (ANOVA, *analysis of variance*) der arithmetischen Mittelwerte durchgeführt.

Alle Daten sind, sofern nicht explizit angegeben, als arithmetisches Mittel und mit Standardabweichung (SD) dargestellt. Statistisch signifikant waren p-Werte < 0,05, die mit einem * in den jeweiligen Abbildungen vermerkt wurden. Mit ** wurden hoch signifikante p-Werte < 0,01 und höchst signifikante p-Werte < 0,001 wurden mit *** gekennzeichnet.

4. Ergebnisse

4.1. Veränderte Zellmorphologie nach Verlust von CCM3 in CI-huVECs

Der Phänotyp von *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen wurde mit dem der *CCM3*$^{+/+}$ Kontrollzellen im Wachstum unter Standardkulturbedingungen verglichen. Im Zeitraum von 24 Stunden bis 72 Stunden zeigten die *CCM3*$^{-/-}$ Zellen im Gegensatz zu den *CCM3*$^{+/+}$ Zellen deutliche zellmorphologische Veränderungen. Die *CCM3*$^{-/-}$ Zellen wirkten unter adhärenten Kulturbedingungen kleiner und kompakter als die Kontrollzellen und zeigten im Zeitverlauf unterschiedliche Wachstumsmuster. Nach 24 Stunden bildeten die *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen mehrere kleine und kurze Ausläufer, welche sich sternartig und konzentrisch um die Zellleiber orientierten (Abbildung 4 A). Außerdem zeigte sich 24 Stunden nach Aussaat eine Zusammenlagerung mehrerer Zellen zu Zellgruppen. Im Randbereich dieser Gruppen bildeten die dort gelegenen Zellen, ähnlich den Kontrollzellen, zwei lange sich an den Polen gegenüberliegenden Zellausläufer. Mit zunehmender Konfluenz waren nur noch vereinzelt Zellen mit konzentrischen kurzen Fortsätzen zu sehen und die Zahl kleiner Zellen mit spindeliger Morphologie nahm zu (Abbildung 4 A). Dadurch entstand insgesamt ein geordnetes Wuchsmuster, das nach 72 Stunden an die pflastersteinartige Zellmorphologie der Kontrollzellen erinnerte.

Die Kontrollzellen hingegen zeigten unabhängig der Zellkonfluenz keine wesentlichen zellmorphologischen Veränderungen. Sie zeichneten sich durch eine spindelige Morphologie mit an gegenüberliegenden Polen orientierten, elongierten Zellausläufern aus (Abbildung 4 B). Die Zellen lagerten sich weder zu Gruppen zusammen noch bildeten sie ein anderes erkennbares geordnetes Wuchsmuster. 72 Stunden nach Aussaat war ein Übereinanderwachsen von Zellen zu sehen. Das pflastersteinartige Wachstumsmuster war nur noch vereinzelt zu erkennen. Das Zellbild war insgesamt eher ungeordnet.

Zusätzlich fiel zwischen den beiden Konditionen ein Unterschied der Zellkonfluenz auf. Die *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen wiesen nach 48 Stunden eine höhere Konfluenz auf als die Kontrollkondition. Nach 72 Stunden konnte dieser Unterschied nicht mehr eindeutig beobachtet werden. Allerdings waren in der Kontrollkondition, im Vergleich zu den CCM3-defizienten Endothelzellen, im Zeitverlauf vermehrt abgestorbene Zellen im Medium zu finden.

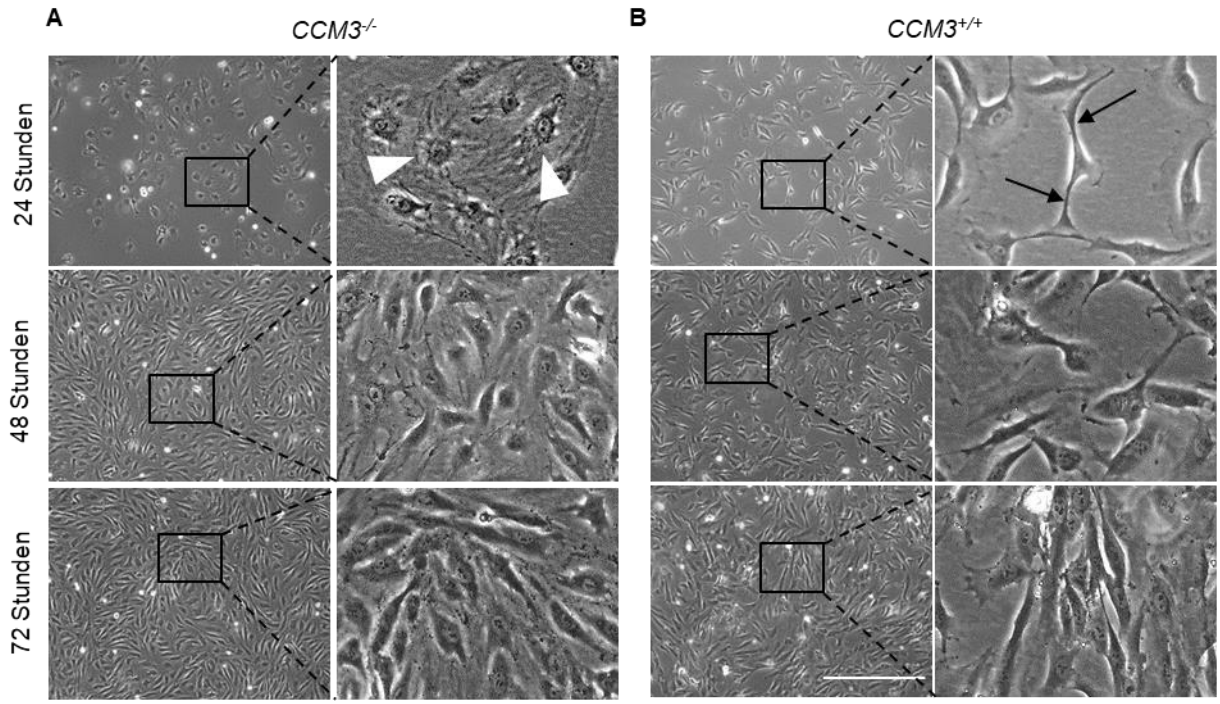

Abbildung 4: Morphologie der *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs und *CCM3*$^{+/+}$ im Zeitverlauf nach Aussaat. Hellfeldaufnahmen 24, 48 und 72 Stunden nach Aussaat. **A** Morphologie der *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen in Übersichtsaufnahme und in gleicher digitaler Vergrößerung. Weiße Pfeilspitzen: sternartige, konzentrisch um die Zellleiber geordnete Fortsätze. **B** *CCM3*$^{+/+}$ in Übersichtsaufnahme und in gleicher digitaler Vergrößerung. Schwarze Pfeile: Zellausläufer an gegenüberliegenden Polen (Maßstab: 400 µm).

4.2. Verringerte Stabilität gefäßähnlicher Strukturen nach Verlust von CCM3 in CI-huVECs

Es wurden 10.000, 15.000, und 20.000 Zellen für den *Tube Formation Assay* ausgesät (Abbildung 5 A). Nach 6 Stunden bildeten die *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen im Vergleich zu den *CCM3*$^{+/+}$ Zellen unabhängig der Zellzahl, mehr Netze aus (Abbildung 5 A, B). Die Mittelwerte der durch *CCM3*$^{-/-}$ Zellen gebildeten Netze lag zwischen 54 und 58, die Mittelwerte der *CCM3*$^{+/+}$ Zellen lagen zwischen 37 und 44. Für eine Zellzahl von 15.000 pro Vertiefung war das Ergebnis statistisch signifikant (Abbildung 5 B; *, p= 0,037). Nach 20 Stunden war der Großteil der Netze zerfallen. In den *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen waren im Mittel noch 4 bis 5 Netze ausgebildet, während sich die Mittelwerte der Kontrollkondition bei 10 bis 11 befanden. Die Differenz zwischen den beiden Konditionen für 20.000 Zellen war statistisch signifikant (Abbildung 5 B; * p= 0,022). Hieraus ließ sich schlussfolgern, dass der Genotyp einen signifikanten Effekt auf die Stabilität der gebildeten Netze im Zeitverlauf hat.

Unabhängig der Zellzahl war ein gesteigerter prozentualer Zerfall bei den *CCM3*$^{-/-}$ Zellen sichtbar (Abbildung 5 C). Der relative Zerfall lag im Mittel zwischen 90,5 % und 92,7 %. In den *CCM3*$^{+/+}$ wurde im Mittel ein prozentualer Zerfall von 73,8 % bis 76,8 % beobachtet. Die Zellfallsrate war für 20.000 Zellen statistisch signifikant (Abbildung 5 C; *, p= 0,044). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für die folgenden *Tube Formation Assays* 20.000 Zellen pro Vertiefung verwendet.

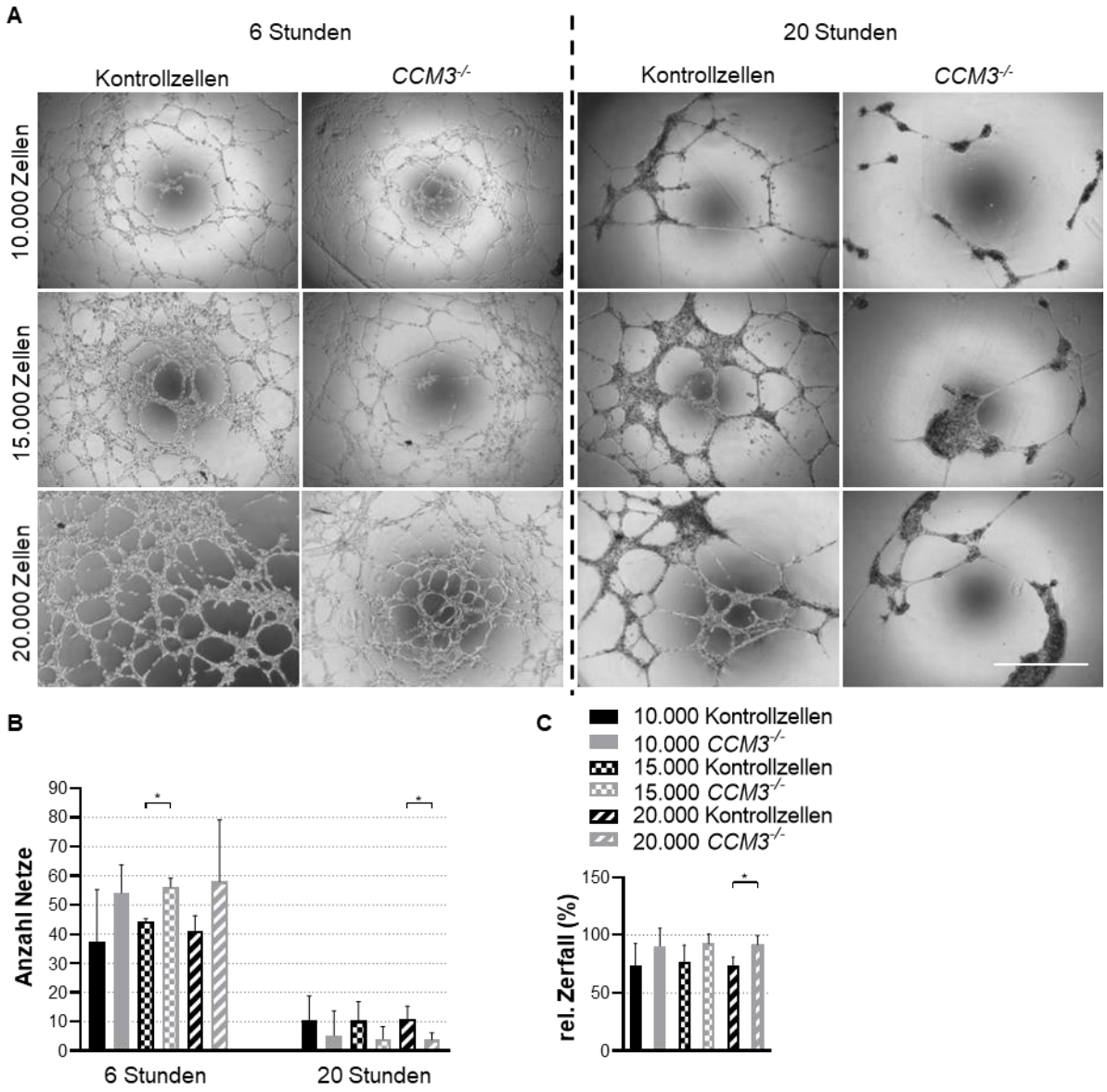

Abbildung 5: Verringerte Netzstabilität nach Verlust von CCM3 in CI-huVECs (n=3). A Hellfeldaufnahmen der *Tube Formation* für 10.000, 15.000 und 20.000 Zellen beider Konditionen nach 6 und 20 Stunden; **B** Grafik: Anzahl gebildeter Netze beider Konditionen nach 6 und 20 Stunden für die drei Zellzahlen; **C** Grafik: relativer Zerfall der Netze prozentual zum Ausgangswert. (*, p< 0,05)

4.3. Verringerte Expression von *FBLN5* bzw. *POSTN* in *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs

Auf Grundlage der veränderten Morphologie und der funktionellen Unterschiede zwischen *CCM3*$^{+/+}$ und *CCM3*$^{-/-}$ Zellen wurde in der Greifswalder Arbeitsgruppe eine Transkriptomanalyse durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass in *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen insgesamt 569 Gene dereguliert waren. Die am stärksten regulierten Gene im gesamten Transkriptom waren *FBLN5* und *POSTN*. Durch sie werden Proteine kodiert, die in der EZM lokalisiert sind. Sie zählen zu der Gruppe der matrizellulären Proteine, sind an diversen biologischen Prozessen beteiligt, jedoch nicht strukturbildend (Bornstein 2000; Gonzalez-Gonzalez & Alonso 2018).

Die Feststellungen der regulierten Gene *FBLN5* und *POSTN* wurden anschließend mittels einer qPCR validiert. Die relative *FBLN5*-Expression lag in *CCM3*$^{-/-}$ bei 3,56 x 10^{-5} und die relative POSTN-Expression bei 1,58 x 10^{-7} (Abbildung 6).

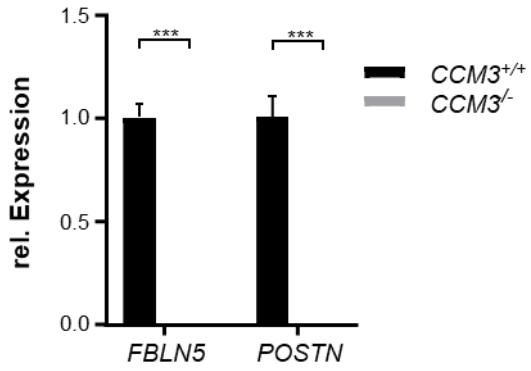

Abbildung 6: Relative mRNA-Expression von *FBLN5* bzw. *POSTN* in *CCM3*$^{+/+}$ und *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs (***, p< 0,001).

4.4. Funktionelle Folgen der akuten Herunterregulation von *FBLN5* und *POSTN*

4.4.1. Inhibitorischer Effekt auf die Ausbildung gefäßähnlicher Strukturen nach akuter Herunterregulation von *FBLN5*

Es wurde eine Transfektion mit der zuvor etablierten siRNA s20608 durchgeführt (siehe 8.2.), um die funktionellen Auswirkungen der akuten Herunterregulation von *FBLN5* in Endothelzellen beurteilen zu können. Dabei wurde ein festes zeitliches

Schema beachtet (Abbildung 7 A). Nach Durchführung der Doppeltransfektion konnte mittels qPCR eine Herunterregulation der relativen *FBLN5*-Genexpression auf 8 % des ursprünglichen Expressionslevels gemessen werden (Abbildung 7 B).

Anschließend wurden die Zellen hinsichtlich ihrer Zellmorphologie untersucht, da die *CCM3*$^{-/-}$ Zellen im Vergleich zu den *CCM3*$^{+/+}$ Kontrollzellen sowohl deutliche morphologische Unterschiede als auch eine veränderte Organisation des Aktinzytoskeletts aufweisen. Abbildung 7 C zeigt sowohl die Wachstumsmorphologie in einer Hellfeldaufnahme nach 24 Stunden als auch das angefärbte Aktinzytoskelett in den CI-huVECs nach akuter Herunterregulation von FBLN5. Im Vergleich zur Kontrollkondition konnte weder eine Veränderung im Wachstum noch eine abweichende Zellkonfluenz beobachtet werden. Durch das Anfärben des Aktinzytoskeletts beider Konditionen wurde das filamentöse Aktin, welches der Polarität der Zelle folgte, sichtbar. Auch hier war kein Unterschied zwischen den beiden Konditionen zu erkennen (Abbildung 7 C).

Im *Tube Formation Assay* bildeten sich nach 6 Stunden in der mit siRNA gegen *FBLN5* behandelten Kondition weniger Netze aus als in der Kontrollkondition. In der behandelten Kondition lag der Mittelwert bei 52 Netzen, während in der Kontrolle im Mittel 65 Netze ausgebildet waren. Nach 20 Stunden war in beiden Konditionen eine erhebliche Abnahme der Netze zu verzeichnen. Die mit siRNA gegen *FBLN5* behandelten Zellen hatten zu diesem Zeitpunkt noch 7 Netze und die Kontrollzellen noch 16 Netze ausgebildet. Dieser Unterschied zwischen beiden Konditionen war statistisch höchst signifikant (***, p= 0,0005). Die Kondition mit einem verringerten *FBLN5*-Genexpressionslevel wies einen relativen Zerfall von 85,1 % auf. In der Kontrollkondition zerfielen im selben Zeitraum im Mittel nur 74,7 % der zu Beginn ausgebildeten Netze. Dieses Ergebnis war ebenfalls statistisch signifikant (Abbildung 7 D; * p= 0,014).

Zusammenfassend zeigte die akute Herunterregulation von *FBLN5* eine signifikant verringerte Ausbildung von Netzen nach sowohl 6 Stunden als auch nach 20 Stunden. Folglich lässt sich ein negativer Effekt auf die Ausbildung gefäßähnlicher Strukturen der CI-huVECs mit verminderter *FBLN5*-Genexpression schlussfolgern. Zusätzlich war auch die Stabilität der Netze im Zeitverlauf eingeschränkt.

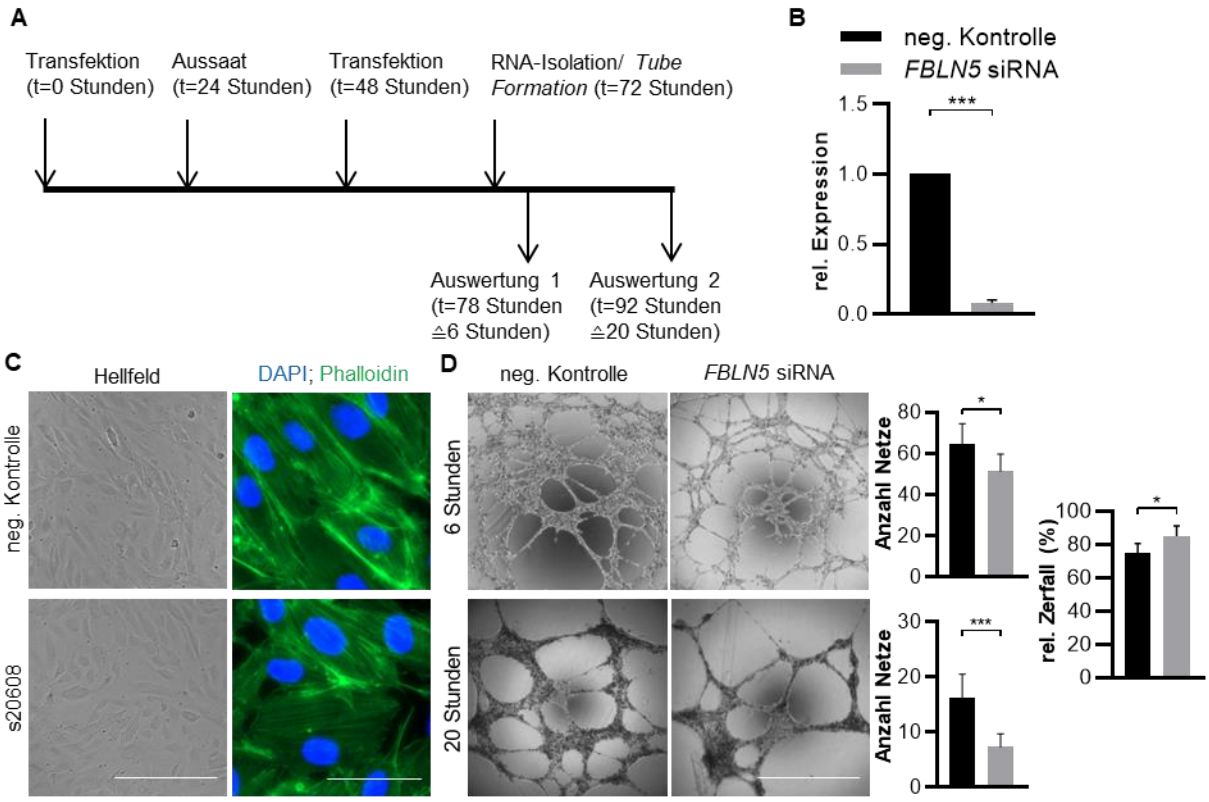

Abbildung 7: Inhibitorischer Effekt auf die Ausbildung gefäßähnlicher Strukturen durch akut verminderte *FBLN5*-Genexpression. A Zeitliche Vorgehensweise; **B** Validierung der Herunterregulation von *FBLN5* mittels qPCR (n=4); **C** Hellfeldaufnahme (Maßstab 400 µm), Darstellung des Aktinzytoskeletts mittels Phalloidin und der Zellkerne mittels DAPI nach 24 Stunden (Maßstab 50 µm); **D** Hellfeldaufnahmen *Tube Formation Assays* nach 6 und 20 Stunden (Maßstab 400 µm). Grafik gebildeter Netze zu den zwei Zeitpunkten; relativer Zerfall der Netze im Zeitverlauf (n=5).

4.4.2. Inhibitorischer Effekt auf die Ausbildung gefäßähnlicher Strukturen nach akuter Herunterregulation von *POSTN*

Die Untersuchung der Auswirkung der akuten Herunterregulation von *POSTN* auf die angiogenetischen Eigenschaften der Zellen erfolgte wie im Schema von Abbildung 8 A beschrieben. Zur Durchführung wurden zwei Zellkonzentrationen und die zuvor etablierte siRNA s20887 verwendet (siehe 8.2.). Mittels qPCR wurde eine höchst signifikante Reduktion der relativen *POSTN*-Expression auf 27,4 % des ursprünglichen Expressionslevels festgestellt (Abbildung 8 B). Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden konnte in der Hellfeldaufnahme kein Unterschied zwischen der mit siRNA gegen *POSTN* behandelten Kondition und der Kontrollkondition festgestellt werden.

Im Vergleich war weder ein Unterschied in der Morphologie noch in der Zellkonfluenz erkennbar. Das mittels Phalloidin angefärbte Aktinzytoskelett zeigte in beiden Konditionen ebenfalls keine Unterschiede (Abbildung 8 C).

Unabhängig der Zellkonzentration zeigte sich bereits nach 6 Stunden eine signifikant verminderte Ausbildung von Netzen nach der Herunterregulation von *POSTN*. Bei 20.000 Zellen je Vertiefung bildeten sich im Mittel in der mit siRNA gegen *POSTN* behandelten Kondition 52,2 Netze aus. In der Kontrollkondition waren es 64,3 Netze (Abbildung 8 D). Bei einer Zellzahl von 25.000 je Vertiefung lag der Mittelwert in der behandelten Kondition bei 49,7 Netzen, zeitgleich waren in der Kontrollkondition 63,3 Netze ausgebildet (Abbildung 8 E). Nach 20 Stunden nahm die Anzahl der Netze in beiden Konditionen unabhängig der verwendeten Zellkonzentration deutlich ab. Im Mittel waren noch 10,6 Netze bei einer Zellzahl von 20.000 in der mit siRNA behandelten Kondition vorhanden, während der Mittelwert der Kontrollkondition bei 15,7 noch vorhandener Netze lag (Abbildung 8 D). Diese Differenz war statistisch signifikant (*, p=0,032). Die Mittelwerte beider Konditionen von 25.000 Zellen je Vertiefung waren mit 12,3 und 12,4 fast identisch. Hier war kein Unterschied erkennbar (Abbildung 8 E).

Der relative Zerfall der Netze im Zeitverlauf zeigte für beide Konditionen bei 20.000 Zellen je Vertiefung ähnliche Werte. Es zerfielen in der mit siRNA gegen *POSTN* behandelten Kondition 78,9 % aller Netze, unterdessen waren es in der Kontrollkondition 75,5 % aller Netze. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant. Die akute Herunterregulation von *POSTN* hat bei einer Zellzahl von 20.000 je Vertiefung keinen Einfluss auf die Netzstabilität (Abbildung 8 D). Bei 25.000 Zellen je Vertiefung zerfielen in der nach siRNA gegen *POSTN* behandelten Kondition 74,9 % der ursprünglich gebildeten Netze. In der Kontrollkondition waren es 80,7 %. Die Differenz der beiden Werte war statistisch signifikant (*, p=0,047). Ein eindeutiger Effekt auf den prozentualen Zerfall konnte aber nicht erkannt werden, da unterschiedliche Beobachtungen zwischen den beiden Zellzahlen gemacht wurden.

Die Summe der Ergebnisse ließ den Schluss zu, dass die akute Herunterregulation von *POSTN* einen schwach inhibitorischen Effekt auf die Angiogenese von CI-huVECs hat.

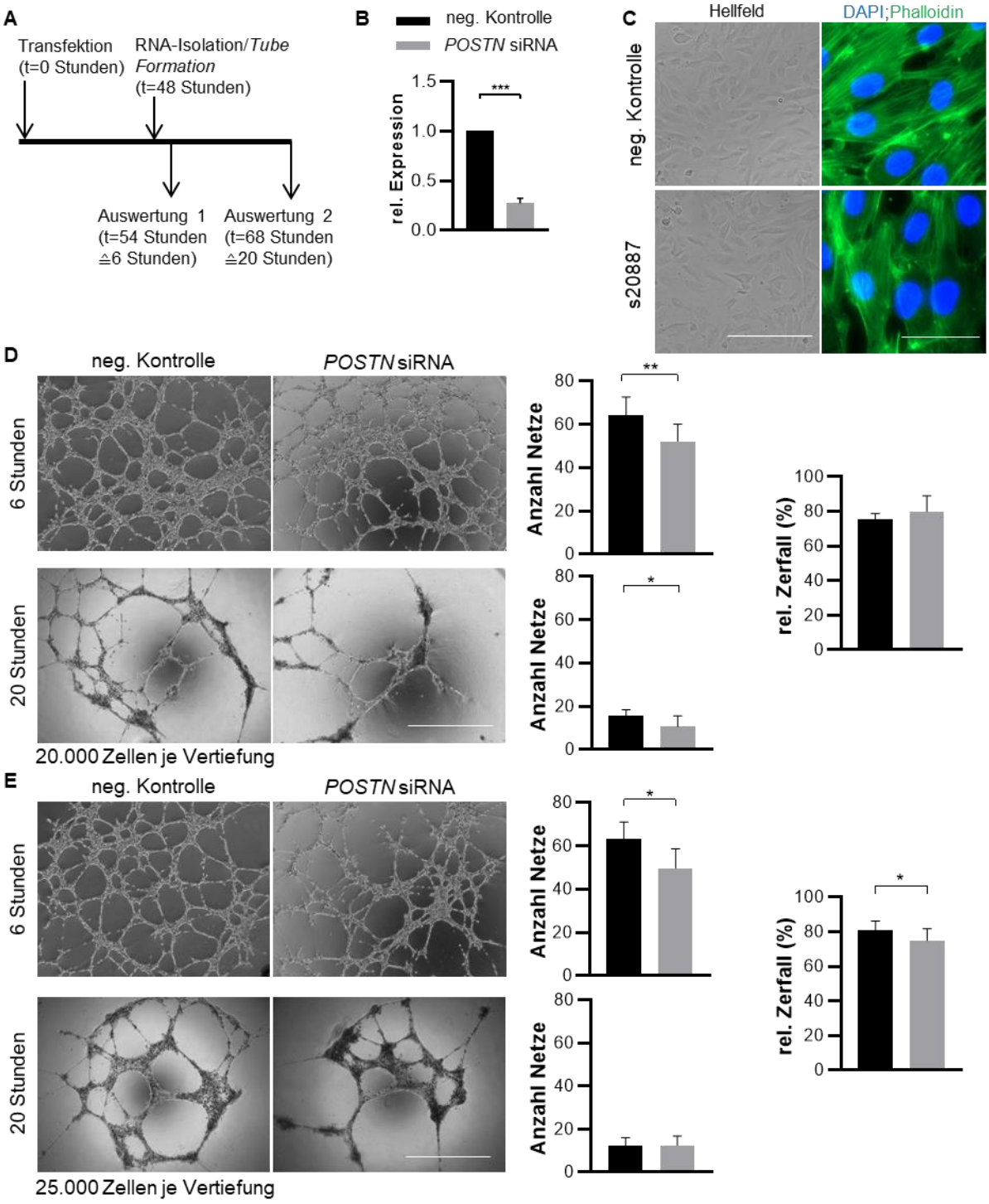

Abbildung 8: Inhibitorischer Effekt auf die Ausbildung gefäßähnlicher Strukturen durch akut verminderte *POSTN*-Genexpression (n=6). A Zeitliche Vorgehensweise; **B** Validierung der Herunterregulation von *POSTN* mittels qPCR; **C** Hellfeldaufnahmen (Maßstab 400 µm), Darstellung des Aktinzytoskeletts mittels Phalloidin und der Zellkerne mittels DAPI nach 24 Stunden (Maßstab 50 µm); **D** 20.000 Zellen: Hellfeldaufnahmen *Tube Formation Assay* nach 6 und 20 Stunden (Maßstab 400 µm). Grafik gebildeter Netze zu den zwei Zeitpunkten; relativer Zerfall der Netze im Zeitverlauf; **E** 25.000 Zellen: Hellfeldaufnahmen *Tube Formation Assay* nach 6 und 20 Stunden (Maßstab 400 µm). Grafik gebildeter Netze zu den zwei Zeitpunkten und relativer Zerfall der Netze im Zeitverlauf.

4.5. Auswirkungen der Hinzugabe von rekombinanten Protein auf *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs

Der dauerhafte Verlust von CCM3 veränderte den Phänotyp von Endothelzellen spezifisch. Um eine mögliche Rettung dieses veränderten Phänotyps zu erzielen, wurden die *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen mit rekombinantem Fibulin5 (rFBLN5) bzw. rekombinantem Periostin (rPOSTN) behandelt und die Endothelzellen hinsichtlich ihrer Morphologie und angiogenetischen Eigenschaften beurteilt.

4.5.1. Veränderter Phänotyp von *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs durch die Hinzugabe von rFBLN5

Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurde die Zellmorphologie der mit rFBLN5 behandelten *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen mit der unbehandelten *CCM3*$^{-/-}$ Kontrollkondition verglichen (Abbildung 9 A). Das Zellbild war maßgeblich verändert. Die Zellen der unbehandelten Kondition stellten sich klein mit einem geordneten Wachstumsmuster dar. Sie wirkten außerdem im Vergleich zu der mit rFBLN5 behandelten Kondition nach gleicher Inkubationszeit deutlich konfluenter. Die Zellkerne der unbehandelten Kondition waren oval bis spindelförmig. Vereinzelt waren abgestorbene Zellen im Medium zu finden. Die Zellkerne der mit rFBLN5 behandelten Kondition lagen im Vergleich weiter auseinander, weshalb zunächst der Eindruck einer geringeren Zellkonfluenz entstand. Die vergrößerten Bildausschnitte zeigten, dass sich die Zellgrenzen unter der Behandlung von rFBLN5 prominenter abzeichneten als in der unbehandelten Kondition (Abbildung 9 A).

In der unbehandelten Kondition wurden durch die Färbung des Aktinzytoskeletts und der Zellkerne die zahlreichen kleinen und kurzen Stressfasern sichtbar, welche ungeordnet im Zytoplasma vorlagen und teilweise über den Zellkern verliefen (Abbildung 9 A). Die mit rFBLN5 behandelten Zellen zeigten ein stark davon abweichendes Aktinzytoskelett. Zentral im Zytoplasma war filamentöses Aktin nicht mehr sichtbar. Die punktförmig angefärbten Bestandteile innerhalb der Zelle sprechen am ehesten für Färbeartefakte. Die größte Intensität des Fluoreszenzsignals war kortikal im Zytoplasma zu verzeichnen, wodurch der Eindruck der Umrandung der Zellen entstand. Durch die hervorgehobenen Zellgrenzen konnte gezeigt werden, dass die

Zellleiber direkt aneinander grenzen. Die Konfluenz war nicht, wie zunächst angenommen, herabgesetzt (Abbildung 9 A).

Im Vergleich zu den starken Auswirkungen von rFBLN5 auf die Zellmorphologie der *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen waren kaum Auswirkungen auf die Ausbildung gefäßähnlicher Strukturen zu verzeichnen (Abbildung 9 B). Nach 6 Stunden bildeten sich in der mit rFBLN5 behandelten Kondition im Mittel zwischen 52 und 88 Netze aus. In der Kontrollkondition waren im Mittel zwischen 73 und 117 Netze ausgebildet. Aufgrund der großen Schwankungsbreite der Anzahl der Netze innerhalb einer Kondition war keine statistische Signifikanz zwischen den Konditionen zu erkennen. Nach 20 Stunden lag die Anzahl noch vorhandener Netze in der mit rFBLN5 behandelten Kondition zwischen 0 und 14. Parallel hierzu waren in der unbehandelten *CCM3*$^{-/-}$ Kondition noch zwischen 2 und 18 Netze ausgebildet. Es ließ sich ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied erkennen.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde geschlussfolgert, dass die Hinzugabe von rFBLN5 einen starken Einfluss auf den Phänotyp und die Organisation des Aktinzytoskeletts hat. Vermutlich hat rFBLN5 einen maßgeblichen Einfluss auf die zellmorphologischen Eigenschaften der CCM3-defizienten Endothelzellen.

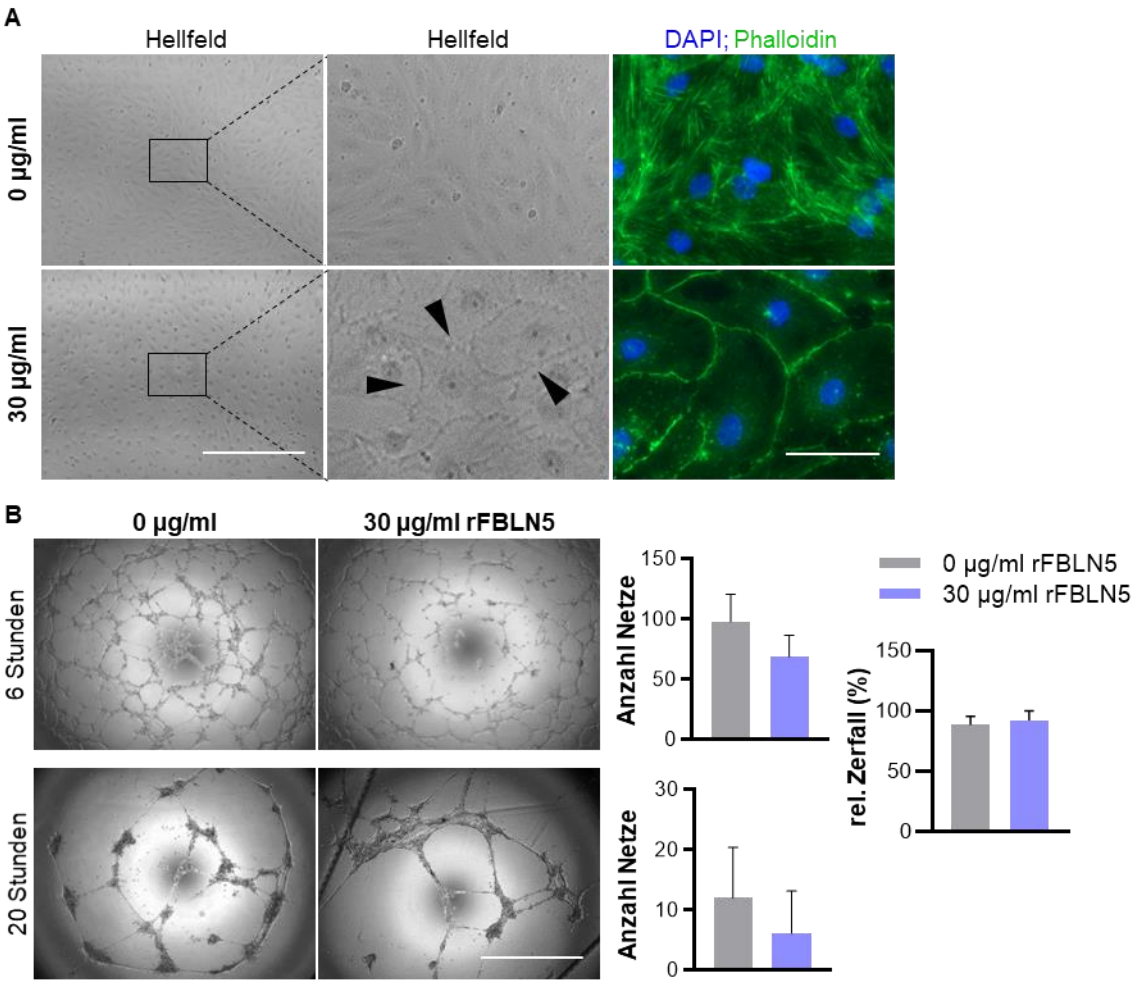

Abbildung 9: Zellmorphologie und *Tube Formation* von *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen nach der Hinzugabe von rFBLN5 (n=4). A Hellfeldaufnahmen der behandelten und unbehandelten Kondition (Maßstab 400 µm) und in gleicher digitaler Vergrößerung. Darstellung des angefärbten Aktinzytoskeletts mittels Phalloidin und der Zellkerne mittels DAPI (Maßstab 100 µm); **B** Bilder: *Tube Formation* nach 6 und 20 Stunden beider Konditionen. Grafische Darstellung der Anzahl gebildeter Netze nach 6 und 20 Stunden im Vergleich zwischen beiden Konditionen. Darstellung des relativen prozentualen Zerfalls im Zeitverlauf.

4.5.2. Stabilitätssteigernde Wirkung von rPOSTN auf gefäßähnliche Strukturen in *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs

Die *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von rPOSTN behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurde ihre Zellmorphologie mit der der unbehandelten Kontrollkondition verglichen. Alle Konditionen zeigten eine annähernd gleiche Konfluenz von 95 % bis 100 %. Auffallend war, dass mit steigender

Konzentration vermehrt rundlich abgelöste oder abgestorbene Zellen im Medium vorzufinden waren. In der Hellfeldaufnahme zeigte sich unabhängig der Konzentration von rPOSTN in allen Konditionen ein vergleichbares Bild (Abbildung 10 A). Die *CCM3*$^{-/-}$ Zellen zeigten eine eher spindelige Form mit einem geordneten Wachstumsmuster, das für *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs nach 48 Stunden Wachstum typisch ist (Abbildung 4 A). Die Hinzugabe von rPOSTN veränderte das Muster nicht (Abbildung 10 A).

Das Anfärben sowohl des Aktinzytoskeletts als auch der Zellkerne ermöglichte die Beurteilung der Stressfaserbildung nach Behandlung mit rPOSTN. Die Hinzugabe von rPOSTN hatte im Vergleich zur unbehandelten Kondition keinen Einfluss auf die Organisation des Aktinzytoskeletts in *CCM3*$^{-/-}$ Zellen. In allen Konditionen war die nach CCM3-Verlust typische Organisation des Aktinzytoskeletts, mit vielen kleinen und kurzen Stressfasern zu beobachten (Abbildung 10 A).

Die Supplementierung von rPOSTN hatte hingegen einen positiven Einfluss auf die Netzstabilität im Zeitverlauf. Nach 6 Stunden bildeten die mit verschiedenen Konzentrationen von rPOSTN behandelten Konditionen zwischen 57,8 und 73 Netze aus. In der unbehandelten Kondition waren es zur gleichen Zeit 65,9 Netze (Abbildung 10 B). Aufgrund der großen Schwankungsbreite innerhalb der behandelten Konditionen war der Vergleich zwischen den Konditionen statistisch nicht signifikant. Nach 20 Stunden nahm die Anzahl der gebildeten Netze in allen Konditionen stark ab (Abbildung 10 C). Dennoch zeigte sich durch die Addition von 10 µg/ml rPOSTN eine 2,7-fach höhere Anzahl noch vorhandener Netze im Vergleich zu den unbehandelten *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen (**, p= 0,004). In den behandelten Konditionen waren zwischen 7,2 und 13,3 Netze ausgebildet, während es in der unbehandelten *CCM3*$^{-/-}$ Kondition lediglich 4,9 Netze waren. Durch die Hinzugabe von 1 µg/ml rPOSTN waren ebenfalls nach 20 Stunden noch signifikant mehr Netze vorhanden (*, p= 0,03).

Der relative Zerfall der Netze im Zeitverlauf nahm durch die Behandlung mit rPOSTN ab. Die arithmetischen Mittelwerte lagen in den behandelten Konditionen für eine Konzentration von 0,5 µg/ml bei 88,1 %, von 1 µg/ml bei 84,0 % und für eine Konzentration von 10 µg/ml bei 71,8 %. Der Mittelwert für die unbehandelte Kondition lag bei 91,5 % der ursprünglich gebildeten Netze. Die Daten zeigten, dass durch die Addition von 10 µg/ml rPOSTN nach 20 Stunden 19,7 % mehr Netze ausgebildet sind (Abbildung 10 D). Es zeigte sich ebenfalls eine statistische Signifikanz (*, p= 0,025).

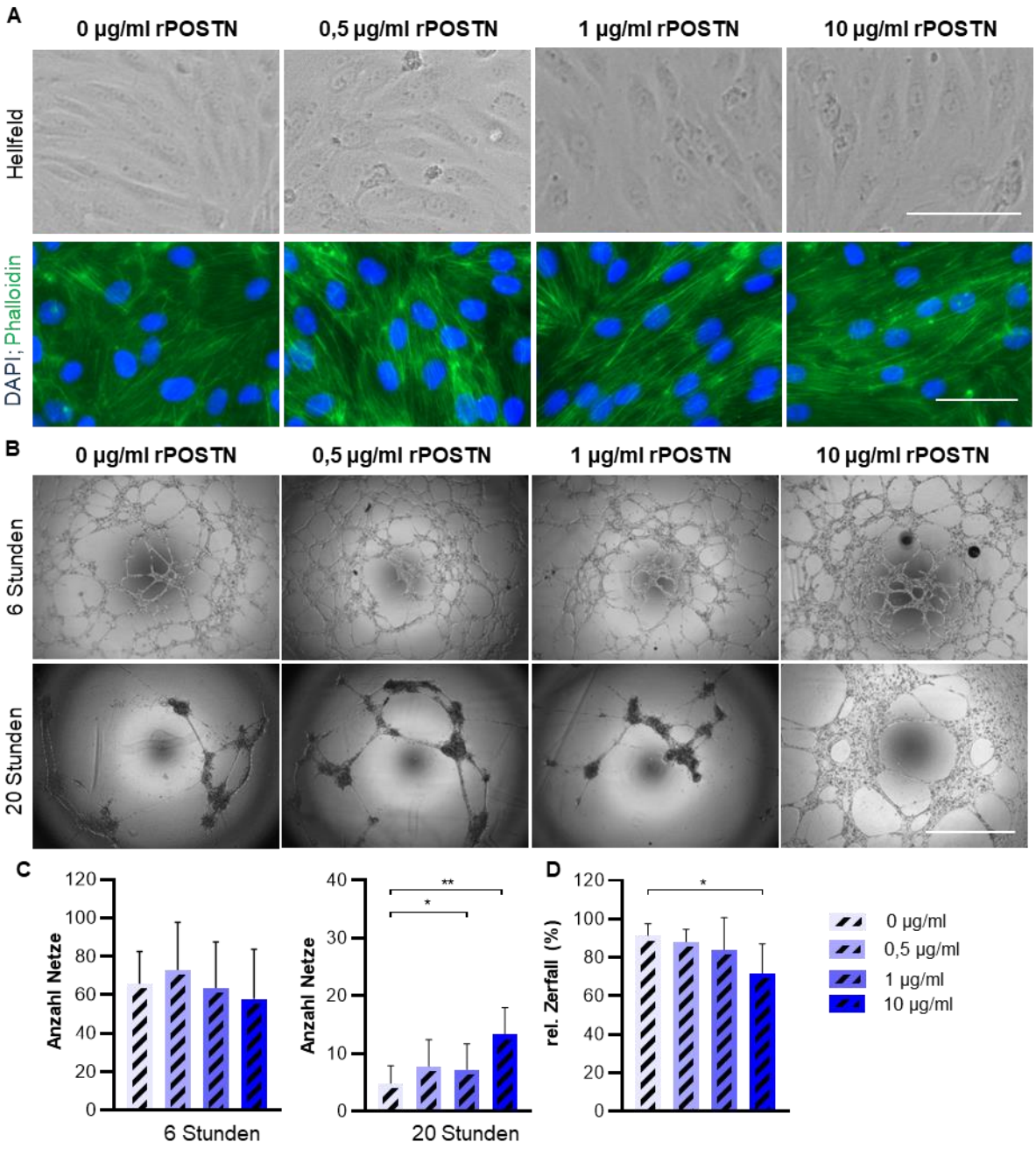

Abbildung 10: Zellmorphologie und *Tube Formation* von *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen nach Hinzugabe von rPOSTN. Kontrollkonditionen und die Konzentrationen von 0,5 µg/ml und 1 µg/ml wurden für n=6 durchgeführt. Die Konzentration von 10 µg/ml rPOSTN wurde mit n=4 durchgeführt. **A** Hellfeldaufnahmen mit den verschiedenen Konzentrationen von rPOSTN (Maßstab 100 µm). Darunter Darstellung des angefärbten Aktinzytoskeletts mittels Phalloidin und der Zellkerne mittels DAPI (Maßstab 50 µm); **B** Bilder: *Tube Formation* nach 6 und 20 Stunden aller Konditionen (Maßstab 400 µm); **C** Grafische Darstellung der Anzahl der Netze nach 6 und 20 Stunden; **D** Darstellung des relativen prozentualen Zerfalls der Netze im Zeitverlauf.

4.6. Auswirkungen der Hinzugabe von rekombinantem Protein auf *CCM3*$^{+/+}$ CI-huVECs

4.6.1. Unveränderte Morphologie von *CCM3*$^{+/+}$ CI-huVECs durch die Hinzugabe von rFBLN5

Um einen möglichen Einfluss von rFBLN5 auf *CCM3*$^{+/+}$ CI-huVECs ermitteln zu können, wurden deren morphologische Eigenschaften beurteilt. In der Hellfeldaufnahme waren die spindelförmige Zellmorphologie und das pflastersteinartige Wachstumsmuster zu erkennen (Abbildung 11). Die Zellkonfluenz nach 48 Stunden von etwa 75 % war mit dem zu erwartenden Wachstumsbild vergleichbar (siehe 4.1.). Außerdem zeigte sich in der Hellfeldaufnahme, dass sich im Medium der mit rFBLN5 behandelten Kondition im Vergleich zur Kontrollkondition vermehrt rundlich abgelöste oder abgestorbene Zellen befinden. Das Aktinzytoskelett stellte sich kortikal organisiert dar (Abbildung 11). Vereinzelt war in der Kontrollkondition filamentöses Aktin zu erkennen, das zwischen Kern und Zellmembran durch das Zytoplasma verlief. Durch die Behandlung mit rFBLN5 änderte sich die Organisation des Aktinzytoskeletts der Endothelzellen nicht. Das angefärbte filamentöse Aktin war auch hier kortikal exprimiert. Jedoch zeigte es nach der Behandlung mit rFBLN5 eine eher lückenhafte kortikale Anordnung.

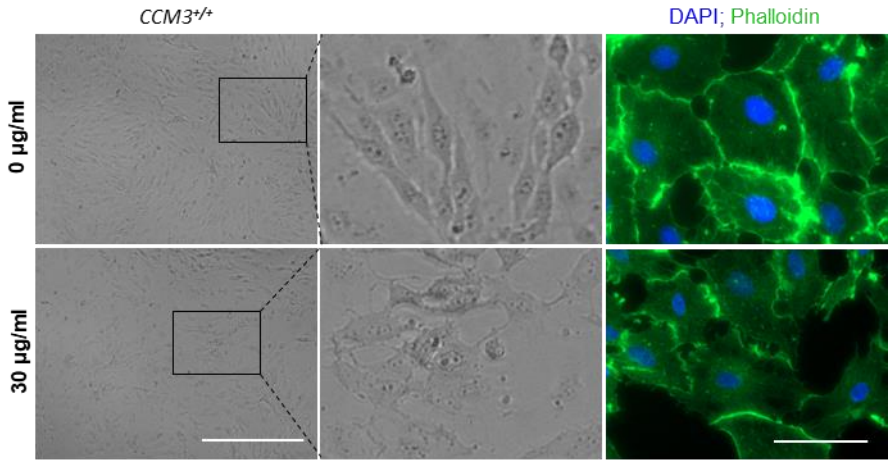

Abbildung 11: rFBLN5 hat keinen Einfluss auf die zellmorphologischen Eigenschaften von *CCM3*$^{+/+}$ Zellen (n=5). Hellfeldübersichtsaufnahmen der Kontrollzellen mit und ohne der Hinzugabe von rFBLN5 (Maßstab 400 µm). Darstellung des Aktinzytoskeletts mittels Phalloidin und der Zellkerne mittels DAPI beider Konditionen (Maßstab 50 µm).

4.6.2. Stabilitätssteigernde Wirkung von rPOSTN auf gefäßähnliche Strukturen in *CCM3*$^{+/+}$ CI-huVECs

Die *CCM3*$^{+/+}$ CI-huVECs wurden äquivalent zu den *CCM3*$^{-/-}$ Zellen mit den drei verschiedenen Konzentrationen 0,5 µg/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml rPOSTN behandelt. Anschließend wurden ihre Morphologie und die Ausbildung gefäßähnlicher Strukturen im *Tube Formation Assay* untersucht.

In den Hellfeldaufnahmen zeigte sich im Wachstum nach 48 Stunden kein sichtbarer Unterschied zwischen den Konditionen (Abbildung 12 A). Zellkonfluenz und Wachstumsmuster wurden durch die Hinzugabe von rPOSTN nicht beeinflusst. Mit steigender Konzentration von rPOSTN waren vermehrt rundlich abgelöste oder abgestorbene Zellen im Medium zu erkennen. Das angefärbte Aktinzytoskelett zeigte zwischen der unbehandelten und der mit rPOSTN behandelten Kondition konzentrationsunabhängig keinen Unterschied in der Organisation der filamentösen Strukturen. Es war regelmäßig angeordnet und die einzelnen Fasern zogen der Polarität einer Endothelzelle folgend, in Längsrichtung durch die Zelle. Die erkennbaren Fasern waren dabei durchgängig und lagen nur vereinzelt über den Zellkernen (Abbildung 12 A).

Im *Tube Formation Assay* lag der Mittelwert der Anzahl gebildeter Netze nach 6 Stunden in den mit rPOSTN behandelten Konditionen zwischen 46,7 und 62,5 Netzen (Abbildung 12 B). Die unbehandelte Kontrollkondition bildete im gleichen Zeitraum im Mittel 47,8 Netze aus. Nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden nahm die Anzahl stabiler Netze in allen Konditionen deutlich ab. In den mit rPOSTN behandelten Konditionen lagen die Mittelwerte der noch ausgebildeten Netze zwischen 15,1 und 29,6. Im Vergleich hierzu waren in der Kontrollkondition noch 16,1 Netze ausgebildet. Die Addition von 10 µg/ml rPOSTN bedingte nach 20 Stunden einen Anstieg der Anzahl noch stabiler Netze um das 1,8-fache im Vergleich zur Kontrollkondition (Abbildung 12 C). Dieses Ergebnis war statistisch signifikant (*, p=0,047).

Der prozentuale Zerfall der Netze im Zeitverlauf lag in den mit rPOSTN behandelten Konditionen zwischen 67,7 % und 52,8 %. Mit steigender Hinzugabe von rPOSTN nahm der relative Zerfall tendenziell ab. Die unbehandelte Kontrollkondition zeigte im Mittel einen relativen Zerfall von 69,1 % (Abbildung 12 D). Der prozentuale Zerfall war zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant.

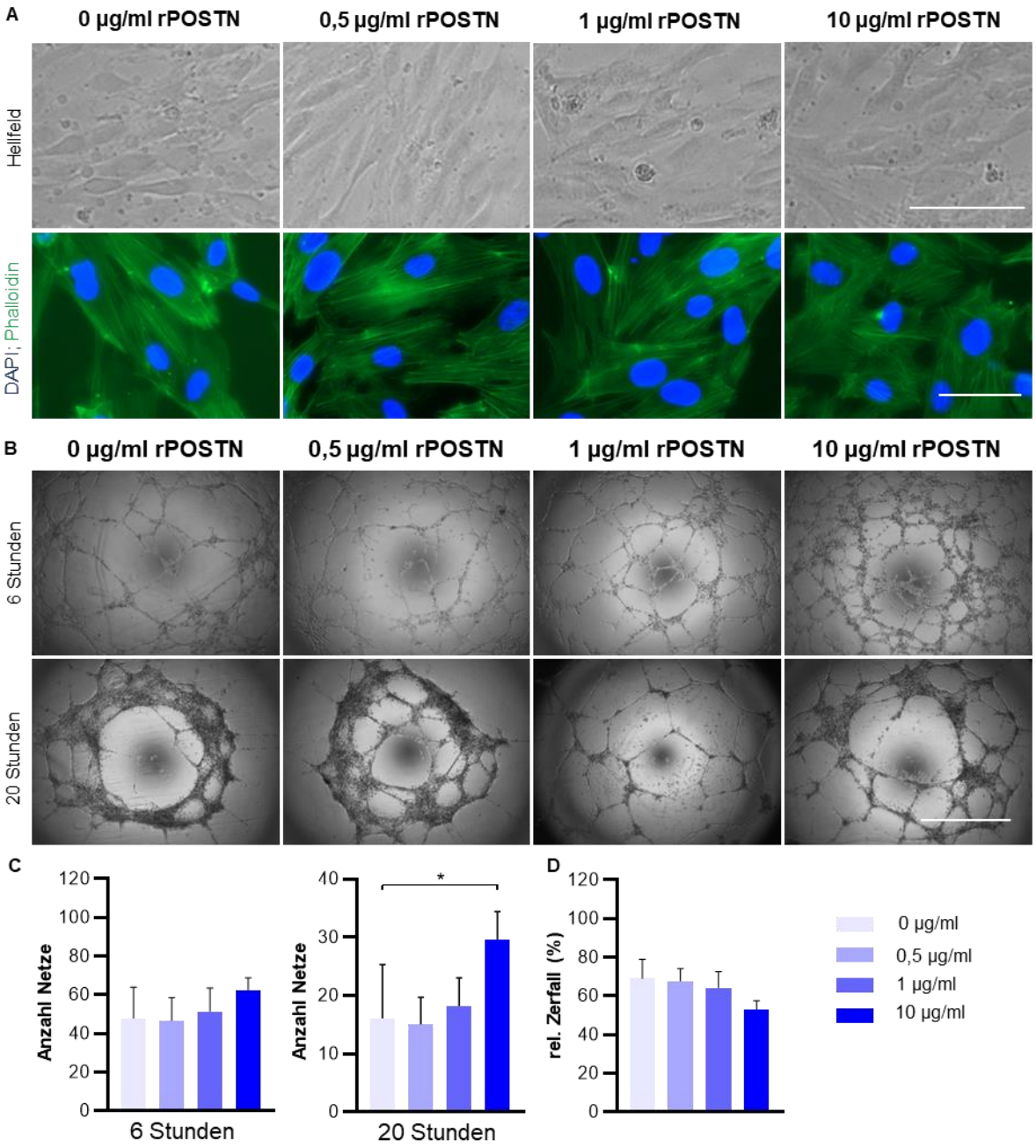

Abbildung 12: Zellmorphologie und *Tube Formation* von *CCM3*$^{+/+}$ Endothelzellen nach Hinzugabe von rPOSTN. Kontrollkonditionen und Konzentrationen von 0,5 µg/ml und 1 µg/ml wurden für n=6 durchgeführt. Konzentration von 10 µg/ml rPOSTN wurde für n=4 durchgeführt. **A** Hellfeldaufnahmen mit den verschiedenen Konzentrationen von rPOSTN (Maßstab 100 µm). Darunter Darstellung des angefärbten Aktinzytoskeletts mittels Phalloidin und der Zellkerne mittels DAPI (Maßstab 50 µm); **B** Bilder *Tube Formation* nach 6 und 20 Stunden aller Konditionen (Maßstab 400 µm); **C** Grafische Darstellung der Anzahl der Netze nach 6 und 20 Stunden; **D** Darstellung des relativen prozentualen Zerfalls der Netze im Zeitverlauf**.**

5. Diskussion

5.1. Auswirkungen des Verlustes von CCM3 auf Endothelzellen

Endothelzellen sind polare Zellen, die unter anderem die Funktionstüchtigkeit der Blut-Hirn-Schranke beeinflussen (Fishman 1982; Pardridge 1999). Die bei Trägern einer *CCM3*-Keimbahnvariante wahrscheinlich durch einen *second hit* initiierte Kavernombildung beruht auf deutlich veränderten Eigenschaften der CCM3-defizienten Endothelzellen. Dazu zählen sowohl eine gesteigerte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke aufgrund gestörter interzellulärer Kontakte als auch eine pathologisch veränderte Angiogenese. Essentiell für den reibungslosen Ablauf der Angiogenese sind der Abbau der extrazellulären Matrix (EZM) und die Auflösung von interzellulären Kontakten (Bicer et al. 2010; Dye et al. 2004). Aus diesem Grund rückt die Untersuchung der CCM-EZM-Signalachse zunehmend in den Fokus des Interesses.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Morphologie und die Zelleigenschaften der Endothelzellen nach Verlust von CCM3 mit Hilfe eines *in vitro* Modells untersucht. Die Inaktivierung der *CCM3*-Expression in CI-huVECs wurde durch die von Schwefel et al. (2019) etablierte Methode einer crRNA:tracrRNA:Cas9-Ribonukleoprotein vermittelten Genomeditierung in Endothelzellen erzielt. Bereits im adhärenten Wachstum zeigten die klonal expandierten *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen, im Vergleich zu den *CCM3*$^{+/+}$ Kontrollzellen, eine rundere und kompaktere Morphologie. Diese Beobachtungen bestätigen die durch Schwefel et al. (2019) beschriebene Morphologie von *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen. In Kavernomen stellt sich die kompakte Ordnung durch dicht aneinander liegende Endothelzellkanäle ohne intervenierendes Hirnparenchym und durch das Fehlen der Schicht glatter Muskelzellen dar (Rigamonti et al. 1987; Tanriover et al. 2013). Vermutet wird, dass der CCM-Formation eine mosaikähnliche Organisation zugrunde liegt, die durch das Zusammenlagern von Endothelzellen mit erhaltener Expression der CCM-Proteine und solchen mit vollständiger Inaktivierung eines CCM-Proteins gekennzeichnet ist (Detter et al. 2018; Malinverno et al. 2019). Malinverno et al. (2019) zeigten in einem Mausmodell der induzierten endothelzellspezifischen CCM3-Inaktivierung, dass die Formation von zerebralen kavernösen Malformationen durch die klonale Expansion von *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen initiiert wird. Jedoch werden im zeitlichen Verlauf ebenfalls genetisch unveränderte Zellen in die

CCM-Formation miteinbezogen. Diese Rekrutierung von Endothelzellen mit erhaltener Expression der CCM-Proteine ist wahrscheinlich für das mosaikähnliche Erscheinungsbild in humanen Kavernomen verantwortlich (Detter et al. 2018; Malinverno et al. 2019). Die Daten der Greifswalder Arbeitsgruppe legen einen Überlebensvorteil von *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen gegenüber den *CCM3*$^{+/+}$ Endothelzellen nahe. Da der Anteil an *CCM3*-Allelen mit einer CRIPSR/Cas9-induzierten *loss-of-function* Variante während der Kultivierung im Zellgemisch, bestehend aus *CCM3*$^{-/-}$ und *CCM3*$^{+/+}$ Endothelzellen, stark ansteigt, ist anzunehmen, dass die Inaktivierung von CCM3 mit einem Überlebensvorteil für die Zellen einhergeht (Schwefel et al. 2019). Es wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Beobachtungen gemacht, die die Hypothese des Überlebensvorteils bekräftigen. *CCM3*$^{+/+}$ CI-huVECs verloren in höheren Zyklen der Zellkultivierung (Passagen) zunehmend ihre pflastersteinartige Morphologie, wohingegen die *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen auch in höheren Passagen unbeeinträchtigt proliferierten.

Zusätzlich weisen Kavernome andere veränderte Eigenschaften auf. Sie stellen sich als abnormal dilatierte Kapillaren dar, welche zu lokalen Blutungen neigen (Labauge et al. 1998; Rigamonti et al. 1988). Aus diesem Grund wurden die Auswirkungen des Verlustes von CCM3 auf die Ausbildung gefäßähnlicher Strukturen untersucht. Zur Visualisierung diente der *Tube Formation Assays,* welcher Teilprozesse der Angiogenese abbildet. Nach 6 Stunden zeigten die *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVE-Zellen, im Vergleich zu den *CCM3*$^{+/+}$ Endothelzellen eine tendenziell höhere Anzahl ausgebildeter Netze. Folglich könnte zunächst ein stimulierender Effekt nach dem Verlust von CCM3 auf die Ausbildung gefäßähnlicher Strukturen geschlussfolgert werden. Jedoch sind nach 20 Stunden deutlich mehr Netze in der Gruppe der CCM3-defizienten Endothelzellen als in der Kontrollkondition zerfallen. Es resultierte demnach eine eingeschränkte Stabilität der ausgebildeten gefäßähnlichen Strukturen im zeitlichen Verlauf. Der beschriebene Stabilitätsverlust scheint die Hypothese zu stützen, dass der Verlust von CCM3 zu einer inhibierten Angiogenese führt (Borikova et al. 2010). Allerdings ist zu erwähnen, dass zum Teil widersprüchliche Auswirkungen des CCM3-Verlustes auf die angiogenetischen Eigenschaften von Endothelzellen beschrieben wurden. Die Mehrheit der Autoren postuliert einen proangiogenen Einfluss (Schleider et al. 2011; You et al. 2013). Diese Diskrepanz könnte in der Komplexität der Angiogenese

begründet liegen, mit der Folge, dass ein Rückschluss auf den Gesamtprozess nicht möglich zu sein scheint.

Neben den beschriebenen Auffälligkeiten von Morphologie, Wachstum und dem Stabilitätsverlust gefäßähnlicher Strukturen zeigen *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen ein verändertes Aktinzytoskelett. Die Organisation des Aktins innerhalb einer Zelle ist essentiell für den Erhalt interzellulärer Kontakte und die Regulation der endothelialen Permeabilität. Der Verlust von CCM3 führt zur Ausbildung kurzer, ungeordnet in der Zelle vorliegender Aktinfilamente. Diese spezifische Stressfaserformation bei Inaktivierung eines der drei Gene, *CCM1, CCM2* oder *CCM3,* ist bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (Faurobert et al. 2013; Glading et al. 2007; Shenkar et al. 2015). *CCM3*$^{+/+}$ Endothelzellen hingegen bilden lange Aktinfilamente aus, die kortikal lokalisiert sind. Die gezielte Reorganisation des Aktinzytoskeletts und die dadurch möglicherweise erklärbare Erhöhung der Zellsteifigkeit der CCM3-defizienten Endothelzellen (Schwefel et al. 2019) führen höchstwahrscheinlich zur Destabilisierung der Zell-Zell-Verbindungen (Huveneers et al. 2015). Unter dieser Prämisse sind sowohl die veränderten interzellulären Kontakte als auch die gesteigerte Permeabilität der Kavernome erklärbar (Faurobert & Albiges-Rizo 2010; Zheng et al. 2010). Draheim et al. (2014) beschreiben zusätzlich einen Umbau der EZM, der durch gesteigerte Stressfaserproduktion ausgelöst wird. Das wiederum deutet darauf hin, dass intrazelluläre Prozesse die Umgebung einer Zelle beeinflussen. Young & Herman (1985) konnten durch die Verwendung klonaler Endothelzellen zeigen, dass Moleküle der EZM umgekehrt die Stressfaserexpression modulieren und damit Einfluss auf das Aktinzytoskelett nehmen. Für dieses beschriebene *inside-out* und *outside-in signaling* sind Oberflächenrezeptoren, sogenannte Integrine, verantwortlich (Giancotti & Ruoslahti 1999). Zeitgleich mit der Erstbeschreibung der Interaktion aller drei CCM-Proteine, in Form eines ternären Komplexes, wurde durch *in vitro* Experimente eine mögliche Assoziation der Proteine mit ICAP-1 (*Integrin Cytoplasmatic Domain-associated protein 1*) vermutet (Hilder et al. 2007). ICAP-1 ist ein Protein, das an die zytoplasmatische Domäne von β1-Integrin bindet und seine Aktivierung hemmt. β1-Integrin vermittelt die Adhäsion zur EZM und aktiviert den Rho-A-Signalweg, der zu einer gesteigerten Zellkontraktilität und dem Umbau des Aktinzytoskeletts führt (Fischer et al. 2013; Huveneers & Danen 2009). Faurobert et al. (2013) zeigten, dass CCM2 CCM1 stabilisiert, das wiederum ICAP-1 vor Degradation schützt. Des Weiteren

ist bekannt, dass CCM3 mit CCM2 interagiert und der Verlust von CCM3 ein reduziertes Proteinlevel von CCM2 bedingt (Draheim et al. 2015; Voss et al. 2007). Anhand dieser Interaktionen ist vorstellbar, dass der Verlust eines Bestandteils des ternären Komplexes den β1-Integrin-Signalweg aktiviert und die Reorganisation des Aktinzytoskeletts initiiert. Die Resultate erhöhen die Wahrscheinlichkeit, dass Integrine durch die CCM-Proteine in einer bisher unbekannten Weise reguliert werden. Die Identifikation der CCM-spezifischen EZM und deren Einflussnahme auf zelluläre Prozesse scheinen daher essentiell.

Die durch die Greifswalder Arbeitsgruppe durchgeführte Transkriptomanalyse der *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen identifizierte *FBLN5* und *POSTN* als die am stärksten deregulierten Gene auf mRNA-Ebene. Beide waren stark herunterreguliert. Dies deckt sich mit den Daten von Guerrero et al. (2015). Sie beobachteten nach shRNA (*small hairpin RNA*) vermittelter Herunterregulation von *CCM3* eine starke Herunterregulation von *FBLN5* und *POSTN*. Beide Gene kodieren für Proteine der EZM und zeigen durch gezielte Integrinbindung Auswirkungen auf Prozesse wie Angiogenese und Organisation des Aktinzytoskeletts. Aufgrund der enormen Dysregulation in *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen und der Einflussnahme auf Prozesse, die in der CCM-Pathogenese maßgeblich verändert sind, waren die Proteine vielversprechend für die Untersuchung einer möglichen Rettung des Phänotyps CCM3-defizienter Zellen.

5.2. Die matrizellulären Proteine FBLN5 und POSTN

FBLN5 und POSTN zählen zu den sogenannten matrizellulären Proteinen. Sie modulieren hauptsächlich Zellfunktionen, stellen aber keine Strukturkomponente innerhalb der EZM dar (Bornstein et al. 2004; Sage & Bornstein 1991). Eigenschaften der EZM werden durch die direkte Bindung der Proteine an Zellrezeptoren oder an strukturbildende Proteine der EZM reguliert. Zusätzlich zeichnen sich die matrizellulären Proteine durch eine hohe Konzentration in der embryonalen Entwicklung und durch eine stark verminderte Konzentration im adulten Gewebe aus. Im Rahmen von Gewebeverletzungen, der Wundheilung und während anderen angiogenetischen Prozessen wird die Expression dieser Proteine gesteigert (Bornstein 2002).

5.2.1. Modulatorische Eigenschaften von FBLN5 auf *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von FBLN5 auf Morphologie, Wachstum und die Ausbildung gefäßähnlicher Strukturen untersucht. Sie repräsentieren, wie dargelegt, einen Teil der veränderten Eigenschaften von *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen. Die akute Herunterregulation von *FBLN5* hatte sowohl nach 6 Stunden als auch nach 20 Stunden im *Tube Formation Assay* eine verminderte Anzahl ausgebildeter Netze zur Folge. Im Vergleich zur Kontrollkondition war die Anzahl noch vorhandener Netze nach 20 Stunden in der Kondition nach Herunterregulation von *FBLN5* um mehr als 50 % niedriger. Die Netzstabilität ist deutlich eingeschränkt. Die zunehmende Instabilität der gebildeten Netze im zeitlichen Verlauf deckt sich mit den Beobachtungen der *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen. Dieses Zellverhalten könnte somit dem Verlust von *FBLN5* zugeschrieben werden.

Neben der eingeschränkten Netzstabilität zeigte die Herunterregulation von *FBLN5* in *CCM3*$^{+/+}$ CI-huVECs nach 6 Stunden zusätzlich einen hemmenden Einfluss auf die Ausbildung röhrenartiger Strukturen und Netze. Durch Albig & Schiemann (2004) wurde gezeigt, dass *FBLN5* in murinen Endothelzellen während der Tubulogenese stark herunterreguliert ist und proangiogene Signale die *FBLN5*-Genexpression hemmen. Die Autoren visualisierten das Verhalten der Zellen, in dem sie die Sprossungseigenschaften der Zellen darstellten. Sie beschrieben, dass das Vorhandensein von FBLN5 das Sprossungsverhalten der Endothelzellen inhibiert. Die eigenen Beobachtungen in CI-huVECs nach Herunterregulation von FBLN5 stehen somit scheinbar im Widerspruch zu den bisherigen Erkenntnissen in Endothelzellen. In dieser Arbeit zeigte die akute Herunterregulation von *FBLN5* einen hemmenden Einfluss, während in der Literatur beschrieben ist, dass das Vorhandensein von FBLN5 die Angiogenese inhibiert. Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte in den angewandten Techniken liegen. Die Angiogenese ist ein aus vielen Teilschritten bestehender Prozess (Senger & Davis 2011). Durch die Verwendung unterschiedlicher experimenteller Ansätze werden verschiedene Stadien innerhalb der Angiogenese abgebildet. Die Sprossungseigenschaften der Zellen werden beispielsweise durch das Zusammenlagern der Zellen in Tropfen, sogenannte Sphäroide, untersucht, während der *Tube Formation Assay* die Ausbildung gefäßähnlicher Röhren und Netze von Zellen visualisiert. Ein weitere Erklärung könnte darin liegen, dass FBLN5 die

Angiogenese über diverse Integrine, welche an der Zellmembran lokalisiert sind (Giancotti & Ruoslahti 1999), beeinflusst. Vermutet wird, dass die proangiogene Wirkung durch eine hohe Affinität von FBLN5 bei geringer Integrindichte erzielt wird. Die antiangiogene Wirkung wird durch eine niedrige Affinität bei hoher Rezeptordichte, eines noch unbekannten Rezeptors, erreicht (Albig & Schiemann 2005). Demzufolge ist es möglich, dass die Wirkung von FBLN5 sowohl über die Rezeptordichte als auch über die Rezeptoreigenschaften einer Zelle bestimmt wird. In wie weit die Herunterregulation von *FBLN5* im Rahmen der CCM3-Pathogenese die Organisation der Integrine beeinflusst bleibt allerdings bisher unklar. Die Einordnung der eigenen Ergebnisse in die aktuelle Literatur zeigen, dass diese nicht zwangsläufig im Widerspruch zueinander stehen, sondern stets kontextabhängig betrachtet werden müssen. Sowohl die Herunterregulation von *FBLN5* als auch dessen Vorhandensein können hemmende sowie stimulierende Auswirkungen auf Teilabläufe der Angiogenese haben. Interessant wäre, zukünftig herauszufinden, welche Integrine involviert sind.

Die Regulationsmechanismen der FBLN5-Genexpression könnten zusätzlich zum besseren Verständnis im Rahmen der CCM3-Pathogenese beitragen. Albig & Schiemann (2004) zeigten, dass VEGF, ein die Angiogenese induzierender Faktor (Pepper et al. 1992), die FBLN5-Genexpression inhibiert. Im Rahmen der CCM-Pathogenese ist bereits eine Assoziation zwischen CCM3 und dem VEGF-Signalweg bekannt (He et al. 2010), weshalb die gezielte Fragestellung der Rolle von FBLN5 in dieser Signalkaskade weiter Aufschluss geben könnte. Des Weiteren zeigen FBLN5-exprimierende Zellen eine gesteigerte Expression des Proteins TSP-1, welches seinerseits auch zu der Gruppe der matrizellulären Proteine zählt (Bornstein 2000). Es stellt unter anderem einen endogenen Angiogeneseinhibitor dar (Good et al. 1990). Vermutet wird, dass die inhibitorischen Eigenschaften von FBLN5 durch die Induktion der TSP-1-Expression zu erklären sind (Albig & Schiemann 2004). In der durch die Greifswalder Arbeitsgruppe durchgeführten Transkriptomanalyse der *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs wurde festgestellt, dass neben *FBLN5* und *POSTN* auch *TSP-1* auf mRNA-Ebene herunterreguliert ist. Allerdings müsste, wenn die beschriebenen Interaktionen vollständig auf die CCM-Pathogenese übertragbar wären, die Herunterregulation von *FBLN5* und *TSP-1* einen positiven Einfluss auf die angiogenetischen Eigenschaften haben. Die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung zeigte allerdings das Gegenteil.

Auch die Supplementierung von rFBLN5 hatte keinen rettenden Effekt auf die angiogenetischen Eigenschaften der *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen. Somit liegt die Schlussfolgerung nahe, dass FBLN5 in der Angiogenese der CCMs keine zentrale Rolle spielt. Des Weiteren gibt es hinreichend Evidenz dafür, dass FBLN5 die Apoptose durch die Expression von MMPs reguliert. Die MMPs stellen einen wichtigen Bestandteil der EZM dar und sind für eine regelrecht verlaufende Angiogenese zuständig (Dye et al. 2004). FBLN5 scheint eine mögliche antagonistische Wirkung auf die Angiogenese durch die Hemmung der MMP-9 zu haben, wodurch zusätzlich die Apoptose induziert wird (Albig & Schiemann 2004). Durch die Arbeit von Bicer et al. (2010) könnte die Vermutung angestellt werden, dass im CCM-Kontext MMP-2 und MMP-9 die für die EZM-Degradation verantwortlichen MMPs sind. Deren Expressionslevel lag höher als in den verglichenen arteriovenösen Malformationen (Bicer et al. 2010). Wenn eine Übertragung dieser Erkenntnisse auf die CCM3-Pathogenese möglich wäre, dann würde die verminderte Expression von *FBLN5* und *TSP-1* zu einer Enthemmung der MMP-9 führen. Hierbei würde es zu einer gesteigerten Angiogenese und einer verringerten Apoptoserate kommen. Wie vorher erwähnt, stimmt die Beobachtung in Bezug auf die Angiogenese nicht überein. Jedoch konnte durch Schwefel et al. (2019) gezeigt werden, dass Endothelzellen nach dem chronischen Verlust von *CCM3* eine verminderte Caspase-3-Aktivität zeigen. Diese gilt als ein Marker der Apoptose. Möglicherweise spielt demnach die Enthemmung der MMP-9 eine Rolle bei der Reduktion der Apoptoserate in *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs und ist mit ursächlich für den Überlebensvorteil der Endothelzellen.

Zum Schluss wurden die Auswirkungen von FBLN5 hinsichtlich Zellmorphologie und Organisation des Aktinzytoskeletts untersucht. Die akute Herunterregulation von FBLN5 zeigte keine Auswirkung auf die untersuchten Zelleigenschaften. Hierdurch ließ sich der besondere Phänotyp von *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen folglich nicht erklären. Schließlich war die Hypothese einer möglichen Rettung des speziellen Phänotyps der CCM3-defizienten Endothelzellen durch die Hinzugabe von rFBLN5 zu überprüfen. Sowohl die Zellmorphologie als auch die Organisation des Aktinzytoskeletts der untersuchten Endothelzellen wurde durch die Substitution von rFBLN5 maßgeblich verändert. In der Hellfeldaufnahme waren die verbreiterten und flächigen Zellleiber der CI-huVECs zu sehen. Zusätzlich zeichneten sich die Zellgrenzen prominenter ab als in der Kontrollkondition. Die Beobachtung stellte einen großen Unterschied zu dem

Erscheinungsbild der *CCM3*$^{+/+}$ Endothelzellen dar. Diese zeichneten sich durch eine spindelige Form mit pflastersteinartiger Anordnung aus. Es lässt sich demnach festhalten, dass rFBLN5 zwar die CCM3-defizienten Endothelzellen beeinflusst, jedoch keine unmittelbare Rettung des Phänotyps darstellte. Das angefärbte Aktinzytoskelett der *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen zeigte nach Behandlung mit rFBLN5 eine gezielte Reorganisation. Die Filamente waren strikt kortikal angeordnet. Diese Beobachtung unterscheidet sich sehr stark von den kleinen kurzen Stressfasern der unbehandelten *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs. Eine mögliche Erklärung dieses auffallend veränderten Phänotyps stellt die Modulation der endothelialen Zelladhäsion dar. FBLN5 nimmt durch seine RGD-Domäne Einfluss auf die Adhäsion (Albig & Schiemann 2005; Nakamura et al. 1999). Nakamura et al. (1999) konnten zeigen, dass die Anhaftung der Zellen an der Oberfläche dosisabhängig durch Integrine vermittelt wird. FBLN5 wird eine brückenbildende Funktion zugeschrieben, wodurch eine verbesserte kurzzeitige Bindung zwischen Integrinen und EZM-Proteinen erzielt wird (Preis et al. 2006). Außerdem ist bekannt, dass eine veränderte Adhäsion zwischen Endothelzellen und der sie umgebenden EZM-Proteine zu einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts führt (Hutchings et al. 2003). Demzufolge ist denkbar, dass rFBLN5 auch in der untersuchten CCM3-Pathogenese die Integrinbindung moduliert, wodurch der veränderte Phänotyp erklärt werden könnte. Jedoch ist dies zum jetzigen Zeitpunkt lediglich eine unbestätigte Hypothese und müsste überprüft werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass FBLN5 keine essentielle Rolle im Rahmen der Angiogenese spielt, jedoch andere Zelleigenschaften wie Adähsion zu modulieren scheint. Deshalb wäre zukünftig interessant herauszufinden, ob und in wie weit veränderte adhäsive Eigenschaften den Phänotyp, die Integrinverteilung auf der Zelloberfläche und die intrazellulären Prozesse von CCM3-defizienten Endothelzellen beeinflussen und welche Bedeutung FBLN5 hierbei hat.

5.2.2. Rettender Einfluss von POSTN auf die angiogenetischen Eigenschaften

POSTN ist ein matrizelluläres Protein dessen Auswirkungen auf Angiogenese und Organisation des Aktinzytoskeletts bisher ausschließlich im Tumorgenesekontext untersucht wurden (Ruan et al. 2009). Die Übertragbarkeit der Vorkenntnisse auf den Kontext der CCM-Pathogenese ist fraglich, jedoch scheint POSTN den Vorgang der

Angiogenese innerhalb von Tumoren essentiell zu beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte die akute Herunterregulation von POSTN weder eine Auswirkung auf die Zellmorphologie noch auf die Organisation des Aktinzytoskeletts. Das bedeutet, dass der für die *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen typische kleine, runde Phänotyp und die gesteigerte Ausbildung von Stressfasern nicht durch die akute Herunterregulation von *POSTN* begründet werden kann. Allerdings sei an der Stelle nochmals auf die möglichen Unterschiede in der Dauer der Herunterregulation hingewiesen, wie es für *CCM3* gezeigt werden konnte (Schwefel et al. 2019). Deshalb ist vorstellbar, dass eine dauerhafte Herunterregulation von *POSTN* womöglich doch Einfluss auf Zellmorphologie und Organisation des Aktinzytoskeletts hat.

Die Hinzugabe von rPOSTN zu *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf die Zellmorphologie oder die Organisation des Aktinzytoskeletts. In *CCM3*$^{+/+}$ Endothelzellen hatte die Substitution von rPOSTN auch keinen Einfluss auf diese Eigenschaften. Die Beobachtung, dass POSTN die Stressfaserproduktion reduziert, wie es im Zusammenhang mit dem epithelialen Ovarialkarzinom gezeigt werden konnte (Gillan et al. 2002), wurde im Kontext der CCM3-Pathogenese nicht bestätigt. Verantwortlich hierfür ist höchstwahrscheinlich ein zelltypspezifischer Effekt. Aufgrund der ausbleibenden Wirkungen lässt sich ableiten, dass POSTN keine Schlüsselrolle in der Modulation von Zellmorphologie und der Reorganisation des Aktinzytoskeletts in Assoziation mit der CCM3-Pathogenese spielt.

Die Auswirkung der akuten Herunterregulation von *POSTN* wurde zusätzlich im *Tube Formation Assay* untersucht. Der initiale Effekt nach 6 Stunden zeigte eine verminderte Ausbildung röhrenartiger Strukturen. Nach 20 Stunden waren noch ähnlich viele Netze wie in der Kontrollkondition ausgebildet. Allerdings zeigten hier die verschiedenen Zellzahlen ein inkongruentes Ergebnis. Dies lässt die Vermutung anstellen, dass die akute Herunterregulation von *POSTN* einen inhibitorischen Effekt auf die initiale Ausbildung röhrenartiger Strukturen und Netze hat, jedoch die Stabilität im Zeitverlauf nicht wesentlich beeinflusst wird. Der inhibitorische Effekt nach Herunterregulation von *POSTN* wurde bereits im Kontext des Pankreastumors beobachtet. In diesem Zusammenhang zeigte eine Herunterregulation von *POSTN* in pankreatischen Sternzellen ein vermindertes Tumorwachstum mit einer geringeren Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen und einer verminderten VEGF-Expression (Liu et al. 2016). Hierdurch lässt sich eine gewisse Parallele zum CCM3-Kontext herstellen.

Im Umkehrschluss lässt sich die Hypothese aufstellen, dass das Vorhandensein von POSTN einen proangiogenen Effekt aufweist. Um in Form eines Rettungsansatzes den Phänotyp der *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen zu verändern, wurden die Auswirkungen von drei Konzentrationen des exogen zugeführten rPOSTN im *Tube Formation Assay* untersucht. Nach 6 Stunden zeigte sich kein Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrollkondition und den mit rPOSTN behandelten Konditionen. Zum zweiten Auswertungszeitpunkt nach 20 Stunden war ein Effekt durch die Substitution von rPOSTN zu erkennen. Alle drei Konzentrationen zeigten im Vergleich zu der unbehandelten Kondition eine höhere Anzahl noch vorhandener Netze, wobei die Substitution von 1 µg/ml und 10 µg/ml rPOSTN statistisch signifikante Ergebnisse erkennen ließ. Im Kontext der Inaktivierung von CCM3 in Endothelzellen bedingte die Hinzugabe von rPOSTN im Zeitverlauf eine gesteigerte Stabilität der gefäßähnlichen Strukturen der CCM3-defizienten Endothelzellen. Dies ist mit einer Rettung des Phänotyps der Endothelzellen gleichzusetzen. Die *CCM3*$^{+/+}$ Endothelzellen hatten nach 20 Stunden im *Tube Formation Assay* im Mittel noch 7 bis 15 Netze ausgebildet. Die *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen hatten im gleichen Zeitraum nach der Hinzugabe von rPOSTN noch 7 bis 18 Netze ausgebildet. Folglich nähert sich die Anzahl noch vorhandener Netze in den CCM3-defizienten Endothelzellen der genetisch unveränderten CI-huVE-Zellen an und auch der prozentuale Zerfall ist nach der Hinzugabe von 10 µg/ml rPOSTN im zeitlichen Verlauf vergleichbar.

Augenscheinlich ist durch die Substitution von rPOSTN der Gesamtprozess der Angiogenese im Verlauf positiv beeinflusst worden. Ein stimulierender Einfluss von rPOSTN auf HUVECs im *Tube Formation Assay* wurde bereits durch Liu et al. (2016) im Tumorgenesekontext gezeigt. Die Autoren beurteilten hier die Anzahl, die Länge und die Intersektionsknoten der tubulären Strukturen, welche nach der Hinzugabe von rPOSTN deutlich erhöht waren. Sie verwendeten ausschließlich die Konzentrationen von 0,5 µg/ml und 1 µg/ml. Eine Testreihe mit 10 µg/ml, wie in dieser Arbeit, wurde damals nicht untersucht. Auf Grundlage ihrer Ergebnisse schlussfolgerten die Autoren eine gesteigerte Angiogenese innerhalb der Tumoren. Vermutlich wird die proangiogene Wirkung von POSTN durch eine erhöhte VEGF-Expression verstärkt (Liu et al. 2016). In der vorliegenden Arbeit konnte eine im Zeitverlauf erhöhte Stabilität der gefäßähnlichen Strukturen festgestellt werden, ein die Angiogenese unmittelbar steigernder Effekt wurde dagegen nicht beobachtet.

Die Literatur geht davon aus, dass POSTN das Überleben von Endothelzellen steigert (Takanami et al. 2008; Zhang et al. 2015; Zhu et al. 2010). Die *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen, in denen *POSTN* herunterreguliert ist, besitzen jedoch bereits einen Überlebensvorteil (Schwefel et al. 2019). Die gesteigerte Stabilität der gefäßähnlichen Strukturen im Rahmen der CCM-Pathogenese scheint somit unabhängig von der überlebens-steigernden Eigenschaft von POSTN zu sein. Analog zu FBLN5 wird auch POSTN im Tumorgenesekontext und in *in vitro* Endothelzellkolonien ein adhäsionssteigernder Effekt zugeschrieben (Gillan et al. 2002; Kim et al. 2014). Die Adhäsion wird über die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ vermittelt (Gillan et al. 2002). Unterstützt werden diese Beobachtungen durch Li et al. (2010a), die in glatten Gefäßmuskelzellen ebenfalls herausfanden, dass POSTN an $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ bindet. Ein die Adhäsion steigernder Effekt wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Unter Umständen spielt jedoch die Modulation der Integrinbindung nach Hinzugabe von rPOSTN eine wichtige Rolle für die gesteigerte Stabilität der Netze im Zeitverlauf. Die Identifikation der an diesen Mechanismen beteiligten Integrine könnte weiteren Aufschluss über die intra- und extrazelluläre Kommunikation bringen. Durch Gonzalez-Gonzalez & Alonso (2018) wird postuliert, dass POSTN eine Schlüsselrolle in der Regulation von Zellverhalten und Organisation der EZM einnimmt. In wie weit diese Annahme auf den CCM-Kontext übertragbar ist muss zukünftig weiter aufgeklärt werden.

Zusammengenommen zeigen die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen zu POSTN, dass die Organisation des Aktinzytoskeletts und die Morphologie durch die Hinzugabe von rPOSTN weitestgehend unbeeinflusst bleiben. Jedoch hat POSTN einen rettenden Einfluss auf einen Teil der angiogenetischen Eigenschaften von *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen. Hieran anschließend scheint es sinnvoll zukünftig die Einflüsse von POSTN im CCM-Kontext auf die Zelladhäsion zu untersuchen.

6. Zusammenfassung

Zerebrale kavernöse Malformationen (CCM) sind maulbeerartige Gefäßfehlbildungen, die sich klinisch in Form von rezidivierenden, migräneartigen Kopfschmerzen, epileptischen Anfällen oder hämorrhagischen Schlaganfällen äußern können. CCMs treten sowohl sporadisch als auch in einer autosomal-dominant erblichen Form auf. Die Prävalenz der symptomatischen erblichen Kavernome liegt bei 1:5400 bis 1:6200. Somit zählen sie zu den seltenen Erkrankungen. Pathogene Varianten in den Genen *CCM1, CCM2* und *CCM3* sind mit der Entstehung der Malformationen assoziiert. Speziell Träger einer pathogenen *CCM3*-Variante zeigen meist ein frühes Manifestationsalter und einen schwerwiegenderen klinischen Krankheitsverlauf.

Durch in der Greifswalder Arbeitsgruppe durchgeführte Transkriptomanalysen von *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs konnten die im Vergleich zu den *CCM3*$^{+/+}$ Zellen neben *FN1* (Fibronektin-1-Gen) am stärksten herunterregulierten Gene *FBLN5* und *POSTN* identifiziert werden. Sie kodieren für Proteine der EZM. In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen der matrizellulären Proteine FBLN5 und POSTN erstmals im Rahmen der CCM3-Pathogenese untersucht. Weder die akute Herunterregulation von *FBLN5* noch die von *POSTN* hatte einen Einfluss auf die Wachstumsmorphologie oder die Organisation des Aktinzytoskeletts. In Bezug auf die Angiogenese führten die akuten Herunterregulationen von *FBLN5* und *POSTN* zu einer verminderten Ausbildung gefäßähnlicher Strukturen. Im nächsten Schritt wurde eine mögliche Rettung des Phänotyps der *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen durch die Hinzugabe der rekombinanten Proteine FBLN5 und POSTN untersucht. Die Addition von rFBLN5 veränderte die Morphologie der Endothelzellen maßgeblich und führte zu einer gezielten Reorganisation des Aktinzytoskeletts. Die Supplementierung von rPOSTN wirkte im Zeitverlauf stabilitätssteigernd auf die gefäßähnlichen Strukturen und hatte einen rettenden Einfluss auf die angiogenetischen Eigenschaften der *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen. In Zusammenschau mit den von Schwefel et al. (2020) publizierten Daten über Fibronektin ist davon auszugehen, dass Bestandteile der EZM eine modulatorische Rolle in der Entstehung von CCMs einnehmen. Allerdings bleibt bisher ungeklärt welche Mechanismen hierbei von Bedeutung sind.

7. Literaturverzeichnis

Akers A, Al-Shahi Salman R, I AA, Dahlem K, Flemming K, Hart B, Kim H, Jusue-Torres I, Kondziolka D, Lee C, Morrison L, Rigamonti D, Rebeiz T, Tournier-Lasserve E, Waggoner D, Whitehead K (2017). Synopsis of Guidelines for the Clinical Management of Cerebral Cavernous Malformations: Consensus Recommendations Based on Systematic Literature Review by the Angioma Alliance Scientific Advisory Board Clinical Experts Panel. Neurosurgery 80(5):665-680.

Albig AR, Schiemann WP (2004). Fibulin-5 antagonizes vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling and angiogenic sprouting by endothelial cells. DNA Cell Biol 23(6):367-379.

Albig AR, Schiemann WP (2005). Fibulin-5 function during tumorigenesis. Future Oncol 1(1):23-35.

Argraves WS, Dickerson K, Burgess WH, Ruoslahti E (1989). Fibulin, a novel protein that interacts with the fibronectin receptor beta subunit cytoplasmic domain. Cell 58(4):623-629.

Argraves WS, Greene LM, Cooley MA, Gallagher WM (2003). Fibulins: physiological and disease perspectives. EMBO Rep 4(12):1127-1131.

Batra S, Lin D, Recinos PF, Zhang J, Rigamonti D (2009). Cavernous malformations: natural history, diagnosis and treatment. Nat Rev Neurol 5(12):659-670.

Baumann CR, Acciarri N, Bertalanffy H, Devinsky O, Elger CE, Lo Russo G, Cossu M, Sure U, Singh A, Stefan H, Hammen T, Georgiadis D, Baumgartner RW, Andermann F, Siegel AM (2007). Seizure outcome after resection of supratentorial cavernous malformations: a study of 168 patients. Epilepsia 48(3):559-563.

Bergametti F, Denier C, Labauge P, Arnoult M, Boetto S, Clanet M, Coubes P, Echenne B, Ibrahim R, Irthum B, Jacquet G, Lonjon M, Moreau JJ, Neau JP, Parker F, Tremoulet M, Tournier-Lasserve E, Societe Francaise de N (2005). Mutations within the programmed cell death 10 gene cause cerebral cavernous malformations. Am J Hum Genet 76(1):42-51.

Bicer A, Guclu B, Ozkan A, Kurtkaya O, Koc DY, Necmettin Pamir M, Kilic T (2010). Expressions of angiogenesis associated matrix metalloproteinases and extracellular matrix proteins in cerebral vascular malformations. J Clin Neurosci 17(2):232-236.

Bonnans C, Chou J, Werb Z (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. Nat Rev Mol Cell Biol 15(12):786-801.

Borikova AL, Dibble CF, Sciaky N, Welch CM, Abell AN, Bencharit S, Johnson GL (2010). Rho kinase inhibition rescues the endothelial cell cerebral cavernous malformation phenotype. J Biol Chem 285(16):11760-11764.

Bornstein P (2000). Matricellular proteins: an overview. Matrix Biol 19(7):555-556.

Bornstein P (2002). Cell-matrix interactions: the view from the outside. Methods Cell Biol 69:7-11.

Bornstein P, Agah A, Kyriakides TR (2004). The role of thrombospondins 1 and 2 in the regulation of cell-matrix interactions, collagen fibril formation, and the response to injury. Int J Biochem Cell Biol 36(6):1115-1125.

Bornstein P, Sage EH (2002). Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. Curr Opin Cell Biol 14(5):608-616.

Brooks PC (1996). Role of integrins in angiogenesis. Eur J Cancer 32A(14):2423-2429.

Carmeliet P (2002). Integrin indecision. Nat Med 8(1):14-16.
Carmeliet P, Collen D (2000). Molecular basis of angiogenesis. Role of VEGF and VE-cadherin. Ann N Y Acad Sci 902:249-264.
Carmeliet P, Jain RK (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature 407(6801):249-257.
Cavalcanti DD, Kalani MY, Martirosyan NL, Eales J, Spetzler RF, Preul MC (2012). Cerebral cavernous malformations: from genes to proteins to disease. J Neurosurg 116(1):122-132.
Chapman SL, Sicot FX, Davis EC, Huang J, Sasaki T, Chu ML, Yanagisawa H (2010). Fibulin-2 and fibulin-5 cooperatively function to form the internal elastic lamina and protect from vascular injury. Arterioscler Thromb Vasc Biol 30(1):68-74.
Chen L, Tanriover G, Yano H, Friedlander R, Louvi A, Gunel M (2009). Apoptotic functions of *PDCD10/CCM3*, the gene mutated in cerebral cavernous malformation 3. Stroke 40(4):1474-1481.
Chu ML, Tsuda T (2004). Fibulins in development and heritable disease. Birth Defects Res C Embryo Today 72(1):25-36.
Clatterbuck RE, Eberhart CG, Crain BJ, Rigamonti D (2001). Ultrastructural and immunocytochemical evidence that an incompetent blood-brain barrier is related to the pathophysiology of cavernous malformations. J Neurol Neurosurg Psychiatry 71(2):188-192.
Daub JT, Merks RM (2013). A cell-based model of extracellular-matrix-guided endothelial cell migration during angiogenesis. Bull Math Biol 75(8):1377-1399.
Denier C, Labauge P, Bergametti F, Marchelli F, Riant F, Arnoult M, Maciazek J, Vicaut E, Brunereau L, Tournier-Lasserve E, Societe Francaise de N (2006). Genotype-phenotype correlations in cerebral cavernous malformations patients. Ann Neurol 60(5):550-556.
Detter MR, Snellings DA, Marchuk DA (2018). Cerebral Cavernous Malformations Develop Through Clonal Expansion of Mutant Endothelial Cells. Circ Res 123(10):1143-1151.
Draheim KM, Fisher OS, Boggon TJ, Calderwood DA (2014). Cerebral cavernous malformation proteins at a glance. J Cell Sci 127(Pt 4):701-707.
Draheim KM, Li X, Zhang R, Fisher OS, Villari G, Boggon TJ, Calderwood DA (2015). CCM2-CCM3 interaction stabilizes their protein expression and permits endothelial network formation. J Cell Biol 208(7):987-1001.
Dye J, Lawrence L, Linge C, Leach L, Firth J, Clark P (2004). Distinct patterns of microvascular endothelial cell morphology are determined by extracellular matrix composition. Endothelium 11(3-4):151-167.
Faurobert E, Albiges-Rizo C (2010). Recent insights into cerebral cavernous malformations: a complex jigsaw puzzle under construction. FEBS J 277(5):1084-1096.
Faurobert E, Rome C, Lisowska J, Manet-Dupe S, Boulday G, Malbouyres M, Balland M, Bouin AP, Keramidas M, Bouvard D, Coll JL, Ruggiero F, Tournier-Lasserve E, Albiges-Rizo C (2013). CCM1-ICAP-1 complex controls beta1 integrin-dependent endothelial contractility and fibronectin remodeling. J Cell Biol 202(3):545-561.
Felbor U, Sure U, Grimm T, Bertalanffy H (2006). Genetics of cerebral cavernous angioma. Zentralbl Neurochir 67(3):110-116.
Fidalgo M, Fraile M, Pires A, Force T, Pombo C, Zalvide J (2010). CCM3/PDCD10 stabilizes GCKIII proteins to promote Golgi assembly and cell orientation. J Cell Sci 123(Pt 8):1274-1284.

Fischer A, Zalvide J, Faurobert E, Albiges-Rizo C, Tournier-Lasserve E (2013). Cerebral cavernous malformations: from CCM genes to endothelial cell homeostasis. Trends Mol Med 19(5):302-308.

Fisher OS, Boggon TJ (2014). Signaling pathways and the cerebral cavernous malformations proteins: lessons from structural biology. Cell Mol Life Sci 71(10):1881-1892.

Fishman AP (1982). Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities. Ann N Y Acad Sci 401:1-8.

Gault J, Sarin H, Awadallah NA, Shenkar R, Awad IA (2004). Pathobiology of human cerebrovascular malformations: basic mechanisms and clinical relevance. Neurosurgery 55(1):1-17.

Giancotti FG, Ruoslahti E (1999). Integrin signaling. Science 285(5430):1028-1032.

Gillan L, Matei D, Fishman DA, Gerbin CS, Karlan BY, Chang DD (2002). Periostin secreted by epithelial ovarian carcinoma is a ligand for alpha(V)beta(3) and alpha(V)beta(5) integrins and promotes cell motility. Cancer Res 62(18):5358-5364.

Glading A, Han J, Stockton RA, Ginsberg MH (2007). KRIT-1/CCM1 is a Rap1 effector that regulates endothelial cell cell junctions. J Cell Biol 179(2):247-254.

Gonzalez-Gonzalez L, Alonso J (2018). Periostin: A Matricellular Protein With Multiple Functions in Cancer Development and Progression. Front Oncol 8:225.

Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, Le Beau MM, Lemons RS, Frazier WA, Bouck NP (1990). A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. Proc Natl Acad Sci U S A 87(17):6624-6628.

Goudreault M, D'Ambrosio LM, Kean MJ, Mullin MJ, Larsen BG, Sanchez A, Chaudhry S, Chen GI, Sicheri F, Nesvizhskii AI, Aebersold R, Raught B, Gingras AC (2009). A PP2A phosphatase high density interaction network identifies a novel striatin-interacting phosphatase and kinase complex linked to the cerebral cavernous malformation 3 (CCM3) protein. Mol Cell Proteomics 8(1):157-171.

Guerrero A, Iglesias C, Raguz S, Floridia E, Gil J, Pombo CM, Zalvide J (2015). The cerebral cavernous malformation 3 gene is necessary for senescence induction. Aging Cell 14(2):274-283.

Guo J, Cheng C, Chen CS, Xing X, Xu G, Feng J, Qin X (2016). Overexpression of Fibulin-5 Attenuates Ischemia/Reperfusion Injury After Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. Mol Neurobiol 53(5):3154-3167.

Hakuno D, Kimura N, Yoshioka M, Mukai M, Kimura T, Okada Y, Yozu R, Shukunami C, Hiraki Y, Kudo A, Ogawa S, Fukuda K (2010). Periostin advances atherosclerotic and rheumatic cardiac valve degeneration by inducing angiogenesis and MMP production in humans and rodents. J Clin Invest 120(7):2292-2306.

Hamilton DW (2008). Functional role of periostin in development and wound repair: implications for connective tissue disease. J Cell Commun Signal 2(1-2):9-17.

He Y, Zhang H, Yu L, Gunel M, Boggon TJ, Chen H, Min W (2010). Stabilization of VEGFR2 signaling by cerebral cavernous malformation 3 is critical for vascular development. Sci Signal 3(116):ra26.

Hilder TL, Malone MH, Bencharit S, Colicelli J, Haystead TA, Johnson GL, Wu CC (2007). Proteomic identification of the cerebral cavernous malformation signaling complex. J Proteome Res 6(11):4343-4355.

Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, Takamatsu H, Katsuura M, Ozawa H, Toyama Y, Bonewald LF, Kudo A (1999). Identification and characterization of a novel

protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta. J Bone Miner Res 14(7):1239-1249.

Hutchings H, Ortega N, Plouet J (2003). Extracellular matrix-bound vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell adhesion, migration, and survival through integrin ligation. FASEB J 17(11):1520-1522.

Huveneers S, Daemen MJ, Hordijk PL (2015). Between Rho(k) and a hard place: the relation between vessel wall stiffness, endothelial contractility, and cardiovascular disease. Circ Res 116(5):895-908.

Huveneers S, Danen EH (2009). Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. J Cell Sci 122(Pt 8):1059-1069.

Hynes RO (2002). A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. Nat Med 8(9):918-921.

Hynes RO (2007). Cell-matrix adhesion in vascular development. J Thromb Haemost 5 Suppl 1:32-40.

Hynes RO (2009). The extracellular matrix: not just pretty fibrils. Science 326(5957):1216-1219.

Hynes RO, Naba A (2012). Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. Cold Spring Harb Perspect Biol 4(1):a004903.

Kean MJ, Ceccarelli DF, Goudreault M, Sanches M, Tate S, Larsen B, Gibson LC, Derry WB, Scott IC, Pelletier L, Baillie GS, Sicheri F, Gingras AC (2011). Structure-function analysis of core STRIPAK Proteins: a signaling complex implicated in Golgi polarization. J Biol Chem 286(28):25065-25075.

Kim BR, Jang IH, Shin SH, Kwon YW, Heo SC, Choi EJ, Lee JS, Kim JH (2014). Therapeutic angiogenesis in a murine model of limb ischemia by recombinant periostin and its fasciclin I domain. Biochim Biophys Acta 1842(9):1324-1332.

Kim BR, Kwon YW, Park GT, Choi EJ, Seo JK, Jang IH, Kim SC, Ko HC, Lee SC, Kim JH (2017). Identification of a novel angiogenic peptide from periostin. PLoS One 12(11):e0187464.

Kim CJ, Yoshioka N, Tambe Y, Kushima R, Okada Y, Inoue H (2005). Periostin is down-regulated in high grade human bladder cancers and suppresses in vitro cell invasiveness and in vivo metastasis of cancer cells. Int J Cancer 117(1):51-58.

Klagsbrun M, D'Amore PA (1991). Regulators of angiogenesis. Annu Rev Physiol 53:217-239.

Kowal RC, Richardson JA, Miano JM, Olson EN (1999). EVEC, a novel epidermal growth factor-like repeat-containing protein upregulated in embryonic and diseased adult vasculature. Circ Res 84(10):1166-1176.

Kuang PP, Goldstein RH, Liu Y, Rishikof DC, Jean JC, Joyce-Brady M (2003). Coordinate expression of fibulin-5/DANCE and elastin during lung injury repair. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 285(5):1147-1152.

Kuang PP, Joyce-Brady M, Zhang XH, Jean JC, Goldstein RH (2006). Fibulin-5 gene expression in human lung fibroblasts is regulated by TGF-beta and phosphatidylinositol 3-kinase activity. Am J Physiol Cell Physiol 291(6):1412-1421.

Labauge P, Denier C, Bergametti F, Tournier-Lasserve E (2007). Genetics of cavernous angiomas. Lancet Neurol 6(3):237-244.

Labauge P, Laberge S, Brunereau L, Levy C, Tournier-Lasserve E (1998). Hereditary cerebral cavernous angiomas: clinical and genetic features in 57 French families. Societe Francaise de Neurochirurgie. Lancet 352(9144):1892-1897.

Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J (2007). Endothelial cell migration during angiogenesis. Circ Res 100(6):782-794.

Li G, Jin R, Norris RA, Zhang L, Yu S, Wu F, Markwald RR, Nanda A, Conway SJ, Smyth SS, Granger DN (2010a). Periostin mediates vascular smooth muscle cell migration through the integrins alphavbeta3 and alphavbeta5 and focal adhesion kinase (FAK) pathway. Atherosclerosis 208(2):358-365.

Li X, Zhang R, Zhang H, He Y, Ji W, Min W, Boggon TJ (2010b). Crystal structure of CCM3, a cerebral cavernous malformation protein critical for vascular integrity. J Biol Chem 285(31):24099-24107.

Liu Y, Li F, Gao F, Xing L, Qin P, Liang X, Zhang J, Qiao X, Lin L, Zhao Q, Du L (2016). Periostin promotes tumor angiogenesis in pancreatic cancer via Erk/VEGF signaling. Oncotarget 7(26):40148-40159.

Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z (2011). Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol 3(12).

Lu TJ, Lai WY, Huang CY, Hsieh WJ, Yu JS, Hsieh YJ, Chang WT, Leu TH, Chang WC, Chuang WJ, Tang MJ, Chen TY, Lu TL, Lai MD (2006). Inhibition of cell migration by autophosphorylated mammalian sterile 20-like kinase 3 (MST3) involves paxillin and protein-tyrosine phosphatase-PEST. J Biol Chem 281(50):38405-38417.

Ma X, Zhao H, Shan J, Long F, Chen Y, Chen Y, Zhang Y, Han X, Ma D (2007). PDCD10 interacts with Ste20-related kinase MST4 to promote cell growth and transformation via modulation of the ERK pathway. Mol Biol Cell 18(6):1965-1978.

Maldonado V, Meléndez-Zajgla J. 2007. A modified method for cloning adherent mammalian cells. Bioquimia. p. 70-72.

Malinverno M, Maderna C, Abu Taha A, Corada M, Orsenigo F, Valentino M, Pisati F, Fusco C, Graziano P, Giannotta M, Yu QC, Zeng YA, Lampugnani MG, Magnusson PU, Dejana E (2019). Endothelial cell clonal expansion in the development of cerebral cavernous malformations. Nat Commun 10(1):2761.

Manders DB, Kishore HA, Gazdar AF, Keller PW, Tsunezumi J, Yanagisawa H, Lea J, Word RA (2018). Dysregulation of fibulin-5 and matrix metalloproteases in epithelial ovarian cancer. Oncotarget 9(18):14251-14267.

Merello E, Pavanello M, Consales A, Mascelli S, Raso A, Accogli A, Cama A, Valeria C, De Marco P (2016). Genetic Screening of Pediatric Cavernous Malformations. J Mol Neurosci 60(2):232-238.

Nakamura T, Lozano PR, Ikeda Y, Iwanaga Y, Hinek A, Minamisawa S, Cheng CF, Kobuke K, Dalton N, Takada Y, Tashiro K, Ross J, Jr., Honjo T, Chien KR (2002). Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis *in vivo*. Nature 415(6868):171-175.

Nakamura T, Ruiz-Lozano P, Lindner V, Yabe D, Taniwaki M, Furukawa Y, Kobuke K, Tashiro K, Lu Z, Andon NL, Schaub R, Matsumori A, Sasayama S, Chien KR, Honjo T (1999). DANCE, a novel secreted RGD protein expressed in developing, atherosclerotic, and balloon-injured arteries. J Biol Chem 274(32):22476-22483.

Nakazawa T, Nakajima A, Seki N, Okawa A, Kato M, Moriya H, Amizuka N, Einhorn TA, Yamazaki M (2004). Gene expression of periostin in the early stage of

fracture healing detected by cDNA microarray analysis. J Orthop Res 22(3):520-525.

Nogueira E, Fidalgo M, Molnar A, Kyriakis J, Force T, Zalvide J, Pombo CM (2008). SOK1 translocates from the Golgi to the nucleus upon chemical anoxia and induces apoptotic cell death. J Biol Chem 283(23):16248-16258.

Norris RA, Borg TK, Butcher JT, Baudino TA, Banerjee I, Markwald RR (2008). Neonatal and adult cardiovascular pathophysiological remodeling and repair: developmental role of periostin. Ann N Y Acad Sci 1123:30-40.

Pardridge WM (1999). Blood-brain barrier biology and methodology. J Neurovirol 5(6):556-569.

Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R (1992). Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis *in vitro*. Biochem Biophys Res Commun 189(2):824-831.

Ponce ML (2009). Tube formation: An *In Vitro* Matrigel Angiogenesis Assay. Methods Mol Biol 467:183-188.

Porter PJ, Willinsky RA, Harper W, Wallace MC (1997). Cerebral cavernous malformations: natural history and prognosis after clinical deterioration with or without hemorrhage. J Neurosurg 87(2):190-197.

Preis M, Cohen T, Sarnatzki Y, Ben Yosef Y, Schneiderman J, Gluzman Z, Koren B, Lewis BS, Shaul Y, Flugelman MY (2006). Effects of fibulin-5 on attachment, adhesion, and proliferation of primary human endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 348(3):1024-1033.

Preisinger C, Short B, De Corte V, Bruyneel E, Haas A, Kopajtich R, Gettemans J, Barr FA (2004). YSK1 is activated by the Golgi matrix protein GM130 and plays a role in cell migration through its substrate 14-3-3zeta. J Cell Biol 164(7):1009-1020.

Raines EW (2000). The extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and survival: relationships to vascular disease. Int J Exp Pathol 81(3):173-182.

Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X (2013). An improvement of the 2^(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. Biostat Bioinforma Biomath 3(3):71-85.

Rath M, Pagenstecher A, Hoischen A, Felbor U (2020). Postzygotic mosaicism in cerebral cavernous malformation. J Med Genet 57(3):212-216.

Riant F, Bergametti F, Ayrignac X, Boulday G, Tournier-Lasserve E (2010). Recent insights into cerebral cavernous malformations: the molecular genetics of CCM. FEBS J 277(5):1070-1075.

Riant F, Bergametti F, Fournier HD, Chapon F, Michalak-Provost S, Cecillon M, Lejeune P, Hosseini H, Choe C, Orth M, Bernreuther C, Boulday G, Denier C, Labauge P, Tournier-Lasserve E (2013). *CCM3* Mutations Are Associated with Early-Onset Cerebral Hemorrhage and Multiple Meningiomas. Mol Syndromol 4(4):165-172.

Rigamonti D, Drayer BP, Johnson PC, Hadley MN, Zabramski J, Spetzler RF (1987). The MRI appearance of cavernous malformations (angiomas). J Neurosurg 67(4):518-524.

Rigamonti D, Hadley MN, Drayer BP, Johnson PC, Hoenig-Rigamonti K, Knight JT, Spetzler RF (1988). Cerebral cavernous malformations. Incidence and familial occurrence. N Engl J Med 319(6):343-347.

Rodriguez-Manzaneque JC, Lane TF, Ortega MA, Hynes RO, Lawler J, Iruela-Arispe ML (2001). Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. Proc Natl Acad Sci U S A 98(22):12485-12490.

Ruan K, Bao S, Ouyang G (2009). The multifaceted role of periostin in tumorigenesis. Cell Mol Life Sci 66(14):2219-2230.

Rundhaug JE (2005). Matrix metalloproteinases and angiogenesis. J Cell Mol Med 9(2):267-285.

Ruoslahti E, Pierschbacher MD (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. Science 238(4826):491-497.

Sage EH, Bornstein P (1991). Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. SPARC, tenascin, and thrombospondin. J Biol Chem 266(23):14831-14834.

Schiemann WP, Blobe GC, Kalume DE, Pandey A, Lodish HF (2002). Context-specific effects of fibulin-5 (DANCE/EVEC) on cell proliferation, motility, and invasion. Fibulin-5 is induced by transforming growth factor-beta and affects protein kinase cascades. J Biol Chem 277(30):27367-27377.

Schleider E, Stahl S, Wustehube J, Walter U, Fischer A, Felbor U (2011). Evidence for anti-angiogenic and pro-survival functions of the cerebral cavernous malformation protein 3. Neurogenetics 12(1):83-86.

Schluterman MK, Chapman SL, Korpanty G, Ozumi K, Fukai T, Yanagisawa H, Brekken RA (2010). Loss of fibulin-5 binding to beta1 integrins inhibits tumor growth by increasing the level of ROS. Dis Model Mech 3(5-6):333-342.

Schneider H, Errede M, Ulrich NH, Virgintino D, Frei K, Bertalanffy H (2011). Impairment of tight junctions and glucose transport in endothelial cells of human cerebral cavernous malformations. J Neuropathol Exp Neurol 70(6):417-429.

Schwefel K, Spiegler S, Ameling S, Much CD, Pilz RA, Otto O, Völker U, Felbor U, Rath M (2019). Biallelic *CCM3* mutations cause a clonogenic survival advantage and endothelial cell stiffening. J Cell Mol Med 23(3):1771-1783.

Schwefel K, Spiegler S, Kirchmaier BC, Dellweg PKE, Much CD, Pane-Farre J, Strom TM, Riedel K, Felbor U, Rath M (2020). Fibronectin rescues aberrant phenotype of endothelial cells lacking either CCM1, CCM2 or CCM3. FASEB J.

Senger DR, Davis GE (2011). Angiogenesis. Cold Spring Harb Perspect Biol 3(8):a005090.

Shao R, Bao S, Bai X, Blanchette C, Anderson RM, Dang T, Gishizky ML, Marks JR, Wang XF (2004). Acquired expression of periostin by human breast cancers promotes tumor angiogenesis through up-regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2 expression. Mol Cell Biol 24(9):3992-4003.

Shenkar R, Shi C, Rebeiz T, Stockton RA, McDonald DA, Mikati AG, Zhang L, Austin C, Akers AL, Gallione CJ, Rorrer A, Gunel M, Min W, De Souza JM, Lee C, Marchuk DA, Awad IA (2015). Exceptional aggressiveness of cerebral cavernous malformation disease associated with *PDCD10* mutations. Genet Med 17(3):188-196.

Shi XY, Wang L, Cao CH, Li ZY, Chen J, Li C (2014). Effect of Fibulin-5 on cell proliferation and invasion in human gastric cancer patients. Asian Pac J Trop Med 7(10):787-791.

Siegel AM, Bertalanffy H, Dichgans JJ, Elger CE, Hopf H, Hopf N, Keidel M, Kleider A, Nowak G, Pfeiffer RA, Schramm J, Spuck S, Stefan H, Sure U, Baumann CR, Rouleau GA, Verlaan DJ, Andermann E, Andermann F (2005). [Familial

cavernous malformations of the central nervous system. A clinical and genetic study of 15 German families]. Nervenarzt 76(2):175-180.

Siriwardena BS, Kudo Y, Ogawa I, Kitagawa M, Kitajima S, Hatano H, Tilakaratne WM, Miyauchi M, Takata T (2006). Periostin is frequently overexpressed and enhances invasion and angiogenesis in oral cancer. Br J Cancer 95(10):1396-1403.

Sottile J (2004). Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. Biochim Biophys Acta 1654(1):13-22.

Spiegler S, Najm J, Liu J, Gkalympoudis S, Schröder W, Borck G, Brockmann K, Elbracht M, Fauth C, Ferbert A, Freudenberg L, Grasshoff U, Hellenbroich Y, Henn W, Hoffjan S, Huning I, Korenke GC, Kroisel PM, Kunstmann E, Mair M, Munk-Schulenburg S, Nikoubashman O, Pauli S, Rudnik-Schoneborn S, Sudholt I, Sure U, Tinschert S, Wiednig M, Zoll B, Ginsberg MH, Felbor U (2014). High mutation detection rates in cerebral cavernous malformation upon stringent inclusion criteria: one-third of probands are minors. Mol Genet Genomic Med 2(2):176-185.

Spiegler S, Rath M, Much CD, Sendtner BS, Felbor U (2019). Precise CCM1 gene correction and inactivation in patient-derived endothelial cells: Modeling Knudson's two-hit hypothesis in vitro. Mol Genet Genomic Med 7(7):e00755.

Spiegler S, Rath M, Paperlein C, Felbor U (2018). Cerebral Cavernous Malformations: An Update on Prevalence, Molecular Genetic Analyses, and Genetic Counselling. Mol Syndromol 9(2):60-69.

Stahl S, Gaetzner S, Voss K, Brackertz B, Schleider E, Sürücü O, Kunze E, Netzer C, Korenke C, Finckh U, Habek M, Poljakovic Z, Elbracht M, Rudnik-Schoneborn S, Bertalanffy H, Sure U, Felbor U (2008). Novel *CCM1, CCM2,* and *CCM3* mutations in patients with cerebral cavernous malformations: in-frame deletion in *CCM2* prevents formation of a CCM1/CCM2/CCM3 protein complex. Hum Mutat 29(5):709-717.

Tai IT, Dai M, Chen LB (2005). Periostin induction in tumor cell line explants and inhibition of in vitro cell growth by anti-periostin antibodies. Carcinogenesis 26(5):908-915.

Takanami I, Abiko T, Koizumi S (2008). Expression of periostin in patients with non-small cell lung cancer: correlation with angiogenesis and lymphangiogenesis. Int J Biol Markers 23(3):182-186.

Takeshita S, Kikuno R, Tezuka K, Amann E (1993). Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. Biochem J 294 (Pt 1):271-278.

Tanriover G, Sozen B, Seker A, Kilic T, Gunel M, Demir N (2013). Ultrastructural analysis of vascular features in cerebral cavernous malformations. Clin Neurol Neurosurg 115(4):438-444.

Voss K, Stahl S, Schleider E, Ullrich S, Nickel J, Mueller TD, Felbor U (2007). CCM3 interacts with CCM2 indicating common pathogenesis for cerebral cavernous malformations. Neurogenetics 8(4):249-256.

Wang CC, Liu A, Zhang JT, Sun B, Zhao YL (2003). Surgical management of brain-stem cavernous malformations: report of 137 cases. Surg Neurol 59(6):444-454.

Wong JH, Awad IA, Kim JH (2000). Ultrastructural pathological features of cerebrovascular malformations: a preliminary report. Neurosurgery 46(6):1454-1459.

Xu X, Wang X, Zhang Y, Wang DC, Ding J (2013). Structural basis for the unique heterodimeric assembly between cerebral cavernous malformation 3 and germinal center kinase III. Structure 21(6):1059-1066.

Yan W, Shao R (2006). Transduction of a mesenchyme-specific gene periostin into 293T cells induces cell invasive activity through epithelial-mesenchymal transformation. J Biol Chem 281(28):19700-19708.

Yanagisawa H, Davis EC, Starcher BC, Ouchi T, Yanagisawa M, Richardson JA, Olson EN (2002). Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo. Nature 415(6868):168-171.

Yanagisawa H, Schluterman MK, Brekken RA (2009). Fibulin-5, an integrin-binding matricellular protein: its function in development and disease. J Cell Commun Signal 3(3-4):337-347.

You C, Sandalcioglu IE, Dammann P, Felbor U, Sure U, Zhu Y (2013). Loss of CCM3 impairs DLL4-Notch signalling: implication in endothelial angiogenesis and in inherited cerebral cavernous malformations. J Cell Mol Med 17(3):407-418.

Young WC, Herman IM (1985). Extracellular matrix modulation of endothelial cell shape and motility following injury in vitro. J Cell Sci 73:19-32.

Zabramski JM, Wascher TM, Spetzler RF, Johnson B, Golfinos J, Drayer BP, Brown B, Rigamonti D, Brown G (1994). The natural history of familial cavernous malformations: results of an ongoing study. J Neurosurg 80(3):422-432.

Zhang Z, Nie F, Chen X, Qin Z, Kang C, Chen B, Ma J, Pan B, Ma Y (2015). Upregulated periostin promotes angiogenesis in keloids through activation of the ERK 1/2 and focal adhesion kinase pathways, as well as the upregulated expression of VEGF and angiopoietin1. Mol Med Rep 11(2):857-864.

Zheng Q, Choi J, Rouleau L, Leask RL, Richardson JA, Davis EC, Yanagisawa H (2006). Normal wound healing in mice deficient for fibulin-5, an elastin binding protein essential for dermal elastic fiber assembly. J Invest Dermatol 126(12):2707-2714.

Zheng X, Xu C, Di Lorenzo A, Kleaveland B, Zou Z, Seiler C, Chen M, Cheng L, Xiao J, He J, Pack MA, Sessa WC, Kahn ML (2010). CCM3 signaling through sterile 20-like kinases plays an essential role during zebrafish cardiovascular development and cerebral cavernous malformations. J Clin Invest 120(8):2795-2804.

Zhou HJ, Qin L, Zhang H, Tang W, Ji W, He Y, Liang X, Wang Z, Yuan Q, Vortmeyer A, Toomre D, Fuh G, Yan M, Kluger MS, Wu D, Min W (2016). Erratum: Endothelial exocytosis of angiopoietin-2 resulting from CCM3 deficiency contributes to cerebral cavernous malformation. Nat Med 22(12):1502.

Zhu M, Fejzo MS, Anderson L, Dering J, Ginther C, Ramos L, Gasson JC, Karlan BY, Slamon DJ (2010). Periostin promotes ovarian cancer angiogenesis and metastasis. Gynecol Oncol 119(2):337-344.

8. Anhang

8.1. Trypsin hat keinen Einfluss auf die relative mRNA-Expression von *FBLN5* bzw. *POSTN*

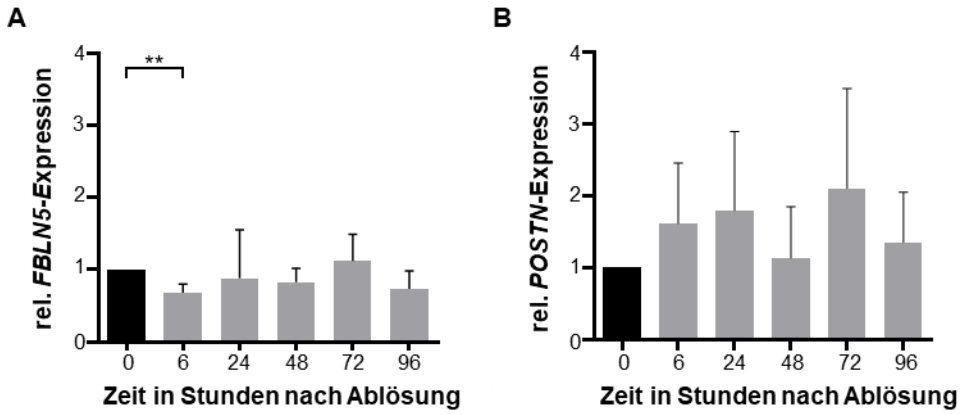

Abbildung 13: Relative *FBLN5*- bzw. *POSTN*-Expression im Zeitverlauf nach Ablösen mittels Trypsin (n=4). Fragestellung: hat der Zeitpunkt des Ablösens der Zellen nach Aussaat eine Auswirkung auf die relative Genexpression der EZM-Proteine; Ablösen der Zellen nach 6, 24, 48, 72 und 96 Stunden mittels Trypsin, Messung der relativen mRNA-Expression, Normalisierung der Werte auf das Expressionslevel unmittelbar nach Aussaat (0 Stunden). **A** relative *FBLN5*-Expression im Zeitverlauf nach Ablösen mittels Trypsin; **B** relative *POSTN*-Expression im Zeitverlauf nach Ablösen mittels Trypsin.

8.2. Etablierung der siRNA-Transfektion gegen *FBLN5* und *POSTN*

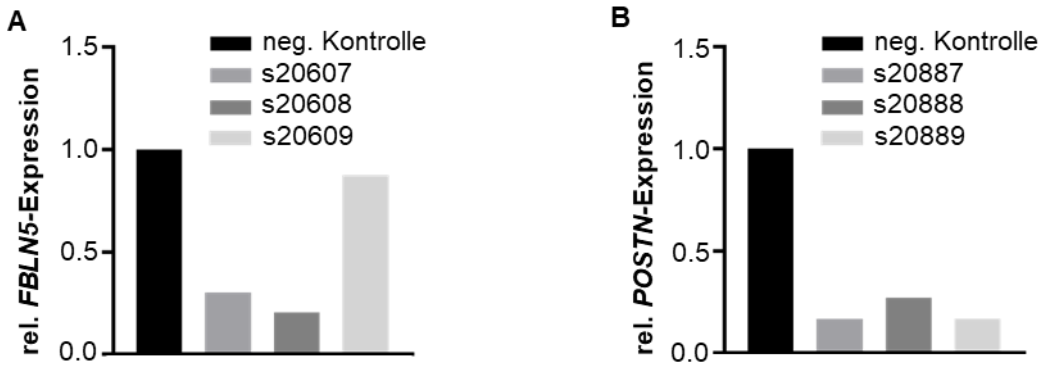

Abbildung 14: Etablierung siRNA-Transfektion gegen *FBLN5* bzw. *POSTN*. Anhand der ursprünglichen Expression wurden die Effizienzen der Herunterregulation gemessen. **A** siRNAs gegen *FBLN5* (Doppeltransfektion), s20608 zeigte größte Effizienz, Herunterregulation auf 20,4 % der ursprünglichen Expression; **B** siRNAs gegen *POSTN* (Einfachtransfektion), Effizienzen der siRNAs s20887 und s20889 waren mit 16,8 % der ursprünglich gemessenen Expression identisch. Nachfolgend wurden die siRNA s20608 gegen *FBLN5* und die siRNA s20887 gegen *POSTN* verwendet.

8.3. Publikation

Schwefel K et al., The FASEB Journal 2020

Schwefel K, Spiegler S, Kirchmaier BC, Dellweg PKE, Much CD, Pané-Farré J, Strom TM, Riedel K, Felbor U, Rath M: Fibronectin rescues aberrant phenotype of endothelial cells lacking either CCM1, CCM2 or CCM3. The FASEB Journal. 2020;34:9018-9033

Copyright:

Copyright (2020) The authors. The FASEB Journal published by Wiley Periodicals LLC on behalf of Federation of American Societies for Experimental Biology. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). No changes were made.

Eigenanteil:

Die Experimente wurden vorwiegend durch KS, SSp, CDM und PKED durchgeführt. KS, BCK, UF und MR konzipierten die Studie. Die experimentellen Arbeiten und Analysen erfolgten unter Leitung von MR, KR und UF. Die Daten wurden von KS, SSp, PKED, BCK und TMS analysiert. KS, SSp, PKED und JPF führten die Mikroskopiexperimente durch. Alle Autoren waren an der Interpretation der Ergebnisse beteiligt. KS, UF und MR konzipierten das Manuskript und alle Autoren beteiligten sich an dessen finaler Durchsicht.

Received: 14 November 2019 | Revised: 17 March 2020 | Accepted: 8 April 2020

DOI: 10.1096/fj.201902888R

RESEARCH ARTICLE

THE FASEB JOURNAL

Fibronectin rescues aberrant phenotype of endothelial cells lacking either CCM1, CCM2 or CCM3

Konrad Schwefel[1,2] | Stefanie Spiegler[1,2] | Bettina C. Kirchmaier[3,4] | Patricia K. E. Dellweg[1,2] | Christiane D. Much[1,2] | Jan Pané-Farré[5] | Tim M. Strom[6,7] | Katharina Riedel[5] | Ute Felbor[1,2] | Matthias Rath[1,2]

[1]Department of Human Genetics, University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany

[2]Interfaculty Institute of Genetics and Functional Genomics, University of Greifswald, Greifswald, Germany

[3]Institute of Cell Biology and Neuroscience, University of Frankfurt, Frankfurt am Main, Germany

[4]Buchmann Institute for Molecular Life Sciences, University of Frankfurt, Frankfurt am Main, Germany

[5]Department of Microbial Physiology and Molecular Biology, Institute of Microbiology, University of Greifswald, Greifswald, Germany

[6]Institute of Human Genetics, Technische Universität München, Munich, Germany

[7]Institute of Human Genetics, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Germany

Correspondence
Matthias Rath, Department of Human Genetics, University Medicine Greifswald, Fleischmannstraße 43, Greifswald D-17475, Germany.
Email: matthias.rath@med.uni-greifswald.de

Present address
Jan Pané-Farré, Center for synthetic Microbiology (SYNMIKRO) and Department of Chemistry, Philipps University Marburg, Marburg, Germany

Funding information
Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), Grant/Award Number: DFG RA2876/2-2; Research Network Molecular Medicine of the University Medicine Greifswald, Grant/Award Number: FOVB-2019-01; Gerhard Domagk program of the University Medicine Greifswald

Abstract

Loss-of-function variants in *CCM1/KRIT1*, *CCM2*, and *CCM3/PDCD10* are associated with autosomal dominant cerebral cavernous malformations (CCMs). CRISPR/Cas9-mediated CCM3 inactivation in human endothelial cells (ECs) has been shown to induce profound defects in cell-cell interaction as well as actin cytoskeleton organization. We here show that CCM3 inactivation impairs fibronectin expression and consequently leads to reduced fibers in the extracellular matrix. Despite the complexity and high molecular weight of fibronectin fibrils, our in vitro model allowed us to reveal that fibronectin supplementation restored aberrant spheroid formation as well as altered EC morphology, and suppressed actin stress fiber formation. Yet, fibronectin replacement neither enhanced the stability of tube-like structures nor inhibited the survival advantage of *CCM3*$^{-/-}$ ECs. Importantly, CRISPR/Cas9-mediated introduction of biallelic loss-of-function variants into either *CCM1* or *CCM2* demonstrated that the impaired production of a functional fibronectin matrix is a common feature of CCM1-, CCM2-, and CCM3-deficient ECs.

KEYWORDS

cerebral cavernous malformations, CRISPR/Cas9 genome editing, extracellular matrix

Abbreviations: CCM, cerebral cavernous malformation; CI-huVECs, immortalized human umbilical vein endothelial cells from InSCREENeX; DOC, deoxycholate; EC, endothelial cell; ECM, extracellular matrix; EDA, extra domain A; EDB, extra domain B; FAK, focal adhesion kinase; FC, fold change; FDR, false discovery rate; RNP, ribonucleoprotein.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.
© 2020 The Authors. *The FASEB Journal* published by Wiley Periodicals LLC on behalf of Federation of American Societies for Experimental Biology

1 | INTRODUCTION

Cerebral cavernous malformations (CCMs) belong to the most common cerebrovascular lesions and can be found in the brain and spinal cord. They are characterized by tightly packed convolutes of low-flow leaky vessels that are lined by a single layer of endothelial cells (ECs), lack supporting elastic fibers or vascular smooth muscle cells in their walls, and tend to bleed into the surrounding brain tissue.[1-4] CCM can occur in a sporadic or autosomal-dominant familial form (OMIM: 116860, 603284, 603285). The latter often presents with multiple CCMs at a younger age. Protein-truncating variants in either *CCM1* [also known as *KRIT1*[5,6]], *CCM2* [*MGC4607*, *OSM*[7,8]], or *CCM3* [*PDCD10*, *TFAR15*[9]] can be identified in up to 98% of familial CCM patients.[10,11] The CCM proteins act together in a heterotrimeric complex but also independently in different signaling pathways.[12] Recent in vitro and in vivo studies have given fascinating new insight into CCM pathobiology and their findings may help to identify a pharmacological approach for CCM management.[13-20]

EC proliferation, migration, morphogenesis, survival, and vascular stability depend on cell adhesion to the extracellular matrix (ECM), which is a scaffold for vascular organization and acts by transmitting mechanical forces.[21] Binding of ECM proteins to integrins can regulate a complex network of intracellular signaling pathways. However, it is not yet fully understood to what extent ECM components contribute to endothelial function and angiogenesis as they can have overlapping functions.[22-24] Notably, EC morphogenesis depends on stabilization by laminin-rich matrices but also on activation by collagen- or fibronectin-rich matrices.[25-27] Since less expression and irregular distribution of the major ECM component fibronectin have been observed in CCM lesions,[28] it is reasonable to hypothesize that the ECM plays an important role in CCM formation. It has also been demonstrated that CCM proteins regulate cell-matrix signaling,[29,30] cytoskeletal reorganization,[31-33] and stabilization of cell-cell junctions.[34,35]

In the present study, we demonstrate that loss of CCM1, CCM2, and CCM3 in human ECs impairs the production of a functional fibronectin matrix, which might trigger CCM formation. We also show that fibronectin replacement suppresses actin stress fiber formation and rescues endothelial dysfunctions of CCM1-, CCM2-, and CCM3-deficient ECs. In particular, a 120 kD cell-binding fragment of fibronectin is critical to restore spheroid formation, cortical actin organization, and EC morphology.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Cell culture

Immortalized human umbilical vein ECs (CI-huVECs, InSCREENeX, Braunschweig, Germany) and human cerebral microvascular ECs (hCMEC/D3; Merck Millipore, Darmstadt, Germany) were cultured at 37°C and 5% of CO_2 in EC growth medium (ECGM, PromoCell, Heidelberg, Germany) supplemented with 10% of fetal calf serum (FCS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) or in EndoGRO-MV complete medium (Merck Millipore) supplemented with 1 ng/mL of FGF-2 (PromoCell) and 5% of FCS, respectively. For rescue experiments, human plasma fibronectin (F2006, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), human cellular fibronectin (F2518, Sigma-Aldrich), a proteolytic human plasma fibronectin 70 kD fragment (F0287, Sigma-Aldrich), a human fibronectin 120 kD cell attachment fragment (Part Number 175, YO Proteins, Ronninge, Sweden), human type IV collagen (C5533, Sigma-Aldrich), recombinant periostin (rPOSTN; RPH339Hu01, Cloud-Clone Corp., Katy, TX, USA), and recombinant fibulin-5 (rFBLN5; 9006-FB-050, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) were either supplemented to the ECGM or used to coat cell culture plates with the indicated concentrations. If not stated otherwise, the cells were cultured for 48 hours with ECM protein supplementation. Cells cultured on uncoated, tissue culture treated plates served as controls.

2.2 | CRISPR/Cas9 genome editing

Following our established protocol,[20] crRNA:tracrRNA:Cas9 ribonucleoprotein (RNP)-mediated genome editing was used to inactivate *CCM1*, *CCM2* or *CCM3*, respectively. In addition to the pre-identified CRISPR/Cas9 target region in *CCM3* exon 3 [LRG_651; 5′-CCT-GTGTTTAATGAGGTGAGTTG-3′; crRNA *CCM3*], target sequences located in *CCM1* exon 10 [LRG_650; 5′-CCA-TACTTTGGTCTAGGAGCTCC-3′; crRNA *CCM1*], and *CCM2* exon 4 [LRG_664; 5′-GGTC AGTTAACGTCCATACC-AGG-3′; crRNA *CCM2*] were selected using the Alt-R crRNA design tool (Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium). CI-huVECs and hCMEC/D3 cells were transfected with crRNA:tracrRNA:Cas9 RNP-complexes and clonally expanded as described before.[20] CCTop-CRISPR/Cas9 target online predictor[36] was used to identify potential off-target sides. The following criteria were used: (1) ≤ 4 crRNA mismatches and (2) ≤ 2 crRNA mismatches in the core of the first twelve nucleotides next to the PAM. Two exonic off-target regions were selected for each crRNA. T7EI assay was used to analyze off-target sides in crRNA:tracrRNA:Cas9 RNP-treated cell mixtures [off-target *CCM1*: 5′-CCA-TAC**C**TTGGTCT**C**GG**T**GC**G**CC-3′ (*ARVCF*), 5′-CCT-**G**AC**C**TTGGTCTA**A**GAGC**C**CC-3′ (*RNF44*); off-target *CCM2*: 5′-GG**AA**AGTTAA**A**GT**A**CA TACC-AGG-3′ (*PAPSS2*), 5′-G**A**TCAG**C**TAACGTC**A** AT**G**CC-TGG-3′ (*KDM4D*)]. Sanger sequencing was used to screen for off-target mutations in clonally expanded *CCM3*$^{-/-}$ cells [off-target *CCM3*: 5′-CCG-GTGTTTAATG AGGTGA**CAGC**-3' (*ZNF256*), 5′-CCT-GTGTTTAATGA

GACTAGATG-3′ (*ZNF586*)]. PCR primers used to amplify the CRISPR/Cas9 target and predicted off-target regions for Sanger sequencing or T7EI assays were as follows: *CCM1*: forward: 5′-ACAAGAGAAACTGCAAGGGTGA-3′, reverse: 5′-AATCCATACTTTGGTCTAGGAGC-3′; *CCM2*: forward: 5′-AGCCCTTGGTCCCTGTACTC-3′, reverse: 5′-GACAAACAGCAGCACCCAAC-3′; *CCM3*: forward: 5′-TGCTTTGTGAAGTAGTACCTAACCAAGGACT-3′, reverse: 5′-CTTCATAGTACTTCATCACCATTGTTCA TTC-3′; *ARVCF*: forward: 5′-GCCTGAGGAGACCTG AGATG-3′, reverse: 5′- TGAGGTAGGCTCGAGAGA GT-3′; *RNF44*: forward: 5′-AGCACTCTCTTTCAGGC ACC-3′, reverse: 5′-GCGCAAAAGAGTAGGAAGCG-3′; *PAPSS2*: forward: 5′-AGGATGTTCTAGGGCAGTTT GC-3′, reverse: 5′-GAGGACCAACAGTCATTGGAAG-3′; *KDM4D*: forward: 5′-TTTCAGCTCACAACCATACAC-3′, reverse: 5′-GCACAGTTGGCCTTAGACTTC-3′; *ZNF256*: forward: 5′-CCGAAGAATTCACACTGGAGTAA-3′, reverse: 5′-TCCTGTGTGAACTCTCTCATGTA-3′; *ZNF586*: forward: 5′-TTCACCAAAAGCCTACACTCCA-3′, reverse: 5′-GAACTCTCTGATGGCGACGG-3′. crRNA:tracrRNA: Cas9 RNP-treated cell mixtures and clonally expanded knockout CI-huVECs were used for functional assays in passage 25 or 28-31, respectively. hCMEC/D3 cells were used in passage 38-40.

2.3 | T7EI cleavage assay and amplicon deep sequencing

T7EI analyzes were performed as described before.[20] To analyze the CRISPR/Cas9-induced mutational spectrum, amplicon deep sequencing libraries were prepared with a custom two-step PCR approach following our established protocol.[20] PCR products were pooled and purified with Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, Pasadena, USA). The library was sequenced on a MiSeq instrument with 2 × 150 cycles (Illumina, San Diego, USA). The SeqNext software was used for data analysis (JSI Medical Systems, Ettenheim, Germany). Only variants with combined read frequencies ≥ 1% and quality score ≥ 25 were called. The following primers with adapter sequences were used for specific target enrichment: *CCM1*: forward: 5′-**ATCGGGAAGCTGAAG**AGCAA TGTGGAGTAAAACCGA-3′, reverse: 5′-**ATCCGACGG TAGTGT**GATGACAAAGCTCTTAATGGGT-3′; *CCM2*: forward: 5′-**ATCGGGAAGCTGAAG**CTGGTG GCCTGAGTATGAAGC-3′, reverse: 5′-**ATCCGACGGT AGTGT**AGGATAGGGTTACCTTTGCATTG-3′; *CCM3*: forward: 5′-**ATCGGGAAGCTGAAG**TTGTGT CCAATTCTTTTATCACCA-3′, reverse: 5′-**ATCCGAC GGTAGTGT**AGCAGGAATTAAAGAATTGCAG AGT-3′. In the second step, barcoded reverse primers and a universal forward primer were used to generate the final sequencing library.

2.4 | RNA isolation, RNA sequencing, and qPCR

The PeqGold TriFast reagent (Peqlab-VWR, Radnor, PA, USA) and Direct-zol RNA MiniPrep Plus Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) were used to extract and purify total RNA. The integrity of the RNA samples was checked on a 2100 Bioanalyzer using the Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA). RNA concentrations were measured on a Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific) with the Qubit RNA HS Assay Kit (Q32852, Thermo Fisher Scientific). Sequencing libraries were prepared with the TruSeq Stranded mRNA Kit according to the manufacturer's instructions (Illumina, San Diego, CA, USA). Pooled libraries were sequenced as 100 bp or 150 bp paired-end runs on a HiSeq 4000 instrument (Illumina). Reads that mapped to annotated genes were quantified with HTseq-count[37] and the Relative Log Expression (RLE) normalization, which is implemented in the R Bioconductor package DESeq2[38] was used to normalize gene counts. RNA sequencing data were uploaded to the Gene Expression Omnibus (GEO) database (record number: GSE138431). Transcripts with a $|\log_2 FC| > 2$ and $P_{adj} < .05$ were subjected to a PANTHER overrepresentation test (version 13.0; http://pantherdb.org/). The PANTHER GO-Slim Cellular Component annotation data set was used as reference list. The First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) was used to transcribe mRNA into cDNA. Deregulated gene expressions of *FN1*, *POSTN,* and *FBLN5* were validated by SYBR Green-based qPCR on a Roche Light Cycler 480 instrument (Roche, Mannheim, Germany). The housekeeping gene *RPLP0* (ribosomal protein lateral stalk subunit P0) was used as an endogenous control. For detection of *FN1*, *POSTN,* and *FBLN5*, PrimeTime qPCR Primers were purchased from Integrated DNA Technologies (Hs.PT.58.40005963, Hs.PT.58.4452022, Hs.PT.58.14576443). The following primer pair were used for *RPLP0* qPCR: 5′-TCGACAATGGCAGCATCTAC-3′ and 5′-ATCCGTCTCCACAGACAAGG-3′.

2.5 | Western blot analyzes

Proteins were extracted with PeqGold TriFast reagent (Peqlab-VWR) and solubilized in buffer containing 8 M of Urea, 2 M of Thio-Urea, and 20 mM of Tris for CCM3 immunoblotting. Proteins of cell culture supernatant were precipitated with 20% of trichloroacetic acid and washed two times with ethanol before solubilization in buffer containing 8 M of Urea, 2 M of Thio-Urea, and 20 mM of Tris. For deoxycholate (DOC) assays, cells were treated as described before.[39] In brief, 200 000 cells were cultured on a 6-well plate, washed with phosphate-buffered saline (PBS, PromoCell), lysed with 500 µL of DOC buffer [2% of DOC, 20 mM of Tris-HCl (pH 8.8), 2 mM of

EDTA, 1× Halt protease and phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific)] and scraped from the cell culture plate. After centrifugation, the insoluble fraction was solubilized in SDS buffer [1% of SDS, 25 mM of Tris-HCl (pH 8.2), 2 mM of EDTA, 1× Halt protease, and phosphatase inhibitor cocktail]. Quantification was performed with the Qubit Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) on a Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) or with the Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). About 10 or 20 µg total protein were separated on 7.5% or 10% of TGX stain-free gels (Bio-Rad, Hercules, California, USA), transferred to PVDF membranes (Roche, Basel, Switzerland), immunostained with monoclonal mouse anti-human fibronectin (1:5000, MAB19182, R&D systems) or rabbit anti-CCM3 (1:150; IG-626, ImmunoGlobe, Himmelstadt, Germany), HRP conjugated mouse IgGκ light chain binding protein (1:30 000, sc-516102, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) or anti-rabbit HRP secondary antibody (1:30 000, sc-2357, Santa Cruz Biotechnology), Precision Protein StrepTactin-HRP Conjugate (1:15 000, Bio-Rad) and detected with Clarity Western ECL (Bio-Rad). A ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) imager was used for blot documentation of Stain-Free total protein and chemiluminometric signal detection. To semi-quantify relative CCM3 and fibronectin protein expression, normalized band intensities were calculated with the ImageLab software (v6.0, Bio-Rad). Since total protein can be used as reliable loading control,[40,41] the volume intensities of the detected protein bands were normalized to the volume intensities of the total protein fraction. For normalization of the DOC-insoluble fractions, total protein volume intensities of the DOC-soluble fractions were used. For relative fibronectin quantification in cell culture supernatants, the volume intensities of the detected protein bands were normalized to the cell number per 0.5 × 0.5 mm growth area, which was documented right before sample preparation.

2.6 | Phospho-kinase detection assay and immunofluorescence imaging

Relative phosphorylation levels of different human protein kinases were determined using the Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit (ARY003B, R&D Systems) according to the manufacturer's instructions. In detail, approximately 1×10^7 cells/mL were solubilized in lysis buffer, and the total protein concentration was measured with the Qubit Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). About 600 µg were used per array set (A + B). A ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) imager was used for documentation, and pixel densities were determined using ImageJ software. For immunofluorescence analysis, 1×10^4 cells/well were cultured on a 96-well plate followed by fixation, permeabilization, and immunostaining as described previously.[20] In brief, cells were fixated with 4% paraformaldehyde at room temperature, permeabilized with 0.1% of Triton X-100 for 15 min, and blocked with 2% of normal goat serum for 1 hour. DNA and F-actin were visualized with DAPI (D9542, Sigma-Aldrich) and iFluor 488-conjugated phalloidin (ab176753, Abcam, Cambridge, UK), respectively. To analyze actin stress fiber formation, at least 120 cells per replicate were manually counted. Cells with short F-actin bundles spanning the nucleus were counted as stress fiber-positive. For fibronectin staining, cells were fixed with ice-cold (−20°C) methanol for 10 minutes. Primary mouse anti-human fibronectin antibodies (1:160, MAB19182, R&D Systems) and Alexa Fluor 488-conjugated secondary goat anti-mouse IgG antibodies (1:200, A-11029, Life Technology, Carlsbad, CA, USA) were incubated at RT for 1 hour. After adding Ibidi Mounting Medium (Ibidi, Martinsried, Germany), image acquisition was performed for each sample of an experiment with the same settings.

2.7 | Cell morphology, spheroid, and tube formation assay

CI-huVECs were seeded with 1×10^4 cells per well on a 96-well plate that had been coated with fibronectin to study cell morphology. Uncoated, tissue culture treated plates served as controls. After 48 hours, at least 300 cells were manually counted to determine the proportion of cells with a compact morphology. Approximately 400 cells were cultured for 24 hours with or without ECM protein supplementation in methocel containing medium (2.4 g/L) as hanging drop (25 µL) to study spheroid formation. The ImageJ software was used to analyze the spheroid cross-sectional areas and circularities of at least 10 spheroids per replicate. In brief, we manually traced the perimeters of each individual spheroid in ImageJ, calculated the lengths of the perimeters (l) in pixels as well as the areas (A) of the selections in square pixels and finally converted the values into millimeters or square millimeters by spatial calibration of the images. The following equation was used to calculate the circularity of the spheroids: $\frac{4\pi A}{l^2}$. To analyze tube formation, 2×10^4 cells were cultured on Matrigel (Corning, Kaiserslautern, Germany) in 96-well plates or Angiogenesis µ-Slides (Ibidi). The number of master segments (number of tubes), total master segments length (tube length), and mesh numbers were quantified after 20 hours with the Angiogenesis Analyzer ImageJ plugin.[42] For these assays, bright-field monochrome images were acquired with the EVOS FL Cell Imaging System at 4× (AMEP4680) or 10× (AMEP4681) magnification.

2.8 | Caspase-3 activity and ECM cell adhesion assays

After 72 hours of fibronectin supplementation, CI-huVECs were incubated for 2 hours with 1 μM of staurosporine to induce apoptosis. The Caspase-3 DEVD-R110 Fluorometric HTS Assay Kit (Biotium, Fremont, CA, USA) was used according to the manufacturer's instructions.

The ability of *CCM3*$^{+/+}$ and *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs to bind to fibronectin, type I collagen, type II collagen, type IV collagen, laminin, tenascin, and vitronectin was quantified with a fluorometric ECM Cell Adhesion Array Kit (ECM545, Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. In brief, CI-huVECs were resuspended in assay buffer and seeded in precoated 96-well plates with 1.5×10^5 cells/well. After 2 hours at 37°C and 5% of CO_2, nonadherent cells were aspirated and the wells were washed three times with assay buffer. Finally, the sample wells were incubated for 15 minutes with a solution of 4X cell lysis buffer and CyQuant GR dye, which shows an enhancement of fluorescence when bound to cellular nucleic acids. Fluorescence intensity was measured in relative fluorescence units (RFU) at Ex/Em (nm) = 470/510-580. Bovine serum albumin coated wells served as control.

2.9 | Microscope image acquisition

An EVOS FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific; Sony ICX445 monochrome CCD; EVOS Light Cube DAPI, GFP, RFP; 10× AMEP4681, 40x AMEP4683) or a Zeiss LSM 510 META Confocal Microscope (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany; Zeiss LSM Software 3.5 plus; meta detector; laser: 405 nm, 488 nm; major beam splitter: HFT 405/488/561 nm; band-pass filter: 505-550 nm; Plan-Neofluar 40×/1.3 Oil DIC) were used for image acquisition.

2.10 | Statistical analysis

GraphPad Prism software (v.8.0.1, GraphPad Software, LA Jolla, CA, USA) was used for data analyzes. Data are presented as mean and single data points if not stated otherwise. Two-tailed, Student's *t* tests, multiple *t* tests, and two-way ANOVA with Holm-Šidák's multiple comparisons tests were used for two or more groups, respectively. RNA sequencing data were analyzed with Wald test and the Benjamini-Hochberg procedure for multiple testing, while Fisher's Exact test with false discovery rate (FDR) multiple test correction was used for PANTHER overrepresentation analysis. *P*-values <.05 and *q*-values <.05 were regarded as statistically significant.

3 | RESULTS

We have recently demonstrated that CRISPR/Cas9-induced CCM3 inactivation in human ECs induces profound morphological and functional changes.[20] In our present study, we used genome-wide RNA sequencing of *CCM3*$^{+/+}$ and *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs to get a better understanding of the underlying molecular mechanisms. About 569 upregulated or downregulated genes ($|\log_2 FC| > 2$ and $p_{adj} < .05$) were identified in clonally expanded CCM3-deficient ECs (Figure 1A,B). A gene set enrichment analysis revealed an overrepresentation of cell junction, extracellular region, and plasma membrane components (Table 1).

We focused our further analyzes on *FN1* ($\log_2 FC = -2.3$; $p_{adj} = 2.10 \times 10^{-99}$), *POSTN* ($\log_2 FC = -8.5$; $p_{adj} = 2.68 \times 10^{-226}$), and *FBLN5* ($\log_2 FC = -8.2$; $p_{adj} = 2.44 \times 10^{-197}$) since they were either the most downregulated genes in *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs (*POSTN* and *FBLN5*) or highly expressed in wild-type *CCM3*$^{+/+}$ but significantly downregulated in *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs (*FN1*). Expression differences of the three genes that encode for the ECM glycoprotein fibronectin or the matricellular proteins periostin and fibulin-5, respectively, were validated by RT-qPCR (Figure 1C). Fibronectin is important for proper ECM assembly[43] and the highest endothelial *FN1* expression has been found in the brain,[44] suggesting that it might support the integrity of the neurovascular unit. Therefore, we decided to study the role of fibronectin in CCM pathogenesis in more detail. In Western Blot analyzes, we observed less fibronectin in the cell culture supernatants of *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs and reduced DOC-insoluble fibronectin aggregates upon CCM3-inactivation (Figure 1D). No fibronectin was detected in the DOC-soluble fractions.

To test whether *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs have a cell-to-ECM adhesion defect, we used cell culture plates coated with fibronectin, type I, II, and IV collagens, laminin, tenascin, and vitronectin in a fluorometric cell adhesion array approach. Of note, binding of CCM3-deficient ECs to exogenous fibronectin was intact and no major cell binding abnormalities were observed for the other ECM components (Figure 1E). These results confirmed that long-term CCM3 inactivation impairs *FN1* expression but not the adhesion of CI-huVECs to fibronectin. This is consistent with the observation that supplementation of plasma fibronectin enhanced fibronectin fiber assembly in the ECM of *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs (Figure 1F). Therefore, we next examined whether exogenous fibronectin supplementation could rescue the endothelial dysfunction of CCM3-deficient ECs.

3.1 | Fibronectin replacement improves spheroid formation and prevents actin stress fiber assembly

Fibronectin supplementation significantly attenuated the aberrant phenotype of *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs. In particular, they

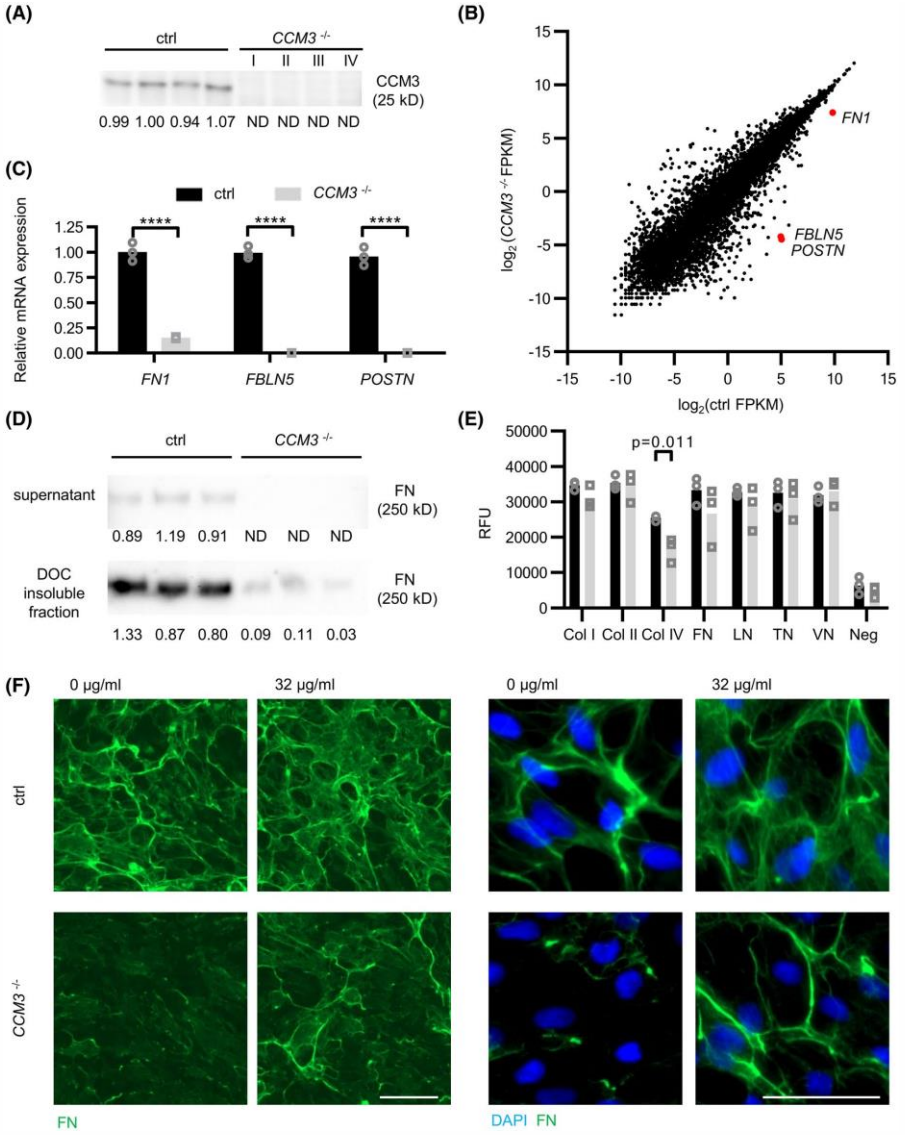

FIGURE 1 Deregulation of extracellular matrix components after long-term CCM3 inactivation. A, Western Blot analyzes verified complete CCM3 inactivation in clonally expanded $CCM3^{-/-}$ CI-huVECs used in this study (clones I-IV). Expression levels normalized to the $CCM3^{+/+}$ control group are given below the panel. B, RNA-Seq data of $CCM3^{+/+}$ control (*x*-axis) and $CCM3^{-/-}$ CI-huVECs (*y*-axis) are presented as scatter dot plot. FPKM = fragments per kilobase of exon model per million mapped reads. C, Expression levels of *FN1*, *FBLN5,* and *POSTN* were validated by qPCR. D, Western Blot results revealed less fibronectin in cell culture supernatants of $CCM3^{-/-}$ CI-huVECs and reduced DOC-insoluble fibronectin aggregates upon CCM3-inactivation. Expression levels normalized to the $CCM3^{+/+}$ control group are given below the subpanels. E, Fluorometric cell adhesion assays demonstrated no major cell binding abnormalities of $CCM3^{-/-}$ CI-huVECs to ECM components. F, A reduced fibronectin expression was observed in immunofluorescence imaging of 1×10^4 cells/well cultured on a tissue culture treated 96-well plate after 48 hours. Plasma fibronectin supplementation promoted fibronectin matrix assembly. Scale bars ≙ 100 µm in the left and 50 µm in the right panels. Images were acquired using the same setting for each sample and no changes were implemented. ND = not detected, RFU = relative fluorescence units, ctrl = $CCM3^{+/+}$ control cells, Col I = type I collagen, Col II = type II collagen, Col IV = type IV collagen, FN = fibronectin, LN = laminin, TN = tenascin, VN = vitronectin, and Neg = bovine serum albumin. Data are presented as mean and single data points (n = 3-4). Multiple *t* tests were used for statistical analyzes. ****$P < .0001$

TABLE 1 Gene set enrichment analysis

PANTHER GO-slim cellular component	# Genes	FC	FDR
Neuronal cell body	3	8.27	0.0479
Cell junction	10	4.44	0.0036
Extracellular region	30	1.88	0.0117
Integral to membrane	39	1.77	0.0098
Plasma membrane	56	1.64	0.0060
Membrane	43	1.55	0.0407
Intracellular	102	0.79	0.0421
Organelle	58	0.6	0.0004
Nucleus	24	0.5	0.0045
Mitochondrion	3	0.24	0.0239

Note: Over- and underrepresented terms in PANTHER cellular component analysis are marked in green and red, respectively.

Abbreviations: FC, fold change; FDR, false discovery rate.

lost their rounded morphology and recovered a spindle-like cell shape when cultured on plates, which had been coated with human plasma fibronectin (Figure 2A). Moreover, fibronectin replacement suppressed actin stress fiber formation and rescued the inability to form round and demarcated spheroids in 3D culture. When cultured in plasma fibronectin-containing hanging drops, the circularity of spheroids formed by *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs increased significantly and their cross-sectional area decreased to nearly normal levels when compared to spheroids formed by *CCM3*$^{+/+}$ wild-type cells (Figure 2B). Besides, normalization of cortical actin filaments and less actin stress fibers were observed in *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs that had been cultured on fibronectin-coated plates (Figure 2C; Figure S1). As expected, fibronectin supplementation had no adverse effects on *CCM3*$^{+/+}$ wild-type cells. In contrast to these positive effects on cell morphology, organization of the actin cytoskeleton and spheroid formation, fibronectin did not increase the stability of tube-like structures formed by *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs on Matrigel (Figure 2D). Although this is an initial screening assay to study the formation of vessel-like tubular networks in vitro,[45] reduced mesh and tube numbers as well as tube length reflect the instability of endothelial cords that has been described for ECs before.[20,46,47] Furthermore, the resistance of *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs to staurosporine-induced apoptotic cell death was not rescued by fibronectin supplementation (Figure 2E).

Fibronectin binds to heterodimeric integrin receptors, which link the extracellular glycoprotein to cytoskeletal adapter proteins and the actin-assembly machinery.[48] The phosphorylation dependent activation of the focal adhesion kinase (FAK), members of the Src family of tyrosine kinases, and downstream signaling pathways play a critical role in adhesion signaling but needs to be tightly regulated since overactivation can lead to endothelial dysfunctions, for example, hyperpermeability.[49,50] We, therefore, wanted to exclude constitutive overactivation in *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs after fibronectin supplementation. Phosphorylation profiling after 48 hours of fibronectin supplementation demonstrated no adverse long-term effects on the activation levels of FAK or Src family members (Figure 2F, Table S1). Using RNA sequencing, we addressed two questions: (1) Can a wild-type-like gene expression profile be restored in *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs by fibronectin supplementation (*CCM3*$^{+/+}$ FN- vs *CCM3*$^{-/-}$ FN+; (Figure 2G)? (2) What gene expression differences are induced in *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs by fibronectin supplementation in general (*CCM3*$^{-/-}$ FN- vs *CCM3*$^{-/-}$ FN+; Figure 2H)? Data analysis demonstrated neither significant gene expression differences (|log2FC| > 2 and $P_{adj} < .05$) in *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs upon fibronectin supplementation nor a rescue of their aberrant gene expression profile (Figure 2G,H). For instance, overexpression of *KLF2*, which is known to induce actin shear fiber formation in ECs and has been described as key player in CCM pathogenesis,[14,17,51] was unaffected by fibronectin replacement (*CCM3*$^{-/-}$ FN+ vs *CCM3*$^{-/-}$ FN-, $\log_2 FC = -0.19$, $P_{adj} = .25$ and *CCM3*$^{-/-}$ FN+ vs *CCM3*$^{+/+}$ FN-, $\log_2 FC = 3.3$, $P_{adj} = 3.73 \times 10^{-139}$). In conclusion, our results demonstrate that the restoration of a fibronectin-rich matrix is sufficient to induce partial rescue of the aberrant phenotype of CCM3-deficient ECs. Similar fibronectin rescue effects were observed in clonally expanded *CCM3*$^{-/-}$ hCMEC/D3 cells (Figure 3).

3.2 | The cell-binding fragment of fibronectin is essential to rescue the altered endothelial phenotype

Plasma fibronectin exists as a soluble dimer of two covalently linked approx. 250 kD subunits with a complex structure of various functional domains. It differs from cellular fibronectin by the two extra domains A (EDA) and B (EDB). As verified by our RNA sequencing data, both isoforms are expressed by CI-huVECs (Figure S2). With two proteolytic plasma fibronectin fragments, we were able to narrow down the region that is crucial to suppress reorganization of the actin cytoskeleton to stress fibers and rescue the dysfunction of CCM3-deficient ECs. The 70 and 120 kD fragments, as well as the less-soluble cellular fibronectin isoform reduced actin stress fiber assembly in *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs (Figure 4A) but only the 120 kD cell attachment fragment with its RGD domain and major integrin interaction sites also normalized spheroid formation (Figure 4B). The N-terminal 70 kD region of fibronectin does not only contain the assembly domain, but can also stimulate outside-in signaling.[52] Interestingly, it has already been demonstrated that the N-terminal 70 kD fragment can bind α5β1 integrins and control actin assembly.[53] This might be an explanation

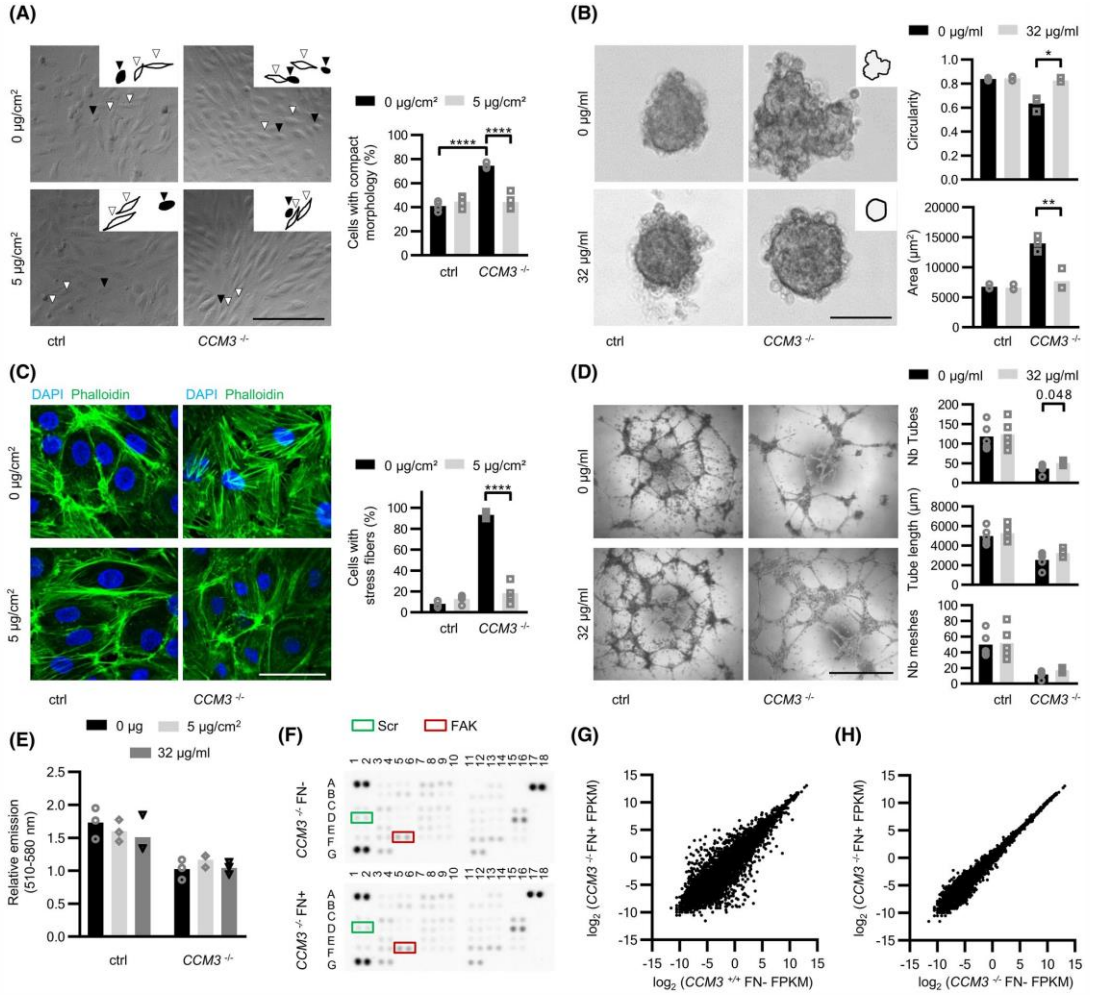

FIGURE 2 Restored endothelial function of *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs by fibronectin replacement. A, *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs cultured on fibronectin coated plates (5 µg/cm^2) regained a typical endothelial morphology. Black arrowheads indicate a compact cell shape, while white arrowheads indicate cells that show a spindle-shaped morphology. *CCM3*$^{+/+}$ and *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs were seeded with 1×10^4 cells/well on a 96-well plate. Scale bar ≙ 200 µm. B, Fibronectin supplementation (32 µg/mL) significantly improved the spheroid organization of *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs. The circularity and the cross-sectional area of the spheroids were determined. The manually traced perimeter of the shown spheroid is depicted in the upper right corner. Scale bar ≙ 100 µm. C, *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs cultured on fibronectin-coated plates demonstrated a reduced actin stress fiber formation (1×10^4 cells/well; 96-well plate). Confocal microscopy was used for image acquisition. Phalloidin-iFluor 488 and DAPI staining are shown in green and blue, respectively. The brightness was adjusted equally for all images to show the relevant structures of F-actin formation. Original images are shown in Figure S1. Scale bar ≙ 50 µm. D, The reduced ability of *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs to form tube-like structures could not be rescued by fibronectin supplementation (32 µg/mL). Scale bar ≙ 1 mm. E, Neither fibronectin coating (5 µg/cm^2) nor supplementation to the culture medium (32 µg/mL) had an effect on staurosporine-induced Caspase-3 activity. F, Representative Phospho-Kinase array membranes are shown for *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs cultured without and with fibronectin supplementation (5 µg/cm^2). Spots showing the detection of phosphorylated forms of Src and FAK are marked in green or red, respectively. G and H, RNA-Seq data of *CCM3*$^{+/+}$ control cells without (*x*-axis) and *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs with 5 µg/cm^2 fibronectin supplementation (*y*-axis) (G) or *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs without (*x*-axis) and with (*y*-axis) fibronectin supplementation (H) are presented as scatter dot plot. FPKM = fragments per kilobase of exon model per million mapped reads. ctrl = *CCM3*$^{+/+}$ control cells, FN = fibronectin, Nb = Number. Data are presented as mean and single data points (n = 3-5). Two-way ANOVA with Holm-Šidák's multiple comparisons test, multiple *t* test or Student's *t* test were used for statistical analyzes: **P* < .05; ***P* < .01; *****P* < .0001

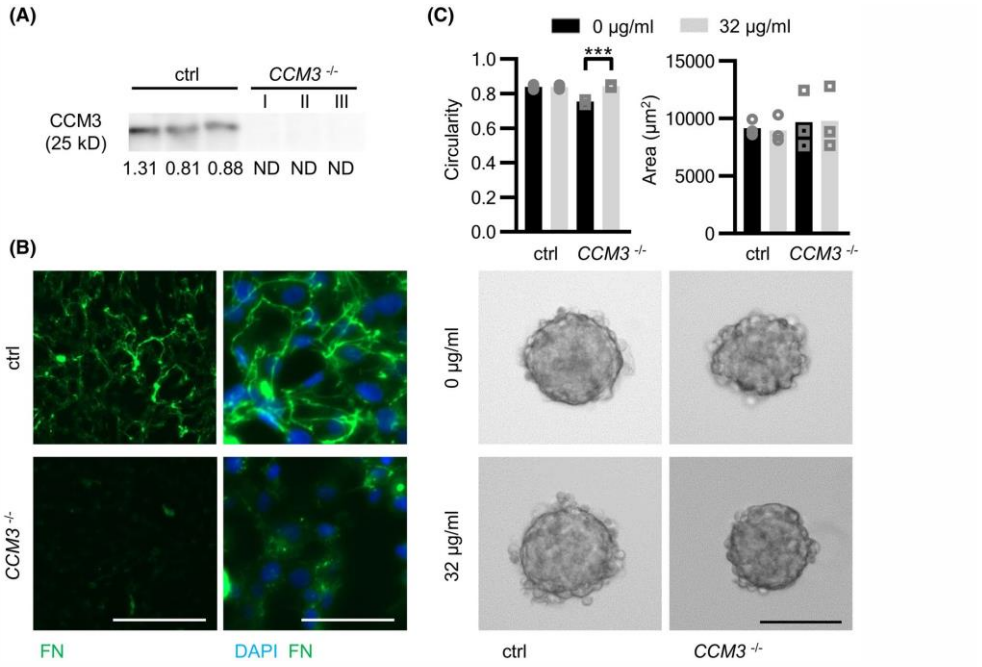

FIGURE 3 Fibronectin replacement improves spheroid organization of *CCM3*$^{-/-}$ hCMEC/D3 cells. A, Western Blot analyzes verified complete CCM3 inactivation in clonally expanded hCMEC/D3 used in this study (clones I-III). Expression levels normalized to the *CCM3*$^{+/+}$ control group are given below the panel. B, A reduced fibronectin expression was observed in immunofluorescence imaging of cells cultured on a tissue culture treated 96-well plate (1×10^4 cells/well). Scale bars ≙ 200 µm in the left and 50 µm in the right panels. C, Plasma fibronectin supplementation (32 µg/mL) significantly improved spheroid organization of *CCM3*$^{-/-}$ hCMEC/D3 cells. Shown are the circularity and the area of the spheroids. Scale bar ≙ 100 µm. ctrl = *CCM3*$^{+/+}$ hCMEC/D3 cells, FN = fibronectin, ND = not detected. Data are presented as mean and single data points (n = 3). Student's *t* test was used for statistical analyzes: ***$P < .001$

for the actin cytoskeleton reorganization that we observed in *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs. However, the 70 kD fragment is also a well-known inhibitor of fibronectin matrix polymerization,[52,54] and therefore, might not be able to faciliate organization of spheroids formed by *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs.

It is noteworthy to mention that supplementation of type IV collagen increased the circularity of *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVEC spheroids but did not reduce actin stress fiber assembly (Figure 4A,B). Periostin replacement stabilized tube-like structures but did not attenuate dysfunctional cytoskeletal dynamics, and fibulin-5 treatment reduced stress fiber formation but induced severe morphological changes in *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs (Figure 5).

3.3 | Dysregulation of the fibronectin matrix is a common feature of CCM1/2/3-deficiency

We next asked the question of whether inactivation of CCM1 and CCM2 in human ECs also impairs fibronectin expression. Thus, CRISPR/Cas9 genome editing was used for *CCM1* and *CCM2* gene disruption in CI-huVECs. Eight days after RNP-transfection, average T7EI cleavage efficiencies of 32% (n = 3; range: 31%-33%) and 17% (n = 3; range: 15%-19%) were observed, respectively. After thirteen days, these had increased to 43% (*CCM1*; range: 39%-48%) and 53% (*CCM2*; range: 47%-54%). These results are in line with the survival benefit of CCM3- and CCM1-deficient human ECs that we have described before.[20,55]

We could not identify commercial antibodies specific to CCM1 or CCM2 in this study. Nevertheless, the results of our deep sequencing analysis indicated protein inactivation in the vast majority of cells: A high proportion of *CCM1* and *CCM2* frameshift variants (71%-88%) was observed in cell mixtures that had been treated with *CCM1*- or *CCM2*-specific crRNA:tracrRNA:Cas9 RNPs, respectively (Figure 6). As expected, disruption of the *CCM1* and *CCM2* genes reduced fibronectin expression (Figure 6). Furthermore, supplementation of human plasma fibronectin rescued the impaired spheroid formation, the reorganization of the actin cytoskeleton, and the atypical rounded cell morphology that were observed in cell mixtures treated with *CCM1*- or

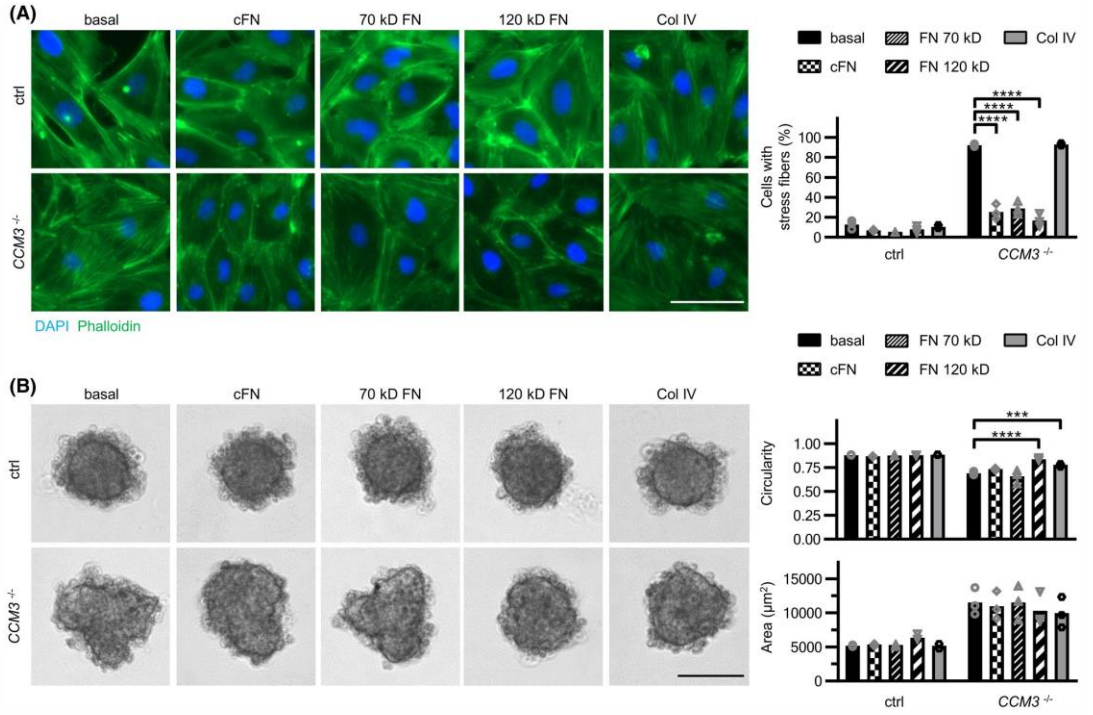

FIGURE 4 The 120 kD fragment of fibronectin is sufficient to rescue the cytoskeletal changes and spheroid organization of *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs. A, Phalloidin-iFluor 488-(green) and DAPI-(blue) co-staining demonstrated that the actin stress fiber content was significantly decreased in *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs that had been cultured on plates coated with cFN, 70 kD or 120 kD fibronectin fragments (5 µg/cm^2; 1×10^4 cells/well). Scale bar ≙ 50 µm. B, Only the supplementation of a 120 kD fibronectin fragment (32 µg/mL) and type IV collagen (60 µg/mL) but not of cellular fibronectin (cFN) or a 70 kD fibronectin fragment (32 µg/mL) significantly rescued circularity and proper spheroid organization of *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs. Scale bar ≙ 100 µm. ctrl = *CCM3*$^{+/+}$ control cells, cFN = cellular fibronectin, 70 kD FN = 70 kD fibronectin fragment, 120 kD FN = 120 kD fibronectin fragment, Col IV = type IV collagen. Data are presented as mean and single data points (n = 3). Two-way ANOVA with Holm-Šidák's multiple comparisons test was used for statistical analyzes: ***$P < .001$, ****$P < .0001$

CCM2-specific crRNA:tracrRNA:Cas9 RNP-complexes, respectively (Figure 7). Together, these results indicate overlapping effects and regulation of endothelial fibronectin expression by CCM1, CCM2, and CCM3. In addition, alterations in potential off-target sites after crRNA:tracrRNA:Cas9 RNP-treatment targeting *CCM1*, *CCM2,* and *CCM3* could be excluded in all cell mixtures and clonal cell lines of CI-huVECs and hCMEC/D3 cells (Figure 6 and Data not shown).

4 | DISCUSSION

In this study, we show that CCM1, CCM2, and CCM3 regulate the production of a functional fibronectin matrix by human ECs. Our results also demonstrate that supplementation of fibronectin rescues morphological changes as well as impaired endothelial spheroid organization and normalizes actin stress fiber formation upon CRISPR/Cas9-induced inactivation of either CCM1, CCM2 or CCM3.

The formation of cavernous vascular malformations upon endothelial CCM3 inactivation has recently been associated with impaired dispersion of ECs in vivo.[56] The results of Castro and colleagues suggest that *CCM3*$^{-/-}$ ECs might be unable to build or remodel their ECM, which serves as a scaffold for coordinate migration. In addition to an important role in angiogenesis, the CCM proteins also contribute to the maintenance and regulation of the vascular endothelial barrier function.[57,58] Therefore, studying cytoskeletal remodeling, cell-cell, and cell-matrix interactions is useful to get a better understanding of the mechanisms leading to increased vascular permeability and recurrent bleeding events in CCM patients.

We here demonstrate that CRISPR/Cas9-induced *CCM3* gene disruption in ECs significantly impairs the expression of fibronectin in vitro. Our observation also reflects the situation in human CCM tissues, in which less and irregularly organized fibronectin fibrils have been noticed around CCM microvessels. Interestingly, this was accompanied by an altered dispersion of tight junction proteins.[28]

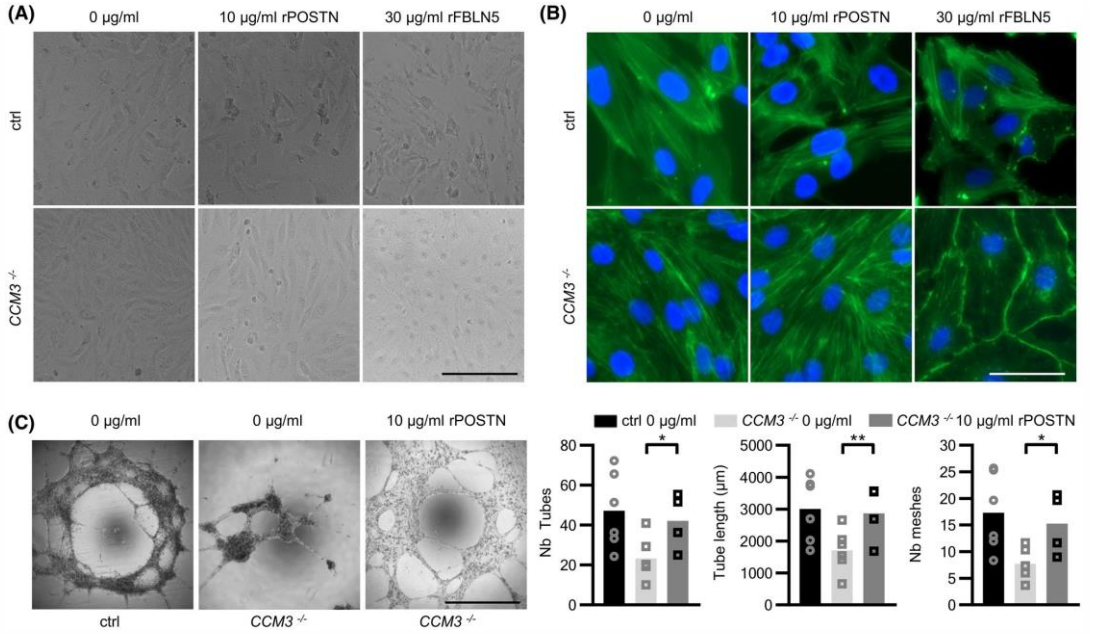

FIGURE 5 Supplemented periostin and fibulin-5 have different effects on *CCM3*$^{-/-}$ CI huVECs. A, Representative bright-field microscopy images and B, Phalloidin-iFluor 488 staining of F-actin indicated an altered cellular morphology and reduced stress fiber formation following supplementation of 30 µg/mL fibulin-5 to *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs. Control cells and cells supplemented with 10 µg/mL periostin demonstrated no changes in cell morphology or F-actin organization (2×10^4 cells/well, 96-well plate). Scale bars ≙ 200 µm (A) and 50 µm (B). C, Replacement of periostin attenuated impaired tube formation after 20 hours in CCM3-deficient ECs. Shown are the tube length, the number (Nb) of tubes and the number of meshes. Scale bar ≙ 1 mm. ctrl = *CCM3*$^{+/+}$ control cells. Data are presented as mean and single data points (n = 3-6). Student's *t* test was used for statistical analyzes: **P* < .05, ***P* < .01

Besides, our study disclosed that the inability to produce a functional fibronectin matrix is not limited to CCM3 deficiency but is also a consequence of CCM1 and CCM2 inactivation in human ECs. CCM1, CCM2, and CCM3 are known to act together in the same signaling pathways but also independently from each other.[59-61] GST pull-down and co-immunoprecipitation studies have demonstrated that the three CCM proteins can form a ternary complex in vitro and that CCM2 acts as a linker molecule between CCM1 and CCM3.[62,63] The shared phenotype of CCM1-, CCM2-, and CCM3-deficient human ECs indicates that the three CCM proteins regulate the expression of fibronectin in a common pathway.

The formation of actin stress fibers has been consistently observed in CCM1-, CCM2-, and CCM3-deficient ECs.[20,33,64,65] Therefore, it has been widely used as surrogate marker for endothelial dysfunctions that are induced by CCM1/2/3 inactivation. Noteworthy, stress fiber formation was also a readout parameter in a recent pharmacological high-throughput screen and in one of the first studies that identified Rho kinase inhibition as a potential therapeutic approach in CCM disease.[31,66] Fibronectin directly participates in mechanosignaling and is linked to the cytoskeleton by the matrix-integrin-cytoskeletal signaling axis.[67,68] Its sustained binding to integrin receptors can induce RhoA activation and stress fiber assembly.[48] On the contrary, Rho-dependent cytoskeletal contractility also promotes fibronectin fibrillogenesis.[69] Therefore, reorganization of the actin cytoskeleton into stress fibers might be a compensatory mechanism to impaired fibronectin expression and lack of a fibronectin-rich ECM upon CCM protein inactivation. The paradoxical effect of fibronectin supplementation on *CCM1*$^{-/-}$, *CCM2*$^{-/-}$, and *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs, namely suppression of actin stress fiber formation and restoration of the cortical actin network, supports this hypothesis. Notably, the formation of cortical actin filaments has been associated with enhanced endothelial barrier function[70] which would be beneficial in CCM pathogenesis.

Cseh and colleagues have demonstrated that supplementation of exogenous fibronectin can restore functional cell-cell junctions between fibronectin-depleted bovine ECs.[71] In addition, monolayers of porcine brain capillary

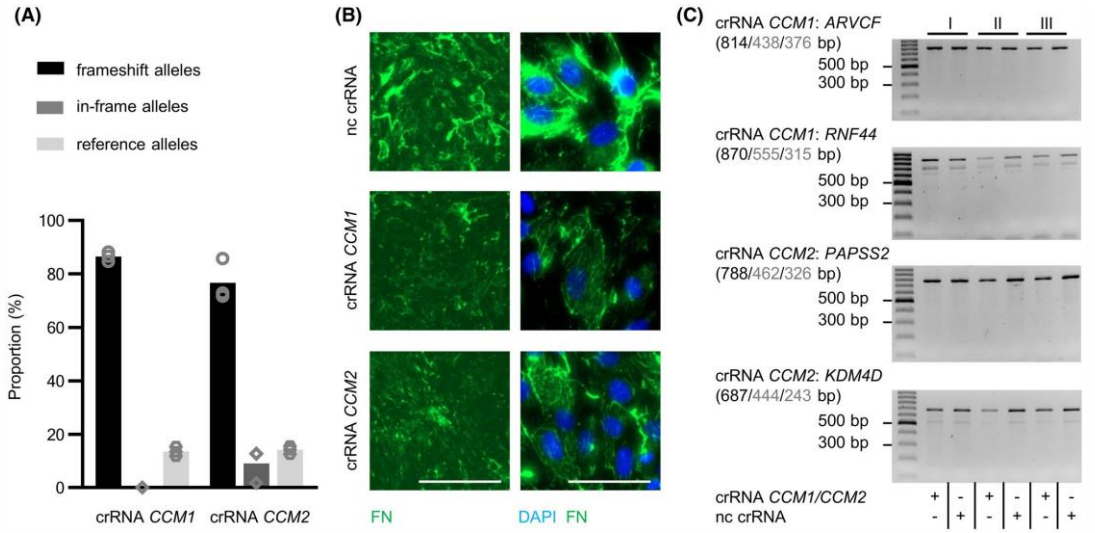

FIGURE 6 Deregulation of fibronectin expression upon CCM1 or CCM2 inactivation in CI-huVECs. A, High proportion of *CCM1* and *CCM2* loss-of-function alleles were found in crRNA:tracrRNA:Cas9 RNP-treated CI-huVEC mixtures. B, Immunofluorescence staining in crRNA:tracrRNA:Cas9 RNP-treated CI-huVECs indicated reduced fibronectin expression (1×10^4 cell/well, 96-well plate). Scale bars ≙ 200 μm in the left and 50 μm in the right panels. C, T7EI analyzes revealed no alterations in predicted off-target regions. Three independent replicates are shown (I-III). Expected length of uncleaved (black) and cleaved (gray) amplicons are depicted at the upper left of each subpanel. crRNA *CCM1* = *CCM1*-targeting RNP, crRNA *CCM2* = *CCM2*-targeting RNP, nc crRNA = non-targeting control RNP, FN = fibronectin. Data are presented as mean and single data points (n = 3)

ECs supplemented with fibronectin showed increased transendothelial electrical resistance (TEER) indicating that fibronectin supports tight junction formation and barrier function.[72] These observations are interesting since the expression and distribution of cell-cell adhesion proteins is impaired in CCMs.[28,64,73] The endothelial spheroid formation assay which was first described in 1998 is a versatile tool to study EC function in a 3D microenvironment.[74] EC aggregation, organization, and differentiation to a two-compartment system of an unorganized center and a highly organized surface can be analyzed in this model.[74] Not only cell-cell but also cell-matrix interactions play important roles in this organization process. Notably, fibronectin fibers can be found at the periphery of endothelial spheroids.[75] Long-term inactivation of CCM1, CCM2 or CCM3 impairs spheroid formation, especially by inhibiting proper assembly of the surface monolayer. Plasma fibronectin supplementation dramatically improved not only the spheroid formation of *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs and *CCM3*$^{-/-}$ hCMEC/D3 cells, but also of CCM1-, and CCM2-deficient ECs. Since cell-matrix and cell-cell adhesions are known to influence each other,[76] it seems reasonable to hypothesize that fibronectin replacement promotes spheroid formation of CCM1-, CCM2-, and CCM3-deficient ECs not only in a cell-matrix, but also in a cell-cell adhesion-dependent manner.

In CCM mouse models, vascular lesions predominantly develop in the brain and retina. Fibronectin is an essential ECM component of retinal blood vessels, and its endothelial-specific inactivation in mice leads to reduced radial growth, less vessel branching, and more vascular regression events.[77] This phenotype is partially reminiscent of the leaky retinal lesions that can be found in CCM mouse models. In the retinas of *Ccm1*- and *Ccm3*-knockout mice, a dense network of dysfunctional vessels can be observed at the periphery of the vascular plexus.[13,16,78] Furthermore, treatment of aortic explants with a Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) peptide, which inhibits the binding of fibronectin to its cognate integrin receptors induced regression of developing microvessels.[79] An altered dispersion of tight junction proteins which are important elements of the blood brain barrier[80] is accompanied by less fibronectin in CCM lesions.[28] In addition, fibronectin may enhance barrier function through its influence on the localization of tight junction proteins.[81] Together, these observations may lead to the hypothesis that disturbance of fibronectin triggers endothelial dysfunction in *Ccm1*- and *Ccm3*-knockout mice.

Taken together, we show that fibronectin was able to rescue a broad spectrum of endothelial alterations that were induced by the disruption of CCM1, CCM2, and CCM3 in human ECs. However, its supplementation neither rescued

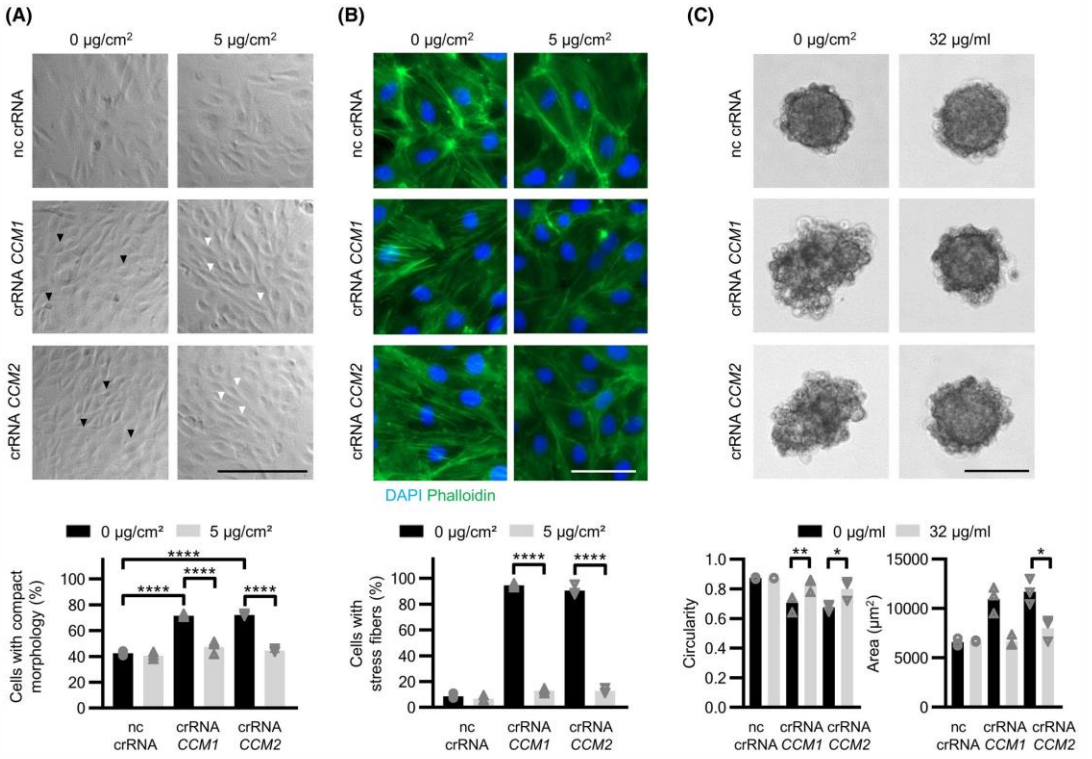

FIGURE 7 Fibronectin replacement attenuates endothelial dysfunction upon CCM1 or CCM2 inactivation in CI-huVECs. A, crRNA:tracrRNA:Cas9 RNP-treated CI-huVECs demonstrated a high proportion of cells with a compact morphology, which was significantly decreased by fibronectin supplementation (1×10^4 cell/well; 96-well plate). Black arrowheads indicate the compact cell shape while white arrowheads indicate cells that regained a spindle-shaped morphology after fibronectin supplementation. Scale bar ≙ 200 µm. B and C, CCM1 and CCM2 inactivation in crRNA:tracrRNA:Cas9 RNP-treated cell mixtures led to an increased stress fiber formation (1×10^4 cells/well; 96-well plate, (B) and an impaired spheroid organization (C), which both were attenuated by fibronectin supplementation. Scale bars ≙ 50 µm (B) and 100 µm (C). crRNA *CCM1* = *CCM1*-targeting RNP, crRNA *CCM2* = *CCM2*-targeting RNP, nc crRNA = non-targeting control RNP. Data are presented as mean and single data points (n = 3). Two-way ANOVA with Holm-Šidák's multiple comparisons test or Student's *t* test were used for statistical analysis: $*P < .05$; $**P < .01$; $***P < .001$; $****P < .0001$

aberrant gene expression signatures in *CCM3*$^{-/-}$ ECs nor inhibited their survival advantage. These observations support the conclusion that the formation and progression of CCM lesions are controlled by a complex network of deregulated pathways. A positive influence on individual signaling cascades and endothelial dysfunctions is not necessarily associated with a complete rescue. Therefore, combinatorial strategies are likely required to prevent CCM formation and progression in a therapeutic setting.

ACKNOWLEDGMENTS

Research reported in this publication was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) [grant number DFG RA2876/2-2 (MR)] and by the Research Network Molecular Medicine of the University Medicine Greifswald [grant number FOVB-2019-01 (MR)]. P. K. E. Dellweg was supported by a scholarship from the Gerhard Domagk program of the University Medicine Greifswald. We thank R. A. Pilz and D. Skowronek for their excellent technical help in CRISPR/Cas9 off-target site analyzes.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

K. Schwefel, S. Spiegler, C.D. Much, and P.K.E. Dellweg performed most of the experiments; K. Schwefel, B. C. Kirchmaier, U. Felbor, and M. Rath contributed to the intellectual conception and the design of the study; M. Rath, K. Riedel, and U. Felbor supervised the experiments; K. Schwefel, S. Spiegler, P.K.E. Dellweg, B.C. Kirchmaier,

T. M. Strom, and M. Rath analyzed the data; K. Schwefel, S. Spiegler, P.K.E. Dellweg, and J. Pané-Farré performed the microscopy experiments; all authors contributed to interpretation of the results; K. Schwefel, U. Felbor, and M. Rath drafted the manuscript and all authors contributed to writing.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All relevant data are published within the paper and its supporting additional files.

REFERENCES

1. Gil-Nagel A, Wilcox KJ, Stewart JM, Anderson VE, Leppik IE, Rich SS. Familial cerebral cavernous angioma: clinical analysis of a family and phenotypic classification. *Epilepsy Res*. 1995;21:27-36.
2. Marchuk DA, Srinivasan S, Squire TL, Zawistowski JS. Vascular morphogenesis: tales of two syndromes. *Hum Mol Genet*. 2003;12(Spec No 1), R97-R112.
3. Günel M, Awad IA, Anson J, Lifton RP. Mapping a gene causing cerebral cavernous malformation to 7q11.2-q21. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:6620-6624.
4. Whitehead KJ, Plummer NW, Adams JA, Marchuk DA, Li DY. Ccm1 is required for arterial morphogenesis: implications for the etiology of human cavernous malformations. *Development*. 2004;131:1437-1448.
5. Laberge-le Couteulx S, Jung HH, Labauge P, et al. Truncating mutations in *CCM1*, encoding KRIT1, cause hereditary cavernous angiomas. *Nat Genet*. 1999;23:189-193.
6. Sahoo T, Johnson EW, Thomas JW, et al. Mutations in the gene encoding KRIT1, a Krev-1/rap1a binding protein, cause cerebral cavernous malformations (CCM1). *Hum Mol Genet*. 1999;8:2325-2333.
7. Liquori CL, Berg MJ, Siegel AM, et al. Mutations in a gene encoding a novel protein containing a phosphotyrosine-binding domain cause type 2 cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet*. 2003;73:1459-1464.
8. Denier C, Goutagny S, Labauge P, et al. Mutations within the *MGC4607* gene cause cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet*. 2004;74:326-337.
9. Bergametti F, Denier C, Labauge P, et al. Mutations within the *programmed cell death 10* gene cause cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet*. 2005;76:42-51.
10. Spiegler S, Rath M, Paperlein C, Felbor U. Cerebral Cavernous Malformations: An Update On Prevalence, Molecular Genetic Analyses, And Genetic Counselling. *Mol Syndromol*. 2018;9:60-69.
11. Cigoli MS, Avemaria F, De Benedetti S, et al. *PDCD10* gene mutations in multiple cerebral cavernous malformations. *PLoS ONE*. 2014;9:e110438.
12. Draheim KM, Fisher OS, Boggon TJ, Calderwood DA. Cerebral cavernous malformation proteins at a glance. *J Cell Sci*. 2014; 127:701-707.
13. Zhou HJ, Qin L, Zhang H, et al. Endothelial exocytosis of angiopoietin-2 resulting from CCM3 deficiency contributes to cerebral cavernous malformation. *Nat Med*. 2016;22:1033-1042.
14. Zhou Z, Tang AT, Wong WY, et al. Cerebral cavernous malformations arise from endothelial gain of MEKK3-KLF2/4 signalling. *Nature*. 2016;532:122-126.
15. Zhou Z, Rawnsley DR, Goddard LM, et al. The cerebral cavernous malformation pathway controls cardiac development via regulation of endocardial MEKK3 signaling and KLF expression. *Dev Cell*. 2015;32:168-180.
16. Cuttano R, Rudini N, Bravi L, et al. KLF4 is a key determinant in the development and progression of cerebral cavernous malformations. *EMBO Mol Med*. 2016;8:6-24.
17. Renz M, Otten C, Faurobert E, et al. Regulation of beta1 integrin-Klf2-mediated angiogenesis by CCM proteins. *Dev Cell*. 2015; 32:181-190.
18. Detter MR, Snellings DA, Marchuk DA. Cerebral cavernous malformations develop through clonal expansion of mutant endothelial cells. *Circ Res*. 2018;123:1143-1151.
19. Malinverno M, Maderna C, Abu Taha A, et al. Endothelial cell clonal expansion in the development of cerebral cavernous malformations. *Nat Commun*. 2019;10:2761.
20. Schwefel K, Spiegler S, Ameling S, et al. Biallelic *CCM3* mutations cause a clonogenic survival advantage and endothelial cell stiffening. *J Cell Mol Med*. 2019;23:1771-1783.
21. Davis GE, Senger DR. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res*. 2005;97:1093-1107.
22. Perruzzi CA, de Fougerolles AR, Koteliansky VE, Whelan MC, Westlin WF, Senger DR. Functional overlap and cooperativity among alphav and beta1 integrin subfamilies during skin angiogenesis. *J Invest Dermatol*. 2003;120:1100-1109.
23. Senger DR, Perruzzi CA. Cell migration promoted by a potent GRGDS-containing thrombin-cleavage fragment of osteopontin. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1314:13-24.
24. Lopez-Ramirez MA, Fonseca G, Zeineddine HA, et al. Thrombospondin1 (TSP1) replacement prevents cerebral cavernous malformations. *J Exp Med*. 2017;214:3331-3346.
25. Whelan MC, Senger DR. Collagen I initiates endothelial cell morphogenesis by inducing actin polymerization through suppression of cyclic AMP and protein kinase A. *J Biol Chem*. 2003;278:327-334.
26. Liu Y, Senger DR. Matrix-specific activation of Src and Rho initiates capillary morphogenesis of endothelial cells. *FASEB J*. 2004;18:457-468.
27. Kim S, Bell K, Mousa SA, Varner JA. Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin alpha5beta1 with the central cell-binding domain of fibronectin. *Am J Pathol*. 2000;156:1345-1362.
28. Schneider H, Errede M, Ulrich NH, Virgintino D, Frei K, Bertalanffy H. Impairment of tight junctions and glucose transport in endothelial cells of human cerebral cavernous malformations. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2011;70:417-429.
29. Liu W, Draheim KM, Zhang R, Calderwood DA, Boggon TJ. Mechanism for KRIT1 release of ICAP1-mediated suppression of integrin activation. *Mol Cell*. 2013;49:719-729.
30. Jilkova ZM, Lisowska J, Manet S, et al. CCM proteins control endothelial beta1 integrin dependent response to shear stress. *Biol Open*. 2014;3:1228-1235.
31. Stockton RA, Shenkar R, Awad IA, Ginsberg MH. Cerebral cavernous malformations proteins inhibit Rho kinase to stabilize vascular integrity. *J Exp Med*. 2010;207:881-896.
32. Whitehead KJ, Chan AC, Navankasattusas S, et al. The cerebral cavernous malformation signaling pathway promotes vascular integrity via Rho GTPases. *Nat Med*. 2009;15:177-184.
33. Shenkar R, Shi C, Rebeiz T, et al. Exceptional aggressiveness of cerebral cavernous malformation disease associated with *PDCD10* mutations. *Genet Med*. 2015;17:188-196.
34. Lampugnani MG, Orsenigo F, Rudini N, et al. CCM1 regulates vascular-lumen organization by inducing endothelial polarity. *J Cell Sci*. 2010;123:1073-1080.

35. Stamatovic SM, Sladojevic N, Keep RF, Andjelkovic AV. PDCD10 (CCM3) regulates brain endothelial barrier integrity in cerebral cavernous malformation type 3: role of CCM3-ERK1/2-cortactin cross-talk. *Acta Neuropathol*. 2015;130:731-750.
36. Stemmer M, Thumberger T, Del Sol Keyer M, Wittbrodt J, Mateo JL. CCTop: an intuitive, flexible and reliable CRISPR/Cas9 Target Prediction Tool. *PLoS ONE*. 2015;10:e0124633.
37. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq–a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2015;31:166-169.
38. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15:550.
39. Brenner KA, Corbett SA, Schwarzbauer JE. Regulation of fibronectin matrix assembly by activated Ras in transformed cells. *Oncogene*. 2000;19:3156-3163.
40. Lorenz L, Axnick J, Buschmann T, et al. Mechanosensing by beta1 integrin induces angiocrine signals for liver growth and survival. *Nature*. 2018;562:128-132.
41. Tin A, Li Y, Brody JA, et al. Large-scale whole-exome sequencing association studies identify rare functional variants influencing serum urate levels. *Nat Commun*. 2018;9:4228.
42. Carpentier G, Martinelli M, Courty J, Cascone I. Angiogenesis analyzer for ImageJ. In: *4th ImageJ User and Developer Conference proceedings*, Mondorf-les-Bains, Luxembourg. ISBN: 2-919941-18-6; 2012:198-201.
43. Singh P, Carraher C, Schwarzbauer JE. Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2010;26:397-419.
44. Sabbagh MF, Heng JS, Luo C, et al. Transcriptional and epigenomic landscapes of CNS and non-CNS vascular endothelial cells. *eLife*. 2018;7:e36187.
45. Auerbach R, Lewis R, Shinners B, Kubai L, Akhtar N. Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin Chem*. 2003;49:32-40.
46. Draheim KM, Li X, Zhang R, et al. CCM2-CCM3 interaction stabilizes their protein expression and permits endothelial network formation. *J Cell Biol*. 2015;208:987-1001.
47. Borikova AL, Dibble CF, Sciaky N, et al. Rho kinase inhibition rescues the endothelial cell cerebral cavernous malformation phenotype. *J Biol Chem*. 2010;285:11760-11764.
48. Huveneers S, Danen EH. Adhesion signaling-crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci*. 2009;122:1059-1069.
49. Sarelius IH, Glading AJ. Control of vascular permeability by adhesion molecules. *Tissue Barriers*. 2015;3:e985954.
50. Wu MH. Endothelial focal adhesions and barrier function. *J Physiol*. 2005;569:359-366.
51. Boon RA, Leyen TA, Fontijn RD, et al. KLF2-induced actin shear fibers control both alignment to flow and JNK signaling in vascular endothelium. *Blood*. 2010;115:2533-2542.
52. Wierzbicka-Patynowski I, Schwarzbauer JE. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *J Cell Sci*. 2003;116:3269-3276.
53. Hocking DC, Sottile J, McKeown-Longo PJ. Activation of distinct alpha5beta1-mediated signaling pathways by fibronectin's cell adhesion and matrix assembly domains. *J Cell Biol*. 1998;141:241-253.
54. McKeown-Longo PJ, Mosher DF. Interaction of the 70,000-mol-wt amino-terminal fragment of fibronectin with the matrix-assembly receptor of fibroblasts. *J Cell Biol*. 1985;100:364-374.
55. Spiegler S, Rath M, Much CD, Sendtner BS, Felbor U. Precise *CCM1* gene correction and inactivation in patient-derived endothelial cells: modeling Knudson's two-hit hypothesis in vitro. *Mol Genet Genomic*. 2019;Med:e755.
56. Castro M, Lavina B, Ando K, et al. CDC42 deletion elicits cerebral vascular malformations via increased MEKK3-dependent KLF4 expression. *Circ Res*. 2019;124:1240-1252.
57. Fischer A, Zalvide J, Faurobert E, Albiges-Rizo C, Tournier-Lasserve E. Cerebral cavernous malformations: from *CCM* genes to endothelial cell homeostasis. *Trends Mol Med*. 2013;19:302-308.
58. Wei S, Li Y, Polster SP, Weber CR, Awad IA, Shen L. Cerebral cavernous malformation proteins in barrier maintenance and regulation. *Int J Mol Sci*. 2020;21:675.
59. Goudreault M, D'Ambrosio LM, Kean MJ, et al. A PP2A phosphatase high density interaction network identifies a novel striatin-interacting phosphatase and kinase complex linked to the cerebral cavernous malformation 3 (CCM3) protein. *Mol Cell Proteomics*. 2009;8:157-171.
60. Yoruk B, Gillers BS, Chi NC, Scott IC. Ccm3 functions in a manner distinct from Ccm1 and Ccm2 in a zebrafish model of CCM vascular disease. *Dev Biol*. 2012;362:121-131.
61. Fidalgo M, Fraile M, Pires A, Force T, Pombo C, Zalvide J. CCM3/PDCD10 stabilizes GCKIII proteins to promote Golgi assembly and cell orientation. *J Cell Sci*. 2010;123:1274-1284.
62. Voss K, Stahl S, Schleider E, et al. CCM3 interacts with CCM2 indicating common pathogenesis for cerebral cavernous malformations. *Neurogenetics*. 2007;8:249-256.
63. Stahl S, Gaetzner S, Voss K, et al. Novel *CCM1*, *CCM2*, and *CCM3* mutations in patients with cerebral cavernous malformations: in-frame deletion in CCM2 prevents formation of a CCM1/CCM2/CCM3 protein complex. *Hum Mutat*. 2008;29:709-717.
64. Glading A, Han J, Stockton RA, Ginsberg MH. KRIT-1/CCM1 is a Rap1 effector that regulates endothelial cell cell junctions. *J Cell Biol*. 2007;179:247-254.
65. Faurobert E, Rome C, Lisowska J, et al. CCM1-ICAP-1 complex controls beta1 integrin-dependent endothelial contractility and fibronectin remodeling. *J Cell Biol*. 2013;202:545-561.
66. Otten C, Knox J, Boulday G, et al. Systematic pharmacological screens uncover novel pathways involved in cerebral cavernous malformations. *EMBO Mol Med*. 2018;10.
67. Sun Z, Guo SS, Fässler R. Integrin-mediated mechanotransduction. *J Cell Biol*. 2016;215:445-456.
68. Jansen KA, Atherton P, Ballestrem C. Mechanotransduction at the cell-matrix interface. *Semin Cell Dev Biol*. 2017;71:75-83.
69. Huveneers S, Truong H, Fassler R, Sonnenberg A, Danen EH. Binding of soluble fibronectin to integrin alpha5 beta1-link to focal adhesion redistribution and contractile shape. *J Cell Sci*. 2008;121:2452-2462.
70. Burridge K, Wittchen ES. The tension mounts: stress fibers as force-generating mechanotransducers. *J Cell Biol*. 2013;200:9-19.
71. Cseh B, Fernandez-Sauze S, Grall D, Schaub S, Doma E, Van Obberghen-Schilling E. Autocrine fibronectin directs matrix assembly and crosstalk between cell-matrix and cell-cell adhesion in vascular endothelial cells. *J Cell Sci*. 2010;123:3989-3999.
72. Tilling T, Korte D, Hoheisel D, Galla HJ. Basement membrane proteins influence brain capillary endothelial barrier function in vitro. *J Neurochem*. 1998;71:1151-1157.
73. Boulday G, Rudini N, Maddaluno L, et al. Developmental timing of CCM2 loss influences cerebral cavernous malformations in mice. *J Exp Med*. 2011;208:1835-1847.
74. Korff T, Augustin HG. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J Cell Biol*. 1998;143:1341-1352.

75. Bauman E, Feijao T, Carvalho DTO, Granja PL, Barrias CC. Xeno-free pre-vascularized spheroids for therapeutic applications. *Sci Rep*. 2018;8:230.
76. Weber GF, Bjerke MA, DeSimone DW. Integrins and cadherins join forces to form adhesive networks. *J Cell Sci*. 2011;124:1183-1193.
77. Turner CJ, Badu-Nkansah K, Hynes RO. Endothelium-derived fibronectin regulates neonatal vascular morphogenesis in an autocrine fashion. *Angiogenesis*. 2017;20:519-531.
78. Maddaluno L, Rudini N, Cuttano R, et al. EndMT contributes to the onset and progression of cerebral cavernous malformations. *Nature*. 2013;498:492-496.
79. Nicosia RF, Bonanno E, Smith M. Fibronectin promotes the elongation of microvessels during angiogenesis in vitro. *J Cell Physiol*. 1993;154:654-661.
80. Liu WY, Wang ZB, Zhang LC, Wei X, Li L. Tight junction in blood-brain barrier: an overview of structure, regulation, and regulator substances. *CNS Neurosci Ther*. 2012;18:609-615.
81. Koval M, Ward C, Findley MK, Roser-Page S, Helms MN, Roman J. Extracellular matrix influences alveolar epithelial claudin expression and barrier function. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010;42:172-180.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Schwefel K, Spiegler S, Kirchmaier BC, et al. Fibronectin rescues aberrant phenotype of endothelial cells lacking either CCM1, CCM2 or CCM3. *The FASEB Journal*. 2020;00:1–16. https://doi.org/10.1096/fj.201902888R

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Auswirkungen des chronischen Verlustes von CCM3 4
Abbildung 2: Modulation der *FBLN5*-Expression und seine Auswirkung auf Zelleigenschaften 10
Abbildung 3: Auswirkungen von POSTN auf Zelleigenschaften. 13
Abbildung 4: Morphologie der *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs und *CCM3*$^{+/+}$ im Zeitverlauf nach Aussaat 36
Abbildung 5: Verringerte Netzstabilität nach Verlust von CCM3 in CI-huVECs 37
Abbildung 6: Relative mRNA-Expression von *FBLN5* bzw. *POSTN* in *CCM3*$^{+/+}$ und *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs (***, p< 0,001). 38
Abbildung 7: Inhibitorischer Effekt auf die Ausbildung gefäßähnlicher Strukturen durch akut verminderte *FBLN5*-Genexpression 40
Abbildung 8: Inhibitorischer Effekt auf die Ausbildung gefäßähnlicher Strukturen durch akut verminderte *POSTN*-Genexpression 42
Abbildung 9: Zellmorphologie und *Tube Formation* von *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen nach der Hinzugabe von rFBLN5 45
Abbildung 10: Zellmorphologie und *Tube Formation* von *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen nach Hinzugabe von rPOSTN 47
Abbildung 11: rFBLN5 hat keinen Einfluss auf die zellmorphologischen Eigenschaften von *CCM3*$^{+/+}$ Zellen 48
Abbildung 12: Zellmorphologie und *Tube Formation* von *CCM3*$^{+/+}$ Endothelzellen nach Hinzugabe von rPOSTN 50
Abbildung 13: Relative *FBLN5*- bzw. *POSTN*-Expression im Zeitverlauf nach Ablösen mittels Trypsin 72
Abbildung 14: Etablierung siRNA-Transfektion gegen *FBLN5* bzw. *POSTN* 72

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete *CCM3*$^{-/-}$ CI-huVECs.....15
Tabelle 2: siRNAs zur Herunterregulation von *FBLN5* bzw. *POSTN* 22
Tabelle 3: Primer für Amplifikation der CRISPR/Cas9 Zielregion im *CCM3*-Gen 22
Tabelle 4: Primer für qPCR 22
Tabelle 5: PCR-Programm zur Amplifikation von *FBLN5* bzw. *POSTN* 30
Tabelle 6: PCR-Programm zur Amplifikation der Zielgene *POSTN* bzw. *FBLN5* und des *Housekeeping*-Gens *RPLP0* 31
Tabelle 7: PCR-Ansatz und -Programm zur Amplifikation der Zielregionen mittels OneTaq®-Polymerase. 32
Tabelle 8: Reaktionsansatz für die Markierung einer Probe zur Sanger-Sequenzierung und PCR-Programm. 33

11. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum Unterschrift

12. Danksagung

Zu allererst bedanke ich mich herzlichst bei Frau Prof. Dr. Ute Felbor, die es mir ermöglichte, an diesem spannenden Forschungsthema zu arbeiten. Ihre hervorragende wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung sowie die dauerhafte Ansprechbarkeit erleichterten mir das Fertigstellen meiner Arbeit sehr.

Mein großer Dank gilt Herrn Dr. Matthias Rath, der mir bereits bei der Antragstellung für das Gerhard Domagk-Stipendium und bei der Konkretisierung meines Forschungsthemas zur Seite stand. Die konstruktiven Diskussionen ermutigten mich stets, lösungsorientiert zu denken. Deine ausgezeichnete Erreichbarkeit, Hilfestellung bei jeglichen Schwierigkeiten und deine herausragend schnellen Korrekturhinweise im Schreibprozess waren entscheidend für die zeitnahe Fertigstellung dieser Arbeit.

Besonders bedanke ich mich bei Herrn Dr. Konrad Schwefel, der mich in etablierte Methoden einarbeitete und der Optimierung von experimentellen Abläufen jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Die gegenseitige Unterstützung schaffte ein angenehmes Arbeitsklima, in dem man sich auf einander verlassen konnte.

Mein Dank richtet sich auch an Frau Dr. Stefanie Spiegler und an Frau Christiane Much, die mich ebenfalls jederzeit bei Fragen und Anliegen unterstützen. Außerdem bedanke ich mich bei allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für Ihren stets hilfsbereiten Umgang.

Zusätzlich möchte ich mich bei dem Gerhard Domagk Nachwuchsförderprogramm der Universitätsmedizin Greifswald für die finanzielle Unterstützung und die Förderung meines naturwissenschaftlichen Interesses bedanken.

Zum Schluss bedanke ich mich herzlich bei meinem inzwischen verstorbenen Großvater, Herrn Prof. Dr. Hans-Werner Dellweg, der meinen Wunsch nach Anfertigen einer experimentellen Doktorarbeit stets bekräftigte. Weiterhin bedanke ich mich sehr bei meinen Eltern, Frau Ursula und Herrn Stephan Dellweg, sowie bei meinem Bruder, Herrn Sebastian Dellweg, die mir trotz der räumlichen Distanz zu jeder Zeit eine enorme emotionale Hilfe waren, damit ich mein Ziel nicht aus den Augen verliere.