



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Regulation of osteoblast differentiation

Barendsz-van der Horst, Geertje

### Citation

Barendsz-van der Horst, G. (2005, November 3). *Regulation of osteoblast differentiation*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4974>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4974>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).



# Samenvatting

## Osteoporose

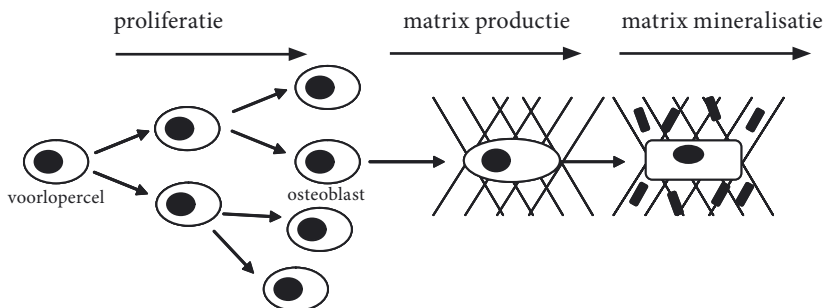
Bot is een dynamisch weefsel en wordt voortdurend afgebroken door osteoclasten, de botafbrekende cellen, terwijl de osteoblasten (botvormende cellen) vervolgens weer voor botaanmaak zorgen. Osteoporose, ook wel botontkalking genoemd, is een skeletziekte die wordt gekarakteriseerd door een lage botmassa en het verlies van botstructuur. Dit leidt tot een verhoogde kans op botbreuken. Osteoporose wordt veroorzaakt doordat de botafbraak door de osteoclasten groter is dan de botaanmaak door osteoblasten. Tot nu toe zijn medicijnen tegen osteoporose vooral gericht op het remmen van de botafbraak (zoals bijvoorbeeld bisphosphonaten). Al eerder verloren gegaan bot kan nog niet worden hersteld. Daarom wordt nu gezocht naar medicijnen die de botvorming kunnen stimuleren. Een van de potentiële kandidaten is het parathyroid hormoon (PTH) en het gerelateerde eiwit (PTHrP). PTH is een bekende stimulator van botafbraak, maar als PTHrP of PTH in lage doseringen met tussenpozen wordt gegeven dan stimuleert het juist de botvorming. Hoe deze tegenstrijdige effecten van PTHrP en PTH tot stand komen is nog niet bekend.

Om het werkingsmechanisme van PTHrP en PTH te onderzoeken en om andere nieuwe anabole medicijnen te ontwikkelen is een betere kennis van de botvormende cel, de osteoblast noodzakelijk.

## Doel van het onderzoek

Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift was om verschillende aspecten van osteoblast differentiatie te bestuderen. Osteoblast differentiatie is het ontwikkelingsproces van voorlopercellen, de mesenchymale stamcellen, tot osteoblasten. In dit proefschrift is als model de KS483 cellijn gebruikt. KS483 cellen kunnen differentiëren van een voorlopercel tot een osteoblast, een vetcel (adipocyte) of een kraakbeencel (chondrocyte) afhankelijk van het gebruikte medium en de kweekomstandigheden.

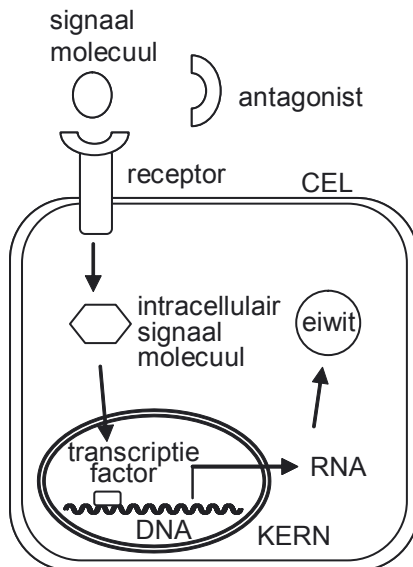
De differentiatie van KS483 cellen naar osteoblasten duurt 18 dagen en is verdeeld in verschillende fases. Eerst vermenigvuldigen de cellen zich (proliferatie fase), daarna wordt er een botmatrix gemaakt (matrix productie en maturatie fase) waarna deze matrix verkalkt (mineralisatie fase) (figuur 1).



**Figuur 1 Osteoblast differentiatie**

Osteoblast differentiatie is verdeeld in een proliferatie, matrix productie en matrix mineralisatie fase.

De differentiatie naar adipocytte duurt 10 dagen, waarbij in de cellen dan duidelijk vetbolletjes zichtbaar zijn. De differentiatie naar chondrocyte duurt ongeveer 28 dagen. De chondrocyten vormen een kraakbeenmatrix, die uiteindelijk mineraliseert. Tijdens het differentiatieproces van voorlopercel naar gespecialiseerde cel heeft de voorlopercel signalen nodig om te weten hoe hij zich moet ontwikkelen (figuur 2). Voor de differentiatie naar osteoblast zijn er verschillende signaalroutes belangrijk waaronder de BMP, Hedgehog (Hh) en Wnt/ $\beta$ -catenine routes. Daarnaast zijn RunX2 en osterix essentiële transcriptiefactoren voor osteoblast differentiatie. Zonder deze transcriptiefactoren is er geen differentiatie naar osteoblasten mogelijk. In dit proefschrift hebben we de effecten en de regulatie van deze belangrijke signaalroutes tijdens osteoblast differentiatie geanalyseerd. Daarnaast hebben we ook gekeken naar de interactie van deze routes met PTHrP en PTH.



**Figuur 2 Signaalroutes**

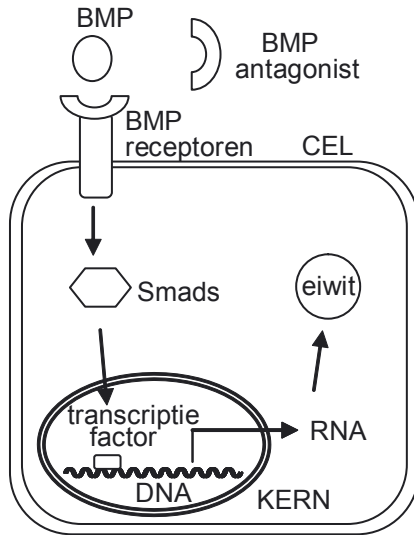
Een cel heeft signalen nodig om te weten hoe hij zich moet ontwikkelen. Als een receptor een signaal krijgt, veroorzaakt de receptor een chemische reactie aan de binnenkant van de cel. Via verschillende eiwitten (intracellulaire signaalmoleculen) wordt het signaal omgezet in een ander signaal dat in de celkern genen kan activeren. Activatie van genen wil zeggen dat informatie opgeslagen als DNA-code in het gen wordt vertaald in RNA (het gen komt tot expressie). Het RNA wordt vervolgens weer vertaald in een eiwit dat zijn werking heeft in de cel, waardoor deze zich anders gaat gedragen. Voor het aflezen van de DNA-code zijn zogenaamde transcriptiefactoren nodig. Het ontvangen signaal bepaalt welke genen worden overgeschreven via het inschakelen van transcriptie factoren die alleen bepaalde genen kunnen activeren. Aan de buitenkant van de cel kan het signaalmolecuul worden weggevangen door de zogenaamde antagonisten. Als gevolg hiervan wordt het signaal niet doorgegeven via de receptor.

## BMP signaalroute

In hoofdstuk 2 zijn de effecten van de BMP signaalroute op osteoblast differentiatie beschreven (figuur 3). Tijdens alle differentiatie fases komen verschillende BMPs, BMP receptoren, intracellulaire signaalmoleculen (Smads) en BMP antagonisten tot expressie. Om na te gaan wat de mogelijke rol van BMP signalering tijdens osteoblast differentiatie is, werden BMPs weggevangen door BMP antagonisten toe

te dienen. De BMP antagonisten blokkeerden osteoblast differentiatie, wat werd bepaald door de activiteit van alkalische fosfatase (ALP), een osteoblast marker, en de hoeveelheid mineraal in de extracellulaire matrix te meten. Uit deze experimenten bleek dat de productie van BMPs door de osteoblast noodzakelijk is tijdens het gehele differentiatieproces.

De behandeling van KS483 cellen met BMPs resulteerde in stimulatie van ALP activiteit en de hoeveelheid mineraal tijdens alle fases van osteoblast differentiatie, wat suggereert dat BMPs niet alleen belangrijk zijn voor de initiatie van de differentiatie, maar ook voor de matrix productie en mineralisatie.



Figuur 3 BMP signaalroute.

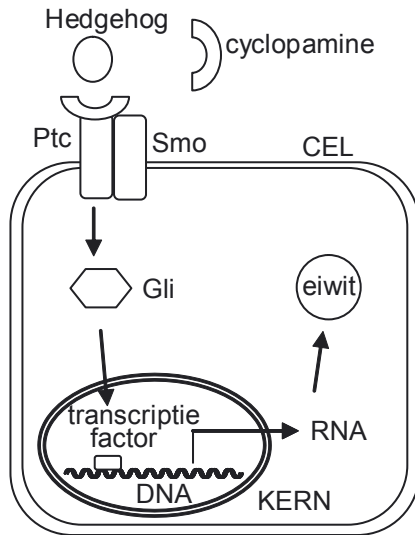
BMPs binden aan de BMP receptoren en via de intracellulaire Smads wordt het signaal doorgegeven naar de kern, waar genen tot expressie worden gebracht.

### Hedgehog signaalroute

Een rol voor de Hedgehog (Hh) signaalroute (figuur 4) tijdens osteoblast differentiatie was eerder aangetoond in een studie waarin Hh de initiatie van osteoblast differentiatie in de botkoker stimuleerde. In hoofdstuk 3 wordt de rol van Hedgehog tijdens matrix productie en mineralisatie en het werkingsmechanisme beschreven. Eerst is de expressie (hoeveelheid mRNA) van Indian Hh (Ihh), de botspecifieke Hh, de Hh receptoren (Ptc1 en Smo) en de intracellulaire signaalmoleculen (Gli's) bestudeerd. De expressie van Ihh, Gli1 en Ptc1 was verhoogd tijdens de matrix maturatie fase, terwijl de expressie van de andere moleculen gelijk bleef. Ihh expressie werd ook gevonden in de osteoblasten in de humerus van een groeiend humaan skelet.

Behandeling van de KS483 cellen met Hh eiwit resulteerde in een matig verhoogde ALP activiteit, terwijl de mineralisatie sterk werd gestimuleerd. Deze effecten werden geremd door de Hh antagonist cyclopamine, dat op zichzelf geen effect had op de differentiatie. Vervolgens werd bepaald tijdens welke fase van osteoblast differentiatie de Hh signaleringsroute belangrijk is. Uit deze experimenten bleek dat voorlopercellen reageerden op Hh, terwijl osteoblasten niet konden worden gestimuleerd.

De Hh geïnduceerde differentiatie werd compleet geremd door toedienen van BMP antagonisten, wat suggereert dat Hh signalering afhankelijk is van functionele BMP signalering. Toedienen van Hh en BMPs aan KS483 cellen resulteerde in synergistisch verhoogde ALP activiteit en mineralisatie. Experimenten toonden aan dat deze synergie op het niveau van de vroege Hh signaal transductie lag, en niet op het niveau van vroege BMP signalering. Hh stimuleerde niet alleen de osteoblast differentiatie, maar remde ook de differentiatie naar adipocyte. Deze data suggereren dat Hh signalering de ontwikkeling van voorlopercellen naar osteoblast stimuleert ten koste van de vetcelvorming. Een andere rol van Hh is de stimulatie van maturatie van vroege osteoblasten.



Figuur 4 Hedgehog signaalroute.

Hh bindt aan de receptor Ptc, waardoor de Smo receptor het signaal kan doorgeven in de cel via Gli's.

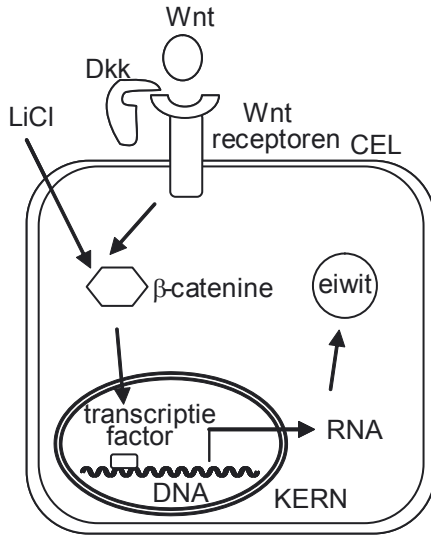
## Wnt/ $\beta$ -catenine signaalroute

Een belangrijke rol voor de Wnt/ $\beta$ -catenine signaalroute (figuur 5) in botvorming is recent aangetoond. Een aantal studies hebben laten zien dat Wnt/ $\beta$ -catenine signalering de proliferatie en differentiatie van osteoblasten stimuleert. In hoofdstuk 5, hebben we de rol van Wnt/ $\beta$ -catenine signalering tijdens matrix vorming en mineralisatie nader bestudeerd.

Het toedienen van Wnt3A of LiCl, een stimulator van de Wnt/ $\beta$ -catenine route, aan KS483 cellen had geen enkel effect op de initiatie van de differentiatie, wat suggereert dat de Wnt/ $\beta$ -catenine signalering al maximaal aanstaat in deze cellen. Dit bleek ook uit experimenten met de Wnt antagonist Dkk-1, waarin toediening van Dkk-1 de initiatie van osteoblast differentiatie remde.

Behandeling van KS483 cellen met Wnt3A of LiCl resulteerde in een remming van matrix mineralisatie. LiCl remde ook de mineralisatie van muizen beenmerg cellen. Opvallend was dat Wnt3A alleen in vroege osteoblasten de Wnt/ $\beta$ -catenine signaalroute kon aanzetten, terwijl LiCl dit kon in alle stadia van differentiatie. Dit zou kunnen komen door verlaagde expressie van Wnt receptoren, of door verhoogde

expressie van Wnt antagonisten in volwassen osteoblasten. Experimenten toonden aan dat de expressie van Wnt receptoren niet veranderde tijdens osteoblast differentiatie, terwijl de expressie van de Wnt antagonisten juist werd geïnduceerd. Dit zou kunnen betekenen dat de Wnt antagonisten Dkk-1 en Dkk-2 Wnt/ $\beta$ -catenine signalering remmen, wat noodzakelijk is voor mineralisatie van de matrix. Om dit te onderzoeken, werden stabiele KS483 cellijnen gemaakt waarin Dkk-1 of Dkk-2 expressie sterk werd verminderd (Dkk-1<sub>si</sub> en Dkk-2<sub>si</sub>). Differentiatie en cel proliferatie waren geremd in de Dkk-2<sub>si</sub>, terwijl mineralisatie was geremd in Dkk-1<sub>si</sub> en Dkk-2<sub>si</sub>. Samenvattend: remming van de Wnt/ $\beta$ -catenine signalering door inductie van de expressie van de antagonisten Dkk-1 en Dkk-2 is essentieel voor matrix mineralisatie.



Figuur 5 Wnt signaalroute.

Wnt bindt aan de Wnt receptoren. In de cel wordt  $\beta$ -catenine geactiveerd, waarna het naar de kern kan gaan om samen met transcriptiefactoren genen te activeren.

## Werkingsmechanisme van PTH en PTHrP

In hoofdstuk 6 laten we zien dat PTHrP en PTH de differentiatie van voorlopercel naar osteoblast remt, onafhankelijk van de dosering, tijd van toevoegen of de differentiatie status van de cel. Deze remming zou kunnen plaatsvinden doordat PTHrP belangrijke signaalroutes voor osteoblast differentiatie remt of doordat PTHrP osteoblast specifieke transcriptiefactoren remt. Deze remming kan plaatsvinden op allerlei niveaus, zoals (1) remming van de expressie van factoren in de BMP of Hh signaalroutes, (2) remming van de signalering van deze signaalroutes of (3) remming van de expressie of activiteit van de transcriptiefactoren RunX2 en Osterix.

Om na te gaan of PTHrP osteoblast differentiatie kon remmen door de BMP route te blokkeren hebben we BMPs en PTHrP toegediend aan KS483 cellen. PTHrP kon inderdaad de BMP geïnduceerde osteoblast differentiatie remmen en omgekeerd. Uit andere experimenten bleek echter dat deze remming waarschijnlijk indirect is.

PTHrP zou ook een remmend effect kunnen hebben op osteoblast differentiatie door

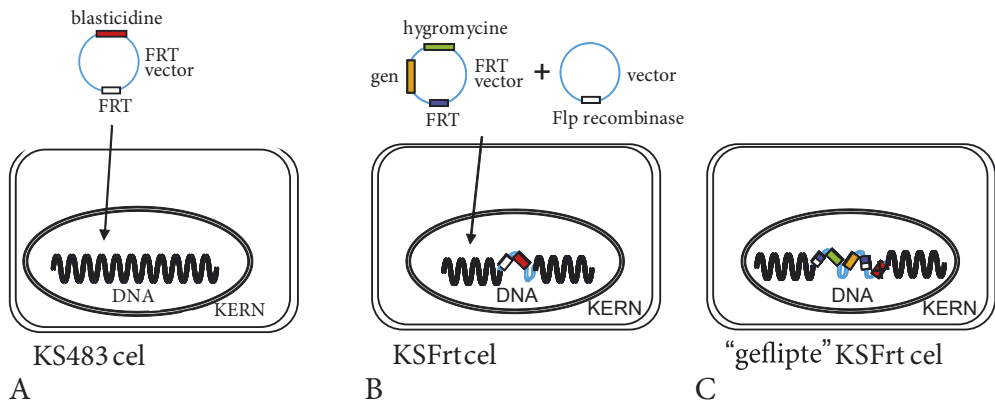
de Hh route te onderdrukken. Interacties tussen PTHrP en de Hh route waren al eerder beschreven in de groeischijf. PTHrP kon de Hh geïnduceerde osteoblast differentiatie remmen en omgekeerd kon hedgehog het effect van PTHrP opheffen. Een van de oorzaken hiervan kan zijn dat in ongedifferentieerde cellen PTHrP de expressie van componenten van de Hh signaal route kon remmen.

### KSFrt model systeem

In hoofdstuk 4 hebben we een model gemaakt waarbij KS483 cellen kunnen worden gebruikt om gemakkelijk en reproduceerbaar stabiele cellijnen te maken door middel van plaats specifieke homologe recombinatie. Daarvoor werd een unieke FRT site geïntroduceerd in het genoom (DNA) van de KS483 cellen, waardoor de KSFrt cellijnen ontstonden (figuur 3). Deze FRT site werd vervolgens gebruikt om genen te introduceren in het genoom in combinatie met positieve selectie door middel van een verandering in resistentie tegen antibiotica. Het voordeel van dit systeem is, dat er altijd één kopie van het gen terechtkomt op dezelfde plek in het genoom. In de KSFrt cellen kunnen bepaalde genen worden geïntroduceerd en kan de expressie van genen worden verhoogd. De expressie van genen kan ook sterk worden verminderd door middel van RNA interference (RNAi). Daarvoor is een nieuwe RNAi vector gemaakt waarbij met de introductie van een kopie van de RNAi vector de expressie van een gen voldoende kan worden geremd.

Dit model kan worden gebruikt om allerlei (onbekende) genen te introduceren, of juist de expressie van bepaalde genen te verminderen, en vervolgens de effecten te bekijken op de differentiatie naar osteoblast, adipocyte of chondrocyte.

Deze studies kunnen als uitgangspunt worden gebruikt voor de ontwikkeling van medicijnen die specifiek op de osteoblast zijn gericht



**Figuur 6 KSFrt model systeem**

A) Een FRT vector met een FRT site en een blastidicine resistentie gen worden in het DNA van de KS483 cel gebracht. Deze FRT vector kan op een willekeurige plaats in het DNA terechtkomen. De cellen met de FRT vector in het DNA overleven nu behandelingen met blastidicine en worden KSFrt cellen genoemd.

B) Een FRT vector met een FRT site, een hygromycine resistentie gen en een gen van interesse worden samen met een vector dat het Flp recombinase bevat in het DNA van de KSFrt cel gebracht. Met behulp van de Flp recombinase komt het gen van interesse en het hygromycine resistentie gen in de FRT site terecht die al in het DNA zat. Deze cellen zijn nu hygromycine resistent en brengen het gen van interesse tot expressie.