



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **The role of PTHrP in chondrocyte differentiation.**

Hoogendam, J.

### **Citation**

Hoogendam, J. (2006, December 6). *The role of PTHrP in chondrocyte differentiation*. Ponsen & Looijen b.v., Wageningen. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/5422>

Version: Corrected Publisher's Version

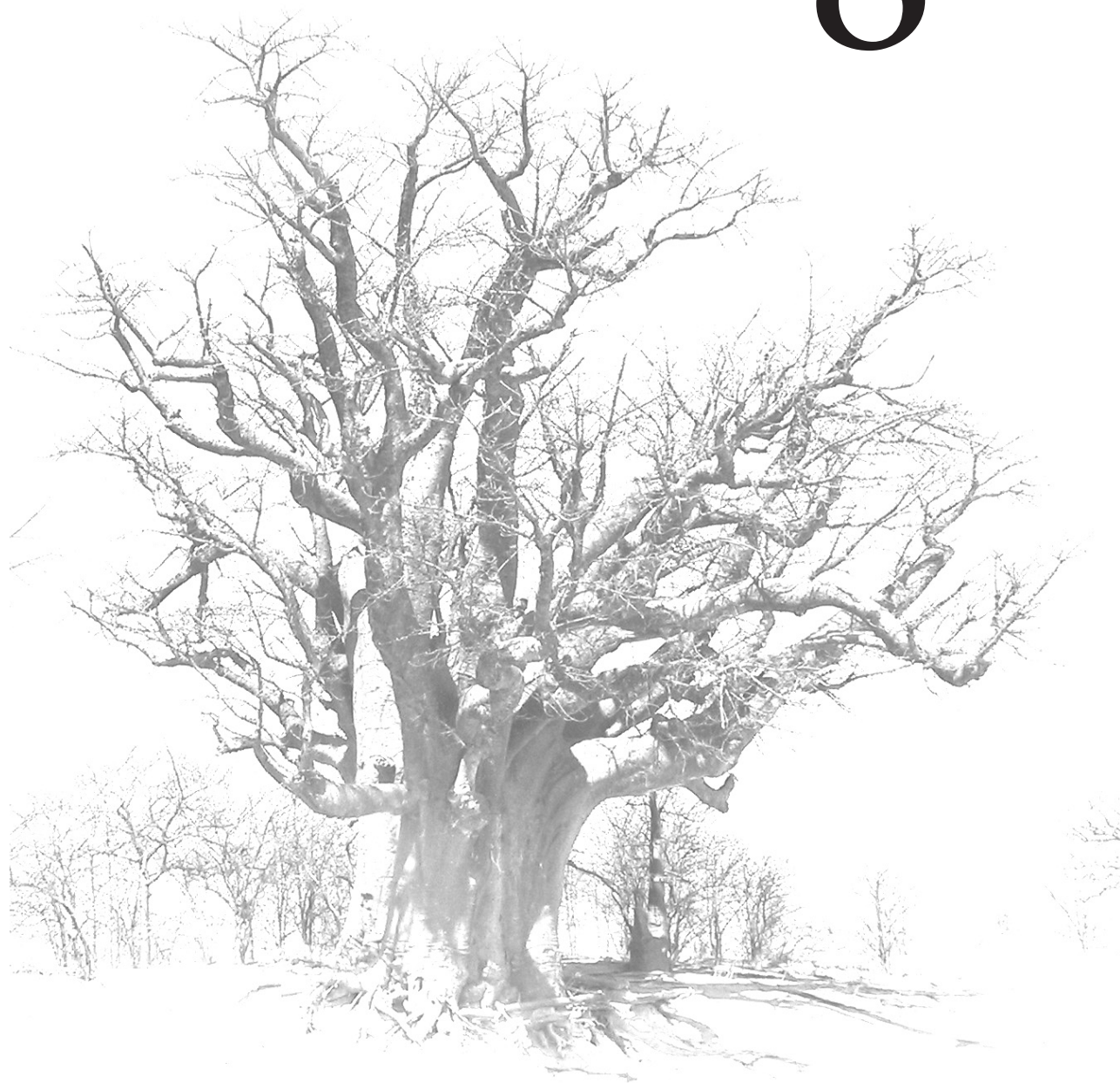
License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/5422>

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

# Summary/Samenvatting

# 8





## Summary

Longitudinal growth is the key characteristic that distinguishes children from adults. Growth is regulated in the growth plates, which are layers of cartilage located at the ends of the long bones. The cartilage cells are called chondrocytes and go through a coordinated program of proliferation, maturation, hypertrophic differentiation, apoptosis and replacement by bone. This process is called endochondral bone formation. A complex network of hormones (endocrine regulators) is involved in this process. The mechanism of actions of these hormones is not completely understood. A possible mechanism of action is the interaction of systemic hormones with locally produced growth factors (paracrine regulators), like the Parathyroid Hormone (PTH) related Peptide (PTHrP) and its receptor, the type 1 PTH/PTHrP receptor (PTHr1). PTHrP and PTHr1 are among the key regulators in the process of endochondral bone formation. The working mechanism of PTHrP signalling, alone or in combination with other growth factors or systemic hormones, in endochondral bone formation is not completely understood. In this thesis, we have further addressed the actions of PTHrP in the complex network of endocrine and paracrine regulation of endochondral bone formation.

Disruption of PTHr1 signalling, caused by a loss of function mutation in the PTHr1 gene, results in the human in Blomstrand Osteochondrodysplasia (BOCD). BOCD can be divided into two types, depending on the severity of the skeletal abnormalities, with type I as the most severe form. The molecular basis for the heterogenic presentation is unknown. In chapter 2 the underlying causative factor of this heterogeneity in clinical presentation of BOCD is addressed. We performed mutation analysis in 2 families with type I BOCD and in 3 families with the less severe form, type II BOCD. The latter group includes 1 case that has not been described before. In one of the type I BOCD cases a nonsense mutation (R104X) was found, resulting in a truncated PTHr1, while in the second type I BOCD case no receptor mutation was identified. A splicing defect (intronM4+27C>T) was demonstrated in one of the type II BOCD cases. In the other 2 families with type II BOCD a previously identified missense P132L mutation was found. Functional analysis demonstrated a near complete inactivation of the PTHr1 with low residual activity in the type II BOCD cases. In combination with published data, we concluded that a complete inactivation of the PTHr1 causes type I BOCD, whereas the relatively milder presentation of type II BOCD is caused by low levels of residual activity due to a near complete inactivation of the PTHr1.

In chapter 3 we investigated the role of the adaptor proteins for the PTHr1, the PDZ domain containing proteins Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor 1 (Nherf1) and Nherf2, in endochondral bone formation and PTHr1 signalling. Using in situ hybridization we showed that Nherf1 and Nherf2 mRNAs are expressed during endochondral bone formation by osteoblasts in the bone collar and by chondrocytes in the growth plate. In addition, overexpression of Nherf1 and Nherf2 in KS483 mesenchymal progenitor cells resulted in opposite effects on terminal osteoblast differentiation. Nherf1 overexpression inhibited, while Nherf2 overexpression stimulated matrix mineralization. Cartilage matrix mineralization was increased in the Nherf2, but not in the Nherf1 overexpressing cell line. Overexpression of Nherf1 or Nherf2 had no effect on the production of early chondrocyte markers, the glycosaminoglycans (GAGs). PTHrP inhibited osteoblastic matrix mineralization and GAG production in chondrocytes. Overexpression of Nherf1 or Nherf2 did not change the effect of PTHrP treatment on osteoblast and chondrocyte differentiation. We concluded that the

distinct actions of Nherf1 and Nherf2 are probably due to the recruitment of different target molecules, like transcription factors, receptors and signalling molecules.

We used the chondrogenic ATDC5 cell line and performed cDNA microarray analysis to identify early PTHrP response genes in chondrocytes and to recognize interactions with other regulatory factors in chapter 4. For this purpose, ATDC5 cells were treated for 1, 2, and 4 hours with PTHrP. By applying very stringent criteria for data generation and by performing validation studies we have produced a small list of early PTHrP response genes, including 7 upregulated (RGS2, SGK, Upar, IER3, Ptp4a1, Stat3, and Csrp2) and 5 downregulated (Sf3a2, Gab1, DYM, LamRI and Acvr2b) genes. The majority of these genes were implicated in signal transduction and regulation. The early response genes were part of a generalized response to PTHrP, since they were also identified as PTHrP response genes in osteoblasts. The majority of the upregulated early response genes contained CREB and AP-1 transcription factor binding sites in their promoter regions, suggesting that CREB and AP-1 are predominantly involved in upregulation of transcription of PTHrP target genes. Among the early response genes were mediators of the Janus Kinase (Jak)/Signal transducer and activator of transcription (Stat) pathway. In addition, several Stat transcription factor binding sites were predicted in the promoter regions of the early response genes. Furthermore, in transient transfection assays we showed that PTHrP positively regulated the posttranslational activity of Stat3 and negatively regulated the posttranslational activity of Stat5a and Stat5b. This data is suggestive for a previously not recognized interaction between PTHrP and Jak/Stat signalling.

In chapter 5 the identification of late PTHrP target genes using the ATDC5 cell line and cDNA microarray analysis is described. For the identification of late PTHrP target genes the ATDC5 cells were treated for 24 and 72 hours with PTHrP. By applying very stringent criteria for data generation and by performing validation studies we have produced a small list of late PTHrP target genes. The list of late response genes included 3 upregulated (IGFBP4, Csrp2, and Ecm1) and 6 downregulated (Col9a1, Col2a1, Agc, Hmgn2, Calm1, and Mxd4) genes. The majority of the late response genes code for structural proteins belonging to the extracellular matrix. The expression of late PTHrP response genes varied between different cell types, suggesting that the expression of late response genes is dependent on the cellular context of the PTHrP responsive cells.

The early and late response genes were validated by quantitative PCR (qPCR) analysis. While the technical approach of qPCR is straightforward, the statistical analysis of qPCR data is less clear. We developed the Double Delta Model (DDM) to calculate p-values and confidence bands in data derived from qPCR analysis, which is described in chapter 6.

In chapter 7 the major findings of this thesis are summarized and critically reviewed in relation to current literature. These findings include the discussion of the quality of cDNA microarrays and the interactions of PTHrP with other regulators of endochondral bone formation.

## **Samenvatting (Summary in Dutch)**

Lengtegroei is één van de belangrijkste verschillen tussen kinderen en volwassenen. De groei wordt gereguleerd in de groeischijven. De groeischijven bevinden zich aan de distale uiteinden van de pijpbeenderen en bestaan uit kraakbeen. De cellen in de groeischijf worden kraakbeencellen of chondrocyten genoemd. Deze chondrocyten doorlopen een gecontroleerd

programma van celdeling (proliferatie), maturatie, differentiatie en geprogrammeerde celdood (apoptose). Dit proces eindigt met de vervanging van het kraakbeen door bot en wordt endochondrale botvorming genoemd. Een complex netwerk van hormonen (endocriene regulatoren) is betrokken bij de regulatie van dit proces. Hoe deze regulatie precies verloopt is nog niet helemaal duidelijk. Een mogelijk mechanisme zou kunnen zijn, dat hormonen de activiteit van lokaal geproduceerde groeifactoren (paracriene regulatoren) beïnvloeden, bijvoorbeeld door het reguleren van het “Parathyroid Hormone (PTH) related Peptide” (PTHrP) en de bijbehorende type 1 PTH/PTHrP receptor (PTHr1). PTHrP and PTHr1 behoren tot de groep van belangrijkste regulatoren binnen het proces van de endochondrale botvorming. Het mechanisme waarmee PTHrP endochondrale botvorming reguleert, alleen of in combinatie met hormonen, is nog niet helemaal duidelijk. In dit proefschrift hebben we de werking van PTHrP binnen het complexe netwerk van endocriene en paracriene regulatie van de endochondrale botvorming verder uitgediept.

Een homozygote inactiverende mutatie in het PTHr1 gen, waardoor een onderbreking ontstaat in de signaalroute van de PTHr1, leidt in de mens tot Blomstrand Osteochondrodysplasia (BOCD). Afhankelijk van de ernst van de afwijkingen in het skelet wordt deze ziekte in twee types verdeeld, waarbij type I de meest ernstige vorm is. De moleculaire basis voor deze heterogene presentatie is niet bekend. In hoofdstuk 2 hebben we dit onderzocht met behulp van mutatie analyse in 2 families met type I BOCD en in 3 families met de minder ernstige vorm, type II BOCD. Deze laatste groep bevat een familie, die in hoofdstuk 2 voor het eerst wordt beschreven. In één van de type I BOCD families werd een nonsense mutatie (R104X) gevonden, wat resulteerde in een “getrunkeerd” PTHr1 eiwit. In de tweede type I BOCD familie werd geen mutatie in het PTHr1 gen geïdentificeerd. Een splicingsfout (intronM4+27C>T) werd gevonden in één van de type II BOCD families. De andere twee families met type II BOCD hadden de P132L missense mutatie in het PTHr1 gen. Deze mutatie is al eerder beschreven. Functionele analyse liet in de type II BOCD families een bijna complete inactivatie van de PTHr1 met lage restactiviteit zien. In combinatie met reeds gepubliceerde data hebben we geconcludeerd dat een complete inactivatie van de PTHr1 leidt tot type I BOCD en dat type II BOCD veroorzaakt wordt door een lage restactiviteit van de receptor, wat komt door een niet geheel complete inactivatie van de PTHr1.

In hoofdstuk 3 hebben we de rol van de adaptor eiwitten voor de PTHr1, de PDZ domein bevattende eiwitten “Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor 1” (Nherf1) en Nherf2, in endochondrale botvorming en in PTHr1 signalering onderzocht. Met behulp van in situ hybridisatie hebben we laten zien dat de Nherf1 en Nherf2 mRNAs tot expressie worden gebracht gedurende endochondrale botvorming, in de bot aanmakende cellen (osteoblasten) in de botkoker en in de chondrocyten in de groeischijf. Daarnaast hebben we laten zien dat overexpressie van Nherf1 en Nherf2 in KS483 mesenchymale voorlopercellen resulteerde in tegenovergestelde effecten in terminale osteoblast differentiatie. Nherf1 overexpressie remde de matrix mineralisatie, terwijl Nherf2 overexpressie deze stimuleerde. De mineralisatie van de kraakbeenmatrix was eveneens toegenomen door overexpressie van Nherf2, maar niet door overexpressie van Nherf1. Overexpressie van Nherf1 of Nherf2 veranderde de productie van de vroege chondrocyte markers, de glycosaminoglycanen (GAGs), niet. PTHrP remde de mineralisatie van de botmatrix en remde de GAG productie door chondrocyten. Overexpressie van Nherf1 of Nherf2 veranderde dit effect van PTHrP op osteoblast en chondrocyte

differentiatie niet. De afwijkende effecten van *Nherf1* en *Nherf2* worden mogelijk veroorzaakt door de interactie met verschillende target moleculen, zoals transcriptie factoren, receptoren en signaal moleculen.

In hoofdstuk 4 hebben we gebruikt gemaakt van ATDC5 cellen, die te beschouwen zijn als voorlopercellen van chondrocyten, en cDNA microarray analyse om vroege PTHrP respons genen in chondrocyten te identificeren en om interacties met andere regulatiefactoren te vinden. Voor het identificeren van vroege PTHrP respons genen, zijn de ATDC5 cellen voor 1, 2 en 4 uur gestimuleerd met PTHrP. Door gebruik te maken van zeer strenge selectie criteria en door het doen van validatie studies hebben we een kleine lijst met vroege PTHrP respons genen kunnen maken. Deze lijst bestond uit 7 opgereguleerde (*RGS2*, *SGK*, *Upar*, *IER3*, *Ptp4a1*, *Stat3* en *Csrpe*) en 5 downgereguleerde (*Sf3a2*, *Gab1*, *DYM*, *LamRI* en *Acvr2b*) genen. Het grootste deel van deze genen is betrokken bij de regulatie van signaaltransductie. De vroege respons genen maken deel uit van een meer algemene PTHrP respons, omdat deze genen ook in osteoblasten zijn gevonden als vroege PTHrP respons genen. In de promotor regionen van de meeste opgereguleerde vroege PTHrP respons genen hebben we CREB en AP-1 transcriptiefactor bindingsplaatsen gevonden. Dit suggereert dat CREB en AP-1 bovenal betrokken zijn bij de opregulatie van transcriptie van PTHrP respons genen. De groep van vroege respons genen bevatte eveneens genen die betrokken zijn bij de “Janus Kinase” (Jak)/”Signal transducer and activator of transcription” (Stat) signaalroute. Ook werden verschillende Stat transcriptie factor bindings domeinen voorspeld in de promotor regionen van de vroege respons genen. Daarnaast hebben we laten zien, door gebruik te maken van transiente transfectie analyses, dat PTHrP de posttranslationale activiteit van *Stat3* positief beïnvloedde en dat PTHrP de posttranslationale activiteit van *Stat5a* en *Stat5b* negatief beïnvloedde. Deze bevindingen zijn suggestief voor een niet eerder gevonden interactie tussen PTHrP en Jak/Stat signalering.

In hoofdstuk 5 hebben we late PTHrP respons genen geïdentificeerd, door gebruik te maken van ATDC5 chondrocyte voorlopercellen en cDNA microarray analyse. Om late PTHrP respons genen te identificeren, zijn de ATDC5 cellen voor 24 en 72 uur gestimuleerd met PTHrP. Door gebruik te maken van zeer strenge selectie criteria en door het doen van validatie studies hebben we een kleine lijst met late PTHrP respons genen kunnen maken. Deze lijst bestond uit 3 opgereguleerde (*IGFBP4*, *Csrp2* en *Ecm1*) en 6 downgereguleerde (*Col9a1*, *Col2a1*, *Agc*, *Hmgn2*, *Calm1* en *Mxd4*) genen. Het grootste deel van de late repons genen codeerde voor structurele eiwitten behorende tot de extracellulaire matrix. De expressie van de late PTHrP respons genen verschilde tussen celtypes, wat suggereerde dat de expressie van late response genen afhankelijk is van de cellulaire context van de PTHrP responsieve cellen. De vroege en late PTHrP repons genen zijn gevalideerd met behulp van kwantitative PCR (qPCR) analyse. De technische procedure van qPCR is duidelijk. De statistische analyse van qPCR data daarentegen is minder duidelijk. Om p-waarden en betrouwbaarheids intervallen te berekenen in data van qPCR analyse, hebben we het “Double Delta Model” (DDM) ontwikkeld. Dit is beschreven in hoofdstuk 6.

Tenslotte zijn in hoofdstuk 7 de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift samengevat en bediscussieerd in het licht van de bestaande literatuur. Deze bevindingen omvatten onder andere de discussie over de kwaliteit van de cDNA microarrays en de interacties van PTHrP met andere regulatoren van endochondral botvorming.