



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Inhibition of signaling cascades in osteoblast differentiation and fibrosis

Krause, C.

Citation

Krause, C. (2011, October 5). *Inhibition of signaling cascades in osteoblast differentiation and fibrosis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/17892>

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/1887/17892>

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

Appendix A

Abbreviations

α -SMA	α -smooth muscle actin
ActRII	activin type II receptor
AEC	amino-9-ethyl-carbazole
ALK	activin receptor-like kinase
ALP	alkaline phosphatase
AP1	activator protein 1
APC	adenomatous polyposis coli
ATF4	activating transcription factor-4
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMP	bone morphogenetic protein
BMPRII	BMP type II receptor
bp	base pair
BS3	bis(sulfosuccinimidyl) suberate
BRE	BMP response element
BSA	bovine serum albumin
BSP	bone sialo protein
c-Myc	avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
CCD	cleidocranial dysplasia
Cbf β 1	core binding factor β
CK1	casein kinase 1
CM	conditioned medium
CML	chronic myelogenous leukemia
CNS	central nervous system
Co-Smad	common-mediator Smad
Col-1	type I collagen
CTGF	connective tissue growth factor
DD	Dupuytren's Disease
Dkk	dickkopf

Dlx	distalless homeobox
DMSO	dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dn	dominant negative
DSS	disuccinimidyl suberate
DXA	dual energy X-ray absorptiometry
ECL	enhanced chemiluminescence
ECM	extracellular matrix
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
ERK-1/2	extracellular-signal regulated kinase-1/2
FBS	fetal bovine serum
FGF	fibroblast growth factors
FGFR	fibroblast growth factor receptors
FL	full length
FN	fibronectin
FOP	fibrodysplasia ossificans progressiva
FPLC	fibroblast-populated collagen lattice
FRA	Fos-related antigen
GAPDH	glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GDF	growth and differentiation factor
GIST	gastrointestinal stromal tumor
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GSK3	glycogen synthase kinase 3
HBM	high bone mass
HCl	hydrochloric acid
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
hES	human embryonic stem cells
Hey1	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1
Hh	hegehog protein
HPLC	high-performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
ICC	immunocytohistochemistry
Id1	inhibitor of DNA binding 1
IF	immunofluorescence
IFN- γ	interferon- γ
IFNGR	interferon gamma receptor
IGF	insulin-like growth factor
Ihh	indian hedgehog
IL	interleukin
IP	immunoprecipitation
I-Smad	inhibitory Smads
JAK	janus kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinases

Ka	association constant
Kd	dissociation constant
KO	knockout
Lef	lymphoid enhancer factor
LRP	low-density lipoprotein receptor-related protein
MAD	mother against decapentaplegic
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MMP	matrix metalloproteases
MSC	mesenchymal stem cells
MTS	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)
μ CT	μ computerized tomography
NAC	N-acetyl-L-cystein
NaCl	sodium chloride
NaOH	sodium hydroxide
NFAT	nuclear factor for activated T cells
NH ₄ Cl	ammonium chloride
NICD	notch intracellular domain
NOG	gene encoding the Noggin protein
OC	osteocalcin
Op-1	osteogenic protein-1
OPN	osteopontin
OPPG	osteoporosis-pseudoglioma syndrome
ORF	open reading frame
Osx	Osterix
PAI	plaminogen activator inhibitor
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PEI	polyethylenimine
PFA	paraformaldehyde
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase
PKA	protein kinase A
PKC	protein kinase C
pNPP	para-nitrophenylphosphate
PRDC	protein related to DAN and cerberus
P-Smad	phosphorylated Smad protein
Ptch	tumor suppressor 12-transmembrane protein Patched
PTH	parathyroid hormone
PTH _{LH}	parathyroid hormone-like hormone
PTH _R	parathyroid hormone receptor
PTH(rP)	arathyroid hormone-related protein
Q-PCR	quantitative-PCR
Ras	rat sarcoma

Rev	Revertant
rhBMP	recombinant human BMP protein
R-Smad	receptor-regulated Smad
RU	resonance units
Runx2	Runt-related transcription factor2
SAPK	stress activated protein kinase
Scl	sclerostin
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SE	standard error
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
Smad	contraction of Sma and Mad
Smo	gene encoding the G protein-coupled receptor protein
	Smoothened
SOST	gene encoding the Sclerostin protein
Sostdc1	sclerostin domain containing protein 1
SYM1	proximal symphalangism
SYNS1	multiple synostosis syndrome 1
SV40	simian virus 40
TCF	T-cell factor
TGF- α	transforming growth factor α
TGF- β	transforming growth factor β
TGF- β -R	transforming growth factor receptor
TIMP	tissue inhibitor of matrix metalloproteinases
TNF α	tumor necrosis factor- α
TPA	12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetate
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
VEGF	vascular endothelial growth factor
Vgr-1	vegetal related-1
Wnt	hybrid of Wg (wingless) and Int in <i>Drosophila</i>
wt	wild type

Appendix B

Summary

Despite its title, this book is not solely about the inhibition of signaling pathways, but about the concept of signal modulation. It's thus about the property of signal inducers and their respective activated signaling cascades to be regulated through intrinsic antagonistic feedback- and/or feed forward-loops. But the truth of the matter is that, in order to suggest the book's topic and goal more clearly, I should probably have called it: Modulating the Inhibition of Signaling Drifts involved in Osteoblast Differentiation and Fibrosis – but can you imagine a more lumbering title? In any case, this book is about the venerable topic of what impact signal modulation has on osteoblast differentiation, hence (un)healthy bone formations as well as on signaling drifts in fibrotic traits. This thesis comprises four years of research at the Leiden University Medical Center (The Netherlands), and discusses my perceptions and conclusions on innate osteoblast signaling differentiation modulators such as Noggin and Sclerostin as well as synthetic inhibitors such as PD98059, Glivec® and SB431542 that can influence myofibroblast activity involved in fibrotic traits.

The key findings on osteoblast differentiation modulators Noggin and Sclerostin can be comprehended as followed:

- BMP-6 is more resistant to Noggin inhibition, and more potent in promoting osteoblast differentiation *in vitro* and inducing bone regeneration *in vivo*, when compared to its closely related BMP-7 paralog.
- A systemic analysis of a panel of BMPs revealed that crucial amino acids for the determination of Noggin susceptibility are conserved among BMPs which enables a prediction on Noggin' effect on yet not investigated BMP proteins.
- It is possible to engineer BMP variants, which overcome the Noggin regiment through amino acid substitution which allows for development of more effective, second generation BMP proteins with potential clinical application in spinal fusion, long bone non-union fracture treatment and osteoarthritis.

- Sclerostin exerts its potent bone catabolic effects by antagonizing Wnt signaling in a paracrine and autocrine manner, and BMP signaling selectively in the osteocytes that synthesize simultaneously both Sclerostin and BMP-7 proteins.
- Sclerostin interacts with both the BMP-7 mature- and pro-domain, leading to intracellular retention and proteasomal degradation of BMP-7.
- Sclerostin effects not only Wnt sustained osteoblast dependent bone formation but also BMP and Wnt perpetuated osteocyte dependent bone turnover.

The key findings on my research on the fibrotic trait Dupuytren's Disease can be comprehended as followed:

- Dupuytren's Disease is driven by TGF- β and their respective activated downstream Smad effectors as well as the ERK1/2 MAP kinase signaling.
- BMP-6 and not BMP-7 induced inhibitory effects on both TGF- β and ERK1/2 MAP kinase driven Dupuytren's disease.
- Concurrent inhibition of TGF- β signaling and ERK1/2 MAP kinase signaling through synthetic inhibitors such as SB-431542 and PD98059, respectively, was sufficient to abrogate proliferation and contraction of Dupuytren's fibroblasts which provides new avenues for non-surgical interventions for Dupuytren's disease.

This investigations have shown to me that what we call 'signaling events' only reflect a certain signaling network state that is based on time, location, agonists and antagonists characteristics. In order to get a clear picture on the impact of a certain signaling cascade in tissue development and maintenance one will need to not only look at signaling dynamics of the desired pathway but also always need to reflect this signaling events in the context of surrounding signaling cascades, something I would like to call a 'signaling niche'. Thereby a balanced signaling network is to me the prerequisite of healthy tissue development and maintenance. This does not reflect a labored balance of agonists and antagonists but rather a flexible state of the signaling niche that can act and react on trigger pulses. In any assumable case where this innate adaptability of a signaling network is altered, either through interminable induction or continuous inhibition of trigger pulses one will have to assume that signaling drifts occur which eventually disconnects the signaling network from critical parameters that influence healthy tissue development and maintenance. How many signaling niches actually exist in a cell and whether they influence each other can only be speculated upon. It will be of interest to see in the future whether the rigid coupling of for instance BMPs to BMP receptors and their common Smad effectors will not need to be replaced by superior super-signaling complexes that govern a multitude of signaling events.

Carola Krause, Potsdam, 18 February 2011

Appendix C

Samenvatting

Om het onderwerp en doel van het boek duidelijker aan te geven, had ik het eigenlijk 'Modulating the Inhibition of Signaling Drifts involved in Osteoblast Differentiation and Fibrosis' moeten noemen. Maar kun je je een lompere titel voorstellen? Want anders dan de titel 'Inhibition of Signaling Cascades in Osteoblast Differentiation and Fibrosis' doet vermoeden gaat dit proefschrift niet alleen over het remmen van de signaaloverdracht maar ook over andere manieren waarop de signaaloverdracht beïnvloed kan worden. En dan met name over de eigenschappen van de moleculen die verantwoordelijk zijn voor de signaaloverdracht. Ook de bijbehorende signaaloverdracht routes met hun intrinsieke antagonistische regelsystemen worden behandeld. De invloed van veranderingen in de signaaloverdracht op zowel (on)evenwichtige osteoblast differentiatie, dus op (on)gezonde botvorming, als op aandoeningen van het bindweefsel worden beschreven. Dit proefschrift omvat 4 jaar onderzoek in het Leids Universitair Medisch Centrum (Nederland). Het behandelt mijn waarnemingen en conclusies over moleculen die osteoblast differentiatie kunnen veranderen zoals noggin en Sclerostin . Ook beschrijft het mijn bevindingen over synthetische remmers zoals PD98059, Glivec® en SB431542, die myofibroblast activiteit beïnvloeden in bindweefsel aandoeningen.

De belangrijkste bevindingen over moleculen zoals noggin en Sclerostin die osteoblast differentiatie beïnvloeden kunnen als volgt uitgelegd worden:

- Vergeleken met het nauw verwante BMP-7 is BMP-6 minder gevoelig voor remming door noggin, maar sterker in het stimuleren van osteoblast differentiatie *in vitro* en bot-regeneratie *in vivo*.
- Een systematische analyse van een aantal BMPs liet zien dat aminozuren die bepalend zijn voor de gevoeligheid van BMPs voor noggin hetzelfde zijn bij de verschillende BMPs. Hierdoor wordt het mogelijk om het effect van noggin op nog niet onderzochte BMPs te voorspellen.

- Het is mogelijk om BMP varianten te maken die ongevoelig zijn voor remming door noggin, door bepaalde aminozuren te vervangen. Zo kunnen effectievere tweede generatie BMP eiwitten ontwikkeld worden die mogelijk gebruikt kunnen worden in de kliniek bij de fusie van wervels, de behandeling van niet-helende botbreuken en artrose.
- Het sterk remmende effect van Sclerostin op botvorming is het gevolg van het remmen van Wnt-signalering, zowel op een paracriene als autocriene manier. Ook BMP signalering wordt tegengegaan, maar alleen in de osteocyten die zowel Sclerostin als BMP-7 tegelijk aanmaken.
- Sclerostin reageert zowel met de 'rijpe' vorm van BMP-7 als met het pro-domein, waardoor BMP-7 in de cel achterblijft en wordt afgebroken in het proteasoom.
- Daardoor heeft Sclerostin niet alleen effect op het in stand houden van osteoblast-afhankelijke botvorming door Wnt signalering, maar ook op de osteocyt-afhankelijke bot turnover die door Wnt en BMP in stand wordt gehouden.

De belangrijkste bevindingen van mijn onderzoek naar de ziekte van Dupuytren, een bindweefsel aandoening, kunnen als volgt worden samengevat:

- De ziekte van Dupuytren wordt gedreven door zowel TGF- β en zijn geactiveerde downstream Smad effectoren als ERK1/2 MAP kinase signalering.
- BMP-6, maar niet BMP-7, liet remmende effecten zien op zowel TGF- β als ERK1/2 MAP kinase-gedreven ziekte van Dupuytren.
- Gelijktijdige remming van TGF- β signaaltransductie en ERK1/2 MAP kinase signaaltransductie door hun respectievelijke synthetische remmers SB-431542 en PD98059, was voldoende om vermeerdering en contractie van Dupuytren fibroblasten tegen te gaan. Dit levert nieuwe mogelijkheden op voor niet-operatieve behandeling van de ziekte van Dupuytren.

Dit onderzoek heeft me laten zien dat wat we signaaltransductie gebeurtenissen noemen, alleen een weergave zijn van de staat waarin een signaleringsnetwerk zich bevindt. Deze staat wordt bepaald door tijd, locatie, agonisten en antagonist. Om een duidelijk beeld te krijgen van de invloed van een bepaalde signaaltransductieroute op de ontwikkeling en het in stand houden van weefsel, moet men breder kijken dan alleen naar de dynamiek van de betreffende signaaltransductie route. Ook de context van andere signaaltransductieroutes in het betreffende weefsel, iets dat ik een 'signaaltransductie niche' zou willen noemen, moet bestudeerd worden. Naar mijn mening is een uitgebalanceerde signaaltransductie noodzakelijk voor een gezonde ontwikkeling en het in stand houden van weefsel. Hiermee bedoel ik dan niet een geforceerde balans van agonisten en antagonist, maar een flexibele staat van de

signaaltransductie niche, die kan reageren op stimuli. Wanneer dit fysiologische aanpassingsvermogen van een signaaloverdracht netwerk verandert, hetzij door ongelimiteerde of door continue remming van stimuli, moet men aannemen dat verschuivingen in signaaloverdracht voorkomen. Deze veranderingen zullen uiteindelijk het signaaloverdracht netwerk ontkoppelen van belangrijke parameters die een gezonde ontwikkeling en de instandhouding van het weefsel beïnvloeden. Hoeveel van deze signaaloverdracht niches bestaan in een cel en of ze elkaar beïnvloeden, daar kan men alleen over speculeren. Het is interessant om te zien of in de toekomst de starre koppeling van bijvoorbeeld BMPs aan BMP receptoren en hun Smad effectoren niet vervangen moeten worden door superieure signaaloverdracht complexen.

translated by Karien de Rooij

Appendix D

Acknowledgments

'Cui honorem, honorem'

Paulus

Appendix E

Curriculum Vitae (dutch)

Carola Krause werd geboren op 16 maart 1981 te Neubrandenburg (Duitse Democratische Republiek). Na een jaar de Oxley High School in Tamworth (Australie) bezocht te hebben, deed ze in 2000 eindexamen aan het Curie gymnasium in Neubrandenburg. Aanvankelijk begon ze aan de studie medicijnen, maar besloot na een stage bij de divisie Neurochirurgie van de Dietrich Bonhoeffer Ziekenhuis (Prof. Dr. W. Schulz). aan de Vrije Universiteit Berlijn (Duitsland) biologie te gaan studeren Tijdens deze studie heeft ze twee korte stages van drie maanden gelopen; aan de vakgroep Molecular Genetics (Prof. Dr. T. Trautner) van het Max Planck Institute for Molecular Genetics in Berlijn en aan de vakgroep Biophysics (Prof. Dr. T.Kist) van de Universidade Federal do Rio Grande do Sul in Porto Alegre (Brazilië). Laatstgenoemde werd gefinancierd door een subsidie van de CNPq (National Brazil Council for developing Science and Technology). Haar afstudeerstage vond plaats in de divisie Cell Structure and Function (Prof. Dr. W. Hunziker) van het Institute of Molecular and Cell Biology in Singapore en werd mogelijk gemaakt door een subsidie van de DAAD (German Academic Exchange Service). Carola behaalde haar doctoraal examen Biologische Wetenschappen in maart 2006. Vervolgens is zij tot aan mei 2010 als onderzoeker in opleiding werkzaam geweest in de groep van Prof. Dr. P. ten Dijke op de afdeling Moleculaire Celbiologie van het Leids Universitair Medisch Centrum te Leiden. Dit project werd gefinancierd door de Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek (NWO). Sindsdien is ze werkzaam als wetenschappelijk medewerker in de vakgroep Biochemie van Prof. Dr. P. Knaus aan de Vrije Universiteit Berlijn.

translated by Hans van Dam

Appendix F

Curriculum Vitae (english)

Carola Krause was born 16 March 1981 in Neubrandenburg (German Democratic Republic) and is married to Christian Krause (former Köhler) since 2008. Their first child Ellen Mahi Krause was born in Leiden (The Netherlands) in 2007. Their son Timon Amin Krause was recently born in Potsdam (Germany). They are currently living in Potsdam.

Education & Work Experiences

After spending a year at the Oxley High School in Tamworth (Australia) Carola finished her A-level in 2000 at the Curie High School in Neubrandenburg. Carola started to study medicine but changed to biology at the Free University of Berlin (Germany) after a work experience at the department of neurosurgery at the Dietrich Bonhoeffer Hospital (Prof. Dr. W. Schulz) in Neubrandenburg. During her biology studies she followed two short internships of three months in the Molecular Genetics group of Prof. Dr. T. Trautner at the Max Planck Institute for Molecular Genetics in Berlin and in the Biophysics group of Prof. Dr. T. Kist in Porto Alegre (Brazil) before she joined the Cell Structure and Function group of Prof. Dr. W. Hunziker at the Institute of Molecular and Cell Biology in Singapore to complete her master thesis. In March 2006 she obtained her Master of Science certificate from the Free University of Berlin. From then until May 2010 Carola joined for her PhD studies the group of Prof. Dr. P. ten Dijke at the department of Molecular Cell Biology of the Leiden University Medical Center in Leiden (The Netherlands). Since then she is working in the Hahn-Meitner building as a research assistant in the department of Biochemistry in the group of Prof. Dr. P. Knaus at the Free University of Berlin.

Scholarships

- General Project Grant from the German Diabetes Society (2011)
- Robert Bosch travel grant and child care allowance for the EMBO Meeting (2010) in Barcelona (Spain)

- German Academic Exchange Service (DAAD) travel grant for the EMBO Meeting (2010) in Barcelona (Spain)
- European Science Foundation (ESF) grant for the International BMP conference (2010) in Leuven (Belgium)
- Young investigators scholarship from the Center for International Cooperation (CIC) of the Free University Berlin for the BMP workshop (2009) in Berlin (Germany)
- Scholarship for the Completion of a Master Thesis in Singapore from the German Academic Exchange Service (2005)
- Financial Award from the National Council for Developing Science and Technology (CNPq) from the Brazilian Government for Excellent Undergraduate Research in Brazil (2004)

Appendix G

List of Publications

- **Krause C**, Kloen P, Ten Dijke P, Elevated TGF- β and MAP kinase pathways mediate fibrotic traits of Dupuytren's disease fibroblasts. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2011 Jun 28;4(1):14
- Poorgholi-Belverdi M, **Krause C**, Guzman A, Knaus P, Comprehensive Analysis of TGF- β and BMP Receptor Interactomes, Review. in press: *European Journal of Cell Biology*, 2011 Jun 27;
- **Krause C**, Guzman A, Knaus P, Noggin. Review. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2011 Apr 43;(4):478-81
- **Krause C**, Korchynskyi O, De Rooij K, Keiper S, De Gorter D, Van Bezooijen R, Raz R, Economides A, Mueller T, Löwik C, ten Dijke P, Distinct modes of inhibition by Sclerostin on BMP and Wnt signaling pathways. *J Biol. Chem.* 2010 Dec 31;285(53):41614-26
- Song K, **Krause C**, Shi S, Patterson M, Sutto RK, Grgurevic L, Vukicevic S, van Dinther M, Falb D, Ten Dijke P, Alaoui-Ismaili MH, Identification of a key residue mediating bone morphogenetic protein (BMP)-6 resistance to Noggin inhibition allows for engineered BMPs with superior-agonist activity. *J Biol. Chem* 2010 Apr 16;285(16):12169-80
- Krause C, **Krause C**, De Vink E, Action-Based Analysis of Discrete Regulatory Networks with Short-Term Stimuli. In CMSB'10: Proc. 8th Conference on Computational Methods in Systems Biology, pages 66-75, New York, NY, USA, 2010. ACM ISBN:978145030068-1, doi:10.1145/18397641839773
- ten Dijke P, **Krause C**, de Gorter DJ, Löwik CWGM, van Bezooijen RL, Osteocyte-derived Sclerostin inhibits bone formation: its role in bone morphogenetic protein and Wnt signaling. *The Journal of Bone and Joint Surgery, Review*, 2008, 90:31-35
- de Gorter DJJ, **Krause C**, Löwik CWGM, van Bezooijen RL and ten Dijke P, Antagonizing BMP and WNT signaling in bone: control of bone mass by Sclerostin.

Book Chapter in: Bone Morphogenetic Proteins: From Local to Systemic Therapeutics. Editors S Vukicevic and KT Sampath., Birkhäuser, page 257-276, ISBN 9783764385521.

- **Krause C**, Gorter DJJ, Karperien M, ten Dijke P, Signal transduction cascades controlling osteoblast differentiation. From the Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, 7th Edition., Editor Clifford J., Wiley InterScience, page 10-16, 2008, ISBN: 9780977888214, doi: 10.1002/9780470623992
- Béguin P, Ng YJ, **Krause C**, Mahalakshmi RN, Ng MY, Hunziker W, RGK small GTP-binding proteins interact with the nucleotide kinase domain of Ca²⁺-channel beta-subunits via an uncommon effector binding domain. *J Biol Chem.* 2007 Apr 13;282(15):11509-20