



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Dissecting cellular function of fibronectin in osteoarthritic cartilage

Hoolwerff, M. van

Citation

Hoolwerff, M. van. (2022, September 6). *Dissecting cellular function of fibronectin in osteoarthritic cartilage*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3455075>

Version: 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/1887/3455075>

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

Chapter 6

Appendix

Nederlandse samenvatting

List of publications

Curriculum Vitae

Dankwoord

Nederlandse samenvatting

Inleiding

Osteoartrose, ook wel artrose genoemd, is een complexe aandoening van de gewrichten, gekenmerkt door veranderingen in kraakbeen en het onderliggende bot. Artrose kan zich ontwikkelen in nagenoeg ieder gewricht, maar komt het meest voor in de knie-, heup- en handgewrichten. Risicofactoren die de kans op het ontwikkelen van artrose vergroten zijn hogere leeftijd, vrouwelijk geslacht, overgewicht, overbelasting en genetische aanleg. Op het moment is artrose de meest voorkomende gewrichtsziekte wereldwijd en alleen al in Nederland hebben ruim 1.2 miljoen mensen artrose in één of meerdere gewrichten. Door de toename van zowel overgewicht als vergrijzing in de samenleving zal de last op de maatschappij naar verwachting exponentieel toenemen de komende jaren. De ziektelast voor een patiënt bestaat uit pijn en stijfheid in het gewricht, wat kan zorgen voor ernstige beperkingen in het dagelijks leven. De zorgkosten van artrose zijn aanzienlijk en waren 1.4% van de totale zorgkosten in Nederland in 2017. Helaas zijn de beschikbare behandelmethodeën op het moment beperkt tot pijnstilling en uiteindelijk een kostbare gewrichtsvervangende operatie op hogere leeftijd. De ontwikkeling van effectieve behandelingen voor artrose blijft onsuccesvol doordat er te weinig inzicht is in de onderliggende pathofysiologie van artrose.

Een van de kenmerken van artrose is de afbraak van het kraakbeen in het gewricht. Kraakbeen bedekt de uiteinden van de botten in onze gewrichten en is ontworpen om de krachten op te vangen die tijdens het lopen, rennen en springen op de gewrichten uitgeoefend worden. In het kraakbeen bevindt zich slechts één celtype die het kraakbeen produceert en onderhoudt, de zogeheten chondrocyten. Chondrocyten zijn gespecialiseerde cellen die zich niet meer delen. In gezond kraakbeen speelt de chondrocyte een belangrijke rol in het onderhouden van de balans tussen de productie en afbraak van kraakbeen componenten. Echter, bij artrose is deze balans verstoord en produceren de chondrocyten te veel kraakbeen afbrekende enzymen, waardoor op een gegeven moment het kraakbeen wordt afgebroken en het zijn optimale eigenschappen verliest.

Doel van dit proefschrift

In dit proefschrift is getracht meer inzicht te krijgen in onderliggende moleculaire processen in artrotisch kraakbeen op verschillende niveaus. Wat het artroseproces in kraakbeen initieert is nog niet bekend, maar wat wel bekend is, is dat de verstoorde balans van chondrocyten veroorzaakt kan worden door veranderingen in genexpressie van de chondrocyten. Aangezien chondrocyten niet meer delen in het kraakbeen, zijn ze sterk afhankelijk van zogeheten epigenetische mechanismes om hun genexpressie te reguleren. In dit proefschrift hebben we een van deze mechanismes in kaart gebracht, om zo te achterhalen wat een van de oorzaken is van de verstoorde balans in genexpressie van chondrocyten.

De verstoorde balans van chondrocyten kan ook op een ander niveau dan genexpressie worden veroorzaakt. Als er afwijkingen in de genetische code zijn, kunnen er foute genproducten, zogenaamde eiwitten, worden gemaakt, die verantwoordelijk zijn voor het ontwikkelen van artrose. Deze genetische afwijkingen kunnen worden doorgegeven aan de volgende generatie en zo is er overerving van de ziekte. Door de genetische afwijking te vinden die zieke familieleden gemeen hebben, kunnen we deze zodanig herkennen als de oorzaak van artrose. Door de moleculaire gevolgen te ontrafelen die ontstaan als gevolg van afwijkingen in de genetische code, kan inzicht worden verkregen over de oorzaak van artrose. Daarom hebben we de genetische code bestudeerd in een familie waar veel familieleden op jonge leeftijd artrose ontwikkelden. Dit resulteerde in de identificatie van een genetische afwijking in het gen *Fibronectin1 (FN1)* die de oorzaak was voor artrose op jonge leeftijd. Vervolgens hebben we functionele studies uitgevoerd met betrekking tot *FN1* om de genetische bevindingen te vertalen naar een biologisch mechanisme in kraakbeen.

Rol van lange niet-coderende RNAs in artrotisch kraakbeen

Zoals eerder genoemd, reguleren chondrocyten hun genexpressie met behulp van zogeheten epigenetische mechanismes. Chondrocyten kunnen op deze manier reageren op externe stimuli, zoals mechanische belasting, zodat het kraakbeen herstelt kan worden als dat nodig is. In chondrocyten in artrotisch kraakbeen vertonen deze epigenetische mechanismes afwijkingen ten opzichte van chondrocyten in gezond kraakbeen. Een van deze mechanismes is de klasse lange niet coderende RNAs (lncRNAs). lncRNAs zijn RNA transcripten langer dan 200 nucleotiden, die structureel sterk lijken op messenger RNA (mRNA), maar niet worden vertaald naar een eiwit. lncRNAs kunnen transcriptie en translatie van mRNAs reguleren via meerdere mechanismes, zoals door het beïnvloeden van de beschikbaarheid van het DNA voor transcriptie, activiteit van transcriptiefactoren en mRNA stabiliteit. Als we kunnen ontrafelen welke lncRNAs essentieel zijn in het reguleren van genexpressie in chondrocyten kunnen we daarna gericht zoeken naar manieren om deze regulatie aan te passen, zodat uiteindelijk het artroseproces verminderd. Gebaseerd op de locatie in de genetische code waar de lncRNAs worden afgeschreven, kunnen ze worden ingedeeld in zogeheten biotypes, zoals ‘antisense’ RNAs, ‘sense’ RNAs, intergenische RNAs en pseudogenen. Omdat op dit moment nog niet bekend is of het biotype de functie van een lncRNA bepaald, wilden we dit verder onderzoeken.

Daarom hebben we in **hoofdstuk 2** eerst de verschillende lncRNAs gekarakteriseerd met betrekking tot hun biotypes in kraakbeen van patiënten die een gewrichtsvervangende operatie zijn ondergaan, van de zogeheten Research Artrose en Articulair Kraakbeen (RAAK) studie. Door de expressie van lncRNAs te vergelijken tussen ‘normaal’ en artrotisch kraakbeen van hetzelfde gewricht hebben we een aantal nieuwe lncRNAs geïdentificeerd die associeerden met het ziekteproces van artrose. Vervolgens wilden we weten of de manier waarop deze lncRNAs genexpressie reguleren gelijk is voor de verschillende biotypes. Hierbij legden we

de focus op intergenische en antisense lncRNAs, omdat die het merendeel van de lncRNAs in chondrocyten omvatten. We observeerden dat een groot aantal lncRNAs omringende dan wel overlappende genen reguleren, ongeacht van het biotype. Experimenteel hebben we dit gevalideerd voor één antisense lncRNA. Hieruit concludeerden we dat als de functie van een lncRNA wordt onderzocht, functionele validatie nodig zal zijn, omdat het biotype geen uitsluitsel zal geven over het mechanisme van regulatie van de lncRNA. De mogelijkheden om de functie van lncRNAs te onderzoeken nemen gestaag toe, waardoor ze potentieel het doelwit kunnen zijn van medicijnen die in de kliniek getest kunnen worden.

Erfelijke factoren betrokken bij artrose

Om de complexe rol van erfelijkheid in artrose te verklaren zijn genomwijde associatie studies uitgevoerd. Deze studies hebben aanwijzingen gegeven voor risicogenen die de aanleg voor artrose verhogen in de algemene bevolking. Onderzoek heeft aangetoond dat het ontwikkelen van medicijnen met risicogenen als aangrijpingspunt het klinische succes kan verdubbelen. Helaas mist de vertaling naar klinische therapeutische toepassingen voor artrose, onder andere doordat de gevonden risicogenen vaak kleine effecten geven en de onderliggende mechanismes nog regelmatig onbekend zijn. Wat dat betreft kan het identificeren van zeldzame genetische afwijkingen met grote effecten in families met ernstig artrose inzicht geven in genotype-fenotype relaties. Op die manier kunnen moleculaire mechanismes worden gevonden, waarbij mildere afwijkingen in dezelfde genen ook een rol kunnen spelen bij het ontstaan van artrose in de algemene bevolking.

In **hoofdstuk 3** is beschreven hoe we de genetische afwijking hebben gevonden die verantwoordelijk is voor het ontwikkelen van ernstige artrose op jonge leeftijd in een familie. Hiervoor hebben we van één familielid met artrose de code van het DNA bepaald van alle genen, met behulp van zogeheten exome sequencing. De genetische afwijkingen die verantwoordelijk zijn voor het ontstaan van ernstige artrose resulteren vaak in veranderingen van functie van het eiwit dat afgelezen wordt van het gen. Daarom hebben we bij dit familielid geselecteerd op afwijkingen waarvan voorspeld werd dat ze een effect zouden hebben op de functie van het eiwit. Deze analyse resulteerde in de identificatie van een afwijking in het gen *FN1*, die verantwoordelijk was voor artrose op jonge leeftijd in de familie. Dit werd verder bevestigd doordat alle aangedane familieleden inderdaad drager waren van deze afwijking en vice versa. Het identificeren van een pathogene genetische afwijking in zeldzame ziektes is niet altijd succesvol, aangezien het humane genoom duizenden varianten bevat. Echter, in dit proefschrift laten we de krachtige combinatie zien van exome sequencing en strenge selectiecriteria van afwijkingen in het DNA van een familie om tot de identificatie van de causale genetische afwijking te komen.

De rol van fibronectine in pathofysiologie van artrose

In het onderzoeksveld van artrose zijn er weinig functionele opvolgstudies gedaan van genetische afwijkingen. Recentelijk is er grote vooruitgang geboekt in het veld dankzij de zogeheten CRISPR/Cas9 technologie, waar we in dit proefschrift dan ook van hebben geprofiteerd. CRISPR/Cas9 is de afkorting van ‘Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats’ en ‘CRISPR-associated protein 9’ en was ontdekt als het verdedigingsmechanisme van bacteriën tegen bacteriofagen. Hierbij herkent de bacterie stukjes genetisch materiaal van een virus en Cas9 is het eiwit dat dit vervolgens kapot knipt, zodat het virus niet meer functioneel is. Tegenwoordig weten we hoe het systeem zo kunnen ontwerpen dat het Cas9 eiwit precies knipt op een gewenste plek in het DNA en dat het wordt gerepareerd met de gewenste veranderingen. Voor onderzoek in het veld van artrose is het relevant om CRISPR/Cas9 toe te passen op bijvoorbeeld chondrocyten, om te onderzoeken wat het effect is van een genetische afwijking op kraakbeen. Echter, de chondrocyten die we verzamelen met de RAAK studie stoppen op een gegeven moment met zowel delen als nieuw kraakbeen maken in het laboratorium. Daarom hebben we ervoor gekozen ‘human induced pluripotent stem cells’ (hiPSCs) te gebruiken. hiPSCs zijn pluripotente stamcellen die gemaakt worden van lichaamscellen en zich voor geruime tijd blijven delen. Ook kunnen deze stamcellen zich differentiëren in elk gewenste celtype van het menselijk lichaam en dus ook in chondrocyten.

In **hoofdstuk 3** staat beschreven hoe we het model opgezet hebben om het biologische mechanisme van de eerder genoemde genetische afwijking in het gen *FN1* te onderzoeken. Hiervoor hebben we met CRISPR/Cas9 deze afwijking geïntroduceerd in het DNA van hiPSCs. Vervolgens werden de (gemuteerde en niet-gemuteerde) stamcellen gedifferentieerd naar chondrocyten die kraakbeen gingen produceren. We observeerden dat zowel de potentie om kraakbeencel te worden als de productie van nieuw kraakbeen verminderd was van de *FN1* mutant cellen. Bovendien hebben we laten zien dat het onderliggende mechanisme van de genetische afwijking wordt veroorzaakt door een verlaagde binding tussen mutant fibronectine en collageen type II, wat zorgt voor verstoorde signalen tussen kraakbeen en cel.

Naast de karakterisering van deze zeldzame variant, is het ook van belang om de algemene functie van fibronectine in kraakbeen te onderzoeken. Het was al bekend dat de genexpressie van *FN1* enorm hoog is in kraakbeen en nog verder toeneemt in artrotisch kraakbeen, onder andere van bevindingen uit de RAAK studie. Bovendien kunnen er door alternatieve splicing 27 verschillende transcripten worden geproduceerd van het *FN1* gen. Het is echter niet bekend welke functie deze verschillende transcripten van *FN1* hebben in gezond en artrotisch kraakbeen. Daarom onderzochten we in **hoofdstuk 4** welke specifieke *FN1* transcripten aanwezig zijn in kraakbeen en hoe het patroon verandert met artrose. We vonden onder andere een verkorte isoform genaamd ‘migration-stimulating factor’ (MSF, of *FN1-208*) die significant verhoogde genexpressie had, die niet eerder was geïdentificeerd in (artrotisch)

kraakbeen. Om te trachten het onderliggende moleculaire mechanisme te onderzoeken van de sterke verhoogde expressie van MSF op het vormen van nieuw kraakbeen hebben we een modelsysteem opgezet met primaire chondrocyten verkregen in de RAAK studie, die kraakbeen in het laboratorium maken en gemoduleerde expressie van MSF hadden. Resultaten van de experimenten lieten zien dat het verlagen van de genexpressie van alle overige *FN1* transcripten ongunstig was voor de productie van nieuw kraakbeen. Dit impliceert dat de eerder geobserveerde verhoogde genexpressie van *FN1* en MSF in de RAAK studie een respons is en niet causaal aan het artroseproces.

Conclusie en toekomstperspectieven

In dit proefschrift laten we zien dat het identificeren van een zeldzame variant en de biologische gevolgen daarvan inzicht kunnen geven in onderliggende mechanismes die een rol spelen in het ontstaan van artrose. De toepasbaarheid van flexibele humane hiPSC modellen zoals in dit proefschrift omschreven kan vergroot worden voor toekomstige studies. Voorbeelden van nieuwe toepassingen zijn het testen van medicijnen, differentiatie naar meerdere cel types en de interactie daartussen onderzoeken, het functioneel onderzoeken van gangbare genetische varianten en potentieel als stamceltherapie in 'regenerative medicine'. Betreffende de rol van fibronectine in artrotisch kraakbeen, hebben we laten zien dat goede binding tussen fibronectine en de kraakbeen matrix via collageen type II essentieel is voor communicatie tussen chondrocyte en kraakbeen. Onze studies tonen aan dat fibronectine als potentieel doelwit van medicatie moet worden onderzocht.

Terugkijkend op de afgelopen jaren van artrose onderzoek, wordt het duidelijk dat er snelle voortgang is geboekt dankzij het toepassen van nieuwe technieken zoals hiPSCs en CRISPR/Cas9. Dit geeft hoop voor de toekomst van zowel artrose onderzoek als de ontwikkeling van medicijnen. De brede studies beschreven in dit proefschrift kunnen gebruikt worden als startpunt voor toekomstige artrose modelsystemen en het testen van nieuwe medicijnen.

