



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Osteoprotegerin: a double-edged sword in osteoarthritis development

Rodriguez Ruiz, A.

### Citation

Rodriguez Ruiz, A. (2022, October 19). *Osteoprotegerin: a double-edged sword in osteoarthritis development*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3484338>

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/1887/3484338>

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

## Nederlandse samenvatting

Artrose (OA) is een degeneratieve aandoening van de gewrichten die wordt gekenmerkt door afbraak van kraakbeen, subchondrale botremodellering, osteofytfvorming en synoviale ontsteking. Klinisch wordt artrose gekenmerkt door chronische pijn, gewrichtsstijfheid en invaliditeit van patiënten. OA treft over het algemeen handen, heupen en knieën en kan worden beïnvloed door meerdere risicofactoren zoals body mass index (BMI), botmineraaldichtheid (BMD), letsel en erfelijkheid. Momenteel zijn er in Nederland ongeveer 1,2 miljoen mensen met artrose en dit aantal zal naar verwachting alleen maar toenemen. Als zodanig verwacht de Wereldgezondheidsorganisatie dat in 2050 15% van de wereldbevolking ouder dan 60 jaar aan artrose zal lijden. Tot nu toe is gewrichtserving de enige effectieve therapie, maar dit is een zeer kostbare procedure die geen volledig herstel garandeert. Als gevolg hiervan wordt geschat dat 1-2,5% van het bruto nationaal product wordt besteed aan OA-gerelateerde behandelingen.

Om de ontwikkeling van effectieve OA-behandelingen te bevorderen, is een beter begrip van de pathofysiologische mechanismen nodig. Door het bestuderen van een familie met juvenile artrose en hoge kraakbeenmineralisatie, werd een vermoedelijk causale mutatie in het TNF-receptor-superfamiliedid 11b (*TNFRSF11B*) dat codeert voor osteoprotegerine (OPG) geïdentificeerd. Deze mutatie veroorzaakt een verlenging van 19 aminozuren aan het C-terminale domein van OPG (OPG-XL). OPG is een receptor die concurreert met receptoractivator van de nucleaire KB-factor (RANK) voor de binding van nucleaire factor KB-ligand (RANKL). Deze triad staat bekend om het reguleren van de vorming van osteoclasten en speelt daarom een cruciale rol bij botremodellering. Gezien het feit dat *TNFRSF11B* ook een van de genen is met de hoogste upregulatie in kraakbeen met aangedaan en niet aangedaan kraakbeen, is dit gen waarschijnlijk de oorzaak van de ontwikkeling en progressie van OA, maar de implicatie ervan in kraakbeenhomeostase is tot nu toe onbekend.

Om de rol van *TNFRSF11B* in de ontwikkeling van artrose te onderzoeken, werd *TNFRSF11B* in **Hoofdstuk 2** tot overexpressie gebracht in een *in vitro* cel model van neo-kraakbeen afgezet door chondrocyten van negen patiënten die een gewrichtserving operatie ondergingen vanwege artrose. Vervolgens werden karakteristieke markers van OA-ontwikkeling en botvorming gemeten. Dit liet een opregulatie zien van genen die gewoonlijk worden geassocieerd met OA-ontwikkeling en matrixomzetting, zoals *MMP13*, *COL2A1* en *COL1A1*. Bovendien suggereerde de consistente hogere expressie van genen geassocieerd met osteoblastvorming en mineralisatie zoals *RUNX2*, *ASPN* en *OGN*, een overgang van chondrocyten naar osteoblasten. Opmerkelijk was dat neo-kraakbeen vertoonde geen veranderingen in expressie van de andere twee

leden van de triad: *TNFSF11* (RANKL) en *TNFRSF11A* (RANK). Dit wijst erop dat een verschil bestaat in het OPG-mechanisme in kraakbeen in vergelijking met bot.

Om meer informatie te verkrijgen over het intrinsieke mechanisme van OPG bij de ontwikkeling van artrose, gingen we verder met het bestuderen van de OPG-XL-familie. Hiervoor gebruikten we geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSC's). iPSC's zijn stamcelachtige cellen afkomstig van gespecialiseerde cellen die weer in staat zijn om te her-specialiseren in verschillende weefsels, terwijl de genetische achtergrond van de donor behouden blijft. Dit maakt ze tot een uitstekende benadering voor ziektemodellering voor ziektemodellering voor het ontwikkelen van (regeneratieve) therapieën. In dit proefschrift hebben we iPSC-technologie toegepast om een stamcellijn te genereren uit huidfibroblasten van een drager van de OPG-XL-mutatie. Aangezien toegang tot kraakbeen en botweefsel van leden van deze familie zeldzaam is, stelde de beschikbaarheid van de iPSC's ons in staat om een hernieuwbare bron van neo-kraakbeen en neo-bot weefsel te genereren dat deze mutatie draagt voor verder onderzoek.

Er waren verschillende protocollen beschikbaar om neo-kraakbeen uit menselijke iPSC's te genereren. Deze protocollen volgden verschillende ontwikkelingsroutes, hetzij door vorming van mesenchymale stromale cellen (hiMSC) of door chondroprogenitorcellen (hiCPC) te genereren. Toch was de kwaliteit van het gegenereerde neo-kraakbeen in vergelijking met articulaire kraakbeen onbekend. Om de beste methode voor het genereren van neo-kraakbeen voor ons OPG-XL-model te bepalen, vergeleken we in **Hoofdstuk 3** het neo-kraakbeen gegenereerd uit beide protocollen met neo-kraakbeen afgezet door respectievelijk mesenchymale stromale beenmergcellen (hBMSCs) en humane primaire articulaire chondrocyten (hPAC's). Op basis van een panel van 20 relevante genen toonden we een overeenkomst van 53% tussen hiMSC's en hBMSC's, en een overeenkomst van 65% tussen hiCPC en hPAC's neo-kraakbeen. Bovendien vertoonde het neo-kraakbeen van hiCPC een hogere expressie van markers geassocieerd met kraakbeen, terwijl het neo-kraakbeen van hiMSC meer vatbaar was voor hypertrofie. Aangezien hypertrofie een belangrijk aspect is van het atrose proces, meer geschikt van hiMSCs is om kraakbeen- en botgerelateerde ziekten te bestuderen.

Door de hiMSC-benadering te volgen, hebben we de hiPSC-OPG-XL-lijn gedifferentieerd in neo-kraakbeen en neo-bot en de effecten van de mutatie in **Hoofdstuk 4** gekarakteriseerd. Om causaliteit van de mutatie te bewijzen, hebben we Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) en CRISPR-geassocieerde eiwit 9 (Cas9) technologie gebruikt om de OPG-XL-mutatie te herstellen. Deze technologie herkent en splitst specifieke DNA-strengen die complementair zijn aan de CRISPR-sequentie, waardoor de perfecte

isogene controle voor OPG-XL wordt gegenereerd met identieke genetische achtergrond. Dit resulteerde in twee CRISPR/Cas9 OPG-XL gerepareerde hiPSC-lijnen waarvan neo-kraakbeen en neo-botweefsel werd gegenereerd. Vergelijking tussen de OPG-XL herstellende en OPG-XL weefsels toonde aan dat deze mutatie een fibrotisch effect had in neo-kraakbeen, terwijl neo-botweefsel een sterkere mineralisatie had, waarschijnlijk via functie van respectievelijk MGP en DIO2.

Immobilisatie van uitgescheiden OPG op het osteoblastmembraan via binding aan heparansulfaat is noodzakelijk voor RANKL-gemedieerde osteoclastremming. Aangezien immobilisatie het gevolg is van de C-terminale binding van OPG aan heparansulfaat en de OPG-XL-mutant aan de C-terminus is veranderd, veronderstellen we dat de effecten op MGP en DIO2 kunnen worden veroorzaakt door interferentie met binding tussen RANKL, heparansulfaat en OPG. Daarnaast werd osteoclastvorming bestudeerd met monocytten van OPG-XL dragers en gematchte gezonde controles. Dit onthulde een hogere osteoclastactiviteit zoals gemeten door genexpressie, ondanks dat vergelijkbare botresorptieniveaus werden waargenomen in kweek. Om te bepalen hoe deze resultaten werden vertaald in het OPG-XL-dragerfenotype, hebben we MRI- en DEXA-scans uitgevoerd. Dit onthulde een pleiotropie van OPG-XL met kraakbeenverkalking vergezeld van lage subchondrale botmineralisatie, beide kenmerken van OA-pathofysiologie, en in overeenstemming met de waargenomen hogere osteoclastactiviteit.

Al met al belicht dit proefschrift de rol van OPG in de ontwikkeling van artrose door het genereren van een OPG-overexpressiesysteem in primaire chondrocyten en door het bestuderen van een zeldzame mutatie in *TNFRSF11B*. Door verder neo-kraakbeen, neo-bot en osteoclasten van de OPG-XL-familieleden te genereren, toonden we een bidirectioneel effect van OPG-XL aan, gekenmerkt door hogere botresorptie en hogere kraakbeenmineralisatie. Nieuwe behandelingen voor deze familie en extrapolatie naar gewone artrose zouden kunnen worden aangepakt op sterk differentieel tot expressie gebrachte genen zoals *MGP* en *DIO2*. Ten slotte wijst de pleiotropie die OPG-XL liet zien op een gunstig of nadelig stadium, afhankelijk van het weefsel, waardoor OPG-XL, en waarschijnlijk OPG, een tweesnijdend zwaard is in de ontwikkeling van OA.