



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The bone and cartilage interplay in osteoarthritis: key to effective treatment strategy

Tuerlings, M.

Citation

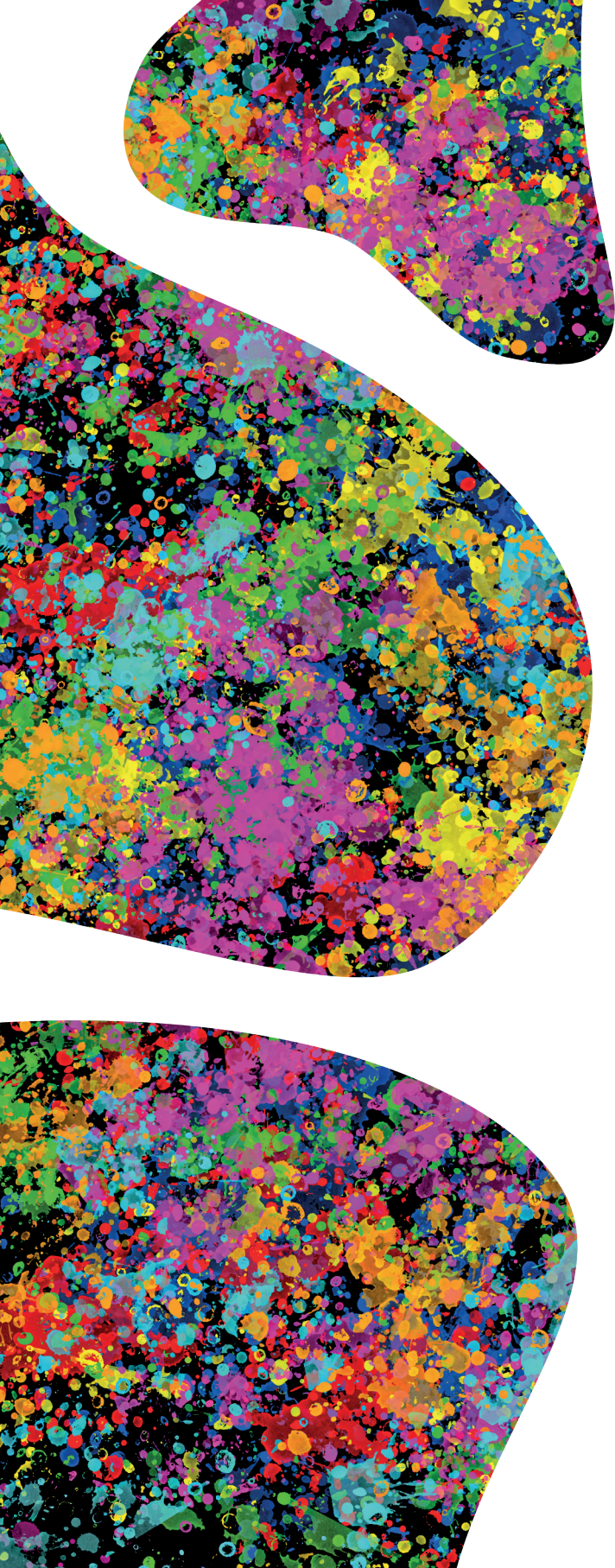
Tuerlings, M. (2023, September 27). *The bone and cartilage interplay in osteoarthritis: key to effective treatment strategy*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3642518>

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/1887/3642518>

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



Appendix



Nederlandse samenvatting

Lisf of publications

Curriculum vitae

Dankwoord

Nederlandse samenvatting

Inleiding

Artrose is een complexe en leeftijd gerelateerde gewrichtsaandoening die wordt gekenmerkt door kraakbeen degeneratie, veranderingen in het onderliggende subchondrale bot en ontsteking. Er zijn verschillende risicofactoren die de kans op artrose vergroten, zoals overgewicht, overbelasting, een hoge leeftijd en een genetische aanleg. Wereldwijd is 7% van de bevolking gediagnostiseerd met artrose en naar verwachting zal dit nog flink oplopen door vergrijzing en het toenemend aantal mensen met overgewicht. De symptomen van artrose zijn pijn en stijfheid van het gewricht, wat leidt tot immobiliteit. Op dit moment zijn er geen medicijnen beschikbaar die het ziekteproces kunnen stoppen of omkeren. De behandeling bestaat daarom alleen uit het toedienen van pijnstilling en/of het uitvoeren van een kostbare gewrichtsvervangende operatie in het eindstadium van het ziekteproces. Dit zorgt voor een grote ziektelast, voor zowel de patiënt als de maatschappij.

Uitgangspunten van dit proefschrift

Om medicijnen te kunnen ontwikkelen hebben we meer inzicht nodig in het onderliggend pathofysiologisch proces van artrose. In kraakbeen is dit ziekteproces al vrij intensief onderzocht, maar het onderliggende subchondrale bot is tot nu toe onderbelicht gebleven. Genetische predispositie is een sterke risicofactor voor artrose. Genetische varianten die het risico op het krijgen van artrose verhogen worden geïdentificeerd in zogenoemde genome-wide association (GWA) studies. Het beter begrijpen van de onderliggende biologische oorzaken waarop deze genetische varianten verhoogd risico geven op artrose is noodzakelijk om effectieve translatie naar medicijnen of therapieën te kunnen maken, die het artroseproces kunnen stoppen of zelfs genezen. Om deze mechanismen te onderzoeken is er een grote behoefte aan laboratorium modellen van gewrichtsweefsel waarin we artrose nabootsen. Tenslotte zijn er signaalmoleculen, ofwel biomarkers, nodig die bijvoorbeeld in bloed gemeten kunnen worden en waarmee we verschillende ziektebeelden van artrose van elkaar kunnen onderscheiden. Dit laatste kan helpen om uiteindelijk een therapie op maat te ontwikkelen, waardoor de patiënt met het juiste medicijn behandeld kan worden.

Doel van dit proefschrift

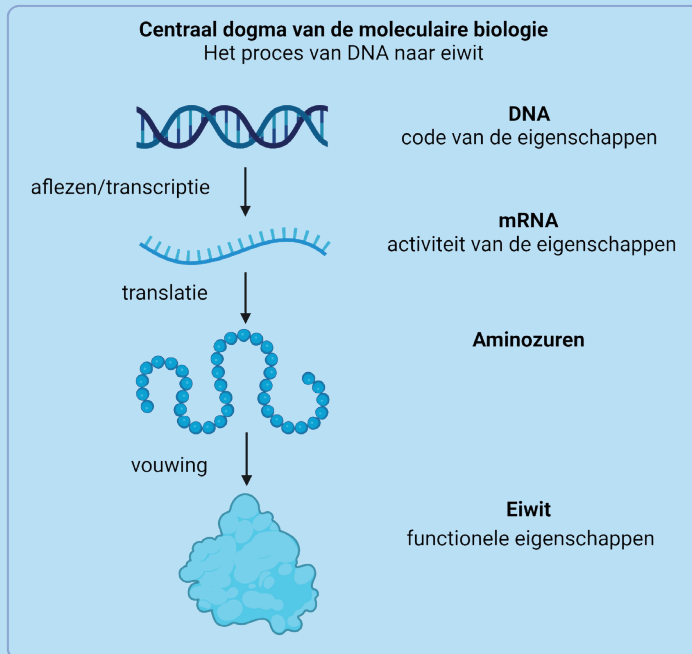
In dit proefschrift hebben we drie strategieën toegepast om aspecten van het ziekteproces in het gewrichtsweefsel te kunnen herkennen en om onderliggende mechanismen van artrose risico genen beter te begrijpen. Dit hebben we gedaan door:

1. De moleculaire pathofysiologie van het bot in interactie met kraakbeen te karakteriseren
2. Moleculen, zogenoemde microRNA (miRNA), aanwezig in bloed te identificeren

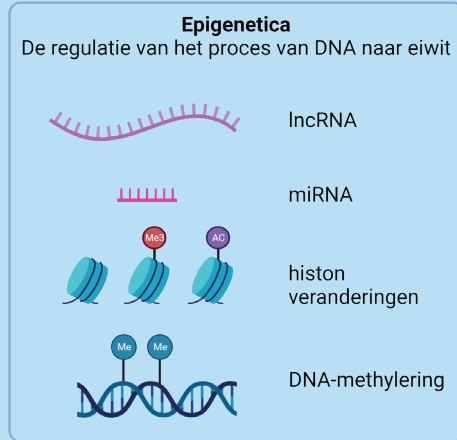
zodat we deze kunnen gebruiken om het type artrose te herkennen op een niet-invasieve manier

3. Verschillende *in vitro* of *ex vivo* modellen van gewrichtsweefsels toe te passen of te ontwikkelen om de onderliggende mechanismen van specifieke risico genen of factoren te kunnen onderzoeken in bot en kraakbeen.

Tekst box 1 – DNA, mRNA en eiwit



Ons DNA bestaat uit twee ketens van nucleotiden die samen een dubbele helix vormen. Het DNA bevat de genetische informatie (de code van de eigenschappen). De nucleotiden waar het DNA uit bestaat vormen samen een code die het lichaam informatie geeft over hoe eiwitten moeten worden aangemaakt. Deze eiwitten bepalen op hun beurt weer welke processen er plaats vinden in het lichaam. Voor het maken van een eiwit wordt een stuk DNA, ook wel gen genoemd, eerst afgelezen en gekopieerd. Dit proces noemen we transcriptie en het kopie wat hierbij ontstaat noemen we mRNA (de hoeveelheid mRNA bepaald de activiteit van de eigenschappen). Dit proces vindt plaats in de celkern. Vervolgens gaat het mRNA de celkern uit, naar een zogenoemde ribosoom. Hier wordt de code van het mRNA vertaald naar een volgorde van aminozuren. Dit proces noemen we translatie. Tenslotte vouwt de keten van aminozuren zichzelf op en ontstaat er een driedimensionale eiwit structuur (met functionele eigenschappen).

Tekst box 2 – Epigenetica

Epigenetica refereert naar een verandering in gen activiteit (Tekst box 1) die plaats vindt zonder dat de code van het DNA veranderd. Veranderingen van gen activiteit zijn vaak nodig om (tijdelijke) aanpassing aan de omgeving te kunnen bewerkstelligen. Er zijn meerdere manieren waarop de regulatie van een gen kan plaats vinden. Er bestaan bijvoorbeeld moleculen die erg veel lijken op mRNA (Tekst box 1), maar die er uiteindelijk niet voor zorgen dat er een eiwit gemaakt wordt. Deze moleculen noemen we niet-coderende RNA's (ncRNA's). Deze ncRNA's bestaan in een lange vorm, ook wel lange ncRNA's (lncRNA's) genoemd, en in een korte vorm, ook wel micro RNA's (miRNA's) genoemd. lncRNA's kunnen worden ingezet om transcriptie of translatie (Tekst box 1) te beïnvloeden. Zo kunnen sommige lncRNA's er voor zorgen dat het transcriptie proces niet plaats kan vinden, terwijl andere lncRNA's er juist voor kunnen zorgen dat mRNA of eiwitten worden afgebroken. MiRNA's kunnen de activiteit van een gen beïnvloeden door bijvoorbeeld aan het mRNA te binden waardoor het wordt afgebroken nog voor dat het eiwit gemaakt wordt. Een andere vorm van epigenetica is histon veranderingen. Histonen zijn eiwitten waar het DNA om zit opgerold. Door bepaalde moleculen, een methylgroep of een acetylgroep, te binden aan een histon wordt het aflezen van het DNA en daarmee de aanmaak van mRNA gereguleerd. Tenslotte kunnen er ook methylgroepen worden toegevoegd aan het DNA zelf. Het toevoegen of weghalen van een methylgroep zorgt er voor dat het DNA wel of niet toegankelijk is voor het aflezen en dus het maken van mRNA.

Moleculaire pathofysiologie van artrose; interactie tussen kraakbeen en subchondraal bot
Zoals eerder genoemd heeft het in kaart brengen van het artrose ziekteproces zich tot nu toe voornamelijk gericht op het kraakbeen. In zulke studies wordt vaak de moleculaire vergelijking gemaakt tussen macroscopisch aangedaan en niet-aangedaan weefsel

afkomstig van hetzelfde gewricht of tussen aangedaan en gezond weefsel afkomstig van verschillende personen. Deze studies hebben al veel waardevolle inzichten gegeven in de expressieprofielen van bijvoorbeeld messenger RNA (mRNA, **Tekst box 1**), miRNA (**Tekst box 2**) en lang niet-coderend RNA (lncRNA, **Tekst box 2**) in kraakbeen. Daarnaast hebben deze studies inzichten gegeven in de processen waar deze moleculen een rol in spelen. In tegenstelling tot de vele studies naar artrose in kraakbeen, is het onderliggende subchondrale bot onderbelicht gebleven. Dit ondanks het feit dat er wel degelijk structurele veranderingen plaats vinden in het subchondrale bot met artrose. Daarnaast zijn er ook meerdere genetische factoren gevonden die verhoogd risico geven op artrose en deze factoren spelen een belangrijke rol in zowel kraakbeen als bot. Dit wijst er op dat naast het kraakbeen ook het onderliggende bot van belang is in de oorzaak en progressie van artrose. Om deze leemte in kennis op te vullen hebben we in RNA-sequencing toegepast op het subchondrale bot en hebben we expressieprofielen vergeleken tussen macroscopisch aangedaan en niet-aangedaan weefsel van hetzelfde gewricht.

In **hoofdstuk 2** hebben we ons gericht op het identificeren van mRNA dat het artroseproces in bot markeert. Door een cluster analyse uit te voeren vonden we verschillen in het artroseproces in subchondraal bot tussen heupen en knieën. Dit verschil is belangrijk om in acht te nemen wanneer men op zoek gaat naar mogelijke aangrijpingspunten voor medicijnen tegen artrose. Idealiter hebben potentiële medicijnen een effect in zowel kraakbeen als bot, zodat het gehele gewricht behandeld kan worden. Daarom hebben we gezocht naar genen die het artroseproces markeren in zowel kraakbeen als bot, met eenzelfde richting van het effect. Om vervolgens hieruit die genen te selecteren die het meest waarschijnlijk artrose veroorzaken, hebben we deze overlappende genen tussen kraakbeen en bot gefilterd op artrose risicogenen. Dit resulteerde in de identificatie van twee genen, *IL11* en *CHADL*. Deze genen markeren in zowel bot als kraakbeen het artrose proces en zijn eerder ook zijn geïdentificeerd als artrose risicogenen, waardoor ze dus aantrekkelijke potentiële aangrijpingspunten zijn voor medicijnen.

Epigenetica refereert naar veranderingen in het fenotype zonder dat er veranderingen in de genetische code plaats vinden. Door expressielevels van genen tijdelijk aan te passen kunnen cellen reageren op omgevingsfactoren zoals mechanische belasting en trauma's. Een van deze epigenetische mechanismen is de expressie van lncRNA (**Tekst box 1**). LncRNA's zijn over het algemeen langer dan 200 nucleotiden en lijken op mRNA moleculen, maar waar mRNA transleert naar eiwit, is lncRNA niet eiwit coderend. LncRNA's kunnen op verschillende niveaus de activiteit van mRNA en eiwitten beïnvloeden en zo processen in het weefsel reguleren. Het gegeven

dat lncRNA's erg weefsel- en ziekte-specifiek kunnen zijn, maakt dat lncRNA een aantrekkelijk aangrijpingspunt is voor medicijnen. Daarom hebben wij in **hoofdstuk 3** lncRNA's geïdentificeerd die het artroseproces markeren in subchondraal bot in interactie met kraakbeen. Door de lncRNA's die tot expressie komen in macroscopisch aangedaan en niet-aangedaan weefsel met elkaar te vergelijken, hebben we vijf lncRNA's geïdentificeerd die zowel in subchondraal bot als in kraakbeen het artroseproces markeren. lncRNA *AC005165.1* kwam in zowel bot als kraakbeen significant lager tot expressie in het aangedane weefsel. Door correlaties te berekenen tussen de expressie levels van *AC005165.1* en mRNA vonden we *FRZB*, een welbekend artrose gen, als mogelijk doelwit van *AC005165.1*. Vervolgens hebben we experimenteel bevestigd dat een lagere expressie van *AC005165.1* in bot cellen direct of indirect leidt tot een lagere expressie van *FRZB*. Dit zien we ook terug in het artrose proces. Verhoging van *AC005165.1* zou daarom een mogelijke therapeutische strategie kunnen zijn om de expressie levels van *FRZB* stabiel te houden in zowel kraakbeen als bot.

Diversiteit van het pathofysiologisch proces in artrose; subtype A en B artrose

Naast de moleculaire verschillen tussen aangedaan en niet-aangedaan weefsel, kan moleculaire data van kraakbeen en subchondraal bot ook gebruikt worden voor het identificeren van subtypes van artrose. Eerdere studies hebben laten zien dat er consistente verschillen zijn in het artrose ziekteproces tussen patiënten. Er zijn twee subtypes van artrose geïdentificeerd op basis van moleculaire data van kraakbeen. In het kraakbeen van patiënten met subtype A artrose wordt voornamelijk een transitie van kraakbeen naar botachtig weefsel gezien, terwijl het kraakbeen van patiënten met subtype B artrose vooral inflammatie laat zien. Om te kijken of het artroseproces ook verschillend is in het onderliggende bot, hebben we ons in **hoofdstuk 5** gericht op het karakteriseren van deze artrose subtypes in het subchondrale bot. Als grootste verschil tussen het bot van de twee subtype artrose patiënten vonden we de mate waarin genen die het inflammatieproces markeren tot expressie kwamen. Vergelijkbaar met kraakbeen kwamen deze inflammatiemarkers, waaronder *IL1 β* , *OSM* en *AIF1*, hoger tot expressie in het bot van subtype B patiënten. Daarnaast zagen we ook een hogere expressie van genen die duiden op de formatie van (nieuw) bot in subtype B patiënten. Deze verschillen tussen patiënten moet in acht worden genomen wanneer men medicijnen gaat ontwikkelen, zodat de patiënt met het juiste medicijn behandeld kan worden.

Classificatie van artrose subtypen; circulerende miRNA's

Tot nu toe is de diagnose en/of classificatie van artrose alleen gebaseerd op röntgenfoto's en klinische symptomen zoals pijn en stijfheid van het gewricht. Er is dus een onvervulde behoefte aan betrouwbare biomarkers die processen in gewrichtsweefsels, waaronder

kraakbeen en subchondraal bot, weerspiegelen. Tot dusver zijn afbraakproducten van gewrichtsweefsels aanwezig in serum of urine, zoals sCOMP en uCTX-II, bestudeerd als mogelijke biomarkers. Deze afbraakproducten zijn meestal niet specifiek voor het artrose ziekteproces dat plaats vindt in de gewrichtsweefsels. Biomarkers die wel specifieke ziekteprocessen in de gewrichtsweefsels markeren bieden de mogelijkheid om subtype A en B artrose te herkennen, wat vervolgens de ontwikkeling van een therapie op maat faciliteert. Een nieuwe richting in het identificeren van biomarkers voor artrose is het bestuderen van miRNA's die aanwezig zijn in bloed. MiRNA's zijn stabiel in plasma en uit recent onderzoek blijkt dat deze miRNA's inderdaad in staat zijn artrose-gerelateerde mRNA-expressiepatronen in kraakbeen te weerspiegelen. Op basis van deze gegevens hebben wij in **hoofdstuk 4** gezocht naar miRNA's in plasma die het verschil markeren tussen subtype A en subtype B artrose patiënten. In dit hoofdstuk hebben wij vier miRNA's in het plasma geïdentificeerd die samen kunnen voorspellen of een patiënt subtype A of subtype B artrose heeft. Dit kan worden ingezet om, voor een behandeling start, te bepalen welk subtype artrose een patiënt heeft en vervolgens de behandeling hierop af te stemmen.

Genetische predispositie en translationeel onderzoek; onderliggende mechanisme van risicogenen *WWP2* en *IL11*.

Tot op heden zijn er meer dan 100 associaties gevonden tussen variaties in het DNA, zogenoemde single nucleotide polymorphism (SNP), en het krijgen van artrose. Het is van belang dat deze risico SNPs voor artrose worden getransleerd naar onderliggende biologische mechanismen en uiteindelijk aangrijpingspunten voor medicijnen. Daarom hebben wij in **hoofdstuk 6** en **hoofdstuk 7** twee verschillende modellen van kraakbeen en/of bot gebruikt om de onderliggende biologische mechanismen van twee van deze risico SNPs te onderzoeken.

In **hoofdstuk 6** hebben we gekeken naar risico SNP rs1052429, die zich in de genetische code van het *WWP2* gen bevindt. Eerder is al laten zien dat het risico allel rs1052429-A geassocieerd is met hogere expressielevels van *WWP2*. Op basis hiervan was onze hypothese dat verhoogde expressielevels van *WWP2* een verhoogd risico geeft op artrose. Daarom hebben we met behulp van een lentivirus verhoogde expressielevels van *WWP2* in kraakbeencellen, zogenoemde chondrocyten, gegenereerd. Vervolgens hebben we 3D kraakbeen organoïden, of ook wel miniatuurorgaantjes, gemaakt van chondrocyten met en zonder verhoogde expressielevels van *WWP2*. Deze kraakbeen pellets hebben we met elkaar vergeleken om inzicht te krijgen in het mechanisme waarop *WWP2* verhoogd risico geeft op artrose. Verhoogde *WWP2* expressielevels resulteerde in verlaagde expressielevels van kraakbeenmarkers *COL2A1* en *ACAN*. Daarnaast zagen we ook verlaagde expressielevels van *GDF10*, *STC2* en *GJA1* en

verhoogde expressielevels van *EPAS1*, allemaal hypoxie-gerelateerde genen. Deze bevindingen suggereren dat verhoogd expressielevel van *WWP2* resulteert in een nadelig effect op kraakbeenmatrix. De genexpressie levels van *EPAS1*, *GDF10*, en *GJA1* zijn allemaal gevoelig voor zuurstoflevels, wat kan betekenen dat verhoogde levels van *WWP2* resulteert in hypoxie-gerelateerde chondrocyt dedifferentiatie. Naast het effect van verhoogde *WWP2* expressie levels, hebben we in **hoofdstuk 6** ook gekeken naar de eiwit expressie in 3D kraakbeen organoïden na drie en na zeven dagen kweken. Op zowel dag drie als dag zeven kwamen kraakbeen eiwitten zoals collageen type 2, aggrecan en fibronectine hoog tot expressie. Dit wijst er op dat chondrocyten in deze 3D kraakbeen organoïden al in drie dagen tijd kraakbeen matrix produceren.

In **hoofdstuk 7** hebben we gefocust op risico SNP rs4252548, die zich in het coderende deel van *IL11* bevindt. Risico allel rs4252548-T is een zogenoemde missense mutatie en resulteert in verminderde stabiliteit van het IL11 eiwit. De hypothese is daarom dat risico allel rs4252548-T verhoogd risico geeft op artrose door minder beschikbaarheid van het IL11 eiwit. Op basis hiervan werd humaan recombinant IL11 (hrIL11) eiwit als mogelijk medicijn voor artrose gesuggereerd. Het voordeel van hrIL11 is dat het gebruik van hrIL11 al is goedgekeurd door de FDA als medicijn tegen trombocytopenie. Een goedgekeurd medicijn is al getest op veiligheid en daarom is het risico op falen van het medicijn lager. Daarnaast kan de ontwikkeling van een al goedgekeurd medicijn veel sneller gaan, omdat er al verschillende testen zijn uitgevoerd. In tegenstelling tot bovengenoemde hypothese, zien we in zowel bot als kraakbeen een hoger level van *IL11* mRNA in aangedaan artrose weefsel in vergelijking tot niet-aangedaan weefsel uit hetzelfde gewricht. Dit zou er op kunnen wijzen dat het IL11 eiwit niet goed wordt aangemaakt of niet goed functioneert in aangedaan weefsel. Om te bestuderen of hrIL11 inderdaad gebruikt kan worden als medicijn tegen artrose, hebben we gebruik gemaakt van een *ex vivo* model van kraakbeen en bot, de zogenoemde osteochondrale biopten. Deze osteochondrale biopten zijn genomen van het aangedane gedeelte van het gewricht, waardoor deze biopten het artrose ziektebeeld in zowel kraakbeen als bot weerspiegelen. Vervolgens hebben we deze biopten behandeld met hrIL11 om te kijken wat het effect is van hrIL11 op het kraakbeen en bot. De effecten van hrIL11 bleken minimaal te zijn. In kraakbeen zorgde hrIL11 behandeling voor een verhoogde expressie van botmarker *SPP1* en voor een verlaagde expressie van *WNT16*. Dit wijst er op dat het kraakbeen meer hypertroof wordt door behandeling met hrIL11, wat een ongunstig effect is. In bot zagen we een verlaagde expressie van *PTGES* en *IL11RA*, wat mogelijk wijst op een verminderde osteoclast activiteit en daarom een voordelig effect zou kunnen zijn. Opvallend was dat de intrinsieke expressielevels van *IL11* niet significant veranderd waren na behandeling met het hrIL11 eiwit. Met name in het kraakbeen was er een grote variatie in intrinsieke *IL11* expressie te zien in reactie op behandeling

met het hrIL11 eiwit. Vooral patiënten die uit zichzelf een hoog expressielevel van *IL11* hadden reageerde wel op de hrIL11 eiwit behandeling. Dit zou er op kunnen wijzen dat het eigen IL11 eiwit mogelijk niet efficiënt bind aan zijn receptor. Meer onderzoek is nodig om te bekijken of dit daadwerkelijk zo is en wat dit precies betekent voor een mogelijke behandeling met hrIL11.

Nieuw model voor het bestuderen van kraakbeen en bot; osteochondrale unit-op-een-chip
De twee modellen die we in dit proefschrift gebruikt hebben zijn de 3D *in vitro* kraakbeen pellets en de *ex vivo* osteochondrale biopten. De kraakbeen pellets hebben als voordeel dat genexpressie kan worden aangepast, bijvoorbeeld door gebruik te maken van een lentivirus, om zo de effecten van een specifiek gen te kunnen onderzoeken (**hoofdstuk 6**). Het nadeel van 3D kraakbeen pellets is dat het model alleen maar uit kraakbeen bestaat, terwijl ook bot een belangrijke rol speelt in artrose. De interactie tussen kraakbeen en bot wordt wel gevangen door het gebruik van osteochondrale biopten (**hoofdstuk 7**). Echter, het nadeel van osteochondrale biopten is dat hier genexpressie niet kan worden aangepast. Om deze limitaties te voorkomen hebben we in **hoofdstuk 8** een nieuw model ontwikkeld waarbij we, gebruikmakende van chondrocyten en botcellen, kraakbeen en bot genereren in een microfluidisch systeem, een zogenoemd gewricht-op-een-chip model. Naast het genereren van kraakbeen en bot in dit systeem hebben we ook laten zien dat we dit weefsel kunnen blootstellen aan artrose-gerelateerde verstoringen zoals hypertrofie-inducerend thyroïd hormoon T3. Dit model kan in de toekomst gebruikt worden voor het functioneel bestuderen van genen en factoren die verhoogd risico geven op artrose.

Conclusie en toekomstperspectieven

In dit proefschrift hebben we verschillende strategieën toegepast om meer inzicht te krijgen in het artrose ziekteproces. Op deze manier hebben we laten zien dat er een aantal belangrijke zaken zijn waar men rekening mee dient te houden bij de ontwikkeling van medicijnen tegen artrose. Ondanks dat genetica een goed startpunt is voor het vinden van aangrijpingspunten voor medicijnen, is het van essentieel belang dat het onderliggende mechanisme van deze risicogenen wordt onderzocht. Dit om te begrijpen hoe en via welk weefsel het gen verhoogd risico op artrose veroorzaakt. Daarnaast pleiten wij voor een medicijn wat aangrijpt op zowel kraakbeen als bot, om op deze manier zo effectief mogelijk te kunnen behandelen. Ook dient men rekening te houden met de heterogeniteit die artrose kent en niet uit te gaan van het one-drug-fits-all-patients principe. Zowel in dit proefschrift als in voorgaande studies is aangetoond dat het artrose ziekteproces verschillend is tussen zowel het type gewricht (heup en knie) als tussen patiënten (subtype A en subtype B artrose). Tenslotte hebben we in dit proefschrift de potentie van miRNA's in bloed als biomarker voor artrose subtypes

weergeven. Al met al hebben we in dit proefschrift geprobeerd een stap voorwaarts te maken in de transitie van bench-to-bed-side.