



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Modeling the genetic and mechanical interplay in osteoarthritis: from in vitro systems to mechanistic insights

Bloks, N.G.C.

Citation

Bloks, N. G. C. (2025, October 22). *Modeling the genetic and mechanical interplay in osteoarthritis: from in vitro systems to mechanistic insights*.

Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4279635>

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/1887/4279635>

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

Nederlandse Samenvatting

Inleiding

Artrose is een veelvoorkomende en invaliderende gewrichtsaandoening die wereldwijd miljoenen mensen treft, met een toenemende prevalentie door de vergrijzing en een stijgend aantal mensen met overgewicht. De ziekte wordt gekenmerkt door een progressieve en onomkeerbare afbraak van het kraakbeen in de gewrichten. Dit leidt tot chronische pijn, stijfheid en een aanzienlijke vermindering van de mobiliteit, wat de levenskwaliteit van patiënten ernstig aantast. De ontwikkeling van artrose is een complex proces dat wordt beïnvloed door een samenspel van diverse factoren, waaronder leeftijd, geslacht, overgewicht en, in belangrijke mate, genetische aanleg.

Een cruciale omgevingsfactor in de pathogenese van artrose is mechanische belasting. Gezond kraakbeen heeft een bepaalde mate van fysiologische belasting nodig om in goede conditie te blijven. Echter, overmatige of schadelijke mechanische krachten, zoals die optreden bij een blessure of door langdurige overbelasting, kunnen het ziekteproces juist initiëren of versnellen. De interactie tussen deze mechanische krachten en de genetische kwetsbaarheid van een individu is een van de kernvragen in het artroseonderzoek. Op moleculair niveau worden de reacties van cellen op hun omgeving mede gestuurd door epigenetische mechanismen, zoals DNA-methylatie. Dit zijn chemische markeringen op het DNA die als 'schakelaars' fungeren om genen aan of uit te zetten, en die potentieel langdurige veranderingen in de celfunctie kunnen vastleggen.

Ondanks de enorme impact op zowel de patiënt als de maatschappij, bestaan er momenteel geen medicijnen die het verloop van artrose kunnen stoppen, vertragen of omkeren. Om effectieve, ziekte-modificerende therapieën te kunnen ontwikkelen, is een diepgaander begrip van de fundamentele moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan de ziekte essentieel.

Doel en opzet van dit proefschrift

Het centrale doel van dit proefschrift was het ontrafelen van de complexe interactie tussen genetische aanleg en mechanische belasting bij het ontstaan en de progressie van artrose. Om dit te bereiken, hebben we geavanceerde in vitro ziektemodellen ontwikkeld en toegepast. Dit zijn modellen waarbij we processen bestuderen in cellen of weefsels die buiten het lichaam, in een gecontroleerde laboratoriumomgeving, worden gekweekt. Deze modellen, die functioneren als 'gewrichten-in-een-schaaltje', stelden ons in staat om de functionele gevolgen van specifieke genetische varianten en de reactie van kraakbeencellen (chondrocyten) op mechanische stress op moleculair niveau te bestuderen. De belangrijkste strategieën die we hebben gevolgd, waren:

1. Het ontwikkelen en valideren van duurzame 3D-kraakbeenorganoïden. We hebben mini-orgaantjes van kraakbeen gekweekt met behulp van zowel primaire menselijke kraakbeencellen (hPACs) als humane geïnduceerde pluripotente stamcellen (hiPSCs). De epigenetische profielen (met name DNA-methylatie) werden gebruikt als een cruciale maatstaf om de kwaliteit en authenticiteit van deze modellen te beoordelen.
2. Het onderzoeken van de epigenetische reacties op mechanische stress. We hebben de kraakbeenmodellen blootgesteld aan hyperfysiologische mechanische belasting om de moleculaire en met name de epigenetische veranderingen (de 'chemische schakelaars' op het DNA) in kaart te brengen die door deze belangrijke risicofactor worden veroorzaakt.
3. Het functioneel karakteriseren van een zeldzame, schadelijke genetische variant. We hebben een specifieke variant in het COL6A3-gen, die werd geïdentificeerd bij een patiënt met een ernstige vorm van artrose, functioneel onderzocht en de interactie tussen deze genetische kwetsbaarheid en mechanische stress bestudeerd.

Samenvatting van de resultaten

Hoofdstukken 2 en 3 - De ontwikkeling van in vitro kraakbeenmodellen

Om de complexe processen van artrose te kunnen bestuderen, zijn betrouwbare en reproduceerbare laboratoriummodellen onmisbaar. Een belangrijke stap was het creëren van een onuitputtelijke bron van chondrocyten. Hiervoor hebben we humane geïnduceerde pluripotente stamcellen (hiPSCs) gebruikt. Een centrale vraag was of de oorsprong van deze stamcellen van invloed is op hun vermogen om kwalitatief goed kraakbeen te vormen. We onderzochten of hiPSCs afkomstig van kraakbeencellen een 'epigenetische herinnering' behouden die hen een voordeel geeft ten opzichte van hiPSCs afkomstig van huidcellen.

Door de DNA-methylatieprofielen en de samenstelling van het gevormde neo-kraakbeen te vergelijken met die van kraakbeen gekweekt uit primaire chondrocyten (de 'gouden standaard'), konden we de kwaliteit van onze modellen objectief beoordelen. Onze resultaten toonden verrassend genoeg aan dat het differentiatieprotocol een grotere rol speelt dan de oorsprong van de hiPSC; het epigenetisch geheugen bood geen significant voordeel. De methylatieprofielen waren zeer vergelijkbaar, wat de robuustheid van ons differentiatieprotocol bevestigde. Er waren echter wel subtiele epigenetische verschillen tussen kraakbeen gekweekt uit hiPSCs en primaire chondrocyten. Deze kennis biedt kansen om het differentiatieproces van hiPSC naar chondrocyten verder te optimaliseren. Vervolgens hebben we in Hoofdstuk 3 dit model gebruikt voor het

toetsen van effecten van mechanische belasting, wat de weg vrijmaakte voor de functionele studies in de latere hoofdstukken.

Hoofdstuk 4 - Epigenetische littekens van mechanische belasting

Mechanische belasting veroorzaakt niet alleen directe fysieke schade, maar kan ook leiden tot veranderingen in de genexpressie van een cel. Deze veranderingen worden vaak gereguleerd door epigenetica, in het bijzonder door DNA-methylatie. Dit mechanisme functioneert als een set chemische schakelaars op het DNA die genen als een dimmer reguleren en zo de cellulaire functie beïnvloeden. Een belangrijk gegeven is dat DNA-methylatie op lange termijn de genen reguleert en als dusdanig functioneert als het geheugen van een cel. In Hoofdstuk 4 hebben we de hypothese getest dat mechanische overbelasting blijvende sporen achterlaat in het epigenoom van chondrocyten.

We hebben aangetoond dat een enkele, kortdurende hyperfysiologische mechanische belasting leidt tot consistente en potentieel langdurige veranderingen in de DNA-methylatie. Deze epigenetische 'littekens' vonden plaats bij genen die cruciaal zijn voor de interactie van de cel met haar omgeving en voor de reactie op wondgenezing, zoals *CD44* en *ITGA5*. Dit is een belangrijke bevinding, omdat het een direct moleculair mechanisme blootlegt waarmee een fysieke, omgevingsgebonden risicofactor (mechanische schade) kan leiden tot een blijvende verandering in de cellulaire programmering. Belangrijker nog, we vonden een significante overlap tussen de door belasting geïnduceerde epigenetische veranderingen en de epigenetische afwijkingen die worden waargenomen in het kraakbeen van artrosepatiënten. Dit suggereert dat de opeenstapeling van mechanische schade door de jaren heen, via deze epigenetische littekens, de chondrocyt geleidelijk in een kwetsbaardere, ziekte-gevoelige toestand kan brengen, wat uiteindelijk bijdraagt aan het ontstaan van artrose.

Hoofdstuk 5 - Een schadelijke variant in COL6A3 verstoort de reactie op mechanische stress

Het kernhoofdstuk van dit proefschrift, Hoofdstuk 5, richtte zich op een zeldzame, voorspeld schadelijke variant in het gen *COL6A3*. Deze variant werd geïdentificeerd bij een patiënt met een ernstige, gegeneraliseerde vorm van artrose. Het *COL6A3*-gen codeert voor collageen type VI, een essentieel eiwit in de pericellulaire matrix (PCM), de directe micro-omgeving die de chondrocyt omringt en beschermt. Met behulp van CRISPR-Cas9-technologie, een soort genetische schaar, hebben we deze specifieke variant nauwkeurig geïntroduceerd in onze hiPSC-modellen.

Onze experimenten toonden aan dat de *COL6A3*-variant de integriteit van de kraakbeenmatrix verstoort. De binding tussen collageen VI en het belangrijke matrixeiwit

fibronectine was verminderd en de hoeveelheid proteoglycanen (de 'sponzen' die water vasthouden en het kraakbeen zijn veerkracht geven) was afgenomen. Dit duwde de chondrocyten naar een fenotype dat kenmerkend is voor artrose. De meest opvallende ontdekking was echter de interactie met mechanische belasting. In tegenstelling tot de controlecellen, die een normale, gecontroleerde en tijdelijke ontstekingsreactie vertoonden na mechanische stress – een reactie die nodig is voor herstel – was deze reactie in de cellen met de *COL6A3*-variant volledig afwezig of sterk afgenomen. Hieruit volgt de hypothese dat niet alleen chronische ontsteking, maar ook het onvermogen om een juiste acute stressrespons te monteren, schadelijk is voor het kraakbeen.

Verder onderzoek wees uit dat het lang niet-coderende RNA (lncRNA) *MIR31HG* een sleutelrol speelt in de regulatie van deze afgenomen ontstekingsreactie. Een lncRNA is een type RNA-molecuul dat niet voor een eiwit codeert maar wel de activiteit van andere genen reguleert. De identificatie van *MIR31HG* als regulator van dit proces maakt het een interessant potentieel doelwit voor verder onderzoek.

Conclusies en toekomstperspectieven

Dit proefschrift heeft met succes het complexe samenspel tussen een specifieke genetische factor (*COL6A3*-variant) en een omgevingsrisicofactor (mechanische belasting) gemodelleerd met behulp van geavanceerde in vitro organoïdemodellen. De rol van epigenetica was hierin tweeledig: het diende als een cruciale kwaliteitsmaatstaf voor onze modellen en als een fundamenteel mechanisme om de langetermijneffecten van mechanische stress te verklaren. Hiermee hebben we een moleculaire link gelegd tussen mechanische overbelasting en het lange termijn risico op het ontwikkelen van artrose via stabiele epigenetische veranderingen in het DNA.

Uiteindelijk hebben we de interactie tussen genetica en omgevingsfactoren bestudeerd. We hebben aangetoond dat de schadelijke *COL6A3*-variant de functie van de pericellulaire matrix aantast en, cruciaal, de normale, herstellende ontstekingsreactie op mechanische stress verstoort. Dit proces wordt op zijn beurt gereguleerd door het lncRNA *MIR31HG*. Deze bevindingen benadrukken een fundamenteel principe: een gezonde reactie op mechanische belasting vereist een nauwkeurig gereguleerd, tijdelijk ontstekingsproces voor weefselherstel. Een verstoring hiervan kan de balans in het gewricht verstoren en bijdragen aan het ontstaan van artrose.

Dit werk biedt een dieper inzicht in hoe omgevingsfactoren de ziekte op moleculair niveau kunnen beïnvloeden en onderstreept het belang van epigenetische regulatie in de gezondheid van kraakbeen. De in dit proefschrift ontwikkelde modellen en de verkregen inzichten openen nieuwe deuren voor toekomstig onderzoek. Ze bieden een

platform voor het testen van nieuwe geneesmiddelen die niet simpelweg ontsteking remmen, maar die gericht zijn op het herstellen van de juiste cellulaire respons op stress. Dit werk vormt een belangrijke stap voorwaarts in ons begrip van de moleculaire basis van artrose en draagt bij aan de zoektocht naar de eerste, langverwachte ziekte-modificerende behandeling.

