

Novel Perspectives in Regulation of Chondrogenic Differentiation

Citation for published version (APA):

Caron, M. M. J. (2013). *Novel Perspectives in Regulation of Chondrogenic Differentiation*. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20130308mc>

Document status and date:

Published: 01/01/2013

DOI:

[10.26481/dis.20130308mc](https://doi.org/10.26481/dis.20130308mc)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary



Chondrogenic differentiation is a tightly regulated process in which many factors regulate the discrete stages of the differentiation program. Understanding the mechanisms of cell commitment and further differentiation into the chondrogenic lineage is of great importance to optimize (progenitor) cell-based cartilage repair techniques. The work described in this thesis aimed to find novel perspectives to increase the chondrogenic differentiation capacity from progenitor cells and modulate their chondrogenic outcome.

Several approaches were explored to enhance the chondrogenic differentiation capacity of progenitor cells. First it was found that inflammatory mediators as NF- κ B/p65 have a role in the onset of chondrogenic differentiation from progenitor cells. Modulating the activity of NF- κ B/p65 alters the chondrogenic outcome via signalling through key chondrogenic transcription factor Sox9. In addition, expression of several growth factors, including BMP-2, is co-regulated in differentiating chondrocytes by NF- κ B/p65 and in turn BMP-2 is able to regulate NF- κ B/p65 signalling which could, at least in part, explain the pro-chondrogenic effect of BMP-2. As an alternative approach to optimize chondrogenic differentiation from progenitor cells we found that chondrogenic marker expression of differentiating chondroprogenitor cells *in vitro* can be enhanced by increasing the osmolarity levels of culture medium by 100 mOsm. The osmolarity responsive gene Nfat5 is part of the mechanism that underlies this effect and might directly influence chondrogenic differentiation via controlling the expression of key chondrogenic transcription factor Sox9.

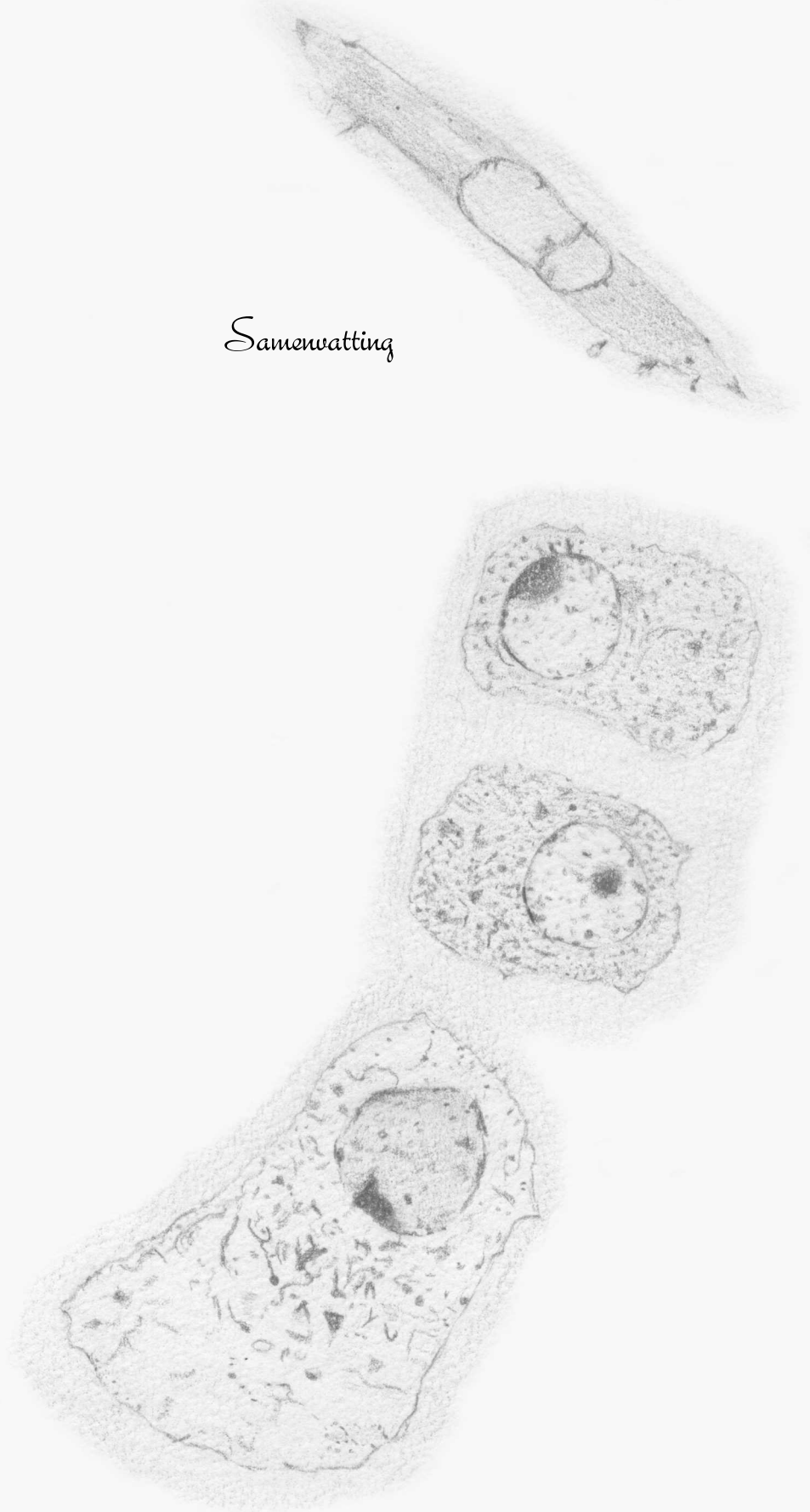
Equally important for optimal chondrogenic differentiation is not only to stimulate the progenitor cells towards chondrocytes but also keeping them chondrocytes and prevent them from hypertrophy. Several new leads were found to suppress chondrocyte hypertrophy during chondrogenic differentiation of progenitor cells. We found that BMP-2 and BMP-7 have differential effects on the chondrogenic outcome of differentiating chondroprogenitor cells: BMP-2 not only induced chondrogenic differentiation but even more chondrocyte hypertrophy, while BMP-7 appears to increase or maintain chondrogenic potential and prevent chondrocyte hypertrophy. Studies into the possible underlying mechanism explaining this discrepancy revealed Bapx1/Nkx3.2 signalling as a potential candidate in regulating chondrocyte hypertrophy. Next to BMP-7, we identified a role for COX-2 in chondrocyte hypertrophy. COX-2 is one of the main transcriptional targets of the NF- κ B/p65 complex and we found that inhibition of COX-2 activity by COX-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) specifically decreases the level of chondrocyte hypertrophic differentiation in different progenitor-based

chondrogenic differentiation models, while leaving chondrogenic differentiation unaltered. Also, systemic inhibition of COX-2 activity *in vivo* resulted in significantly impaired chondrocyte hypertrophic differentiation in rabbit growth plates. Next to COX-2-specific NSAIDs, other NSAIDs specifically inhibit COX-1 or both COX-enzymes. It was determined that, as opposed to COX-2 inhibition, COX-1-specific NSAIDs inhibit extracellular matrix production during chondrogenic differentiation from progenitor cells. A possible explanation for the discrepancy in the chondrogenic outcome influenced by COX-1- and COX-2- specific inhibitors might lie in differential prostaglandin synthesis under these circumstances.

Especially for progenitor cell-based cartilage repair technologies, our novel insights could be employed to increase the differentiation potential of progenitor cells toward engineered cartilaginous tissue *in vitro and in vivo*. To also be able to test the above candidates on human articular chondrocytes in an hypertrophic differentiation context in the future, we set up a human *in vitro* culture system suitable of displaying hypertrophic potential. Using this 2D model requires protein analysis as an important read out parameter and once again stresses on the mutual analysis of mRNA and protein in chondrocyte molecular biology.

Taken together, the findings described in this thesis on molecular pathways involved in regulating the chondrogenic phase of endochondral ossification may not only be a logical way to stimulate cartilage (and endochondral bone) (re)generation, but is also expected to provide valuable information how to keep differentiating progenitor cells or mature chondrocytes in the desired differentiation phase and will contribute to our understanding of skeletal developmental processes, fracture healing and diseases like OA.

Samenwatting



Kraakbeen differentiatie is een strak gereguleerd proces waarbij vele factoren betrokken zijn die de afzonderlijke fasen van het differentiatie programma reguleren. Het begrijpen van de moleculaire mechanismen die betrokken zijn bij de differentiatie in de chondrogene lijn zijn van groot belang voor de optimalisatie van op (voorloper/stam) cellen gebaseerde kraakbeen herstel technieken. Het werk beschreven in dit proefschrift is gericht op het vinden van nieuwe perspectieven om de chondrogene differentiatie capaciteit van kraakbeen voorloper cellen te verhogen en de chondrogene uitkomst te moduleren.

Verschillende benaderingen werden bestudeerd om de chondrogene differentiatie capaciteit van voorlopercellen te verbeteren. Allereerst hebben we vastgesteld dat ontstekings-mediators als NF- κ B/p65 een rol spelen bij de initiatie van chondrogene differentiatie van voorlopercellen. Moduleren van de activiteit van het NF- κ B/p65 complex resulteert in een veranderde chondrogene differentiatie via signalering via een van de belangrijkste chondrogene transcriptiefactoren: Sox9. Daarnaast is de expressie van verschillende groeifactoren, waaronder BMP-2, tijdens differentiatie mede gereguleerd door NF- κ B/p65, en op zijn beurt kan BMP-2 NF- κ B/p65 signalering reguleren waardoor, althans gedeeltelijk, het pro-chondrogene effect van BMP-2 kan worden verklaard. Als een alternatieve benadering voor de optimalisatie van chondrogene differentiatie vanuit kraakbeen voorloper cellen hebben we gevonden dat kraakbeen gen-expressie *in vitro* kan worden verbeterd door de osmolariteit van het kweekmedium te verhogen met 100 mOsm. Nfat5, het gen dat gevoelig is voor osmolariteit, maakt deel uit van het mechanisme dat ten grondslag ligt dit effect en kan mogelijk chondrogene differentiatie direct beïnvloeden via de regulering van de expressie van Sox9.

Even belangrijk voor optimale chondrogene differentiatie is niet alleen de stimulatie van kraakbeen voorloper cellen naar chondrocyten, maar ook om vervolgens het chondrocyt fenotype te behouden en kraakbeen hypertrofie te voorkomen. Verschillende nieuwe leads bleken chondrocyt hypertrofie te onderdrukken tijdens de chondrogene differentiatie van voorlopercellen. We vonden dat BMP-2 en BMP-7 differentiële effecten hebben op de uitkomst van chondrogene differentiatie chondroprogenitor cellen: BMP-2 induceerde niet alleen chondrogene differentiatie maar ook chondrocyte hypertrofie, terwijl BMP-7 het chondrogene vermogen lijkt te verhogen of handhaven en tevens chondrocyt hypertrofie te voorkomen. In de studies naar een mogelijke onderliggend mechanisme ter verklaring van deze discrepantie kwam Bapx1/Nkx3.2 signalering naar voren als een potentiële kandidaat in het reguleren van chondrocyten hypertrofie. Naast BMP-7 identificeerden we ook een rol voor COX-2 in chondrocyte hypertrofie. COX-2 is een van de belangrijkste

transcriptionele targets van het NF- κ B/p65 complex, en het bleek dat remming van COX-2 activiteit van door COX-2 selectieve niet-steroïdale anti-inflammatoire geneesmiddelen (NSAIDs) specifiek de hoogte van chondrocyte hypertrofie kon voorkomen in verschillende voorlopercel-gebaseerde chondrogene differentiatie modellen, terwijl chondrogene differentiatie ongewijzigd bleef. Ook systemische remming van COX-2 activiteit *in vivo* leidde tot een significante vermindering van chondrocyt hypertrofe differentiatie in groeischijven van jonge konijnen. Naast de COX-2-specifieke NSAIDs, zijn er ook andere NSAIDs die specifiek COX-1 of beide COX-enzymen remmen. Er werd vastgesteld dat, in tegenstelling tot COX-2 specifieke NSAIDs, COX-1-specifieke NSAIDs de kraakbeen extracellulaire matrix productie remmen tijdens chondrogene differentiatie van kraakbeen voorloper cellen. Een mogelijke verklaring voor deze discrepantie in de chondrogene uitkomst kan liggen in differentiële prostaglandinesynthese onder deze omstandigheden.

Speciaal voor voorlopercel-gebaseerde kraakbeenherstel technologieën kunnen onze nieuwe inzichten worden gebruikt om zo het differentiatiepotentieel van voorlopercellen te verhogen voor ge-engineered kraakbeenweefsel *in vitro* en *in vivo*. Om ook de bovengenoemde kandidaten te testen op humane articulaire chondrocyten in een hypertrofe context hebben we een *in vitro* differentiatie systeem opgezet voor het induceren van chondrocyt hypertrofie in humane adulte chondrocyten. Dit 2D-model vereist wel eiwit analyse als een belangrijke parameter en benadrukt zo nogmaals op het analyseren van zowel eiwit als RNA in de moleculaire chondrocyt biologie.

Tezamen kunnen de bevindingen beschreven in dit proefschrift de moleculaire pathways die betrokken zijn bij het reguleren van de chondrogene fase van endochondrale ossificatie niet alleen op een logische manier gebruikt worden om kraakbeen (en endochondrale bot) (re) generatie te stimuleren, maar zal ook naar verwachting waardevolle informatie verstrekken over hoe differentiërende stamcellen of volwassen chondrocyten in de gewenste differentiatie fase te houden en zal daarnaast bijdragen aan ons begrip van skeletaire ontwikkelingsprocessen, fractuurgenezing en ziekten zoals artrose.