

# Bone regeneration

Citation for published version (APA):

Bách, L. Q. (2018). *Bone regeneration: Exploring a plethora of approaches*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.201812181b>

## Document status and date:

Published: 01/01/2018

## DOI:

[10.26481/dis.201812181b](https://doi.org/10.26481/dis.201812181b)

## 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](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

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

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

# Summary

## Bone regeneration: Exploring a plethora of approaches

Bone related disorders affect millions of people worldwide and are the leading cause for years lived with disabilities in many countries. Research in bone healing and regeneration is one of the earliest examples of medical research, with a direct impact on increasing the quality of life. Scientific and technological advances of the 21<sup>st</sup> century, particularly in the areas of genomics and proteomics, have generated a huge amount of data, but an understanding the mechanisms, pathway, and cell types involved is far from complete.

Chapter 1 of this thesis provides an up-to-date literature review about the components of bone and their regenerative capacity. Bone consists of macro-level tissues such as periosteum, osseous tissue, endosteum and bone marrow, which are useful for their utilization by the orthopaedic surgeons. But laboratory scientists prefer to work on a different scale, namely the microscopic composition of bone, including the bone cells and extracellular matrix proteins. Each of these components has been tested for their ability to regenerate bone *in vitro* as well as *in vivo*, which is the focus of this literature review.

In chapter 2, we performed a high throughput screen to search for a drug that stimulates collagen production of ATDC5 cells. Bone formation starts with the production of collagen matrix by osteoblasts. Increasing collagen production could have a benefit for bone formation. After the screen, we found and validated a drug called tetradecylthioacetic acid (TTA). TTA consistently induces collagen production from ATDC5 cells at bone gene and protein level. However, we did not see the same effect of TTA on human chondrocytes and human mesenchymal stem cells. Thus TTA can be used to improve the *in vitro* culture of ATDC5.

For chapter 3, we used a 3D culture system to grow ATDC5 cells for the purpose of upscaling its collagen matrix production. The cells were cultured in small aggregates of 1000 cells, which we called micro-tissue-engineering cartilage (MiTEC). This allows the cells to be in contact with each other, while facilitating nutrient and waste exchange to the culture medium. MiTEC can grow significantly in size, and produce the desired extracellular matrix quantity and quality. We demonstrated that this 3D culture system is suitable to grow ATDC5 in the lab for manipulating experiments, while has great potential for upscale manufacturing.

In chapter 4, we experimented with a novel approach of using topographical cues to influence cell fate. Topographical patterns that could induce early osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (from a previous screen), were tested to evaluate their effect on ATDC5 cells. The results showed that some patterns also stimulate hypertrophic differentiation of ATDC5, proving the concept of topography inducing cell fate. These patterns can be used to improve the *in vitro* culture of ATDC5 cell line.

Finally, in chapter 5, we attempted to devise a reporter cell line for the growth factor bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) utilizing the CRISPR-Cas9 gene editing tool. We successfully produced the DNA template for the knock-in strategy, consisting of the reporter

gene GFP, the puromycin resistant cassette and 2 homologous arms for BMP-2 locus. The template was validated by sequencing. However, the single guide RNA targeting of the BMP-2 locus was not successful, and thus none of the transfected cells carries the correct insert. More work needs to be done to finish the generation of this BMP-2 reporter cell line.

Overall, this thesis has explored several different approaches to study bone regeneration: a pharmaceutical high throughput drug screening approach, an upscaling 3D-cell culture approach, a novel topographical approach and a conventional genetic approach. Of the plethora of approaches that one could take, the author has chosen these broadly different ones in order to get exposed to as many laboratory techniques as possible. Besides, the author has an ambition for commercialization, thus every chosen approach has its own valorisation potential. To this end, the author still cannot answer the question: what is the best approach for bone regeneration? Perhaps, a lot more effort is needed to complete this mission. One thing is clear; the scientists are all on it.

# Samenvatting

## Botregeneratie: een verkenning van meerdere benaderingen

Bot gerelateerde aandoeningen komen wereldwijd voor bij miljoenen mensen en zijn in veel landen de belangrijkste oorzaak voor het leven met een handicap. Onderzoek naar botgenezing en -regeneratie is een van de vroegste voorbeelden van medisch onderzoek met een directe invloed op het verhogen van de kwaliteit van leven. Wetenschappelijke en technologische ontwikkelingen in de 21e eeuw, met name op het gebied van genomics en proteomics, hebben een enorme hoeveelheid aan data gegenereerd. Echter, ons inzicht in de mechanismen, pathways en celtypes die hierbij betrokken zijn, is verre van compleet.

Hoofdstuk 1 van dit proefschrift geeft een actueel literatuuroverzicht van de botcomponenten en hun regeneratieve vermogen. Bot bestaat uit weefsels op macroniveau zoals periosteum, botweefsel, endosteum en beenmerg, die nuttig zijn voor gebruik door orthopedisch chirurgen. Maar wetenschappers werken het liefst op een andere schaal, namelijk de microscopische samenstelling van het bot, inclusief de botcellen en extracellulaire matrixeiwitten. Al deze componenten zijn getest op hun vermogen om bot te regenereren, zowel *in vitro* als *in vivo*, wat de belangrijkste focus is van het literatuuroverzicht in dit hoofdstuk.

In hoofdstuk 2 hebben we een *high throughput screen* uitgevoerd om een medicijn te vinden dat de productie van ATDC5-collageen stimuleert. Botvorming begint met de productie van collageenmatrix door osteoblasten. Het verhogen van de productie van collageen zou voordelig kunnen zijn voor de botvorming. Na de *screen* vonden en valideerden we een medicijn genaamd tetradecylthioacetic acid (TTA). TTA induceert consequent collageenproductie door ATDC5-cellen op gen- en eiwitniveau. We zagen echter niet hetzelfde effect van TTA op menselijke chondrocyten en menselijke mesenchymale stamcellen. Daarop concludeerden we dat TTA gebruikt kan worden om de *in vitro* kweek van ATDC5 cellen te verbeteren.

Voor hoofdstuk 3 hebben we een 3D-kweeksysteem gebruikt om ATDC5 cellen te laten groeien met als doel om de productie van collageenmatrix op te hogen. De cellen werden gekweekt in kleine aggregaten van 1000 cellen, die we *micro-tissue-engineering cartilage* (MiTEC) noemden. Hierdoor kunnen de cellen met elkaar in contact komen, terwijl de uitwisseling van voedingsstoffen en afvalstoffen naar het kweekmedium wordt vergemakkelijkt. MiTEC kan aanzienlijk in omvang groeien en daarmee de gewenste hoeveelheid en kwaliteit aan extracellulaire matrix produceren. We hebben aangetoond dat dit 3D-kweeksysteem geschikt is om ATDC5 cellen in het laboratorium te laten groeien voor het beïnvloeden van experimenten, terwijl het daarnaast de mogelijkheid biedt voor het opschalen van de productie.

In hoofdstuk 4 hebben we geëxperimenteerd met een nieuwe benadering voor het gebruik van topografische modificaties om het gedrag van cellen te beïnvloeden. Topografische patronen die in een vorige *screen* vroege osteogene differentiatie van mesenchymale stamcellen induceerden, werden getest om hun effect op ATDC5 cellen te evalueren. Uit de resultaten bleek dat sommige patronen ook hypertrofische differentiatie van ATDC5 stimuleren, wat

bewijst dat topografie inderdaad het gedrag van de cel beïnvloedt. Deze topografische patronen kunnen worden gebruikt om de *in vitro* kweek van ATDC5 cellijn te verbeteren.

Tot slot, in hoofdstuk 5, hebben we getracht een reportercellijn te ontwerpen voor de groeifactor *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2) met behulp van het CRISPR-Cas9 *gen-editing* systeem. We hebben met succes de DNA-template voor de *knock-in*-strategie geproduceerd, bestaande uit het reporter gen GFP, de puromycine-resistente cassette en twee homologe armen voor de BMP-2-locus. De template werd gevalideerd door middel van *sequencing*. Echter, de *single-guide RNA-targeting* van de BMP-2 locus was niet succesvol waardoor geen van de getransfecteerde cellen de juiste insertie bevatten. Er moet daarom meer werk worden verricht om deze BMP-2-reportercellijn te voltooien.

Over het algemeen heeft dit proefschrift verschillende benaderingen onderzocht om botregeneratie te bestuderen: een farmaceutische *high-throughput* aanpak van drugsscreening, een opschaling van de 3D-celcultuur, een nieuwe topografische aanpak en een conventionele genetische aanpak. Van de vele verschillende benaderingen die mogelijk zijn, heeft de auteur bovenstaande keuzes gemaakt om met zoveel mogelijk laboratoriumtechnieken ervaring op te kunnen doen. Bovendien heeft de auteur een ambitie voor commercialisering, dus heeft elke gekozen aanpak zijn eigen valorisatiepotentieel. De auteur kan echter nog geen antwoord geven op de vraag welke benadering het beste is voor botregeneratie. Misschien is er veel meer inspanning nodig om deze missie te voltooien. Eén ding is wel duidelijk: wetenschappers zitten er bovenop.