

Summary

With an ever increasing average age of the world population, age related disorders become more frequent and take up an increasing part of the health care related costs. One of these age-related disorders is osteoporosis, which manifests as a decrease in bone mineral density and an increase in fracture risk, which in the long run lead to an increase in morbidity.

The free radical theory of aging states that organisms and their tissues because cells accumulate free radical induced damage to their DNA and proteins over time. Taking this theory as a starting point, we set out to study a number of parameters that could possibly affect the amount of damage that accumulates in bone cells and influence the rate of skeletal aging.

In **chapter 2** the effects of low oxygen tension on bone formation and matrix mineralization were studied. Low oxygen tension cultures (i.e. 2% oxygen) mimic the physiologic state of the cells in the body more accurately than the more commonly used 20% oxygen cultures. In our SV-HFO pre-osteoblast cell line, low oxygen tension inhibits osteoblast differentiation and mineralization, but also lowers the amount of ROS present in the cells, protecting the osteoblasts against oxidative damage and significantly reducing osteoblast apoptosis. In addition, the defense mechanisms that protect the cells against oxidative stress are downregulated, leaving them more susceptible to unexpected oxidative stress. Last, but not least, low oxygen tension has an effect on the expression of a number of matrix modification proteins. This suggests that the matrix produced under low oxygen tension might have a different composition than the mineralizing matrix found in cells cultured under 20% oxygen.

Since the expression levels of many of the genes studied in **chapter 2** were affected by a switch in oxygen tension, global gene expression profiling studies were performed as described in **chapter 3**, comparing cells cultured under 20% oxygen with those cultured on 2% oxygen. The changes in gene expression in each of the three predetermined differentiation stages were studied to determine which of the phases is most susceptible to 2% oxygen. The highest number of differentially regulated probes was found in phase 2, the pre-mineralization phase. Further analysis into the processes and functions behind the differentially regulated probes indicated that low oxygen tension affects osteoblast differentiation and matrix mineralization in two ways. First, they affect cell metabolism, lowering the metabolic state of the osteoblasts which drives them towards staying in an undifferentiated state. Secondly low oxygen tension changes the expression levels of genes involved in collagen matrix production and modification. Collagen expression and modification are severely affected by changes in oxygen tension. This fits with the results obtained in **chapter 2**.

In **chapters 4 and 5**, we moved away from cell lines and studied *in vivo* bone formation in DNA repair defective TTD mice. TTD is a rare autosomal recessive nucleotide excision repair disorder, caused by a mutation in XPD, a component of the basal transcription factor TFIIH, which is a major component of the nucleotide excision repair pathway. TTD mice, carrying a patient based mutation, resemble many of the features observed in the human TTD syndrome, including a range of skeletal abnormalities. The results, obtained

in female (**chapter 4**) and male (**chapter 5**) mice, display an accelerated skeletal aging, due to defective DNA repair. Both male and female mice undergo accelerated bone loss, affecting both cortical and trabecular bone. This loss in bone volume goes accompanied by a decrease in bone strength and a lack of periosteal apposition. When comparing wild type and TTD *in vitro* bone marrow cultures, we observed an age-related decrease in bone nodule formation, which was accelerated in TTD mice. Adipocyte differentiation was not affected *in vitro*. This is remarkable, since TTD mice display a severe lack of body fat. In conclusion, these data suggest that defective DNA repair leads to an increase in oxidative damage that leads to a decrease in the number of mesenchymal stem cells and a subsequent decrease in bone formation. In addition, the absence of the necessary systemic factors to drive osteoblast and adipocyte differentiation also contributes to the observed TTD phenotype.

In conclusion, oxygen tension plays an important role in regulating osteoblast cell metabolism, the production of ROS and protection against oxidative damage. While low oxygen tension inhibits osteoblast differentiation and mineralization, it also more accurately mimics physiologic circumstance in our bodies. Results might be of interest to the fields of fracture healing and MSC based tissue repair in which cells are exposed to very low concentrations of oxygen and still have to form bone. Defective DNA repair leads to accelerated skeletal aging in both male and female TTD mice. An accumulation of damage leads to a decrease in bone volume and strength as a result of a reduction in the number of MSCs present in the bone marrow of DNA repair deficient mice. TTD mice displayed a number of skeletal abnormalities, including a severe lack of periosteal apposition, which makes them an excellent tool to study the regulatory mechanisms that underlie bone formation and skeletal aging. Finally, the results obtained with the TTD mouse model underline the importance of optimal DNA repair for healthy aging and the maintenance of bone strength.

Samenvatting

De afgelopen decennia is de gemiddelde leeftijd van de wereldbevolking gestaag gestegen. Een van de gevolgen van een steeds ouder wordende populatie is een groei in het aantal mensen dat leidt aan een verouderingssyndroom en de steeds groter wordende financiële last die dat met zich mee brengt. Eén van deze syndromen is osteoporose, in de volksmond beter bekend als botontkalking. Osteoporose wordt gekenmerkt door een verlaging van de mineraaldichtheid van het bot en een verhoogd risico op botbreuken, in het bijzonder in de heup, pols en wervelkolom.

De vrije radicalen theorie stelt dat veroudering wordt veroorzaakt doordat de cellen in ons lichaam gedurende het leven schade aan eiwitten en DNA ophopen. Deze schade wordt veroorzaakt door vrije radicalen die worden geproduceerd door de cellen zelf. Een groot deel van deze schade wordt meteen gerepareerd, maar gedurende het leven verzamelt een cel toch de nodige beschadigde eiwitten en DNA moleculen waardoor de cellen uiteindelijk gedwongen worden om dood te gaan. Dit kan dan op latere leeftijd leiden tot orgaanfalen en de dood van een organisme. Met deze theorie als uitgangspunt is in dit proefschrift onderzoek gedaan naar een aantal factoren dat de hoeveelheid schade in botcellen kan beperken en zodoende botveroudering zou kunnen vertragen.

In **hoofdstuk 2** zijn de effecten van lage zuurstofspanning op botvorming en matrixmineralisatie bestudeerd. Normaal gesproken is de zuurstofspanning voor celkweken 20%. Een lage zuurstofspanning (in dit geval 2% zuurstof) benadert de fysiologische condities waarin botcellen zich in ons lichaam bevinden echter veel beter. In SV-HFO pre-osteoblasten leidt een lage zuurstofspanning tot een vertraagde osteoblast differentiatie en matrixmineralisatie, een verlaging van het aantal te detecteren vrije radicalen en een vermindering in osteoblast apoptose. Verder wordt er een vermindering in de bescherming tegen vrije radicalen waargenomen, waardoor de cellen uiteindelijk vatbaarder zijn voor schade veroorzaakt door onverwachte externe stimuli. Als laatste zijn er een aantal veranderingen waargenomen in de expressiepatronen van een aantal genen die matrixmodificatie eiwitten coderen. Dit suggereert dat de opbouw van de botmatrix die in lage zuurstofkweken wordt geproduceerd anders is dan die van de botmatrix die bij 20% zuurstof wordt geproduceerd.

Naar aanleiding van de waargenomen veranderingen in genexpressie in **hoofdstuk 2**, is er verder onderzoek gedaan naar het effect van lage zuurstof op de genexpressie van osteoblasten met behulp van micro-array expressie analyse. De resultaten van deze analyse, waarin lage en hoge zuurstofkweken met elkaar vergeleken worden, staan beschreven in **hoofdstuk 3**. Een van de doelstellingen was om te bepalen welke van de drie bekende differentiatiestadia het meest vatbaar is voor veranderingen veroorzaakt door een daling in zuurstofspanning. Het grootste aantal differentieel gereguleerde probes werd gevonden in het tweede differentiatiestadium, de pre-mineralisatie fase. Verdere analyse van de data leverde een aantal belangrijke biologische processen en functies op die beïnvloed worden door de verlaging van de zuurstofspanning. Aan de hand van deze analyses werd geconcludeerd dat een lage zuurstofspanning osteoblastdifferentiatie op twee manieren beïnvloed. Om te beginnen verlaagd een lage zuurstofspanning het celmetabolisme waardoor de cellen hun pre-differentiatiestatus behouden. Vervolgens

beïnvloedt lage zuurstofspanning de productie van een aantal matrixcomponenten, waaronder een groot aantal collagenen en de productie van eiwitten die collagenen in de matrix kunnen modifieren. Zowel collageenproductie als collageenmodificatie wordt dan ook sterk beïnvloed door een lage zuurstofspanning. Dit komt overeen met de resultaten met betrekking tot matrixcompositie beschreven in **hoofdstuk 2**.

In **hoofdstuk 4 en 5** word vervolgens overgegaan van het bestuderen van cellijnen op het bestuderen van *in vivo* botvorming in muizen met een defect DNA-reparatiemechanisme, zogenaamde TTD muizen. TTD is een zeldzaam autosomaal recessief syndroom, veroorzaakt door een mutatie in XPD, een component van het basale TFIIH transcriptiefactorcomplex dat een belangrijke rol speelt in DNA reparatie. De TTD muizen dragen een bestaande mutatie in hun XPD gen - gekopieerd uit een patiënt - en vertonen een groot aantal aan het syndroom gerelateerde kenmerken waaronder een aantal botafwijkingen. De resultaten, die zijn behaald in vrouwelijke (**hoofdstuk 4**) en mannelijke (**hoofdstuk 5**) muizen, tonen aan dat er sprake is van een versnelde botveroudering als gevolg van het defecte DNA-reparatiemechanisme. Er is een versnelde afname in trabeculair en corticaal bot in TTD mannetjes en vrouwtjes en dit gaat gepaard met een verlies in botsterkte en een complete afwezigheid van periostale appositie. Vergelijking van mesenchymale stamcelkweken uit het beenmerg van TTD en controle muizen toont aan dat er een leeftijdsafhankelijke afname in botkoloniefformatie optreedt, die versnelt plaatsvindt in het beenmerg van TTD muizen. *In vitro* vetcel productie is opmerkelijker wijs niet aangedaan, ondanks het feit dat TTD muizen *in vivo* bijna geen vetcellen produceren. Deze data suggereren dat een defectief DNA-reparatiemechanisme leidt tot een toename in oxidatieve schade, die op zijn beurt weer leidt tot een afname in het aantal mesenchymale stamcellen en de hoeveelheid bot die uiteindelijk geproduceerd kan worden. Verder lijkt er ook nog een rol weggelegd voor een aantal, in TTD muizen ontbrekende, circulerende factoren die normaalgesproken het differentiatieproces reguleren.

Uit de resultaten, besproken in dit proefschrift, valt te concluderen dat zuurstofspanning een belangrijke rol speelt in de regulatie van het celmetabolisme, de productie van vrije radicalen en de bescherming tegen oxidatieve schade. De onder lage zuurstofspanning verkregen resultaten geven een beter inzicht in de processen die zich afspelen in ons lichaam tijdens botvorming. Aangezien de zuurstofspanning bij een botbreuk bijvoorbeeld erg laag is, kunnen deze resultaten ook makkelijk toegepast worden in andere onderzoeksgebieden. Verder wordt er aangetoond dat een defectief DNA-reparatiemechanisme kan leiden tot een versnelde botveroudering. Ophoping van oxidatieve schade leidt tot een afname in het botvolume en de botsterkte van TTD muizen als gevolg van een afname in het aantal mesenchymale stamcellen in het beenmerg dat botcellen kan vormen. TTD muizen lijken verder een zeer geschikt onderzoeksmiddel om de regulatie van botvorming en botresorptie gedurende het leven te bestuderen.