

# VU Research Portal

## Chondrocytes and chondrons for tissue engineering of cartilage

Vonk, L.A.

2010

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

Vonk, L. A. (2010). *Chondrocytes and chondrons for tissue engineering of cartilage*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

### **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

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

## **GENERAL ABSTRACT**

## GENERAL ABSTRACT

Cartilage degeneration is a major clinical problem nowadays. Current treatment options aim for pain management and removal of damaged tissue instead of repairing the tissue. The ultimate goal for the treatment of cartilage defects would be reconstruction of the tissue by which all the properties of the native tissue are preserved. Tissue engineering aims at restoring the tissue and thereby also the function. This makes cartilage tissue engineering very promising for the treatment of cartilage defects. In this thesis we investigated certain aspects of the repair of cartilage by the use of cell-induced cartilage formation with chondrocytes. The main focus was on the collagen network as this is often compromised in cartilage reconstruction.

In **chapter 2** we provide quantitative biochemical data from various cartilaginous tissues (e.g. articular cartilage, meniscus, nucleus pulposus and annulus fibrosus) and data on gene expression levels (from genes encoding proteins/enzymes involved in the synthesis and degradation of the ECM) of chondrocytes from these tissues. We found large differences in the biochemical composition of the different tissues and in the gene expression levels by the different chondrocytes. Correct expression of the modifying enzymes by the cells is a requirement for the production of a collagen network with the desired biomechanical properties. The expression of enzymes involved in collagen cross-linking was different between the cell populations under the same culture conditions. This makes collagen-modifying enzymes potent chondrocyte-specific phenotypical markers for cartilage tissue engineering applications.

In **chapter 3** we analyzed the effects of glucose deprivation on extracellular matrix (ECM) production and cell death by various chondrocyte populations and dermal fibroblasts. Chondrocytes responded faster than dermal fibroblasts to glucose deprivation by initiating an endoplasmic reticulum (ER) stress response. A general response by cells to ER stress is a down-regulation of expression of secreted molecules and an up-regulation of chaperones and foldases. We found indeed a down-regulation in the expression of type I and type II collagen, while most of the collagen-modifying enzymes were up-regulated to help with any misfolded or aggregated proteins in the ER. A prolonged situation of ER stress leads to apoptosis. Although chondrocytes are more sensitive to glucose deprivation, less apoptotic chondrocytes were found after chemically induced ER stress than apoptotic fibroblasts, indicating that chondrocytes can cope better with ER stress. Overall, glucose deprivation is unwanted in cartilage tissue engineering approaches as there is no ECM production and the cells undergo apoptosis.

In **chapter 4** we investigated whether the presence of type I or type II collagen affects chondrocyte-mediated matrix contraction and collagen degradation. The

chondrocytes contracted the gels composed of type I collagen and this coincided with an increased Mmp-13 and -14 expression as well as matrix degradation.

In **chapter 5** we have shown that maintaining the chondrocyte's native pericellular matrix improves cell-induced cartilage formation. Chondrons secreted higher levels of proteoglycans compared to isolated chondrocytes and the collagen that was deposited by the chondrons was cross-linked. Furthermore, expression levels of Mmp-13 were strongly increased after 18 days of culture in alginate beads by chondrocytes compared to chondrons.

That maintaining the chondrocyte's pericellular matrix prevents collagen-induced Mmp-13 expression and collagen degradation is demonstrated in **chapter 6**. By keeping the pericellular matrix a direct contact between chondrocytes and collagen is prevented. We found that both integrin  $\alpha 1$  and discoidin domain receptor 2 modulate Mmp-13 expression after direct contact between chondrocytes and collagen. Furthermore, PKC, FAK, MEK and JNK are involved in collagen-stimulated expression of Mmp-13.

Based on the data presented in this thesis we conclude that chondrons are more effective for cartilage tissue engineering approaches than chondrocytes. The interactions between chondrocytes and their native pericellular matrix seem to provide optimal conditions for cartilage tissue engineering. The pericellular matrix stimulates the production of ECM, it enhances the chondrocytic characteristics of the cells and it prevents matrix degradation.



## **ALGEMENE SAMENVATTING**

## ALGEMENE SAMENVATTING

Kraakbeen vervult een belangrijke functie in het bewegingsapparaat; het zorgt voor een glad en enigszins indrukbaar oppervlak zodat gewrichten gemakkelijk kunnen bewegen en dat de krachten uitgeoefend op een gewricht op een goede manier verdeeld worden. Kraakbeen wordt in verschillende vormen op verschillende locaties in het lichaam aangetroffen. Zo zijn bijvoorbeeld de uiteinden van botten in gewrichten bekleed met articulaire kraakbeen. Naast dit gewrichtskraakbeen zijn in de knie extra kraakbeenschijven aanwezig, de menisci, die van belang zijn bij de verdeling van de krachten die op het kniegewricht uitgeoefend worden. In de rug tussen de wervellichamen bevinden zich ook kraakbeenschijven. Deze zogenaamde tussenwervelschijven bestaan uit een gel-achtige nucleus pulposus die omsloten wordt door de annulus fibrosus en zij maken een zekere beweeglijkheid van de rug mogelijk.

Kraakbeen bestaat voor het overgrote deel uit extracellulaire matrix (ECM) waarin collagenen en proteoglycanen de meest voorkomende eiwitten zijn. Deze componenten zijn van wezenlijk belang voor goed functionerend kraakbeen. Binnen de extracellulaire matrix van het kraakbeen bevinden zich de cellen, de chondrocyten, die het kraakbeen vormen en onderhouden.

Een van de tekortkomingen van kraakbeen is een zeer gering vermogen om zichzelf te herstellen bij beschadigingen. Relatief kleine beschadigingen kunnen invloed hebben op de rest van het kraakbeen en dit kan mettertijd tot artrose leiden. Hoewel kraakbeenletsel niet levensbedreigend is, heeft het wel grote invloed op het functioneren van betrokkene en op de kwaliteit van leven. Kraakbeenletsels kunnen voor pijn, gewrichtszwellingen, en een sterk verminderde mobiliteit zorgen. De behandelopties voor deze letsels zijn vooral gericht op pijnbestrijding. Als conservatieve behandeling zoals fysiotherapie en leefstijlaanpassingen geen oplossing bieden, dan wordt er overgegaan tot chirurgisch ingrijpen. De meeste operatieve ingrepen zijn gericht op het verwijderen van beschadigd weefsel, hetgeen niet leidt tot herstel van het weefsel. Eigenlijk zou het weefsel wel hersteld moeten worden om het kraakbeen weer optimaal te kunnen laten functioneren. Het doel van *tissue engineering* is om weefsels te herstellen en daarbij de functionaliteit van weefsels te behouden. Dit maakt *tissue engineering* van kraakbeen veelbelovend voor de behandeling van kraakbeenletsels.

De centrale doelstelling van dit proefschrift was om verschillende aspecten van kraakbeenproductie door cellen te onderzoeken in het kader van het herstel van kraakbeendefecten. Het vezelige netwerk (collageen) dat door cellen geproduceerd wordt om te gebruiken voor herstel van kraakbeen is vaak van mindere kwaliteit dan het collageen in kraakbeen. Juist het collageene netwerk zorgt voor de belangrijke biomechanische eigenschappen van kraakbeen en als deze eigenschappen achteruit gaan, volgt

kraakbeenafbraak. Daarom werd de aandacht in dit proefschrift vooral gevestigd op de productie en de afbraak van het collageen netwerk.

Om het collageen netwerk optimaal na te kunnen maken, moeten de eigenschappen van dit netwerk bekend zijn. Daarom geven wij in **hoofdstuk 2** kwantitatieve informatie over de biochemische samenstelling van verschillende kraakbeenweefsels (articulair kraakbeen, meniscus, nucleus pulposus en annulus fibrosus). Daarnaast zijn ook de genexpressie niveaus (van genen die coderen voor enzymen die betrokken zijn bij de synthese en de afbraak van de ECM) van chondrocyten uit deze kraakbeenweefsels onderzocht. Er werden grote verschillen gevonden zowel in de biochemische samenstelling van de verschillende kraakbeenweefsels als in de genexpressie niveaus van de verschillende chondrocyten. Een juiste expressie van de collageen-modificerende enzymen is van groot belang om een collageen-netwerk te produceren met de juiste biomechanische eigenschappen. De expressie van de enzymen die betrokken zijn bij de cross-linking van collageen verschilde sterk tussen de chondrocyten afkomstig uit de verschillende soorten kraakbeen.

Aangezien afbraak van kraakbeen onder andere veroorzaakt kan worden door een gebrek aan voedingsstoffen, onderzochten we in **hoofdstuk 3** het effect van de afwezigheid van glucose op de ECM productie en celdood van zowel chondrocyten (afkomstig uit verschillende kraakbeenweefsels) als van huidfibroblasten. Chondrocyten reageerden sneller op de afwezigheid van glucose dan huidfibroblasten en zij deden dit door het activeren van een endoplasmatisch reticulum (ER) stress respons. De expressie van type I en II collageen was verminderd terwijl de expressie van de meeste modificerende enzymen was toegenomen. Dit komt overeen met de algemene reactie op ER-stress waarbij de expressie van eiwitten die uitgescheiden moeten worden, wordt verminderd terwijl de expressie van moleculen die kunnen helpen bij het verwerken van slecht- of ongevouwen eiwitten worden verhoogd. Als ER-stress langere tijd aanhoudt, dan kan dit tot celdood (apoptose) leiden. Hoewel de chondrocyten gevoeliger waren voor de afwezigheid van glucose, waren er minder apoptotische chondrocyten na behandeling met tunicamycin (een chemische ER-stress veroorzaker) in vergelijking met huidfibroblasten. Dit duidt erop dat chondrocyten beter bestand zijn tegen ER-stress. Een tekort aan glucose is dus zeer ongewenst in kraakbeen *tissue engineering* omdat er geen ECM geproduceerd wordt en de cellen in apoptose gaan. Als de oorspronkelijke kraakbeenafbraak veroorzaakt wordt door een tekort aan voedingsstoffen, dan is het waarschijnlijk dat cellen die in een dergelijke omgeving geïmplant worden om het letsel te herstellen niet optimaal kunnen functioneren.

Dragermaterialen (*scaffolds*) die opgebouwd zijn uit collageen worden regelmatig gebruikt om kraakbeen te herstellen. Van dergelijke *scaffolds* is bekend dat zij ook enige negatieve eigenschappen hebben. Zo kunnen zij worden samengetrokken door de cellen die in het materiaal zitten. Deze samentrekking resulteert in een verlies van contact tussen het geïmplanteerde *scaffold* en het omliggende weefsel hetgeen de kans op succesvolle integratie aanzienlijk verkleint. Ook kan collageen de expressie van MMP-13 (een enzym



dat collageen afbreekt) verhogen wat kan leiden tot de afbraak van de *scaffold*. In **hoofdstuk 4** werd bestudeerd of de aanwezigheid van type I of type II collageen de contractie en de afbraak van de matrix beïnvloedt. Wij vonden dat chondrocyten type I collageen, maar geen type II collageen, gels samentrokken. Tegelijk met deze contractie werd ook de expressie van Mmp-13 en -14 verhoogd en vond er afbraak van de matrix plaats. Deze bevindingen ondersteunen het idee dat de samenstelling van de *scaffold* van cruciaal belang is voor de respons van de cellen die er in uitgezet worden.

In **hoofdstuk 5** onderzochten wij of het behouden van de pericellulaire matrix de kraakbeen productie verbeterde. Voor kraakbeen *tissue engineering* worden vaak chondrocyten gebruikt, maar in het weefsel zelf worden de cellen omgeven door een pericellulaire matrix en het is bekend dat cellen sterk beïnvloed worden door hun omgeving. In **hoofdstuk 5** zijn naast chondrocyten ook chondronen onderzocht. Chondronen zijn chondrocyten met hun eigen pericellulaire matrix. Chondronen bleken meer proteoglycanen uit te scheiden dan chondrocyten en het collageen dat door de chondronen geproduceerd werd bevatte cross-links. Mmp-13 werd zeer sterk tot expressie gebracht door de chondrocyten maar niet door de chondronen. Het behouden van de pericellulaire matrix heeft dus een positief effect op de kraakbeenproductie.

In **hoofdstuk 6** vonden wij dat de pericellulaire matrix de expressie van Mmp-13 tegenging die geïnduceerd wordt door contact met collageen en wij veronderstellen dat dit komt doordat er geen direct contact tussen cellen en collageen mogelijk is. Aangetoond werd dat de collageenreceptoren integrine  $\alpha 1$  en discoidine domain receptor 2 betrokken zijn bij de regulatie van Mmp-13 expressie na contact met collageen. Ook de intracellulaire kinases PKC, FAK, MEK en JNK bleken een rol te spelen bij de verhoging van de expressie van Mmp-13 door contact met collageen.

Samenvattend concluderen wij dat chondronen meer geschikt zijn voor kraakbeen *tissue engineering* dan chondrocyten. Het lijkt erop dat de interacties die plaatsvinden tussen de chondrocyten en hun pericellulaire matrix optimale condities verschaffen voor kraakbeenproductie. Zo stimuleert de pericellulaire matrix de aanmaak van extracellulaire matrix, verhoogt het de kraakbeenachtige eigenschappen van de cellen en het verhindert de afbraak van de extracellulaire matrix.

## **DANKWOORD**

## DANKWOORD

Een proefschrift maak je niet alleen. Nu het af is, wil ik graag een aantal mensen bedanken die hebben bijgedragen aan de totstandkoming ervan.

Allereerst wil ik mijn promotoren, Ruud Bank en Vincent Everts, bedanken voor de begeleiding en ondersteuning die onmisbaar waren in het hele traject.

Ruud, bedankt dat jij me deze kans gegeven hebt. Jouw positieve instelling en jouw vele ideeën werkten zeer motiverend. Je hebt heel veel vertrouwen in me gehad en je gaf me erg veel vrijheid in het onderzoek. Na jouw verhuizing naar Groningen, stond de mailbox voor me open. Ik vond de snelle reactie op mijn emails erg fijn! Ik ben je zeer dankbaar voor alle hulp!

Vincent, jouw ideeën en kritische kijk hebben dit onderzoek verbeterd. Ik heb veel van je geleerd en jouw enthousiasme voor het vak werkte aanstekelijk! Je hebt me gestimuleerd om met mijn eigen ideeën te komen en vooral ook om mijn stem te laten horen. Verder wil ik je er ook voor bedanken dat je deur altijd open stond. Bedankt voor alles!

Vervolgens natuurlijk mijn copromotor Behrouz Zandieh Doulabi. Behrouz, het is een grote eer om jou als copromotor te mogen hebben! Mede door onze besprekingen heb ik de experimenten zeer efficiënt kunnen uitvoeren. Jij hebt me zoveel geleerd op het gebied van de PCR. Samen hebben we heel wat problemen op kunnen lossen en merkwaardige resultaten kunnen verklaren. Jij bent heel behulpzaam en je stond altijd voor me klaar, of het nou ging over werk of over meer persoonlijke dingen. Bedankt voor de zeer fijne samenwerking!

Marco, ook jij was heel sterk bij mijn project betrokken. Zeker in het begin heb jij me goed op weg geholpen en een goed begin is het halve werk. Ik kon met allerlei vragen bij jou terecht. Je kritische inbreng in de manuscripten, vanuit een iets meer toegepaste hoek, heb ik als erg nuttig ervaren. Bedankt daarvoor.

ChunLing, unfortunately you only worked in our project for a relatively short time, but you've done a lot of work. Thank you for all the PCR's you have designed and optimized! Furthermore, I also want to thank you for relaxing chitchats we had, you could always make me laugh.

Jenneke, al was je niet direct bij mijn project betrokken, ik heb veel van je geleerd. Bedankt!

Veel van mijn experimenten heb ik uitgevoerd op het tissue engineering lab, maar toch was dit onmogelijk geweest zonder de mensen die het OCB-lab draaiende houden. “Ha die Lucienne” hoorde ik meestal als ik op het OCB-lab binnenkwam en er hing een goede sfeer. Dirk-Jan, grote dank voor jouw hulp bij de bestellingen die ik gedaan heb of als ik weer eens een adres nodig had. Jolanda, jij hielp me iedere keer weer met zoeken als ik iets nodig had. Verder kon ik met je kletsen over van alles en nog wat. Cor, ook jij was altijd erg behulpzaam als ik iets vroeg. Vaak kwam je aan met de oplossing waar ik naar op zoek was. Ook kon ik met jou kletsen over van alles en nog wat. Marion, met jou kon ik ook steeds een babbeltje maken en ik kon altijd met je meereizen als we her of der een promotiefeestje hadden en ik de weg in Amsterdam weer eens niet wist. Bedankt voor alles!

Ook was ik regelmatig op het biochemie-lab aan het werk. Ineke, jij was mijn steun en toeverlaat op het gebied van de MMP's. Daarnaast heb jij mij ook de Hyp-bepaling geleerd, die af en toe heel frustrerend was, maar wel hele mooie resultaten heeft opgeleverd. Theo, bij jou kon ik terecht met de wat meer biochemisch gerichte vragen over collageen, dank je wel voor de antwoorden op deze toch wat lastige vragen. Ton S en Teun, ik vond het geweldig leuk om met jullie de cursus moleculaire biologie te geven! Kamran, dank je wel voor de hulp bij de Western blots en de eiwitisolaties.

Ik had mijn onderzoek niet kunnen doen als ik niet steeds gebruik had kunnen maken van het geitenkraakbeen. Marco, Roel H, Robert-Jan, Harry, Wouter, Albert, Daniël, Kees-Pieter, Klaas, Paul en Jerry, hartelijk dank daarvoor!

Ook dank ik Jessica Snabel, Marry Barret, Reinout Stoop, Roeland Hanemaaijer, Anton de Bart en Joline Attema voor de ondersteuning en nuttige tips. Het was erg leuk om af en toe eens naar TNO Leiden te komen.

Ik heb met verschillende mensen een kamer gedeeld. Aviral, thanks for the warm welcome on my first day and for being such a kind roommate. Zufu, thanks for the nice conversations and for the tips and tricks you gave me. Behrouz, ook als kamergenoot ben je geweldig.

Verder liepen er nog veel meer leuke en gezellige mensen rond op de afdeling, waardoor de sfeer altijd goed was. Ana, Veerle, Robert-Jan en Wouter, wij zijn ongeveer tegelijk begonnen en het was erg fijn dat wij ervaringen uit konden wisselen of gewoon even heerlijk tegen elkaar konden klagen als het tegenzat. Harry en Harriët, bedankt voor de gezelligheid en de goede gesprekken tijdens het snijwerk. Ana, Marlene, Don en Jack, een koffie met jullie deed altijd goed. Mel, you always made me laugh. Astrid, Nina, Marjoleine, Janice, Petra en Rishikesh, jullie zijn gewoon ontzettend gezellig en ik ben

ontzettend blij dat jullie mij via het internet nog een beetje op de hoogte houden ;-). Marjolein, ik vond het heel leuk om je bij OCB weer tegen te komen, wie weet waar we elkaar over een paar jaar weer treffen... Agnes, dank je wel voor de korte, maar prettige samenwerking. Ook bedankt voor alle gezelligheid: Clara, Ton B, Roel B, Roel H, Albert, Kees-Pieter, Elena, Sjoerd.

Van het VU medisch centrum wil ik graag Barend van Royen (dank je wel, ik heb het enorm naar mijn zin), Margriet Mullender, Theo Smit en Margreet Verweij-Deddens bedanken.

Ook wil ik mijn vrienden bedanken voor de ontspannende avondjes, bijvoorbeeld in Woudenberg (of nog beter The Ribs Factory te Curaçao).

En natuurlijk stond mijn familie altijd voor me klaar. Mil en Arno, bedankt voor jullie aanmoedigingen, steun en begrip. Frank, Gerda en Jasper, bedankt voor jullie hulp, de heerlijke etentjes en de succes sms-jes op congressen. Patty, Richard en Oscar, bedankt voor alle gezellige kaartjes.

Ook mijn schoonfamilie was zeer betrokken. Henk en Liesbet, dank jullie wel voor de grote interesse, de ontspannende uitjes en de succes sms-jes voor presentaties (bewonderenswaardig hoe jullie dit altijd onthielden). Amber, Dionne en Lina, bedankt voor de gezelligheid en natuurlijk de voorbereidingen voor het feest.

En natuurlijk Chiel. Lief, enorm bedankt voor alle steun, de soms broodnodige afleiding en jouw begrip als ik wel echt moest werken. Ik kon op je steunen en dat heb ik ook gedaan. Nu is het jouw beurt ☺

Ik kijk heel positief terug op de afgelopen vier jaar, maar er hebben ook minder leuke dingen plaatsgevonden. Gelukkig hebben sommige wel een goede afloop gehad en zo ben ik er heel dankbaar voor dat:

- Mijn moeder eindelijk haar geluk gevonden heeft. Mam, je hebt het verdient!
- Mijn vader gezond het ziekenhuis heeft verlaten en dat zijn herstel zo voorspoedig verlopen is. Pap, ik ben trots op je!
- Mijn neefje ook gezond het ziekenhuis heeft verlaten en na een herstelperiode nu aan zijn toekomst kan gaan werken. Oscar, ik hoop dat je, net als ik, veel plezier beleeft aan je studie!
- Ine goed teruggekeerd is uit Zwitserland. Dat wij nog maar heel veel gezellige, ontspannende en waardevolle zondagmiddagen mogen hebben met ons moppie!

## **CURRICULUM VITAE**

## CURRICULUM VITAE

Name: Lucienne Angela Vonk  
Date and place of birth: 24 October, 1981, Utrecht, The Netherlands  
Contact: lavonk@gmail.com

### Scientific education

Post-doctoral research Jan 2010-onwards at Dept Orthopaedics, University Medical Centre Utrecht, Utrecht, The Netherlands

Ph.D. degree 2005-2009 at Dept Oral Cell Biology, Academic Centre for Dentistry Amsterdam (ACTA), Research Institute MOVE, University of Amsterdam and VU University Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands  
Funding: Dutch Program for Tissue Engineering (DPTE), Project no. BGT.6734  
Promotors: Prof.dr. R.A. Bank  
Prof.dr. V. Everts.  
Copromotor: Dr. B. Zandieh Doulabi

Bachelor of Science 2000-2004 Bachelor of Applied Science, Life Sciences, minor Molecular Biology, Hogeschool van Utrecht, Utrecht, The Netherlands

Pre-academic education 1992-2000 Gymnasium, Utrechts Stedelijk Gymnasium, Utrecht, The Netherlands

### Publications

Vonk LA, Kroeze RJ, Zandieh Doulabi B, Hoogendoorn RJ, Huang CL, Helder MN, Everts V, Bank RA. Caprine articular, meniscus and intervertebral disc cartilage: an integral analysis of collagen network and chondrocytes. (In press, Matrix Biology)

Vonk LA, Zandieh Doulabi B, Huang CL, Helder MN, Everts V, Bank RA. ER stress inhibits collagen synthesis independent of collagen-modifying enzymes in different chondrocyte populations and dermal fibroblasts. (In press, Cell Biology and Biochemistry)

Vonk LA, Zandieh Doulabi B, Huang CL, Helder MN, Everts V, Bank RA. Preservation of the chondrocytes pericellular matrix improves cell-induced cartilage formation. (In press, Journal of Cellular Biochemistry)

Vonk LA, Zandieh Doulabi B, Huang CL, Helder MN, Everts V, Bank RA. Collagen-induced expression of collagenase-3 (MMP-13) by primary chondrocytes is mediated by integrin  $\alpha 1$  and discoidin domain receptor 2: a protein kinase-c dependent pathway. (Submitted for publication)

Berendsen AD, Vonk LA, Zandieh Doulabi B, Everts V, Bank RA. Contraction-induced MMP13 and -14 expression by goat articular chondrocytes in collagen type I but not type II gels. (Submitted for publication)

Bron JL, Vonk LA, Smit TH, Koenderink, GH. The effects of changes in alginate concentration on scaffold stiffness and chondrogenic cell behavior. (Submitted for publication)

Bron JL, Mulder H, Vonk LA, Veerman ECI, Smit TH. Migration of intervertebral disc cells into dense collagen scaffolds in vitro. (Manuscript in preparation)

Huang CL, Vonk LA, Kroeze RJ, Lu ZF, Helder MN, Bank RA, Zandieh Doulabi, B. Optimization of high-quality total RNA isolation from different cartilaginous tissues. (Manuscript in preparation)

### **International meetings**

- 2009 World Congress on Osteoarthritis, Montreal, Canada (poster presentation)
- 2008 World Biomaterials Congress, Amsterdam, The Netherlands (poster presentation)
- 2008 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, San Francisco, CA, USA (poster presentation)
- 2007 Annual TERMIS-EU Meeting, London, United Kingdom (keynote lecture in young investigators session and poster presentation)
- 2006 Meeting of the Federation of European Connective Tissue Societies, Oulu, Finland

### **National meetings (The Netherlands)**

Annual meeting of the Netherlands Institute of Dental Sciences (IOT) 2006, 2008 (oral presentation)

Annual meeting of the Dutch Society for Calcium and Bone Metabolism (NVCB) 2006, 2007 (oral presentation), 2008 (oral presentation)

Annual meeting of the Dutch Society for Matrix Biology (NVMB) 2008 (oral presentation), 2009 (oral presentation)

Annual Dutch Symposium on Tissue Engineering (DPTE) 2006, 2007 (poster presentation), 2008 (oral presentation)







