



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Modulation of the canonical Wnt signaling pathway in bone and cartilage**

Miclea, R.L.

### **Citation**

Miclea, R. L. (2011, November 30). *Modulation of the canonical Wnt signaling pathway in bone and cartilage*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/18153>

Version: Corrected 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/1887/18153>

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

## **Samenvatting**



## SAMENVATTING

Het skelet bestaat uit ongeveer 200 botten en 300 gewrichten die het lichaam ondersteunen en zijn vorm geven. Het bestaat uit twee delen: het axiale skelet (schedel, wervelkolom en ribbenkast) en het appendiculaire skelet (pijpbeenderen, sleutelbeenderen, schouderbladen en bekkenbeenderen). Het skelet zorgt voor lengtegroei, ondersteuning van de verschillende lichaamsdelen, voor mineraal huishouding, voor bescherming van onze organen en samen met de spieren voor beweging. Het skelet is een levend weefsel, dat tijdens het hele leven voortdurend wordt vernieuwd. Drie verschillende celtypen zijn hiervoor verantwoordelijk: chondrocyten (voor kraakbeen-aanmaak), osteoblasten (voor botaanmaak) en osteoclasten (voor kraakbeen- en bot-resorptie).

Voor een gezond skelet is gedurende verschillende levensfasen een precieze regulatie tussen de aanmaak en afbraak van bot en kraakbeen van zeer groot belang. Deze regulatie wordt grotendeels uitgevoerd door hormonen en groeifactoren. Hormonen zijn regulerende stoffen, die in hormoonklieren geproduceerd worden en via het bloed stromen naar de plaats waar ze werkzaam zijn. Het groeihormoon (GH), de schildklierhormonen en de geslachtshormonen zijn de belangrijkste hormonen tijdens de ontwikkeling en onderhoud van het skelet. Groeifactoren zijn eiwitten die door bepaalde cellen worden gemaakt en in hun directe omgeving hun effect op andere cellen uitvoeren. Groeifactoren die een cruciale rol spelen in het skelet zijn: Insulin-like Growth Factor (IGF)-I en -II, Fibroblast Growth Factor (FGF), Parathormone-related Peptide (PTHrP), Indian Hedgehog (IHH) en leden van de Wnt-familie van groeifactoren.

Wijkt de groei van het skelet af van normaal, dan spreekt men over een groeistoornis. Slechts in een minderheid van de kinderen met een groeistoornis kan de oorzaak definitief worden vastgesteld en zelfs bij een bekende oorzaak is een causale behandeling meestal niet beschikbaar. Momenteel is voor enige groepen kinderen met korte gestalte behandeling met GH injecties beschikbaar, maar het effect van GH varieert sterk per kind. Recent is daarnaast biosynthetisch IGF-I beschikbaar gekomen voor kinderen met een IGF-I tekort. Korte gestalte in de kindertijd, adolescentie en volwassenheid kan psychologische, sociale, educatieve en professionele gevolgen hebben. Vandaar dat er een grote behoefte is aan nieuwe diagnostische instrumenten en behandelingsvormen voor patiënten die niet van de momenteel beschikbare therapie kunnen profiteren. Ook daarom wordt veel onderzoek gedaan om de invloed van verschillende groeifactoren in skeletontwikkeling beter te begrijpen.

Een gewricht wordt in de regel gevormd door twee botten waarvan de uiteinden zijn bekleed met articulaire kraakbeen. Dit kraakbeen is spiegelglad en maakt samen met het intra-articulaire vocht een soepele beweging mogelijk. Daarbij is het articulaire kraakbeen erg elastisch, zodat het schokken kan opvangen zoals die bijvoorbeeld optreden bij lopen. Omdat articulaire kraakbeen avasculair is, is het nogal kwetsbaar en herstelt het slecht na het optreden van beschadiging. De laag van articulaire kraakbeen bij kinderen is relatief dik en deze neemt naarmate wij ouder worden langzaam af.

Wanneer het kraakbeen beschadigd raakt bij bijvoorbeeld een ongeval of herhaaldelijke blessures, zal uiteindelijk de soepele werking van het gewricht verloren gaan en kan de meest voorkomende gewrichtsaandoening, artrose, ontstaan.

Tussen het twintigste en dertigste levensjaar bereiken de botten hun maximale massa (piek-bot-massa). Voor een goede botopbouw zijn hoogwaardige voeding met voldoende vitamine D en calcium, lichaamsbeweging en zonlicht van belang. In de vierde of vijfde decade begint de botmassa af te nemen. Dit is het gevolg van toegenomen botafbraak door osteoclasten en verminderde botvorming door osteoblasten. Wanneer de botafbraak groter wordt dan de botaanmaak ontstaat botontkalking, oftewel osteoporose. Deze skeletziekte wordt gekarakteriseerd door een lage botmassa en het verlies van botstructuur. Osteoporose leidt tot een verhoogde kans op botbreuken, kleiner en krommer worden, orgaanklachten en evenwichtsverlies. Vrijwel alle geneesmiddelen die beschikbaar zijn voor de behandeling van osteoporose hebben antiresorptieve effecten, waardoor ze de activiteit van de osteoclasten remmen. Deze geneesmiddelen verminderen het risico op fracturen, maar ze leiden niet tot een significante toename van de botmassa. Omdat verschillende groeifactoren de activiteit van osteoblasten en daarmee de botaanmaak kunnen stimuleren, bestaat er een grote interesse om hun precieze effecten in het botweefsel te begrijpen.

Fundamentele inzichten in de regulatie van skeletontwikkeling, groei, en bot- en kraakbeenmetabolisme verbeteren ons begrip in deze processen en verhogen daarmee de kans om alternatieve geneesmiddelen te vinden voor de behandeling van groeistoornissen, osteoporose en artrose. Wnt signalering is een zeer complexe biologische signaleringssroute, bestaande uit een groot aantal groeifactoren, receptoren en remmers, die aan elkaar binden in veel verschillende combinaties. Wnt signalering kan een groot aantal reacties uitvoeren in een verscheidenheid aan cellen en weefsels. De Wnt groeifactoren zijn hierdoor betrokken bij een breed scala aan ontwikkelingsprocessen. Daarnaast spelen zij een centrale rol in stamcelvernieuwing en proliferatie in verschillende weefsels zoals dikke darm, huid, en haarfollikels. In de laatste decennia hebben vele studies vastgesteld dat Wnt signalering een cruciale rol speelt in skeletontwikkeling en -onderhoud.

Tot nu toe zijn er 19 Wnt groeifactoren geïdentificeerd. Deze kunnen tenminste drie signaleringsroutes activeren: de canonische Wnt /  $\beta$ -catenine route, de Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  en de Wnt / vlakke polariteitsroute. Hiervan is de canonische Wnt /  $\beta$ -catenine route het beste begrepen. Deze signaleringsroute remt de differentiatie van chondrocyten, terwijl het de differentiatie van osteoblasten stimuleert. Echter, studies hebben aangetoond dat de niveaus van  $\beta$ -catenine zorgvuldig gereguleerd moeten worden. Te veel Wnt /  $\beta$ -catenine signalering interfereert met het differentiatiepotentieel van cellen. APC (adenomatosis polyposis coli) en GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ) zijn twee intracellulaire eiwitten, die de hoeveelheid functioneel  $\beta$ -catenine in de kern bepalen. Hiermee kunnen ze het resulterende niveau van het Wnt signaal beïnvloeden. Een grondigere kennis van de functies van deze twee eiwitten zal ons helpen om het werkingsmechanisme van de Wnt /  $\beta$ -catenine signaleringsroute tijdens skeletontwikkeling en -onderhoud beter te kunnen begrijpen. In dit proefschrift hebben we de functies van Apc en Gsk3 $\beta$  in de complexe Wnt /  $\beta$ -catenine signaleringsroute tijdens skeletontwikkeling en -onderhoud verder uitgediept.

Tijdens de skeletontwikkeling zijn de eiwitniveaus van  $\beta$ -catenine in de canonische Wnt signaleringsroute doorslaggevend voor de differentiatie van skeletvoorlopercellen (SVC) in osteoblasten en chondrocyten. Om te onderzoeken of Apc ook betrokken is in deze processen hebben we de skeletontwikkeling van proefdiermuizen zonder functioneel Apc in SVCn bestudeerd. Deze muizen laten een sterk verhoogde canonisch Wnt signalering zien in hun skelet als gevolg van een functioneel verlies van Apc. Muizen waarin beide kopieën van het Apc gen uitgeschakeld zijn, stierven perinataal en toonden een sterk aangetaste botontwikkeling. Al hun lange botten waren misvormd en misten hun structurele integriteit. De meerderheid van de SVCn zonder functioneel Apc kon niet in chondrocyten of osteoblasten differentiëren. Echter, de SVCn in de proximale ribben waren in staat om aan het schadelijke effect van functioneel Apc verlies te ontsnappen en vormden zeer actieve osteoblasten. Apc inactivatie in chondrocyten was geassocieerd met dedifferentiatie van deze cellen. Onze resultaten in **hoofdstuk 2** bevestigen dat een strakke Apc-gemedieerde controle van de  $\beta$ -catenine niveaus essentieel is voor de differentiatie van SVCn. Daarnaast is Apc nodig voor het behoud van de chondrocyteïenschappen in de reeds gevormde chondrocyten.

Tot op heden zijn alleen de aan / uit effecten van  $\beta$ -catenine op de differentiatie van SVCn onderzocht. Er zijn geen studies beschikbaar over de effecten van gemiddelde  $\beta$ -catenine niveaus tijdens de skeletontwikkeling. Apc staat bekend als de belangrijkste intracellulaire regulator van de dosering van transcriptioneel actief  $\beta$ -catenine. Om het effect van verschillende  $\beta$ -catenine doseringen op SVCn te kunnen onderzoeken, hebben we Apc mutante muizen gegenereerd met een conditioneel mutant allel ( $Apc^{15lox}$ ) en een hypomorphisch (minder functioneel) Apc mutant allel ( $Apc^{1638N}$  of  $Apc^{1572T}$ ). Dit resulteerde in verschillende niveaus van canonische Wnt signalering. Een relatief sterke toename van  $\beta$ -catenine in de SVCn van  $Col2a1-Cre; Apc^{15lox/1638N}$  embryo's leidde tot een volledige remming van kraakbeen- en botvorming. Een matig toegenomen niveau van  $\beta$ -catenine in de SVCn van  $Col2a1-Cre; Apc^{15lox/1572T}$  embryo's resulteerde in de vorming van zeer actieve osteoblasten, geen osteoclasten en vroegrijpe mineralisatie. Zo laten we in **hoofdstuk 3** zien dat een nauwkeurige dosering van de Wnt /  $\beta$ -catenine signalering door Apc nodig is voor de differentiatie van de SVCn.

Om een beter inzicht te krijgen in de moleculaire mechanismen waarmee Apc de differentiatie van SVCn beïnvloedt, hebben we de expressie van Apc in de muis mesenchymale stamcel-achtige KS483 cellijn verminderd. Gekweekte KS483- $Apc_{si}$  cellen vertoonden een mesenchymaal-achtige morfologie, een sterk verminderde proliferatie en verhoogde apoptose. Hoewel de verlaging van het Apc eiwit in opregulatie van de Wnt /  $\beta$ -catenine en BMP / Smad signalering resulteerde, werd de osteogene differentiatie compleet geremd. Dit remmende effect kon worden opgeheven door toevoeging van hoge concentraties van BMP-7 in het differentiatie-medium. Daarnaast waren KS483- $Apc_{si}$  cellen niet in staat om te differentiëren in chondrocyten of adipocyten. We tonen in **hoofdstuk 4** aan dat Apc essentieel is voor de proliferatie, overleving en differentiatie van KS483 cellen. Verlaging van Apc eiwit expressie blokkeert de osteogene differentiatie, een proces dat tegengegaan kan worden door verhoogde BMP signalering.

Humane heterozygote mutaties in het APC gen veroorzaken een erfelijke, uiteindelijk maligne, aandoening, waarbij honderden poliepen in de dikke darm voorkomen.

Deze ziekte staat bekend onder de naam familiäre adenomateuze polyposis (FAP). Of APC mutaties een invloed op de botmassa hebben in de mens was niet bekend. Om dit te onderzoeken, hebben we een cross-sectionele studie uitgevoerd in FAP patiënten met een gedocumenteerde APC mutatie. Onze resultaten toonden aan dat deze patiënten een significant hogere botmassa hebben in vergelijking met gezonde controles. Ons enige inclusiecriteria voor deelname aan de studie was een bevestigd FAP syndroom, en ons enige exclusiecriteria was het gebruik van botmassamodulerende geneesmiddelen. FAP patiënten werden dus opgenomen in deze studie, ongeacht leeftijd, geslacht of de ernst van de ziekteverschijnselen. Onze studiepopulatie, weliswaar heterogeen, was representatief voor FAP patiënten, omdat alle klinische bevindingen aanwezig waren in verhoudingen die in andere FAP cohorten eerder zijn gemeld. Onze resultaten, beschreven in **hoofdstuk 5**, suggereren dat heterozygote APC mutaties een positief effect hebben op de botmassa, hoogst waarschijnlijk door verhoogde expressie van  $\beta$ -catenine.

De canonische Wnt /  $\beta$ -catenine signaleringsroute is bekend ook voor zijn functie in kraakbeenonderhoud. Omdat GSK3 $\beta$  een belangrijk Wnt-regulerend eiwit is wilden we nagaan wat de precieze rol van dit eiwit in kraakbeen is. Daarom hebben we chondrocyten *ex vivo* en *in vivo* met GIN behandeld, een selectieve GSK3 $\beta$  remmer. Efficiënte GSK3 $\beta$  remming werd gevalideerd door dosis-afhankelijke verhoging van de canonische Wnt signaleringsroute via  $\beta$ -catenine. In foetale muis middenvoetsbeentjes, resulteerde GIN behandeling in verlies van expressie van kraakbeengenen en verminderde chondrocytproliferatie. Late (3 dagen) effecten van GIN waren degradatie van de kraakbeenmatrix en een verhoogde apoptose, terwijl langdurige (7 dagen) GIN behandeling resulteerde in resorptie van het middenvoetsbeentje. Deze veranderingen werden bevestigd door middel van genexpressie-analyse, die een daling liet zien in de expressie van typische kraakbeen genen en inductie van de expressie van proteasen betrokken bij kraakbeenmatrixdegradatie. Intra-artculaire injectie van GIN in kniegewrichten van ratten veroorzaakte nucleaire accumulatie van  $\beta$ -catenine in chondrocyt-kernen. Dit ging gepaard met kraakbeenafbraak, oppervlaktefibrillatie en chondrocythypocellulariteit. Onze resultaten beschreven in **hoofdstuk 6** bewijzen dat GSK3 $\beta$  in het behoud van het chondrocyte fenotype en kraakbeenmatrix betrokken is door het verlaging van  $\beta$ -catenine. Bovendien kan remming van GSK3 $\beta$  in chondrocyten worden gebruikt om artrose-achtige functies *in vivo* te induceren.

Tenslotte zijn in **hoofdstuk 7** de bevindingen van dit proefschrift samengevat. Ook worden in dit hoofdstuk potentiële toekomstige onderzoekslijnen genoemd om de functie van Apc en GSK3 $\beta$  tijdens skeletontwikkeling en -onderhoud nog beter te kunnen begrijpen.



