



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Regulators of growth plate maturation

Emons, J.A.M.

Citation

Emons, J. A. M. (2010, April 14). *Regulators of growth plate maturation*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/15225>

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/1887/15225>

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

13

SAMENVATTING

Samenvatting

Lengtegroei vindt plaats in de epifysaire groeischijven die zich bevinden aan de uiteinden van de lange pijpbeenderen en in groeischijven in de wervelkolom. Deze groeischijven bevatten verschillende zones kraakbeencellen (chondrocyten) die zich in verschillende stadia van differentiatie bevinden. De mechanismen die een rol spelen in de regulatie van de groeischijf zijn complex en slechts in geringe mate bekend. Het is van belang om meer inzicht te krijgen in de mechanismen die de lengtegroei beïnvloeden, omdat bij kinderen met een groeistoornis slechts in een minderheid van de gevallen een onderliggende oorzaak kan worden gevonden. In de zeldzame gevallen dat er wel een oorzaak gevonden wordt is er dikwijls geen causale behandeling mogelijk. Gedurende de puberteit neemt de groeisnelheid eerst toe, een fenomeen dat bekend staat als de pubertaire groeispuurt, maar met voortgang van de puberteit neemt de groeisnelheid steeds verder af totdat de volwassen eindlengte is bereikt en de groeischijven sluiten. Nadat de groeischijven gesloten zijn, is het niet meer mogelijk om de groei medicamenteus te beïnvloeden. Voor de behandeling van groeistoornissen zou het daarom gunstig zijn als het proces van sluiting van de groeischijf zou kunnen worden beïnvloed. Bij kinderen met een kleine lengte zou bijvoorbeeld een verlenging van het proces van groeischijfsluiting kunnen leiden tot een grotere eindlengte, doordat meer tijd beschikbaar komt voor stimulering van de groei. Aan de andere kant zou het versnellen van de groeischijfsluiting een goede behandelingsmogelijkheid zijn voor patiënten met een te grote lengte. Het precieze mechanisme dat ten grondslag ligt aan de rijping en uiteindelijke sluiting van de groeischijf is grotendeels onopgehelderd. Meer kennis zou kunnen leiden tot het ontwikkelen van medicamenten die de timing van groeischijfsluiting beïnvloeden. In dit proefschrift is op verschillende niveaus en in diverse experimentele modellen de rijping van de groeischijf en het proces van groeischijfsluiting onderzocht.

In de puberteit neemt de concentratie van oestrogenen in het bloed toe. Oestrogenen spelen niet alleen een belangrijke rol in de ontwikkeling van secundaire geslachtskenmerken tijdens de puberteit van een meisje, maar zijn ook betrokken bij de rijping en sluiting van de groeischijf, zowel bij jongens als bij meisjes. In ons onderzoek toonden we aan dat zowel de oestrogeen-receptor alpha ($ER\alpha$) als de oestrogeen-receptor beta ($ER\beta$) tot expressie komen in de groeischijf van de rat, voornamelijk in de laat-prolifererende chondrocyten en de vroege hypertrofe chondrocyten. Als oestrogeen werd toegediend, nam de expressie van beide receptoren af. Na toediening van desoxyestrone, een synthetisch oestrogeen dat alleen via non-genomische signalering zijn werking uitoefent, aan ratten met een status post ovariectomie (het verwijderen van de eierstokken), resulteerde dit in minder groeivertraging dan werd waargenomen met 17β -estradiol. Hieruit concludeerden we dat oestrogenen een effect op de lengtegroei uitoefenen via de genomische en ook via de non-genomische route, waarbij de genomische route waarschijnlijk overheerst.

Behandeling met oestrogenen heeft naast een positieve werking ook mogelijke bijwerkingen, die vermeden kunnen worden met Selectieve Oestrogeen Receptor Modulators (SERMs). Wij onderzochten het effect van één van die SERMs, 2-methoxyoestradiol, op de lengtegroei en zagen inderdaad een weefsel-specifiek effect op de groeischijf van jonge ratten, maar geen meetbaar effect op de lengtegroei.

Oestrogeen en oestrogeen receptoren worden beïnvloed door verschillende groeifactoren en hormonen. In dit proefschrift onderzochten we de relatie tussen oestrogeen en de expressie van Vascular endothelial growth factor (VEGF) in de groeischijf. Ovariëctomie bij ratten resulteerde in een afname van de VEGF-expressie in de groeischijf, terwijl oestrogeensuppletie resulteerde in een toename van VEGF-expressie. In groeischijfpreparaten van meisjes zagen we op eiwit-niveau een toename in VEGF-expressie met het voortschrijden van de puberteit. Hieruit concludeerden

we dat VEGF-expressie beïnvloedt kan worden door oestrogenspiegels en dat VEGF mogelijk een rol speelt in het proces van groeischijfsluiting.

Van oestrogeen is ook bekend dat het de “senescence” (veroudering) van de groeischijf versnelt. Met deze term worden de structurele veranderingen in de groeischijf in de tijd aangeduid, zoals een afname in de hoogte van de groeischijfzones en een afname in proliferatie van de chondrocyten. In dit proefschrift onderzochten we de rol van een celcyclusremmer p27Kip1 (p27) op de proliferatie van chondrocyten en de lengtegroei in de muis. In de groeischijf van 5 weken oude muizen komt p27 op mRNA niveau in iedere zone van de groeischijf in ongeveer gelijke mate tot expressie. Muizen met een p27-deficiëntie (p27 knock-out) lieten een toename zien in de proliferatie van de chondrocyten. Er was echter geen duidelijk effect zichtbaar op de lengtegroei na 7 weken. Tevens bleek dat p27 niet nodig is voor het groeiremmende effect van dexamethason; p27 deficiënte muizen lieten namelijk een zelfde mate van vertraging zien als de “wild-type” muizen (muizen zonder de mutatie). In een ander experiment, waarin we de gen-expressie bestudeerden in de humane groeischijf, zagen we dat de gen-expressie van p27 steeg met het voortschrijden van de puberteit. Deze bevinding wijst op een mogelijke rol voor p27 in de afname van chondrocytenproliferatie en daarmee de afname in groeisnelheid aan het einde van de puberteit.

Als na een periode van groeivertraging, bijvoorbeeld door een ziekte of bepaalde medicamenten, de ziekte adequaat wordt behandeld of de medicamenten worden gestopt, gaat de groeisnelheid vaak aanzienlijk omhoog. Dit fenomeen staat bekend als “inhaalgroei” (catch-up growth). Het is onbekend wat het achterliggende mechanisme is, maar dierexperimentele studies hebben aanwijzingen gevonden dat inhaalgroei tenminste voor een belangrijk deel te verklaren is door een vertraging in de “senescence” van de groeischijf. Om de hypothese te toetsen dat dit fenomeen ook bij kinderen met inhaalgroei een rol speelt, onderzochten wij de groei van kinderen met coeliakie (gluten-allergie) die na de start van een glutenvrij dieet een inhaalgroei vertoonden. Het groeipatroon van deze kinderen kwam inderdaad overeen met het groeipatroon van jongere kinderen, zoals men zou verwachten bij vertraging van de “senescence” gedurende de fase van groeivertraging.

In een studie naar de veranderingen die optreden in de humane groeischijf over een periode van 1 jaar tijdens de puberteit, zagen we structurele veranderingen die leken op de veranderingen die werden waargenomen in het proces van “senescence” bij ratten en konijnen. We zagen een significante afname in de totale groeischijfdikte en een afname van de dikte van elke afzonderlijke zone. Daarnaast zagen we een toename in de ruimte tussen de kolommen van chondrocyten, en daarmee ook een toename van de extracellulaire matrix in de groeischijf in de loop van de puberteit. Voor het eerst hebben wij met zogenaamde “microarray” experimenten laten zien hoe het gen-expressie-profiel eruitziet van de humane groeischijf. De veranderingen in het gen-expressie-profiel kwamen overeen met de histologische veranderingen die we microscopisch hadden waargenomen; veel genen die geassocieerd zijn met de extracellulaire matrix lieten een toename zien in expressie naarmate de maturatie van de groeischijf voortschreed. Tevens veranderde de expressie van veel genen die te maken hebben met de celcyclus, met hormoonsystemen en met de zogenaamde “geprogrammeerde celdood”. In de groep genen waarvan de expressie veranderde gedurende de puberteit vonden we veel genen met transcriptiefactor-bindingsplaatsen voor de oestrogeen receptor, de androgeen receptor, STAT5B, ELK-1 en RUNX2 in hun promotor regio's die de expressie van het gen mogelijk reguleren. Met name de bindingsplaatsen voor de transcriptiefactoren ELK-1 en RUNX2 waren verrijkt ten opzichte van controles. Dit wijst op een rol van deze transcriptiefactoren in de maturatie van de groeischijf in de puberteit. In het algemeen was de verandering in gen-expressie gering, wat in overeenstemming is met de “senescence”

theorie, die suggereert dat stamcellen in de zogenaamde “reserve zone” een beperkte capaciteit hebben om zich te delen. Als het aantal stamcellen is uitgeput, zou dit volgens deze hypothese resulteren in sluiting van de groeischijf.

Het precieze mechanisme waardoor de groeischijf uiteindelijk sluit is nog grotendeels onbekend, maar men neemt aan dat “apoptose” (geprogrammeerde celdood) hierin een rol speelt. Wij hebben een gedetailleerde studie verricht naar apoptose in de terminale hypertrofe zone van groeischijven van meisjes in verschillende stadia van puberteit. We hadden ook de beschikking over een groeischijf die zich in het laatste stadium bevond van sluiting. In geen van de groeischijven waren typische kenmerken te zien van apoptose. Wel zagen we een dikke en compacte rand van bot om de fuserende groeischijf heen en daarnaast ook tekenen van hypoxie en van necrose. In een microarray studie van humane groeischijven zagen we tevens dat de expressie van het hypoxia-inducible factor 2 alpha gen (Hif-2 alpha) significant omhoog ging met het voortschrijden van de puberteit. Daarnaast veranderde ook de expressie van vele genen die geassocieerd zijn met geprogrammeerde celdood, zoals genen die betrokken zijn bij pro-apoptose, anti-apoptose en autophagie. Op basis van deze bevindingen veronderstellen wij dat hypoxie een rol speelt bij de sluiting van de groeischijf en dat chondrocyten uiteindelijk ten gronde gaan aan een specifiek type celdood.

In de laatste hoofdstukken van dit proefschrift bestudeerden we een relatief nieuw model voor de groeischijf, namelijk humane mesenchymale stamcellen (hMSCs) die kunnen differentiëren naar chondrocyten. Deze MSCs kunnen uit verschillende bronnen geïsoleerd worden. Wij concludeerden dat MSCs uit foetaal beenmerg het meest geschikt waren om tot chondrocyten te differentiëren. In een microarray studie zagen we dat het expressieprofiel van MSCs die differentiëerden naar chondrocyten beter overeenkwam met dat van chondrocyten uit de groeischijf dan met chondrocyten uit gewrichtskraakbeen. Daarnaast zagen we in het differentiatieproces veel genen en groepen genen veranderen waarvan reeds bekend was dat ze een rol spelen in processen in de groeischijf. Dit geeft aan dat uit MSCs gedifferentieerde chondrocyten een uitstekend model vormen om de groeischijf en het chondrogene differentiatie proces in meer detail op verschillende niveaus te kunnen bestuderen.

