



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Systems biology of osteoarthritis

Kamphorst, J.J.

Citation

Kamphorst, J. J. (2010, March 25). *Systems biology of osteoarthritis*.
Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/15125>

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/1887/15125>

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

Samenvatting

Artrose is een reumatische aandoening die meer dan de helft van de mensen boven de zestig jaar treft. Het meest typische kenmerk van de aandoening is afbraak van het kraakbeen in de gewrichten, waarvan men vermoedt dat een verstoring in de balans van aanbouw en afbraak van de extracellulaire matrix-eiwitten (waaruit kraakbeen is opgebouwd) hieraan ten grondslag ligt. Echter, de exacte oorzaak van artrose is nog steeds onbekend, met als gevolg dat adequate diagnostiek en behandeling ontbreken. Mogelijk zijn er complexe interacties van meerdere pathofysiologische mechanismes bij betrokken. Hoewel deze mechanismes nog onbekend zijn, kunnen recente wetenschappelijke ontwikkelingen, met name innovaties in het veld van de analytische biowetenschappen, daarin verandering brengen. In het bijzonder de ontwikkeling van de *'omics'* technieken stelt ons in staat om honderden biomoleculen (transcripten, eiwitten, metabolieten) tegelijkertijd te analyseren en geeft op die manier een uniek overzicht van de biochemische processen die plaatsvinden in het gezonde dan wel ongezonde organisme.

Het ligt in de lijn der verwachting dat het gebruik van deze *'omics'* methoden de ontdekking van nieuwe biomarkers zal faciliteren. Een biomarker is een objectief te meten indicator van biochemische processen in relatie tot ziekte of therapeutische interventie. Ook is het mogelijk met deze *'omics'* methoden ziektes als artrose te bestuderen vanuit een systeembioologisch perspectief: het bestuderen van biologie als een geïntegreerd systeem van genetische, eiwit-, metabool-, cellulaire en netwerkgebeurtenissen die in flux en afhankelijk van elkaar zijn.

Het doel van dit onderzoek was om artrose vanuit een systeemperspectief te benaderen, en om daarbij de toepasbaarheid van de *'omics'* technologie voor dit onderzoek te bestuderen. Als eerste stap in het project werden door middel van een intensieve bestudering van de literatuur de hiaten in de kennis van artrose geïdentificeerd, die een volledig systeemperspectief van artrose op dit moment nog onmogelijk maken. Aan de hand daarvan werden relevante *'omics'* methoden opgezet en toegepast.

In **Hoofdstuk 2** zijn de gepubliceerde artikelen, die 'omics' gegevens bevatten geraadpleegd vanuit een systeembioologisch (en dus data-integratie) perspectief. Hierdoor zijn de hiaten in de beschikbare data, die een volledige systeemevaluatie van artrose in de weg staan geïdentificeerd. De drie meest veelbelovende, maar relatief onbekende, mechanismen die in meerdere studies en op meerdere niveaus (transcript, eiwit en/of metaboliet) naar voren kwamen, waren celcommunicatie, suiker- en vetmetabolisme, en oxidatieve stres. Gebaseerd op deze bevindingen is onze aandacht uitgegaan naar het ontwikkelen en toepassen van peptidomics (profiëren van peptiden) en lipidomics (profiëren van lipiden) technologie.

Peptidomics of peptide profileringmethoden stellen ons in staat om tegelijkertijd honderden endogeen aanwezige peptiden in een monster te meten. Deze endogene peptiden zijn belangrijke communicatiemediatoren, alsook eiwitdegradatieproducten. In **Hoofdstuk 3** worden de analytische aspecten besproken van een zelf opgezette methode voor de analyse van endogene peptiden in de synoviale (gewrichts)vloeistof, aangezien de ziekte zich in het gewricht manifesteert. De grootste obstakels die het hoofd geboden moesten worden waren de hoge viscositeit van de synoviale vloeistof door de aanwezigheid van een hoge concentratie hyaluronzuur en de inherent lage concentraties van de endogene peptiden. Een combinatie van ultrafiltratie en vaste-fase extractie (solid-phase extraction, SPE) bleek te voldoen om het hyaluronzuur en andere vervuilingen te verwijderen en in combinatie met het zeer gevoelige nano-vloeistof chromatografie-massa spectrometrie (nanoLC-MS) systeem konden honderden endogene peptiden worden geanalyseerd. De analytische prestaties van het systeem werden geschikt bevonden voor biologische studies met relatieve standaardafwijkingen binnen één dag van 5-15%, relatieve standaard afwijkingen tussen dagen van 6-16%, een lineaire respons in het geanalyseerde 50-800 nM bereik ($R^2 = 0.930-1.000$), een detectielimiet op femtomole nivo en herhaalbare extractie-opbrengsten van 14-67%.

In **Hoofdstuk 4** wordt de ontwikkelde methode toegepast om verschillen te vinden in de peptidesamenstelling van synoviale vloeistofmonsters van artrose -en reumatoïde artritispatiënten, ten opzichte van controle (geen artritis) monsters. In totaal konden ca. 1000 datapunten in alle monsters

worden gemeten en worden vergeleken, en principale componentenanalyse liet clustering zien van de drie groepen. Hoewel deze clustering deels werd veroorzaakt door de veel aanwezige fibrinogeenfragmenten, werden er ook ziektegerelateerde veranderingen waargenomen in de spiegels van fragmenten van collagene (I, II, III), osteopontin, kininogen, complement component 3&4, serum amyloid A, en verschillende histonen. Zeer interessant was de vinding dat de niveaus van de pijn -en ontstekingsmediator bradykinin en de gehydroxyleerde variant daarvan verhoogd waren in artrose, in vergelijking tot reumatoïde artritis en controlemonsters.

Hoewel de monstervoorbewerking door de combinatie van ultrafiltratie en SPE (zoals besproken in Hoofdstuk 3) bewezen heeft efficiënt te zijn in het extraheren van peptiden vanuit een moeilijke matrix, is de benadering relatief bewerkelijk en daardoor wat minder geschikt voor grootschalige biomarkerstudies. Daarom wordt in **Hoofdstuk 5** een alternatieve voorbewerkingsmethode onderzocht die gebaseerd is op electro-dialyse. Deze methode heeft als voordeel dat het kan worden geautomatiseerd, verkleind en aangepast voor high-throughput toepassingen. Een zelf ontworpen instrument werd vervaardigd van het inerte materiaal Kel-F. Het bestond uit twee, door een dialysemembraan gescheiden, compartimenten die onder spanning werden gezet. Eén compartiment werd gebruikt als donor (het monster bevattend) en in het andere (kleinere) compartiment werden de peptiden opgevangen tijdens de voorbewerking. Met behulp van modelpeptiden werd de procedure geoptimaliseerd door het effect te onderzoeken van de tussen de compartimenten aangelegde voltage, de concentratie van de in de compartimenten aanwezige ammonium acetaat buffer en de duur van het electro-dialyse proces. Optimale condities werden gevonden bij respectievelijk 300V (150V/cm), 25 mM ammoniumacetaatbuffer (pH 3.8) bevattende 20% v/v DMSO, en een tijdsduur van 10 minuten. Met deze geoptimaliseerde procedure werden voor de modelpeptiden extractie-opbrengsten van 35%-85% (gemiddeld 64%) behaald. Ook werd electro-dialyse succesvol toegepast op een synoviale vloeistofmonster van een reumatoïde artritispatiënt, en werden 27 peptiden (van 12 eiwitten) geïdentificeerd, waarvan een groot deel nog niet

was geïdentificeerd met andere methoden. Hiermee is het nut en de complementaire aard gedemonstreerd van de combinatie van electro dialyse en nanoLC-MS voor biomarkerstudies. Deze resultaten tonen aan dat electro dialyse veelbelovend is als een snelle en selectieve voorbereidingsmethode voor de profilering van endogene peptiden.

In **Hoofdstuk 6** worden de lipidomics experimenten besproken die verder ingaan op onze vinding dat het lipidenmetabolisme betrokken is bij artrose. Deze lipidomics analyse van synoviale vloeistof en plasma gaven een eerste blik op zowel de locale, als de systemische artrosegerelateerde veranderingen op lipide niveaus. De plasma en synoviale vloeistofmonsters werden behandeld met een methode gelijkende op de bekende Blich en Dyer lipide-extractie. Vervolgens werden de lipide-extracten geanalyseerd met vloeistofchromatografie scheiding (C8) en massaspectrometrische analyse (QTOF).

In totaal konden 115 lipiden in plasma en 72 lipiden in synoviale vloeistof van 8 lipideklassen worden gemeten en vergeleken tussen alle monsters. Principale componentanalyse suggereerde een artrosegerelateerde verandering in lipide samenstelling, zowel lokaal (in synoviale vloeistof), als systemisch (in plasma). In plasma werd een algemene verlaging van de lipideniveaus waargenomen. Deze afname gold met name voor de lipiden met de kortere vetzuren en correleerde met de intensiteit van het ziektebeeld. Voor de synoviale vloeistof was de meest aanwezige variatie tussen controle- en artrosemonsters een verandering in de relatieve samenstelling tussen de lipideklassen. Vergelijking van de samenstelling van plasma enerzijds en synoviale vloeistof anderzijds liet zien dat plasma en synoviale vloeistof van artrosepatiënten meer op elkaar lijken dan dat van de controlemonsters. De resultaten van deze lipide-profilering-studie tonen aan dat artrosegerelateerde veranderingen in lipidemetabolisme optreden, zowel lokaal (synoviale vloeistof), als systemisch (plasma).

Concluderend mag gezegd worden dat dit onderzoek zich begeven heeft op de grenzen van de analytische en de klinische wetenschappen door een eerste, experimentele, systeembioïologische benadering toe te passen op artrose. De ontwikkeling en toepassing van peptidomics en lipidomics technologie

hebben geleid tot interessante vindingen wat betreft de biochemische implicaties van de ziekte en het is aannemelijk dat deze en andere '*omics*' methoden zullen bijdragen tot het vinden van nieuwe biomarkers en een beter begrip van de achterliggende biochemische oorzaken van artrose. Echter, dit zal alleen gerealiseerd kunnen worden wanneer de analytische methoden verder worden ontwikkeld, en wanneer de '*omics*' -en systeembioologische aanpak verder worden geïntegreerd in het medische onderzoek.