



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Thyroid hormone signalling in Osteoarthritis: early life events in late life disease

Bömer, N.

### Citation

Bömer, N. (2017, January 17). *Thyroid hormone signalling in Osteoarthritis: early life events in late life disease*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/45570>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/45570>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/45570> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Bömer, N.

**Title:** Thyroid hormone signalling in Osteoarthritis: early life events in late life disease

**Issue Date:** 2017-01-17

## Chapter 8

Nederlandse samenvatting



## Inleiding

Osteoartrose, in de volksmond kortweg artrose genoemd, is de meest voorkomende gewrichtsaandoening en wordt gekenmerkt door pijn en stijfheid van de gewrichten, met als gevolg chronische invaliditeit. De oorzaak van artrose is de toenemende afbraak van kraakbeen en de vorming van botuitstulpingen aan de randen van de gewrichten (osteophyten). Deze symptomen kunnen voorkomen in alle gewrichten van het lichaam, maar uiten zich voornamelijk in hand-, heup- en knie- gewrichten.

Artrose wordt beschouwd als een zogenaamde complexe ziekte. Dit houdt in dat het ontstaan van de ziekte een samenkomst is van genetische- en omgevingsfactoren, zoals (sport) blessures, overgewicht, geslacht en leeftijd. Doordat zo veel verschillende factoren van invloed zijn op het ontstaan en het verloop van de ziekte is de biologische oorzaak nog grotendeels onbekend. Dit heeft als gevolg dat tot op heden de behandelmogelijkheden voor artrose beperkt zijn tot het geven van pijnverlichting totdat tenslotte een gewrichts-ervangende operatie noodzakelijk is.

Genetisch onderzoek heeft in de loop der jaren al wel geleid tot de ontdekking van een aantal risicogenen voor artrose, zoals *DIO2*, *GDF5*, *DOT1L*, *NCOA3* en *SMAD3*. Echter, om te komen tot de biologische werking van deze risicogenen en de waarde van een genetische bevinding in te schatten zijn functionele studies vereist. Om deze stap te kunnen maken moet je de beschikking hebben over ziekterelevante weefsels, waaronder dus kraakbeen. Belangrijk hierbij is ook om je te realiseren dat dat medicijnonderzoek, ondersteund door genetisch bewijs, twee keer zo vaak succesvol is dan wanneer er geen genetische oorsprong is.

### Doel van dit proefschrift

In dit proefschrift hebben we functionele studies gebruikt om van een genetische bevinding te komen tot een biologisch mechanisme dat leidt tot artrose. We hebben gekeken naar de effecten van genetische variatie op genexpressie en epigenetische regulatie en hoe dit bijdraagt aan de gevoeligheid voor artrose. Deze kennis kan gebruikt worden als aangrijpingspunt voor de ontwikkeling van een nieuw medicijn. Meer specifiek hebben we de ziekte processen ontrafeld die de rol van *DIO2*/schildklierhormoon in het ontstaan van artrose blootleggen. Genetische studies hebben laten zien dat erfelijke variatie in het *DIO2* gen risicoverhogend is voor het krijgen van de aandoening. Het *DIO2* gen codeert voor het enzym dat verantwoordelijk is voor de intracellulaire omzetting van inactief (T4) naar actief schildklierhormoon (T3). Van deze hormoon activatie weten we al dat het in de ontwikkelingsfase van het lichaam een belangrijke rol speelt in de vorming van de botten en gewrichten. Wat de precieze rol van verhoogde *DIO2* expressie en dus verhoogde T3 omzetting in een volgroeid gewricht is, weten we tot dit moment nog niet.

Voor het vinden van een verklaring en een mogelijke oplossing is het verkrijgen van ziekterelevante weefsels van essentieel belang. De verzameling hiervan, zoals gedaan voor een groot aantal artrosepatiënten in de RAAK-biobank, is ideaal gebleken voor het ontrafelen van moleculaire processen die onderliggend zijn aan het ontstaan van kraakbeenafbraak. Op deze manier konden we patiënt-specifieke vergelijkingen maken tussen

het aangedaan (artrotisch) en niet-aangedaan kraakbeenweefsel. Daarnaast hebben we als onderdeel van de RAAK-biobank mesenchymale stamcellen uit het beenmerg (hBM-MSCs) en primaire articulaire chondrocyten (hPACs) van meerdere artrosepatiënten verzameld. Met de cel modellen die we hebben ontwikkeld waren we in staat om reeds ontdekte risicogenen functioneel te valideren en, waar mogelijk, op in te grijpen. De juiste organisatie en uitbreiding van deze ziekterelevante weefsel- en celbank is uitgevoerd als onderdeel van mijn onderzoek.

In eerder onderzoek hadden we al verhoogde expressie van de risicovariant, ook wel risico allel genoemd, van *DIO2* ten opzichte van het referentie allel laten zien. Verder zagen we dat kraakbeen, aangetast door het artrose proces, meer *DIO2* mRNA en eiwit produceert dan gezond kraakbeen. Deze bevindingen lieten ons zien dat de genetische variant van het *DIO2* gen daadwerkelijk biologische gevolgen kan hebben voor het kraakbeen. Onze hypothese over de invloed van *DIO2* op het artrose proces luidde dat toegenomen expressie van *DIO2*, en daardoor toegenomen beschikbaarheid van T3, een bepalende factor is in de schadelijke processen onderliggend aan artrose. Omgekeerd veronderstelden we dat het remmen van deze *DIO2* expressie positieve gevolgen zou moeten hebben voor de gezondheid van het kraakbeen.

**Hoofdstuk 1** geeft een inleiding over de aandoening artrose, het relevante weefsel en de reeds bekende ziekte mechanismen. Verder wordt er toegelicht welke methodologie er toegepast wordt in het artrose onderzoek en van welke ziekterelevante weefsels en specialistische cel- en muismodellen we in dit proefschrift gebruik hebben gemaakt om onze hypothese te bevestigen.

### **Van genetica naar ziekte mechanismen; functionele studies in artrose onderzoek**

De ervaring heeft geleerd dat genetische variatie die de gevoeligheid voor het ontstaan van complexe ziekten verhogen vaak veroorzaakt wordt doordat het risico allel de expressie van een nabijgelegen gen beïnvloedt, bijvoorbeeld door alternatieve binding van transcriptie factoren.

Een eerste belangrijke stap om van genetische susceptibiliteit naar een onderliggend ziekte proces te komen, is te begrijpen wat de functionele consequenties zijn van het geïdentificeerde risico allel. Een methode om te bepalen of een variant de expressie beïnvloedt is via het meten van de hoeveelheid mRNA van de twee allelen afzonderlijk. Om dit onderscheid te maken tussen de twee allelen kun je weer gebruik maken van de genetische variatie die ook aanwezig is op het mRNA. De aanwezigheid van allelische onbalans, waarbij het risico allel kan dus meer of minder tot expressie komen in dragers van de variant dan de referentie, kan zo bijdragen aan het ontstaan van de aandoening. Het nut van het bepalen van allelische onbalans in expressie voor artrose onderzoek was reeds gedemonstreerd voor *DIO2*. In **hoofdstuk 2** gebruikten we deze methode om functioneel bewijs toe te voegen aan de identificatie van *ALDH1A2* als een risicogen voor hand artrose. Naast het identificeren van een verschil in *ALDH1A2* expressie tussen aangedaan en niet-aangedaan kraakbeen hebben we allelische onbalans aangetoond voor *ALDH1A2*. Deze bleek afhankelijk te zijn van dragerschap van de rs3204689 SNP in de 3'-UTR van het *ALDH1A2* mRNA. We hebben laten zien dat het mRNA met het risico allel "C" minder tot ex-

pressie kwam dan het corresponderende referentie allel. Dit resultaat impliceert dat het risico allel een functioneel effect heeft op de expressie van het gen, maar om het exacte mechanisme te bepalen is verder onderzoek nodig. Voorbeelden van vervolgonderzoek zijn in dit proefschrift uitgevoerd voor *DIO2*.

### Functionele studies van *DIO2*; de effecten van intracellulair schildklierhormoon

In hoofdstuk 3 gebruikten we gepaard aangedaan en niet-aangedaan kraakbeenweefsel om de veranderingen in expressie van het *DIO2* gen te bepalen. We lieten zien dat in aangedaan kraakbeen, dragers van het rs225014 risico allel een grotere toename van expressie van het *DIO2* gen laten zien dan niet-dragers. Daarnaast toonden we aan dat methylatie van een specifieke locatie net buiten het *DIO2* gen positief correleerde met *DIO2* expressie in dragers van de rs225014 variant. Met deze data hebben we aangetoond dat genetische aanleg samen met artrose gerelateerde veranderingen in het articulaire kraakbeen, resulteerden in een verlies van epigenetische onderdrukking van *DIO2* expressie. Vervolgens lieten we zien dat teveel expressie van het *DIO2* gen, en daarmee verhoogde aanwezigheid T3, slecht is voor de kwaliteit van het kraakbeen. In een *in vitro* chondrogenese model van hBM-MSCs leidde dit tot de activatie van ongunstige expressie profielen, resulterend in kraakbeen afbraak. Omgekeerd lieten we ook zien dat wanneer *DIO2* activiteit geremd wordt, dit een positief effect heeft op de gezondheid van kraakbeen. Deze bevindingen lieten zien dat een commercieel medicijn (Iopanoic acid; IOP), gericht op de remming van *DIO2*, de potentie heeft om gebruikt te worden als toekomstige interventie voor artrose.

Het positieve effect van de remming van *DIO2* expressie in *in vitro* kraakbeen hebben we vertaald naar een *in vivo* muismodel in hoofdstuk 4. In samenwerking met het 'Skeletal Biology and Engineering Research Centre' (KU Leuven, België) hebben we het effect onderzocht van *Dio2* op schade in muizenkniejes veroorzaakt door mechanische overbelasting. We maakten gebruik van een model waarin muizen gedwongen werden om te rennen op een lopende band gedurende 3 weken (5 dagen per week, een uur per dag). Normale muizen hebben na deze zware belasting van de gewrichten duidelijke schade aan het kraakbeen. Echter, wanneer *Dio2* expressie afwezig is, leidt dit tot minder kraakbeenschade als gevolg van deze zware mechanische belasting. Genoomwijde expressie analyse liet daarnaast zien dat kraakbeen van wild-type muizen, onder invloed van de overbelasting, disregulatie van expressie van een groot netwerk van genen had. Echter, kraakbeen van muizen zonder *Dio2* ondervond hierdoor geen verandering op expressie niveau. De resultaten in dit hoofdstuk onderstrepen het belang van de *Dio2*-afhankelijke regulatie van T3 in de ontwikkeling van kraakbeenschade als gevolg van mechanische overbelasting.

### Intrinsieke factoren voor gezond kraakbeen; *DIO2* deficiëntie

Naast het opsporen van factoren die het artrose ziekte proces beïnvloeden, is het ook belangrijk om meer inzicht te krijgen in intrinsieke factoren die bijdragen aan de stabiliteit van gezonde kraakbeencellen. Met andere woorden; welke processen hebben een gunstige uitwerking op het kraakbeen, zelfs onder negatieve invloed van buitenaf, zoals mechanische (over-)belasting? In hoofdstuk 5 hebben we ons gericht op *Calreticulin*

(*Calr*). Dit was het enige gen dat significant anders tot expressie kwam in kraakbeen van wild-type muizen vergeleken met muizen zonder *Dio2* expressie. Onafhankelijk van de mechanische belasting vonden we dat muizen zonder *Dio2* expressie een lagere expressie van het *Calr*-gen hebben dan de wild-type muizen. Daarnaast had mechanische belasting in de wild-type muizen een duidelijk verlagend effect op de expressie van *Calr*. Echter, in kraakbeen zonder *Dio2* was dit effect na overbelasting afwezig. Om de invloed van veranderende *Calr* expressie op de gezondheid van kraakbeen aan te tonen hebben we een *in vitro* celmodel gebruikt. Hierin lieten we zien dat verhoogde *Calr* expressie zorgt voor verminderde proteoglycaan synthese tijdens kraakbeen ontwikkeling. Proteoglycanen zijn belangrijke moleculen voor de integriteit van het kraakbeen. Het drastische verminderen van *Calr* expressie had daarentegen geen effect op de vorming van kraakbeenmatrix in vergelijking met de controle condities. De resultaten beschreven in hoofdstuk 5 laten zien lage expressie niveaus van zowel *Dio2* als van *Calr* bijdragen aan de gezond kraakbeen.

### **‘Functional genomics’; *in vitro* 3D-cel modellen vergeleken met autoloog kraakbeen**

In hoofdstuk 6 hebben we ons verdiept in de vergelijking van het methylatie landschap van *in vitro* 3D-cel modellen met dat van gepaard autoloog kraakbeen. Aanleiding hiertoe was het waargenomen verschil in chondrogenese capaciteit van hBM-MSCs en hPACs als gevolg van de weefsel specifieke beschikbaarheid van T3. Onze studie liet zien dat *in vitro* gekweekt ‘neo-kraakbeen’ van hPACs een methylatie profiel had dat voor bijna 99% overeen kwam met dat van het oorspronkelijke kraakbeen. Dit in tegenstelling tot het neo-kraakbeen gekweekt van hBM-MSCs (~80% overeenkomst). Dus hoewel het *in vitro* 3D-model van hBM-MSCs een ideaal model is voor onderzoek naar het artrose ziekte proces, leken de cellen in het gevormde neo-kraakbeen niet op chondrocyten zoals aanwezig in kraakbeen van een volwassen persoon. Tenminste, op basis van hun methylatie profiel. Ondanks dit grote verschil in het methylatie profiel ten opzichte van normaal kraakbeen, worden hBM-MSCs wijdverbreid gebruikt voor weefsel regeneratie doeleinden. We weten echter niet wat het effect van deze abnormale regulatie is op de lange termijn na een transplantatie.

### **Conclusie en toekomstige toepassingen**

De resultaten beschreven in dit proefschrift komen voort uit een toegewijde en voortgaande genomische artrose-onderzoekslijn. Door gebruik te maken van deze functionele studies hebben wij inzicht kunnen verkrijgen in de rol van schildklierhormoon gereguleerd via *DIO2* in het artrose proces. Het geleverde bewijs geeft een basis voor het ontwikkelen van een mogelijke behandeling. Onze resultaten doen vermoeden dat de intracellulaire T3 niveaus strikt gereguleerd moeten worden via *DIO2* als het kraakbeen mechanisch belast wordt, om stabiliteit van moleculaire processen in het kraakbeen te waarborgen. Het testen van de therapeutische effecten van IOP, *ex vivo* en *in vivo*, zullen ons waardevolle informatie leveren over het potentiële klinische gebruik ervan. Om een mogelijke effectieve behandeling voor artrose te vinden, zou toekomstig onderzoek zou gericht moeten zijn op de mogelijkheid om *DIO2* activiteit, en daarmee beschikbaarheid van T3, te verminderen met behulp van intra-articulaire toediening van een deiodinase-remmer (IOP) als.



Verder is het van essentieel belang om meer inzicht te krijgen in de mechanismen die in gewrichten zorgen voor de activatie van het T3-signaalsysteem onder invloed van bijvoorbeeld biomechanische stress. Gegeven dat *DIO2* geen invloed heeft op de hoeveelheid circulerend T3 in het lichaam, zullen deze onderzoeken zich vooral moeten richten op de lokale adaptatie van T3 beschikbaarheid in articulaire kraakbeen. Desalniettemin zullen we in ons achterhoofd moeten houden dat we op zoek zijn naar een moleculaire verklaring voor het ontstaan van artrose in een kunstmatig model. Daarom moeten we onze bevindingen altijd in perspectief plaatsen. Zoals het geval is bij genetisch- en biomarker-onderzoek, zouden we artrose-subtypen moeten karakteriseren in de verschillende *in vitro* en *in vivo* modellen die gebruikt worden.

