



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Orchestration of bone remodeling

Moester, M.J.C.

Citation

Moester, M. J. C. (2014, December 9). *Orchestration of bone remodeling*. Department of Radiology, Faculty of Medicine, Leiden University Medical Center (LUMC), Leiden University. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/30099>

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/1887/30099>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/30099> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Moester, Martiene Johanna Catharina

Title: Orchestration of bone remodeling

Issue Date: 2014-12-09

Samenvatting

Het skelet heeft verschillende functies. Zo geeft het vorm aan het lichaam, beschermt het vitale organen en het beenmerg, is een reservoir voor mineralen en geeft een aanknopingspunt voor spieren zodat bewegen mogelijk wordt. Het bot is een levend weefsel dat voortdurend wordt aangemaakt en afgebroken (geresorbeerd) door botcellen: de osteoblasten, osteoclasten en osteocyten. Osteoclasten resorberen het bot, waarna osteoblasten nieuwe botmatrix vormen. Sommige osteoblasten blijven tijdens het vormen van bot in de matrix zitten, waar ze differentiëren tot osteocyten. Osteocyten zijn met elkaar en de cellen op het oppervlak verbonden via kanaaltjes, waardoor ze veranderingen in het bot (zoals belasting) goed kunnen voelen. Als gevolg hiervan scheiden osteocyten factoren uit waarop de osteoblasten en osteoclasten reageren. Deze worden daarnaast ook beïnvloed door sommige hormonen. Bij elkaar resulteert dit in een ingewikkeld en nog niet volledig begrepen systeem dat het botmetabolisme regelt. In **Hoofdstuk 1** wordt een aantal belangrijke factoren besproken.

In gezonde personen is er een balans tussen aanmaak en afbraak van bot, zodat de botmassa gelijk blijft. Een verstoring van deze balans kan leiden tot een hogere of lagere botmassa, en ziekten zoals osteoporose. Osteoporose is de meest voorkomende ziekte van het skelet en wordt gekenmerkt door een lage botmassa en verlies van stevigheid en interne structuur. Hierdoor breken mensen met osteoporose sneller botten, vooral in de pols, heup en wervels. Oudere vrouwen hebben het hoogste risico op osteoporose omdat tijdens de menopauze de productie van oestrogeen vermindert en hierdoor de botaafbraak snel toeneemt. Behandeling van osteoporose gebeurt meestal met bisfosfonaten. Deze medicijnen onderdrukken de botaafbraak doordat ze specifiek de activiteit van osteoclasten remmen. Hierdoor remmen ze de progressie van de ziekte en brengen lichte verbetering, maar bisfosfonaten kunnen de botmassa niet terugbrengen naar een gezonde sterkte. Daarom moeten patiënten vaak levenslang behandeld worden. Er zijn andere medicijnen op de markt, en enkele andere komen hoogstwaarschijnlijk in de komende jaren beschikbaar, maar de ideale therapie is nog niet gevonden. Meer kennis over botmetabolisme en mogelijke nieuwe therapieën is daarom nodig.

Hoofdstuk 2 geeft een overzicht van de huidige kennis over sclerostin. Sclerostin is een eiwit dat de botvorming remt en gemaakt wordt door osteocyten in

gemineraliseerde botmatrix. Dit doet het door het remmen van de Wnt signalering, een signaleringsroute die belangrijk is voor botvorming en differentiatie van osteoblasten. Het gen dat codeert voor sclerostin is *SOST*. Mutaties in *SOST* of in de regio's rond het gen die de expressie reguleren kunnen leiden tot verminderde of ontbrekende productie van sclerostin en een verhoogde botmassa. Patiënten met sclerosteose of de ziekte van Van Buchem hebben een zeer sterk verhoogde botmassa. Zij hebben daardoor problemen zoals verlamming van de gezichtsspieren of doofheid door beknelling van de gezichtszenuwen. Draggers van deze ziekten hebben geen complicaties, maar wel een verhoogde botmassa vergeleken met controlepersonen. Het bot is van goede kwaliteit en structuur, en zowel patiënten als dragers lijken dan ook goed bestand tegen botbreuken. Dit wijst op een dosis-afhankelijk effect waarbij een lagere productie van sclerostin verband houdt met een hogere botmassa. Omdat sclerostin specifiek gemaakt wordt in osteocyten, worden bij medicijnen die zich richten op dit eiwit weinig bijwerkingen in andere organen verwacht. Bovendien betekent een dosis-afhankelijk effect dat kleine veranderingen in sclerostin productie al een positief effect kunnen hebben bij patiënten met osteoporose. Sclerostin is daarom een van de meest aantrekkelijke aanknopingspunten voor nieuwe therapieën voor osteoporose.

Sclerostin kan worden gemeten in serum, en er zijn veel studies gedaan naar de concentraties in serum van zowel controlepersonen als patiënten met verschillende ziekten. Patiënten met sclerosteose hebben een inactiverende mutatie in *SOST*, en in hun serum is dan ook geen sclerostin gevonden. In patiënten met Van Buchem ziekte werden kleine hoeveelheden sclerostin gevonden. Van Buchem ziekte wordt veroorzaakt door een mutatie in een regulerende regio buiten het coderende deel van *SOST* en de symptomen zijn meestal minder ernstig dan bij sclerosteose. Dickkopf 1 (DKK1) is een eiwit dat, net als sclerostin, de Wnt signalering remt. In **Hoofdstuk 3** vonden we dat DKK1 in serum monsters van mensen met sclerosteose en Van Buchem ziekte verhoogd is. Mogelijk gebeurt dit om te compenseren voor het tekort aan sclerostin. De sterk verhoogde botmassa in deze patiënten suggereert echter dat de verhoging van DKK1 niet voldoende is om sclerostin te compenseren.

Nieuwe mutaties die botfenotypes tot gevolg hebben kunnen de kennis van de fysiologische werking van het gemuteerde eiwit vergroten. In **Hoofdstuk 4** beschrijven we een nieuwe mutatie in sclerostin na onderzoek van een broer en zus

met klassieke sclerosteose kenmerken. Deze mutatie heeft een aminozuurverandering tot gevolg waardoor een belangrijk onderdeel van de structuur van sclerostin, de cystine-knoop, niet goed gevormd wordt. Het eiwit wordt daardoor vastgehouden in het endoplasmatisch reticulum en niet uitgescheiden. Daarnaast laten we zien dat het gemuteerde eiwit niet goed kan binden aan de Wnt co-receptor LRP5, en dus zijn functie niet goed kan uitoefenen. Samen leiden deze veranderingen tot een totaal verlies van de functie van sclerostin en het sclerosteose fenotype.

Door het ontrafelen van de normale werking van regulatiemechanismen die *SOST* expressie controleren, hopen we uiteindelijk dit gen specifiek te kunnen aangrijpen en daardoor in patiënten met osteoporose de botmassa te verhogen met minimale bijwerkingen. In **Hoofdstuk 5** hebben we de regulatie van *SOST* onderzocht door de activiteit van de Wnt signaleringsroute te variëren. *SOST* expressie leek te worden verlaagd door verhoogde Wnt signalering activiteit, en sterk verlaagd door GIN. Dit is een remmer van glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β), en daarmee een activator van de Wnt signaleringsroute. Verschillende remmers van de Wnt signalering konden echter de verlaging in *SOST* expressie door GIN niet opheffen. Bovendien had het rechtstreeks blokkeren van transcriptie van de Wnt signalerings targetgenen geen effect op *SOST* expressie. De verlaging van *SOST* expressie lijkt daarom niet veroorzaakt door Wnt signalering, maar door een ander effect van GSK3 β .

Naast het moduleren van de endogene regulatie van sclerostin expressie worden andere methoden onderzocht om het effect van het eiwit te blokkeren. In **Hoofdstuk 6** hebben we een nieuwe methode voor het remmen van *SOST* expressie onderzocht met antisense oligonucleotiden (AONs). Zoals uitgebreid beschreven in **Hoofdstuk 1** verstoren AONs de zogenaamde splicing van een gen. Een gen bestaat uit exonen (coderende stukken) en intronen (niet-coderend), en tijdens splicing worden de exonen aan elkaar geplakt en de intronen weggegooid, waarbij het messenger RNA (mRNA) gevormd wordt. AONs kunnen ervoor zorgen dat een exon niet herkend wordt, en dus overgeslagen tijdens het vormen van mRNA (een exon skip). Omdat *SOST* maar twee exonen heeft, betekent het skippen van een van deze exonen dat er geen eiwitproductie plaats zal vinden. Van de 20 onderzochte AONs (zowel controle als specifiek gemaakt voor *SOST*) bleek helaas geen enkele de *SOST* expressie te verlagen. Een tweede gen waarop exon skipping in **Hoofdstuk 6** onderzocht werd

is *Rank*. Het eiwit dat door dit gen gemaakt wordt is essentieel voor de differentiatie van osteoclasten. Exon skipping van het membraangebonden deel van *Rank* heeft als extra voordeel dat een eiwit gevormd wordt dat lijkt op osteoprotegerin (OPG), een soort dummy-receptor die de osteoclastdifferentiatie en daardoor de botafbraak remt. Hierdoor wordt niet alleen de functie van *Rank* geïnactiveerd, maar wordt gelijktijdig een eiwit gevormd dat een extra positief effect heeft. Hoewel we in enkele experimenten exon skipping hebben aangetoond, is verder onderzoek nodig om de efficiëntie te optimaliseren. Pas dan kan een biologisch effect verwacht worden.

Het ontdekken van stoffen die een verhoging van de botmassa en –sterkte kunnen veroorzaken in patiënten met osteoporose zou een enorme vooruitgang voor de huidige therapie betekenen. Voor het onderzoeken van potentiële kandidaten zijn nieuwe screeningsmethoden voor relevante parameters en met een grote capaciteit nodig. Mineralisatie is de laatste en waarschijnlijk meest belangrijke stap in de botformatie en heeft daarom de voorkeur als uitleesparameter. **Hoofdstuk 7** beschrijft de ontwikkeling van een makkelijke en opschaalbare methode voor het kwantificeren van de mineralisatie in *in vitro* celkweken. Hierbij worden de fluorescente stoffen Bonetag 800 en Osteosense 800 gebruikt. De resultaten van deze methode zijn vergeleken met de veelgebruikte Alizarine Rood S kleuring en we hebben aangetoond dat de nieuwe methode hiermee correleert.

De huidige medicijnen voor osteoporose zoals bisfosfonaten werken door het remmen van de botafbraak, maar kunnen het bot niet herstellen naar een gezond niveau. Geneesmiddelen die de botvorming stimuleren zouden een waardevolle toevoeging zijn aan de huidige behandelmogelijkheden. In **Hoofdstuk 8** worden de resultaten van dit proefschrift bediscussieerd in relatie tot de huidige kennis van botmetabolisme en strategieën voor behandeling van osteoporose.

