



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Genes and mediators of inflammation and development in osteoarthritis

Bos, S.T.

Citation

Bos, S. T. (2010, September 15). *Genes and mediators of inflammation and development in osteoarthritis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/15944>

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/1887/15944>

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

6

CC / CT / TT

The image is a composite graphic. At the top center is a large, black, stylized number '6'. Below it, the background is filled with a repeating pattern of DNA double helix sequences in a light gray color. Overlaid on this background are three main visual elements: 1) A large, semi-transparent DNA double helix structure on the left side. 2) A central, semi-transparent microscopic image showing several cells, some of which appear to be budding or dividing. 3) A semi-transparent X-ray of a human pelvis, showing the hip bones, spine, and pelvic cavity, positioned in the lower right quadrant. The text 'CC / CT / TT' is printed in a bold, sans-serif font in the upper left area of the composite image.

Nederlandse samenvatting

6.1 Introductie

Artrose is de meest voorkomende aandoening van het bewegingsapparaat. Het proces wordt gekenmerkt door de afbraak van het kraakbeen op de gewrichtsdelen en de vorming van bot op de randen van de gewrichten (osteofyten). Op röntgenfoto's zijn deze 2 kenmerken zichtbaar als een vernauwing van de gewrichtsspleet en verbreding van de gewrichtsoppervlakten. Klinische symptomen van artrose zijn pijn in de gewrichten en beperking van de bewegingsvrijheid. De meest voorkomende aangedane gewrichten zijn de handen, knieën, heupen en wervelkolom. De oorzaak van de ziekte is nog grotendeels onbekend, hoewel duidelijk is dat de balans van aanmaak en afbraak van de componenten van het kraakbeen verstoord is.

Artrose heeft een grote erfelijke component, wat verklaard waarom de ziekte vaak in families voorkomt. Naast de erfelijke component spelen ook andere factoren zoals leeftijd, geslacht, overgewicht en beroep een rol wat het onderzoeken van de erfelijke component moeilijker maakt. De recente bevindingen die door genetisch onderzoek zijn gedaan duiden erop dat in het ontstaan van artrose twee processen een grote rol spelen. Het eerste proces is het ontstekingsmechanisme en het tweede proces is de endochondrale verbening die plaatsvindt tijdens de lengtegroei van botten en formatie van gewrichten.

6.2 Kraakbeen en onderzoeksdoelen

Het kraakbeen wordt gevormd gedurende de ontwikkeling van de gewrichten. Het ontstaat uit een groep gespecialiseerde cellen die tijdens de vorming van de botten als kraakbeen cellen een matrix om zich heen leggen die het articulaire kraakbeen genoemd wordt. Eenmaal gevormd blijft het kraakbeen levenslang haar functie van soepele beweging en demping van schokken verrichten. De kraakbeencellen zijn maar spaarzaam aanwezig in het kraakbeen, delen zich niet en hun activiteit is heel laag (Zie ook Hoofdstuk 1 blz. 12, Figuur 2A). Gedurende het leven gaan kleine hoeveelheden van de bouwstenen van het kraakbeen kapot en de kraakbeencellen zijn net actief genoeg om dit op te ruimen en weer aan te vullen. Dit proces is zorgvuldig gebalanceerd, onder andere doordat de kraakbeen cellen gevoelig zijn voor ontstekingsparameters die onder invloed van schade aan het kraakbeen vrijkomen. Het is bekend dat teveel van deze ontstekingsparameters deze balans van opbouw en afbraak kunnen verstoren, waardoor teveel kraakbeen verloren gaat. Een van de algemeen aanvaarde hypothesen in artrose is dat deze balans verstoord is in de richting van de afbraak van het kraakbeen. In dit proefschrift hebben wij voor meerdere ontstekingsparameters onderzocht of we deze hypothese konden bevestigen. Daarnaast zijn in de recente wereldwijde onderzoeken naar artrose genen gevonden die coderen voor eiwitten die in de vroege ontwikkeling van bot en kraakbeen een rol hebben. Een van dergelijke genen, die door ons werd geïdentificeerd is het *DIO2*. Verder onderzoek moet nu uitwijzen wat mogelijke achterliggende oorzaken zijn voor de betrokkenheid van dit gen bij artrose. We onderzochten mogelijke verschillen in de snelheid van het afschrijven van varianten van dit gen. Daarnaast werd onderzocht of het eiwit waar *DIO2* voor codeert, samen met enkele aanverwante eiwitten daadwerkelijk aanwezig is in kraakbeen met en zonder artrose.

6.3 Studie populaties

Om te onderzoeken welke processen een rol spelen in artrose zijn in dit proefschrift verschillende studies gebruikt, waarvan de GARP (Genetica **AR**trose en **P**rogressie) en RAAK (**R**esearch **AR**trose en **AR**ticulair **K**raakbeen) de belangrijkste twee zijn.

De GARP studie, een samenwerking met de afdeling Reumatologie, bestaat uit een grote groep van broer- en/of zus-paren tussen de 40 en 70 jaar met klinische klachten en radiologisch aangetoonde artrose in twee of meer gewrichtsgroepen (hand, heup, knie en wervelkolom). Van deze patiënten hebben wij ook DNA, RNA, bloed en urine afgenomen zodat we relevante metingen kunnen doen. In het kader van dit proefschrift hebben we vooral ontstekingsparameters gemeten en deze, met relevante genen voor deze parameters in associatiestudies* met artrose onderzocht. Daarnaast is in de GARP studie met behulp van een koppelingsonderzoek** gezocht naar nieuwe varianten van genen die de maximale productiecapaciteit van bloedcellen voor ontstekingsparameters beïnvloeden.

De RAAK studie is een lopende samenwerking met afdeling Orthopedie in het Leids Universitair Medisch Centrum in Leiden en het Rijnland Ziekenhuis in Leiderdorp waarbij de chirurgen bij operaties van patiënten die een gewrichtsvervanging nodig hebben het verwijderde gewrichtsmateriaal voor onderzoek insturen. In dit materiaal kunnen we onderzoek doen in de voor artrose meest relevante weefsels zoals kraakbeen, bot en de ligamenten.

****Associatiestudies** vergelijken twee groepen personen, waarvan één groep aangedaan is met de ziekte, en de andere groep de ‘normale’ bevolking representeert. Voor een kandidaatgen, dat ervan verdacht wordt een rol te spelen bij de ziekte kan worden bekeken of varianten van dit gen vaker voorkomen bij de patiënten dan bij de controle personen; er is dan sprake van associatie van een variant met de ziekte. De oorzaak van deze associatie kan dan liggen in een eigenschap van deze variant zelf, of een variant die hier dichtbij ligt op dezelfde DNA streng. Bij het overerven van het DNA worden grote stukken met hierop meerdere varianten vaak geheel overgedragen van ouder op kind. Zo’n stuk DNA heet een haplotype, en in dit proefschrift is voor meerdere genen onderzoek gedaan naar dergelijke haplotypen. Wij onderzochten niet alleen of haplotypen van genen vaker bij aangedane personen te vinden waren, maar ook of deze haplotypen bloedwaarden van relevante ontstekingsparameters beïnvloeden.*

*****Koppelingsstudies** maken gebruik van het gelijktijdig overerven van grote stukken DNA binnen families waarin een ziekte vaker voorkomt. Broers en zussen delen onderling gemiddeld 50% van hun DNA, de overige 50% is verschillend. Door in kaart te brengen welke delen van het DNA gedeeld worden en welke delen uniek zijn, kunnen we bij aangedane familieleden nagaan op welke 50% van het DNA de genen liggen die betrokken zijn bij het ontstaan van de ziekte. Door het verzamelen van heel veel van dit soort paren uit verschillende families is het mogelijk om nauwkeurig vast te stellen welk deel van het DNA door al deze paren vaker gedeeld wordt dan wat op basis van toeval verwacht wordt. Door deze ‘koppeling’ van ziekte aan een stukje van het DNA kunnen we in dit stukje DNA verder zoeken naar de mogelijke genvarianten die het risico op de ziekte verhogen. In dit proefschrift gebruikten wij deze aanpak om binnen een groep broer-zus paren te onderzoeken welke gebieden op het DNA genen kunnen bevatten die de bloedwaarden van relevante ontstekingsparameters kunnen beïnvloeden.*

6.4 Interleukine-1 gen cluster onderzoek

Interleukine-1 is een sterk pro-inflammatoire ontstekingsparameter, die de kraakbeencellen kan aanzetten tot de productie van enzymen die de kraakbeen matrix afbreken (Zie ook Hoofdstuk 4 blz. 108, Figuur 1). Door bloedcellen te stimuleren met een stof die lijkt op een bacterie produceren deze bloedcellen op maximale snelheid ontstekingsparameters, zoals de verschillende vormen van het interleukine(IL)-1. In bloed van de GARP patiënten hebben we onderzocht of de genen die coderen voor IL-1 (*IL1RN*, *IL1A* en *IL1B*) associëren met de maximale capaciteit van bloedcellen om IL-1 bèta en IL-1 receptor antagonist(Ra) te produceren. We vonden dat een haplotype van het *IL1RN* gen associeert met de biologische beschikbaarheid van IL-1 bèta (de verhouding tussen IL-1 bèta en de IL-1 receptor antagonist). Draggers van dit haplotype hebben een lagere biologische beschikbaarheid van IL-1 bèta, maar meer radiologische handartrose. Gegeven dat pro-inflammatoire signalen het kraakbeen aanzetten tot productie van afbraakenzymen, verwachtte wij bij een lage biologische beschikbaarheid van IL-1 bèta juist minder aanleg voor artrose. Een mogelijke verklaring voor onze bevinding is dat gedurende het leven het kraakbeen onderhouden wordt door een balans tussen de pro- en anti-inflammatoire eiwitten, waarbij bij kleine beschadigingen mogelijk een voldoende sterke actie van IL-1 bèta nodig hebben om de reparatie op gang te krijgen, of de kleine schade voldoende op te ruimen voordat de reparatie van de kraakbeenmatrix kan plaatsvinden.

6.5 Koppelings analyse met maximale productiecapaciteit van ontstekingsparameters

De genetische variatie waarvan bekend is dat het ontstekingsparameters beïnvloed verklaart niet de volledige erfelijkheid hiervan. Met behulp van een genoom wijde koppelings analyse in de GARP studie zochten we naar genen die ook aan de genetische component van deze bloedwaarden bijdragen. In deze analyse ontdekten wij een variant in het *CD53* gen, die associeert met de maximale productie capaciteit van bloedcellen voor tumor necrose factor (TNF) alpha, een sterk pro-inflammatoir eiwit. Uit eerdere onderzoeken blijkt dat maximale capaciteit van de bloedcellen om TNF alpha te produceren niet geassocieerd is met de aanwezigheid van artrose, en deze genetische variant heeft dan ook geen relatie met het ontstaan van artrose in de GARP studie. Mogelijk is de door ons geïdentificeerde variant wel van belang bij andere aandoeningen waarbij de maximale TNF productiecapaciteit van de bloedcellen wel een grote factor is bij het ontstaan of voortgang van de aandoening, een hypothese die nader onderzocht moet worden.

6.6 CRP haplotypen, CRP levels en artrose

CRP is een eiwit wat een breed scala aan processen reguleert en sterk pro-inflammatoire ontstekingsparameters aanzet. Een eerder onderzoek wees uit dat genetische variatie in het *CRP* gen de basale bloedwaarden van dit eiwit beïnvloed. Wij onderzochten of wij deze relatie van gen en bloedwaarden in de GARP studie konden bevestigen, en of de genetische variatie mogelijk een invloed heeft op de mate van artrose. Het haplotype 7/8 van dit gen, wat geassocieerd is met hoge bloedwaarden voor het CRP associeert ook met ernstige handartrose (gedefinieerd als 7 of meer aangedane gewrichten van 20 gescoorde gewrichten). Dit zou kunnen duiden op een relatie tussen de hoge CRP waarden onder invloed van dit haplotype en de ernstige schade aan het kraakbeen van de handen. De bloedwaarden van de mensen die ernstige handartrose hebben zijn echter niet hoger in

vergelijking met de rest van de GARP studie. Dit mogelijk is te wijten aan het feit dat alle deelnemers in de GARP studie artrose op meerdere gewrichtslocaties hebben.

6.7 Selenoprotein S gen variatie, ontstekingsparameters en artrose

In een associatie studie, uitgevoerd door een buitenlandse onderzoeksgroep werd aangetoond dat het selenoprotein S gen (*SELS*) associeert met bloedwaarden van IL-6, IL-1 bèta en TNF. In de GARP studie onderzochten wij of we deze relatie konden verifiëren in onze artrose patiënten. Hoewel de gerapporteerde associatie niet werd gereproduceerd was de genetische variatie in het gen wel met verschillende cytokines geassocieerd, wat duidt op een rol van dit gen in de bloedwaarden van ontstekingsparameters. De genetische variatie in het gen associeerde echter niet met artrose wat erop duidt dat de rol van dit gen niet direct met artrose heeft te maken.

6.8 Samenvatting ontstekingsparameters en artrose

In Tabel 1 geven we de gevonden relaties tussen genen, ontstekingsparameters en artrose weer welke in dit proefschrift beschreven zijn.

Tabel 1. Samenvatting van gevonden relaties tussen genen en ontstekingsparameters in artrose

Gen	Associaties		
	Haplotype met bloedwaarden	Haplotypen met artrose	Bloedwaarden met artrose
<i>CRP</i>	Ja (Serum HsCRP)	Ja (Hand ROA)	Nee
IL-1 gen cluster	Ja (Max. biol. beschik. IL-1β)	Ja (ROA)	Ja (Max. biol. beschik. IL-1β)*
<i>SELS</i>	Ja (Cytokines en serum HsCRP)	Nee	Ja (Chemokines)

* De biologische beschikbaarheid van IL-1 bèta heeft een tegengestelde relatie voor de haplotype associatie en bloedwaarden associatie met artrose; het haplotype wat associeert geeft lage bloedwaarden, waar de bloedwaarden die met artrose associëren juist de hogere waarden zijn.

Max. biol. beschik. IL-1β staat voor de maximale biologische beschikbaarheid van IL-1 bèta, ROA staat voor radiologisch bepaalde artrose.

Samenvattend kunnen we stellen dat artrose en ontstekingsparameters een intieme relatie hebben waarbij het moeilijk is om de oorzaak en gevolg te onderscheiden. De met artrose gepaard gaande afbraakprocessen van het kraakbeen zorgen mogelijk voor een subtiele verhoging van de bloedwaarden van de patiënten waardoor het moeilijk is om te achterhalen of de genen die met artrose associëren zorgen voor deze hoge waarden, of juist de bloedwaarden hoog zijn als het gevolg van het artroseproces. Het opstellen van studies van gezonde personen of personen met vroege artrose zou een goede stap zijn om deze relatie nader te onderzoeken. Zulke onderzoeken kunnen op verschillende tijdstippen de relatie tussen het ontstaan van artrose en bloedwaarden van ontstekingsparameters waarnemen en hierdoor een richting aan de associaties geven die worden waargenomen.

6.9 Karakterisatie van het DIO2 gen in artrotisch kraakbeen

In de GARP studie toonde een eerder onderzoek van onze groep aan dat de rs225014 T>C variant in het gen *DIO2* het risico op het krijgen van artrose verhoogt. *DIO2* codeert voor type II deiodinase (D2), een eiwit wat inactief thyroïd hormoon T₄ omzet in actief thyroïd hormoon T₃. Tijdens de lengtegroei van botten en de formatie van gewrichten (endochondrale verbening) is D2 en daarmee actief T₃ aanwezig wat signaal geeft aan de chondrocyten in de richting van terminale differentiatie en de uiteindelijke formatie van bot stimuleert.

In de RAAK studie is artrotisch kraakbeen van patiënten verzameld, en in deze studie zijn de kraakbeen biopten van personen die zowel een risicovariant als een normale variant van rs225014 dragen onderzocht om mogelijke verschillen in de genactiviteit te onderzoeken. We hebben met dit onderzoek aangetoond dat de risico variant een veel hogere genactiviteit geeft in vergelijking met de normale variant van het gen. Een dergelijk verschil in activiteit kan worden veroorzaakt doordat de regulatie van de twee varianten verschilt. Dit verschil in activiteit duidt aan dat dit mogelijk onderliggend is aan het hogere risico op het ontstaan van artrose in personen die drager zijn van de C-variant.

In samenwerking met de afdeling Pathologie van het LUMC hebben we ook artrotisch en niet artrotisch kraakbeen materiaal microscopisch onderzocht voor de aanwezigheid van het *DIO2* genproduct D2, evenals aanverwante eiwitten type III deiodinase en de thyroid hormoon receptor bèta. In het kraakbeen van artrosepatiënten werd met toenemende mate van kraakbeenschade een hogere activiteit van deze eiwitten waargenomen, in vergelijking met de niet artrotische coupes. De hogere aanwezigheid van het eiwit duidt op meer activiteit van de thyroid hormoon as, wat de overgang van de chondrocyten naar de terminale differentiatie zal bevorderen. Deze terminale differentiatie zal de kraakbeenkwaliteit verslechteren en nog verder doen afbreken.

6.10 Conclusie

Het onderzoek naar artrose krijgt, onder invloed van de wereldwijde vergrijzing en gepaarde toename van de gevolgen van deze aandoening onder de bevolking meer en meer aandacht. In dit proefschrift hebben we de rol van ontstekingsparameters en de genen die deze reguleren in artrose onderzocht. De complexiteit van de communicatie over en weer tussen de genen, ontstekingsparameters en artrose ontstaat doordat de ziekteactiviteit ook de ontstekingsparameters beïnvloed. We toonden aan dat een haplotype van het *CRP* gen dat codeert voor hogere CRP bloedwaarden bij handartrose betrokken is. Daarnaast identificeerden we een component van chemokines die ook invloed heeft op de mate van handartrose in de GARP studie, de richting van deze laatste associatie anders is dan verwacht, wat de complexiteit van de rol van ontstekingsparameters in artrose onderstreept of een gevolg is van de manier waarop de GARP studie verzameld is. Een nog ingewikkeldere associatie vonden wij voor de rol van de maximale biologische beschikbaarheid van IL-1 bèta in artrose. Een haplotype dat associeert met lage biologische beschikbaarheid geeft meer handartrose, mogelijk door onvoldoende activatie van matrix reparatiemechanismen of opruiming van de beschadigde matrix bij kleinere schades aan het kraakbeen. Naast de ontstekingsparameters komen de genen betrokken bij de ontwikkeling van bot en gewrichten meer en meer onder aandacht als gevolg van bevindingen in het genetische onderzoek. Deze genen kunnen zowel vroeg in het leven, bij de ontwikkeling en vorming van gewrichten als later in het leven, bij het onderhoud van het articulaire kraakbeen een rol spelen. Subtiele verschillen in gewrichtsvorm of botsamenstelling vergroten mogelijk het risico op artrose door lokaal grotere stress op het kraakbeen bij normaal gebruik. De genen die actief zijn in de groeiplaat gedurende de lengtegroei zijn in het gezonde articulaire kraakbeen niet actief, maar mogelijk wordt met het ouder worden deze onderdrukking van activiteit verloren onder de invloed van activiteit van genen zoals *DIO2*. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift toont aan dat de genetische variatie die associeert met artrose een grotere genactiviteit zou kunnen veroorzaken in kraakbeen. Daarnaast werd tussen gezond kraakbeen en artrotisch kraakbeen een verhoging van de

aanwezigheid van dit eiwit waargenomen, wat de hypothese van verhoging van de genactiviteit en daarmee gepaard gaande afbraak van het kraakbeen ondersteunt. Toekomstige genetische bevindingen kunnen op soortgelijke wijze op functionele activiteit getoetst worden, waarbij de nieuwe technieken zoals sequencing en DNA-methylatie metingen kunnen bijdragen aan respectievelijk de identificatie van nieuwe functionele varianten en bepaling van de achterliggende oorzaak achter toegenomen genactiviteit.

