

DE ROL VAN METABOLE REGULERING IN HET FUNCTIONEREN VAN DE SKELETCEL

Nick van Gastel

Afdeling Cellulair Metabolisme en Micro-omgeving, de Duve Instituut, Brussel

De functies van het skelet omvatten mechanische ondersteuning, beweging, bloedcelproductie, opslag van mineralen en hormonale regulatie. Deze veelzijdige rol wordt bereikt door een samenspel van botcellen, kraakbeencellen en bindweefselcellen, alle afkomstig van skeletale stamcellen. Recente studies tonen het belang aan van het intermediaire metabolisme van skeletcellen voor de regulering van hun functie. De verschillende soorten skeletcellen hebben niet alleen verschillende metabole eisen met betrekking tot hun specifieke functie, maar worden ook beïnvloed door de beschikbaarheid van voedingsstoffen in hun micro-omgeving. Dit artikel geeft een overzicht van recente bevindingen over de rol van specifieke metaboliëten en metabole programma's bij de vorming en het functioneren van de verschillende skeletceltypes. Verder wordt de metabole ontregeling bij veroudering van het skelet en degeneratieve ziekten besproken.

INLEIDING

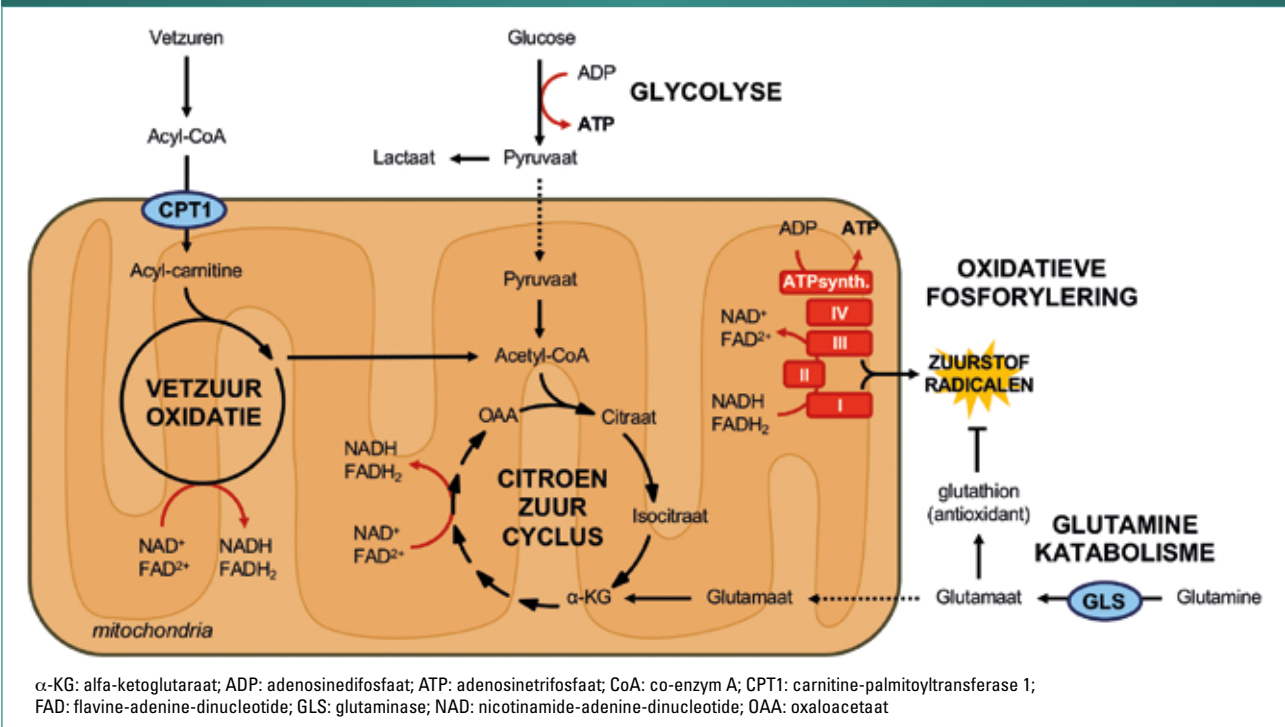
Celmetabolisme of intermediair metabolisme is het subveld van de biochemie dat zich bezighoudt met het uitgebreide en sterk geïntegreerde netwerk van biochemische reacties dat cellen voorziet van energie, biosynthetische tussenproducten en reducerend vermogen voor redoxreacties (**Figuur 1**). De opheldering van de belangrijkste biochemische mechanismen die het functioneren van cellen bewerkstelligen, heeft enkele van de grootste wetenschappelijke geesten bijna twee eeuwen lang beziggehouden. Eens dit doel bereikt was, verloor de bredere biochemische gemeenschap zijn interesse en werd celmetabolisme als een opgelost probleem aanzien. Dit domein heeft de laatste jaren echter een nieuw leven gekregen door verschillende onverwachte ontdekkingen die intermediair metabolisme van een op zichzelf staand proces herpositioneerden tot een centraal systeem dat alle aspecten van celfunctie beïnvloed, van celtgroei, celdeling en celdood tot epigenetica en tumorvorming (1). Ook in skeletcellen speelt het intermediaire metabolisme een belangrijke rol, waarvan hier een overzicht gegeven wordt.

DE METABOLE KOSTEN VAN BOTVORMING

De vorming en het onderhoud van het skelet zijn het resultaat van een gecoördineerde samenwerking tussen verschillende types cellen. Osteoblasten zijn de botvormende cellen, die een karakteristieke collageenrijke matrix aanmaken en deze vervolgens mineraliseren om het bot zijn sterkte te geven. Tijdens het botvormingsproces raakt een deel van de osteoblasten ingebed in de botmatrix, waarna ze worden aangeduid als osteocyten (2).

Eiwitsynthese is een metabool veeleisend proces, en osteoblasten hebben daardoor behoefte aan grote hoeveelheden energie en aminozuren. Matrix-producerende osteoblasten zijn vaak dicht bij bloedvaten gelokaliseerd, wat duidt op een ruime toevoer van zuurstof en voedingsstoffen (3). Studies bij muizen met radioactief gelabelde glucoseanalogen hebben aangetoond dat de opname van glucose in het skelet gelijk is aan of groter is dan die van metabole organen zoals lever, spieren en vetweefsel (4). Om energie te produceren, zetten cellen glucose om in pyruvaat, een proces dat glycolyse genoemd wordt.

Figuur 1: Overzicht van een aantal belangrijke biochemische reacties uit het intermediaire metabolisme. Cellen nemen verschillende voedingsstoffen (glucose, vetzuren, glutamine) op uit hun directe omgeving en zetten deze om tot energie (in de vorm van ATP), biosynthetische tussenproducten, antioxidanten en redoxmoleculen.



Vervolgens wordt pyruvaat geoxideerd in de mitochondriale citroenzuurcyclus, waarbij grote hoeveelheden energie in de vorm van adenosinetrifosfaat (ATP) geproduceerd worden door oxidatieve fosforylering. Glycolyse op zichzelf produceert, naast tussenproducten voor biosynthese, eveneens kleine hoeveelheden ATP. Wanneer er niet voldoende zuurstof aanwezig is voor pyruvaatoxidatie kunnen cellen pyruvaat omzetten tot lactaat (melkzuur) en dit uitscheiden om zo glycolyse aan een hoge snelheid te laten verlopen en toch voldoende energie te genereren. Experimenten in celkweken tonen echter aan dat het grootste deel van de glucose die door osteoblasten wordt opgenomen, gemetaboliseerd wordt tot lactaat zelfs in aanwezigheid van voldoende zuurstof, een proces dat bekend staat als aerobe glycolyse. In volwassen osteoblasten kan aerobe glycolyse tot 80% van de energieproductie uitmaken. Geschat wordt dat onder deze omstandigheden slechts 15-20% van de glucose-koolstof naar de citroenzuurcyclus of naar biosynthetische processen gaat (5, 6). Anabole stimuli zoals parathyreoïd hormoon (PTH) en WNT-signalering verhogen de expressie

van glycolytische enzymen in osteoblasten, en bevorderen zo de botvorming (5, 7).

Osteoblasten zijn afhankelijk van glycolyse, maar er is ook een sterke stijging van het zuurstofverbruik, gelinkt aan een verhoogde ATP-productie, waar te nemen tijdens de osteogene differentiatie van zowel skeletale muis- als humane stamcellen in celkweken (8) (**Figuur 2**). Het uitschakelen van de transcriptiefactor PPAR-γ-coactivator 1α (PGC1α), een belangrijke regulator van mitochondriale biogenese

Figuur 2: Vergelijking van de metabole programma's van osteoblasten, chondrocyten en adipocyten.

Skeletale stamcel			
	Osteoblast	Chondrocyt	Adipocyt
Glycolyse	+++	+++	+
Oxidatieve fosforylatie	+++	+	+++
Glucose-oxidatie	+	+	+++
Vetzuuroxidatie	++	–	–
Glutaminekatabolisme	+++	+++	+

en oxidatief metabolisme, in skeletale stamcellen vermindert osteogene differentiatie en induceert botverlies in muizen (9). Gelijktijdig met een toename van oxidatieve fosforylering gaat osteogene differentiatie van stamcellen gepaard met een toename van de antioxidantcapaciteit (8). Dienovereenkomstig zijn osteoblasten, maar niet skeletale stamcellen, gevoelig voor het blokkeren van oxidatieve fosforylering of voor toenemende oxidatieve stress in de vorm van zuurstofradicalen (8, 9).

Hoewel osteoblasten het vermogen hebben tot glucoseoxidatie, lijkt glucose geen belangrijke brandstof te zijn voor de mitochondriale citroenzuurcyclusactiviteit (5, 10), wat een rol suggereert voor andere voedingsstoffen. Het is al lang bekend dat vetzuuroxidatie een belangrijke rol speelt in het energiemetabolisme van osteoblasten. Oudere biochemische studies toonden aan dat tot 40% van de ATP-productie in osteoblasten afkomstig kan zijn van de oxidatie van vetzuren (11). Recentere studies bevestigen dat osteoblasten de vereiste receptoren en katabole enzymen tot expressie brengen om vetzuren te verbranden (10, 12). Onze studies tonen verder aan dat skeletale stamcellen van muizen kunnen overleven in vetarme omgevingen of na uitschakeling van CPT1a (carnitine-palmitoyltransferase 1a), het belangrijkste enzym in vetzuuroxidatie, maar niet meer kunnen differentiëren naar osteoblasten in deze situaties (10). Kim et al. toonden verder aan dat verlies van CPT2 bij volwassen osteoblasten de botvorming vermindert door de mineralisatie te verstoren (12). De effecten werden versterkt in de aanwezigheid van oestrogeen, dat vetzuuroxidatie bevordert ten koste van glycolyse. Ook WNT-signalering bevordert vetzuuroxidatie in osteoblasten (13). De exacte rol van vetzuuroxidatie in osteoblasten, zijnde energieproductie, biosynthese of epigenetische regulatie, dient echter nog te worden bepaald.

Naast vetzuren wordt de citroenzuurcyclusactiviteit in de osteoblast ook gevoed door glutamine. Uitschakelen van het glutamine-afbrekende enzym glutaminase (GLS) in skeletale stamcellen in muizen vermindert de ontwikkeling van osteoblasten en botvorming (14). Zowel skeletale stamcellen van muizen als van mensen verhogen hun glutamineconsumptie en -metabolisme tijdens osteogene differentiatie in celkweek, en afwezigheid van glutamine in het medium of uitschakeling van GLS voorkomt osteogene differentiatie (14). Een nieuwe studie uit het laboratorium van prof. Geert Carmeliet aan de KU Leuven toont aan dat glutamine in osteoblasten nodig is voor nucleotide- en aminozuursynthese, om zo celgroei en matrixproductie te ondersteunen, alsook voor de productie van antioxidanten die oxidatieve stress en celdood voorkomen (15). Net als bij glycolyse neemt katabolisme van glutamine in osteoblasten toe als reactie op PTH

en WNT-signalering, waardoor een verhoogde botvorming metabool wordt ondersteund (15, 16).

DE UNIEKE MICRO-OMGEVING VAN KRAAKBEEN

Een tweede belangrijk celtype in het skelet is de chondrocyt, die het kraakbeen vormt dat onder meer wordt teruggevonden in de gewrichten, ribben, neus, luchtpijp en oren. Chondrocyten spelen ook een sleutelrol in botontwikkeling en breukherstel, waarbij een kraakbeentussenproduct wordt gevormd dat vervolgens wordt vervangen door bot (1).

Kraakbeen is een van de weinige niet-gevasculariseerde weefsels in het menselijk lichaam, wat voor unieke uitdagingen zorgt betreffende beschikbaarheid van voedingsstoffen en het afvoeren van afvalproducten. Diffusie is de belangrijkste vorm van verspreiding van metabolieten in de kraakbeenmatrix, die tot 80% water bevat, wat betekent dat kleine moleculen zoals glucose of aminozuren gemakkelijker beschikbaar zijn in vergelijking met grotere moleculen zoals vetten (10). De afwezigheid van bloedvaten in kraakbeen kan zeer zuurstofarme condities (hypoxie) creëren (17), wat leidt tot activatie van hypoxie-induceerbare factor 1α (HIF1 α). Activatie van HIF1 α bevordert de chondrogene differentiatie door verhoging van de belangrijke transcriptiefactor SOX9, verbetert de overleving van chondrocyten en ondersteunt anaerobe glycolyse door de transcriptie van de belangrijkste glycolytische enzymen te induceren. Glycolyse is het belangrijkste lot van glucose in kraakbeen, en chondrocyten genereren het merendeel van hun ATP (> 60%) via dit proces. Toch hebben ze ook glucoseoxidatie nodig om energieproblemen te voorkomen: overmatige HIF1 α -activatie in chondrocyten in muizen verlaagt glucoseoxidatie en leidt tot skeletdysplasie door de celdeling te verminderen en de biosynthese van collageen te verstoren (18).

In tegenstelling tot osteoblasten lijkt vetzuuroxidatie geen grote rol te spelen in het metabolisme van chondrocyten. Chondrocyten van muizen zijn niet afhankelijk van vetzuuroxidatie voor hun ontwikkeling of overleving, en overtollige vetten in de micro-omgeving van skeletale stamcellen verhinderen hun differentiatie naar chondrocyten, door de genexpressie van Sox9 te verminderen (10). SOX9 werkt op zijn beurt als een metabole regulator in chondrocyten door zowel vetzuuroxidatie te onderdrukken als glutaminemetabolisme te bevorderen. Glutamine wordt echter niet gebruikt door chondrocyten voor de productie van ATP, maar voor het ondersteunen van epigenetische regulatie, de aanmaak van biosynthetische tussenproducten voor celgroei en matrixproductie, en het genereren van antioxidanten (19).

Vetzuuroxidatie speelt een belangrijke rol in het energiemetabolisme van osteoblasten.

Chondrocyten vertonen dus metabole aanpassingen waardoor ze zich kunnen vermenigvuldigen en grote hoeveelheden matrix kunnen produceren onder een beperkte toevoer van voedingsstoffen (**Figuur 2**). Glucose en glutamine lijken de voorkeurssubstraten te zijn voor het metabolisme van chondrocyten die alleen afhankelijk zijn van diffusie, hoewel de bijdrage van andere kleine voedingsstoffen die door de unieke kraakbeenmatrix kunnen diffunderen, niet kan worden uitgesloten.

METABOLE INTERACTIES IN HET BEENMERG

In de beenmergholte worden nog twee andere skeletceltypen aangetroffen: mergadipocyten en hematopoëse-ondersteunende stromacellen (20, 21). Mergadipocyten – vetcellen in beenmerg – hebben unieke kenmerken in vergelijking met andere vetcellen in het lichaam, en dragen bij aan lokale en systemische metabole processen, waaronder bloedvorming, botvorming en energiemetabolisme. Verschillende onderzoeken hebben aangetoond aan dat mergadipocyten en osteoblasten zich ontwikkelen vanuit een gemeenschappelijke voorlopercel, wat aanleiding heeft gegeven tot het concept dat de vorming van vetcellen ten koste gaat van osteoblastdifferentiatie (20). Mergadipocyten produceren echter ook een groot aantal factoren die de osteoblastfunctie op zowel negatieve als positieve manieren kunnen beïnvloeden. Zo stimuleert PTH mergadipocyten om vetzuren vrij te zetten die vervolgens worden opgenomen door osteoblasten, wat aantoont dat de relatie tussen deze twee celtypen complex is (22).

Tijdens differentiatie naar vetcellen vertonen skeletale stamcellen een sterke toename van het oxidatieve metabolisme, gekenmerkt door verhoogde aanmaak van mitochondria, gestegen oxidatieve fosforylering en een toename van oxidatieve stress (23) (**Figuur 2**). In tegenstelling tot bij osteoblasten, waar zuurstofradicalen vooral schadelijk lijken, is een bepaalde hoeveelheid zuurstofradicalen vereist om differentiatie naar vetcellen in gang te zetten. De vetvoorraden die aangelegd worden tijdens deze differentiatie worden gegenereerd met behulp van zowel vetzuren opgenomen uit de micro-omgeving als van nieuw gesynthetiseerde vetzuren waarvoor voornamelijk glucose, maar ook acetaat, pyruvaat en glutamine als substraten gebruikt worden (24).

Glucose en glutamine lijken de voorkeurssubstraten in het metabolisme van chondrocyten.

Hematopoëse-ondersteunende stromacellen, ook wel beenmerg-stromacellen (BMSC's) genoemd, zijn een populatie van bindweefselcellen die essentiële groeifactoren leveren voor de werking van hematopoëtische stamcellen en de productie van bloedcellen (21). Recent ontdekkingen tonen aan dat BMSC's ook metabole ondersteuning

bieden aan bloedcellen en dat deze interacties een rol spelen in bloedkankers zoals leukemie. BMSC's scheiden bijvoorbeeld een heel aantal essentiële en niet-essentiële aminozuren uit, mogelijk om deze op een optimaal niveau te houden voor bloedvorming (25, 26). Naast metaboliëten kunnen BMSC's ook celorganellen overbrengen naar hematopoëtische cellen. Zo worden tijdens bacteriële infectie mitochondriën overgedragen van BMSC's naar hematopoëtische stamcellen. Dit proces zorgt voor een verschuiving van glycolyse naar oxidatieve fosforylering in de hematopoëtische stamcellen, gevolgd door snelle productie van witte bloedcellen (27). Een vergelijkbare mitochondriale overdracht vindt plaats tussen BMSC's en leukemiecellen, en speelt een rol in de bescherming van de leukemiecellen tegen chemotherapie (28).

Het belang van metabole interacties met stromacellen voor de groei van leukemie en de ontwikkeling van chemoresistentie wordt ook bevestigd door verschillende andere onderzoeken. Zhang et al. beschreven hoe BMSC's cystine importeren en omzetten tot cysteïne, dat vervolgens wordt afgegeven aan de micro-omgeving voor opname door leukemiecellen, die cysteïne nodig hebben voor antioxidantproductie om zo te overleven tijdens chemotherapie (29). Ons recent onderzoek toont aan dat BMSC's glutamine omzetten tot aspartaat, dat door leukemiecellen wordt gebruikt voor de aanmaak van nucleotiden en hen zo beschermt tegen celdood door chemotherapie (26). Leukemiecellen induceren ook mergadipocyten om vetzuren af te geven, wat de proliferatie en overleving van de leukemiecellen ondersteunt door hun vetzuuroxidatie van brandstof te voorzien (30). Het zal van belang zijn voor toekomstige studies om te onderzoeken welke precieze rol deze verschillende vormen van stromale metabole ondersteuning spelen tijdens normale bloedvorming.

INTERMEDIAIR METABOLISME EN VEROUDERING VAN SKELETCELLEN

Veroudering heeft grote gevolgen voor de functie van skeletcellen en is een belangrijke risicofactor voor de ontwikkeling van degeneratieve skeletaandoeningen zoals osteoporose en osteoartritis. Er zijn verschillende metabole veranderingen gevonden in verouderde skeletcellen die kunnen bijdragen aan het ontstaan en de voortgang van deze ziekten.

Een belangrijke verandering bij veroudering is een verschuiving in het differentiatiepotentieel van skeletale stamcellen, waarbij er verlies van osteoblastdifferentiatie optreedt ten koste van de vorming van vetcellen. Osteogene differentiatie van skeletale stamcellen afkomstig van

oudere personen wordt gekarakteriseerd door de aanwezigheid van mitochondria met een abnormale structuur, een lager zuurstofverbruik, verminderde ATP-synthese en verhoogde aanmaak van zuurstofradicalen (31). Verder neemt de activiteit van PGC1 α af met de leeftijd als reactie op genomische stress, wat eveneens invloed heeft op de differentiatie van skeletale stamcellen en de osteoblast-adipocytbalans in het beenmerg (9). Veroudering vermindert ook de activiteit van GLS, en dus het glutaminemetabolisme, waardoor de osteogene differentiatie van skeletale stamcellen verder wordt onderdrukt (32).

Een ander skeletweefsel waar veroudering een grote impact heeft, is gewrichtskraakbeen, waarbij leeftijd de belangrijkste risicofactor is voor het ontstaan van osteoarthritis. Net als bij verouderde osteoblasten wordt het metabolisme van osteoartritische chondrocyten gekenmerkt door een ontregeling van mitochondriale activiteit, geassocieerd met verhoogde productie van zuurstofradicalen, verminderde mitochondriale ATP-generatie en verhoogde glycolyse. Ontstekingsstimuli kunnen de metabole herprogrammering van articulaire chondrocyten verder versterken door de glycolyse te verhogen ten koste van oxidatieve fosforylering. In overeenstemming hiermee lijkt het corrigeren van de disfunctionele mitochondria een veelbelovende therapeutische strategie bij osteoarthritis (33).

Ook het vetzuurmetabolisme verandert in osteoarthritis. Overmatige inname van verzadigde vetzuren induceert kraakbeenafbraak en subchondrale botveranderingen bij ratten (34). Ons eerder onderzoek toont verder aan dat hoge niveaus van vetzuren in de micro-omgeving de chondrogene differentiatie van skeletale stamcellen kunnen verstoren door de activiteit van de transcriptiefactoren FOXO en SOX9 te onderdrukken (10). Zowel FOXO- als SOX9-niveaus zijn verlaagd in osteoarthritis, wat suggereert dat veranderingen in lokale vetzuurniveaus, mogelijk gekoppeld aan verhoogde ontsteking of bloedvatvorming, een rol kunnen spelen bij de voortgang van deze ziekte.

CONCLUSIE

De afgelopen vijf jaar is er een grote vooruitgang geboekt in het onderzoek naar de metabole regulatie van skeletcellen, gedreven door technologische ontwikkelingen en een hernieuwde interesse in intermediair metabolisme (35). Toch blijft het inzicht in de metabole programma's die de functie van skeletcellen beheersen beperkt. Net als in andere studiegebieden wordt het merendeel van de onderzoeken naar het metabolisme van skeletcellen uitgevoerd in celkweken en is er duidelijk behoefte aan meer validatie in vivo. Een methodologische vooruitgang die een beter begrip van het skeletcelmetabolisme mogelijk zou maken, is de ontwikkeling van protocollen voor het isoleren van cellen met behoud van hun metabool profiel, waardoor een directe metabole vergelijking van verschillende skeletceltypen mogelijk zou worden. In de hematologie en immunologie, waar cellen gemakkelijker toegankelijk zijn, hebben deze methoden een ongekend inzicht gegeven in de metabole programma's die het gedrag van cellen in hun natuurlijke omgeving controleren (26, 36). Andere technologieën, zoals massacytometrie, maken nu gelijktijdige analyse mogelijk van cellulaire identiteit en aanwezigheid van metabole enzymen op het individuele celniveau, terwijl continu verbeterende metabole beeldvormingsmethoden ruimtelijke informatie kunnen verschaffen op nanoschaal (37). Er wordt verwacht dat deze nieuwe technologische ontwikkelingen de komende jaren voor belangrijke ontdekkingen over het metabolisme van skeletcellen zullen zorgen.

Referenties op www.ortho-rheumato.be