

VU Research Portal

Mechanosensing and Chemical Signaling in Single Osteocytes

Vatsa, A.

2008

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Vatsa, A. (2008). *Mechanosensing and Chemical Signaling in Single Osteocytes*.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

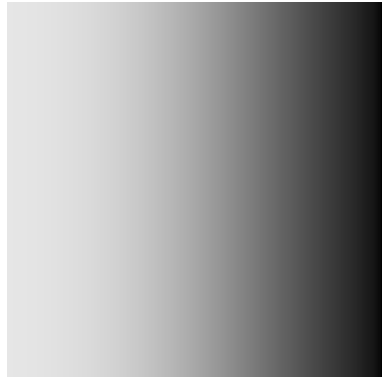
- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl



ALGEMENE SAMENVATTING

Ik heb mijn hart en ziel in mijn werk gestopt, maar verloor mijn verstand in het proces

~ Vincent Van Gogh

ALGEMENE SAMENVATTING

Botten zijn onderhevig aan variërende krachten tijdens dagelijkse activiteit. Zij adapteren hun botmassa en structuur, binnen fysiologische grenzen, aan de belastingscondities, om zodoende hun gewichtsdragende vermogen te optimaliseren. Osteocyten zijn de centrale cellen die deze biomechanische regulatie van botmassa en botstructuur aansturen, hetgeen tot stand wordt gebracht middels het proces van botremodellering. Botremodellering is een lokaal proces gekenmerkt door botresorptie door osteoclasten gevolgd door botvorming door osteoblasten. De activiteit van deze effectorcellen, osteoclasten en osteoblasten, wordt hoogstwaarschijnlijk gereguleerd door de mechanosensitieve osteocyten. De osteocyten vormen 90-95% van de totale botcelpopulatie in het volwassen dier. De cellichamen van de osteocyten bevinden zich in lacunae, die zich in de harde gemineraliseerde botmatrix bevinden. Uit elk cellichaam van een osteocyt ontspringen ongeveer 50-60 celuitlopers die straalsgewijs in alle richtingen door canaliculi lopen, om zodoende een intercellulair netwerk te vormen met de omringende osteocyten alsmede de cellen aan het botoppervlak en het beenmerg. Anatomisch gezien bevinden osteocyten in de botmatrix zich in een ideale positie om mechanische belasting op bot waar te nemen (*mechanosensatie*). Hoe de mechanosensitieve osteocyten de mechanische belasting op bot waarnemen en adaptieve veranderingen in botmassa en structuur tweebrengen is nog niet precies bekend. Het wordt echter algemeen aangenomen dat het mechanische signaal de door belasting geïnduceerde interstitiële vloeistofstroom langs de osteocyten is, die vervolgens signaalmoleculen produceren die de activiteit van de effectorcellen kunnen reguleren. Dit resulteert vervolgens in een optimale botmassa en structuur.

Ook al vervullen osteocyten een zeer belangrijke rol in het botremodelleringsproces, toch is er zeer weinig informatie beschikbaar omtrent de rol van afzonderlijke osteocyten in *mechanosensatie*, chemische signaalvoering, en dus botadaptatie.

De belemmering van onderzoek op het niveau van één enkele osteocyt heeft waarschijnlijk te maken met de anatomische positie van de osteocyten diep in de botmatrix, alsmede het uitdagende aspect van het mechanisch belasten en dan het meten van de biologische respons op het niveau van één enkele cel.

In dit proefschrift richten wij ons op de beantwoording van de volgende wetenschappelijke vragen:

1. Is het mogelijk om kwantitatief en online de stikstofoxide respons van één enkele osteocyt te meten op een gekwantificeerde, directe en gelokaliseerde mechanische belastingprikkel?
2. Welk deel van één enkele osteocyt is mechanosensitief, het cellichaam en/of de celuitlopers?

3. Kan één enkele mechanisch gestimuleerde osteocyt het mechanische signaal doorgeven aan de omliggende cellen, zowel in de aan- als afwezigheid van intercellulaire verbindingen?
4. Zijn de cellichamen van de osteocyten betrokken bij de directe *mechanosensatie* van matrix *strains* (vervorming)?
5. Is het externe belastingpatroon van bot bepalend voor de vorm van osteocyten en/of hun oriëntatie langs de lengteas?

Teneinde bovenstaande vragen te beantwoorden zijn we begonnen aan te tonen dat mechanische prikkeling van één enkele osteocyt leidt tot een toename van de intracellulaire stikstofoxide (NO) productie. NO wordt geproduceerd wanneer L-arginine wordt omgezet in L-citruline in de aanwezigheid van het enzym NO synthase, moleculaire zuurstof, NADPH, en andere co-factoren. In bot is aangetoond dat NO de activiteit van de botvormende osteoblasten en botresorberende osteoclasten moduleert, en dat het ook kan worden gebruikt als een marker om de mechanosensitiviteit van osteocyten te onderzoeken. NO is een klein, zeer reactief molecuul met een halfwaardetijd van minder dan 5 seconden, wat online NO detectie op het niveau van één enkele cel lastig maakt. Wij hebben het recent geïntroduceerde NO-gevoelige chromofoor DAR-4M AM gebruikt om aan te tonen dat het mogelijk is om online instantaan de NO productie in één enkele osteocyt te meten na een gekwantificeerde, directe en gelocaliseerde mechanische belasting, die werd toegediend middels *optical tweezers* en *microneedle* (hoofdstuk 3 en 4). We hebben deze nieuwe technieken, d.w.z. gekwantificeerde en gelocaliseerde mechanische belasting en het bepalen van de intracellulaire NO productie, toegepast om de rol van één enkele osteocyt in *mechanosensatie* en intercellulaire chemische signaalvoering nader te onderzoeken.

Botremodellering is een lokaal proces waar verschillende celgroepen bij betrokken zijn, die samenwerken in *basic multicellular units* (BMU). Voor een georkestreerde activiteit van deze cellen is het noodzakelijk dat de mechanosensatieve osteocyten de *mechanosensing* informatie communiceren met de effectorcellen in een BMU, de osteoblasten en osteoclasten. Zowel de directe intercellulaire signaalvoering als de indirecte extracellulaire signaalvoering dragen zeer waarschijnlijk bij aan de communicatie tussen de osteocyten en de effectorcellen. Mechanische stimulatie van één enkele osteocyt, zowel in een onderling verbonden netwerk van cellen als niet onderling verbonden, resulteerde in een toename van de intracellulaire NO productie in de gestimuleerde cell en in de omringende cellen (hoofdstuk 4 en 5). Deze intercellulaire communicatie was waarschijnlijk mogelijk door signaalmoleculen zoals calcium of 3'-5'-cyclisch adenosine monofosfaat, membraan-permeabele meervoudig onverzadigde vetzuren die bekend staan om hun vermogen NO productie te stimuleren, en ATP. Dit toont aan dat één enkele

osteocyt inderdaad de *mechanosensing* informatie kan doorgeven naar omringende cellen, zowel in de aan- als afwezigheid van intercellulaire verbindingen.

Gedurende de afgelopen decennia hebben gegevens verkregen uit theoretische modellering alsmede experimentele data geleid tot de algemene opvatting dat de osteocyten de mechanosensoren van bot zijn. Het mechanisme van *mechanosensing* door osteocyten is nog niet geheel duidelijk, maar er wordt verondersteld dat de osteocyten mechanisch worden geactiveerd door een vloeistofstroom als gevolg van *strain*. Volgens Han *et al.* (PNAS 2004) bezitten de celuitlopers van de osteocyten een uniek *strain*-amplificatie mechanisme, wat resulteert in de *mechanosensatie* van de belasting-geïnduceerde vloeistofstroom door de osteocyten. De berekende schuifkrachten op het cellichaam als gevolg van de vloeistofstroom worden echter te gering geacht om de osteocyten *in situ* mechanisch te activeren. In het algemeen relateert men dan ook niet het cellichaam van de osteocyt aan het proces van *mechanosensatie*. Bovendien is er weinig experimenteel bewijs voor de rol van het cellichaam van de osteocyt in *mechanosensatie*. Wij tonen aan dat zowel het cellichaam als de celuitlopers mechanosensitief zijn voor lokale, directe mechanische belasting (hoofdstuk 3).

Wij hebben een toename van de intracellulaire NO productie na mechanische belasting van de osteocyt cellichamen aangetoond, wat laat zien dat deze cellichamen in staat zijn tot integrine-gemedieerde *mechanosensing* na directe mechanische belasting (hoofdstuk 3). Deze waarneming was voor ons aanleiding om de hypothese te formuleren dat *in vivo* het cellichaam van de osteocyt betrokken is bij de directe *mechanosensatie* van matrix *strains* via het cytoskelet. Om deze hypothese te toetsen hebben wij *in situ* de 3D vorm en oriëntatie van de lengteas van osteocyten bepaald in twee typen bot, fibula en calvaria, die fysiologisch een verschillend belastingspatroon vertonen (hoofdstuk 6). Wij hebben de 3D vorm en de oriëntatie van de lengteas van individuele osteocyten onderzocht, omdat het bekend is dat externe mechanische krachten de structuur van het cytoskelet beïnvloeden, en dus de celvorm, en dat de cellen zich oriënteren in de richting van de *principle strains* ten gevolge van integrine-gemedieerde uitrekking van stress fibrillen. Door gebruik te maken van confocale laser scanning microscopie hebben wij aangetoond dat de oriëntatie van de lengteas van osteocyten in de fibula overeenkomt met de hoofdrichting van de mechanische belasting, terwijl de oriëntatie van de lengteas van osteocyten in de calvaria geen specifieke richting vertoont (hoofdstuk 6). Tevens heeft nano-CT scan analyse aangetoond dat de osteocyten lacunae in de volledige dikte van de fibula (bijna 1 mm) een parallelle oriëntatie vertonen ten opzichte van de hoofdrichting van de mechanische belasting, terwijl de oriëntatie van de osteocyten lacunae in de volledige dikte van de calvariae (eveneens bijna 1 mm) relatief willekeurig is. Dit verschil in oriëntatie kan worden toegeschreven aan de verschillende belastingspatronen in de twee botten. De fibula wordt voornamelijk in longitudinale richting belast, terwijl de calvaria radiaal wordt belast door de intracraniale druk. Dit is een aanwijzing dat osteocyt cellichamen mogelijk in staat zijn om externe mechanische

belasting waar te nemen en derhalve een oriëntatie aan te nemen die overeenkomt met deze belasting.

De 3D morfologie van individuele osteocyten heeft uitgewezen dat fibula osteocyten uitgestrekt en relatief plat zijn, terwijl calvaria osteocyten een rondere morfologie vertonen (hoofdstuk 6). *In vitro* studies met MLO-Y4 cellen hebben aangetoond dat ronde cellen vele malen mechanosensitiever zijn dan platte cellen. Fysiologisch wordt een calvaria veel minder mechanisch belast dan lange pijpbeenderen, wat zou kunnen verklaren waarom osteocyten in calvariae hun fysiologische functies zelfs in de aanwezigheid van zeer geringe mechanische belasting kunnen onderhouden, en dus mechanosensitiever zijn dan osteocyten in pijpbeenderen, die aan hogere mechanische belasting worden blootgesteld. De morfologie van osteocyten blijkt zich dus te adapteren aan de externe mechanische belasting en lijkt bovendien een belangrijke fysiologische rol te spelen in *mechanosensing* en botadaptatie.

Bovengenoemde hypothese dat directe *mechanosensatie* van matrix *strains* wordt uitgevoerd door de osteocyt cellichamen wordt verder onderbouwd door het feit dat in levende osteocyten *in situ* de interne organisatie van het actine cytoskelet gerelateerd is aan de hoofdrichting van de externe mechanische belasting (hoofdstuk 7). Bovendien werd paxilline eiwit voornamelijk aangetroffen in de “bovenste” en “onderste” polen van fibula osteocyten, terwijl dit eiwit gelijkmatig verdeeld was over de cellichamen van calvaria osteocyten. De lokalisatie van paxilline wordt vaak gebruikt om de verdeling van *focal adhesions* in mechanogevoelige cellen aan te tonen, en van paxilline is bekend dat het is gelokaliseerd in het *mechanosensing* deel van de cel. De “gepolariseerde” verdeling van paxilline in fibula osteocyten kan waarschijnlijk worden toegeschreven aan het longitudinale belastingpatroon in de fibula, en de gelijkmatige verdeling van paxilline in calvaria osteocyten aan het radiale belastingpatroon in de calvaria. Dit kenmerkende maar verschillende verdelingspatroon van mechanosensitieve *focal adhesions* in de cellichamen van fibula en calvaria osteocyten ondersteund de eerder geformuleerde hypothese dat osteocyt cellichamen betrokken zijn bij de directe *mechanosensing* van matrix *strains* via het cytoskelet.

In dit proefschrift tonen wij aan dat het mogelijk is om de NO respons van één enkele osteocyt kwantitatief en online te monitoren, na gekwantificeerde, directe en lokale mechanische stimulatie. *Mechanosensing* en chemische signaalvoering in response op mechanische belasting kan door één enkele osteocyt worden uitgevoerd. Een mechanisch gestimuleerde osteocyt kan de ontvangen mechanische prikkel doorgeven aan de omringende cellen. Deze intercellulaire communicatie wordt mogelijk gemaakt door signaal moleculen die zich zowel door de celuitlepers via intercellulaire verbindingen verspreiden, als extracellulair via oplosbare factoren. Onze resultaten suggereren dat zowel het cellichaam als de celuitlepers van de osteocyt betrokken zijn bij *mechanosensing*. Waarschijnlijk nemen de osteocyt cellichamen de botmatrix *strains* waar via hun cytoskelet, middels de *focal adhesions*, en passen zij hun morfologie en oriëntatie aan voor

Algemene samenvatting

een efficiënte draagkracht. Dit versterkt het algemeen geaccepteerde concept van de rol van osteocyten als mechanosensoren van bot, en benadrukt de mogelijkheid van een nieuw *mechanosensing* mechanisme in deze cellen. Concluderend kunnen we stellen dat één enkele osteocyt de capaciteit heeft om *mechanosensing* uit te voeren alsmede chemische signaalvoering in gang te zetten in respons op mechanische belasting.