

Fynd kan leda till skräddarsydda preparat

AUTOREFERAT Framtida hormoner-sättningspreparat kommer sannolikt att designas efter den enskilda individens behov. Kunskaper om hur dessa preparat påverkar parodontiet kommer därför att få stor betydelse. Studien har lett till grundläggande kunskaper om hur östrogen påverkar celler på proteinnivå.

Godkänt för publicering 7 september 2007



Daniel Jönsson
tandläkare, odont dr,
odontologiska fakul-
teten, avdelningen
för parodontologi,
Malmö högskola
E-post: daniel.
jonsson@mah.se

Flera studier har rapporterat ett samband mellan förändringar i serumkoncentrationerna av kvinnliga könshormon (bland annat östrogen) och förändrat parodontalt status.

För att undersöka detta samband har fästeför-luster hos postmenopausala kvinnor som inte tar respektive som tar hormonersättning mätts. Resultaten visar en något större fästeförlust hos kvinnor utan hormonersättning. I andra vävna-der i kroppen, till exempel i hjärna, mag-tarmka-nalen, leder och kärl, har östrogen rapporterats ha en inflammationsdämpande effekt.

Två östrogenreceptorer (ER) har identifierats, ER α respektive ER β . ER β upptäcktes så sent som 1996 men det saknas fortfarande konsensus kring dess biologiska betydelse. Forskning kring hor-monersättning, bröstcancer, osteoporos och kroniska inflammatoriska sjukdomar arbetar i dag med det gemensamma målet att ta fram så kallade SERMS; selective estrogen receptor modulators; på svenska, ER-subtyp-specifik farmaka.

Parodontalligament-celler (PDL-celler) är fi-broblaster i parodontiet som har osteoblastiska egenskaper. De är stationerade i parodontalli-

gamentet. Under påverkan av emaljprotein har PDL-celler rapporterats kunna differentiera till cementblastliknande celler men även tillbaka-bildas till en mer inflammatorisk celltyp. Tillbaka-bildningen sker under påverkan av interleukiner. PDL-cellers biologiska roll vid friskt alternativt sjukt parodontium är bristfälligt kartlagd.

SYFTE

Det övergripande syftet var att identifiera och karakterisera östrogenreceptorer och dess bio-logiska roll i humana PDL-celler.

De specifika målen var att undersöka:

- om PDL-celler uttrycker östrogenreceptorer, ER, och i så fall vilken subtyp,
- den subcellulära distributionen av ER och om den kan kopplas till östrogens funktionella me-kanismer,
- hur östrogen påverkar cellens fysiologiska egenskaper som DNA- och kollagensyntes och om dessa egenskaper kan kopplas till uttryck av ER-subtyp, samt
- hur bakterietoxinet LPS påverkar cellens in-flammatoriska respektive normala fysiologiska egenskaper och om östrogen påverkar cellernas svar på LPS.

Delarbete I

I det första delarbetet undersöktes om PDL-celler uttrycker östrogenreceptorer och i så fall vilken subtyp. PDL-celler fick växa ut från parodontal-ligamentet på tänder som extraherades av ort-odontiska skäl (figur 1).

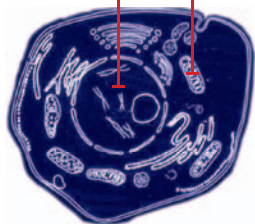
ER-uttrycket undersöktes med så kallad im-munocytokemi. Denna metod baseras på att en primär antikropp som är kodad för ER binder till receptorproteinet. En sekundär antikropp som är utrustad med en markör (här fluorescerande) binder till den primära antikroppen. Komplexet som består av ER, den primära antikroppen och den sekundära antikroppen kan nu studeras i ett mikroskop (fluorescenskonfokalmikroskop).

Resultaten visar att PDL-celler uttrycker östrogenreceptorer, nämligen ER. Uttrycket av östrogenreceptorer var som väntat starkt i cell-kärnan men vi kunde också se ett förvånansvärt starkt uttryck kring cellkärnan (figur 2a).

DISPUTATION

Den 5 juni 2007 försvarade Daniel Jönsson, avdelningen för parodontologi, odontologiska institutionen, Malmö högskola, avhandlingen »The biological role of the female sex hormone estrogen in the periodontium«. Fakultets-opponent var professor Anders Gustafsson, odontologiska institutionen, Karolinska institutet. Huvudhandledare var docent Bengt-Olof Nilsson, medicinska fakulteten, Lunds universitet och bihandledare var professor Gunilla Bratthall, odontologiska fakulteten, Malmö högskola.

Cellkärna
Mitokondrie





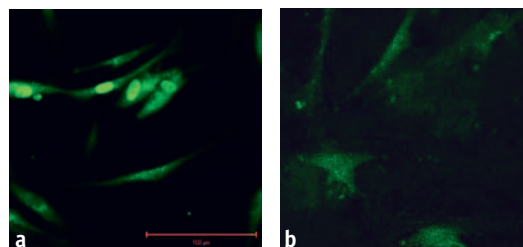
Figur 1. På tänder som extraherats av ortodontiska skäl skrapades parodontalligamentet av från mittersta tredjedelen av roten och vävnadsbitar (explants) odlades ut.

Delarbete II

År 2004 publicerades arbeten som rapporterade att ER inte enbart uttrycks i cellkärnan utan även i mitokondrierna. Detta skulle kunna förklara den immunreaktivitet för östrogenreceptorer som kunde påvisas kring cellkärnan i delarbete I. Förekomsten av mitokondriellt ER hade tidigare inte undersökts i så högt differentierade humana celler som PDL-celler. Syftet var därför att undersöka den subcellulära distributionen av ER och om den kan kopplas till östrogens funktionella mekanismer.

Även här använde vi oss av immunocyto kemi, dels tillsammans med MitoTracker® som färgar in mitokondrier, dels med immunoguld, där den sekundära antikroppen är kopplad till en guldpartikel som visualiseras i elektronmikroskop. Resultaten visade att mitokondrieinfärgningen (grön) och immunuttrycket av ER (röd) kunde lokaliseras tillsammans (gula pixlar) (figur 3). Fynden bekräftades med immunoguldelektronmikroskopi, där vi kunde se immunoguldfärgning i cellkärnan samt i mitokondrierna.

Varför är det intressant att östrogenreceptorer finns i mitokondrierna? I mitokondriematrix finns mitokondriellt DNA som kodar för proteiner som är aktiva i mitokondriell funktion som oxidativ fosforylering. Oxidativ fosforylering kallas den process i mitokondrierna där huvuddelen av cellens energi bildas i form av ATP. Vid oxidativ fosforylering förs vätejoner till intermembranutrymmet i mitokondrien med hjälp av elektrontransportkedjan. En viktig underenhet till det fjärde enzymet i elektrontransportkedjan, COX 1 (cytochrome c oxidase subunit 1) kodas av det mitokondriella genomet. En påverkan av detta pro-



Figur 2 a, b. a) visar positiv ER β immunofärgning i cellkärnan men även kring cellkärnan. b) visar infärgning för ER α som är negativ. Linjen motsvarar 100 μ m. (För positiv och negativ kontroll, se originalarbetet.)

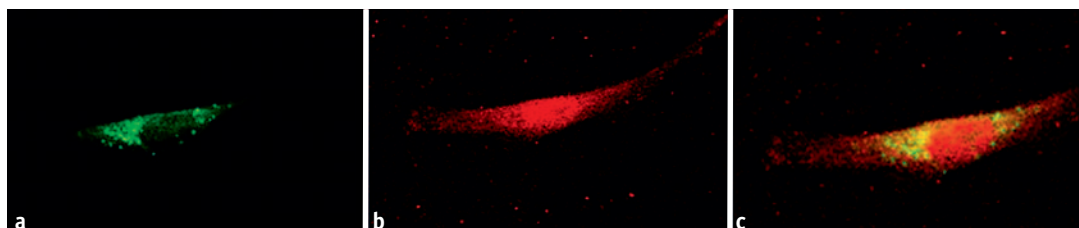
tein på östrogen skulle tyda på att mitokondriellt ER är aktivt vid mitokondriell transkription.

Genom att använda western blotting kvantifierades COX 1 på proteinnivå. Vi fann att östrogen hämmar mängden COX 1 med cirka 30 procent. Detta visar på förekomst av aktivt mitokondriellt ER samt antyder att östrogen skulle kunna hämma den oxidativa fosforyleringen i PDL-celler. Därmed skulle det kunna vara så att östrogen förbereder PDL-celler för en mer syrefattig miljö.

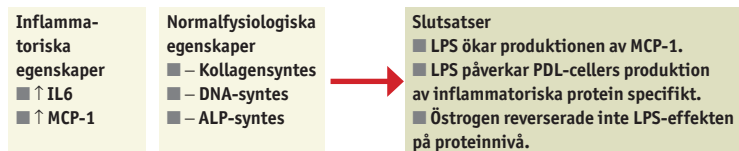
Delarbete III

PDL-cellers primära uppgift är att omsätta kollagen. Tidigare rapporter som behandlat östrogens inverkan på parodontiet har dragit slutsatsen att östrogens stimulerande effekt på kollagensyntes hos fibroblaster i huden direkt kan översättas till PDL-celler (fibroblaster i huden uttrycker både ER α och ER β till skillnad från PDL-celler). Tillväxten, proliferationen, av PDL-celler har betydelse för exempelvis parodontal regeneration.

Kollagen- och DNA-syntes i PDL-celler mättes under påverkan av östrogen. Metoden som an-



Figur 3 a-c. a) visar en MitoTracker®-infärgad PDL-cell. b) visar ER β -immunofärgning. c) är en overlay-bild där samlokalisering ses som gula pixlar.



Figur 4. LPS påverkan på PDL-celler. LPS ökade produktionen av IL-6 och MCP-1 men påverkade inte normala fysiologiska egenskaper. Samtliga parametrar mättes vid kort och lång tids behandling samt vid två koncentrationer LPS.

vändes var inkorporering av isotopmärkt proline och thymidine som binder in i kollagen respektive i DNA-kedjan. Radioaktivitet mättes och korrelerades mot mängden totalt protein i proven. Resultaten visade att östrogen inte påverkar kollagen- eller DNA-syntes i PDL-celler. Däremot ökade östrogen DNA-syntesen i specifika bröstcancer-celler (MCF-7 bröstcancer-celler) som uttrycker både ER α och ER β , vilket skulle kunna förklaras av det skilda östrogenreceptoruttrycket. I det tredje delarbetet gjordes även immunocytokeemiinfärgning för progesteronreceptorer som inte uttrycks i PDL-celler.

Delarbete IV

I det fjärde delarbetet undersöktes sambandet mellan inflammation och östrogen. Tidigare arbeten har visat att ER α medierar östrogens inflammationshämmande effekt via blockering av transkriptionsfaktor NF- κ B (NF- κ B: nuclear factor- κ B) transkriptionella aktivitet.

Andra studier har rapporterat att ER β -specifika agonister verkar inflammationshämmande. Eftersom PDL-celler framför allt uttrycker ER β var det av stort intresse att undersöka östrogens effekter på PDL-cellers produktion av inflammatoriska protein.

Som tidigare nämnts har PDL-celler visat sig

kunna tillbakabildas under påverkan av interleukiner. Det var därför intressant att undersöka hur bakterietoxinet LPS påverkar PDL-cellers normalfysiologiska egenskaper för att kunna upptäcka en eventuell tillbakabildning av cellerna.

PDL-celler odlades med LPS med eller utan östrogen. De inflammatoriska protein som mättes var CRP (c-reactive protein), MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) samt IL-6 som mättes med ELISA, en immunologisk metod att genomföra tester baserad på antigen-antikropps bindningar (ELISA; enzym linked immunosorbent assay). För att undersöka hur tillbakabildning av PDL-celler påverkas av LPS och östrogen undersökte vi även olika fysiologiska egenskaper hos PDL-celler, nämligen kollagen- och DNA-syntes samt alkaliskt fosfatas-aktivitet (ALP). Resultaten visade att LPS ökar produktionen av IL-6 och MCP-1.

Det har hittills inte publicerats några data som visar att PDL-celler producerar den viktiga chemokinen MCP-1 under LPS-stimulering. Hög fysiologisk koncentration av östrogen (100nM) reverserade inte LPS effekt på PDL-celler. LPS påverkade inte heller PDL-cellers normalfysiologiska egenskaper vilket tyder på att LPS effekt på PDL-celler specifikt påverkar produktionen av inflammatoriska protein (figur 4).

KONKLUSIONER

- PDL-celler uttrycker immunoreaktivitet för ER β men inte ER α , vilket tyder på att östrogens effekt i PDL-celler framför allt förmedlas via ER β (delarbete I).
- ER β uttrycks förutom i cellkärnan även i mitokondrier i PDL-celler (delarbete II).
- Östrogen nedreglerar det mitokondriella proteinet COX 1 och därmed skulle östrogen kunna hämma oxidativ fosforylering (delarbete II).
- PDL-celler uttrycker inte immunoreaktivitet för progesteronreceptorer, vilket tyder på att

TACK
 ► till laboratoriepersonal samt medförfattare, framför allt Malin Odenlund som tragiskt gick bort elva dagar efter min disputation, 32 år gammal.

DELARBETEN

- I. Jönsson D, Andersson G, Ekblad E, Liang M, Bratthall G, Nilsson B-O. Immunocytochemical demonstration of estrogen receptor β in human periodontal ligament cells. Arch Oral Biol 2004; 49 (1): 85–8.
- II. Jönsson D, Nilsson J, Odenlund M, Bratthall G, Broman

J, Ekblad E, Lydrup M-L, Nilsson B-O. Demonstration of mitochondrial oestrogen receptor β and oestrogen induced attenuation of cytochrome c oxidase subunit I expression in human periodontal ligament cells. Arch Oral Biol 2007; 52: 669–76.

III. Jönsson D, Wahlin Å, Idvall

I, Johnsson I, Bratthall G, Nilsson B-O. Differential effects of estrogen on DNA synthesis in human periodontal ligament and breast cancer cells. J Periodontal Res 2005; 40 (5): 401–6.

IV. Jönsson D, Nebel D, Bratthall G, Nilsson B-O. Effects of bacterial lipopolysaccharide and estrogen on human

periodontal ligament cells. Submitted.
 V. Jönsson D. The biological role of female sex hormone estrogen in the periodontium – studies on human periodontal ligament cells. Thesis. Swed Dent J Suppl 187, 2007.

Vetenskapliga artiklar fritt på nätet:

www.tandlakartidningen.se

**TANDLÄKAR
TIDNINGEN**

progesteron inte påverkar PDL-celler via dessa receptorer (delarbete III).

- Östrogen påverkar inte kollagen- eller DNA-syntesen i PDL-celler. Däremot ökar östrogen DNA-syntesen i MCF-7-bröstcancer celler som odlas med östrogen. Resultatet speglar sannolikt det skilda ER-uttrycket (delarbete III).

- LPS ökade produktionen av MCP-1 i PDL-celler, vilket påvisar att PDL-celler aktivt rekryterar leukocyter till parodontiet (delarbete IV).

- LPS ökade produktionen av inflammatoriska protein som IL-6 och MCP-1 men påverkade inte PDL-cellers fysiologiska egenskaper vilket tyder på att LPS effekt är specifik. Östrogen reverse-rade inte LPS effekt på PDL-celler på proteinnivå (delarbete IV).

VAD INNEBÄR FYNDEN?

Resultaten har lett till grundläggande kunskaper om vilken subtyp av östrogenreceptorer som uttrycks i PDL-celler samt var i cellen de uttrycks. Detta är av stor betydelse eftersom framtida hormonersättningspreparat sannolikt kommer att vara designade efter den enskilda individens behov. Därmed kommer kunskaper om hur dessa preparat påverkar parodontiet att vara av stor betydelse. Dessutom är det en intressant idé att se vilken effekt en lokal behandling av SERMS skulle ha i parodontiet. Den här avhandlingen är en systematisk kartläggning av hur östrogen påverkar PDL-celler på proteinnivå. I framtida projekt vill vi undersöka hur östrogen påverkar LPS-reglerade inflammatoriska protein på gennivå.

Fynd kan leda till skraddarsydda preparat

Opponenten har ordet

Daniel Jönsson har i sina studier undersökt uttryck och funktion av östrogenreceptorer (ER) i parodontalligamentceller (PDL). Detta är ett intressant område som inte tidigare har undersökts med moderna analysmetoder. PDL-cellens roll i övergången från en i huvudsak skyddande inflammation, gingivit, till en vävnadsnedbrytande parodontit är dåligt utforskad.

Daniel Jönssons avhandling består av fyra arbeten som beskriver en logisk utveckling i forskningen. Det första arbetet visar att det finns ER i PDL-celler och att de i huvudsak är den mindre studerade ER. Studie två undersökte den intercellulära lokaliseringen av ER. Studien visade att ER inte bara finns i cellkärnan utan också i mitokondrier. Fyndet antyder att östrogen skulle kunna ha ett inflytande på cellens energiproduktion.

Arbete tre och fyra är funktionella studier av PDL-cellen, både under fysiologiska och inflammatoriska förhållanden. Studierna visade att PDL-celler ökade produktionen av den proinflammatoriska cytokinen interleukin-6 och kemotraktanten MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) efter stimulering med LPS. Detta innebär att PDL-cellerna kan verka inflammationsdrivande samt att de aktivt kan rekrytera vita blodkroppar till det inflammerade parodontiet. Studierna kunde dock inte visa att östrogen hade någon inverkan på de här funktionerna hos PDL-cellen.

Daniel Jönsson har bedrivit mycket av sin forskning på institutionen för experimentell medicinsk vetenskap vid Lunds universitet. Detta har givit honom tillgång till avancerade analysmetoder och expertis inom området. Jag hoppas

att Daniel själv och odontologiska fakulteten i Malmö kan fortsätta med det samarbetet.

Daniel Jönssons frågeställningar och metodologi kunde med fördel appliceras på andra relevanta celltyper i parodontiet, till exempel monocyter och epitelceller. Det är troligt att uttrycket av östrogenreceptorerna ER α och ER β skiljer sig mellan olika celltyper. En sådan forskning skulle i förlängningen kunna leda till en behandling med ER-specifika preparat så kallade SERMS. Detta är ett mycket aktuellt forskningsområde när det gäller osteoporos, bröstcancer och kroniska inflammationer i andra delar av kroppen.

Daniel Jönsson är precis den typ av forskare som odontologin behöver. Daniel försöker besvara odontologiska frågeställningar med moderna basvetenskapliga metoder. Jag är övertygad om att Daniel genom sitt metodkunnande och engagemang kommer att lämna betydande bidrag till den odontologiska forskningen. ■



Anders Gustafsson
professor,
odontologiska
institutionen,
avdelningen
för parodontologi,
Karolinska institutet
E-post: Anders.
Gustafsson@ki.se



**Söker du dig själv?
Vi känner några
ungar i Kap Verde
som kan hjälpa dig
att leta.**



BARNfonden
www.barnfonden.se
90-konto pg901302-0
tel 040-121885