

Kariesgener och profylaktik på 2000-talet

Nicklas Strömberg och Ingegerd Johansson

■ ■ ■ Redan om några år kan tandvården använda sig av avancerad genteknik och en långt driven individualiserad profylaktik. Med ett DNA-chip stort som ett frimärke kan tandläkaren år 2010 snabbt ta reda på om patientens genuppsättning innehåller anlag för karies, parodontit och andra sjukdomar. Chipet kan också analysera sammansättningen av mikrofloran i munhålan. Med denna information kan tandläkaren individualisera behandlingen som också kan innefatta individuellt producerade läkemedel.

Nyckelord: karies, genom, DNA-chip, prevention

Författare

Nicklas Strömberg, professor, odont dr och **Ingegerd Johansson**, docent, odont dr. Institutionen för odontologi/Cariologi, Umeå universitet, Umeå.

Jakten på den "multifaktoriella" orsaken till karies har vi analyserat salivprotein för salivprotein, bakterie för bakterie, kostfaktor för kostfaktor, etc. Trots långa listor av potentiella salivproteiner, bakterier och kostfaktorer kan vi fortfarande inte ange vad som garanterar tandläkaren framgång i sitt arbete [1]. Patienternas problem hänförs därför ofta till generella faktorer som t ex brister i kost och munhygien.

Millenie- och paradigmskifte

På 2000-talet tacklas problemet annorlunda (fig 1). Istället för faktor-för-faktor analyseras all arvs-massa i en enda analys [2, 3]. Med DNA-chip rankas de för karies och parodontit mest betydelsefulla generna och utifrån dessa "sjukdomsgener" utvecklas diagnostik och läkemedel. Profylax och behandling skraddarsys sedan från individens uppsättning av sjukdomsgener [2].

I kartläggningen av genetiska orsaker till sjukdom kan vi komma att stöta på samband mellan tand- och folksjukdomar, som fetma, hjärt-kärlsjukdom och diabetes. Vid en närmare analys av involverade gener kan det också visa sig att olika

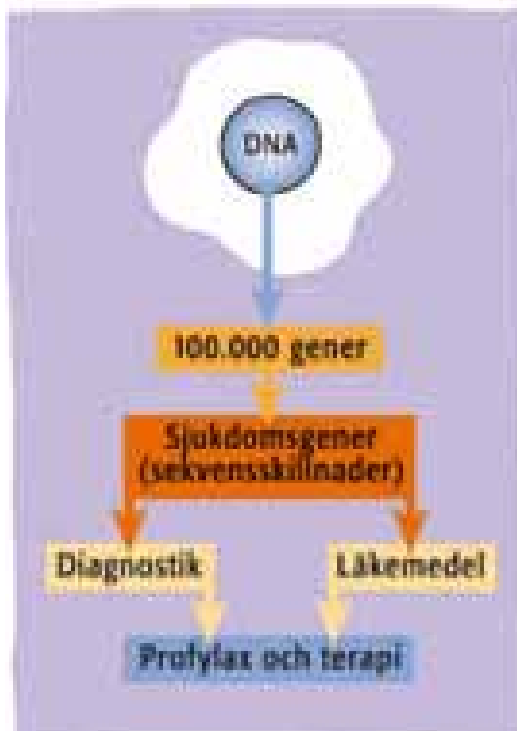
individer med samma sjukdom och symtom ska placeras i grupper med olika behandlingsstrategier.

Idag är det närmast så att "klinikerns kompetens" är den viktigaste faktorn vid bedömning av en patients risk att utveckla kariessjukdom [1]. Klinikerns sammanvägda bild av kariesskador, fis-suranatomi och övriga munförhållanden förutsä-ger framtida karies bättre än traditionella saliv-och bakterietest. Även om tandläkarna utifrån aktuellt antal diagnostiserade kariesangrepp är duktiga på att gissa antalet framtida kaviteter [4] är målet att riskgruppera patienterna innan symtomen på sjukdom blivit alltför tydliga.

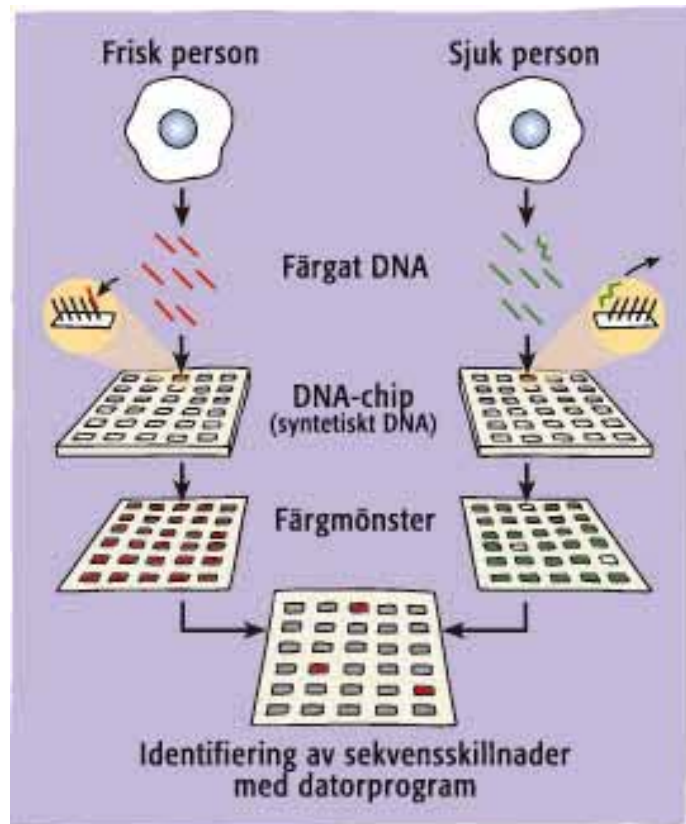
Hugoprojektet och DNA-chips

År 2003 beräknas de över 100 000 generna i männi-skans arvs massa vara kartlagda [Hugoprojektet; 2]. En del av dessa gener skiljer i bokstavskod (sekvens) mellan personer och kan vara orsak till olika sjukdomar (s k sjukdomsgener). Redan idag är cirka hälften av dessa gener tillgängliga i offentliga databaser.

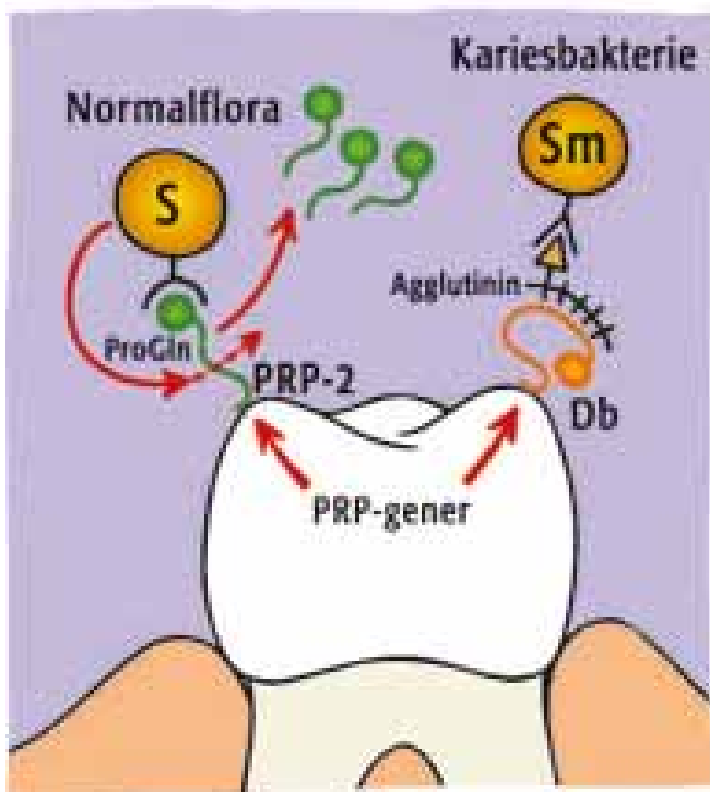
DNA-chip är en teknik för att identifiera sjukdomsgener (fig 2; [3]). DNA-chip har ett frimär-



Figur 1. Identifiering av sjukdomsgener för utveckling av ny profylax och terapi för tandsjukdomar. Kartläggningen av människans arvs massa (Hugoprojektet) möjliggör identifiering av sjukdomsgener, dvs gener som skiljer i bokstavskod (sekvens) mellan friska och sjuka personer. Kunskapen om sådana sjukdomsgener används i sin tur för att utveckla diagnostik och läkemedel för en individualiserad profylax och terapi.



Figur 2. Identifiering av sjukdomsgener med DNA-chip. DNA från friska och sjuka personer märks med var sin färg och binds till DNA-chip med syntetiska genkopior av människans arvs massa. Avvikelser i färgmönstren avslöjar gener med sekvensskillnader mellan friska och sjuka personer (s k sjukdomsgener).



Figur 3. Kariesgener kodar för salivproteiner som vidhåftar kariesbakterier. Hos personer med lite karies kodar specifika gener (*PRH1/PRH2*) för PRP-varianter (t ex PRP-2) som vidhåftar skyddande streptokock- och *Actinomyces*-arter ur normalfloran (S). Personer med mycket karies kännetecknas av Db-varianten (med 21 extra aminosyror) som vidhåftar kariesbakterier (*S mutans*; Sm), antingen direkt eller indirekt via *S mutans*-bindande agglutinin.

kes storlek och innehåller syntetiska DNA-kopior av människans arvs massa. Principen för DNA-chipets funktion är att det avläser skillnader i DNA-sekvensen mellan provet och syntetiskt DNA som finns bundet till chipets yta. När provet, märkt med färgämne, binds till de DNA-sekvenser som finns på chipet bildas ett färgmönster som kan avläsas optiskt och bearbetas av dator till en sammanställning över de gensekvenser som finns i provet.

DNA-chip kan också användas för att avläsa vilka gener som aktiveras i en cell (DNA→RNA→protein) och hur dessa gener svarar på olika faktorer, t ex hur en spottkörtelcell svarar på läkemedel eller metabola faktorer eller vilka gener som aktiveras i en och samma celltyp från en frisk respektive sjuk person. Principen är att cellens RNA färgmärks och sedan analyseras som vid identifiering av sjukdomsgener (fig 2). På detta sätt kartläggs sjukdomsmekanismerna ytterligare och man kan ana hur framtidens forskare arbetar med flöden av gener och deras samverkan snarare än med enskilda gener [3].

Inom ramen för Hugoprojektet kartläggs också bakteriers arvs massa. Detta möjliggör användningen av DNA-chip också för diagnostik av bakteriesamhällena i munnen. I framtiden kan alltså DNA i ett plack- eller salivprov bindas till ett chip med syntetiskt DNA specifikt för olika bakterier. Istället för tidskrävande renodlingar och jäsningsrader av oändliga rader av bakteriestammar överblickas då bakteriesamhällena i en enda analys.

Kariesgener kodar för bakteriebindande PRP-proteiner

Vi har identifierat två gener på kromosom 12 som tycks kunna förklara varför vissa personer är mer benägna än andra att utveckla kariessjukdom (fig 3; [5]). Dessa s k kariesgener (*PRH1/PRH2*) kodar för fem typer av ett PRP-protein som vidhåftar bakterier till salivfilmen på tandytan.

PRP-proteinet, som tillhör en av de i saliven rikligast förekommande proteinfamiljerna, har många olika funktioner. I proteinets ena ände finns negativt laddade aminosyror som växelverkar med kalcium och ansvarar för proteinets adsorption till hydroxiapatit och dess positiva effekt på re- och demineralisering. I proteinets andra ände finns två aminosyror, ProGln, som hos de flesta personer binder skyddande normalflorabakterier till tanden. Individuella skillnader i aminosyrasekvens i den bakterievidhäftande delen av PRP-proteinet kan emellertid leda till adhesion av olika bakterier.

En av de fem PRP-typerna, Db (med 21 extra aminosyror), är typisk för personer med mycket karies och stark vidhäftning av *S mutans* [5]. De andra PRP-typerna (PRP-2 etc) är typiska för personer med lite karies och stark vidhäftning av normalflorabakterier, som streptokocker och *Actinomyces*-arter.

Redan i slutsatsen av den s k Vipeholmsundersökningen står att läsa om genetiska skillnader som möjlig förklaring till att vissa personer aldrig utvecklade karies trots frekvent intag av toffeekarameller [6]. Tvillingstudier har visat att en-äggstvillingar utvecklar liknande mönster av kariessjukdom även när de växer upp under olika förhållanden [7]. Man har också lyckats avla fram rått- och musstammar som är benägna respektive obenägna att utveckla karies.

Kariesgener, medfödd immunitet och läkemedel

Då PRP-proteinet korrelerar med kariesbenägenhet kan det ha flera egenskaper relaterade till s k medfödd immunitet, dvs protein- eller cellfunktioner som reglerar bakteriekolonisationen på slemhinnor.

Utöver bakterieadhesion innehåller PRP-proteinet funktioner som aktiveras via spjälkning av proteinet med enzymer från den normala streptokockfloran (fig 4; [8]). Spjälkningen frigör en pentapeptid, ArgGlyArgProGln, som i laboratoriemiljö visar intressanta egenskaper; via ProGln-delen frisätter peptiden bundna *Actinomyces*-bakterier och via aminosyran Arg höjer den pH i plack. pH-höjningen är resultatet av att Arg metaboliseras till ammoniak av den normala streptokockfloran.

Både adhesion och det lokala pH-värdet är viktigt för att reglera biofilmens sammansättning av bakterier. Ett neutralt pH-värde gynnar normalfloras metabolism och växt, ett surt pH-värde gynnar kariesbakterier som mutanstreptokocker och laktobaciller.

Alltså, PRP-proteinet innehåller peptider med adhesionshämmande och pH-reglerande effekter och vilka aktiveras i symbios med normalfloran. Dessa peptider kan komma att utvecklas till läkemedel.

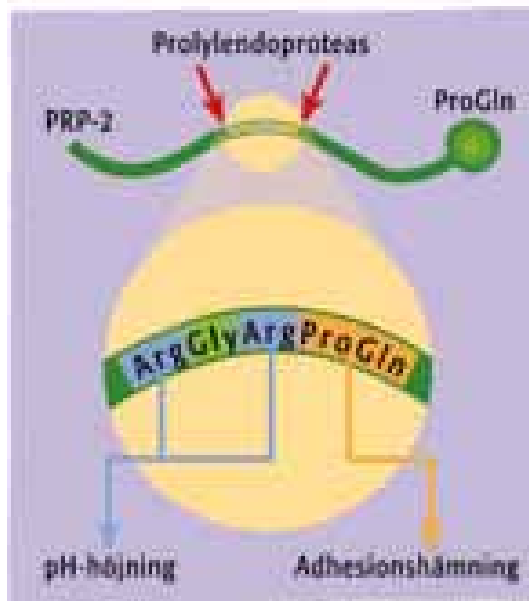
Biofilmer, adhesionstyper och cellulär mikrobiologi

Via adhesion, metabolism och signalering mellan bakterier skapas en biofilm av munbakterier (fig 5; [9, 10]). Medan antibiotika angriper bakteriens metabolism kan kunskap om adhesion och signalering möjliggöra nya sätt att motverka bakterieinfektioner (och resistensutveckling mot antibiotika).

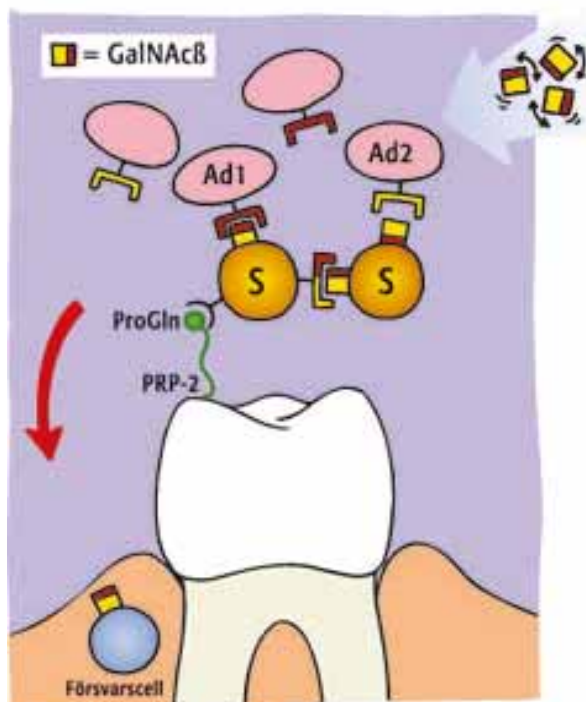
Adhesion mellan bakterier medieras av GalNAc β , som är en vanlig kolhydrat på ytan av plackbakterier och våra egna celler (fig 5). Vi har konstruerat syntetiska GalNAc β -strukturer i syfte att kontrollera bakteriekolonisation, och i kliniska försök visat att sådana adhesionshämmare kan påverka plackbildningen [10].

Utöver biofilmens artrikedom rymmer varje bakterieart flera adhesionstyper (fig 5; [10]). Vissa adhesionstyper skulle kunna favorisera uppkomsten av bakteriesamhällen med sjukdomsframkallande egenskaper respektive växelverka med slemhinne- och försvarsceller på ett sätt som leder till sjukdom.

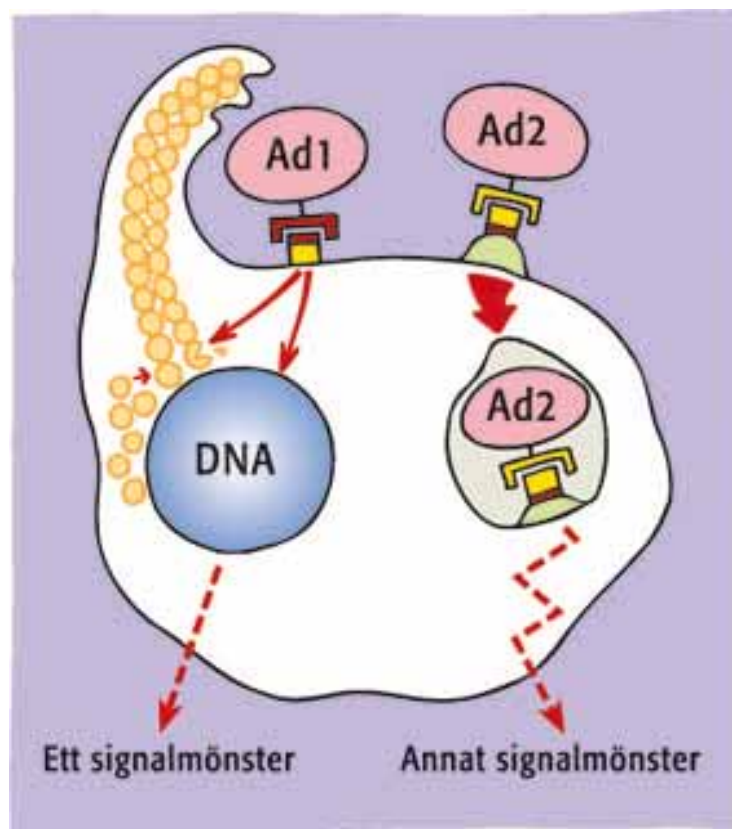
Bakterieadhesion kan nämligen orsaka en kaskad av händelser i slemhinne- och försvarscellerna (fig 6; [10, 11]). Exempelvis kan cellens skelett av aktinmolekyler påverkas så att bakterier tillåts passera in i cellen eller vävnaden. Bakterieadhesion leder också till signalmönster av cytokiner som antingen ökar eller minskar graden av inflammation. Denna forskning kallas cellulär mikrobiologi och möjliggör nya synsätt på inflammationssjukdomar som t ex parodontit och ulcerös kolit [11].



Figur 4. Läkemedelsliknande peptider från PRP-proteinet. Streptokocker i normalfloran bär ett enzym (prolylendoproteas) som spjälkar PRP-proteinet till pentapeptiden ArgGlyArgProGln med pH-höjande och adhesionshämmande egenskaper.



Figur 5. Plackbakterier binder till GalNAc β -strukturer i biofilmen. Många bakteriearter binder till sockerarten galaktosamin (GalNAc β) och inom en art finns flera adhesionstyper, dvs stammar (Ad1 och Ad2) som binder till olika delar av GalNAc β -molekylen (t ex röd eller gul sida). Denna molekyl finns också på ytan av slemhinne- och försvarsceller, varför plackbakterier också adhererar till dessa celler.



Figur 6. Adhesion påverkar slemhinne- och försvarscellers beteende beroende på bakteriens adhesionsstyp (Ad1 eller Ad2). Bakterieadhesion kan antingen förhindra försvarscellers fagocytos genom att påverka cellens skelett av aktinmolekyler eller dess genavläsning eller lura slemhinne- och försvarsceller till aktiv transport av bakterier in i cellen. De adhesionsstyper (Ad1 och Ad2) som binder till olika GalNAc β -innehållande molekyler på ytan av slemhinne- och försvarsceller kan aktivera olika sådana processer och leda till olika signalmönster.

Tand- och folksjukdomar – nya samband på 2000-talet ?

Potentiella samband mellan tand- och folksjukdomar, som t ex hjärt-kärlsjukdom, ägnas alltmer intresse [12]. Ateroskleros ("åderförkalkning"), som nu anses vara en kronisk inflammation och den viktigaste bakomliggande faktorn vid hjärt-kärlsjukdom, visar statistiska samband och överlappande signalmönster (cytokiner) med parodontit [12].

Vi har nyligen funnit att ett glykoprotein, s k agglutinin [5], som medierar adhesion och aggregering av *S mutans* i saliv är identiskt med proteiner som på makrofagers yta städar kroppen på "dåliga blodfetter". Även kariessjukdom kan därför komma att uppvisa samband med olika systemsjukdomar.

Ojämlighet i tandsjukdomar – 2000-talets utmaning ?

Idag är karies hos svenska tonåringar skevt fördelat med många friska och ett färre antal (cirka 10 %) sjuka (fig 7; [13]). I våra egna studier [5] av svenska tonåringar är idag bakterieadhesion (fig 3) starkare kopplad till kariesbenägenhet än traditionella markörer som t ex laktobacill- och mutanstal, sockerintag, munhygien och fluor. Vidare är vissa skyddsfaktorer i kosten starkare kopplade till karies än sockerintag och munhygien.

Dagens skeva kariesfördelning understryker behovet av individanpassad profylax och behandling och ett möjligt genomslag av genetiska faktorer i populationen. Gårdagens kariesbild med många sjuka medförde lika profylax till alla, t ex fluor-sköljningar. Därför saknas idag egentlig kunskap om hur personer med mycket respektive lite karies ska handläggas på ett optimalt sätt.

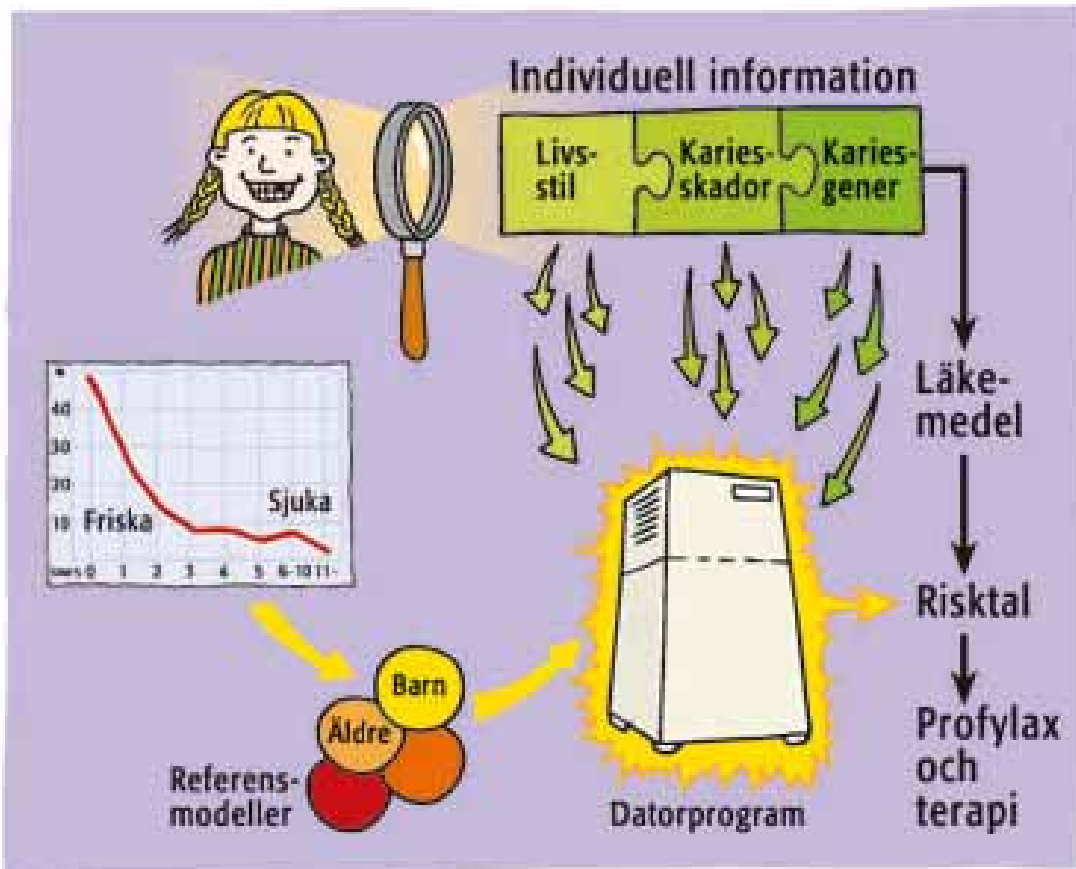
En utmaning för 2000-talet är att identifiera de genetiska och livsstilsberoende faktorer som betingar dagens kariesbild. En lika stor utmaning är att utforma individuellt anpassade och kostnads-effektiva program för profylax [14].

Kariesvaccin – realitet eller dröm?

Dagens sjukdomsbild med en mindre grupp med relativt grav karies eller parodontit accentuerar frågan om vaccin mot dessa sjukdomar. Idag finns metoder att skapa kraftiga och bestående antikroppssvar och med modern DNA-teknik kan man "klippa" bort eventuella biverkningar associerade med potentiella antigen.

Vaccineringen kan antingen bygga på stimulering av slemhinnans immunsystem eller lokal administration av antikroppar mot de sjukdomsframkallande mikroorganismerna. Antikroppar mot adhesionsmolekyler hos *S mutans* har nyligen producerats i tobaksplanter och visats kunna förhindra kolonisation av *S mutans* när de penslas på tandytor [15]. I framtiden kan därför antikroppar och antigen komma att administreras via födoämnen tillverkade med DNA-teknik, s k "functional food".

Det kvarstår emellertid att identifiera de grupper av bakterier som orsakar karies (och parodontit) för att effektivt förhindra sjukdom och inte bara vissa bakteriearters kolonisation. Bland dessa grupper av bakterier bör man sedan identifiera gemensamma antigen eller cocktails av olika antigen. Ytterligare en viktig aspekt är att utveckla förfinade metoder för diagnostik av tidiga sjukdomssymtom respektive individer med förhöjd sjukdomsbenägenhet. På så sätt kan vaccin riktas till de personer som med säkerhet behöver särskild behandling.



Figur 7. Diagnostik av riskindivider år 2010. Vid framtida tandläkarbesök kan information om livsstil, kariesskador och sjukdomsgener analyseras med nya metoder. Med kraftfulla datorprogram vägs informationen samman till exakta risktal för olika kategorier av patienter. Längre in i framtiden kan kunskapen om sjukdomsgener leda till en för individen skräddarsydd profylax och terapi.

Tidiga kariesskador och komplexa mönster av information

Att registrera tidiga kariesskador (eller parodontala skador) blir en viktig del av framtida strategier för individuella profylaxprogram. Idag utvecklas laser- och fluorescensmetoder för att i en sorts ögonblicksbild förstora upp kariesskador [16]. Med sådana "förstoringsglas" kan vi få en fullständigare bild av kariessymtomen medan de är reversibla och på ett kontrollerat sätt avläsa effekten av behandlingen.

Komplexa mönster av kariesskador och genetiska respektive livsstilsfaktorer måste också kunna överföras till exakta risktal. Idag finns kraftfulla matematiska metoder för att väga samman information ur komplexa datamönster som annars är omöjliga att tolka direkt [17]. Istället för sådana exakta och sammanvägda provvärden för flera faktorer har vi hittills använt förenklade gränsvärden för enstaka faktorer, t ex mutansmiljonär eller inte. På så sätt förloras en stor del av den möjliga informationen.

Framtida profylaktik – ett exempel år 2010

Ett tandläkarbesök år 2010 kan inledas med att en laserkamera läser av patientens kariesskador som överförs till ett datorprogram (fig 7). Via ett själv-illustrerande datorprogram informeras patienten om genetiska tester och efter dennes godkännande tas ett salivprov (med epitelceller) för analys av ett 15-tal gener. Analyser görs också av saliv- och mikrobiologiska, liksom av livsstilsberoende, faktorer som överförs till samma datorprogram.

Datorprogrammet väger samman den komplexa informationen till exakta risktal för karies och parodontit utan att information förloras. Utifrån informationen individualiseras profylax och terapi som sedan följs, t ex genom att laserkameran avläser patientens kariesbild.

I en något senare framtid kan profylax och terapi komma att individualiseras så att den exakt passar patientens uppsättning av sjukdomsgener. Kanske också att detta sker med hänsynstagande till patientens anlag för folksjukdomar som t ex

fetma, hjärt-kärlsjukdom och diabetes. Kanske påverkas också tandläkarens framtida yrkesroll.

English summary

Caries genes and prophylaxis in the 21st century

Nicklas Strömberg, Ingegerd Johansson

Tandläkartidningen 2000; 92 (2): 36–42

Advanced DNA techniques will in a few years find their use in preventive dentistry. Using DNA-chips (also called microarrays) about the size of a postage stamp, the dentist will in the year 2010 be able to rapidly tell if the patient's genome contains genes for caries, periodontitis and other diseases. The oral microbial communities may also be analysed using DNA-chips. Based on this information, the dentist will ultimately be able to provide individually designed preventive strategies and drugs.

Key words: caries, genome, DNA-chip, prevention

Referenser

1. Stamm JW, Disney JA, Beck JD, Weintraub JA, Stewart PW. The University of North Carolina caries risk assessment study: final results and some alternative modelling approaches. *In: Cariology for the nineties*. Bowen WH, Tabak LA, editors. Rochester NY: University of Rochester Press 1993, pp 209–34.
2. Collins FS. Shattuck lecture – medical and societal consequences of the human genome project. *N Engl J Med* 1999; 341: 28–37.
3. Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet* 1999; 21 (1 Suppl): 33–7.
4. Alanen P, Hurskainen K, Isokangas P, Pietila I, Levanen J, Saarni UM, Tiekso J. Clinician's ability to identify caries risk subjects. *Community Dent Oral Epidemiol* 1994; 22: 86–9.
5. Stenudd C. Role of polymorphism of salivary molecules for bacterial adhesion in host susceptibility and resistance to dental caries. Licentiate Dissertation, Umeå University 1999.
6. Gustavsson BE, Quensel C-E, Swenader-Lanke L, Lundqvist C, Grahnén H, Bonow BE, Krasse B. The Vipeholm dental caries study. The effect of different levels of carbohydrate intake on caries activity in 436 individuals observed for five years. *Acta Odontol Scand* 1954; 11: 232–364.
7. Conry JP, Messer LB, Boraas JC, Aeppli DP, Bouchard Jr TJ. Dental caries and treatment characteristics in human twins reared apart. *Arch Oral Biol* 1993; 38: 937–43.
8. Bratt P. Salivary proteins as potential modulators of oral microbial adhesion and ecology. Umeå University Odontological Dissertations, No 66, 1999.
9. Gibbons RJ. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *J Dent Res* 1989; 68: 750–60.
10. Strömberg N, Ahlfors S, Borén T, Bratt P, Hallberg K, Hammarström KJ, Holm C, Johansson I, Järvholm M, Kihlberg J, Li T, Ryberg M, Zand G. Anti-adhesion and diagnostic strategies for oro-intestinal bacterial pathogens. *Adv Exp Med Biol* 1996; 408: 9–24.

11. Cossart P, Boquet P, Normark S, Rappuoli R. Cellular microbiology emerging. *Science* 1996; 271: 315–6.
12. Meyer DH, Fives-Taylor PM. Oral pathogens: from dental plaque to cardiac disease. *Curr Opin Microbiol* 1998; 1: 88–95.
13. Flinck A, Källestål C, Holm A-K, Allebeck P, Wall S. Distribution of caries in 12-year old children in Sweden. Social and oral health related behavioural patterns. *Community Dent Health* 1999; 16: 160–5.
14. WHO (Socialdepartementet, Folkhälsoinstitutet, Socialstyrelsen, Nationella folkhälsokommittén). *Hälsa 21 – Hälsa för alla på 2000-talet*, 1999.
15. Ma JK, Hikmat BY, Wycoff K, Vine ND, Chargelegue D, Yu L, Hein MB, Lehner T. Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nature Med* 1998; 4: 601–6.
16. Angmar-Månsson BE, al Khateeb S, Tranaeus S. Caries diagnosis. *J Dent Educ* 1998; 62: 771–80.
17. Wold S, Sjöström M, Eriksson L. Partial least squares projections to latent structures (PLS) in chemistry. *In: Encyclopedia of computational chemistry*. von Ragué Schleyer P, editor. Chichester: John Wiley and Sons 1998; pp 2006–21.

Särskilt tack till Carina Källestål för kariesepidemiologiska data och Jens Sandros för samtal om cellulär mikrobiologi.

Illustrationer: Catharina Carlsson/Nicklas Strömberg.

Adress: Nicklas Strömberg, Medicinsk-odontologisk fakultet, Umeå universitet, 901 87 Umeå. nicklas.strömberg@odont.umu.se