

ULF H LERNER, professor, Oral cellbiologi, Umeå universitet, Umeå

## Skelettet i käkar och annorstädes

### En behård vävnad fylld av liv och rörelse både vid hälsa och sjukdom

#### 1. Benets fysiologiska uppbyggnad och omsättning

⊙ Denna översiktsartikel sammanfattar vad vi cellbiologiskt vet om de celler som bildar ben, *osteoblaster* och de som resorberar ben, *osteoklaster*.

Den moderna cellbiologin har kunnat visa att osteoblaster är en slags benvävnadens Dr Jekyll och Mr Hyde. De inte bara bildar ben utan kontrollerar även bildandet och aktiveringen av bennedbrytande osteoklaster. Även om man anat detta under de senaste 20 åren är det inte förrän under de allra senaste 3–4 åren som samspelet mellan osteoblaster och osteoklaster fått sin molekylära förklaring.

Med ytterligare molekylärbiologisk kunskap om specifika reglersystem för benresorption och benbildning kommer man att kunna utveckla nya läkemedel för behandling av patienter med sjukdomar som primärt eller sekundärt drabbar remodelering av skelettet.

REFERENTGRANSKAD. ACCEPTERAD FÖR PUBLICERING 4 APRIL 2004

Det är många av oss som när vi tittar på en röntgenbild och ser att marginala benkan- ten är sänkt eller upptäcker att det finns ett radiolucent område kring roten säger till patienten (eller kolleger) att benet är resorberat kring tanden. På samma sätt är det vanligt att röntgenologer, ortopedier och andra som tittar på röntgenbilder från patienter med misstanke om osteoporosjukdom säger till varandra att benet är ”urkalkat” när röntgen visar ett mindre opakt nätverk av kompakt eller trabekulärt ben. Hos samtliga dessa patienter beror röntgenbildens mindre radioopaka struktur, eller ökade radiolucens, på förlust av mineral.

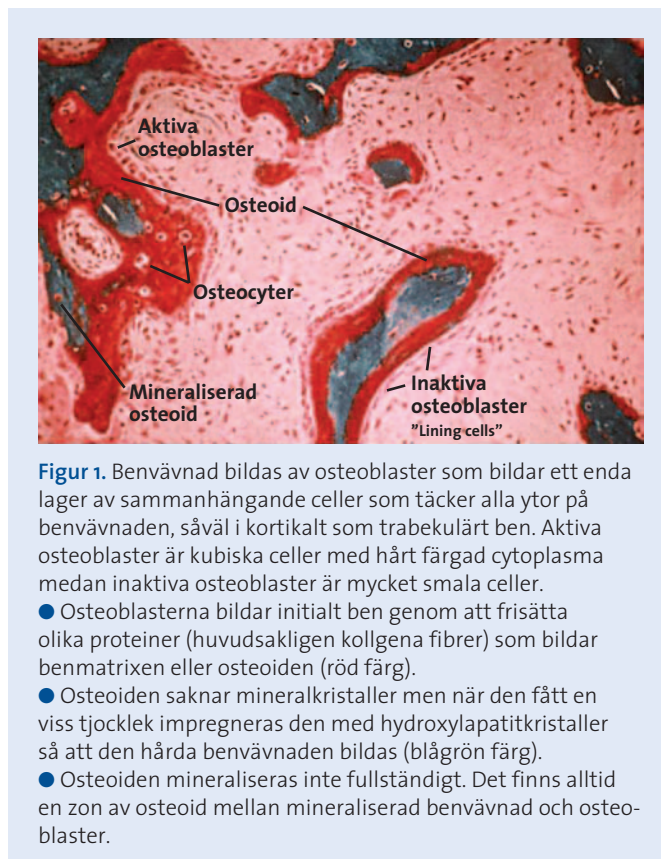
I denna översikt vill jag dock försöka förmedla dels att ett skelett aldrig enbart kan urkalkas vid patologiska tillstånd och dels att det inte bara är ökad nedbrytning av ben som äger rum vid sjukliga processer som parodontit, periapikal osteit, reumatoid artrit, periimplantit eller metastaser av maligna tumörer i skelettet. Vid dessa patologiska processer förekommer också ökad benbildning, det vill säga ökad remodelering.

När en död kropp har förruttnat återstår till slut bara skelettet. Detta faktum har lett till att många betraktar skelettet som en kroppsdel som är resistent mot biologiska processer och vars funktion hos oss ryggradsdjur endast är att vara armeringsjärn för att hålla oss upprätta och för att fästa muskler och senor på. Det är naturligtvis förståeligt att denna tanke uppkommer men i själva verket är den benvävnad som skelettet består av lika levande som alla andra vävnader i en levande kropp. Skelettet har celler vars liv och leverne regleras av gener, hormoner, omgivningsfaktorer och till och med av nervsystemet.

Det är min avsikt att översiktligt beskriva den kunskap vi har idag om benets biologi och att i en senare artikel redogöra för hur dess celler påverkas av sjukliga processer som inflammation, tumörer och osteoporosjukdom.

Den som drar sig till minnes tidigare kunskaper i benbiologi kommer att kunna konstatera att ett mycket stort dogmskifte har ägt rum, nämligen att de benbildande osteoplasterna inte enbart ägnar sig åt att bilda ben utan att det är dessa celler som också reglerar bildandet och aktivering av benresorberande osteoklaster. Jag kommer att ägna speciell uppmärksamhet åt att förklara de landvinningar under senaste 3–4 åren och som har lett till denna nya uppfattning.

Det är viktigt inte minst på grund av att kunskaperna redan har lett till utvecklande av nya läkemedel för antiresorptiv behandling. Kunskaperna har också lett till att man nu genetiskt och molekylärt kan förklara flera skelettsjukdomar, både sådana som leder till ökad bentäthet (*osteopetros*)



**Figur 1.** Benvävnad bildas av osteoblaster som bildar ett enda lager av sammanhängande celler som täcker alla ytor på benvävnaden, såväl i kortikalt som trabekulärt ben. Aktiva osteoblaster är kubiska celler med hårt färgad cytoplasma medan inaktiva osteoblaster är mycket smala celler.

- Osteoplasterna bildar initialt ben genom att frisätta olika proteiner (huvudsakligen kollagen fibrer) som bildar benmatrixen eller osteoiden (röd färg).
- Osteoiden saknar mineralkristaller men när den fått en viss tjocklek impregneras den med hydroxylapatitkristaller så att den hårda benvävnaden bildas (blågrön färg).
- Osteoiden mineraliseras inte fullständigt. Det finns alltid en zon av osteoid mellan mineraliserad benvävnad och osteoplaster.

och sådana som leder till minskad bentäthet generellt (*osteoporos*) eller lokalt (*osteolys*).

#### Benceller

Benvävnaden innehåller tre olika celltyper som tillsammans är ansvariga för den ständiga remodeleringen av skelettet med vilka skelettets form och benmassa (=mängden mineraliserad benvävnad) ständigt kan anpassas till olika fysiologiska krav. Förändringar av dessa cellers aktiviteter är också orsaken till att benvävnadens form och massa förändras vid vissa patologiska processer inuti eller i anslutning till skelettet; till exempel *parodontit*, *reumatoid artrit* och *osteoporos*.

*Osteoplaster* är de celler som bildar ben genom att syntetisera en icke mineraliserad matrix bestående av benproteiner som senare, genom osteoplasters kontroll, mineraliseras (Figur 1). Dessa celler förekommer som ett enda lager av celler som täcker all benvävnad, såväl kompakt som trabekulärt ben.

Osteoplaster är bindvävsceller och närmast släkt med *odontoplaster* i dentin och *cementoplaster* i cement men också med *fibroblast*er i slemhinnor och hud och de speciella fibroblastliknande rothinnecellerna. Osteoplaster kan också bildas

från primitiva stromaceller i benmärg; celler som också kan ge upphov till fettceller, muskelceller och broskceller beroende på vilka gener som för tillfället är aktiverade. Detta regleras av hormoner och andra signalsubstanser som i sin tur reglerar olika transkriptionsfaktorer inne i cellen. Dessa senare proteiner är ofta inaktiva i cellernas cytosol. Men när de aktiveras "vandrar" de från cytosolen in i kärnan (*translokation*) och binds där till startmotorer (*promotorer*) för olika gener (Figur 2).

Som en följd av att dessa transkriptionsfaktorer (*startnycklar*) passar till startmotorer för olika gener kommer specifika gener att aktiveras. Detta leder sedan till att budbärar-RNA syntetiseras (*transkription*) och tjänar som en mall eller kod för ribosomernas ihopkopplande av aminosyror till olika proteiner (*translation*). Som en följd av den ändrade uppsättningen av proteiner inne i cellen kommer cellens egenskaper (*fenotyp*) att förändras så att till exempel stromaceller kan bli osteoblaster eller fettceller beroende på vilka gener som är aktiva.

Forskning under senaste 20 åren har lett till att kunskapen om vilka proteiner som osteoblaster syntetiserar för att bilda benmatrix är relativt omfattande även om vår kunskap om vilka funktioner som dessa proteiner har är bristfällig. Vår kunskap om vilka transkriptionsfaktorer som styr benbildning är också bristfällig men under de senaste 3–4 åren har man funnit ett par sådana "startnycklar" som är kritiska för osteoblasternas bildande av skelettet.

*Osteocyter* är en bencell som förekommer inuti benvävnaden där de har hamnat genom att vissa osteoblaster inkorporeras in i benvävnaden under benbildningen. Det är en gåta hur det kommer sig att vissa osteoblaster fortsätter att bilda ben medan andra inkorporeras i hålrum inne i benet och omvandlas till osteocyter. Väl inne i dessa lakuner kan sedan osteocyterna inte förökas. De befinner sig som ändceller i en återvändsgränd som de inte kan lämna.

Till antalet är osteocyterna den dominerande bencellen men trots detta har vi ingen väl styrkt uppfattning om deras funktion. En intressant teori, för vilken det finns experimentell evidens, är att osteocyter fungerar som mekanoreceptorer som kan känna av olika grad av fysisk belastning på skelettet och sedan överföra detta till osteoblaster så att de bildar mer ben. Det är utanför ramen för denna översikt att närmare gå in på osteocyternas biologi.

*Osteoklaster* är den tredje bencellen och den cell som bryter ned, eller *resorberar*, ben. Med osteoklaster avses mångkärniga jätteceller som liksom osteoblaster förekommer på benvävnadens ytor om än i mycket mindre antal än osteoblaster. De är genom sin storlek och flerkärnighet mycket

lätt urskiljbara från enkärniga osteoblaster (Figur 3). Bildandet av dessa högspecialiserade jätteceller från enkärniga förstadier är en mycket komplicerad process som styrs av signalsubstanser, transkriptionsfaktorer och olika gener.

Intensiv forskning inom akademier och läkemedelsindustrin stimulerad av den ökade benresorption som ses vid stora folksjukdomar som osteoporos, cancer, reumatoid artrit och parodontit har lett till att vi i dag har en mycket mer detaljerad kunskap om cell- och molekylärbiologin i samband med osteoklaster än vi har för osteoblaster.

En fundamental skillnad mellan osteoblaster och osteoklaster är inte bara att osteoblaster bildar ben och osteoklaster bryter ned ben utan att osteoklaster är en typ av vit blodkropp (*leukocyt*), som därmed inte alls är släkt med osteoblaster och osteocyter, utan närmast med *monocyter/makrofager*. Kunskapen har haft stor betydelse på så sätt att patienter med defekter i osteoklaster har kunnat behandlas genom transplantation av benmärgsceller.

Avsikten med denna översikt är att sammanfatta vad vi cellbiologiskt vet om de celler som bildar ben, *osteoblaster*, och de som resorberar ben, *osteoklaster*. En fascinerande aspekt är att den moderna cellbiologin har kunnat visa att osteoblaster är en slags benvävnadens Dr Jekyll och Mr Hyde på så sätt att de inte bara bildar ben utan också kontrollerar bildande och aktivering av bennedbrytande osteoklaster. Även om vi anat detta under de senaste 20 åren är det inte förrän under de senaste 3–4 åren som samspelet fått sin molekylära förklaring.

### Osteoplastisk benbildning

Osteoblaster är celler som ligger som ett enda lager av celler närmast själva benvävnaden, såväl i *periostet*, som täcker det kortikala benets yttre begränsning som i *endostet*, som täcker såväl den inre ytan av kortikala benet som alla ytor av det trabekulära benet (Figur 1, 2). Detta gäller både för de ben som bildas via så kallad *enkondral benbildning* (Faktaruta 1) som de ben som bildas via så kallad *intramembranös benbildning* (Faktaruta 1).

Ett olöst problem är vad som skiljer osteoblaster som bildar kortikalt ben från dem som bildar trabekulärt ben. En annan intressant fråga som inte fått sin lösning är om det finns några skillnader mellan osteoblaster i ben som embryonalt bildats via enkondral benbildning jämfört med i ben som bildats intramembranöst. Styrts osteoblaster i dessa ben av olika hormoner och gener? Är osteoblaster i ben från skallen känsliga för mekanisk belastning? Frågorna är aktuella inte bara av akademiska skäl utan också i kliniska sammanhang framför allt i samband med bentransplantation.

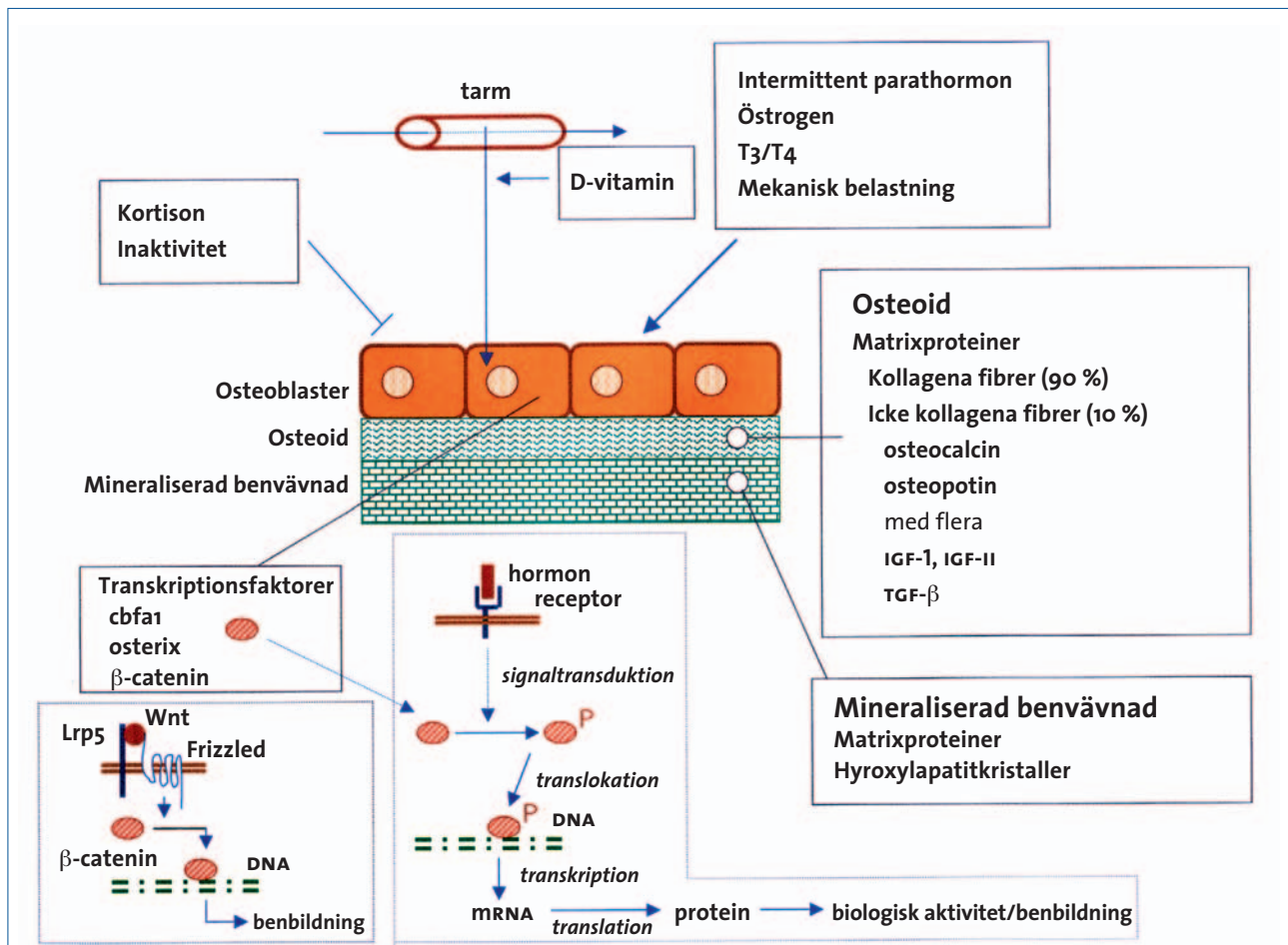
#### Faktaruta 1

##### Enkondral benbildning:

Långa rörben som embryonalt bildas först som broskben och senare ersätts med benvävnad.

##### Intramembranös benbildning:

Skallens platta ben som inte föregås av brosk utan bildas direkt i bindväven.



**Figur 2.** Benvävnad bildas av osteoblaster som en icke mineraliserad osteoid. Osteoiden består av matrixproteiner som senare impregneras med hydroxylapatitkristaller till den mineraliserade benvävnaden.

- Osteoplasternas benbildande aktivitet stimuleras av vissa hormoner och mekanisk belastning medan de hämmas av andra hormoner och fysisk inaktivitet.
- Förmågan att bilda hydroxylapatitkristaller är starkt beroende av tillgången på kalcium som regleras dels av födointaget och dels av D-vitamin som behövs för att kalcium ska kunna tas upp från tarmen till blodet. Brist på D-vitamin leder hos vuxna till ett dåligt mineraliserat skelett och så kallad osteomalaci eller rakitis (engelska sjukan) hos barn.
- Intracellulärt styrs benbildningen av transkriptionsfaktorer som i sin tur styrs av hormoner och andra signalsubstanser. De senare binds till specifika receptorer på osteoplasternas cellmembraner

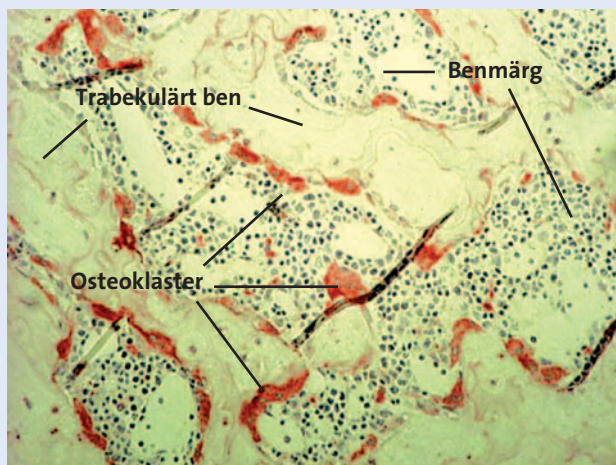
vilket resulterar i olika signalsystem inne i cellerna aktiveras.

- Många av signalsystemen fungerar så att de kopplar på fosfatgrupper på transkriptionsfaktorer som vandrar från cytosolen in i kärnan där de binds till promotorer, så kallade startmotorer i DNA. Därefter bildas mRNA (budbärar-RNA) genom transkription och en kopia av genen skapas som tjänar som mall för syntes av proteiner i ribosomer.
- Det protein som bildats deltar i benbildningsprocessen antingen genom att ingå i osteoiden eller genom att i sin tur reglera andra benbildande aktiviteter intracellulärt.
- Lrp5 är ett membranbundet protein som nyligen påvisats i osteoplasters cellmembran. När Lrp5 binds till proteinet Wnt aktiveras ett annat membranbundet protein som kallas Frizzled och som aktiverar signaltransduktion. Detta leder till aktivering av transkriptionsfaktorn β-catenin som sedan aktiverar hittills ej identifierade gener som är inblandade i benbildning. Ju mer aktivt detta system är desto större benmassa bildas.

Även om osteoblaster har många släktdrag med fibroblaster i hud och slemhinnor är en fundamental skillnad att osteoblaster bildar ben i en enda riktning (*polariserat*). Till skillnad från fibroblaster bildar de alltså inte matrix runt omkring sig (*pericellulärt*). Benvävnadens matrix, nätverket av olika extracellulära matrixproteiner, har stora likheter med matrix i hud och slemhinna eftersom det huvudsakligen består av kollagena fibrer av typ I.

Benets matrix består till 90 procent av sådana fibrer. Resterande 10 procent består av så kallade *icke kollagena proteiner* (alltså inga fibrer). Det är en familj av proteiner vars medlemmar utökas för varje år genom upptäckten av nya benmatrixproteiner (Figur 2). Dessa proteiner är egentligen kemiskt inte medlemmar av samma familj eftersom många av dem uppvisar stora strukturella skillnader.

Proteinerna har framför allt upptäckts av bioke-



**Figur 3.** Benvävnaden resorberas av flerkärniga jätteceller som kallas osteokläster. De bildas av enkärniga celler i periost eller endost i kortikalt eller trabekulärt ben. De enkärniga prekursorcellerna har hematopoetiskt ursprung i benmärg eller mjälte, men den färdiga osteoklasten bildas endast längs benytorna. Osteoklasterna är rödfärgade i cytoplasman på grund av att de innehåller stora mängder av ett enzym (*tartratresistent surt fosfat*) som här har påvisats med hjälp av en teknik som gör att det kan observeras som en röd färg. Bilden har ställts till förfogande av docent Sven Sjögren, Astra-Zeneca, Mölndal.

mister genom allt mer förfinade system att rena proteiner från extrakt av ben. Vilken funktion de icke kollagena proteinerna har är i stort okänt. Men vi börjar förstå att många av dem binds dels till varandra, dels till kollagena fibrer och dels till celler. På så sätt bildas ett sammanhängande nätverk mellan matrix, olika proteiner och benets celler.

Ett mycket oväntat fynd är att matrixen i benet innehåller stora mängder av tillväxtfaktorer som insulinliknande tillväxtfaktorer (IGF-I, IGF-II) och *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Varför deponerar osteoblaster sådana signalsubstanser inne i den mineraliserade vävnaden frågade sig alla benbiologer initialt? De har ingen betydelse för benvävnadens struktur men det har visat sig att de kommer till användning den dag benet remodeleras.

En speciell egenskap hos osteoblaster som de delar med odontoblaster och cementoblaster är att kunna mineralisera matrixen till en hård vävnad som *ben*, *dentin* eller *cement*. Hårdheten beror på att det i matrixen inkorporerats kristaller av hydroxylapatit.

- Hur kommer det sig att dessa hydroxylapatitkristaller enbart bildas i benets, dentinets och cementets matrix och inte i andra bindvävsmatix?

- Vad är det som gör att vi inte omvandlas till saltstoder?

Man kan ju till exempel tänka sig att det kan bero på de proteiner som bildar den så kallade icke kollagena proteinfamiljen. Vissa av dessa proteiner skulle alltså bidra till förkalkning medan andra kanske har motsatt effekt? Närmast till hands att tro är att osteoblaster skiljer sig från fibroblaster genom att kunna bilda vissa typer av benspecifika proteiner och genom att kunna kontrollera bildandet av kristallerna.

När det gäller icke kollagena proteiner i ben är det dock ganska få som har visat sig vara benspecifika. Till dessa hör *osteokalcin*, ett protein vars funktion är okänd men som har stor klinisk betydelse eftersom koncentrationen av osteokalcin i serum är en mycket god indikator på graden av benbildning i skelettet. Ännu har ingen kunnat förklara mineraliseringsprocessen med hjälp av icke kollagena benspecifika proteiner. Men utesluter inte att de kan ha en sådan roll.

Finns det då några proteiner inne i osteoblaster som skulle kunna förklara varför de kan deponera hydroxylapatitkristaller i benvävnadens matrix? Ja, det protein som mest har associerats till mineralisering är enzymet *alkaliskt fosfat*. Redan på 1920-talet visades att osteoblaster bildar ovanligt stora mängder av en variant av detta enzym som ibland kallas *ben-specifikt alkaliskt fosfat* och ibland *TNAP* (*tissue non-specific alkaline phosphatase*). Som det senare namnet antyder finns det andra celler som också kan bilda enzymet. Ju mer benbildande osteoblaster är, desto mer finns det av detta enzym inne i cellerna. Denna kunskap används idag kliniskt på så sätt att mängden av detta enzym i serum (i likhet med osteokalcin) generellt sett är en bra markör på benbildningshastigheten i skelettet.

Att enzymet verkligen har en kritisk roll har Jose Luis Millan och hans tidigare forskningsgrupp i Umeå, delvis i samarbete med vår egen, kunnat visa eftersom osteoblasters förmåga att mineralisera ben är kraftigt nedsatt när genen för detta enzym slagits ut hos möss med hjälp av modern molekylärgenetisk teknik. Enzymets betydelse visas också genom att patienter med mutationer i genen för enzymet får defekt bildning av skelett och tänder.

Vad har då enzymet för roll?

Det finns två huvuduppfattningar:

- 1) Den ena teorin gör gällande att enzymet fungerar som en producent av fosfatjoner, vilka behövs för att bilda hydroxylapatitkristaller (som består av kalcium, fosfat och hydroxyljoner).

11) Den andra uppfattningen gör gällande att enzymets roll är att degradera pyrofosfat, en substans som finns överallt i bindväven för att förhindra saltstods bildning, men som kan degraderas av osteoblaster så att mineralisering kan ske.

Den senare uppfattningen baseras på en teori att det finns överskott av kalcium och fosfat i all bindväv så att kristaller skulle bildas men att det är pyrofosfatet som förhindrar detta.

I områden där mineralisering sker kan man ofta med hjälp av elektronmikroskopi påvisa intracellulära små vesiklar som är omgivna av membran. Dessa vesiklar frisätts så småningom ut i den extracellulära matrixen.

Det finns en del data som tyder på att kristallbildningen initieras av vesiklarna. När de sedan frisätts och kristallen vuxit sig tillräckligt stor brister vesikeln extracellulärt. Vesiklarna skulle alltså enligt denna uppfattning fungera som lokal ackumulator av kalcium och fosfat för att möjliggöra att hydroxylapatitkristallen faller ut. När väl detta skett kan kristallerna växa sig större även extracellulärt.

Trots att mineralisering är en så fundamental process i bildandet av ben (dentin, cement och emalj) är kunskaperna om mekanismerna för hur det kommer sig att hydroxylapatitkristaller faller ut i benmatrix i stort sett obefintliga.

Sammanfattningsvis bildas benvävnaden av osteoblaster som först bildar en matrix som framför allt innehåller kollagen fibrer men också en mängd andra proteiner med i stort sett okänd funktion.

Osteoblasterna deponerar sedan en stor mängd hydroxylapatitkristaller i den matrix de bildat.

#### Faktorer som styr benbildning

I likhet med alla andra celler regleras osteoblasternas aktivitet med hjälp av signalsubstanser som finns runt omkring cellen och som sedan med hjälp av ett signalöverföringssystem inne i celler åstadkommer effekter genom att slå på och av olika gener. Dessa signalsubstanser är dels sådana som cirkulerar i blodet, *hormoner*, och dels sådana som bildas lokalt i vävnaden, till exempel *cytokiner*, *tillväxtfaktorer* och *prostata glandiner*. Det allra senaste är att nervsystemet också med hjälp av sina signalsubstanser kan påverka osteoblaster.

Det finns inget hormon som är specifikt för osteoblaster; det vill säga det finns inget unikt benbildningshormon. Flera hormoner har dock visat sig ha effekter. Till dessa hör D-vitamin (eller egentligen den till hormon omvandlade metaboliten

1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub>), *parathormon* (PTH), *köns-hormoner*, *tyroideahormon* och *kortison*. Förändringar av nivåerna av dessa hormoner kan ge upphov till osteoporotiska tillstånd, så kallade *sekundär osteoporos* och *osteomalaci* (normal mängd ben med dålig mineraliseringsgrad). 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> är kanske det hormon som har störst betydelse för den fysiologiska benbildningen. Det verkar framför allt indirekt genom att det är nödvändigt för upptag av kalcium i tarmen så att benmatrix kan mineraliseras (Figur 2). Det finns också receptorer för 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> i osteoblaster men dessa har störst betydelse för resorption av ben.

För att bilda och mineralisera ben är det nödvändigt att tillföra mängder mängder av D-vitamin och kalcium via födan. I Sverige är det mycket sällsynt att det inte sker med hjälp av normal kost. Men det finns en stor fara för att det håller på att förändras på grund av den allt större konsumtionen av snabbmat och coca-cola.

*Parathormon* som benbildningsstimulator är den senaste behandlingsmetoden för osteoporos. Det är den enda metod som hittills inriktar sig på att skapa mer ben. Övriga terapier riktar sig huvudsakligen mot att minska ytterligare nedbrytning. Eftersom parathormon är det mest välkända resorptionsstimulerande hormonet var denna behandlingsform mycket ifrågasatt initialt. Hormonet bildas vid brist på kalcium i blodet för att frisätta kalcium från skelettet.

Metoden bygger på kunskapen om att det finns receptorer för parathormon i osteoblaster. Något som varit känt cirka 20 år men som kopplats till dess förmåga att stimulera osteoklaster. Om receptorerna aktiveras genom en kontinuerligt förhöjd nivå av parathormon stimuleras resorptionen. Men om receptorerna i stället aktiveras genom dagliga injektioner av parathormon bildar osteoblaster mer ben i stället för att stimulera osteoklaster. Hur detta går till molekylärt vet man ännu inte. Men det fungerar såväl på försöksdjur som på människor och introduceras nu världen över som behandling mot osteoporos.

Fysisk belastning har också stor betydelse för reglering av mängden benvävnad. Det illustreras särskilt tydligt av att tennisspelare har mycket högre benmassa i racketarmen. Liknande benmasseförhöjande effekt har påvisats också inom andra sporter. Inaktivitet leder omvänt till en minskning av benmassa som orsakar dramatiska förluster av benvävnaden hos till exempel viktlösa astronauter. Patienter som blir långvarigt sängliggande drabbas också av förluster av benmassa.

Hur förändrad belastning registreras av bencellerna och överförs molekylärt till

## Faktaruta 2

### Polymorfismer "Felstavningar"

Variationer i den genetiska kod som finns i de databaser som genererats genom den världsomfattande kartläggningen av det mänskliga genomet.

reglering av benbildande gener är en olöst gåta. För närvarande arbetar en del forskargrupper med hypotesen att osteocyterna spelar en kritisk roll för registrering av belastning via så kallade mekanoreceptorer.

#### Gener som reglerar osteoplasternas benbildande aktivitet

Den delvis resultatlösa jakten på signalsubstanter som kan reglera benbildning via aktivering av receptorer på osteoblaster har skapat nya strategier för att hitta reglerande signaler. Detta har nyligen lett till upptäckten av ett helt nytt signalsystem av stor betydelse för benbildning. Genom klassiskt genetiska studier har man kunnat beräkna att benmassans storlek till 60–70 procent bestäms genetiskt. Ett sätt att studera genomets betydelse är att i stora kohortstudier av friska och sjuka individer undersöka hur *polymorfismer* ("felstavningar", Faktaruta 2) är kopplade till exempelvis hög eller låg benmassa, eller osteoporosjukdom.

Dessa studier har kunnat associera många så kallade "*single nucleotide polymorphisms*" till benmassa. Men eftersom benmassan är polygenetiskt betingad kommer inte dessa studier att kunna ge en fullständig bild innan alla polymorfismer i olika populationer i världen har sekvenserats och deras inbördes kopplingar kartlagts. Detta pågår för närvarande som ett stort globalt projekt som påminner om HUGO-projektet vilket initialt kartlade genomet i sin helhet.

Genom att studera familjer till patienter som visat sig ha en osedvanligt hög bentäthet har man kunnat lokalisera en region på kromosom 11q, 13 (kromosom 11:s långa arm, band 13) som misstänkt ställe. Så småningom har man visat att den höga bentätheten var kopplad till en enda mutation för genen kodande för "*lipoprotein receptor-related protein 5*" (Lrp5). Det är en mutation som leder till att aminosyran *glycin* i position 171 är utbytt mot *valin*. Lrp5 förekommer i de flesta cellers cellmembraner och signalerar tillsammans med lösliga proteiner som kallas *Wnt* in till celler med hjälp av ytterligare ett signalöverförande protein som kallas *Frizzled* (Figur 2).

Denna signalering leder till aktivering av transkriptionsfaktorn *β-catenin* som i sin tur, på något hittills okänt sätt, reglerar benbildning. *Wnt* är en gen som är nära besläktad med bananflugans gen *Wingless* som reglerar utvecklingen av vingarna hos flugan. Att Lrp5/*Wnt*/*Frizzled*-systemet är betydelsefullt för benbildning är nog en av de största överraskningarna hittills inom benbiologin. Mutationen i Lrp5 får till följd att Lrp5 blir överaktiv och signalerar kontinuerligt, så kallad "*gain-of-function*"-mutation. Det betyder att Lrp5 ständigt

är bunden till *Wnt*/*Frizzled* i stället för att denna bindning slås av och på för att reglera aktiveringen av *β-catenin* allt efter "behov". Samtidigt som mutationens betydelse för hög benmassa upptäcktes fann en annan forskargrupp genom ett helt osannolikt sammanträffande i tiden att patienter med syndromet *osteoporosis-pseudoglioma syndrome* (OPPG) har så kallad "*loss-of-function*"-mutation i just Lrp5-genen.

Patienterna har som ett av flera symtom även låg benmassa vilket ju ytterligare styrker betydelsen av detta signalsystem för benbildning. Senare har man genom att manipulera genomet för Lrp5 och introducerat de olika mutationerna som finns hos människa i möss ytterligare kunnat stärka evidensen för den nära kopplingen mellan Lrp5/*Wnt*/*Frizzled*-signalering och benmassa.

En annan teknik för att förstå geners betydelse för benbildning är att på inavlade möss försöka hitta gener som är associerade till hög benmassa. Ett antal regioner på olika kromosomer har lokaliserats och på American Society for Bone and Mineral Researchs möte i september 2003 rapporterades att genen för enzymet *12/15-lipoxygenase* är en gen associerad till ökad benbildning. Motsvarande strategier används också i ett svenskt forskningsprojekt på höns med hög benmassa.

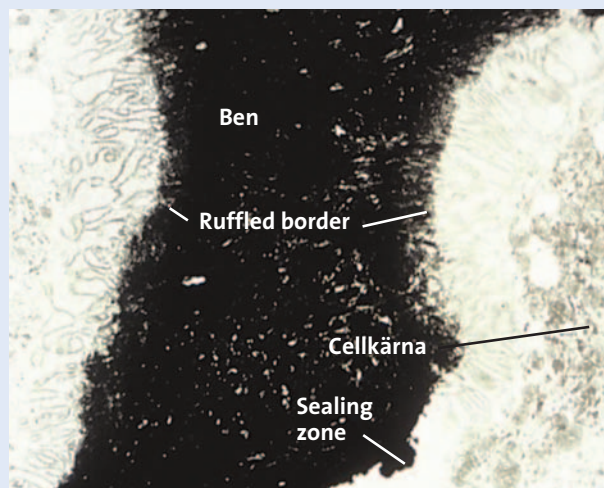
Andra forskargrupper har letat efter proteiner som förekommer intracellulärt i osteoblaster och som specifikt kontrollerar dessa cellers benbildande förmåga. De har funnit två transkriptionsfaktorer (startmotorer för gener) som är helt avgörande för bildande av skelettet (Figur 2). Möss som saknar båda generna för transkriptionsfaktorn *core binding factor 1a* (*cbfa1*) kan embryonalt inte bilda någon benvävnad över huvud taget. De bildar ett normalt "broskskelett" men de kan inte omvandla detta via så kallad endokondral benbildning till benvävnad. De bildar inte heller ben i skallen via så kallad intramembranös benbildning och dör därför strax efter födelsen. Om mössen saknar den ena genen för *cbfa1* kan de bilda ett defekt skelett med förändringar som påminner om de som patienter med *Cleidocranialis dysostosis* har. Det har också visat sig att dessa patienter har mutationer just i genen för *cbfa1*. En annan transkriptionsfaktor som är nödvändig för bildanden av benvävnad är *osterix*.

Avsikten med studier är inte enbart att kunna förstå genetiken bakom benbildning utan att leta efter mekanismer och molekyler som kan användas som mål för behandling. Det blir möjligt när man kartlagt i detalj hur de olika proteiner som dessa gener kodar för deltar i osteoplasternas benbildande aktivitet.

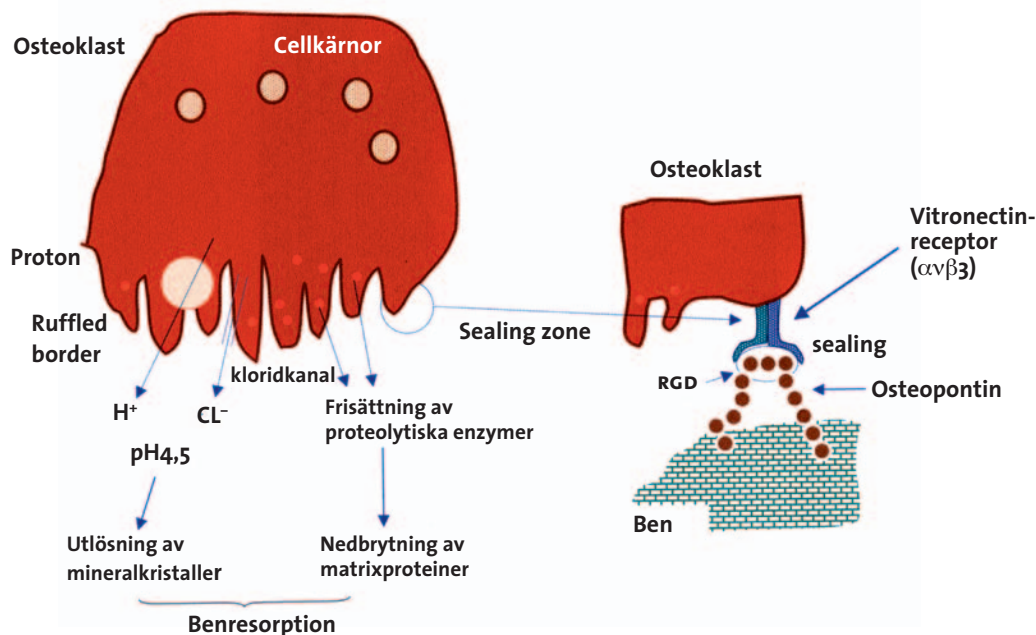
### Benresorption med hjälp av osteoklaster

Osteoklaster är den enda cell som hittills visats kunna bryta ned ben. Dessa celler är lätt identifierbara i mikroskop eftersom de är så kallade jätteceller med många kärnor och endast förekommer på benytorna, insprängda här och var mellan osteoblaster. De "suger fast" i benet genom att speciella vidhäftningsmolekyler, så kallade *integriner*, uttrycks på osteoklasternas cellmembran i den så kallade "sealing zone" (Figur 4). Integrinerna binds till en struktur om tre aminosyror (RGD) i benmatrixproteinet *osteopontin* (pons=brygga). Detta leder sedan till att osteoklasten blir polariserad och ombildar cellmembranet i ett starkt veckat "ruffled border" innanför "sealing zone" (Figur 4, 5). Det är i detta så kallade ruffled border som resorptionsprocessen äger rum inte genom att osteoklasten "äter upp" (fagocyterar) benet utan genom att den löser upp benvävnadens beståndsdelar.

- Resorptionsprocessen startas på så sätt att osteoklasten frisätter protoner ( $H^+$ ) genom att en protonpump anrikas i cellmembranet i ruffled border (Figur 5).



**Figur 4.** Här ses delar av två osteoklaster i en elektromikroskopisk bild som resorberar benvävnaden från två håll. Benvävnaden är mycket tunn och består av *os parietale* från en nyfödd mus. Det mycket speciella cellmembran, *ruffled border*, som osteoklasten utvecklar i resorptionszonen syns tydligt i båda cellerna. Vidhäftningszonen, *sealing zone*, känns lätt igen eftersom den ser strukturlös ut (kallas därför ibland för *clear zone*). Även delar av några cellkärnor kan observeras. Bilden har ställts till förfogande av professor Åke Larsson, oral patologi, Tandläkarhögskolan, Malmö.



**Figur 5.** Benvävnaden kan endast brytas ner eller resorberas av osteoklaster; mångkärniga jätteceller som i den del av cellen som utövar resorptionsprocessen är polariserad med ett veckat cellmembran kallat *ruffled border*.

- I membranet finns en protonpump med vars hjälp osteoklasten pumpar ut protoner och en kloridkanal genom vilken kloridjoner passerar. Som en följd av detta sänks pH i resorptionslakunen till cirka 4,5 och hydroxylapatitkristallerna löses upp. Parallellt frisätter osteoklasten proteolytiska enzymer i lakunen. Dessa bryter ner matrixproteinerna.
- Resorptionsprocessen består av både mineralutlösning och matrixnedbrytning; det vill säga all benvävnad försvinner. Det låga pH:t i resorptionslakunen upprätthålls genom att osteoklasten suger fast, adhearerar till, benvävnaden med hjälp av *sealing zone*. "Klistret" består molekylärt av en bindning mellan så kallade vitronectinreceptorer som sticker ut från cellmembranet i *sealing zone* och som binds till de tre aminosyror arginin (R), glycin (G) och asparaginsyra (D) i matrixproteinet osteopontin.

- Protonerna genereras intracellulärt från vätebikarbonat med hjälp av enzymet *karbanhydras II*.
- Parallellt med frisättningen av protoner läcker kloridjoner ut i resorptionslakunen.
- Det låga pH på cirka 4,5 som skapats ute i lakunen får till följd att hydroxylapatitkristallerna löses upp, det vill säga benmatrixen urkalkas.
- För att resorbera den återstående matrixen frisätts en cocktail av proteolytiska enzymer som degraderar kollagena fibrer och övriga proteiner. Detta innebär att när benet resorberas försvinner inte enbart mineral utan all benvävnad.

Det finns ingen biologisk mekanism med vilken skelettet enbart kan urkalkas. Om en patient har förlorat radioopakt ben på röntgen är således inte skelettet urkalkat. Det har försvunnit. Observera dock att det finns situationer då osteoblaster har nedsatt förmåga att mineralisera matrixen, så kallad *osteomalaci*, vilket ju också leder till mindre radioopakt ben.

Det pågår för närvarande en intensiv forskning, framför allt inom läkemedelsindustrin men även vid vår egen avdelning, för att kartlägga vilka enzymer som är involverade vid matrixdegradation. Flera cysteinproteaser och matrix metalloproteaser har visats vara betydelsefulla. Det är troligt att inhibitorer av osteoklastspecifika enzymer kan komma att bli intressanta verktyg för farmakologisk intervention vid omfattande bennedbrytning. Detta gäller också för inhibitorer vid protonpumpen och inhibitorer av vidhäftningsmekanismen. Redan i dag testas inhibitorer av enzymet *katepsin  $\kappa$*  i olika modellsystem.

#### *Bildning av osteoklaster*

De stora flerkärniga osteoklasterna bildas genom att enkärniga prekursorceller slår sig samman. Längre trodde man att prekursorceller var osteoblaster och att dessa celler alltså ändrade sin tillvaro då och då från att vara benbildande till att vara bennedbrytande. Genom bland annat pionjärarbeten i Sverige under 1970-talet av patologen Jan Ericsson och ortopederna Gustav Göthlin vid Sabbatsbergs sjukhus kunde man visa att osteoklasternas förstadier cirkulerar i blod och att de kommer från blodbildande vävnader (*benmärg, lever, mjälte*). På senare tid har man kunnat visa att osteoklastprekursorerna är mycket nära släkt med prekursorer som ska bilda makrofager. Det inne-

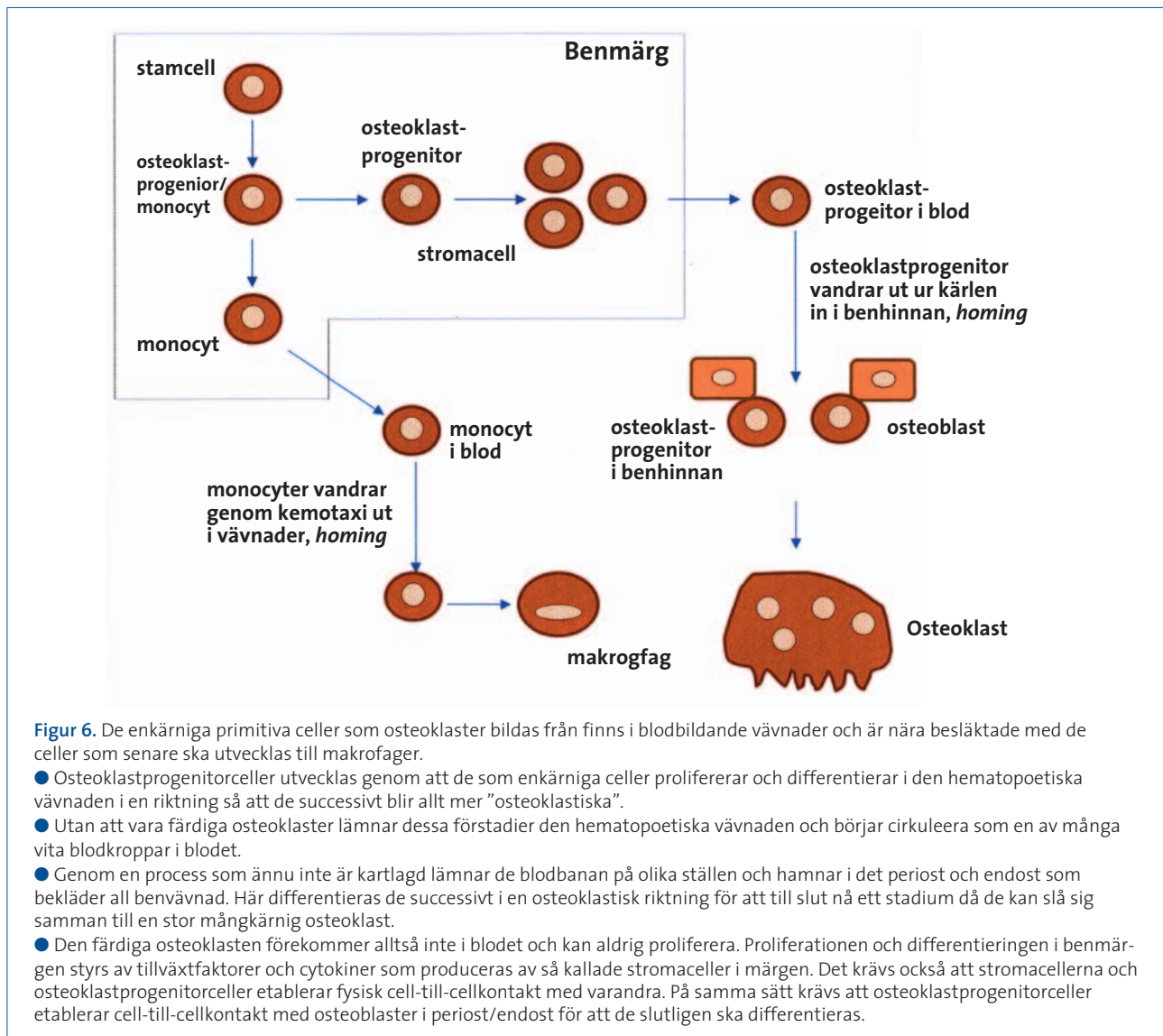
bär att osteoklaster är *leukocyter*. Cirka 0,5 procent av leukocyterna i blod består av osteoklastprekursorer.

Osteoklasterna bildas genom att stamceller i benmärgen differentieras till förstadier som är gemensamma för osteoklaster och makrofager (Figur 6). Under ett visst skede i dessa cellers utveckling får de signaler som gör att de antingen kommer att få egenskaper (det vill säga aktivera gener) som gör att de utvecklas mot osteoklaster eller andra egenskaper som leder till utveckling mot monocyter. Sedan kommer dessa celler att vandra ut i blodkärl och cirkulera som monocyter (förstadier till makrofager) eller osteoklastprogenitorer.

Exakt vad som skiljer dessa celler åt i cirkulationen vet vi ännu inte och det finns inga markörer med vilka vi säkert kan särskilja dem åt. Vid de ställen i skelettet som ska remodeleras, eller vid patologiska processer som är förenade med ökad benresorption, vandrar osteoklastprogenitorceller ut ur blodkärlen med en så kallad "*homing-process*" som är helt okänd men som sannolikt påminner om de mer välkända för andra leukocyter, inklusive monocyter (Figur 6). På så sätt hamnar osteoklastprekursorer ute i periost och endost. Här får de ytterligare information (signalsubstanser) från celler i omgivningen, det vill säga osteoblaster, så att de differentieras till ett stadium då de fusioneras till flerkärniga vilande osteoklaster. Dessa celler påverkas sedan ytterligare så att de kan fästa till benytan, polariseras och resorbera ben.

Det faktum att osteoklaster är en typ av vit blodkropp innebär bland annat att de är celler med stor förmåga att röra på sig. De utnyttjar denna egenskap när de förflyttar sig utmed benytan för att när resorptionsprocessen avslutats på ett ställe flytta sig till ett nytt resorptionsställe. Det behövs därför inte så många osteoklaster för att bryta ned ben i ett område.

Det finns patienter med genetiska defekter som leder till att de inte kan bilda osteoklaster. Det finns andra patienter som visserligen bildar flerkärniga osteoklaster men dessa celler kan inte aktiveras. Oavsett om patienterna har mindre antal osteoklaster eller mindre funktionella osteoklaster blir resultatet detsamma, nämligen att ben ackumuleras i skelettet och de får så kallat "*mar-morben*" eller *osteopetros*. Om den genetiska defekten är lokaliserad i osteoklaster eller deras prekursorer och inte i omgivande celler (stromaceller eller osteoblaster) vars signaler också är nödvändiga för osteoklastutveckling kan patienter med *osteopetros* behandlas med benmärgstransplantation. Metodiken har ännu inte optimerats. Därmed är lyckandefrekvensen tyvärr begränsad. Men med hjälp av den allt mer förfinade molekylära kunskapen kommer detta snart att förbättras.

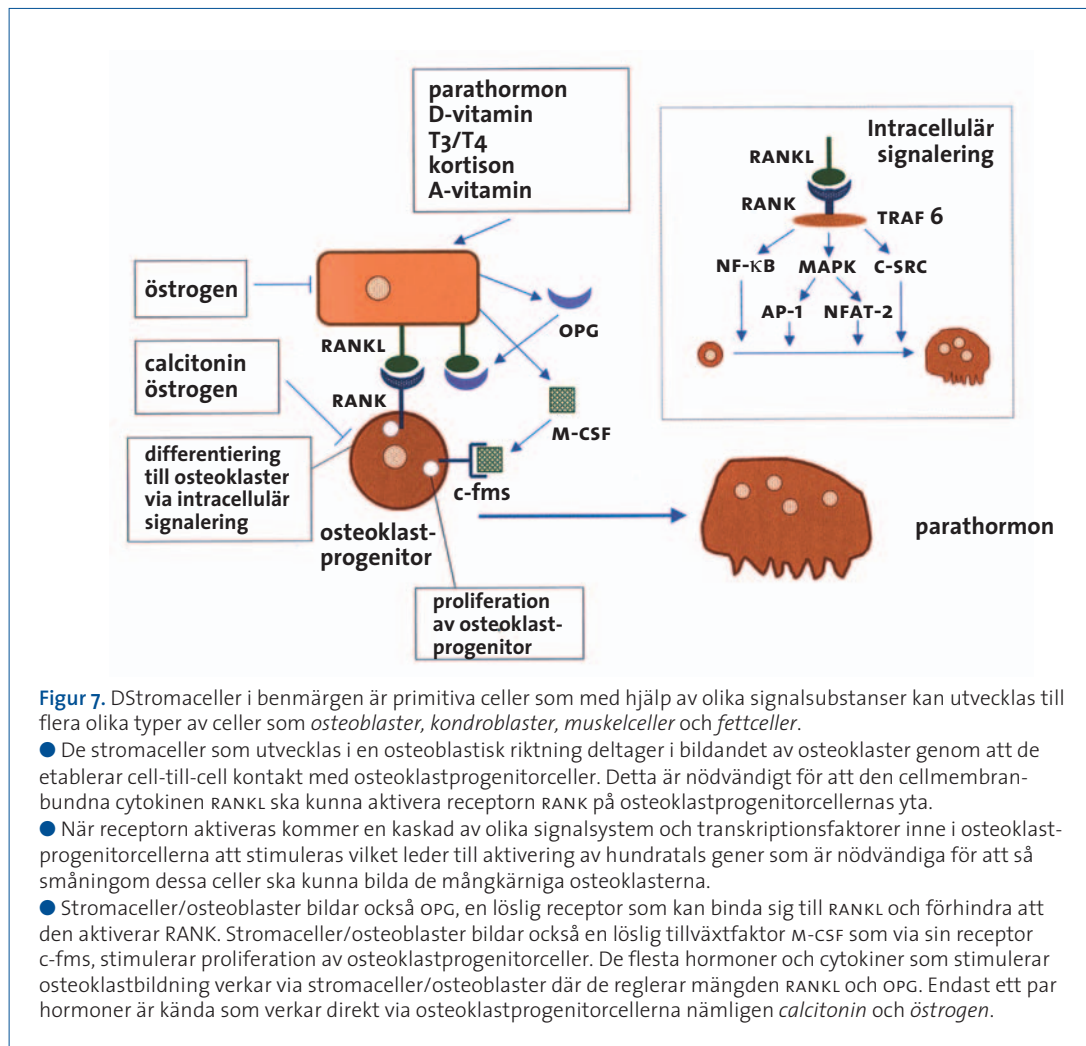


**Osteoblaster kontrollerar bildning av osteoklast**  
När den moderna molekylärbiologin introducerades inom bencellsbiologin under slutet av 1970-talet blev det ganska snart uppenbart att hormoner som stimulerar benresorption (till exempel parathormon och  $1,25(\text{OH})_2$ -vitamin  $\text{D}_3$ ) inte kan stimulera osteoklasterna eller deras prekursorceller direkt och att receptorer för dessa hormoner endast kunde påvisas i stromaceller/osteoblaster. Detta var naturligtvis i början mer eller mindre en paradox och mycket svårförståeligt. I början på 1980-talet lanserade Gideon Rodan och Jack Martin en teori för hur aktivering av osteoblaster initialt i resorptionsprocessen skulle kunna vara rationellt och förutsägbart och att osteoblaster på något sätt sedan kommunicerade med osteoklastprekursorer.

Under slutet av 1980-talet visade Tatsuo Suda och medarbetare i Tokyo att det krävdes inte bara

hematopoetiska celler för att osteoklaster ska bildas utan även stromaceller från märgen som differentierats till osteoblastliknande celler (Figur 6). Alternativt kunde man tillsätta "färdiga" osteoblaster från periost till osteoklastprogenitorceller. Man visade också elegant att det krävdes cell-till-cellkontakt mellan dessa supporterceller och osteoklastprogenitorerna. Dessa observationer kunde under 90-talet konfirmeras av många laboratorier och ett stort antal forskargrupper inom akademien och läkemedelsindustrin sökte efter de molekyler som förmedlade signaleringen mellan supportercellerna och osteoklastprogenitorerna.

Det visade sig att cytokinen *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) var en sådan faktor som stromaceller/osteoblaster bildar men att dess roll snarast är att stimulera proliferation av osteoklastprogenitorer i stället för att vara den förmedlande



länken vid cell-till-cellkontakten. Med hjälp av upptäckten att fibroblaster bildar en löslig inhibitor av osteoklastbildning, initialt kallad "*osteoclast inhibitory factor*" (OCIF) och senare *osteoprotegerin* (OPG) lyckades två grupper i USA respektive Japan, visat att OPG binds till en molekyl på stromaceller / osteoblaster, som fick namnet OPG-ligand (OPGL).

Såväl genen för OPG som den för OPGL klonades med en rasande fart och med moderna molekylär-genetiska tekniker kunde man snart visa att om genen för OPGL slås ut i möss (OPGL knockout mice) blir mössen *osteopetrotiska* (på grund av att det inte bildas några osteoklaster). Man kunde också visa att om genen för OPG slås ut blir mössen *osteoporotiska* (på grund av att det bildas stora mängder osteoklaster). Ganska snart kunde man därefter visa att OPGL binder till en receptor på osteoklastprekursorernas yta och som kallades "*receptor activator of NF $\beta$ B*" (RANK). Då ändrades nomenklaturen så att OPGL fick namnet RANKL (Figur 7).

Möss hos vilka genen för RANK slagits ut får

egenskaper (klinisk fenotyp) som är identiska med RANKL-knockoutmöss, det vill säga osteopetros. RANKL och RANK upptäcktes under samma tid också av immunologer som kallade RANKL för TRANCE. Eftersom RANKL och RANK uttrycks också av lymfoida och dendritiska celler i immunsystemet får också möss som saknar RANKL eller RANK förändringar i immunsystemet.

Upptäckten av RANKL-RANK-OPG-systemet innebar att man äntligen funnit de molekyler i stromaceller/osteoblaster som instruerar monocyper/osteoklastprogenitorceller att differentieras till osteoklaster (Figur 8). Detaljerad kartläggning av molekylernas struktur och funktion har visat att RANKL är en cytokin som är nära släkt med den tumörnekrotiserande faktorn (TNF) och att den är en ovanlig ligand på så sätt att den i likhet med många receptorer är förankrad i cellmembranet. Till skillnad från receptorer har den dock ingen "svans" inne i cellen som kan signalera. RANKL binds till sin receptor RANK som är förankrad på

osteoklastprekursorernas cellyta. RANK har en cytoplasmatisk svans inne i cellen som kan aktivera olika signalsystem i osteoklastprekursorer när RANK aktiveras av RANKL (Figur 7).

RANK är nära släkt med receptorerna för TNF och dess släktingar. Till denna familj hör också OPG som i likhet med RANK har affinitet till RANKL. OPG är en så kallad löslig receptor som inte sitter på cellmembranet och som inte kan signalera i cellen utan i stället hindrar RANK från att aktiveras genom att binda sig till RANKL. Den relativa mängden RANKL och OPG blir på så sätt avgörande för hur många RANK-molekyler som kan aktiveras och därmed hur många osteoklasters som bildas. Alla hittills påvisade stimulatorer av osteoklastbildning verkar genom att påverka RANKL och OPG-uttrycken. Starka stimulatorer som parathormon och  $1,25(\text{OH})_2$ -vitamin D<sub>3</sub> stimulerar uttrycket av RANKL samtidigt som OPG-uttrycket minskar.

Kunskaperna om RANKL-RANK-OPG och de intracellulära signalvägarna med vilka RANK påverkar osteoklastprogenitorceller innebär att läkemedelsindustrin nu fått nya mål för att rikta intervention mot vid sjukdomar med hög benresorptionsaktivitet, till exempel *osteoporos*, *reumatoid artrit*, *cancermetastaser i ben* och *parodontit*. Med rekordfart har inhibitorer utvecklats och kliniska prövningar pågår redan.

Vi har i Umeå upptäckt att en familj av enzymer, så kallade *cysteinproteaser*, deltar i osteoklastbildning. Dessa enzymer, framför allt *katepsin κ*, är väl kända för att vara viktiga i den cocktail av enzymer som osteoklasterna frisätter ut i resorptionslakunen för att bryta ned den organiska matrixen. Genom att använda olika typer av inhibitorer har vi kunnat visa att också cysteinproteaser är viktiga för osteoklastdifferentiering och fusion och att det är olika proteaser som är viktiga för resorptionsprocessen respektive differentieringen. Vilka cysteinproteaser som är involverade i osteoklastbildning vet vi ännu inte även om vi kunnat visa att det inte är katepsin  $\kappa$ . I nuvarande stadium vet vi inte heller vad enzymerna har för roll men det är ett mycket spännande projekt som även engagerar medicinska kemister i Lund, proteinkemister i Gdansk, Polen och molekylärbioleger i Kiel, Tyskland och som finansierats av Strategiska Stiftelsen.

#### Faktorer som styr bildandet av osteoklast

De hormoner som är de mest potenta stimulatorerna av osteoklastbildning är parathormon och  $1,25(\text{OH})_2$ -vitamin D<sub>3</sub>. En överproduktion av dessa leder till minskad mängd benvävnad på grund av

ökad benresorption. Andra hormoner som kan stimulera osteoklastisk differentiering är *tyroideahormon*, *glukokortikoider* (kortison) och *retinoider* (A-vitamin) (Figur 7). *Calcitonin* från tyroideas C-celler är det resorptionshämmande hormon som är mest väldokumenterat. Calcitonin verkar direkt på receptorer på osteoklasternas cellmembran. Vi har nyligen visat att calcitonin också hämmar differentieringen av osteoklastprogenitorceller. Differentieringen och aktivitet av osteoklasterna hämmas också av *östrogen* och *androgen* med mekanismer som dels är direkta på osteoklasterna och dels medieras av andra celler (till exempel stromaceller, lymfocyter). Detta är förklaringen till att postmenopausala kvinnor liksom andra kvinnor med brist på östrogen får fler och mer aktiva osteoklasterna.

Osteoklastbildning och benresorption styrs inte bara av systemiska hormoner utan även av lokala faktorer. Dessa har studerats framför allt av forskare som intresserat sig för lokal bennedbrytning och patologiska processer, till exempel kronisk inflammation och metastaserande maligna tumörer. Många av dessa "patologiska" molekyler som upptäckts har så småningom visat sig vara av betydelse även för fysiologisk remodelering. De flesta av dem är *cytokiner*, det vill säga peptider som initialt upptäcktes av immunologer och som har stor betydelse för kommunikationen mellan celler i immunsystemet.

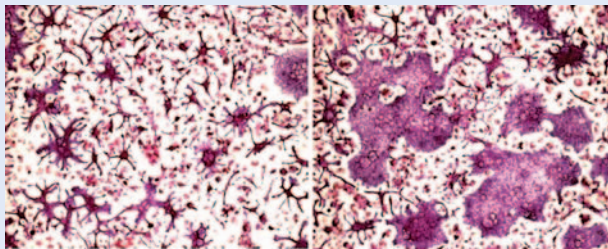
Cytokiner kan bildas av många celler, inklusive benceller. Cytokiner som visat sig kunna stimulera osteoklastdifferentiering är *interleukin-1* (IL-1), IL-6, IL-7, IL-11, IL-17, TNF, *leukemia inhibitory factor* (LIF) och *oncostatin M* (OSM). Av dessa är IL-1 den mest potenta stimulatorn även om man räknar in stimulerande hormoner. Samtliga dessa stimulatorer utövar sina effekter genom att först reglera uttrycket för RANKL och OPG i stromaceller och osteoblaster.

Det finns även cytokiner som hämmar osteoklastdifferentiering. Dessa har dock studerats i mycket mindre omfattning än de stimulatoriska. Till de hämmande hör IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18,  $\gamma$ -interferon ( $\gamma$ -IFN) och  $\alpha$ -IFN. Mekanismerna är relativt okända men själva har vi nyligen visat att IL-4 och IL-13 hämmar differentiering av osteoklasterna dels genom att minska RANK i osteoklastprogenitorceller, dels genom att inhibera RANKL och stimulera OPG i stromaceller och osteoblaster.

#### Gener som reglerar

##### *osteoklasternas bildande och aktivitet*

Som framgått styrs osteoklastutveckling av både stromaceller/osteoblaster och osteoklastprogenitorceller. Därför är olika gener i dessa celler viktiga. Framför allt studier med hjälp av möss där olika gener slagits ut med modern molekylärgenetik



**Figur 8.** På bilden till vänster ses många rödblå celler med långa utskott som representerar osteoklastprogenitorceller som håller på att slå sig samman till flerkärniga osteoklaster. Några små runda celler kan också ses. Det är tidiga osteoklastprogenitorer som ännu inte hunnit till det stadium då de kan slå sig samman. På bilden till höger ses stora flerkärniga osteoklaster. Dessa foton är tagna från en cellodling där cellerna isolerats från mjälte och sedan stimulerats med M-CSF och RANKL i fyra dagar.

teknik som gett förändringar i skelettet har kunnat visa på den kritiska betydelsen av ett stort antal gener. Vissa av dessa genutslagningar har varit riktade mot gener som man genom *in vitro* studier förstått vara av betydelse för osteoklastbildning. Men flera gener har mer av en slump upptäckts vara viktiga för skelettet. De har slagits ut av forskare som varit intresserade av helt andra celler och processer men som till sin stora förvåning funnit att skelettet sett helt annorlunda ut hos de möss som saknar den gen de varit intresserade av. Andra gener av betydelse för osteoklasterna har påvisats genom att man med mer traditionella genetiska metoder undersökt musstammar där man sedan länge känt till att de har skelettdefekter.

En möjlighet som nu har öppnat sig är att med olika tekniker studera vilka gener som slås på i osteoklasterna när man aktiverar receptorn RANK (Figur 7). Detta är intressant inte bara ur grundvetenskaplig synpunkt utan även för läkemedelsindustrin som söker nya och kanske ännu mer specifika mål för utvecklande av osteoklasthämmare. Sålund har man påvisat gener som behövs för att initiera differentiering av osteoklasterna. Dessa är dels sådana som behövs för intercellulär kommunikation som till exempel RANKL, RANK, OPG och M-CSF, dels sådana som är nödvändiga intracellulärt för differentiering av osteoklasterna, till exempel olika transkriptionsfaktorer som NF- $\kappa$ B och NFAT2 (Figur 7).

Gener involverade i vidhäftning, polarisering och utvecklande av ruffled border har också kartlagts, till exempel proteinerna  $\alpha$ v och  $\beta$ 3 som bildar integrinen  $\alpha$ v $\beta$ 3 (Figur 5) och tyrosinkinaset c-src (Figur 7). För resorptionsprocessen är genen för enzymet *katepsin  $\kappa$*  avgörande för proteolytisk nedbrytning av matrixproteiner (Figur 5). Man har också funnit en gen som kodar för en osteoklastspecifik subenhet i protonpumpen samt den gen som kodar för kloridkanalen (kloridkanal 7) (Figur 5). I samtliga dessa fall har genens betydelse

för osteoklastdifferentiering och aktivitet kartlagts med hjälp av så kallad "gene knockout".

Kartläggandet av musgener har nu också lett till att flera olika ärftliga skelettsjukdomar hos människa kunnat kartläggas. Dessa studier har inte bara molekylärgenetiskt kunnat förklara etiologin och patogenesen för sjukdomarna utan också visat på hur lika musens och människans gener är.

Patienter med de ärftliga sjukdomarna *familial expansile osteolysis* and *expansile skeletal hyperphosphatasia* har ökat antal hyperaktiva osteoklasterna och därmed ökad remodelering av skelettet. Detta har nu visat sig bero på mutationer i genen för RANK. Receptorn blir mer aktiv än normalt, så kallad *gain-of-function mutation*, och därmed ökad signalering till osteoklastbildning. Patienter med *hyperostosis corticalis deformans juvenilis* har ökad bennedbrytning och stora besvär med frakturer och deformiteter i skelettet som beror på en inaktiverande mutation i genen för OPG. Detta leder till minskad hämning av RANK-signalering.

#### Fysiologisk remodelering av skelettet

Under fysiologiska förhållanden byggs skelettet ständigt om via så kallad *remodellering*. Detta sker i diskreta ombyggnadsplatser; så kallade "bone multicellular units". Man räknar med att det finns 1–2 miljoner ombyggnadsplatser i skelettet. Det finns fler ombyggnadsplatser i trabekulärt ben än i kortikalt ben och därför är remodeleringen hög i till exempel ryggkotor, distala radius och lårbenshalsen som innehåller stora mängder trabekulärt ben. Totalt har man beräknat att under friska förhållanden resulterar remodelering i att 10 procent av skelettets benvävnad byts ut varje år.

- Remodelleringscykeln startar med att osteoklasterna identifierar ett område som ska bytas ut varvid de fäster till benytan och sedan resorberar detta område (Figur 9).
- Den resorptionslakunen som de lämnar efter sig när de flyttar till ett nytt remodeleringsställe invaderas av osteoblasterna som bildar nytt ben i lakunen.
- Det är nu som de tillväxtfaktorer som osteoblasterna tidigare deponerat i benvävnaden kommer till användning (figur 2). De frisätts och aktiveras när osteoklasterna bryter ned ben och läcker sedan ut till omgivningen där IGF-s och TGF- $\beta$  aktiverar osteoblasterna så att nytt ben kan bildas i resorptionslakunen; de fungerar som så kallade *coupling factors* (Figur 9).
- Om mängden ben som bildas är lika stor som den som bryts ned blir benmassan i fortsättningen oförändrad. Om däremot

nedbrytningen är större än nybildningen, som fallet är vid till exempel *osteoporos*, minskar benmassan.

- Vid ärftliga sjukdomar förenade med defekt osteoklastbildning eller -aktivitet blir resorptionsaktiviteten mindre än benbildningen och resultatet blir *osteopetros*.

Hur remodelleringen regleras är en intressant fråga som vi vet mycket lite om.

- Varför måste vissa områden bytas ut?
- Vad har hänt med den extracellulära matrixen och hur kan osteoklasterna identifiera sådana områden?
- Hur vet osteoklasterna att de har resorberat färdigt i remodelleringsstället?

Det vi vet är att den fysiska belastningen är nödvändig på något sätt. Om vi inte belastar skelettet överväger resorptionen över benbildningen och vi förlorar benmassa. Hos viktlösa astronauter kan detta gå mycket snabbt. Omvänt vet vi också att belastning av skelettet ökar benmassan i det belastade benet. En intressant fråga är om den ökade benmassa som vi på så sätt förvärvar kvarstår genom livet? Viss forskning tyder på att så är fallet. En kanske ännu viktigare frågeställning är om den maximala benmassa som man förvärvar under uppväxten har någon betydelse för osteoporosjukdom när man blir äldre?

All forskning tyder på att ju mer ben man har skapat under uppväxten desto långsammare förlorar man ben vid osteoporosjukdom. Detta gör det än viktigare att argumentera för mer fysisk aktivitet hos ungdomar liksom att påpeka hur viktigt det är med kalciumtillsättningen under tider när allt fler dricker mindre och mindre mjölk.

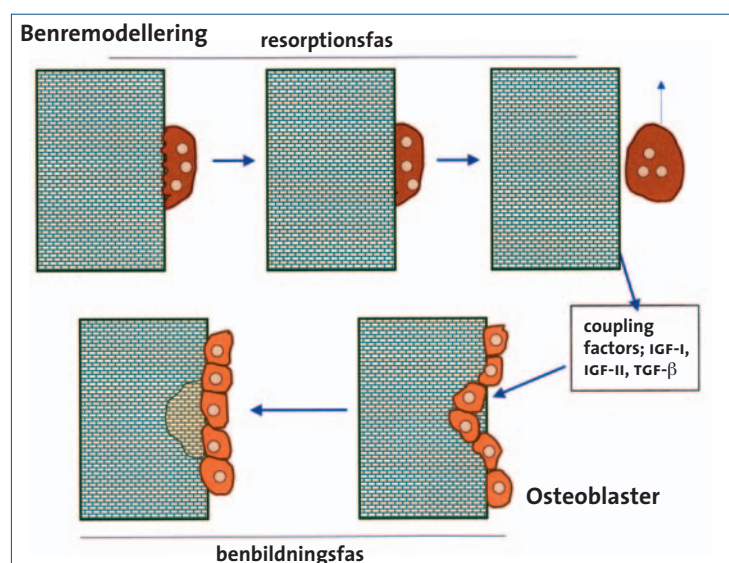
### Hjärnan och nervsystemet som regulatorer av benmassan

Traditionellt anses skelettet vara en vävnad som saknar nerver så när som på ett ganska stort antal sensoriska nerver i periostet. Modern immunhistokemisk teknik har dock avslöjat att det finns ett väl utbrett nervsystem såväl i kortikalt och trabekulärt ben som inne i benmärgen. Dessa nerver innehåller signalsubstanser som *neuropeptider* och *katekolaminer*. Till viss del har dessa nerver en sensorisk funktion men vi har frågat oss om signalsubstanserna också skulle kunna reglera bencellernas aktiviteter? Det är väl studerat i immunsystemet att signalsubstanser i nervfibrer påverkar immunkompetenta celler. Att en liknande neuro-osteologisk interaktion förekommer antyds av studier både hos människa och djur. Studierna visar att förlust av skelettal innervation leder till förändringar i skelettal re-

modellering. Vi har kunnat visa att både osteoblasterna och osteoklasterna har mRNA (budbärarRNA) för receptorer för neuropeptiden *vasoaktiv intestinal peptid* (VIP), en av signalsubstanserna i skelettala nerver.

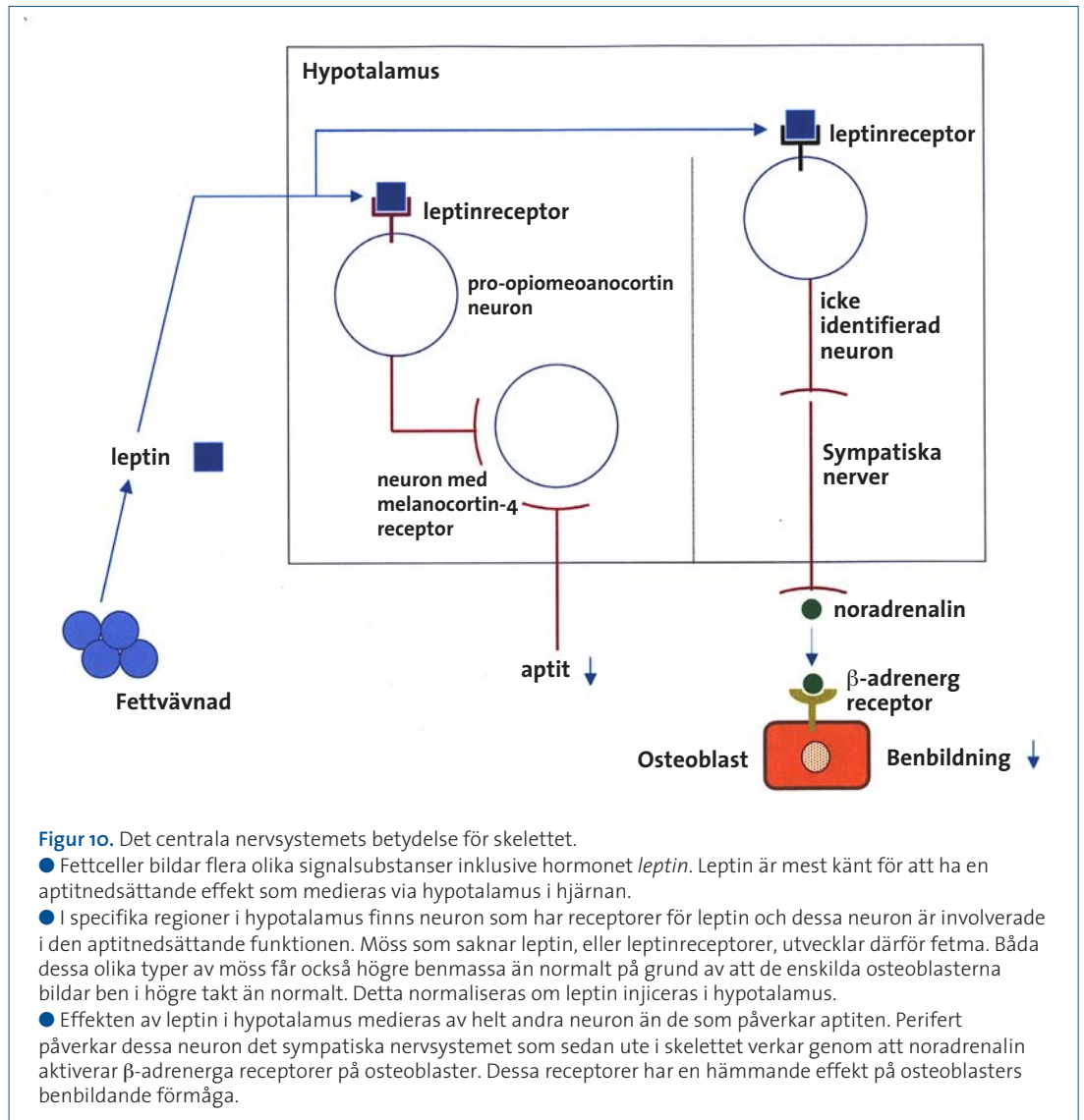
Receptorerna för VIP i osteoblasterna och osteoklasterna är inte desamma. Olika receptortyper förekommer i de olika cellerna. I samarbete med bland annat Michael Horton i London har vi också visat att de olika mRNA för dessa receptorer leder till att olika receptorproteiner uttrycks på bencellernas cellmembran.

I flera olika *in vitro*-system har vi sedan kunnat visa att om receptorerna aktiveras med VIP och närbesläktade peptider leder detta till stora förändringar i benbildning och benresorption. Andra forskargrupper har visat att neuropeptiderna *calcitonin gen-relaterad peptid* (cgrp) och substans P (sp) samt *katekolaminer* kan påverka osteoblasterna och



**Figur 9.** Benvävnaden i skelettet hos en vuxen individ byggs ständigt om, *remodelleras*. Detta sker i högre takt i det trabekulära jämfört med i det kortikala benet.

- Remodelleringen initieras av att osteoklasterna identifierar det område som ska resorberas och adhererar till området med hjälp av *sealing zone*.
- Nedbrytningen av benvävnaden pågår i cirka tre veckor sedan förflyttar sig osteoklasten till ett nytt remodelleringsställe. Under resorptionsfasen bryts de flesta matrixproteinerna ned, men tillväxtfaktorer som IGF-I, IGF-II och TGF- $\beta$  aktiveras i stället och kommer att aktivera de osteoblasterna som finns i närheten av resorptionslakunen. Osteoblasterna vandrar in i lakunen och börjar att fylla upp den med nybildat ben; en långsam process som tar flera månader.
- Om osteoblasterna kan bilda lika mycket ben som osteoklasterna resorberat påverkas inte benmassan. Om däremot benbildningen inte förmår ersätta allt nedbrutet ben minskar benmassan och skelettet blir *osteoporotiskt*.
- När osteoklasterna inte bildas i normal omfattning, eller inte kan fungera normalt samtidigt som osteoblasterna bildar ben som vanligt ökar benmassan och skelettet blir *sklerotiskt*.



osteoklasters aktiviteter. Vi har nyligen själva påvisat att cgrp också hämmar bildning av osteoklast. Dessa studier visar hur det perifera nervsystemet kan tänkas påverka skelettal remodellering.

Helt nyligen har två grupper kunnat visa hur det centrala nervsystemet i hjärnan påverkar benmassan hos möss. Gerhard Karsenty et al i Houston har visat att receptorer för fetthormonet *leptin* i hypothalamus är betydelsefulla för benmassan. Möss som saknar leptin eller receptorer för leptin har högre benmassa än kontrollmössen. Detta beror på leptinreceptorer i kärnor i hypothalamus som är skilda från de som reglerar leptinets aptitnedsättande förmåga. I ett mycket elegant arbete visar gruppen också att effekten medieras av det sympatiska nervsystemet och β-adrenerga receptorer i osteoblaster som aktiveras av noradrenalin (Figur 10).

En forskargrupp vid Garvan Institute i Sydney har på ett annat sätt visat på hypothalamus roll för benbildning. De har nyligen rapporterat att möss som saknar en viss receptortyp för *neuropeptid Y* (NPY, så kallade NPY-receptorer typ 2) specifikt i hypothalamus får ökad benmassa pga ökad benbildningsaktivitet i osteoblaster. Hur NPY-receptorer i hypothalamus sedan via nervsystemet påverkar osteoblaster perifert ute i skelettet är för närvarande inte känt.

Det kommer att bli mycket spännande att följa de studier som pågår för att studera det sympatiska nervsystemets betydelse för benmassan hos oss människor, inte minst pga att många patienter behandlas med antagonister för β-adrenerga receptorer.

### Sammanfattning

Benvävnaden är ett vitalt organ som ständigt remodeleras genom väl integrerade aktiviteter mellan bennedbrytande osteoklaster och benbildande osteoblaster.

Modern cell- och molekylärbiologisk forskning har kartlagt många extra- och intracellulära signalsubstanser som reglerar bildande av benceller och deras aktiviteter. Till dessa hör *hormoner*, *cytokiner* och *transkriptionsfaktorer*. Sålunda har man visat att cytokinen RANKL som produceras av stromaceller i benmärg och osteoblaster i periost är helt nödvändig för differentiering av osteoklaster genom att den aktiverar receptorn RANK på osteoklastprogenitorceller. Denna interaktion hämmas av en löslig receptor som kallas OPG.

Flera ärftliga skelettsjukdomar hos människa beror på mutationer i generna för RANK och OPG. Dessa studier visar att osteoblaster inte bara är de celler som bildar ben utan också de celler som kontrollerar bildningen av osteoklaster. Flera intracellulära signalvägar med vilka RANK stimulerar differentiering av osteoklaster har också klarlagts, till exempel transkriptionsfaktorerna NF- $\kappa$ B och NFAT2, samt fosforylerande enzymer som MAP-kinaser.

Den benbildande aktiviteten i osteoblaster regleras också av extra- och intracellulära signalsystem. Ur klinisk synpunkt är dagliga injektioner med *parathormon* den mest intressanta stimulatoren av benbildning.

*Cbfa1* och *osterix* är två transkriptionsfaktorer som är nödvändiga för att osteoblaster ska kunna bilda benvävnad. Helt oväntat har det visat sig att det membranbundna signalsystemet *Lrp5/Wnt/Frizzled* förekommer i osteoblaster och reglerar benmassans storlek och mutationer i *Lrp5*-genen som ger upphov till hög respektive låg benmassa har nyligen påvisats.

Med ytterligare molekylärbiologisk kunskap om specifika reglersystem för benresorption och benbildning kan vi förhoppningsvis se fram emot utvecklande av mer specifika farmaka för att kunna behandla patienter med sjukdomar som primärt eller sekundärt drabbar remodelering av skelettet.

### Referenser

Referenslistan utgörs av ett antal nyskrivna reviewartiklar där den intresserade läsaren ytterligare kan fördjupa sig. Det går även bra att kontakta författaren för närmare information om de originalartiklar som denna översikt är baserad på.

1. Karsenty G. The complexities of skeletal biology. *Nature* 423: 316–8, 2003.

2. Mariani FV, Martin GR. Deciphering skeletal patterning: clues from the limb. *Nature* 423: 319–25, 2003.
3. Helms JA, Schneider RA. Cranial skeletal biology. *Nature* 423: 326–31, 2003.
4. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423: 332–6, 2003.
5. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423: 337–42, 2003.
6. Zelzer E, Olsen BR. The genetic basis for skeletal diseases. *Nature* 423: 343–8, 2003.
7. Harada S-I, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423: 349–55, 2003.
8. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4: 632–49, 2003.
9. Lerner UH. Osteoclast formation and resorption. *Matrix Biol* 19: 107–20, 2003.
10. Lerner UH, Lundberg P. Kinins and neuropeptides. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. *Principles of Bone Biology*, 2<sup>nd</sup> edition. Academic Press, San Diego, USA; 2002, pp. 773–99.
11. Lerner UH. New molecules in the tumor necrosis factor ligand and receptor superfamilies with importance for physiological and pathological bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med*, 15: 64–81, 2004.
12. Lundberg P, Lerner UH. The expression and regulatory role of receptors for vasoactive intestinal peptide in bone cells. *Microscopy Res Tech* 58: 98–103, 2002.

**FOTNOT:** Studier vid författarens laboratorium har stötts av Vetenskapsrådet, Svenska Stiftelsen för Strategisk Forskning, Reumatikerförbundet, Konung Gustav V:s 80-årsfond, Västerbottens läns landsting, Patentmedelsfonden, Arbetstlivsinstitutet, Anna-Greta Craafords Stiftelse, Tandläkarsällskapet, Umeå Universitet, Astra-Hässle och Pharmacia-Upjohn.

### Adress:

Ulf H Lerner,  
Oral cellbiologi,  
Umeå universitet,  
901 87 Umeå  
E-post:  
ul.lerner  
@odont.umu.se