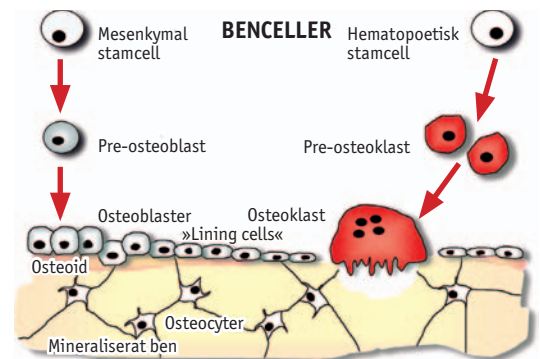


Signalsystem samverkar vid bennedbrytning

Studier hjälper oss förstå hur benvävnaden påverkas vid inflammation

AUTOREFERAT Cellernas förmåga att reagera på stimuli från inflammation beror på samverkan mellan olika stimulerande och hämmande signalsystem. Denna kunskap har stor betydelse för att förstå hur lokala celler i benvävnaden påverkas av inflammation som leder till att tandens stödjevävnader bryts ned vid parodontit eller att leder förstörs hos patienter med reumatoid artrit.

Godkänt för publicering 15 augusti 2007



Figur 1. Schematisk bild över cellerna i benvävnaden.



Anna Brechter
leg tandläkare, med dr, avdelningen för ortodonti, Tandläkarhögskolan Umeå och avdelningen för oral cellbiologi, odontologiska institutionen, Umeå universitet
E-post: anna.brechter@odont.umu.se

Skelettet är en levande vävnad som ständigt omsätts genom att det fortlöpande bryts ned och ersätts med nytt ben. Processen är viktig för att förnya benet och även för att anpassa benets struktur till förändrad belastning. Hos en frisk vuxen människa omsätts ungefär 10 procent av skelettets benvävnad per år. De celler som ansvarar för benremodelleringen är osteoblaster, som bildar nytt ben, osteocytter, som förekommer inuti benvävnaden där de inkorporerats under benbildningen och osteoklaster, som är ansvariga för bennedbrytningen. Den fjärde celltypen är de inaktiva osteoblaster som kallas »lining cells« och som täcker benytan (figur 1).

Under fysiologiska förhållanden är bennedbrytningen lika stor som bennybildningen. Vid vissa sjukdomstillstånd kan ombyggnadsprocessen påverkas så att nedbrytningen ökar och att nybildningen av ben inte räcker till för att ersätta allt ben som förlorats. Detta kan leda till minskad benmassa, antingen generellt i skelettet (som till

exempel vid benskörhet) eller lokalt i benvävnaden (till exempel hos patienter där man kan se inflammation i anslutning till skelettet).

Vid inflammation ses flera olika cellulära svar: ökad angiogenes, blodkärlen dilateras och kärleins permeabilitet ökar. Den ökade permeabiliteten leder bland annat till att proteiner från kalikrein-kinin-systemet och koagulationskaskaden läcker ut i inflammationsprocessen. Dessa proteiner är viktiga i vårt inflammations svar. Olika typer av leukocyter tränger ut ur kärle och in i omgivande vävnad.

De leukocyter som invaderar inflammationsprocessen frisätter olika signalmolekyler (cytokiner) som kan påverka andra celler i området. I våra käkar påverkas till exempel fibroblaster i gingivan och parodontalligamentet samt även celler i benvävnaden.

Flera av cytokinerna har visat sig kunna ge upphov till bennedbrytning genom aktivering av flerkärniga osteoklaster. Det är de benbildande osteoblasterna som är nyckelceller även i denna process eftersom det krävs cell-till-cellkontakt mellan osteoblaster och pre-osteoklaster för att osteoklasterna ska kunna utmognas och aktiveras till att bryta ned benvävnaden.

Två sådana stimulerande cytokiner är Interleukin-1 (IL-1) och tumörnekrotiserande faktorn- α (TNF- α). De har också visat sig öka prostaglandinproduktionen i ben, en viktig effekt eftersom prostaglandiner i sig själva kan ge upphov till bennedbrytning. Det finns också cytokiner som

DISPUTATION

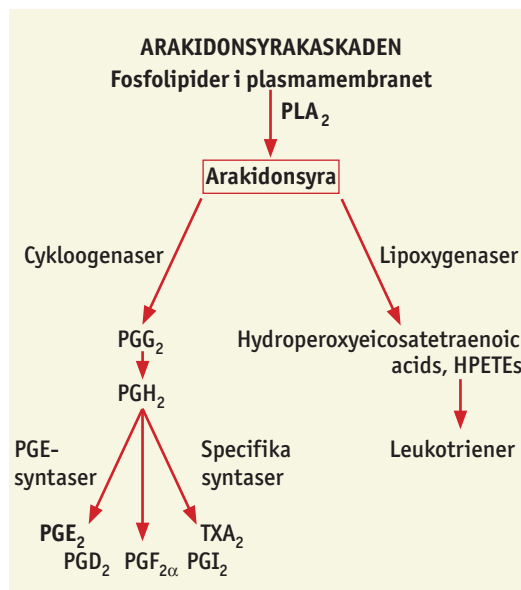
Den 2 februari 2007 försvarade Anna Bernhold Brechter, avdelningen för oral cellbiologi, odontologiska institutionen, Umeå universitet, avhandlingen »Kinins – important regulators in inflammation induced bone resorption«. Fakultetsopponent var professor Hans-Erik Claesson, institutionen för medicinsk biokemi och biofysik, Karolinska institutet. Huvudhandledare var professor Ulf Lerner, avdelningen för oral cellbiologi, odontologiska institutionen, Umeå universitet.

kan hämma bennedbrytning, till exempel IL-4 och IL-13 (figur 2).

Arakidonsyrakaskaden är en kaskad av reaktioner som leder fram till bildningen av bland annat prostaglandiner (figur 3). Olika stimuli kan trigga frisättningen av arakidonsyra från plasmamembranet med hjälp av fosfolipas A₂. Arakidonsyran kan sedan omvandlas med hjälp av olika cyklooxygenaser (COX-1 och COX-2) till de intermediära formerna PGG₂ och sedan PGH₂. COX-1 verkar vara mer konstant uttryckt i celler, medan COX-2 induceras kraftigt av olika inflammationsmediatorer. Ganska nyligen upptäcktes de enzymer, som är ansvariga för att katalysera omvandlingen från PGH₂ till PGE₂, så kallade PGE-syntaser. Det finns i dag tre identifierade PGE-syntaser, varav den membranbundna mPGES-1 har visat sig vara funktionellt kopplad till COX-2. Även mPGES-1 induceras av pro-inflammatoriska substanser.

Vid inflammation aktiveras också flera serumprotein-kaskader, en av dessa är kallikrein-kininsystemet (figur 4). Vid aktivering av detta system bildas små peptider, så kallade kininer. En av dessa är bradykinin, BK som består av nio aminosyror med Arginin i båda ändar (Arg-Pro-Pro-Gly-Ser-Pro-Phe-Arg). Det är en typisk inflammationsmediator som bland annat ger upphov till smärta, kärlvidgning och ökad kärlpermeabilitet. Bradykinin kan även stimulera benresorption i kalvarier från nyfödda möss. Effekten är helt beroende av prostaglandinbildning. Tidigare publicerade resultat har också visat att det är osteoblaster som är målceller för kininer.

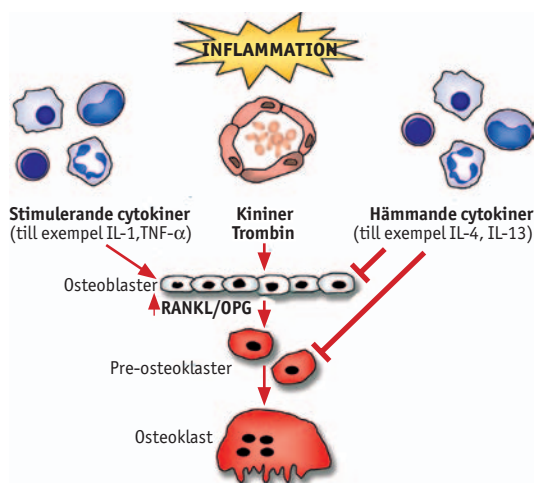
Effekterna av kininer är kopplade till två subtyper av kininreceptorer som kallas B1 och B2. Båda är receptorer som sitter på cellens yta. B2-receptorerna kräver alla nio aminosyrorna i bradykinin för att aktiveras. BK och Lys-BK är natur-



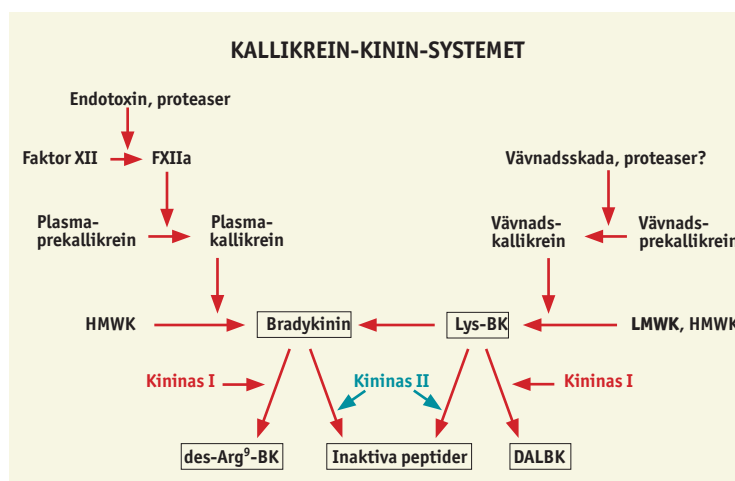
Figur 3. Schematiskt diagram över bildningen av bland annat prostaglandiner.

ligt förekommande kininer som binder till B2-receptorer. B1-receptorerna är endast känsliga för kininer som saknar aminosyran Arginin (Arg). Enzymet kininas I klyver denna aminosyra från BK eller Lys-BK och vi får i stället des-Arg⁹-BK eller des-Arg¹⁰-Lys-BK (DALBK), de naturligt förekommande kininer som binder in till B1-receptorer (figur 4).

Extra intressant är att bradykinin inte bara stimulerar bennedbrytning utan förstärker även synergistiskt effekten av cytokinerna IL-1β och TNF-α på prostaglandinsyntes och benresorption. Synergismen indikerar att flera olika agonister samverkar för att stimulera benresorption vid inflammation.



Figur 2. Olika cytokiner och inflammationsmediatorer har visat sig kunna reglera osteoklastbildning och benresorption.



Figur 4. Schematisk bild av de två primära vägarna i kallikrein-kinin-systemet som leder fram till bildning av kininer.

ÖVERGRIPANDE SYFTE

Det övergripande syftet och hypotesen med detta projekt var att försöka öka kunskapen om de mekanismer som ligger bakom interaktionerna mellan olika inflammationsmediatorer som kan ge upphov till bennedbrytning. För att kunna undersöka mekanismerna har vi framför allt använt en human osteoblastisk cellinje som heter MG-63. Vi ville undersöka en osteoblastisk cell (helst en human) eftersom osteoblaster är de nyckelceller som även reglerar bennedbrytning.

Delarbete I

Syftet med delarbete I var att karaktärisera receptorer för kininer i en human osteoblastisk cell-linje (MG-63), genom att använda olika kininer med specifika agonistiska eller antagonistiska egenskaper för de olika kininreceptorerna.

Resultaten visar att den humana osteoblastiska cell-linjen MG-63 är utrustad med både B1- och B2-receptorer, kopplade till frisättning av PGE₂. B2-receptorer är kopplade till en mycket snabb frisättning av PGE₂ medan aktivering av B1-receptorerna leder till en mycket mer fördröjd ökning av PGE₂-frisättning, vilket troligtvis beror på att prostaglandinfrisättningen förmedlas av olika molekylära mekanismer.

Delarbete II

Tidigare studier har visat att kininer kraftigt ökar effekten av vissa cytokiner på både prostaglandinproduktion och benresorption i kalvarier hos nyfödda möss. Eftersom resultaten i delarbete I visar att de osteoblastiska MG-63-cellerna uttrycker både B1- och B2-receptorer ville vi undersöka mekanismerna bakom dessa interaktioner.

Syftet med delarbete II var att undersöka inter-

aktionerna mellan kininer och vissa cytokiner genom att studera 1) frisättning av prostaglandiner, 2) uttrycken av de enzymer som är involverade i bildningen av prostaglandiner samt att 3) utvärdera rollen av transkriptionsfaktor NF-κB och olika MAP-kinaser (NF-κB=Nuclear Factor-κB; MAP=Migogen Activated Protein).

Observationerna visar att kininer som binder till B1- och B2- receptorer interagerar med signaleringen från IL-1 och TNF-α-receptorerna. Detta leder i sin tur till en kraftigt synergistisk ökning av PGE₂-frisättningen. Vi undersökte flera olika enzymer i Arakidonsyrakaskaden och från resultatet drog vi slutsatsen att den enorma synergistiska potentiering som fås på PGE₂-frisättning då kininer och cytokinerna IL-1 eller TNF-α samverkar delvis är beroende av en ökning av COX-2.

Vi ville också studera vad som händer inne i cellen vid sådana interaktioner och valde att undersöka transkriptionsfaktorn NF-κB samt olika MAP-kinaser eftersom de i tidigare studier visat sig vara involverade i ökat uttryck av COX-2.

Signaleringen inne i cellen involverar ofta en sekvens av flera reaktioner orsakade av olika enzymer, till exempel kinaser (figur 5). Dessa kinaser kan genom att koppla på fosfatgrupper aktivera olika molekyler.

I cellens kärna finns våra gener. En transkriptionsfaktor är ett protein som fungerar som en regulator för vilka gener som uttrycks. Speciellt regleras aktivering och hämning av transkription av olika gener, vilket innebär att mängden mRNA regleras. mRNA:t fungerar sedan som mall när ribosomerna ska koppla ihop olika aminosyror till proteiner, så kallad translation. Data indikerar att inte bara NF-κB utan framför allt MAP-kinaserna p38 och JNK (c-Jun N-terminal Kinase) tycks vara involverade i regleringen av COX-2-uttrycket vid interaktioner mellan kininer och IL-1β.

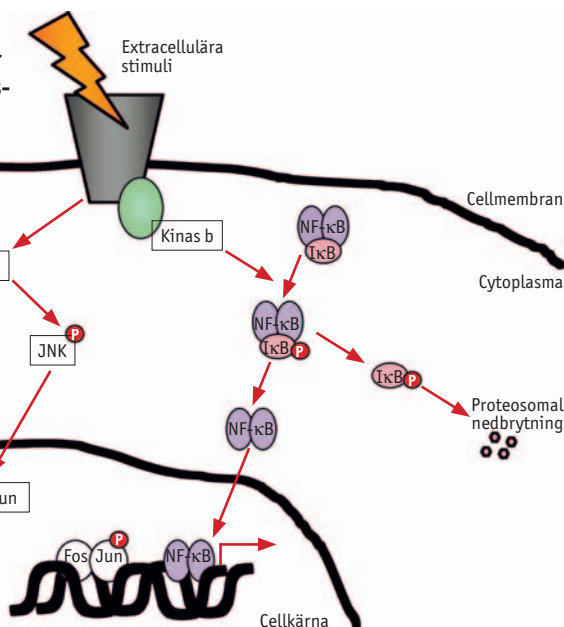
Delarbete III

Syftet med delarbete III var att studera effekter av cytokiner på kinin-receptoruttrycken eller vice versa effekter av kininer på uttrycken av cytokinreceptorer.

Av resultatet framgår att IL-1β eller TNF-α reglerar upp uttrycket av både B1- och B2-receptorer, både på mRNA- och på proteinnivå. Det kan tolkas som att mängden receptorer på ytan ökat. Ingen ytterligare uppreglering av receptorer ses i kombination med kininer, vilket tyder på att kininerna inte reglerar upp sina egna receptorer. Inga effekter av kininer sågs på cytokinreceptorerna.

Vi ville i även detta arbete undersöka mekanismerna bakom cytokinernas uppreglering av kininreceptorer genom att titta på vad som sedan händer inne i cellen. De intracellulära mekanismerna tycks involvera både transkriptionsfaktorerna NF-κB och AP-1 (Aktivations Protein-1) samt olika MAP-kinaser.

Figur 5. Schematisk bild över signaleringsvägar för transkriptionsfaktorerna NF-κB och AP-1.



Delarbete IV

Cytokinerna IL-4 och IL-13 har tidigare visat sig ha en hämmande effekt på benresorption, dels genom att hämma utmognaden av osteoklaster och dels genom att hämma COX-2 och prostaglandinbildning.

Syftet med delarbete IV var att 1) undersöka om och hur de hämmande cytokinerna IL-4 och IL-13 eventuellt kan reglera uttrycken av kininreceptorer samt även de enzymer som är involverade i prostaglandinsyntesen samt, 2) studera de signaleringsvägar som är involverade i dess hämning.

Det är sedan tidigare känt att cytokinerna IL-4 och IL-13 kan hämma PGE₂-frisättning. Detta kunde vi också se i våra studier. Våra observationer visar även att IL-4 och IL-13 nedreglerar uttrycket av COX-2; både det basala och det som uppregerats av IL-1β.

Denna nedreglering är beroende av transkriptionsfaktorn STAT6 (Signal Transducer and Activator of Transcription 6). Detta har vi kunnat visa med hjälp av speciella möss där genen för STAT6 är utslagen (så kallade knock-out-möss). I dessa möss fås ingen hämning med IL-4 eller IL-13. Våra resultat visar också att IL-4 och IL-13 hämmar uttrycket av både B1- och B2-receptorerna; både det basala och det som reglerats upp av IL-1β. Denna hämning är också beroende av transkriptionsfaktorn STAT6.

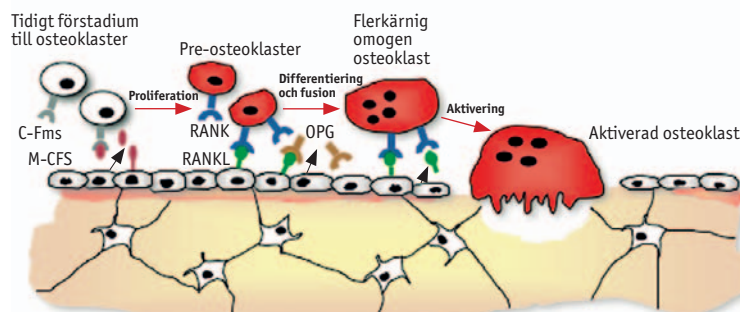
För att ytterligare försöka att koppla våra resultat till ökad benresorption har vi undersökt om uttrycken av ett antal aktivatörer som är mycket viktiga för osteoklastutmognad kunde påverkas av interaktionen mellan kininer och IL-1β, nämligen RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor-κB) RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor-κB ligand) och OPG (osteoprotegerin) (figur 6). Dessa undersökningar gjordes i delarbete II.

RANK är en receptor som befinner sig på förstadiet till osteoklaster och mogna osteoklaster.

RANKL produceras av och uttrycks på osteoblaster/stromaceller och binder till RANK; på så sätt utmognas och aktiveras osteoklaster.

OPG är en löslig receptor som frisätts från osteoblaster och som också kan binda till RANKL för att hämma bindningen till RANK, vilket i sin tur leder till en hämning av utmognaden och aktiveringen av osteoklaster. OPG skyddar benet från nedbrytning.

Vi fann att kombinationen med kininer och IL-1β gav en kraftig ökning av RANKL-uttrycket både på mRNA och på proteinnivå. Denna uppreglning är mestadels prostaglandinberoende. Vi fann ingen signifikant reglering av RANK eller OPG med de olika kininerna. Dessa resultat är särskilt intressanta eftersom RANKL är en nödvändig faktor för osteoklastogenes och bennedbrytning vid inflammatoriska tillstånd som parodontit och reumatoid artrit.



Figur 5. Schematisk illustration över bildning och aktivering av osteoklaster.

SAMMANFATTAT

- Humana osteoblastiska celler är utrustade med funktionella B1- och B2-receptorer som är kopplade till prostaglandinfrisättning (delarbete I).
- Kininer, som binder till både B1- och B2-receptorer, interagerar med signaleringen från IL-1- och TNF-receptorer, vilket leder till en synergistisk ökning av prostaglandinfrisättningen (delarbete II).
- Mekanismen bakom synergismen verkar involvera ett ökat uttryck av COX-2, där både NF-κB och olika MAP-kinaser är involverade i den intracellulära signaleringen (delarbete II).
- IL-1β och TNF-α ökar uttrycket av både B1- och B2-receptorer i de undersökta cellerna via signaleringsvägar som involverar MAP-kinaserna p38 och JNK samt transkriptionsfaktorerna NF-κB och AP-1 (delarbete III).
- De antiinflammatoriska cytokinerna IL-4 och IL-13 hämmar uttrycken av PGE₂, COX-2 samt både B1- och B2-receptorer, och effekten verkar vara beroende av transkriptionsfaktorn STAT6 (delarbete IV).
- De synergistiska interaktionerna ökar också uttrycket av RANKL, en nödvändig aktivator för osteoklastogenes och bennedbrytning vid inflammatoriska tillstånd (delarbete II).

Om osteoblaster eller gingivala fibroblaster samtidigt utsätts för stimulans av kininer och vissa pro-inflammatoriska cytokiner (IL-1β och TNF-α) samverkar signalsubstanserna synergistiskt; det vill säga att den sammanlagda effekten är avsevärt större än summan av de enskilda effekterna. Denna samverkan kan även hämmas av andra så kallade antiinflammatoriska cytokiner (IL-4 och IL-13). Viktiga fynd i avhandlingen är de som presenterar mekanismerna bakom dessa interaktioner.

Resultaten visar att cellernas förmåga att reagera på stimuli från inflammation beror på samverkan mellan olika stimulerande och hämmande signalsystem. Denna kunskap har stor betydelse för att vi ska förstå hur lokala celler i

benvävnaden (och till exempel i gingivan) påverkas av inflammation vilket leder till att till exempel tandens stödjevävnader bryts ned vid parodontit och att leder förstörs hos patienter med reumatoid artrit. Vi hoppas att resultaten ska

visa sig vara viktiga för att öka kunskapen om hur inflammationsprocesser kan leda till bennedbrytning vid tillstånd som parodontit, reumatoid artrit, lossnade ledproteser, ortodontisk tandflyttning med mera.

DELARBETEN

- I.** Brechter AB, Lerner UH. Characterization of bradykinin receptors in a human osteoblastic cell line. Regul Pept 2002; 103: 39–51.
- II.** Brechter AB, Lerner UH. Bradykinin potentiates cytokine-induced prostaglandin

biosynthesis in osteoblasts by enhanced expression of cyclooxygenase-2, resulting in increased RANKL expression. Arthritis Rheum 2007; 56 (3): 910–23.

- III.** Brechter AB, Persson E, Lundgren I, Lerner UH. Kinin B1 and B2 receptor

expression in osteoblasts and fibroblasts is enhanced by interleukin-1β and tumour necrosis factor-α – Effects dependent on activation of NF-κB and MAP kinases. Submitted.

- IV.** Brechter AB, Lerner UH. IL-4 and IL-13 inhibit cytokine-

induced enhancements of COX-2 and kinin receptor expression – Effects important for their inhibition of the synergistic stimulation of PGE₂ formation caused by co-treatment with cytokines and kinins.

Signalsystem samverkar vid bennedbrytning

Opponenten har ordet



Hans-Erik Claesson
professor, institutionen för medicinsk biokemi och biofysik, Karolinska institutet
E-post: Hans-Erik.Claesson@ki.se

Anna Bernhold Brechters avhandlingsarbete syftar till att öka vår förståelse av inflammationsprocessens roll vid bennedbrytning. Inflammatoriska reaktioner spelar en viktig roll vid många patofysiologiska tillstånd som parodontit och reumatoid artrit. Det finns ett stort medicinskt behov av att utveckla nya antiinflammatoriska läkemedel för behandling av inflammatoriskt betingad bennedbrytning.

Prostaglandin (PGE₂) och bradykinin spelar en central roll vid inflammatoriskt inducerad bennedbrytning och Annas avhandlingsarbete har fokuserats på att kartlägga mekanismerna som leder till ökad PGE₂-bildning och uttrycket av receptorer för bradykinin och RANK.

Studien ger en viktig insikt i att samverka mellan olika inflammatoriska mediatorer ger en mycket större effekt än mediatorernas effekt var för sig på PGE₂-bildningen och receptoruttryck. Det är möjligt att effektiv behandling av inflammatoriskt inducerad bennedbrytning kräver samtidigt bruk av flera läkemedel med olika verkningsmekanismer.

Nyckelspelare i inflammationsprocessen är ändå PGE₂ och avhandlingsarbetet belyser behovet av att utveckla nya läkemedel som specifikt blockerar mikrosomalt PGE-syntas 1 – enzymet som katalyserar sista steget vid bildningen av PGE₂. Dessa »tredje generationens« NSAID (non-steroidal antiinflammatory drugs) kommer förhoppningsvis att vara effektiva läkemedel för behandling av parodontit, utan de traditionella NSAIDs gastrointestinala biverkningar eller COX-hämmarnas kardiovaskulära bieffekter. ■

Tandläkartidningen har ny kostym på nätet!



www.tandlakartidningen.se

**TANDLÄKAR
TIDNINGEN**