

Ny indsigt i mundens muciner

Peter A. Nielsen

Spyttets kvalitet og mængde er vigtig for opretholdelse af sundhed i mundhulen. Spyt består af en række komponenter som hver for sig tjener specifikke formål. Sygdom i mundhulen kan opstå ved at en eller flere af disse komponenter ikke kan opfylde de opgaver som er nødvendige for at bevare sundheden. En af spyttets vigtigste komponenter kaldes muciner. Muciner er ansvarlige for spyttets viskositet, men har derudover også andre funktioner. Muciner binder bl.a. mikroorganismer og er både ansvarlige for at bakterier kan kolonisere tandpelliklen og for at bakteriemængden i munden holdes nede ved at mucinerne synkes.

Nærværende artikel er et sammendrag af den nuværende viden om spyttets muciner og er baseret på en af forfatteren indleveret ph.d.-afhandling.

Spyttets rolle for bevarelse af oral sundhed illustreres hos patienter som af den ene eller anden årsag har nedsat spytsekretion; fx patienter som bliver behandlet med tricykliske antidepressiva, radioterapi pga. kræftsvulster, eller patienter som lider af Sjögrens syndrom. Alle disse patienter har foruden nedsat spytsekretion typisk en kraftigt øget tendens til caries og svampeinfektioner i mundhulen og klager over svien og brænden fra slimhinderne.

Hvorfor virker spytet beskyttende på tænder og slimhinder?

Spyttets komponenter

Spyt indeholder en række komponenter ud over vand. Nogle af disse komponenter er små molekyler såsom ioner og salte. Fx indeholder spytet bicarbonat, som neutraliserer syrepåvirkning, og kalcium- og fosfat-ioner, som modvirker opløsning af tænderne. Andre af spyttets komponenter er forskellige større molekyler af proteinstof, som ligeledes har specifikke funktioner i mundhulen. Fx inhiberer statherin udfældning af kalciumfosfatsalte, histatiner har antibakteriel og antimykotisk virkning, og cystatiner menes at have hæmmende virkning på proteaser som destruerer parodontiet ved parodontitis marginalis. Immunsystemet er repræsenteret i form af sekretorisk IgA i spyt hvorved mikroorganismer kan bindes og uskadeliggøres. Den vigtigste komponent for spyttets smørende effekt kaldes muciner. Muciner er ansvarlige for spyttets viskøse, tyktflydende karakter (Fig. 1). Hvis mucinerne manglede i spyt, ville spytet have konsistens som vand og ikke virke smørende på mundens slimhinder, med be-



Fig. 1. Spyttets tyktflydende karakter skyldes muciner.

Fig. 1. The visco-elastic properties of saliva are due to glycoprotein molecules termed mucins.

tydelige gener til følge. Desuden binder bakterier og vira sig til muciner. Eftersom en type af spytmucin er en hovedkomponent i tandpelliklen, spiller muciner en rolle i bakteriers kolonisering af tænderne (1). En anden type af mucin i spytet indgår ikke i tandpelliklen, men er ansvarlig for at mundens bakteriemængde holdes nede. Dette foregår ved at mucinet binder bakterier som således bliver nedsvælget når mucinet synkes (1). Der findes studier som viser at hos individer med øget cariesaktivitet har dette spytmucin en betydelig nedsat evne til at binde orale mikroorganismer (2).

Hiv uskadeliggøres af spytmucin

Det er endnu ikke fuldstændigt afklaret i hvor høj grad hiv er smitsomt gennem spyt. Undersøgelser tyder på at kun få hiv-positive patienter har infektiøse hiv-partikler i spytet (3). Da hiv bindes til et bestemt spytmucin og hermed neutraliseres (4), er dette muligvis grunden til at hiv tilsyneladende kun i ringe grad kan smitte gennem spyt.

Ph.d.-projektets formål

Nærværende projekt havde til formål at identificere og karakterisere spytets muciner på det molekylære plan. Indsigt i muciners syntese, strukturer og genetiske regulering er afgørende for forståelsen af disse molekylers rolle i sygdom og sundhed. Fx er det kendt fra klinikken at spytets viskositet varierer mellem individer, undertiden med betydelige gener

til følge for patienter (og tandlægen), men baggrunden herfor, om viskositetsforskellene fx er arvelige, er ukendt. Det vides heller ikke om ændringer i mængden eller sammensætningen af mucin har betydning for »burning-mouth syndrome« eller Sjögrens syndrom, eller hvilke specifikke defekter cariesaktive individer har i deres spytmuciner. Manglen på denne viden skyldes i høj grad at meget lidt er kendt om spytmuciners struktur og funktion selv under normale forhold og at der ikke har eksisteret reagenser til at identificere muciner i spyt og bestemme mucinmængden. Muciner har tidligere været vanskelige at studere bl.a. pga. deres modstandsdygtighed mod proteolytiske enzymer. Imidlertid er det med moderne molekylærbiologiske teknikker blevet muligt at isolere gener mv. og få et detaljeret indblik i mucinernes strukturer.

Muciner

Hvad er muciner?

Muciner er molekyler som ikke kun findes i spytet, men også i slimsekreter fra andre organer, såsom lungerne og mave-tarm-systemet. Fra studier af muciner herfra ved vi hvordan muciner generelt er opbygget, og hvordan de har betydning for sekretets viskositet og binding af mikroorganismer. Som illustreret i Fig. 2A er et mucin opbygget af en proteinkerne som bærer sukksidekæder. Dette er i modsætning til de fleste af de proteiner som vores krop er opbygget af, fx keratiner i hår, negle og hud, antistoffer i blod og spyt osv. ►

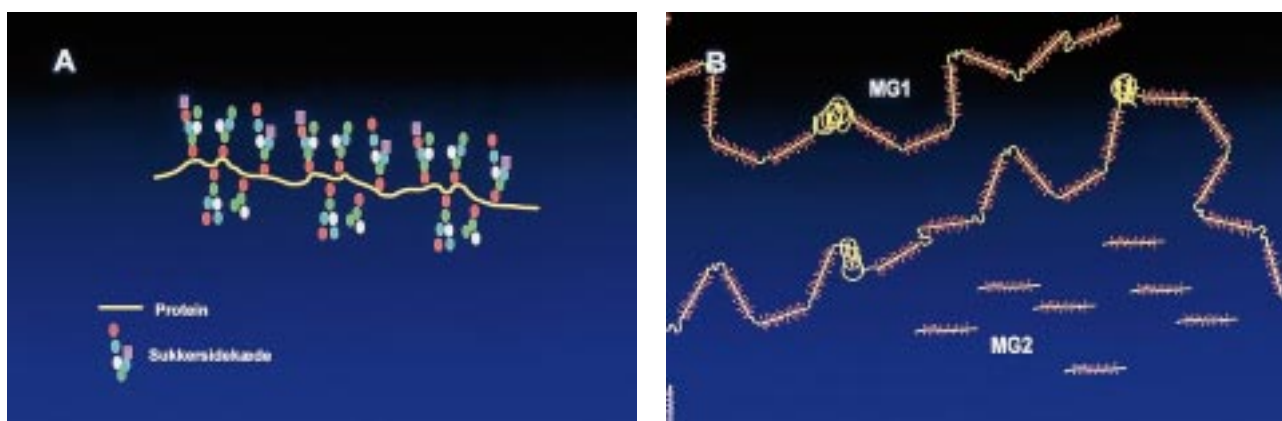


Fig. 2. Strukturen af mucinmolekyler i spyt. A: Et mucinmolekyle består af en proteinkerne som er dækket af sukksidekæder. B: Et mucin i spyt danner lange polymerer ved at mucinmolekylernes proteinkerner bindes til hinanden (dette mucin kaldes MG1). Disse polymerer gør spytet viskøst. En anden type af mucin i spyt findes som enkeltmolekyler (dette mucin kaldes MG2). Mucin af enkeltmolekyletypen bidrager ikke væsentligt til spytets viskositet, men bidrager til at bakteriemængden i mundhulen holdes nede ved at mucinet synkes.

Fig. 2. The structure of mucin-glycoproteins in saliva. A: A single mucin molecule contains a protein core to which carbohydrate side-chains are attached. B: One type of mucin in saliva forms polymers by linking the ends of the protein cores (MG1). A different mucin in saliva is found as monomers (MG2). This mucin does not contribute significantly to the viscosity of saliva, but is important in clearing the oral cavity of bacteria.

Disse molekyler består hovedsagelig af proteinstof og indeholder mindre sukker. Mucinernes sukkersidekæder kan »binde« vand hvilket muliggør at slimsekreter er klæbrige. Samtidig er også bindinger mellem mucinernes proteinkerner vigtige for spytets viskositet (Fig. 2B). Hvis spytet til sættes stoffer som bryder bindingerne mellem mucinets proteinkerner, reduceres spytets viskositet drastisk. Dette skyldes at mucinpolymerer bliver spaltet i enkeltmolekyler og derved ikke kan danne lange, sammenhængende tråde.

Hvordan dannes muciner?

Dannelsen af et mucinmolekyle starter med det gen (et stykke dna) som koder for et mucinmolekyles proteinkerne (Fig. 3). Dette gen findes i alle kroppens celler, men kommer kun til udtryk hvor mucinmolekylerne bliver dannet, fx i spytkirtelcellerne. Det udtrykte gen er en skabelon som indeholder den nødvendige information til at cellerne kan syntetisere mucinmolekylets proteinkerne. Hvis man kender genet som koder for et givet protein, kan man altså direkte forudsige hvordan proteinet ser ud. En række mucinproteinkerner er i dag kendt fra andre mucinproducerende organer ud over spytkirtler. Disse proteinkerner er kendt idet deres gener er blevet isoleret og karakteriseret. Forskellige mucinproteinkerner er udtrykt i forskellige organer og celletyper. Fx er mucinet fra tyk- og tyndtarmens bægerceller (mucinproducerende celler) forskelligt fra mucinet i luftrørets bægerceller. Forskelle i muciner fra forskellige væv må formodes at give anledning til slimsekreter med forskellige egenskaber. Efter dannelsen af proteinkernen sættes sukkersidekæder på. Dette foregår også inde i de mucinproducerende celler hvor enzymer sætter sukrene på én ad gangen, til sukkersidekæderne typisk er 4-20 sukre lange (Fig. 3).

Hvilke muciner findes i spyt?

I spyt findes to forskellige muciner, et stort kaldet MG1 og et mindre kaldet MG2 (5). Det store MG1-mucin er ansvarlig for spytets viskositet. Viskositeten fremkommer når enderne på dette mucins proteinkerner bindes til hinanden og danner polymerer (Fig. 2B). MG1-mucinet er en af hovedkomponenterne i tandpelliklen og har stor betydning for adhæsion af bakterier til tandoverfladen. Det mindre mucin, MG2, findes derimod i spytet som enkeltmolekyler og bidrager ikke væsentligt til spytets viskositet. Dette mucin binder hiv og en række orale bakterier. Grunden til at MG1 og MG2 kan binde forskellige mikroorganismer er sandsynligvis at de to muciner har forskellige sukkersidekæder (6).

Spytmuciners proteinkerner

Hvordan ser MG1- og MG2-proteinkernerne ud, og i hvilke

spytkirtler og celler syntetiseres disse muciner? Genet som koder for MG2 blev isoleret og karakteriseret af amerikanske forskere i 1993 (7). MG2-mucinet findes udelukkende i spyt, og måske i luftvejene, men ikke andre steder i kroppen. Der har hersket nogen forvirring om hvilke spytkirtler og hvilke celler der producerer dette mucin. Spytkirtlerne har både mukøse og serøse celler hvoraf de mukøse indeholder store mængder af mucin. Man har tidligere ment at nogle mukøse celler producerede MG1 mens andre mukøse celler producerede MG2.

For at kunne bestemme hvor MG1 og MG2 syntetiseres, har vi fremstillet en række monoklonale antistoffer mod disse to muciners proteinkerner (8). Monoklonale antistoffer kan genkende specifikke proteinstrukturer. Disse antistoffer har afsløret at vævsfordelingen af MG1 og MG2 er anderledes end hidtil antaget. MG1-proteinkernen bliver syntetiseret i alle spytkirtlernes mukøse celler, dvs. i gl. sublingualis, gl. submandibularis og de små spytkirtler fra læbe og gane. Dette er i overensstemmelse med kliniske observationer, nemlig at de små spytkirtler i ganen producerer sejt, klæbrigt spyt (Fig. 1)

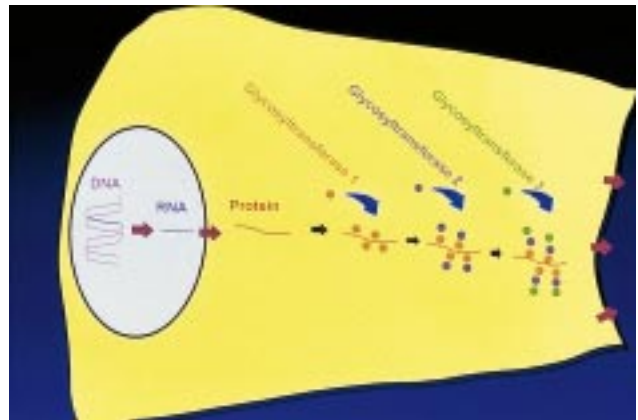


Fig. 3. Syntesen af muciner. Et gen (dna) som koder for proteinkernen findes i alle kroppens celler, men er inaktivt i de fleste celler. I spytkirtlerne er genet aktivt, og udtrykkes i form af rna i cellekernen. Dette rna »oversættes« til protein i cellernes ribosomer. Dernæst får proteinkernen sat sukre på til sidekæderne er 4-20 sukre lange. Herefter secernerer mucinmolekylet til spytet. For nogle muciner er syntesen mere kompliceret idet molekylerne danner lange kæder inde i cellerne.

Fig. 3. The synthesis of mucin-glycoproteins. A gene (DNA) encoding the mucin protein core is present in all cells, but is inactive in most. The gene is active in salivary glands, and is expressed in the form of RNA in the cell nucleus. This RNA is translated to proteins in the ribosomes. Sugars are attached to the protein core, until the side-chains are 4-20 sugars long. The mucin-glycoprotein is hereafter secreted to saliva. The synthesis of some mucin-glycoproteins is more complex, as the molecules form polymers inside the cells.

mens gl. parotis, som kun indeholder serøse celler, producerer tyndtflydende spyt. I modstrid med tidligere opfattelse fandt vi at MG2, det lille mucin, ikke kommer fra mukøse celler, men fra serøse celler i gl. submandibularis og gl. sublingualis (Fig. 4). De serøse celler i gl. parotis producerer ikke MG2. Der er altså forskel på de serøse celler i forskellige spytkirtler, og forskellige muciner kommer henholdsvis fra serøse og mukøse celler.

Det er interessant at bemærke at der også findes et stort og et lille spytmucin hos mus, rotte og ko. Måske er det nødvendigt for alle pattedyr at have et lille spytmucin for at holde mundens bakteriemængde nede. Alle pattedyr har også et stort spytmucin for at give spytet viskositet.

Genet som koder for MG1-proteinkernen

Vha. antistoffet mod MG1 isolerede vi en del af det gen som koder for MG1-proteinkernen. Da vi analyserede denne genstump, viste det sig at være et kendt gen, nemlig genet som også koder for mucinproteinkernen i de submukøse mucin-

producerende kirtler i luftrøret. For at kontrollere om det er rigtigt at alle mukøse celler i spytkirtlerne producerer denne proteinkerne, undersøgte vi med in situ-hybridisering om spytkirtelcellerne udtrykker genet. Dette forsøg bekræftede at alle mukøse celler udtrykker luftrørmucingenet (9). Det er altså det samme mucin, kodet af samme gen, som gør både spytet og luftrørsslim viskøst.

Fremtid

Vi har nu reagenser som specifikt genkender spyttets mucin-kerner og deres gener. Disse vil sætte os i stand til at undersøge hvordan spytmucinerne udtrykkes og ændres under forskellige sygdomme i mundhulen. På langt sigt vil det også med denne nye viden være muligt at finde ud af om fejl i dette gen hos nogle individer ændrer deres muciner, og om individerne derved bliver mere modtagelige for fx caries. Flere forskningsgrupper i udlandet er nu gået i gang med at undersøge mucinerne i luftrøret hos patienter med cystisk fibrose vha. de antistoffer og genprober mod spytmucin som vi har ►

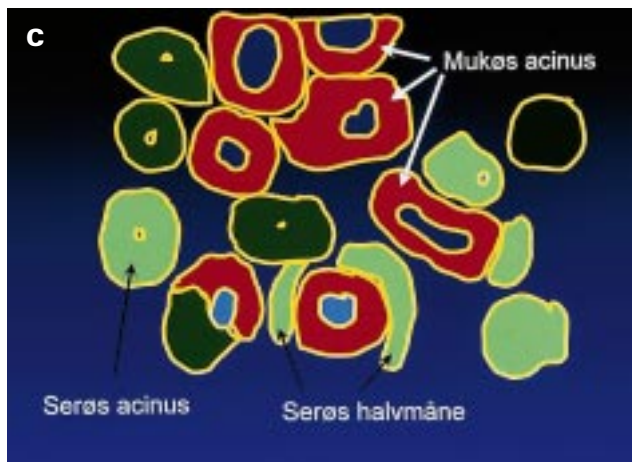
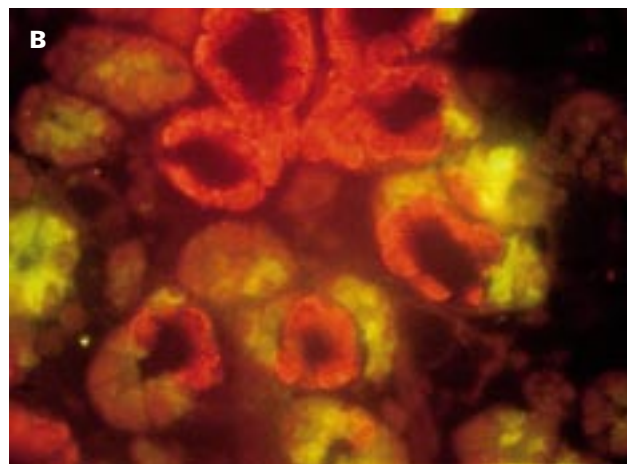
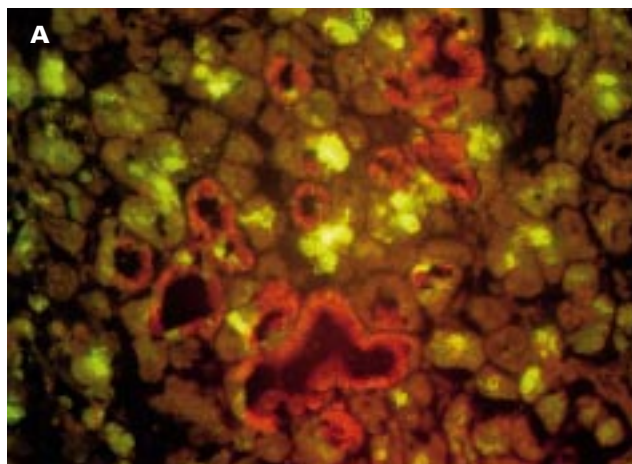


Fig. 4. Immunohistologisk billede af gl. submandibularis farvet med et antistof mod MG1 (rød) og et antistof mod MG2 (grøn). Alle mukøse celler indeholder MG1; nogle serøse celler indeholder meget MG2. A: Overblik. B: Detalje. C: Skematisk repræsentation af (B) med celletyper anmærket.

Fig. 4. Immunohistological staining of the submandibular gland by an anti-MG1 antibody (red) and an anti-MG2 antibody (green). All mucous cells contain MG1; some serous cells stain intensely for MG2. A: Overview. B: Detail. C: Schematic representation of (B) with cell types marked.

fremstillet. Eftersom vi nu kender genet som koder for det mucin som gør spytet viskøst, vil man på langt sigt kunne fremstille dette mucin vha. genteknologi. Dette kan være af betydning for at udvikle forbedrede typer af kunstigt spyt til xerostomipatienter.

På vej mod indsigt i mundslimhindens muciner

Det har i de seneste år vist sig at mucinlignende molekyler også findes på overfladen af de celler som beklæder slimhinderne i bl.a. mundhulen. Disse muciner sidder fast på epitelcellerne og bidrager altså ikke til spytets viskositet. Derimod er disse muciner muligvis ansvarlige for at spytets muciner kan » glide « på slimhinden. Vi har identificeret et cellebundet mucin som findes i kindens ydre cellelag. Det viser sig at dette mucin ikke blot findes i mundslimhinden, men også i en række slimhinder som er opbyggede som mundslimhinden, dvs. i svelget, spiserøret, livmoderhalsen og i skeden. Kendskab til dette mucinlignende molekyle har derfor generel medicinsk betydning. Desuden findes mucinet udtrykt i pochernes sulcus-epitel, men kun i små mængder i resten af gingiva. Overraskende viser det sig at dette mucin fuldstændigt forsvinder i mundhule karcinomer og i livmoderhals karcinomer (Fig. 5) (10). Grunden til dette er endnu ukendt. Det vil derfor forbedre vores forståelse af mundhulecancer at få kendskab til det gen som koder for mucinet og de reguleringsmekanismer der styrer hvornår dette gen bliver udtrykt. Samtidig vil det være interessant at få belyst,

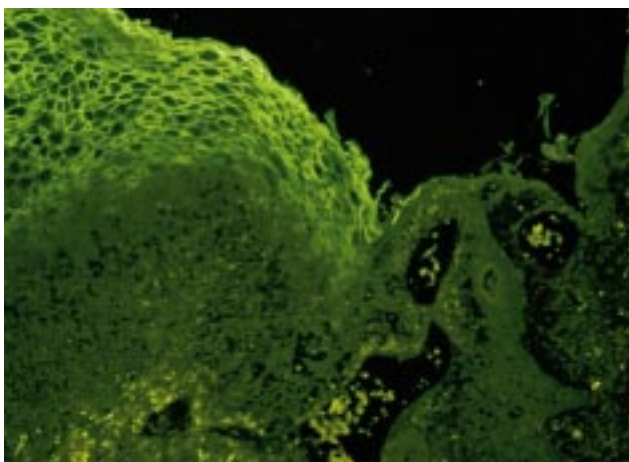


Fig. 5. Immunhistologisk billede af normal kindslimhinde (til venstre) grænsende op til et planocellulært karcinom (til højre) farvet med et antistof mod cellebundet mucin.

Fig. 5. Immunohistological staining of normal buccal mucosa (left) bordering a squamous cell carcinoma (right) stained with an antibody against a membrane-bound mucin-glycoprotein. Complete loss of the mucin is observed in the carcinoma.

hvilken rolle mucinet spiller i normal slimhinde. Eftersom mikroorganismer hovedsagelig bindes til sukkerstrukturer i slimhinden ved invasion, er det muligt at mucinet spiller en rolle for bakterie- og svampekolonisation af poche- og gane-epitel. ■

Ph.d.-projektet er gennemført i Glykobiologi-gruppen, Afdeling for Oral Diagnostik, Odontologisk Institut, Københavns Universitet. Vejledere har været docent, dr.odont. *Henrik Clausen* og professor, dr.odont. *Erik Dabelsteen*.

Tak til Det Sundhedsvidenskabelige Forskningsråd, Kræftens Bekæmpelse, Lundbeck Fonden, Ingeborg Roikjær Fonden, og Velux Fonden for økonomisk støtte til Glykobiologi-gruppen.

English summary

New insight into oral mucins

Mucins are the glycoproteins in saliva and mucous secretions which are mainly responsible for the viscoelastic properties of these secretions. Mucin molecules contain a central protein core to which glycans are attached. We here describe the development of monoclonal antibodies against the protein-cores of salivary mucins and the cloning of high-molecular-weight salivary mucin. The implications of these findings are discussed. Mucin molecules are also found attached to cell membranes of epithelia, including the buccal mucosa and gingiva. We have identified a novel membrane-bound mucin-glycoprotein expressed in non-keratinized stratified squamous epithelia. This mucin-glycoprotein is down-regulated in oral and cervical squamous cell carcinomas.

Litteratur

1. Tabak LA. Structure and function of human salivary mucins. *Crit Rev Oral Biol Med* 1990; 1: 229-33.
2. Slomiany BL, Piotrowski J, Czajkowski A, Shovlin FE, Slomiany A. Differential expression of salivary mucin bacterial aggregating activity with caries status. *Int J Biochem* 1993; 25: 935-40.
3. Barr CE, Millar LK, Lopez MR, Croxson TS, Schwartz SA, Danman H, et al. Recovery of infectious HIV-1 from whole saliva. *J Am Dent Assoc* 1992; 123: 37-48.
4. Bergey EJ, Cho MI, Blumberg BM, Hammarskjold ML, Rekosh D, Epstein LG, et al. Interaction of HIV-1 and human salivary mucins. *J Acquired Imm Def Synd* 1994; 7: 995-1002.
5. Ramasubbu N, Reddy MS, Bergey EJ, Haraszthy GG, Soni SD, Levine MJ. Large-scale purification and characterization of the major phosphoproteins and mucins of human submandibular-sublingual saliva. *Biochem J* 1991; 280: 341-52.
6. Prakobphol A, Leffler H, Fisher SJ. The high-molecular-weight human mucin is the primary salivary carrier of ABH, Le(a), and Le(b) blood group antigens. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4: 325-33.
7. Bobek LA, Tsai H, Biesbrock AR, Levine MJ. Molecular cloning, sequence, and specificity of expression of the gene encoding the

- low molecular weight human salivary mucin (MUC7). *J Biol Chem* 1993; 268: 20563-9.
8. Nielsen PA, Mandel U, Therkildsen MH, Clausen H. Differential expression of human high molecular weight salivary mucin (MG1) and low molecular weight salivary mucin (MG2). *J Dent Res* 1996; 75: 1820-6.
 9. Nielsen PA, Bennett EP, Therkildsen MH, Hannibal J, Wandall HH, Clausen H. Identification of a major human high molecular weight salivary mucin (MG1) as MUC5B. Mucous cells of all salivary glands express MUC5B while serous cells of some salivary glands express MUC7. *Glycobiology* (in press).
 10. Nielsen PA, Mandel U, Therkildsen MH, Ravn V, David L, Reis CA, et al. Loss of a mucin-like epithelial glycoprotein in oral and cervical squamous cell carcinomas. *Cancer Res* (in press).

Forfatter

Peter Aagaard Nielsen, cand.odont.

Afdeling for Oral Diagnostik, Odontologisk Institut, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet.

Forsvaret af ph.d.-afhandlingen »Oral mucins« af cand.odont. *Peter Aagaard Nielsen* finder sted d. 24. januar 1997 kl. 14.30 i Hannover-auditoriet på Panuminstituttet, København. Opponent er lektor, dr.med. *Gunnar Hansson*, Göteborg Universitet, dr.med. *Ingemar Carlstedt*, Lund Universitet, og lektor, dr.odont. *Dennis Moe*, Odontologisk Institut, Københavns Universitet. Forsvaret indbefatter et foredrag på 45 minutter af *Peter Aagaard Nielsen* og dernæst selve forsvaret, som typisk varer 30-60 minutter. Foredraget vil blive holdt på engelsk. Alle er velkomne.