

# ADAM8-fuusioproteiinin osuus nivelreuman pannuksen invaasioissa luuhun

Ainola M<sup>1,2,3</sup>, Konttinen YT<sup>1,3,4</sup>, Li TF<sup>1,2</sup>, Mandelin J<sup>2</sup>, Hukkanen M<sup>2</sup>, Choi SJ<sup>6</sup>, Salo J<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Sisätautien osasto, Helsingin yliopistollinen sairaala; <sup>2</sup>Biolääketieteenlaitos/ Anatomia, Helsingin Yliopisto; <sup>3</sup>Tieteellinen tutkimus ORTON; <sup>4</sup>Tekonivelsairaala COXA; <sup>5</sup>Ortopedian laitos, Rochesterin yliopisto, Rochester, NY; <sup>6</sup>Hematologian ja Onkologian osasto, Lääketieteenlaitos, Pittsburgin Yliopisto, PA; <sup>7</sup>Ortopedian ja traumatologian klinikka, Helsingin yliopistollinen sairaala

Nivelreumassa tulehtunut kudosalvo eli pannus kasvaa nivelruston päälle muodostaen kroonisen synoviittikudoksen, joka aiheuttaa ruston ja rustonalaisen luun tuhoa johtaen eroosioiden muodostumiseen luussa. Luun tuhoutumiseen osallistuvat monitumaiset luunsyöjäsolut muodostuvat monosyytti/makrofaageista fuusioitumalla. Olimme aiemmin osoittaneet monitumaisten solujen esiintymisen pannuskudoksessa ja nyt halusimme määrittää tarkemmin mahdolliseen fuusioon osallistuvan disintegrini-metalloproteiinaasi ADAM8:n ilmenemisen pannuskudoksessa sekä selvittää lähemmin sen funktiota fuusioituvissa soluissa. Tutkimustuloksemme osoittavatkin ADAM8:n ekspresion niin proteiini- kuin lähetti-RNA-tasoilla lisääntyneen tulehtuneessa reumakudoksessa sekä myös luunsyöjäsolujen fuusioitumisen aikana. Funktionaalisesti ADAM8:n yliekspressio lisäsi luunsyöjäsolujen muodostumista, kun taas ADAM8:n ekspresion hiljentämisen vaikutus oli päinvastainen.

## Johdanto

Nivelreumassa tuntematon antigeeni saavuttaa nivelkalvokudoksen aiheuttaen paikallisen immuunivasteen, joka johtaa jatkuvaan nivelkalvon tulehdukseen. Tulehtunut nivelkalvo eli pannus kasvaa kiinni rustoon aiheuttaen sen sekä alla olevan luun tuhoutumisen (1,2). Pannuksen etenevä reuna muodostuu fibroblastin ja makrofaagin kaltaisista soluista (3), jotka tuottavat nivelrustoa ja luuta tuhoavia proteinaaseja sekä muodostavat luunsyöjäsolujen eli osteoklastien syntyyn tarvittavia tekijöitä.

ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) perheen proteiinit ovat solukalvon läpäiseviä glykoproteiineja, joilla kaikilla on sekä disintegrini- että metalloproteiinaasiosa (4). Solunulkoinen aminoterminaalinen osa muodostuu propeptidistä eli aktivaatiopeptidistä, jota seuraa soluväliaineen pilkkoutumiseen osallistuva metalloproteiinaasiosa. Disintegrini ja kysteiniirikkaat osat seuraavat metalloproteiinaasiosaa ja ovat osallisena soluadheesioissa sekä muodostavat

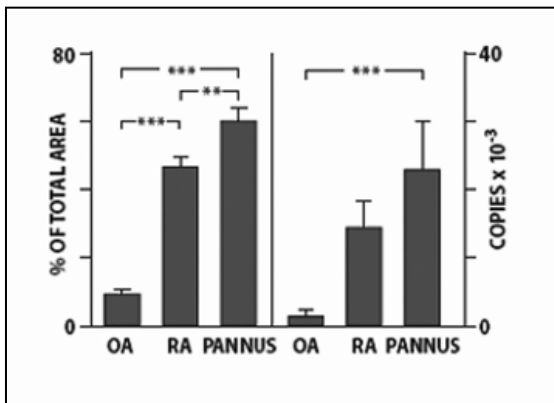
virusinfektioiden yhteydessä syntyvien fuusiomolekyylien kaltaisia rakenteita. ADAM8:n, 9:n ja 12:n onkin aiemmin osoitettu olevan osallisena solu-solufuusioon (5–7). Näiden samojen proteiinien lisääntynyt ekspresio aseptisesti irronneen tekonivelen välikalvokudoksessa sekä aktivoituminen monitumaisten solujen muodostumisen yhteydessä puolestaan osoittaa näiden proteiinien osallisuuden tekonivelen irtoamiseen tuhoamalla ympäröivää luuta (8–10)

Kudostuhon mekanismien ymmärtäminen antaa keinoja täsmähoitoihin, joilla voidaan pyrkiä estämään nivelreumaan liittyviä rakenteellisia toimintakyvyn alenemiseen ja elämänlaadun huononemiseen johtavia muutoksia. Tarkempi selvitys luunsyöjäsolujen fuusion mekanismeista mahdollistaisi saamaan profylaktiset fuusion estäjät tiloihin, joissa luunsyöjäsolut aiheuttavat kudostuhoa.

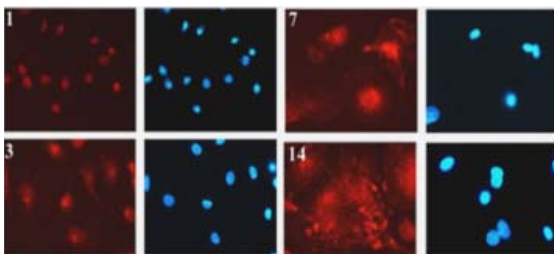
## Menetelmät

Disintegrini-metalloproteiinaasi ADAM8:n osuut-

ta nivelreumassa tutkittiin immunohistokemiallisesti proteiinien ja in situ -hybridisaatiolla lähetti-RNA paikallistamisen avulla nivelreuman pannuksesta verrattuna nivelreuman ja nivelrikon ei-tulehtuneeseen nivelkalvoon. ADAM8:n osuutta solujen yhteensulautumisessa tutkittiin käyttämällä perifeerisen veren yksitumaisia soluja (monosyyttejä) sekä hiiren monosyytti/makrofaagi-linjan (RAW 264.7) soluja multinukleaaristen solujen esiastesoluina kasvattamalla niitä osteoklastien erilaistumistekijän RANK-ligandin (receptor activator of nuclear factor kappa B ligand) kanssa sekä humaanisolut myös monosyyttikasvutekijän M-CSF:in (macrophage-colony stimulating factor) kanssa. ADAM8-proteiinin ilmentyminen hiljennettiin RAW-soluissa käyttäen RNA-interferenssitekniikkaa (siRNA), joka hidastaa proteiinin muodostumista. Vastaavasti nopeutunutta muodostusta tutkittiin lisäämällä ADAM8-proteiinin tuotantoa siirtämällä RAW-soluihin kloonattu, täyspitkä ja vilityyppinen komplementaarinen ADAM8-DNA. ADAM8:n esiintymistä tutkittiin proteiinitasolla



Kuva 1. Prosentuaalinen ADAM8:n immunohistokemiallinen värjäytyminen kokonaisalasta sekä ADAM8:n kvantitatiiviset lähetti-RNA kopiolutut (per 1000 beta-aktiinia) nivelrikon (OA) ja nivelreuman synoviaalikudoksessa (RA) sekä pannuskudoksessa. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ .

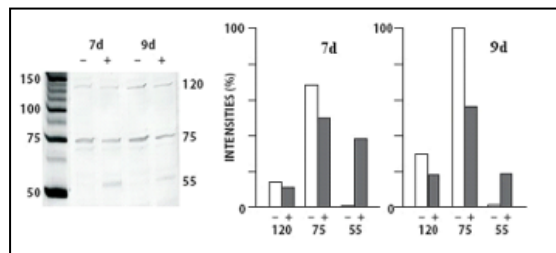


Kuva 2. ADAM8-proteiinin ilmeneminen stimuloituissa monosyyteissä (1, 3, 7 ja 14 päivät) käyttäen immunokemiallista värjäytymistä. DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) värjäsytymien osoittamiseksi (x 600).

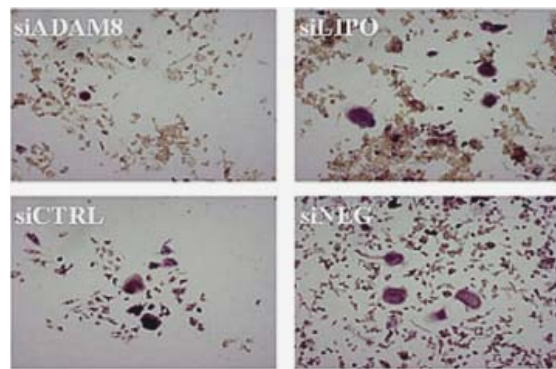
myös käyttäen western blottausta, virtausytometriaa ja immunofluoresenssia, joissa ADAM8-proteiinin eri muodot (promuoto, katalyyttisesti aktiivinen muoto ja fuusioaktiivinen muoto) pystyttiin osoittamaan spesifisesti sitoutuvien vasta-aineiden avulla. ADAM8:n geenin ilmentymistä tutkittiin kvantitatiivisesti lähetti-RNA-tasolla (qRT-PCR). TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase) värjäystä sekä kvantitatiivista luunsyöjäsolumarkkereiden (TRAP, katepsiini K, Integriini beta-3, kalsitoniinireseptori) RT-PCR:ää käytettiin osoittamaan monitumaiset osteoklastityypiset solut.

### Tulokset

Nivelreuman pannuksen osoitettiin niin proteiini- kuin lähetti-RNA-tasoilla selkeästi lisänneen ADAM8:n tuotantoa (kuva 1). Monosyytit tuottavat stimuloitaessa lisää ADAM8-molekyylejä valmistautuessaan fuusioon, sillä stimuloituissa monosyyteissä ADAM8:n värjäytyminen lisääntyi kasaamina fuusioituvien solujen sisällä (kuva 2). ADAM8:n lähetti-RNA-tuo-



Kuva 3. Western blotting osoittaa ADAM8-proteiinin eri muodot ei-stimuloituissa (-) ja stimuloituissa (+) monosyyteissä (120 kD promuoto, 75kD metalloproteinaasimuoto, 55 kD disintegriinimuoto). Värjäytymisen voimakkuudet on osoitettu prosentuaalisesti korreloituna vahvimpaan muotoon.



Kuva 4. TRAP-positiivisten solujen ilmeneminen stimuloituissa monosyyteissä, joissa ADAM8 hiljennetty (siADAM8), kontrolli siRNA-alukkeet (siCTRL), kontrolli ilman alukkeita (siLIPO) tai kontrolli ilman mitään lisättyä aineita (siNEG).

tanto kasvoi monitumaisten solujen muodostumisen aikana ja samanaikaisesti huomattiin ADAM8:n proteiinin pilkkoutuminen ensiksi proteolyttisesti aktiiviin metalloproteiinaasimuotoon ja sitten vielä proteinaasittomaan fuusioaktiiviseen muotoon (kuva 3). ADAM8:n ilmenemisen hiljentäminen aiheutti monitumaisten TRAP+-solujen muodostuksen (kuva 4), kuten myös osteoklastimarkkereiden ekspresion alenemisen, kun taas vastaavasti ADAM8:n ylituotanto lisäsi muodostusta.

## Pohdinta

Nivelreuma on yleisin niveltulehduksen tyypeistä ja huolimatta tehokkaasta tutkimuksesta sairauden syy on edelleen epäselvä. Pannuksen tuottamat proteolyttiset entsyymit mahdollistavat sen etenemisen ruston läpi alla olevaan luuhun sitä tuhoten. Tällöin pannuskudoksen makrofaagin kaltaiset solut alkavat mahdollisesti fuusioitua muodostaen monitumaisia luunsyöjäsoluja. Tutkimuksemme osoittavatkin pannuksessa olevien monitumaisten solujen läsnäolon ja nyt myös mahdollisen fuusioon osallistuvan matriksi-metalloproteiinaasin ADAM8:n lisääntyneen ilmenemisen pannuksessa ja erityisesti pannus-kovakudoksen rajapinnalla.

ADAM8-proteiini aktivoituu ensiksi proteolyttisesti aktiiviseksi kun propeptidin pilkkoutuminen paljastaa metalloproteiinaasiosan. Metalloproteiinaasiosan irtoaminen, joka on mahdollisesti autokatalyyttinen, paljastaa fuusioon tarvittavat disintegrointi- ja kysteiniirikkaat osat (11), johon tulostemme perusteella tarvitaan myös luunsyöjäsoluja stimuloivat tekijät RANK-ligandi ja M-CSF. ADAM8:n rakenteen muuttumisen osoitus proteolyttisesti aktiivisesta mahdolliseen fuusioaktiiviseen muotoon monitumaisten solujen muodostuessa viittaa näin ollen myös ADAM8:n rakenteellisen toiminnan osuuteen solufuusiassa.

Tarkemmin funktionaalista toimintaa tutkiesä käytimme transfektiota lisätäksemme ADAM8-proteiinin tuotantoa stimuloituissa monosyyteissä ja huomasimme niin värjäysten kuin kvantitatiivisten osteoklastimarkkereidenkin perusteella, että monitumaisten luunsyöjäsolujen muodostuminen näissä soluissa lisääntyi merkittävästi. Halusimme myös osoittaa toteen saman asian mutta päinvastoin eli hiljensimme ADAM8:n tuotantoa stimuloituissa monosyyteissä ja kuten olettaa saattoi, tulokset olivat niin TRAP-positiivisten solujen osalta kuin osteoklastimarkkereiden lähetti-RNA-tasojen perusteella juuri

päinvastainen kuin transfektiotaalyyysien perusteella.

Tulokset osoittavat ADAM8-proteiinin lisääntyneen ilmenemisen niin kudosis- kuin solutasolla ja erityisesti monitumaisten luunsyöjäsolujen muodostumisen eli solufuusion aikana. Kuitenkaan tarkkaa molekulaarista mekanismia ei vielä tiedetä ja se jää epäselväksi, mutta mahdollisesti ADAM8-positiivisten solujen disintegroiniossa on vuorovaikutuksessa muodostuvan luunsyöjäsolun integriinireseptorin kanssa muodostaen solu-solu-kontaktin. ADAM8:n rooli tällaisessa kontaktimallisissa voisi olla solujen aktivoiminen mahdollisen fuusioitumisen helpottamiseksi.

## Kirjallisuus

1. Fassbender HG, Gay S: Synovial processes in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 1988;Suppl 76:1-7.
2. Zvaifler NJ, Firestein GS: Pannus and pannocytes. Alternative models of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994;37:783-789.
3. Shiozawa S, Shiozawa K, Fujita T: Morphologic observations in the early phase of the cartilage-pannus junction. Light and electron microscopic studies of active cellular pannus. *Arthritis Rheum* 1983;26:472-478.
4. Wolfsberg TG, Primakoff P, Myles DG, White JM: ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J Cell Biol* 1995;131:275-278.
5. Abe E., Mocharla H, Yamate T, Taguchi Y, Manolagas SC: Meltrin-alpha, a fusion protein involved in multinucleated giant cell and osteoclast formation. *Calcif Tissue Int* 1999;64:508-515.
6. Namba K, Nishio M, Mori K, Miyamoto N, Tsurudome M, Ito M, et al.: Involvement of ADAM9 in multinucleated giant cell formation of blood monocytes. *Cell Immunol* 2001;213:104-113.
7. Choi SJ, Han JH, Roodman GD: ADAM8: a novel osteoclast stimulating factor. *J Bone Miner Res* 2001;16:814-822.
8. Mandelin J, Li TF, Hukkanen MV, Liljeström M, Chen ZK, Santavirta S, et al.: Increased expression of a novel osteoclast-stimulating factor, ADAM8, in interface tissue around loosened hip prostheses. *J Rheumatol* 2003;30:2033-2038.
9. Ma G, Ainola M, Liljeström M, Santavirta S, Poduval P, Zhao D, et al.: Increased expression and processing of ADAM 12 (Meltrin-a) in osteolysis associated with aseptic loosening of total hip replacement implants. *J Rheumatol* 2005;32:1943-1950.
10. Ma GF, Liljeström M, Ainola M, Chen T, Tiainen VM, Lapalainen R, et al.: Expression of ADAM9 (meltrin- $\gamma$ ) around aseptically loosened total hip replacement implants. *Rheumatology* 2006 (Oxford).
11. Schlomann U, Wildeboer D, Webster A, Antropova O, Zeuschner D, Knight CG, et al.: The metalloprotease disintegrin ADAM8. Processing by autocatalysis is required for proteolytic activity and cell adhesion. *J Biol Chem* 2002;277:48210-48219.