

Die Rolle des RANKL- und des OPG-Gens ...

Fortsetzung von Seite 1

Ein verwandtes Protein wurde ebenfalls identifiziert, genannt Osteoprotegerin (OPG), das eine starke Bin-

dem Osteoprotegerin entwickeln eine früh beginnende Osteoporose als Ergebnis einer exzessiven Osteoklastenaktivität. Ein schematisches Diagramm der theoretischen

und verändern so indirekt die Osteoklastenaktivität. Kürzlich hat unser Forschungslabor ein Zellkultursystem aus Stammzellen der Maus genutzt, um die zellulären Ef-

um das Differenzierungsstadium der Stammzellen in diesem Zellkulturmodell zu bestätigen (Abb. 2). In verschiedenen Stadien der Osteoblastenentwicklung wurden die

scheint die Genexpression von RANKL in den späten Stadien der Osteoblastenentwicklung hoch zu regulieren, während das gleiche Hormon die OPG-Genproduktion zu

numerische Messwert ist, der bestimmt, wie Osteoklasten auf die Osteoblastenrekretion reagieren (Abb. 3c). Die Messwerte des PTH-Rezeptors zeigen die

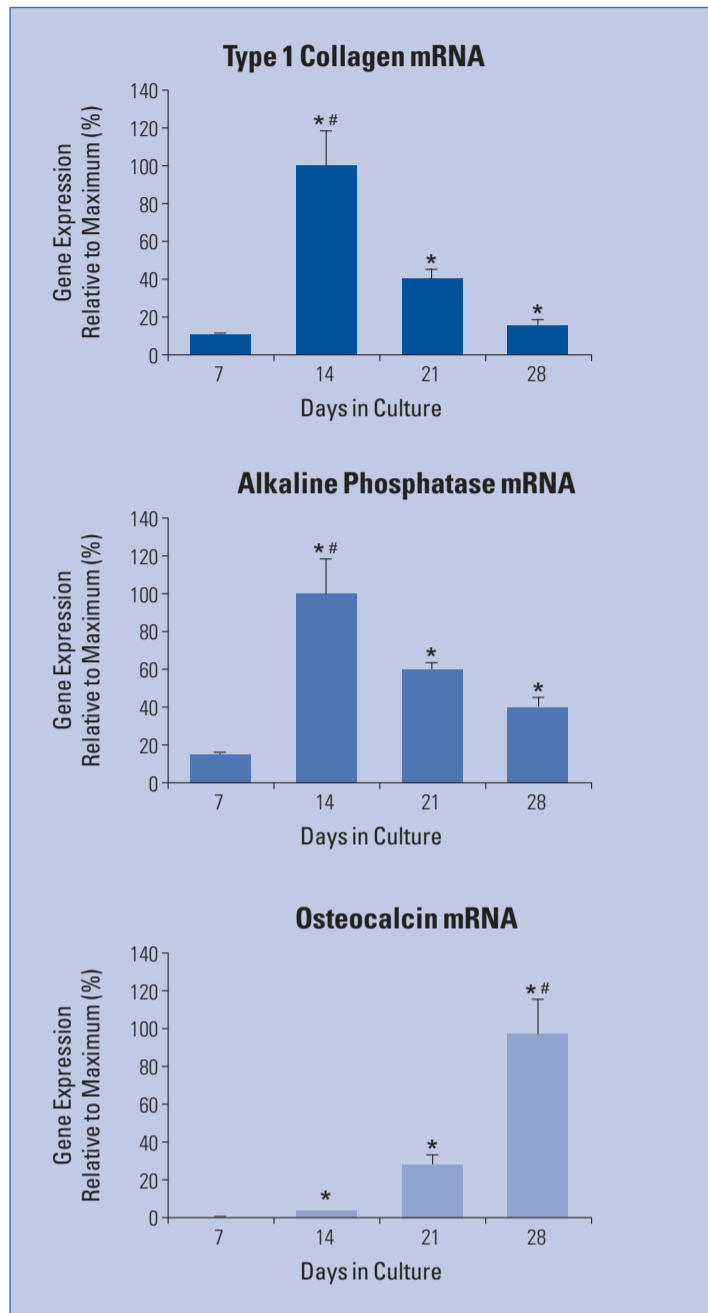


Abb. 2a: Osteoblasten Markergene validieren die Differenzierung von mesenchymalen Knochenmarkszellen bei drei Monate alten Mäusen.

COL1 und ALP folgten vorhersehbaren Mustern einer frühen Genexpression, während mesenchymale Knochenmarkszellen sich zu funktionsfähigen Osteoblasten differenzieren. Osteocalcin wurde erst spät während der Osteoblastenreife exprimiert (* statistisch signifikant $p < 0,05$ im Vergleich zur Genexpression am 7. Tag; # relative maximale Genexpression). Die Stammzellen des Knochenmarks folgten dem Verlauf einer normalen Osteoblastendifferenzierung.

dungsaffinität an den RANKL-Zelloberflächenrezeptor hat und die Bindung von RANKL an seinen eigenen kognaten Rezeptor verhindert, der auf der Oberfläche der Osteoklasten-Vorläuferzellen exprimiert wird. Überexpression des Osteoprotegerin-Gens (OPG) führte zu einer erhöhten Knochenmineraldichte als Resultat der verminderten Osteoklastenaktivität (Simonet et al., 1997). Mäuse mit fehlen-

Interaktion zwischen OPG und RANKL wird in Abbildung 1 skizziert. Zahlreiche Faktoren beeinflussen das Ausmaß von Knochenstoffwechsel und Knochenfunktion. Calciotrope Hormone helfen, Calcium aus Knochen ins Serum freizusetzen, und spielen deshalb eine signifikante Rolle bei der Knochenmineraldichte. Das Parathyreoid-Hormon (PTH) und Vitamin D₃ wirken auf die Osteoblasten-Rezeptoren

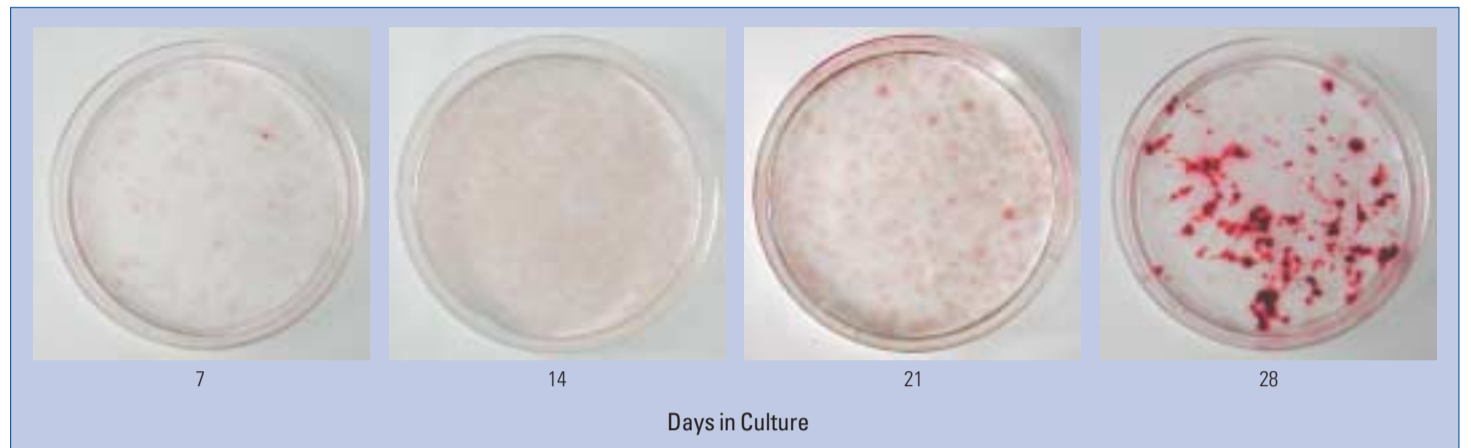


Abb. 2b: Eine Färbung mit Alizarinrot demonstrierte eine progressive Mineralisation der sich differenzierenden Zellen in der Zellkultur.

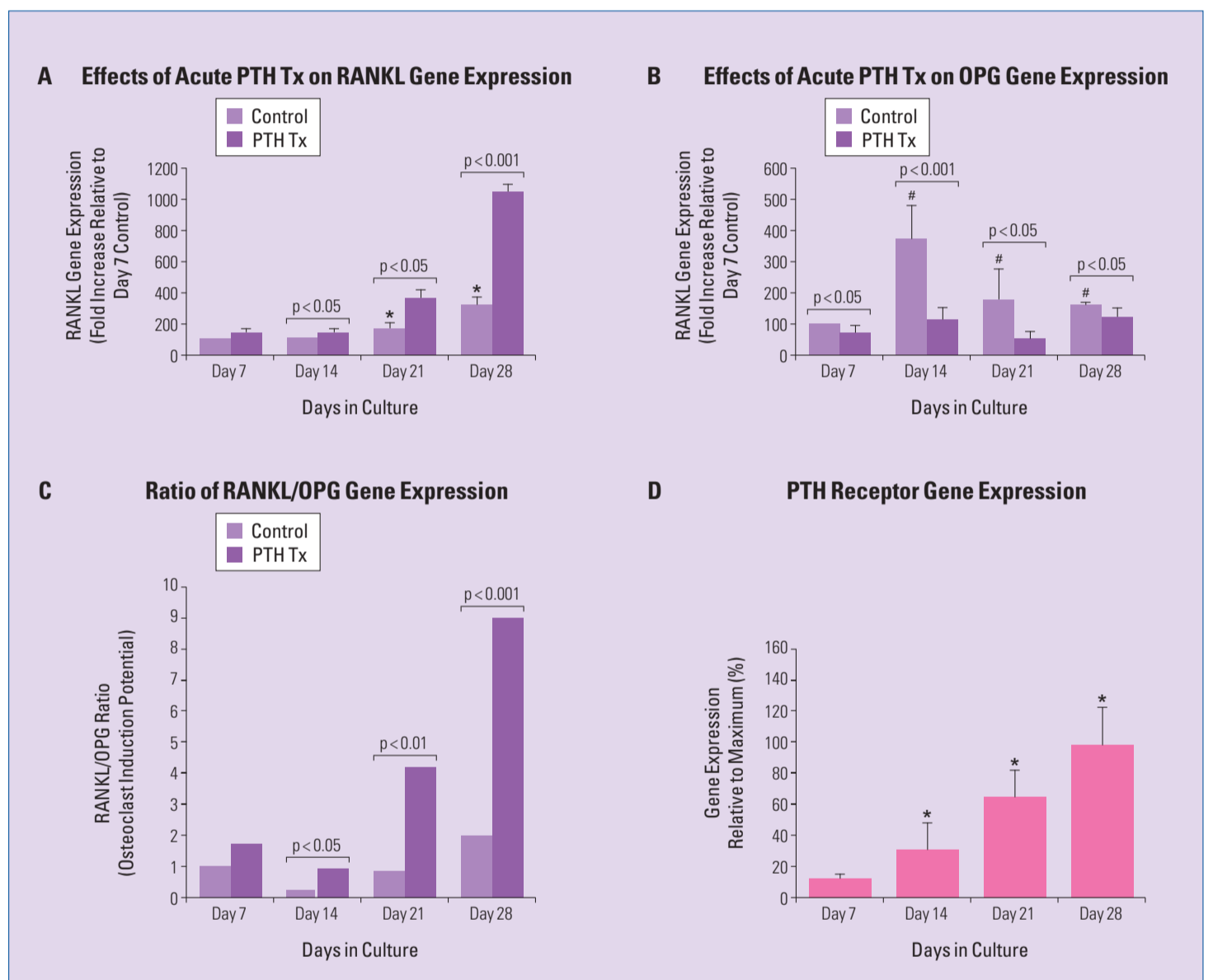


Abb. 3 a-d:

(A) Quantitative RT-PCR-Analyse der RANKL-Genexpression. Die Genexpression des RANKL in der Zellkultur vergrößerte sich fortschreitend vom 7.-28. Tag, (* $p < 0,05$). Akute Behandlung mit PTH verursachte in allen Stadien der Osteoblastenentwicklung eine vergrößerte RANKL-Genexpression.

(B) OPG erreichte seine maximale Genexpression am 14. Tag und verringerte sich nach akuter Behandlung mit PTH. Die basale Genexpression von OPG stieg relativ früh während der Osteoblastendifferenzierung an und erreichte einen PEAK mit dreifacher Erhöhung gegenüber dem basalen Wert (# $p < 0,001$). Einer akuten zweistündigen PTH-Aussetzung der Stammzellkultur verursachte eine Inhibition der Genexpression von OPG in jedem Stadium der Osteoblastendifferenzierung. Der Effekt war am 7. Tag nur minimal, aber am 14., 21. und 28. Tag erwiesen.

(C) Das Verhältnis der RANKL-Genexpression/OPG-Genexpression passt zu dem Potenzial des Systems, Osteoklasten zu aktivieren. Vom 7.-14. Tag gibt es eine Verringerung des RANKL/OPG-Verhältnisses um 20 % gegenüber den basalen Bedingungen. Am 21. Tag erholt sich das Verhältnis RANKL/OPG, und am 28. Tag ist das RANKL/OPG-Verhältnis zweifach gegenüber den initialen Bedingungen am 7. Tag erhöht. Nach der Behandlung mit PTH ist das Verhältnis der RANKL/OPG-Genexpression in jedem Stadium der Osteoblastenentwicklung erhöht.

(D) Die PTH-Rezeptor-Genexpression folgt einem progressiven Anstieg und erreicht maximale Werte in späten Stadien der Differenzierung ($p < 0,05$).

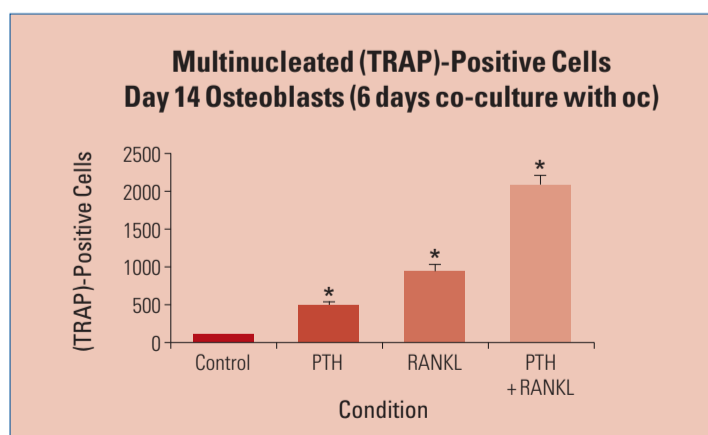


Abb. 4a: Evaluierung des Osteoklasten-Induktions-Potenzials der durch PTH vermittelten Veränderungen in der Genexpression von RANKL und OPG am 14. Tag der Osteoblasten-Zellkultur. Ein fünfmaliger Anstieg der TRAP⁺-Zellen in Osteoblasten-Osteoklasten-Ko-Kulturen war zu verzeichnen, was ein vergrößertes Osteoklasten-Induktions-Potenzial der Osteoblasten nach Behandlung mit PTH anzeigt. Das Hinzufügen exogener Maximaldosen von RANKL war ausreichend, um die Wirkung des im System vorhandenen OPG zu überwinden, um die TRAP⁺-Zellen ungefähr auf das achtfache gegenüber den Kontrollbedingungen zu erhöhen. Das Hinzufügen von PTH und RANKL induzierte synergistische Effekte der Osteoklasten-Aktivität, wie es in der zwanzigfachen Erhöhung der TRAP⁺-Zellen (* $p < 0,001$ im Vergleich zum 14. Tag der TRAP⁺-Zellen der Kontrolle).

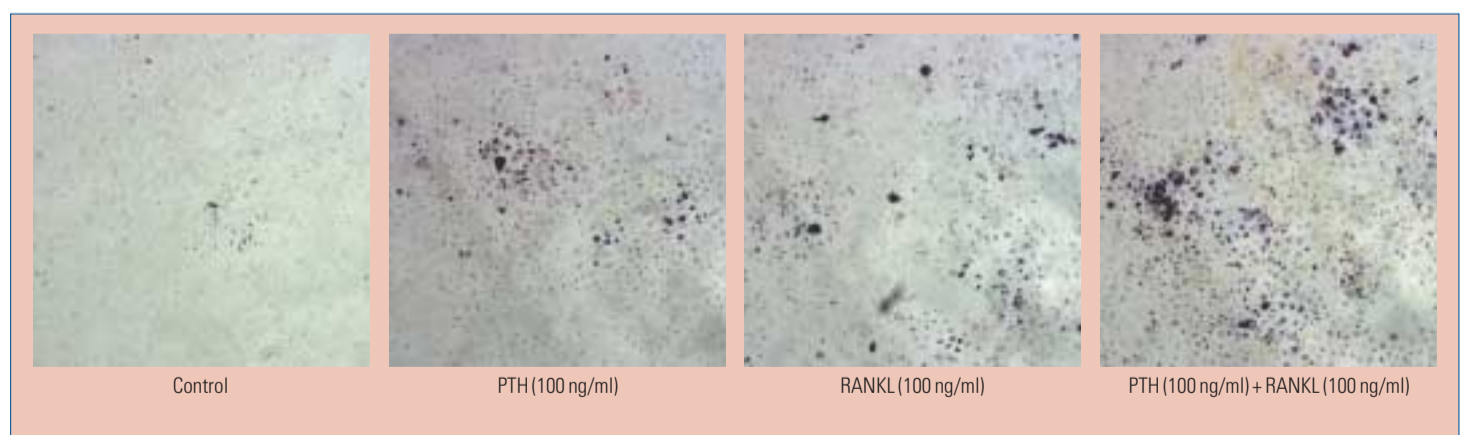


Abb. 4b: Fotografien der TRAP⁺-Zellen zeigen eine relative Anzahl von TRAP⁺-Zellen innerhalb jeder Gruppe.

fekte von PTH auf die Genexpression von RANKL und OPG zu demonstrieren. Bekannte frühe und späte Marker der Osteoblastendifferenzierung wurden gemessen,

Zellen dem Hormon PTH 2 Stunden ausgesetzt und die RANKL- und OPG-Gen wurden als Indikator der Osteoklastenaktivität gemessen. Die Behandlung mit PTH

frühen Zeitpunkten herabreguliert (Abb. 3a und 3b). Da OPG antagonistisch zu RANKL wirkt, wird deutlich, dass die Ratio von OPG zu RANKL der entscheidende

erhöhte Rezeptorsensibilität gegenüber PTH während der Osteoblastenreifung (Abb. 3d). Ansteigende Werte von RANKL und OPG translatie-

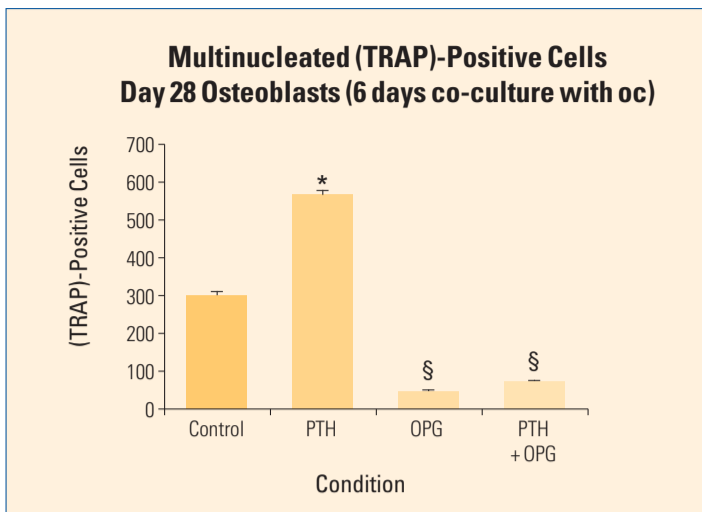


Abb. 5a: Evaluierung des Induktionspotenzials der Osteoklastenaktivität der PTH-induzierten Veränderungen in der Genexpression von RANKL und OPG am 28. Tag der Osteoblasten-Zellkultur. Es gab eine größere Anzahl aktivierter Osteoklasten am 28. Tag in der Kontrollgruppe im Vergleich zum 14. Tag der Kontrollgruppe, was anzeigt, dass sich differenzierende Osteoblasten die Fähigkeit erworben haben, Osteoklasten zu aktivieren. Die Zugabe von bPTH (1-34) für zwei Stunden erhöhte die Anzahl von TRAP⁺-Zellen (* p < 0.05), und die Gegenwart des exogen verabreichten OPG war nicht ausreichend, um zu der Fähigkeit zu verhelfen, Osteoklasten zu aktivieren (§ < 0.001 in Relation zu den TRAP⁺-Zellen der Kontrollgruppe).

ren zu einer Osteoklastenrekretion und -aktivität, was durch TRAP⁺ staining sichtbar gemacht wird. Sowohl die Zugabe von PTH als auch die Zugabe von exogenem RANKL erhöht die Anzahl der Osteoklasten, und die Kombination von PTH mit einer submaximalen Zufuhr von exogenem RANKL hat einen additiven Effekt auf die Osteoklastenentwicklung. Die inhibitorische Eigenschaft von OPG wurde eindeutig demonstriert, indem OPG der Zellkultur beigegeben wurde und es zu keiner Bildung von Osteoklastenzellhaufen kam. Bei dieser In-

hibition konnte nicht einmal die Zugabe von PTH helfen, was die verdrängende Negativregulation der Osteoklastenrekretion durch OPG anzeigt (Abb. 4 und 5). PTH ist nur eines von vielen Hormonen, das für die Regulation des Knochenstoffwechsels bei der Zahnbewegung genutzt werden kann. Vitamin D₃ ist ein weiteres calcitropes Hormon, das sorgfältig untersucht wurde. Es wurde gezeigt, dass es die Osteoklastenaktivität unterstützt und die Zahnbewegung um 60 % erhöht (Collins und Sinclair, 1988). Eine spezifischere Wirkung von Vitamin D₃ ist die

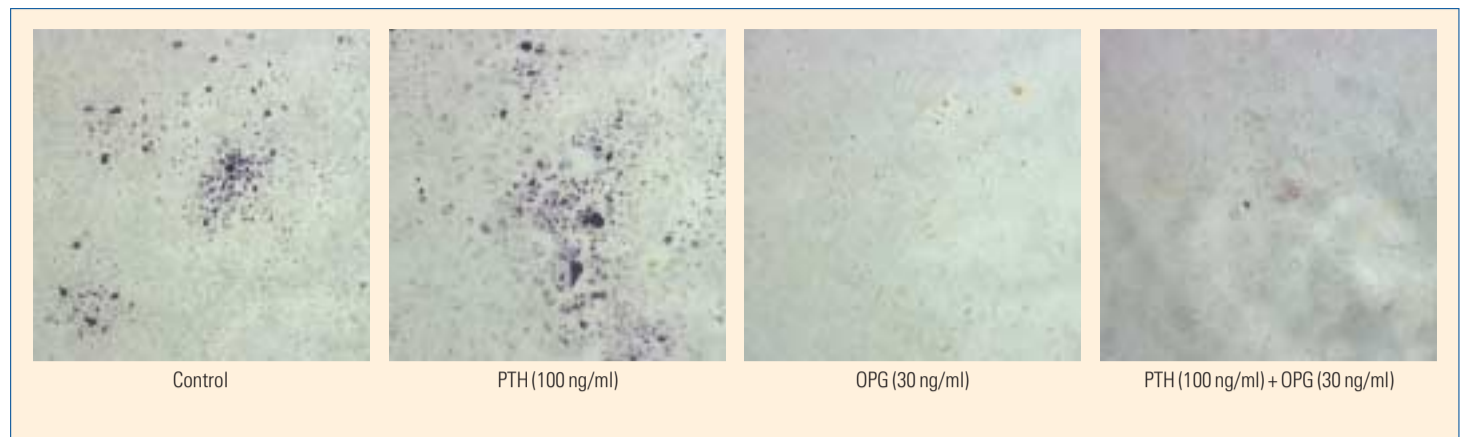


Abb. 5b: Fotografien der TRAP⁺-Zellen demonstrieren die erhöhte TRAP⁺-Zellzahl bei der PTH-Behandlung und einer deutlichen Inhibition der Osteoklastenaktivität durch OPG.

Down-Regulation der OPG- und Up-Regulation der RANKL-Genexpression in Zellen des Parodonts (Hasegawa et al., 2002; Zhang et al., 2003). Prostaglandin (PGE₁) fördert ebenfalls eine Entzündungsreaktion und wurde bei Patienten genutzt, um die Zahnbewegung zu fördern (Yamasaki, 1984). Das andere Extrem: Nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAID) wie Indomethacin verringern die Osteoklastenzahl und verursachen eine um 50 % geringere Zahnbewegung (Chumbley und Tuncay, 1986). Alternativ können die OPG- und RANKL-Spiegel lokal in der gewünschten Region verändert werden. Während der kieferorthopädischen Zahn- bewegung sind RANKL und OPG wichtige Determinanten in den parodontalen Geweben, die die ausgeglichene

alveoläre Knochenresorption steuern (Oshiro et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass intermittierende Zugspannung die regionale Expression von OPG in Zellen des parodontalen Ligaments reguliert (Tsuji et al., 2004). Wenn wir uns die Idee des PerioCHIP-Konzepts entleihen, wo pharmakologisches Chlorhexidin direkt in die örtlich begrenzte, von Parodontitis betroffene Region eingeführt wird, können Kieferorthopäden ebenfalls versuchen, exogenes OPG- oder RANKL-Protein direkt in örtlich umschriebene Gebiete einzubringen, als Hilfe zur Verringerung oder Erhöhung der Zahnmobilität und der Verankerung von Zähnen. Durch die Kontrolle der Dosierung und die Verabreichung lokaler OPG/RANKL-

Spiegel, kann ein erhöhtes OPG eine vorübergehende Knochenmineraldichte verursachen, was zu einer potenziellen Vergrößerung der Verankerung führt. Im Gegensatz dazu, kann ein erhöhter RANKL-Spiegel einen vorübergehenden Anstieg der Knochenresorption begünstigen und so die Zahnbewegung vereinfachen.

Dieses Wissen um die molekulare Zellbiologie schafft enorme Gelegenheiten, potenzielle Therapien zu entwickeln, die die Zellantworten auf die Kraftanwendung verändern. Die Möglichkeiten sind grenzenlos und können irgendwann einmal in der Zukunft die kieferorthopädischen Therapiemethoden verändern. **KN**

KN Anmerkung der Redaktion

Die entsprechende Literaturliste zum Artikel „Die Rolle des RANKL- und des OPG-Gens bei Regulation der Knochenbiologie und Remodeling“ ist auf Anfrage unter folgender Adresse erhältlich:

Redaktion KN Kieferorthopädie Nachrichten
Oemus Media AG
Holbeinstraße 29
04229 Leipzig
Fax: 03 41/4 84 74-2 90
E-Mail: c.sens@oemus-media.de

„Es konnte gezeigt werden, dass eine Zell-Zell-Interaktion existiert“

KN sprach während des AAO-Jahreskongresses in Orlando mit John C. Huang, BSc, DMD, DMedSc, von der University of California San Francisco/USA, über dessen präsentierte Studienergebnisse.

KN Die RANKL- und OPG-Gene wurden als wichtige Gene für die Knochenresorption identifiziert. Beeinflussen diese Gene nur die Differenzierung der Zellen und wie machen sie das? Zu allererst werden RANKL und OPG nicht nur in Knochenzellen exprimiert, obwohl sie zuerst in diesen Zellen identifiziert wurden. Sie werden auch in anderen Zelltypen exprimiert. Die andere bekannte Stammzelle ist die T-Zelle. Also sind sie nicht nur ein „Knochenfaktor“. Sie beeinflussen nicht nur die Differenzierung von Zellen, sondern haben auch die Aufgabe der Aktivierung der Rekrutierung reifer Osteoklasten. Und sie machen das durch Zell-Zell-Interaktion, also gibt es hauptsächlich den direkten Kontakt, der erforderlich ist. Und dies wurde durch die japanische Gruppe gezeigt, wo Osteoblasten auf der einen Seite und Osteoklasten auf der anderen Seite mit einer semipermeablen Membran dazwischen inkubiert wurden. Es gab also keinen körperlichen Kontakt. Und was sie herausfanden, ist, dass keine Bildung von Osteoklasten auftreten würde. Es konnte gezeigt werden, dass eine Zell-Zell-Interaktion existiert, die dafür benötigt wird. OPG wird als löslicher Inhibitor gebildet, aber er

spielt keine Rolle bei der Aktivierung und Rekrutierung von Osteoklasten.

KN Wirken sie nur lokal in dem Gebiet, wo sie gebraucht werden, und durch welche Zellen werden sie aktiviert?

Nun, auf Grund der Tatsache, dass dieser Zell-Zell-Kontakt benötigt wird, sind sie hauptsächlich einer lokalen Mikro-Umgebung wirksam. Die Osteoklasten-Vorläuferzellen werden durch Osteoblasten aktiviert sowie durch den RANKL und durch verwandte Rezeptor-Interaktion. Doch die Aktivierung der Osteoblasten geschieht durch Zytokine und verschiedene Hormone ebenso wie mechanische Irritationen.

KN Ist der Aktivierungsmechanismus bereits bekannt? Was ist das zu Grunde liegende Muster dieser Reaktion?

Im Wesentlichen besteht der Aktivierungsmechanismus für RANK im Osteoklast aus zwei separaten Komponenten. Einer ist die Aktivierung von Osteoblasten, um ein Osteo-Protogen und RANK-Ligan zu bilden. Und die andere Hälfte ist die Aktivierung von Osteoklasten zu reifen Osteoklasten. Beide wurden bereits ausgiebig untersucht. Auf der Ebene des Osteoblasten

werden diese wieder durch die Zytokine und mechanische Irritation aktiviert. Und dann wurde die Interaktion und deren komplette Kaskade des second Messenger Signals demonstriert. Und primär wurde gezeigt, dass TRAF 6 in den Osteoklasten entscheidend für die Aktivierung ist.

KN Wie wird der Multiplikationsprozess aktiviert und durch welche Faktoren wird er initiiert (Druckveränderung, Änderung der elektrischen Spannung, biochemische Transmitter)?

Zuallererst gibt es die calcitropen Hormone, die Hormone, die die Knochenablagerung und Knochenresorption als Reservoir einer Calcium-Reserve regulieren. Doch es gibt andere, Zytokine ebenso, bei den Interleukinen i 6, i 11 konnte gezeigt werden, dass sie OPG und RANKL beeinflussen. Es gibt eine ganze Reihe verschiedener inflammatorischer Zytokine, denn hauptsächlich ist es dies, die Reaktion auf einen Entzündungszustand. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass mechanische Störung ebenso die intrazelluläre Konfiguration von Rezeptoren beeinflusst, welche schließlich zu einer Erhöhung oder Verringerung von OPG oder RANKL führt. Soweit ich weiß, gab es noch keine Stu-

dien bezüglich Beeinflussung der Genexpression von RANKL und OPG durch elektrische Spannung.

KN Wenn man die Verankerung betrachtet: Was sind die Schlüsse, die Sie aus den therapeutischen Maßnahmen ziehen?

KN Kurzvita



John C. Huang, BSc, DMD, DMedSc

Ausbildung:

- 1987–1991 BSc (Physiologie), McGill University Montreal/Kanada
- 1991–1995 DMD, Ehrenpromotion Magna Cum Laude, Tufts University School of Dental Medicine, Boston/USA
- 1995–1999 Kieferorthopädie (Zertifikat), Harvard School of Dental Medicine Boston/USA
- 1995–1999 DMedSc (Oralbiologie), Harvard School of Dental Medicine Boston/USA

Akademische Verpflichtungen:

- 1995–1999 Forschungsmitglied, Abt. für Orthodontie, Harvard School of Dental Medicine, Boston/USA
- 1995–1999 Post-doktorales Forschungsmitglied, Laboratorium für die Lehre skelettaler Störungen und Rehabilitation, Abt. für orthopädische Forschung, Children's Hospital Medical Center, Boston/USA
- 1998–2000 Dozent für KFO, Abt. für predoktorale zahnmedizinische Ausbildung, Harvard School of Dental Medicine, Boston/USA
- 1999–2000 Dozent, Abt. für Wachstum und Entwicklung, Bereich für Orthodontie und Dentofaziale Orthopädie, Harvard School of Dental Medicine, Boston/USA
- 1999–2000 Forschungsmitarbeiter, Laboratorium für die Lehre skelettaler Störungen u. Rehabilitation, Abt. für orthopädische Forschung Children's Hospital Medical Center, Boston/USA
- 2000–2002 Sachverständiger, Forschungsabteilung für endokrine Drüsen, Veterans Affairs Medical Center, San Francisco/USA
- 2000–2002 Außerordentl. Assistenzprofessor, Abt. für Wachstum u. Ent-

Und wiederum die Idee des Perio-Chips aufgreifend, gibt es ein in Hydrokolloid oder eine andere formbare gelatinöse Substanz eingebettetes pharmakologisches Mittel. Dieses Gel kann um die Sulcusflüssigkeit herum geteilt werden, das Gebiet um das Zahnfleisch der Zähne, um die Expression von RANKL- und OPG-Proteinen regional zu modulieren, um dort „mehr Knochenbildung“ oder „weniger Knochenbildung“ einzustellen.

KN Vielen Dank für das interessante Interview! **KN**

wicklung, University of California San Francisco/USA

- 2002–dato Assistenzprofessor (Tenure Track), Abt. für Wachstum und Entwicklung, University of California San Francisco/USA

Klinische Erfahrung:

- 1992–1995 Röntgentechniker, Abt. für Röntgenologie, Tufts University School of Dental Medicine
- 1995–1998 KFO-Assistent, Harvard School of Dental Medicine
- 2000–dato Kieferorthopäde, KFO-Fakultätspraxis an der University of California San Francisco/USA

Diverse Ämter, u. a.:

- 2001–dato Direktor der UCSF Orthodontics 3-D Craniofacial Imaging Services und Forschungslabore, UCSF Orthodontie
- 2001–dato Geschäftsführer, Konferenzen über KFO-Fortschritte in Wissenschaft und Technik
- 2001–dato Vorsitz, UCSFKieferorthopädischer Zulassungsausschuss
- Mitglied div. Organisationen u. Fachgesellschaften; Preisträger des T.M. Graber Teaching Fellowship Award 2004 der AAO