

Simon Heuthe
Dr. med.

Die Effekte von Dihydrotestosteron und Wachstumsfaktoren auf menschliche Knochenzellen in vitro

Geboren am 1.3.1965 in Öhringen
Reifeprüfung am 2.6.1984 in Öhringen
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1987 bis WS 1995
Physikum am 5.4.1989 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Bad Mergentheim und Wil (Schweiz)
Staatsexamen am 9.5.1995 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Prof. Dr. med. R. Ziegler

Der kontinuierliche Knochenumbau am menschlichen Skelett wird durch systemische und lokale Regulatoren des Knochenzellstoffwechsels gesteuert. Eine bedeutende Rolle spielen hierbei androgene Steroide und Wachstumsfaktoren. Dies ist durch zahlreiche Beobachtungen und Untersuchungen am Menschen und in Tiermodellen, sowie durch Ergebnisse aus zellbiologischen Experimenten in menschlichen und tierischen Knochenzellmodellen belegt. Der durch eine insuffiziente Gonadenfunktion hervorgerufene Androgenmangelzustand ist mit einer verminderten Knochendichte und einem erhöhten Risiko hinsichtlich der Entwicklung einer Osteoporose assoziiert. Bei Zuständen sowohl exogener als auch endogener Steigerung der für den Organismus verfügbaren Androgenspiegel wird die Osteogenese und der Knochenstoffwechsel stimuliert. Bei kastrierten männlichen und weiblichen Ratten kann durch die Gabe von Androgenen die Entwicklung einer konsekutiven Osteopenie vermieden werden. Neben der Entdeckung und Quantifizierung von Androgenrezeptoren auf menschlichen und murinen osteoblastären Zellen, konnte eine direkte Stimulation der osteoblastären Proliferation und Differenzierung durch Dihydrotestosteron *in vitro* nachgewiesen werden. Die Wachstumsfaktoren Insulin-like Growth Factor (IGF)-I und -II, Transforming Growth Factor (TGF)- β und Fibroblast Growth Factor (FGF) sind regulatorische Polypeptide, die von Osteoblasten produziert, sezerniert und in der Knochenmatrix gespeichert werden. Wie viele andere Zelltypen besitzen osteoblastäre Zellen spezifische Bindungsstellen für die genannten Wachstumsfaktoren. Zahlreiche *in vivo*-Studien belegen, daß IGF, TGF β und FGF an der Stimulation der Osteogenese und dem Erhalt der Knochenmasse beteiligt sind. Bei Osteoblasten *in vitro* ist ein steuernder Einfluß der Wachstumsfaktoren bei der Mitose und auch bei verschiedenen differenzierten Zellfunktionen nachweisbar. Der Androgenwirkmechanismus im Knochenstoffwechsel ist nicht genau bekannt. Für eine Vermittlung der Androgenwirkung durch Wachstumsfaktoren sprechen Befunde, nach denen Dihydrotestosteron (DHT) bei Osteoblasten die Expression von TGF β stimuliert und den mitogenen Effekt von IGF2 und FGF verstärkt. Werden in klinischen und experimentellen Studien die Merkmale "Geschlecht" und "Alter" berücksichtigt, ergeben sich im Knochengewebe ganz unterschiedliche Androgeneffekte. Andere Untersuchungen enthalten direkte Hinweise auf geschlechts- und altersabhängige Androgenwirkungen. Wir stellten deshalb die Hypothese auf, daß DHT in normalen menschlichen Knochenzellpopulationen, die sich durch Geschlecht und Altersgruppe unterscheiden, differentielle Wirkungen entfaltet. Unter Berücksichtigung der Interaktionen von Androgenen mit Wachstumsfaktoren, stellte sich außerdem die Frage, ob die Wirkungen von IGF, FGF und TGF β in normalen

menschlichen Knochenzellpopulationen geschlechts- und altersgruppenspezifische Unterschiede zeigen. Zur Klärung der sich daraus ergebenden Fragen, dienten aus menschlicher Knochen-spongiosa durch Präparation, Primärkultur und Subkultivierung gewonnene präpubertär männliche, präpubertär weibliche, adult männliche und adult weibliche osteoblastäre Zellpopulationen, in denen nach ihrer vergleichenden Charakterisierung spezifische Effekte von DHT und IGF, FGF und TGF β unter standardisierten und kontrollierten Bedingungen untersucht wurden. Die Charakterisierung der Knochenzellpopulationen erfolgte durch die quantitative Bestimmung der Expression anerkannter osteoblasten-spezifischer Merkmale (Bestimmung des Prozentsatzes alkalische Phosphatase (AP)-positiver Zellen nach histochemischer Lokalisation der AP, Messung der Osteokalzinsekretion mittels Radioimmunoassay). Ähnlich wie die AP ist Osteokalzin (OC) ein bei der Knochenneubildung synthetisiertes nichtkollagenes Protein. Zur Beurteilung der Effekte einer DHT- und Wachstumsfaktorbehandlung untersuchten wir in den entsprechenden Zellpopulationen die DNA-Synthese als Parameter der Zellproliferation und die spezifische alkalische Phosphatase-Aktivität als Parameter der Zelldifferenzierung. Die Verwendung von transformierten Knochenzelllinien und neonatalen murinen Knochenzellen als Modell für menschliche Osteoblasten ist wegen ihres unvollständigen osteoblastären Phänotyps bzw. alters- und speziesbedingter Unterschiede problematisch. Die im Vergleich zu transformierten Knochenzellen begrenzte Zellausbeute und evtl. Instabilität des osteoblastären Phänotyps bei normalen menschlichen Osteoblasten werden in Kauf genommen zugunsten der Möglichkeit, auf zellulärer Ebene direkte Auswirkungen von Substanzen auf normale Zell-funktionen humaner Osteoblasten untersuchen zu können. Die Experimente wurden so konzipiert, daß die Heterogenität von normalen menschlichen Knochenzellen hinsichtlich des osteoblastären Phänotyps und nichtosteoblastärer Zellelemente nicht zu Ergebnisverfälschungen führen konnte. Die Charakterisierung zeigte, daß bei den weiblichen Zellpopulationen der Prozentsatz AP-positiver Zellen signifikant größer war als bei den männlichen Zellpopulationen. Dieser bei präpubertären und adulten Zellen vorhandene Geschlechtsunterschied ist möglicherweise genetisch determiniert. Denkbar wäre auch eine bei weiblichen Osteoblasten primär stärkere Expression autokrin aktiver Faktoren, die aufgrund ihrer differenzierenden Eigenschaften dann sekundär zu einer stärkeren Expression der AP führen könnten. Sowohl in den präpubertär männlichen als auch in den adult männlichen Zellpopulationen war eine signifikant höhere OC-Produktion nachweisbar als in den entsprechenden weiblichen Zellpopulationen. Ähnliche Geschlechtsunterschiede sind bei den OC-Serumspiegeln und bei den im Knochen gespeicherten OC-Mengen bekannt. Analog zur AP könnte es sich um einen altersunabhängigen primär genetisch verankerten geschlechtsspezifischen Unterschied der OC-Expression handeln. Denkbar wäre auch eine geschlechtsabhängige Expression von Regulationsfaktoren der osteoblastären OC-Synthese. DHT stimulierte die DNA-Synthese von adulten und präpubertär männlichen Osteoblasten, nicht jedoch von präpubertär weiblichen Osteoblasten. Der beobachtete Geschlechtsunterschied des Androgeneffektes auf die DNA-Synthese von menschlichen präpubertären Knochenzellen korrespondiert zu geschlechtsabhängigen Befunden im Rattenmodell. Eine mögliche Erklärung für die erst nach der Pubertät bei weiblichen Osteoblasten beobachtete mitogene Reaktion auf DHT, die bei den adult weiblichen Osteoblasten signifikant größer war als bei den adult männlichen Zellen, wäre eine Induktion der Androgenrezeptorexpression durch ansteigende Östrogenspiegel während der Pubertät. DHT stimulierte die Differenzierung in weiblichen Osteoblasten stärker als in männlichen Osteoblasten. Damit ergibt sich folgender Zusammenhang: Unabhängig von der Altersgruppe zeigten weibliche Osteoblasten eine höhere basale AP-Expression als männliche Osteoblasten und reagierten auf eine DHT-Exposition mit einer signifikant stärkeren Stimulation der AP-Expression als männliche Zellen. Möglicherweise wird somit in osteoblastären Zellen mit einem hohen basalen AP-Gehalt durch eine DHT-Behandlung eine stärkere Stimulation der AP-Expression bewirkt als in Osteoblasten mit einer niedrigen basalen AP-Expression. Auch bei weiblichen

osteoblastären Zellen führt die Applikation von DHT bei Subpopulationen mit hoher basaler AP-Aktivität zu einer stärkeren Stimulation der AP-Expression als bei Subpopulationen mit niedriger basaler AP-Aktivität. Daher könnte es sich bei der in weiblichen Osteoblasten stärker ausgeprägten Stimulation der Differenzierung durch Androgene nicht um einen primär geschlechtsspezifischen Unterschied handeln, sondern um eine variable Androgenwirkung in Abhängigkeit von der basalen AP-Aktivität. Mitogene Wachstumsfaktoren stimulierten die DNA-Synthese von präpubertären Osteoblasten stärker als von adulten Osteoblasten. Für diesen Altersunterschied sind möglicherweise höhere Rezeptorzahlen im Kindesalter verantwortlich, die durch eine gesteigerte Aktivität von osteotropen Hormonen im Zuge des beschleunigten Knochenwachstums induziert werden. Der beobachtete mitogene Reaktionsunterschied zwischen der präpubertären und der adulten Altersgruppe könnte auch Ausdruck sein einer altersbedingten generellen Abnahme der osteoblastären Fähigkeit auf mitogene Stimuli zu reagieren. Wachstumsfaktoren mit stimulierender Wirkung auf die Differenzierung bei männlichen Osteoblasten hatten nur einen marginalen differenzierenden Effekt bei weiblichen Osteoblasten. Damit ergibt sich ein weiterer Zusammenhang: Unabhängig von der Altersgruppe zeigten männliche Osteoblasten eine niedrigere basale AP-Expression als weibliche Osteoblasten und reagierten auf eine TGF β - bzw. IGF2-Behandlung mit einer starken Stimulation der AP-Expression, während weibliche Zellen kaum reagierten. Möglicherweise kann eine signifikante Stimulation der AP-Aktivität nur in denjenigen Knochenzellpopulationen erzielt werden, die eine niedrige basale AP-Expression aufweisen. Auch in weiblichen osteoblastären Subpopulationen mit differierender basaler AP-Expression zeigt die Stimulation der AP-Aktivität durch IGF2 Unterschiede. Deshalb könnte der bei männlichen Osteoblasten stärker ausgeprägten Stimulation der AP-Aktivität kein primärer Geschlechtsunterschied zugrunde liegen, sondern eine variierende Wachstumsfaktorwirkung in Abhängigkeit von der basalen AP-Expression der Knochenzellen. Warum die AP-Aktivität von TGF β und IGF2 nur in Knochenzellpopulationen mit niedriger basaler AP-Expression (männliche Osteoblasten) stimuliert wird und von DHT dagegen nur in Zellpopulationen mit hoher basaler AP-Expression (weibliche Osteoblasten), ist nicht bekannt und mit den Ergebnissen dieser Untersuchungen nicht zu erklären. Diese Frage wird sich eher beantworten lassen, wenn die Ursache für die unterschiedliche basale AP-Expression von männlichen und weiblichen osteoblastären Zellen geklärt ist.

