

Kathrin Krohn

Dr. med.

**Die Interaktion von Dihydrotestosteron und  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  bezüglich Proliferation, lokaler IGF-I Synthese und Differenzierung epiphysealer Chondrozyten der Ratte *in vitro***

Geboren am 28.03.1973 in Hamburg

Reifeprüfung am 22.05.1992 in Heidelberg

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1993 bis WS 2000

Physikum am 29.03.1995 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg, London

Praktisches Jahr in München, New York

3. Staatsexamen am 15.11.2000 an der Universität München

Promotionsfach: Kinderheilkunde

Doktorvater: Prof. Dr. med. Otto Mehls

Bei chronisch niereninsuffizienten Kindern ist häufig eine Wachstumsstörung zu beobachten. Das Wachstum ist bei diesen Patienten insbesondere während der Pubertät stark eingeschränkt. Gleichzeitig erhalten die Patienten zur Behandlung des sekundären Hyperparathyreoidismus in der Regel Calcitriol, das je nach Dosis wachstumssteigernd oder hemmend wirken könnte. Eine Aufklärung der Einflüsse von Gonadenhormonen und  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf das epiphysäre Wachstum ist deshalb von besonderem Interesse. In dieser Studie wurde der Einfluss von Dihydrotestosteron und  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf kultivierte epiphyseale Chondrozyten männlicher Ratten untersucht. Im Einzelnen wurde die Wirkung beider Steroidhormone und ihrer Kombination hinsichtlich (1) Proliferation, (2) lokaler IGF-I-Synthese, (3) Genexpression des Androgenrezeptors, des Vitamin D-Rezeptors und des IGF-I-Rezeptors und (4) bezüglich Zelldifferenzierung überprüft. Die Zellen wurden in Monolayerkultur, in Agarose-stabilisierten dreidimensionalen Suspensionkulturen und in dreidimensionalen Pelletkulturen gezüchtet. Um die Interaktion mit Serumfaktoren möglichst gering zu halten, wurden Kurzzeitversuche (8 bis 48 Stunden) in serumfreiem Medium durchgeführt. Langzeitversuche (bis zu ca. sechs Wochen) wurden in steroidhormonarmem Medium (Ch-FCS) durchgeführt. Die Proliferation wurde mit Hilfe von  $^3\text{H}$ -Thymidinassays, Wachstumskurven in

Monolayerkultur und der Koloniebildung in Agarose-stabilisierten Suspensionskulturen untersucht. Die IGF-I-Synthese wurde auf der Ebene der mRNA mittels RT-PCR, auf Ebene des sezernierten Proteins mit Hilfe eines Radioimmunoassays (RIA) untersucht. Die Genexpression der Rezeptoren wurde ebenfalls mittels RT-PCR untersucht. Als Differenzierungsmarker wurde die AP-Aktivität bestimmt, Kollagen II und X mRNA mittels RT-PCR untersucht, und die Kalzifizierung der Matrix mit Hilfe der Färbung nach von Kossa sichtbar gemacht.

Dihydrotestosteron steigerte konzentrationsabhängig die Proliferation kultivierter Chondrozyten, was anhand von Radiothymidinassay, Wachstumskurve und Suspensionskultur nachgewiesen werden konnte.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  erwies sich entsprechend früherer Studien unserer Arbeitsgruppe in der Konzentration von  $[10^{-12} \text{ M}]$  als proliferationssteigernd. Die Proliferationssteigerung durch Dihydrotestosteron und  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  konnte auf eine vermehrte lokale IGF-I-Synthese zurückgeführt werden. Dihydrotestosteron und  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  bewirkten eine deutliche Steigerung der IGF-I mRNA. Nach zwanzigstündiger Stimulation konnte eine erhebliche Steigerung (7 bis 9-fach) des sezernierten Peptids gegenüber der Lösungsmittelkontrolle im Zellüberstand mittels RIA nachgewiesen werden. Die Steigerung der DNA-Synthese unter dem Einfluss von Dihydrotestosteron oder  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  konnte durch den IGF-I Antikörper gehemmt werden. Dies legte die Schlussfolgerung nahe, dass Dihydrotestosteron und  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ihre proliferationsfördernden Effekte über eine Steigerung der lokalen IGF-I-Synthese vermitteln.

Im Gegensatz hierzu führte die Kombination von Dihydrotestosteron und  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  im  $[^3\text{H}]$ -Thymidinassay zu einer nur geringen Zunahme der DNA-Synthese und in der Agarose-stabilisierten Suspensionskultur zu keiner Steigerung der Koloniebildung gegenüber der Kontrolle. Das Stereoisomer  $1\beta,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  als Spezifitätskontrolle hemmte den proliferationssteigernden Effekt von Dihydrotestosteron nicht.

Die mRNA des IGF-I-Rezeptors wurde am stärksten durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und weniger ausgeprägt durch Dihydrotestosteron und die Kombination beider Hormone stimuliert. Die Genexpression des Androgenrezeptors wurde durch Dihydrotestosteron und  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und insbesondere durch die Kombination beider Substanzen hochreguliert. Die Expression der VDR mRNA wurde geringfügig durch Dihydrotestosteron und stärker durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und die Kombination beider Hormone hochreguliert.

Kollagen II mRNA, ein Marker der frühen Differenzierung, wurde durch Dihydrotestosteron und  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , nicht aber ihre Kombination hochreguliert. Kollagen X mRNA, ein Marker der späten Differenzierung, wurde dagegen, ebenso wie die AP-Aktivität

und die Kalzifizierung der Matrix, insbesondere durch die Koinkubation und in geringerem Maße durch die Einzelsubstanzen stimuliert.

Zusammenfassend üben Dihydrotestosteron und  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  über eine Steigerung der lokalen IGF-I-Produktion einen dosisabhängigen wachstumsfördernden Effekt auf kultivierte epiphyseale Chondrozyten der Ratte aus. Eine Koinkubation der beiden Steroidhormone führt jedoch zu keiner Steigerung der Proliferation, sondern zu einer verstärkten Zelldifferenzierung.