

Lutz Thorsten Weber
Dr. med.

Interaktionen von Insulin-like growth factor I und $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bezüglich Proliferation und Rezeptorexpression epiphysealer Knorpelzellen von Ratten *in vitro*

Geboren am 27. 02. 1969 in Duisburg
Reifeprüfung am 16. 06. 1988 in Duisburg
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1990 bis WS 1996/97
Physikum am 30. 03. 1992 an der Universität Freiburg
Klinisches Studium in Freiburg und Heidelberg
Praktisches Jahr in Bad Mergentheim
Staatsexamen am 07. 11. 1996 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Kinderheilkunde
Doktorvater: Professor Dr. med. Otto Mehls

Bei Kindern mit chronischer Niereninsuffizienz besteht häufig eine Wachstumsstörung, die sowohl auf Störungen in der Homöostase der somatotrophen als auch der calciotropen Hormone zurückgeführt wird. Wachstumsknorpel ist ein Zielorgan für IGF-I und für $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und exprimiert die jeweiligen Rezeptoren. Da beide Hormonsysteme gleichzeitig gestört sind, sollte die vorliegende Studie klären, inwieweit eine Interaktion von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und IGF-I an der Wachstumsknorpelzelle stattfindet. Im einzelnen sollte geklärt werden, inwieweit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die IGF-I-Rezeptorexpression und die IGF-I abhängige Zellproliferation beeinflusst, zum anderen, ob umgekehrt IGF-I die Vitamin D-Rezeptorexpression und die Vitamin D-abhängige Zellproliferation moduliert.

Ex vivo gewonnene Wachstumsknorpelchondrozyten aus der proximalen Tibiametaphyse von 60 g schweren Sprague-Dawley-Ratten wurden nach Anzucht in Medium mit fötalem Kälberserum (FCS, 10%) unter serumfreien Bedingungen in Monolayer-Kulturen und in Agarose-stabilisierten Suspensionskulturen untersucht. Die Expression des Vitamin D-Rezeptors und des IGF-Typ-I-Rezeptors wurden durch Bindungsstudien (Scatchard-Analysen) mit Hilfe von [^3H]- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und dem jodierten IGF-Typ-I-Rezeptor-Antikörper [^{125}J]-alpha-IR3 untersucht. Die DNA-Synthese der Zellen wurde durch [^3H]-Thymidininkorporation, die Zellproliferation durch Wachstumskurven (Monolayer-Kulturen) und Kolonienbildungen (in Agarose-stabilisierten Suspensionskulturen) quantifiziert.

IGF-I steigerte dosisabhängig die [^3H]-Thymidininkorporation mit einer maximalen Wirkung bei 60 ng/ml. Der Effekt von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die Zellproliferation gestaltete sich biphasisch. Niedrige Konzentrationen (10^{-12} M) stimulierten die Proliferation, während hohe Konzentrationen (10^{-8} M) keinen derartigen Effekt zeigten. Das Stereoisomer $1\beta,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ als Spezifitätskontrolle hatte keinerlei Einfluß auf die [^3H]-Thymidininkorporation.

Der Effekt von IGF-I auf die DNA-Synthese war additiv zum Effekt von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (IGF-I (60 ng/ml) 196 ± 4 %; $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-12} M) 180 ± 7 %; IGF-I + $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 258 ± 4 %; gegenüber Kontrolle, $p < 0,05$ ANOVA). Der additive Effekt konnte spezifisch durch den polyklonalen IGF-I-Antikörper (AB-1) verhindert werden. Die Monolayer-Kultur-

Experimente wurden durch Experimente mit Agarose-stabilisierten Suspensionskulturen bestätigt.

IGF-I (60 ng/ml) steigerte die Expression des IGF-Typ-I-Rezeptors deutlich. Dieser Effekt konnte wiederum durch Koinkubation mit dem IGF-I-Antikörper inhibiert werden. Koinkubation mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-12} M) führte zu einer signifikanten Steigerung der Rezeptorexpression. $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-12} M) bewirkte eine homologe Hochregulation der Vitamin D-Rezeptorexpression. Die Koinkubation von IGF-I (60 ng/ml) und $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-12} M) steigerte die Vitamin D-Rezeptorexpression auf das Dreifache des Basalwertes. Diese Steigerung konnte nicht bei Koinkubation von IGF-II (60 ng/ml) und $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-12} M) beobachtet werden, obwohl IGF-II dosisäquivalent wie IGF-I die Proliferation stimulierte. Aktinomycin D führte zu einer Hemmung des IGF-I Effektes. Dies weist auf einen transkriptionellen Mechanismus hin, d.h. IGF-I bewirkte eher eine Rezeptorneubildung als eine (Re-)Aktivierung ruhender Rezeptoren.

Aus den Befunden kann geschlossen werden, daß IGF-I und $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sowohl homolog die Expression des eigenen Rezeptors als auch die Expression des heterologen Rezeptors erhöhen. Diese Befunde erklären möglicherweise auf molekularer Ebene, auf welche Weise IGF-I und $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ additive Effekte auf die Zellproliferation ausüben.

Sollten sich die gefundenen Ergebnisse *in vivo* bestätigen, wäre bei Kindern mit chronischer Niereninsuffizienz eine Korrektur beider Hormonsysteme wünschenswert, um ein optimales Wachstum zu garantieren. Dabei sollte bedacht werden, daß es bei zu hohen $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Spiegeln möglicherweise zur Hemmung der Interaktionen kommen kann, wie wir es in unserem experimentellen System zeigen konnten.