

Christian Jux
Dr. med.

Zell- und molekularbiologische Untersuchungen zum Einfluß von somatotropen Hormonen (Wachstumshormon, IGF-I) auf die Glukocorticoid (Dexamethason) – induzierte Wachstumsstörung von Epiphysenfugenchondrozyten

Geboren am 19. 6. 1966 in Lübeck
Reifeprüfung am 3. 7. 1985 in Lübeck
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1987 bis WS 1993/94
Physikum am 14. 3. 1989 an der Universität Göttingen
Klinisches Studium in Göttingen, London, Toronto
Praktisches Jahr in Bremen und Toronto
Staatsexamen am 27.04.1994 an der Universität Göttingen

Promotionsfach: Kinderheilkunde
Doktorvater: Prof. Dr. med. O. Mehls

Eine wesentliche Ursache für Wachstumstörungen als Nebenwirkung einer längerfristigen und höherdosierten Glukocorticoidmedikation im Kindesalter stellen Alterationen der somatotropen Hormonachse dar. Dabei bestehen zwischen Glukocorticoiden und somatotropen Hormonen vielfältige und klinisch relevante Interaktionen, deren genaue Mechanismen auf zellulärer und molekularbiologischer Ebene des Zielorgans für das Längenwachstum bisher nur unzureichend verstanden und in vivo nur schwer zu untersuchen sind.

Wir untersuchten daher die Wirkungen und mögliche Wirkmechanismen von somatotropen Hormonen (GH, IGF-I) und einem Glukocorticoid (Dexamethason) sowie deren Interaktion auf das Wachstum mit Hilfe des experimentellen Modells primärkultivierter Wachstumsfugenchondrozyten der Ratte.

Wir konnten durch dieses Modell zeigen, daß Dexamethason dosisabhängig (10^{-12} – 10^{-7} M) sowohl die basale als auch die GH-, IGF-I- und kostimierte DNA-Synthese und das Zellwachstum über Wochen reduziert. Ein IGF-I Antikörper hemmte spezifisch die GH, nicht jedoch eine bFGF stimulierte Proliferation und verringerte dosisabhängig das Knorpelzellwachstum.

Dexamethason reduzierte die im Überstand des konditionierten, serumfreien Kulturmediums mittels eines spezifischen, IGF-Bindungsprotein blockierten RIA gemessene IGF-I-Konzentration, während GH die lokale IGF-I Synthese unter basalen ebenso wie unter Dexamethason-gehemmten Bedingungen erhöhte.

Im RNase protection solution hybridization Assay supprimierte Dexamethason zeitabhängig die GHRmRNA-Transkriptionsrate. Darüber hinaus konnte anhand von Bindungsstudien eine dosisabhängige Herabregulation der (basalen) Anzahl somatogener GH-Rezeptoren auf Proteinebene gezeigt werden.

Im Gegensatz zur [³H]Thymidininkorporation, die durch eine pulstille/ kurzzeitige GH-Gabe gegenüber dem dauerhaften Applikationsmodus noch gesteigert werden konnte, erwies sich die kontinuierliche Anwesenheit von GH im Inkubationsmedium wichtig zum Erhalt bzw. zur maximalen Hochregulation des GH-Rezeptors. Für eine direkte GH-Wirkung sprachen dabei, daß weder die Zugabe eines IGF-I-Antikörpers, noch IGF-I selbst einen Einfluß auf die GHR-Expression hatten. Eine Reduktion der homologen GHR-Hochregulation unter Dexamethason konnte übereinstimmend auf mRNA- und Proteinebene belegt werden.

Während auch in hoher Konzentration kein Effekt von Dexamethason auf die basale Expression des IGF Typ I-Rezeptors nachzuweisen war, blockierte Dexamethason die homologe Hochregulation des IGFR vollständig.

Die Ergebnisse der immunzytochemischen Anfärbungen deuteten darauf hin, daß dabei die Rezeptorregulationen nicht gleichmäßig über alle Zellen der jeweiligen Kulturen hinweg erfolgten. Vielmehr führten die somatotropen Hormone zu einem Anstieg des Prozentsatzes intensiv rezeptorpositiv gefärbter Chondrozyten, wohingegen Dexamethason diese Zellfraktion verringerte.

Mittels mikrofluorimetrischer, zeitaufgelöster Messungen der intrazellulären freien/ionisierten Kalziumionenkonzentration, $[Ca^{2+}]_i$, an einzelnen Wachstumsfugenchondrozyten, konnten wir in der vorliegenden Arbeit erstmals GH induzierte $[Ca^{2+}]_i$ - Signale an Knorpelzellen nachweisen und näher charakterisieren. Obwohl die durch GH induzierten $[Ca^{2+}]_i$ - Signale in den individuellen Zellen erheblich variierten, ließen sie sich überwiegend als langanhaltende Transienten, die von der Ruhe- $[Ca^{2+}]_i$ auf das 4- bis 12-fache anstiegen und nach 30-60 Minuten auf Ausgangswerte zurückkehrten, beschreiben.

Die Abhängigkeit dieser Transienten von der extrazellulären Kalziumionenkonzentration und ihre Blockierbarkeit durch den Kalziumkanalblocker Verapamil wiesen auf einen transmembranären Kalziumeinstrom über spannungsabhängige L-Typ Kalziumkanäle als ursächlichem Entstehungsmechanismus für die GH-abhängigen $[Ca^{2+}]_i$ - Signale hin.

Dexamethason beeinflusste im getesteten Konzentrations- (10^{-12} – 10^{-7} M) und Zeitbereich (bis zu einer Stunde) weder die basale $[Ca^{2+}]_i$ noch den Verlauf der GH-stimulierten $[Ca^{2+}]_i$ - Transienten.- Proliferationsexperimente mit ansteigenden Kalziumkonzentrationen im Kulturmedium zeigten die Kalziumabhängigkeit der GH stimulierten DNA-Synthese, während die basale $[^3H]$ Thymidininkorporation über einen weiten Bereich der extrazellulären Kalziumionen-konzentration konstant blieb. Eine Kalziumkanalblockade mit Verapamil ließ die basale und GH stimulierte DNA-Synthese unbeeinflusst. Die mögliche Interferenz zwischen somatotropen Hormonen und Glukocorticoiden auf anderen, tiefer gelegenen Stufen der Signaltransduktionskaskade oder Regulationsmechanismen an gemeinsamen genomischen Angriffspunkten sind Gegenstand fortschreitender Forschungsaktivitäten.

Zusammengefaßt belegen die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit in Übereinstimmung mit tierexperimentellen und klinischen Befunden den antagonistischen Effekt von somatotropen Hormonen (GH, IGF-I) und Glukocorticoiden (Dexamethason) auf Zielzellen des Längenwachstums. Dabei lassen sich die meisten Ergebnisse sowohl im Sinne einer Hemmung der basalen und GH stimulierten Zellproliferation durch Dexamethason, aber auch als Kompensation der Glukocorticoid-induzierten Wachstumshemmung durch GH und IGF-I interpretieren.

Die phänotypisch adäquate Beschreibung dieser Prozesse durch das angewandte In-vitro-Modell war die Voraussetzung zur Untersuchung der Interaktionsmechanismen auf zellulärer und molekularer Ebene. Gegenregulatorische Einflüsse von somatotropen Hormonen und Dexamethason als Glukocorticoid konnten für die DNA-Synthese und Proliferation der Wachstumsfugenchondrozyten, die lokale Synthese des Wachstumsfaktors IGF-I, die Transkription von GH-Rezeptor mRNA sowie die Expression von IGF-I- und GH-Rezeptorprotein gezeigt werden. Die in der Studie beschriebenen Mechanismen könnten ein Beitrag zur weiteren Aufklärung der Pathogenese des steroidinduzierten Minderwuchses und zur biologischen Rationale der Wachstumshormontherapie entsprechender Kinder sein.