

Katrin Faehling
Dr. med.

Osteoblastäre Subpopulationen: Charakterisierung und Wirkungen von Dihydrotestosteron und Wachstumsfaktoren

Geboren am 28/08/1968 in Mannheim
Staatsexamen am 12.11.2007 an der Universität Ulm

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

Androgene Steroide sind bei beiden Geschlechtern für die Regulation der Osteogenese und des Knochenstoffwechsels von Bedeutung. In vitro beeinflussen sie sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung osteoblastärer Zellen. Die Abhängigkeit dieser Androgen-Effekte vom Differenzierungsgrad einer Zellpopulation sowie weitere mit dem Differenzierungsgrad assoziierte Unterschiede sind Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen. Dabei wird insbesondere überprüft, ob die gleichzeitige Stimulation von Proliferation und Differenzierung osteoblastärer Zellen durch gegensätzliche Reaktionen unterschiedlich differenzierter Subpopulationen auf Dihydrotestosteron (DHT) bedingt sein könnte. Wachstumsfaktoren beeinflussen die Regulation des Knochenstoffwechsels und gelten als mögliche Vermittler der Wirkungen androgener Steroide. Hierfür kommen neben zahlreichen hier nicht berücksichtigten Faktoren auch Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) und Insulin-like Growth Factor II (IGF2) in Betracht. Ihre Wirkungen an unterschiedlich differenzierten osteoblastären Populationen werden daher ebenfalls untersucht. Zur Charakterisierung einer Zellpopulation und zur Beurteilung ihrer Reaktion auf Effektoren werden folgende Parameter bestimmt: Die Einschätzung des Differenzierungsgrades erfolgt anhand der spezifischen Aktivität der Alkalische Phosphatase (AP) im Zellextrakt. Im weiteren werden daher Populationen mit hoher AP-Expression auch als hochdifferenziert, solche mit niedrigem AP-Gehalt auch als niedrigdifferenziert bezeichnet. Als weitere Differenzierungsparameter dienen im Rahmen der Charakterisierung der Anteil AP-positiver Zellen, die Kollagenfreisetzung in das Medium - gemessen als PICP-Konzentration - sowie die Osteocalcin-Freisetzung. Als Bezugsgröße für die AP-Expression, die Kollagen- und die Osteocalcin-Synthese, aber auch als eigenständiger Parameter wird der Proteingehalt im Zellextrakt bestimmt. Zur Quantifizierung der proliferativen Aktivität einer Zellpopulation wird die DNA-Synthese-Rate als ^3H -Thymidin-Inkorporation in zelluläre DNA und durch wiederholte mikroskopische Zählung die Verdopplungszeit bestimmt. Als Modell für normale menschliche Osteoblasten wird die hochdifferenzierte humane Osteosarkomzelllinie SaOS-2 gewählt. Die Isolierung hoch- und niedrigdifferenzierter Subpopulationen der transformierten osteoblastären Zelllinie gelingt mittels zweier aufeinanderfolgender 5-Zell-Aussaaten bis zur Unterschieden in der spezifischen AP-Aktivität vom 850-fachen. Die resultierenden Subpopulationen unterscheiden sich dabei außer in ihrer AP-Expression auch bezüglich anderer zellbiologischer Parameter. Die Ergebnisse der Charakterisierung weisen auf das Vorhandensein folgender systematischer Unterschiede hin: Subpopulationen mit hoher basaler AP-Expression weisen einen hohen Anteil AP-positiver Zellen auf. Sie proliferieren schneller und verfügen über ein höheres Potential zur Bildung von Subklonen. Sie setzen weniger Kollagen frei als Subpopulationen mit niedriger spezifischer AP-Aktivität. Diese bestehen überwiegend aus AP-negativen Zellen. Sie weisen eine höhere Kollagenfreisetzung auf, proliferieren langsam und bilden nur wenige Subklone. Weder hoch- noch niedrigdifferenzierte Populationen produzieren Osteocalcin.

Anhand der charakterisierten Zelllinien kann die oben skizzierte Hypothese grundsätzlich bestätigt werden: Subpopulationen mit unterschiedlicher spezifischer AP-Aktivität reagieren unterschiedlich auf Dihydrotestosteron. DHT stimuliert die AP-Expression von Klonen mit hohem basalen AP-Gehalt stärker als von Klonen mit niedrigem. Bei letzteren führt das Androgen gleichzeitig auch zu einer leichten Stimulation der DNA-Synthese, während diese bei Populationen mit hoher spezifischer AP-Aktivität leicht supprimiert wird. DHT wirkt demnach an hochdifferenzierten SaOS-2-Subpopulationen stärker differenzierungsstimulierend, an niedrigdifferenzierten stärker proliferationsfördernd. Die Proteinsynthese wird bei Populationen mit niedriger AP-Expression stärker supprimiert als bei Populationen mit hoher.

Auch bezüglich ihrer Reaktion auf bFGF und IGF2 unterscheiden sich hoch- und niedrigdifferenzierte SaOS-2-Subpopulationen. bFGF und IGF2 bewirken an hochdifferenzierten Zellen eine Proliferationsstimulation, die durch eine Vorbehandlung mit DHT noch gesteigert wird. Im Gegensatz dazu fällt die Stimulation durch bFGF an niedrigdifferenzierten Populationen wesentlich schwächer aus oder schlägt in eine leichte Suppression um. IGF2 vermindert die Proliferation niedrigdifferenzierter Klone sogar erheblich. DHT hat dabei auf die bFGF- und IGF2-Wirkung nur einen geringen oder gar keinen modifizierenden Effekt.

IGF2 bewirkt weiterhin einer Suppression der spezifischen AP-Aktivität, die bei hochdifferenzierten Populationen stärker ausfällt, aber im Gegensatz zu den Befunden bei niedrigdifferenzierten Klonen durch DHT nicht verstärkt wird. Die Proteinsynthese wird bei hochdifferenzierten Klonen durch IGF2 deutlicher stimuliert, dies Stimulation jedoch durch DHT weniger potenziert als bei niedrigdifferenzierten.

Die geschilderten Befunde weisen daraufhin, dass die biologischen Charakteristika von SaOS-2-Subpopulationen und ihre Reaktion auf Dihydrotestosteron und die Wachstumsfaktoren IGF-2 und bFGF von ihrem Differenzierungsgrad abhängig sind.