

---

Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München  
Frauenklinik und Poliklinik  
(Direktorin: Univ.- Prof. Dr. M. B. Kiechle)

**In vitro Untersuchungen zur Beeinflussung von  
Proliferation und Differenzierung humaner  
Osteoblasten durch Konzentration und Zyklizität von  
Progesteron nach Estradiolexposition**

Monika Schmidmayr

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grads eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier  
Prüfer der Dissertation:  
1. Univ.- Prof. Dr. M. B. Kiechle  
2. Univ.- Prof. Dr. A. A. Perren  
(schriftliche Beurteilung)  
2. Priv.- Doz. Dr. M. A. Kremer  
(mündliche Prüfung)

Die Dissertation wurde am 26.06.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.03.2009 angenommen.

---

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN</b>	<b>I</b>
<hr/>	
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<hr/>	
1.1 HORMONELLE REGULATION VON KNOCHENFORMATION IN VIVO	1
1.2 HORMONELLE REGULATION VON OSTEOLASTEN IN VITRO	4
1.3 THEMENSTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT	7
<b>2 MATERIALIEN UND METHODIK</b>	<b>8</b>
<hr/>	
2.1 MATERIALIEN	8
2.1.1 GERÄTE	8
2.1.2 MEDIEN, CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	9
2.2 ZELLKULTUR	11
2.2.1 HERSTELLUNG EINER PRIMÄREN HUMANEN OSTEOLASTENZELLKULTUR	11
2.2.2 SUBKULTIVIERUNG	12
2.2.3 KRYOKONSERVIERUNG UND AUFTAUEN VON ZELLEN	13
2.3 VERSUCHSPLANUNG UND –DURCHFÜHRUNG	14
2.3.1 KULTURMEDIEN UND ZUSÄTZE	14
2.3.2 ESTRADIOL UND PROGESTERON IN GEEIGNETER KONZENTRATION UND HERSTELLUNG ENTSPRECHENDER LÖSUNGEN	14
2.3.3 VERSUCHSDAUER	16
2.3.4 ZELLZAHL	16
2.3.5 DURCHFÜHRUNG DER EXPERIMENTE	18
2.4 VERWENDETE UNTERSUCHUNGSMETHODEN	23
2.4.1 HISTOCHEMISCHE BESTIMMUNG DER CALCIFIZIERUNG	23
2.4.2 ALP IN SITU-FÄRBUNG	23
2.4.3 PROLIFERATIONS-NACHWEIS MITTELS ADHÄSIONS-/HEXOSAMINIDASE-ASSAY	24
2.4.4 ALP FÄRBUNG MIT DEM PNPP-ASSAY	24
2.4.5 ALP-BESTIMMUNG IM ÜBERSTAND	25
2.4.6 UPA UND PAI-1-MESSUNG	25
2.5 STATISTIK	26
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>27</b>
<hr/>	
3.1 TYPISIERUNGSTESTS	27
3.2 ERGEBNISSE DER VORVERSUCHE	28
3.3 OSTEOLASTEN-PROLIFERATION	29
3.3.1 ERGEBNISSE DER ZELLZAHLBESTIMMUNG MITTELS NBT/BCIP	29
3.3.2 OSTEOLASTEN-PROLIFERATION NACH SEQUENTIELLER INKUBATION MIT ESTRADIOL UND PROGESTERON	32
3.3.3 OSTEOLASTEN-PROLIFERATION NACH INKUBATION MIT PROGESTERON OHNE VORHERIGE ESTRADIOL-EXPOSITION	34
3.4 OSTEOLASTEN-DIFFERENZIERUNG	36
3.4.1 INTRAZELLULÄRE ALP-MESSUNGEN MITTELS PNPP NACH SEQUENTIELLER INKUBATION MIT ESTRADIOL UND PROGESTERON	36
3.4.2 INTRAZELLULÄRE ALP-MESSUNGEN MITTELS PNPP NACH ALLEINIGER PROGESTERON- INKUBATION (OHNE ESTRADIOL-EXPOSITION)	40

---

3.4.3	VERGLEICH DER INTRAZELLULÄREN ALP-MESSUNGEN MITTELS PNPP, MIT UND OHNE INKUBATION MIT ESTRADIOL	42
3.4.4	ERGEBNISSE DER ALP-BESTIMMUNGEN IM ÜBERSTAND	44
3.4.5	BESTIMMUNG DES ANTEILS ALP-POSITIVER ZELLEN MITTELS NBT/BCIP	45
<b>3.5</b>	<b>UPA- UND PAI-1-MESSUNGEN</b>	<b>46</b>
<b>4</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b>52</b>
<b>4.1</b>	<b>DISKUSSION DER METHODIK</b>	<b>52</b>
4.1.1	ZELLKULTUR	52
4.1.2	OSTEOGENE MEDIUMZUSÄTZE (PHENOLROT, DEXAMETHASON, ASCORBINSÄURE, FCS)	53
4.1.3	STEROIDHORMONE	55
4.1.4	UNTERSUCHUNGSMETHODEN: HEXOSAMINIDASE-PROLIFERATIONS-ASSAY UND ALP-NACHWEIS	56
4.1.5	UNTERSUCHUNGSMETHODEN: UPA UND PAI-1	57
<b>4.2</b>	<b>DISKUSSION DER ERGEBNISSE DER HAUPTVERSUCHE</b>	<b>58</b>
4.2.1	PROGESTERONKONZENTRATION	58
4.2.2	ZYKLIZITÄT VON ESTRADIOL UND PROGESTERON	61
4.2.3	VERSUCHSDAUER	64
4.2.4	UPA- UND PAI-1	66
<b>4.3</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK</b>	<b>69</b>
<b>5</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b>71</b>
	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b>73</b>
	<b><u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u></b>	<b>79</b>
	<b><u>TABELLENVERZEICHNIS</u></b>	<b>81</b>
	<b><u>ANHANG</u></b>	<b>82</b>

---

## **Abkürzungen und Einheiten**

°C	Grad Celsius
AA/Ascorbins.	Ascorbinsäure
Abb.	Abbildung
ALP	Alkalische Phosphatase
Art.	Artikel
bzw.	beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
Dex	Dexamethason
E <sub>2</sub>	Estradiol
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetales Kälberserum
HSD	Hydroxysteroid-Dehydrogenase
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
l	Liter
Konz.	Konzentration
M	Mol
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
mm	Millimeter
mM	Milli-Mol
MPA	Medroxyprogesteronacetat
NaOH	Natriumhydroxid
NBT/BCIP	Nitro Blau Tetrazolium Chlorid/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat
ng	Nanogramm
Nr.	Nummer
n.s.	nicht signifikant
OPG	Osteoprotegrin
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PBS	Phosphate-Buffered Saline
physiol.	physiologisch
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
Prog.	Progesteron

---

PTH	Parathormon
RANK	Rezeptor-Aktivator von nukleärem Faktor $\kappa$ B
RANKL	RANK-Ligand
S.	Seite
sog.	sogenannt
supraphysiol.	supraphysiologisch
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
uPA	uro Plasminogen Aktivator
v.a.	vor allem
vs.	versus
WHO	World Health Organisation

# 1 Einleitung

## 1.1 Hormonelle Regulation von Knochenformation in vivo

Die Osteoporose wird von der WHO als eine der 10 weltweit wichtigsten Krankheiten eingestuft. Im Rahmen der derzeitigen „Bone and Joint Decade“ wird zunehmend die Prävention dieser mit Schmerzen, Behinderung und Pflegebedürftigkeit verbundenen Erkrankung gefordert. Etwa 30% aller Frauen erleiden osteoporotische Frakturen und sind damit doppelt so häufig betroffen wie Männer. Um die Menopause kommt es bei ca. 25% der Frauen zu einem besonders beschleunigten Knochenmasseverlust. Bei diesen sogenannten „fast losers“ handelt es sich um eine besondere Risikogruppe für Osteoporose. Warum es zu dem überdurchschnittlichen Knochendichte-Abbau kommt, ist bisher nicht geklärt. Bislang konzentrierte sich das Interesse hauptsächlich auf die anti-resorptiven Eigenschaften von Östrogenen.

Für Gestagene wurden anabole Wirkungen am Knochen gefunden [Prior 1994, S.521; Tremolieres 1993, S.628-629]. Ausserdem schwankt der Knochen-Stoffwechsel zyklusabhängig mit einer Korrelation zwischen Knochenabbau und niedrigen Hormonspiegeln in der Follikulär-Phase [Chiu 1999, S.612; Zittermann 2000, S.97].

Nach neuesten Erkenntnissen geht der Aktivierung der Osteoklasten eine Aktivierung der Osteoblasten voraus, da RANK-Ligand, von Osteoblasten gebildet, die Osteoklasten-Tätigkeit steuert. Zu diesem System gehört ausserdem Osteoprotegrin (OPG), welches durch Behinderung der RANK/RANK-L-Bindung die Osteoklasten-Tätigkeit stört [Manolagas 2000, Kap.V]. Unter anderem über eine Modulation der Produktion von Interleukin-6 und -11 beeinflussen Estrogene, SERMs und Gestagene dieses System [Futamura 1995, S.157; Viereck 2003, S. 4208; Liao 2003, S.787] Der Knochenmetabolismus wird also maßgeblich auch von Osteoblasten und nicht nur – wie bisher angenommen – von Osteoklasten bestimmt.

In der Perimenopause, einer Phase mit noch ausreichender, oft sogar erhöhter, unopponierter Östrogenversorgung [Prior 1998, S.405] haben neuere Untersuchungen einen schnelleren Knochenabbau pro Jahr gefunden, als in der frühen Postmenopause [Prior 1998, S.419]. In dieser Phase nimmt auch die Rate ovulatorischer Zyklen von 70% (sieben Jahre vor der Menopause) auf 5% (sechs Monate vor der Menopause) ab [Prior 1998, S. 408], sodaß ein Progesterondefizit dem Östrogenmangel vorausgeht. Hinzu kommt die Erkenntnis, dass bei perimenopausalen Frauen mit noch ausreichenden Estrogenkonzentrationen bereits verstärkt Veränderungen im Knochenstoffwechsel festzustellen sind. Dabei scheinen

die laborchemischen Parameter von sowohl Knochenauf- als auch –abbau erhöht zu sein [Rosenbrock 2002, S.143].

Vor dem Hintergrund der neuen Erkenntnisse sowohl zur Endokrinologie der Perimenopause als auch zur Regulation des Knochenstoffwechsels durch das RANKL/OPG-System erscheint eine Charakterisierung der knochenmetabolischen Wirkungen der ovariellen Steroidhormone unter Berücksichtigung ihrer Zyklizität wünschenswert.

Endogenes Progesteron wird nur in der zweiten Zyklushälfte messbar und überschreitet nur nach einer Ovulation Werte von 8-10ng/ml Serum. Ein Zusammenhang mit dem Knochenstoffwechsel liegt nahe durch zwei Beobachtungen: Im dritten Trimenon der Schwangerschaft steigt die Progesteron-Produktion im weiblichen Körper massiv an und erreicht bis zu 100-200mg pro Tag. In diesem Trimenon erfolgt 80% der Mineralisierung des fetalen Skeletts.

Progesteron bindet kompetitiv an Cortisonrezeptoren. Neben der cortisonbedingten Osteoporose sind auch Ess-Störungen wie Bulimie und Anorexie, die in ihren mildesten Ausprägungen zunächst mit gehäufte Anovulation einhergehen, bekannte, starke Risikofaktoren für Osteoporose [Kaplan Seidenfeld 2001, S.446], ebenso wie die „stress-induzierte“ Anovulation, die als Vorstufe zur hypothalamischen Amenorrhoe aus Zyklusbeobachtungen in Kinderwunschzentren bekannt ist.

Bowman publizierte bereits 1996 Versuche an pseudo-schwangeren Ratten, welche niedrige Estrogen-, aber hohe Progesteronspiegel aufweisen, und an ovariectomierten Ratten mit niedrigen Estrogen- und Progesteronspiegeln. Dabei zeigten die ovariectomierten Ratten signifikant reduzierte Knochenmasse sowie gesteigerte Osteoklastentätigkeit. Bei den pseudo-schwangeren Ratten dagegen blieb die Knochenmasse unverändert, wobei die Osteoklastentätigkeit hier nicht höher war als bei Kontroll-Tieren mit normalen Zyklen, und vor allem die periostale Knochenbildung stärker zunahm als bei den ovariectomierten Tieren. Die Daten sprechen für eine wichtige Rolle des Progesterons zur Erhaltung der Knochendichte durch gesteigerte Knochenbildung und verminderte Knochenresorption in Zeiten von niedrigen Estrogenspiegeln [Bowman BM 1996, S. 15-21].

Eine Studie an jungen Frauen mit Zyklusunregelmäßigkeiten fand schützende Wirkungen von Gestagenen bezüglich der Knochendichte. Diese Frauen, welche Symptome wie Oligomenorrhoe, Anovulation und verkürzte Lutealphasen aufwiesen, wurden zyklisch 10 Tage pro Monat mit Medroxyprogesteron behandelt. Dabei

zeigten diese Patientinnen nach einem Jahr eine Zunahme der Knochendichte, die durch Calcium allein nicht erreicht werden konnte, während die Frauen der Kontrollgruppe mit denselben Symptomen, aber ohne Medroxyprogesteron-Behandlung eine Reduktion der Knochendichte erlitten [Prior 1994, S.521].

## **1.2 Hormonelle Regulation von Osteoblasten in vitro**

Die osteoanabole Wirkung von Progesteron auf Osteoblasten wurde bisher anhand von vermehrter Konzentration bzw. Aktivität von Osteoprotegerin, TGF $\beta$ -Isoformen und knochenspezifischer Alkalischer Phosphatase (BAP) [Scheven BAA 1992, S.55-56; Katzburg S 1999, S.668-669; Luo X-H 2002, S.329] gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass Östrogenrezeptor alpha der dominante Induktor für die Bildung von Progesteron-Rezeptoren in menschlichen Osteoblasten ist [Rickard JD 2002, S.586], und dass Progesteron die Expression und Transkription von IGF-Bindungs-Protein-5 erhöht, welches in Osteoblasten produziert wird und den mitogenen Reiz von IGF in Osteoblasten-Zellkulturen potenziert [Manolagas 2000; 115-137].

Progesteron aktiviert in Osteoblasten direkt G-Protein, was ohne die Vermittlung über nukleäre Rezeptoren zu einer sehr schnellen Second-messenger-Formation führt. Diese rasche G-Protein-Aktivierung wird via unkonventionelle Oberflächenrezeptoren vermittelt, die membranständig und Phospholipase C-gekoppelt zu sein scheinen [Le Mellay V 2000, S.173] Grosse B 2000, S.343]. Osteoblasten-Kulturen sind Steroid-Metabolismus-aktive Gewebe, in denen Oxoreductase, 20-alpha-Hydroxsteroid-Dehydrogenase, sowie 3 $\beta$ -HSD, 7-Alpha-Hydroxylase und 17 $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität nachgewiesen werden konnte, sodaß sowohl Kortison zu aktivem Kortisol (das kompetitiv mit Progesteron am Rezeptor bindet) konvertiert werden kann, als auch aus Progesteron in Zyklustag-abhängigen Bildungsraten 20-Alpha-Progesteron gebildet wird [Ishida Y, Killinger DW 2002, S.237]. Die Gruppe um Ishida zeigte im Jahr 2002, dass das synthetische Gestagen Medroxyprogesteronacetat, das signifikante glukokortikoide Aktivität besitzt, den Glukokortikoid-Rezeptor besetzt, und dass Rezeptor-Besatz über normale Glukokortikoid-Konzentrationen hinaus die Differenzierung von Osteoblasten beeinträchtigt [Ishida Y, Heersche 2002, S.603]. Dies könnte erklären, warum besonders für hochdosiertes Depot-MPA die klinische Beobachtung gemacht wurde, dass es zu einer Abnahme der Knochendichte führt.

Scheven [Scheven BAA 1992, S.55-556] untersuchte mit seiner Arbeitsgruppe die Wirkung von Estrogen und Progesteron, jeweils in den Konzentrationen 10<sup>-8</sup>M, 10<sup>-10</sup>M und 10<sup>-12</sup>M, auf die Gesamtzellzahl und den Anteil ALP-positiver Zellen in einer humanen Osteoblasten-Zellkultur. Dabei betrug die Inkubationszeit lediglich 24 bis 48 Stunden.

Verhaar [Verhaar HJ 1994, S.307-308] verwendete Estrogen in der Konzentration von 10<sup>-10</sup>M sowie Progesteron in Konzentrationen von 10<sup>-6</sup>M bis 10<sup>-14</sup>M, um die

Wirkung auf die Gesamtzellzahl humaner Osteoblasten in vitro zu beurteilen. Daneben benutzte er Estrogen und Progesteron in einer Konzentration von jeweils  $10^{-10}$ M, um deren Einfluss auf die ALP-Konzentration zu ermitteln. Dabei betrug das Alter der Patienten, aus deren Knochen die verwendeten Osteoblasten kultiviert wurden, durchschnittlich 70 Jahre. Auch in diesen Versuchen wurden die Zellkulturen nur 24 Stunden lang mit den Hormonen behandelt.

Katzburg [Katzburg S 1999, S.667-668] teilte die Patienten, aus deren Knochen er Osteoblasten kultivierte, in vier Gruppen ein, Frauen unter 50 und über 55 Jahre sowie Männer unter 55 und über 60 Jahre. Diese Zellen wurden über 48 Stunden mit  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  in einer Konzentration von  $10^{-9}$ M behandelt, um die Auswirkungen auf Osteocalcin zu testen, sowie mit Estrogen  $10^{-7}$ M,  $10^{-8}$ M und  $10^{-9}$ M und Progesteron  $10^{-5}$ M und  $10^{-6}$ M, um dadurch hervorgerufene Veränderungen von ALP zu ermitteln.

Eine weitere Arbeit von Sloomweg [Sloomweg MC 1992, R5-8] beschäftigte sich mit der Interaktion von Estrogen und Progesteron. Dazu wurden humane Osteosarkomzellen und Ratten-Osteoblasten für 24 bis 48 Stunden mit Estrogen und dem reinen Gestagen Org 2058 sowohl jeweils einzeln als auch gleichzeitig inkubiert. Die Konzentrationen betragen für Estrogen ebenso wie für das Gestagen  $10^{-8}$ M,  $10^{-10}$ M,  $10^{-12}$ M und  $10^{-14}$ M. Dabei konnte bei beiden Zell-Linien kein signifikanter Effekt auf die Proliferation durch alleinige Estrogen- oder Gestagen-Gabe gefunden werden. Dagegen hatte die gleichzeitige Behandlung mit Estrogen und dem Gestagen sowohl bei den humanen Osteosarkomzellen als auch bei den Ratten-Osteoblasten eine signifikante Steigerung der Proliferation zur Folge.

Somit gibt es zwar bereits verschiedene Arbeiten, die sich mit der Wirkung von weiblichen Sexualhormonen auf Osteoblasten auseinandersetzen, jedoch war die Inkubationszeit bei allen bisher unternommenen Experimenten mit 24 bis 48 Stunden zu kurz, um Auswirkungen auf das sich nur langsam erneuernde Knochengewebe aussagekräftig beurteilen zu können.

Hinzu kommt, dass die meisten bislang durchgeführten Untersuchungen nur jeweils die Einzelwirkung von entweder Estrogen oder Progesteron behandelten, und nur in einem Fall die gemeinsame Wirkung Gegenstand der Versuche war. Bei diesem Fall handelte es sich jedoch um Forschungen an Osteosarkom- und Ratten-Zellen, so dass eine Übertragbarkeit auf humane Osteoblasten nur bedingt gegeben ist. Zudem decken die verwendeten Konzentrationen zum Teil nur einen kleinen Bereich der sinnvollerweise zu testenden Konzentrationen ab. Gerade das Progesteron, aber auch das Estrogen betreffend sind im Laufe des Zyklus ebenso wie im Verlauf des

Lebens einer Frau sehr verschieden hohe physiologische Spiegel anzutreffen, was bei entsprechenden Versuchen auch berücksichtigt werden sollte.

Humane Osteoblasten enthalten sowohl urokinase Plasminogen-Aktivator (uPA) als auch Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1), denen eine Beteiligung an der Kopplung zwischen Knochenformation und Knochenresorption zugesprochen wird, da Plasmin sowohl Osteocalcin aus Hydroxylapatit herauszulösen vermag als auch TGF $\beta$  aktiviert [Yee JA 1993, S.528], und da in tPA- und uPA-Knock-out-Mäusen vermehrte Knochenformation und höhere Knochenmasse gefunden wurden [Daci E 2003, S.1167].

Gewebsständige wie lösliche Plasminogenaktivatoren und PAI-1 üben außerdem wichtige Funktionen bei der Ovulation, der Regulation des Corpus luteum und der Luteolyse aus, wofür ein zeitlich koordiniertes, feinabgestimmtes Zusammenspiel dieser beiden Proteasen vermutet wird. So verstärken Plasminogen-Aktivator neutralisierende Antikörper die PAI-1-Aktivität und die Progesteron-Produktion in Affen-Luteal-Zellkulturen [Liu 2003, S. 615-3616]. Die Autoren vermuteten die Hemmung der Progesteronsynthese durch autokrine und parakrine Mechanismen im Corpus luteum.

Da uPA und PAI-1 also sowohl in Osteoblasten-Funktionen als auch im Corpus luteum in die Regulation der Progesteronsynthese involviert sind, wäre umgekehrt eine Wirkung von Progesteron auf die Proteasenexpression (z.B. im Sinne eines Rückkopplungsmechanismus) gut vorstellbar. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit auch der Effekt von Progesteron auf die Expression der beiden Serin-Proteasen in der humanen Osteoblasten-Kultur betrachtet werden.

### **1.3 Themenstellung und Ziel der Arbeit**

Die bisher erwähnten Publikationen verdeutlichen die Rolle sowohl klinischer Veränderungen im zyklischen hormonellen Geschehen bei Frauen als auch experimentell hervorgerufener Hormon-Einflüsse auf Osteoblasten-Zellkulturen im Knochenstoffwechsel. Dabei konzentriert sich das Interesse zunehmend auch auf die Charakterisierung der knochenmetabolischen Eigenschaften des Progesterons. Die Betrachtung bisher gewonnener Erkenntnisse führte zu der Frage, inwieweit Progesteron im Laufe eines Zyklus allein bzw. in Interaktion mit Estradiol zu einer Veränderung im Proliferations- und Differenzierungsverhalten von Osteoblasten sowie in deren Expression von uPA und PAI-1 führt. Hierzu wurde eine Versuchsreihe mit humanen Osteoblasten-Zellkulturen geplant, welche für die Dauer eines physiologischen Zyklus mit Progesteron in verschiedenen Konzentrationen, mit und ohne vorausgehende und simultane Estradiol-Behandlung, inkubiert werden sollten. In 14- und 28-tägigen Langzeit-Versuchen sollten der Proliferationsmarker Hexosaminidase, der Differenzierungsmarker ALP sowie uPA und PAI-1 bestimmt werden. Durch diesen Versuchsaufbau sollte erstmals der Einfluss folgender Faktoren auf die genannten Parameter untersucht und miteinander verglichen werden:

1. Estradiolinkubation vor und während der Inkubation mit Progesteron – vs. Inkubation nur mit Progesteron
2. Inkubation mit Estradiol für 14 und Progesteron für 7 Tage – vs. Inkubation mit Estradiol für 28 und Progesteron für 21 Tage
3. Inkubation mit Progesteron alleine für 7 Tage – vs. Inkubation mit Progesteron alleine für 21 Tage
4. Inkubation mit Progesteron in verschiedenen Konzentrationen, jeweils mit und ohne Estradiol

## **2 Materialien und Methodik**

### **2.1 Materialien**

#### **2.1.1 Geräte**

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Geräte benutzt:

- Brutschrank (Hera Cell, Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Computer (Intel Pentium II 266 MHz, Betriebssystem Microsoft® Windows 98, Software: Microsoft Office 97)
- Kryokonservierungsröhrchen (Art. 5000-0012; Nalgene Cryogenic Vials, Nalge Company, Rochester, NY, USA)
- Eismaschine (Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen, Deutschland)
- Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,6ml, 2ml; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Eppendorfpipetten (Reference, Eppendorf AG)
- Gefrierschränke (Kühlschrank premium frost-free, Tiefkühlschrank, Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland)
- Mikroliterpipettierhilfen (Biozym PreCision, Biozym GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Mikroskope:
  - Wilovert S (Hund, Wetzlar, Deutschland)
  - Axiovert 25 (Zeiss, Jena, Deutschland)
- Kamera: AxioCam MRC (Zeiss, Jena, Deutschland) mit zugehöriger Software
- Mikrotiterplatten (6 Well, 96 Well; DB Falcon, Becton Dickinson Labware Company, Franklin Lakes, NJ. USA)
- Neubauerkammer
- Objektträger mit unterteilten Kulturkammern (BD Falcon 4-well Culture Slides, BD Europe, Belgien)
- Ostasemessgerät (Access®, DPC Biermann, Bad Nauheim, Deutschland)
- Photometer Multiscan® Ascent (Version 1.3.1, LabSystems, Research Technologies, Helsinki, Finland, Art. 1507 540) mit dazugehöriger Ascent Software (Version 2.4 für Multiscan® Ascent Art. 1507 550)
- Pipettierhilfe (Pipetus-Akku, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland)

- Sterile Einmal-Glaspipetten (2ml, 5ml, 10ml, 25ml; BD Falcon, Becton/Dickinson, Franklin Lakes, NJ. USA)
- Sterile Einmal-Mikroliterpipettenspitzen (Safeseal Tips Premium 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl; Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland)
- Sterile PVC-Röhrchen (Falcon Blue Max, 15ml, 50ml, Becton Dickson Labware Company, Franklin Lakes, NJ, USA)
- Sterile Werkbank (Hera safe, Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Stickstofftank (Asperge 75, Air Liquide GmbH, Düsseldorf, Deutschland)
- Vortex Mixer (NeoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Wasserbad (Grant Instruments (Cambridge) Ltd., Cambridgeshire, GB)
- Wärmeplatte mit Magnetrührer (Ikamag® RCT basic, Ika-Werke GmbH + Co. KG, Staufen, Deutschland)
- Zellkulturflaschen (BD Falcon T-25 [250mm<sup>2</sup>], T-75 [750mm<sup>2</sup>], T-160 [160mm<sup>2</sup>]; Becton Dickinson Labware Company, Franklin Lakes, NJ. USA)
- Zellsieb (BD Falcon cell strainer 40µm; BD Biosciences Europe, Erembodegem, Belgien)
- Zentrifuge (Rotixa/A, Hettich AG, Bäch, Schweiz)

### 2.1.2 Medien, Chemikalien und Reagenzien

Die beschriebenen Untersuchungen wurden mit Hilfe dieser Assays durchgeführt:

- Adhäsionsassay (Substrat: p-Nitrophenyl N-Acetyl-β-p-Glucosaminide, Art. N-9376, Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
- ALP Assay (Sigma Fast™ para-Nitrophenylphosphat Set, Art. N1891, Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
- ALP in situ Assay (NBT/BCIP Nitro blue tetrazolium chloride/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate ready-to-use tablets, Cat. No. 1 697 471, Roche Diagnostics GmbH – Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland)
- Alizarinrot zum Calcifizierungs-Nachweis (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
- Ostase-Assay (Access® Ostase, DPC Biermann, Bad Nauheim, Deutschland)
- PAI-1 Kit (Imubind® Tissue PAI-1 ELISA Kit, Prod. No. 821, American Diagnostica inc., Stamford, USA)
- uPA Kit (Imubind® Tissue uPA ELISA Kit, Product No. 894, American Diagnostica inc., Stamford, USA)

Neben den aufgelisteten Geräten und Assays wurden die folgenden Medien, Chemikalien und Reagenzien bei der Durchführung der hier beschriebenen Experimente verwendet:

- Aqua injectabile (Aqua Spüllösung, Delta select GmbH, Dreieich, Deutschland)
- Ascorbinsäure (Art. Nr. A-4403, Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
- BRIJ® 35 Solution (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO 63178 USA)
- Biotynilated Link Universal (Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark)
- Dexamethason (wasserlöslich, für Zellkultur getestet; Art. Nr. D 2915, Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
- Ethanol 100% (UN 1170, J.T. Baker, Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland)
- FCS (fetales Kälberserum, Art. Nr. FO 115, Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- L-Glutamin (200nM, Art. Nr. K0282, Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- Nährmedien:
  - Dulbecco's MEM (mit 3,7g/l NaHCO<sub>3</sub>, mit 4,5g/l D-Glucose, ohne L-Glutamin, ohne Na-Pyruvat; Art. Nr. FG 0435, Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
  - calciumfreies Medium (Dulbecco's MEM [1x]; mit 3,7g/l NaHCO<sub>3</sub>, mit 1,0g/l D-Glucose, ohne L-Glutamine, ohne Ca<sup>2+</sup> ; Art. Nr. F 9050/0504G, Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
  - phenolrotfreies Medium (Dulbecco's MEM [1x]; mit 3,7g/l NaHCO<sub>3</sub>, mit 4,5g/l Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- Einfriermedium (mit 10% DMSO, Gibco, Paisley, Scotland, UK)
- Estradiol (Art. Nr. E-2257; Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
- PBS (Phosphate-Buffered Saline) 0,01M, pH 7,4 (P-3813, Sigma-Aldrich Inc.)
- Progesteron (Art. P-6149; Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
- 1-Propanol (K 320 27897321, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)
- Primocin™ (Antibiotikum, 100µg/ml, 1ml/500ml Medium, Art. Nr. 11 K 03-SV; Invivogen, San Diego, USA;)
- Streptavidin HRP (Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark)
- Tris-Puffer 99+% (Art. T-8524; Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
- Trypanblau 0,5% (w/v) in physiologischer Kochsalzlösung (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

- Trypsin-EDTA (1x), ohne Calcium und Magnesium mit EDTA (Gibco, Paisley, Scotland, UK)
- Vitamine (MEM Vitamine 100x, Zusammensetzung in 100x Konzentrat: Folsäure, Cholinchlorid, Nicotinsäureamid, D-Ca-Pantothenat, Pyridoxal-HCl, Thiamin-HCl (je 100mg/l), Riboflavin (10mg/l), i-Inositol (200mg/l); Art. Nr. K 0373, Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

## **2.2 Zellkultur**

### **2.2.1 Herstellung einer primären humanen Osteoblastenzellkultur**

#### **Herkunft der Zellen**

Die für die nachfolgend beschriebenen Versuche verwendeten Osteoblasten wurden aus Hüftköpfen kultiviert, welche im Rahmen einer Totalendoprothese-Operation in der Orthopädischen Klinik i.H. (Direktor: Prof. Dr. R. Gradinger) entnommen wurden. Für die Versuche wurden als Spender von Hüftköpfen Frauen im prä- und perimenopausalen Alter ausgewählt, um in vitro einen möglichst gleichen Steroidhormonrezeptorstatus zu ermöglichen. Die aus den Hüftköpfen von drei Patientinnen gewonnenen Osteoblasten wurden anschließend gepoolt, um interindividuelle Unterschiede auszugleichen. Diese drei Patientinnen werden hier aus Datenschutzgründen in Form von Kürzeln genannt. Es handelte sich um

Frau H., 48 Jahre, Diagnose: Coxarthrose

Frau E., 45 Jahre, Diagnose: Coxarthrose

Frau S., 39 Jahre, Diagnose: Dysplasiecoxarthrose

Die betreffenden Patientinnen hatten ihr Einverständnis zur Verwendung entnommenen Gewebes für wissenschaftliche Zwecke gegeben.

#### **Kultivierung der Zellen**

Die Kultivierung der Zellen erfolgte nach der im orthopädischen Forschungslabor etablierten Methode wie beschrieben von Diehl P et al [Diehl P 2005, S. 286]. Unmittelbar nach der operativen Entnahme des Hüft-Kopfs wurde dieser steril verpackt in das Labor gebracht und dort an der Sterilbank unter sterilen Bedingungen weiterverarbeitet. Mit Hilfe von Zangen und Einmal-Skalpellen wurde die besonders zur Zellkultivierung geeignete Spongiosa herausgelöst und in möglichst kleine Stücke von max. 0.5cm x 0.5cm Größe zerteilt. Die gerade nicht in Bearbeitung befindlichen

Stücke wurden in Medium aufbewahrt, um ein Austrocknen zu vermeiden. Anschließend wurden sie so lange mit PBS gewaschen, bis die Spülflüssigkeit keine Erythrozyten, Fett und andere Verunreinigungen mehr enthielt und dementsprechend klar war. Danach folgte eine fünfminütige Behandlung mit in PBS gelöstem Penicillin und Streptomycin, welches hierauf mit PBS wieder ausgewaschen wurde. Zuletzt wurden die Knochenstücke für weitere fünf Minuten mit Trypsin 0.05%/EDTA 0.02% inkubiert, um eventuell anhaftende Fibroblasten zu entfernen. Die Trypsin-Lösung wurde mit Hilfe von serumhaltigem Medium deaktiviert und ausgespült. Die so behandelte Spongiosa wurde auf 6 Wellplatten verteilt und mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) bedeckt. In den folgenden Tagen wurden die Wells wiederholt mit frischem Medium gespült, sofern noch Erythrozyten oder andere Verunreinigungen zu sehen waren. Bis zum Auswachsen von Zellen, das nach ca. 1 Woche begann, wurden die Knochenstücke im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### **2.2.2 Subkultivierung**

Nach dem Auswachsen eines konfluenten Zellrasens aus den Spongiosastücken etwa 4 Wochen nach Beginn der Kultivierung wurden diese zusammen mit dem Medium entfernt und die Schälchen für ein bis zwei Minuten mit PBS gespült, um eine Deaktivierung des nachfolgend angewandten Trypsins durch das im Medium enthaltene Serum zu verhindern. Daraufhin wurden die Zellen mit leicht angewärmtem Trypsin/EDTA bedeckt und für drei bis fünf, maximal aber fünfzehn Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert, bis sich alle adhärenen Zellen von der Oberfläche der Kulturschale abgelöst hatten. Die Inaktivierung erfolgte mit serumhaltigem Medium in einer dem Trypsin entsprechenden Menge. Die Zellsuspension wurde in sterile Falcon PVC-Röhrchen überführt und 10 Minuten lang bei 250 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig vom Zellpellet abpipettiert und dieses in frischem Medium resuspendiert. Das Verklumpen der Osteoblasten, welches das Auszählen und gleichmäßige Verteilen auf neue Kulturgefäße unmöglich gemacht hätte, wurde durch mehrfaches pipettieren soweit möglich verhindert. Schließlich wurden die Zellen ausgezählt und in einer Dichte von ca.  $4 \times 10^5$  Zellen/Flasche in 75cm<sup>2</sup> Kulturflaschen ausgesät.

Sobald die Zellen in den Kulturflaschen erneut ca. 80% Konfluenz erreichten, erfolgte entsprechendes Vorgehen und Verteilung der Zellen auf eine größere Anzahl an

Gefäßen um eine Hemmung der Proliferation durch Kontaktinhibition und ein mögliches Absterben der Kultur zu unterbinden.

Ein Mediumwechsel fand in der Regel zweimal pro Woche statt oder sobald ein Farbumschlag des Mediums, das Phenolrot als pH-Indikator enthielt, zu erkennen war.

Um das Aussäen der jeweils geeigneten Menge an Zellen zu gewährleisten, musste ihre Anzahl in der durch das oben beschriebene Abtrypsinieren gewonnenen Suspension bestimmt werden. Dies geschah mit Hilfe einer Neubauerkammer in herkömmlicher Weise. Dazu wurden 40µl Medium, 10µl der Zellsuspension sowie 50µl Trypanblau miteinander vermischt und die Anzahl der darin enthaltenen vitalen Zellen in mindestens vier der großen Quadrate der Neubauerkammer bestimmt. Die Zellzahl/ml wurde durch Bildung des Mittelwerts aus den ausgezählten Quadraten und Multiplikation mit  $10^5$  berechnet, die Gesamtzellzahl durch Multiplikation der Zellzahl/ml mit dem Gesamtvolumen der Suspension in ml.

### **2.2.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen**

Um eine Kontamination der Kulturen sowie zu häufiges Passagieren und damit den Verlust der spezifischen Eigenschaften der Osteoblasten zu vermeiden, wurden diese, sobald durch wiederholte Subkultivierung eine ausreichende Anzahl erreicht war, bis zur weiteren Verarbeitung kryokonserviert. Dies erfolgte nach der im Labor etablierten Methode, wie beschrieben bei Lindl [Lindl T, 2002, S.115-118].

Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben abtrypsinisiert und ausgezählt. Im Anschluß daran wurden sie erneut zentrifugiert, und nach vorsichtigem Abpipettieren des normalen Mediums wurde das Zellpellet ebenso wie Einfriermedium auf Eis gestellt. Einige Minuten später, wenn beides abgekühlt war, wurden die Zellen in geeigneter Dichte von  $5 \times 10^6$  /ml mit dem Einfriermedium resuspendiert und je 1ml der Suspension in ein Kryoröhrchen abgefüllt. Die Röhrchen wurden unverzüglich in die mit 1-Propanol gefüllte Einfrierbox und diese bei einer Temperatur von  $-80^\circ\text{C}$  in die Kühltruhe gestellt. Um die Zellen zu schonen, muss dieser Vorgang innerhalb von fünf Minuten nach Zugabe des Einfriermediums beendet werden. 24 bis 48 Stunden später wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und dort bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Zum Auftauen wurden die Zellen im  $37^\circ\text{C}$  warmen Wasserbad erwärmt und der beinahe vollständig aufgetaute Inhalt eines jeden Röhrchens in 15ml angewärmten Kulturmediums gegeben. Die abzentrifugierten und ausgezählten Zellen wurden in

geeigneter Dichte in Kulturflaschen ausgesät und vor der Verwendung für Experimente mindestens 2x passagiert.

Zuletzt wurden die so behandelten Zellen der drei Patientinnen zu gleichen Teilen in einem Pool zusammengefasst und als solcher in den Versuchen verwendet, um individuelle Unterschiede auszugleichen.

## **2.3 Versuchsplanung und -durchführung**

### **2.3.1 Kulturmedien und Zusätze**

In der Subkultivierung der Zellen kam neben  $\text{Ca}^{2+}$ -enthaltendem auch  $\text{Ca}^{2+}$ -freies Medium zum Einsatz.

Für die Versuche wurde phenolrotfreies Medium verwendet, da eine Beeinflussung der Ergebnisse durch Phenolrot, das estrogene Aktivität besitzt [Ernst M 1989, S.907], verhindert werden sollte.

Um optimales Wachstum der Osteoblasten zu ermöglichen, wurden dem Medium unabhängig von seiner Art stets 2nM Glutamat, MEM-Vitamine, fetales Kälberserum (10%) und das Antibiotikum Primocin™ zugesetzt. [Diehl P 2005, S. 286] Da fetales Kälberserum als obligater Mediumzusatz unverzichtbar war, wurde seine Estrogen-Konzentration gemessen: bei 14pg Estradiol je ml FCS wurde in 500 µl Gesamt-Mediumvolumen/Well mit 10% FCS die Estrogen-Konzentration von 1.4pg/ml nicht überschritten. Dieser Estrogengehalt gilt als knochenmetabolisch nicht relevant.

Alle Hauptversuche wurden mit  $10^{-9}\text{M}$  Dexamethason und Ascorbinsäure durchgeführt [Coelho MJ 2000, S.1095].

### **2.3.2 Estradiol und Progesteron in geeigneter Konzentration und Herstellung entsprechender Lösungen**

#### **Estradiol**

Aufgrund der Osteoblastenzellkultur-Arbeiten anderer Arbeitsgruppen, sowie im Hinblick auf die physiologischen Estradiol-Konzentrationen in vivo von perimenstruell 0.02ng/ml bis periovulatorisch 0.2ng/ml wurde für die Versuche eine Estradiol-Konzentration von 0.1ng/ml gewählt, was annähernd  $10^{-10}\text{M}$  entspricht.

Um eine Estradiollösung in geeigneter Konzentration zu erhalten, wurde nach den Angaben des Herstellers zuerst 1mg Estradiol in 1ml Ethanol gelöst und mit 49ml phenolrotfreiem Medium gemischt, so dass eine Lösung mit einer Estradiolkonzentration von 20µg/ml entstand. Ein Teil dieser Stammlösung wurde mit frischem phenolrotfreiem Medium weiter verdünnt bis zu einer Estradiolkonzentration

von 2ng/ml. Der Rest der Stammlösung wurde in einem Falcon-Röhrchen bei -20°C eingefroren, um die Haltbarkeit über einen längeren Zeitraum zu gewährleisten. Die Lösung mit 0.2µg/ml Estradiol wurde zu 1ml und jene mit 2ng/ml Estradiol zu 10ml aliquotiert, um zu häufiges Auftauen und wieder Einfrieren zu vermeiden, und ebenfalls bei -20°C kryokonserviert. Bei jedem Mediumwechsel wurde dann ein Aliquot aufgetaut und auf eine Konzentration von 1ng/ml, 0.1ng/ml bzw. 0.01ng/ml verdünnt. Bei einer molaren Masse des Estradiols von 272.4g/mol entspricht dies  $3.7 \times 10^{-9} \text{M}$ ,  $3.7 \times 10^{-10} \text{M}$  bzw.  $3.7 \times 10^{-11} \text{M}$ .

### Progesteron

Nach oben genannten Kriterien wurde auch der Progesterongehalt des Mediums gewählt. Da die physiologische Konzentration in der menschlichen Lutealphase bei 3-30ng/ml liegt und andere Arbeitsgruppen häufig mit Konzentrationen von  $10^{-10}$ - $10^{-12} \text{M}$  (0.2ng/ml – 2pg/ml) arbeiteten, wurden für die Experimente zunächst Progesteronkonzentrationen von 0.02µg/ml, 2ng/ml und 0.2ng/ml gewählt, was bei einem Molekulargewicht des Progesteron von 314.5g/mol  $6.4 \times 10^{-8/-9/-10} \text{M}$  entspricht. Aufgrund von Zwischenergebnissen in den Vor- und den ersten Hauptversuchen wurden dann zusätzlich auch  $10^{-6} \text{M}$  sowie  $10^{-7} \text{M}$  Progesteron verwendet. Die Lösungen mit den benötigten Progesteronkonzentrationen wurden analog dem oben beschriebenen Vorgehen bei den Estradiollösungen hergestellt, aliquotiert und kryokonserviert. Bei jedem Mediumwechsel wurde ein Aliquot aufgetaut und die Progesteron-Verdünnungsreihe mit frischem Medium weitergeführt. Eine Übersicht der verwendeten Progesteronkonzentrationen in molar und g/l sowie deren physiologisches Vorkommen zeigt Tab. 1.

<b>Prog. Konz. molar</b>	$6.4 \times 10^{-10} \text{M}$	$6.4 \times 10^{-9} \text{M}$	$6.4 \times 10^{-8} \text{M}$	$6.4 \times 10^{-7} \text{M}$	$6.4 \times 10^{-6} \text{M}$
<b>g/l</b>	0.2ng/ml	2ng/ml	20ng/ml	200ng/ml	2µg/ml
<b>Physiol. Vorkommen</b>	Pubertät/ Follikelphase/ Postmenopause	Pubertät/ Follikelphase/ Anovulator. Lutealphase/ Postmenopause	Lutealphase	3.Trimenon der Gravidität	Supraphysiol./ nach Injektion von Depot- Gestagen

**Tab. 1: Verwendete Progesteronkonzentrationen in molar und g/l sowie deren physiologisches Vorkommen**

Zudem wurde eine Ethanolkontrolllösung hergestellt. Dafür wurde entsprechend der 1ng/ml Estradiollösung die höchste eingesetzte Ethanolkonzentration von 0.02‰ ausgewählt.

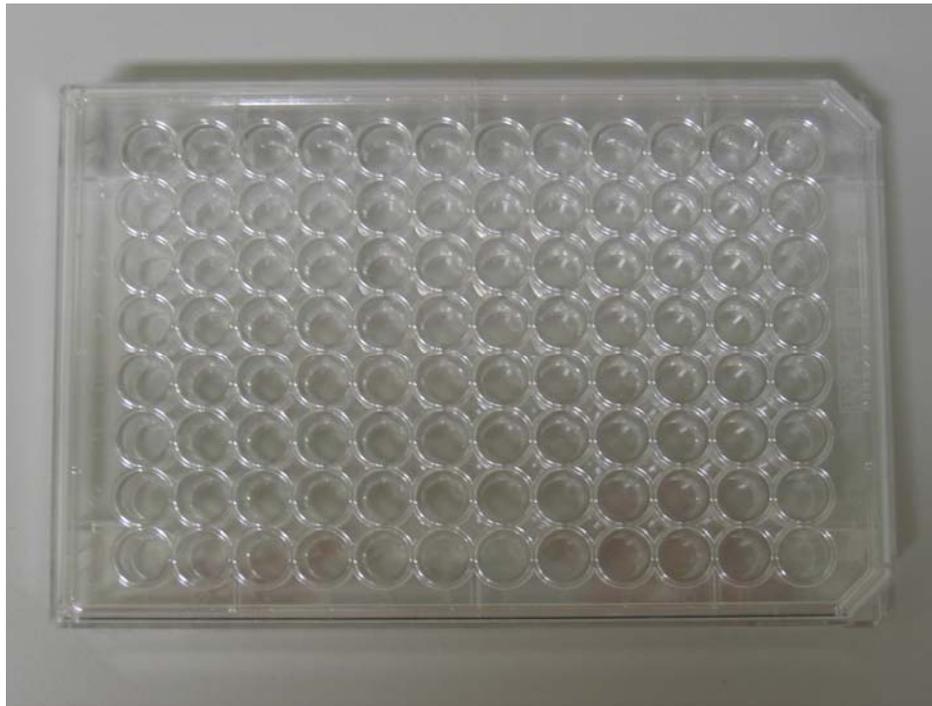
### **2.3.3 Versuchsdauer**

Die Dauer eines Versuchs sollte 14 bzw. 28 Tage betragen, wovon 7 Tage in Estrogenvorbehandlung ohne Progesteronzugabe und 7 weitere bzw. die 21 nachfolgenden Tage in simultaner Östrogen- und Progesteronbehandlung bestehen sollten. Zum einen sollte durch die Versuchszeit von 28 Tagen mit 7 Tagen alleiniger Estrogenbehandlung der physiologische weibliche Zyklus annähernd simuliert werden. Zudem sollte untersucht werden, ob ein Effekt des Progesterons bereits nach nur einer Woche erkennbar ist. Hinzu kommt, dass die Induktion von Progesteronrezeptoren durch Östrogen in der Osteoblastenzellkultur nach 48 Stunden beginnt und sich in den darauffolgenden 10 Tagen weiter steigert [Rickard 2002, S.588]. Dem sollte durch die einwöchige Estradiolvorbehandlung der Zellkultur Rechnung getragen werden.

### **2.3.4 Zellzahl**

Die Wahl einer geeigneten Zahl ausgesäeter Zellen pro Schale (Well) einer 96well Mikrotiterplatte bzw. pro Kammer eines geteilten Objektträgers stellte eine besondere Herausforderung dar. Einerseits benötigen Osteoblasten eine ausreichende Dichte, andererseits führt zu große Dichte zur Kontaktinhibition. Ausserdem besitzt jede Zellpopulation ein ihr eigenes Proliferationsvermögen, das sich in verschiedenen Passagen verändern kann. Gemäß der Erfahrungen, die das Zellkulturlabor bereits mit verschiedenen ausgesäten Zellzahlen gemacht hatte [Diehl P 2005, S.287], wurden für einen ersten Versuchsansatz 3000 Zellen pro Well einer Zellkulturplatte für einen für 14 Tage geplanten Versuch sowie 1500 Zellen je Well für einen für 28 Tage geplanten Versuch ausgesät. Für weitere Experimente wurden Zellzahlen von 1000 Zellen pro Well für 14 Tage-Versuche und 800 Zellen pro Schale für 28 Tage-Versuche festgelegt (Begründung s. Punkt 3.2).

Für die Füllung der Kammern des geteilten Objektträgers wurden 3000 Zellen pro Kammer eines in vier Kammern geteilten Objektträgers für einen 14 Tage dauernden Versuch und 6000 Zellen pro Kammer für 28 Tage bei allen Versuchen beibehalten.



**Abb. 1: 96 Well Zellkulturplatte**



**Abb. 2: Vier in je vier Kammern unterteilte Objektträger, „Chamber slides“**

Um die optimalen Bedingungen für die Durchführung der Hauptversuche herauszufinden, wurden zunächst Vorversuche durchgeführt. Sie bestanden in der Testung verschiedener Ausgangszellzahlen in den Wells der Zellkulturplatten und in den Kammern der unterteilten Objektträger sowie verschiedener Hormonkonzentrationen. Zusätzlich wurden Vorversuche ohne Zugabe von Dexamethason und Ascorbinsäure durchgeführt.

### 2.3.5 Durchführung der Experimente

Die Experimente bestanden aus 3 Vor- und 2 Hauptversuchen. Die oben erläuterten Ansätze wurden in den einzelnen Versuchen wie in den nachfolgenden Tabellen beschrieben durchgeführt:

Versuch Nr.	Versuchs-Laufzeit [d]	Estradiol [ng/ml], ([M])	Progesteron [ng/ml], ([M])	Zusatz Dex/AA	Gemessene Parameter
1a	14	0.1, 0.01 ( $10^{-10/-11}$ )	20, 2, 0.2 ( $10^{-8/-9/-10}$ )	∅	ALP photometrisch/in situ, Hexosaminidase
2a	14	0.1, 1 ( $10^{-10/-11}$ )	20, 2, 0.2 ( $10^{-8/-9/-10}$ )	∅	ALP photometrisch/in situ/im Überstand, Hexosaminidase
3a	14	0.1 ( $10^{-10}$ )	2000, 20, 2, 0.2 ( $10^{-6/-8/-9/-10}$ )	Dex + AA; nur AA; ∅ Zusatz	ALP photometrisch/in situ/im Überstand, Hexosaminidase;
<b>4a</b> I + II	14	0.1 ( $10^{-10}$ )	2000, 20, 2, 0.2 ( $10^{-6/-8/-9/-10}$ )	<b>Dex+AA (2x)</b> , nur AA	ALP photometrisch/in situ, Hexosaminidase; <i>uPA, PAI-1(1 Versuch); Zellzahlbest. nach in situ Färbung</i>
<b>5a</b> I + II	14	0.1 ( $10^{-10}$ )	2000, 200, 20, 2, 0.2 ( $10^{-6/-7/-8/-9/-10}$ )	<b>Dex+AA (2x)</b>	ALP photometrisch/in situ, Hexosaminidase; <i>uPA, PAI-1(1 Versuch); Zellzahlbest. nach in situ Färbung</i>
2b	28	0.1, 1 ( $10^{-10/-11}$ )	20, 2, 0.2 ( $10^{-8/-9/-10}$ )	∅	ALP photometrisch/in situ/im Überstand, Hexosaminidase
3b	28	0.1 ( $10^{-10}$ )	2000, 20, 2, 0.2 ( $10^{-6/-8/-9/-10}$ )	Dex + AA; nur AA; ∅ Zusatz	ALP photometrisch/in situ/im Überstand, Hexosaminidase
<b>4b</b> I + II	28	0.1 ( $10^{-10}$ )	2000, 20, 2, 0.2 ( $10^{-6/-8/-9/-10}$ )	<b>Dex+AA (2x)</b> , nur AA	ALP photometrisch/in situ/im Überstand, Hexosaminidase; <i>uPA, PAI-1(1 Versuch); Zellzahlbest. nach in situ Färbung</i>
<b>5b</b> I + II	28	0.1 $10^{-10}$ )	2000, 200, 20, 2, 0.2 ( $10^{-6/-7/-8/-9/-10}$ )	<b>Dex+AA (2x)</b>	ALP photometrisch/in situ/im Überstand, Hexosaminidase; <i>uPA, PAI-1 (1 Versuch); Zellzahlbest. nach in situ Färbung</i>

**Tab. 2: Übersicht der Einzelversuche** (einschließlich Vorversuche), fett: Hauptversuche, kursiv: Veränderung gegenüber vorherigem Ansatz

Versuch Nr.	Versuchs-Laufzeit [d]	Estradiol [ng/ml]	Progesteron [ng/ml], ([M])	Zusatz Dex/AA	Gemessene Parameter
1c	14	0.0	20, 2, 0.2 (10 <sup>-8/-9/-10</sup> )	∅	ALP photometrisch/in situ, Hexosaminidase
2c	14	0.0	20, 2, 0.2 (10 <sup>-8/-9/-10</sup> )	∅	ALP photometrisch/in situ; Hexosaminidase
3c	14	0.0	2000, 20, 2, 0.2 (10 <sup>-6/-8/-9/-10</sup> )	Dex + AA	ALP photometrisch/in situ; Hexosaminidase;
4c	14	0.0	2000, 20, 2, 0.2 (10 <sup>-6/-8/-9/-10</sup> )	Dex+AA	ALP photometrisch/in situ, Hexosaminidase; <i>Zellzahlbest. nach in situ Färbung</i>
5c	14	0.0	2000 200, 20, 2, 0.2 (10 <sup>-6/-7/-8/-9/-10</sup> )	Dex+AA	ALP photometrisch/in situ, Hexosaminidase; <i>Zellzahlbest. nach in situ Färbung</i>
2d	28	0.0	20, 2, 0.2 (10 <sup>-8/-9/-10</sup> )	∅	ALP photometrisch/in situ; Hexosaminidase
3d	28	0.0	2000, 20, 2, 0.2 (10 <sup>-6/-8/-9/-10</sup> )	Dex + AA	ALP photometrisch/in situ; Hexosaminidase
4d	28	0.0	2000, 20, 2, 0.2 (10 <sup>-6/-8/-9/-10</sup> )	Dex+AA	ALP photometrisch/in situ; Hexosaminidase; <i>Zellzahlbest. nach in situ Färbung</i>
5d I + II	28	0.0	2000, 200, 20, 2, 0.2 (10 <sup>-6/-7/-8/-9/-10</sup> )	Dex+AA (2x)	ALP photometrisch/in situ; Hexosaminidase; <i>Zellzahlbest. nach in situ Färbung</i>

**Tab. 3: Übersicht der Einzelversuche (einschließlich Vorversuche) ohne Estradiol; fett: Hauptversuche, kursiv: Veränderung gegenüber vorherigem Ansatz**

Bei den Hauptversuchen handelte es sich um vier Versuche mit 14 Tagen Versuchslaufzeit sowie um drei Experimente mit einer Dauer von 28 Tagen mit Estradiol. Ohne Estradiol wurden zwei Versuche mit 14 Tagen und drei mit 28 Tagen Versuchsdauer durchgeführt.

Im Folgenden graphisch dargestellt ist der Versuchsablauf mit den jeweils angewendeten Hormonkonzentrationen für Experimente mit 14 und 28 Tagen Dauer sowie mit und ohne Estradiol-Inkubation.

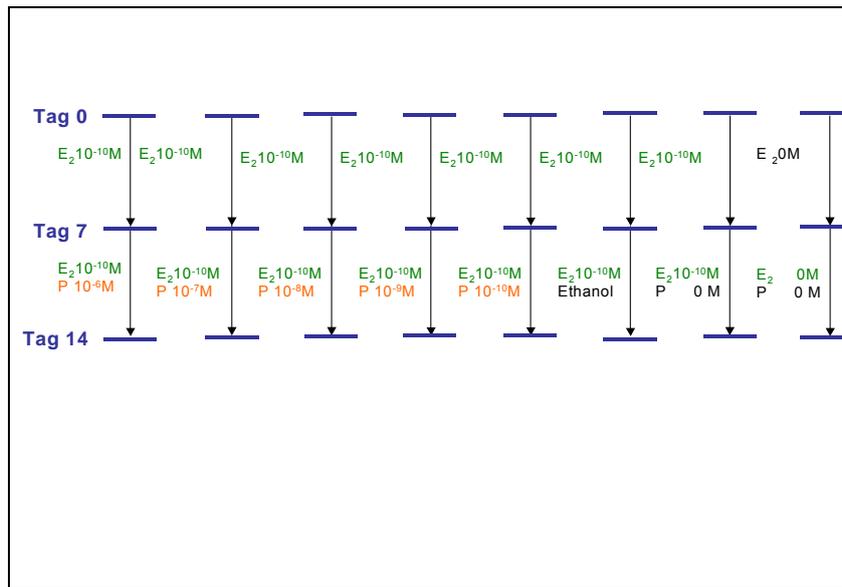


Abb. 3a: Versuchsaufbau 14 Tage mit Estradiol

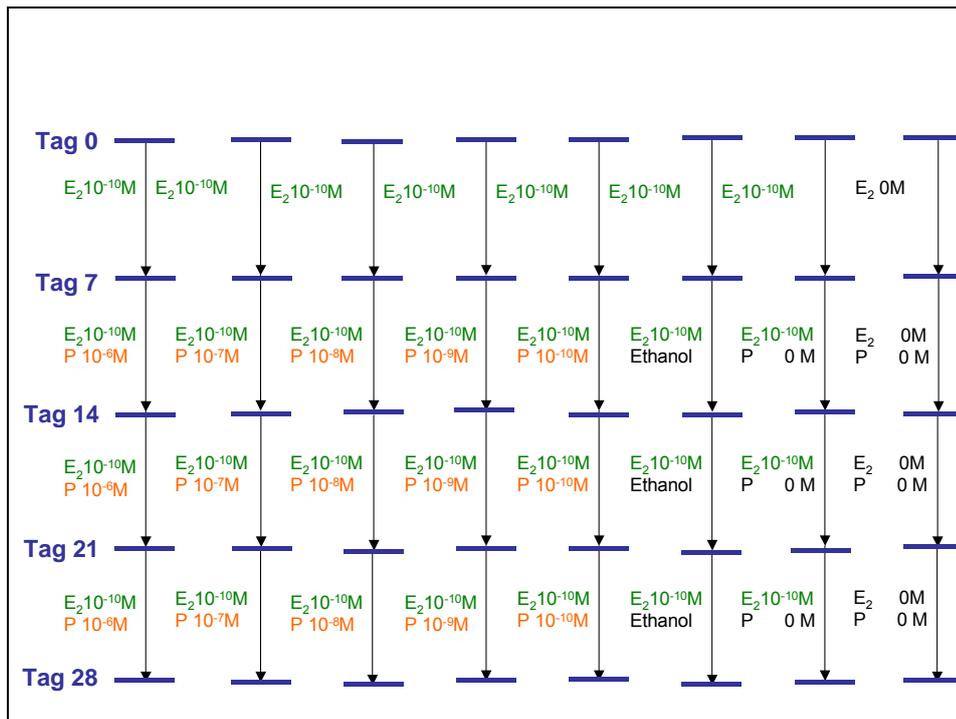


Abb. 3b: Versuchsaufbau 28 Tage mit Estradiol

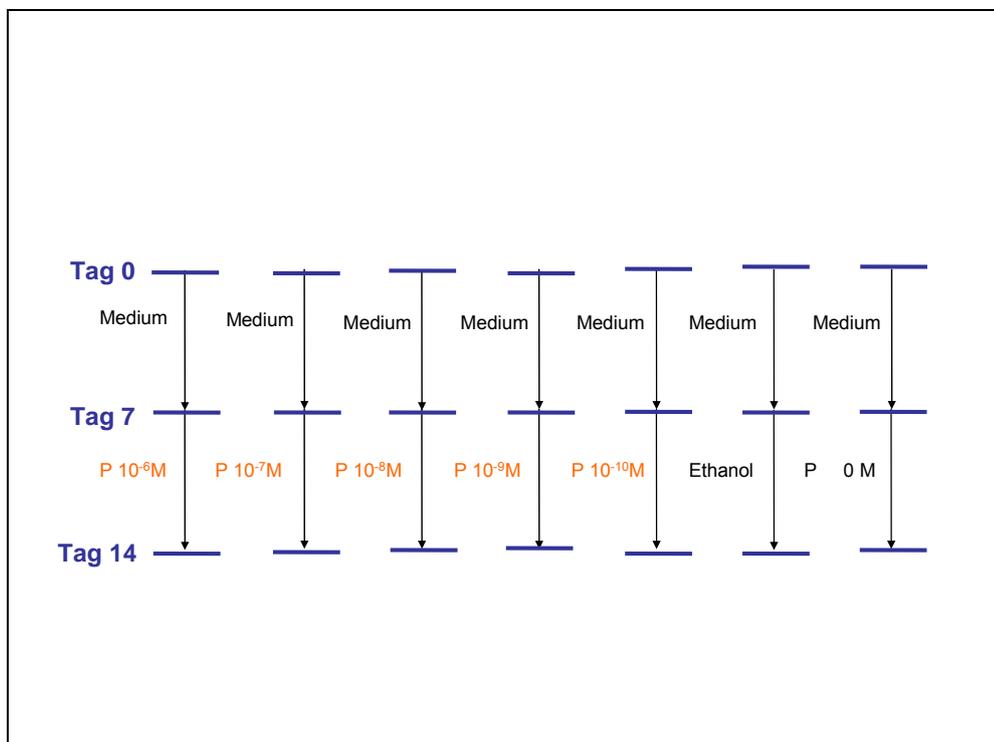
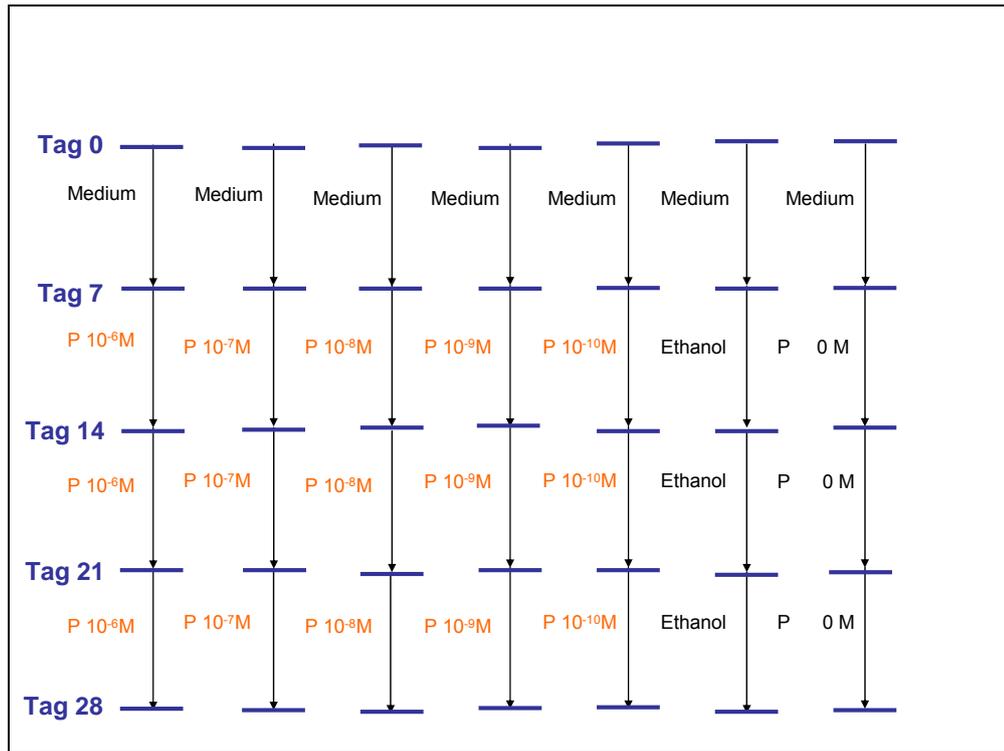


Abb. 3c: Versuchsaufbau 14 Tage ohne Estradiol



**Abb 3d: Versuchsaufbau 28 Tage ohne Estradiol**

**Abb. 3: Graphische Darstellung des Versuchsaufbaus mit 14 und 28 Tagen Versuchsdauer, mit und ohne Estradiol**

Grün: Estradiolgehalt im Medium

Rot: Progesterongehalt im Medium

Je Versuch zweimal auf 96 Well Zellkulturplatten und zweimal auf Chamber slides im dreifachen Ansatz durchgeführt. Zellkulturplatten: Proliferationstest mit dem Hexosaminidase-Assay und Differenzierungstest mit dem pNPP-Assay. Chamber slides: ALP-in-situ-Färbung, Medium aus den Kammern zudem für ALP-Messung und uPA- und PAI-1-Messungen im Überstand.

Als Estradiolkonzentrationen wurden in den Vorversuchen 0.01ng/ml, 0.1ng/ml und 1ng/ml ( $=10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11}M$ ) gewählt. Unter Berücksichtigung der physiologischen Estradiolkonzentration von 0.1-0.2ng/ml periovulatorisch und in der Lutealphase wurden alle Haupt-Versuchsreihen mit 0.1ng/ml ( $10^{-10}M$ ) durchgeführt.

Die gewählten Progesteronkonzentrationen in den Vorversuchen lagen bei 0.2ng/ml bis 20ng/ml ( $=10^{-10}-10^{-8}M$ ). In den Hauptversuchen wurden ausserdem 200ng/ml und 2µg/ml ( $10^{-7}M$  und  $10^{-6}M$ ) verwendet.

Auf den Zusatz von Dexamethason und Ascorbinsäure zum Medium war zunächst verzichtet worden, da Dexamethason und Progesteron an Cortisolrezeptoren in Osteoblasten kompetitiv binden können [Ishida 2002, S. 602] und eine Beeinflussung der Progesteronwirkung durch Dexamethason ausgeschlossen werden sollte. In

Versuch Nr.3 wurde je ein Versuch mit beiden Zusätzen, ein Versuch nur mit Ascorbinsäure sowie ein Versuch ohne Zusätze durchgeführt. Aufgrund der unzureichenden Differenzierung unter anderen Versuchsbedingungen erfolgten alle nachfolgenden Hauptversuche Nr. 4 und 5 mit Zusatz von sowohl Dexamethason als auch Ascorbinsäure.

Als Kontrolle wurde in den Haupt-Versuchen ein Ansatz mit Ethanol, ein Ansatz mit alleiniger Estradiolzugabe ohne Progesteron sowie einer mit Medium ohne Hormon-Zusatz mitgeführt.

## **2.4 Verwendete Untersuchungsmethoden**

### **2.4.1 Histochemische Bestimmung der Calcifizierung**

Um calcifizierende Bestandteile qualitativ nachzuweisen, wurden die Zellkulturen nach der von Hessle beschriebenen Methode mit Alizarinrot gefärbt [Hessle L 2002, 9445]. Dazu wurde Alizarinrot in einer Konzentration von 1% in Wasser gelöst und auf pH 4,5 eingestellt. Von den 6-Well Kulturplatten, in denen die Osteoblasten zuvor für 4 Wochen gezüchtet worden waren, wurde Medium abpipettiert, und die Wells wurden zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit dem vorbereiteten Alizarinrot bedeckt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurde solange mit PBS gewaschen, bis die Spüllösung farblos war. Konnten mikroskopisch Bestandteile der Kultur identifiziert werden, an welche sich das Alizarinrot gebunden hatte, so wurden diese photographisch dokumentiert.

### **2.4.2 ALP in situ-Färbung**

Zum Nachweis von ALP im Sinne einer Osteoblasten-Typisierung sowie zur Quantifizierung wurden die Zellen zunächst für mindestens eine Woche bis zur Konfluenz auf in Kammern eingeteilten Objektträgern, sogenannten chamber slides, gezüchtet und im Anschluss daran mit NBT/BCIP (Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphat) gefärbt. Dies erfolgte nach fünfminütigem Waschen der Zellen mit PBS, zehn Minuten dauernder Fixierung mit Hilfe von 100%igem Alkohol und Rehydrierung mittels Tris-Puffer für 15 Minuten. Die Behandlung der Kultur mit NBT/BCIP und eine Inkubation von fünfzehn Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer führte zur Blaufärbung ALP-positiver Zellen. Die Reaktion wurde mittels Tris-Puffer gestoppt, und die Objektträger wurden mit erwärmter Glyceringelatine beträufelt und mit einem Deckglas bedeckt, um die Zellen zu konservieren und ihre Färbung für längere Zeit beurteilbar zu machen. Von

jeder der drei Kammern eines Objektträgers mit gefärbten Zellen wurden drei Ausschnitte, die repräsentativ für die gesamte Kammer erschienen, vergrößert fotografiert. Diese Fotos wurden am PC mit einem Raster unterlegt, was die anschließende Auszählung gefärbter und ungefärbter Zellen erleichterte.

### **2.4.3 Proliferations-Nachweis mittels Adhäsions-/Hexosaminidase-Assay**

Um die Proliferation der Zellen im Adhäsions-Assay nach der von Landegren beschriebenen Methode [Landegren U 1984, S.379] zu messen, wurden die Osteoblasten in die Vertiefungen von 96-well Flachbodenplatten ausgesät und für 14 oder 28 Tage kultiviert.

Zu Beginn des Tests wurde das zu gleichen Teilen mit PBS gemischte und bei -20°C eingefrorene Hexosaminidasereagenz, bestehend aus 100 mM Natrium-Citrat Puffer pH 5, 0,5% Triton-X 100 und 15 mM p-Nitrophenol-N-acetyl-beta-D-glucosaminid, im Wasserbad aufgetaut. Die Wells wurden nach Entfernen des Kulturmediums dreimal mit PBS gewaschen, bevor 100 µl des Hexosaminidasereagenz-PBS-Gemischs in jedes Well pipettiert wurde. Die darauf folgende Inkubation im Brutschrank bei 37°C dauerte 90 Minuten. Dabei lysiert Triton die Zellen und das lysosomale Enzym Hexosaminidase, welches das Substrat umsetzt, wird frei. Im Anschluss daran wurden 100 µl des Stop-Puffers aus 0,2 M NaOH und 5 mM EDTA zugegeben, was durch eine Veränderung des pH-Werts zu einer Gelbfärbung des Substrats und damit der Lösung führte. Es folgte die photometrische Bestimmung der Extinktion bei 405 nm. Diese modifizierte Methode basiert auf der Publikation von Shibata [Shibata H 1996, S.53]. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus verschiedenen Versuchen mit verschiedenen hohen absoluten Werten wurden die Ergebnisse auf den Mittelwert der Dreifachmessung im Kontrollansatz ohne Mediumzusätze bezogen und der Faktor, um welchen sich das Ergebnis bei Zugabe von Hormon(en) jeweils gegenüber dem Ergebnis im Kontroll-Ansatz ohne Hormon-Zugabe erhöhte oder erniedrigte, berechnet.

### **2.4.4 ALP Färbung mit dem pNPP-Assay**

Die Färbung mit Hilfe des para-Nitrophenyl-Phosphat (=pNPP) Assays wurde durchgeführt, um den ALP-Gehalt der in einem Well vorhandenen adhärenenten Osteoblasten photometrisch zu analysieren. Bei diesem Verfahren macht man sich die Eigenschaft von ALP zunutze, pNPP quantitativ in gelbes p-Nitrophenol umzuwandeln, welches dann photometrisch bestimmt werden kann. Das praktische

Vorgehen richtete sich nach den Angaben des Herstellers, in Anlehnung an die Beschreibung von Jones JV et al. [Jones JV, 1988, S.80-81]. Dazu wurden Zellen in geeigneter Dichte in 96-Well Platten ausgesät und entsprechend des jeweiligen Versuchsplans 14 oder 28 Tage kultiviert. Das Medium wurde aus den Wells entfernt, woraufhin diese zweimal mit 0.1M Tris-Puffer gewaschen wurden. Danach wurden je eine Tablette pNPP und eine Tablette Tris in 5ml Tris gelöst und je 75µl des so zubereiteten Substrats in jedes Well pipettiert. Nach der Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur folgte die Zugabe von 75µl des Stoppuffers 1N NaOH, um die Reaktion zu beenden. Zuletzt wurde die Extinktion der Lösung aus Zell-Lysaten und Reaktionsmedien in den einzelnen Wells photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

#### **2.4.5 ALP-Bestimmung im Überstand**

Die Konzentration von extrazellulärer alkalischer Phosphatase wurde auch im Medium-Überstand gemessen. Dazu wurde nach jeder Versuchswoche, 92-100 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel, Medium entnommen. 200µl Überstand wurden aus drei mit gleichen Hormonkonzentrationen behandelten Kammern eines jeden Objektträgers entnommen und gepoolt. Anschließend wurden die Überstände bis zur Durchführung der Messungen bei -70°C tiefgefroren. Die ALP-Bestimmung erfolgte mit Hilfe des Ostase-Chemilumineszenzassays nach etablierten Methoden des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie (Direktor: Univ. Prof. Dr. med. D. Neumeier) am Klinikum rechts der Isar.

#### **2.4.6 uPA und PAI-1-Messung**

Auch für die uPA und PAI-1-Messungen wurden in der unter Punkt 2.4.5 beschriebenen Weise Überstände von Medium entnommen und tiefgefroren. Die Bestimmungen wurden freundlicherweise von Mitarbeitern der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik unter Leitung von PD V. Magdolen mittels Imubind® ELISA Kits für uPA und PAI-1 nach etablierten Protokollen durchgeführt. Kurz zusammengefasst erfolgt die Messung, indem zunächst die aufgetauten Überstände in mit Maus-Anti-human-uPA- bzw. Maus-Anti-human-PAI-1-Antikörpern beschichtete Wells gegeben werden und ein weiterer solcher Antikörper zur Markierung der gebundenen uPA- bzw. PAI-1-Moleküle zugegeben wird. Die Reaktion von hinzugefügter Streptavidin-konjugierter Peroxidase mit Perborat/3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Substrat führt dann zu blauer Färbung, welche durch Sulfursäure-Stoppuffer in gelbe Farbe übergeführt wird. Die Extinktion der Lösung wird bei 405 nm photometrisch bestimmt, und durch Vergleich mit einer Eichkurve kann so uPA bzw. PAI-1 quantifiziert werden. Dabei erfasst der uPA-Assay alle

Einzel-Ketten- und High-Molecular-Weight- ebenso wie Rezeptor-gebundene Formen des Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivators und uPA-PAI-1 und -PAI-2-Komplexe. Der PAI-1-Assay erfasst alle aktiven und inaktiven Formen von PAI-1 und PAI-1-Komplexe, nicht aber PAI-2 in irgendeiner Form.

## **2.5 Statistik**

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Software SPSS in Zusammenarbeit mit Frau Dipl. Math. R. Busch vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der TU München (Direktor: Prof. Dr. Klaus A. Kuhn) durchgeführt.

Berechnet wurden jeweils die Mittelwerte aus zwei bis vier Versuchen mit Minimum und Maximum, das 95% Konfidenzintervall sowie Standardabweichung und Standardfehler.

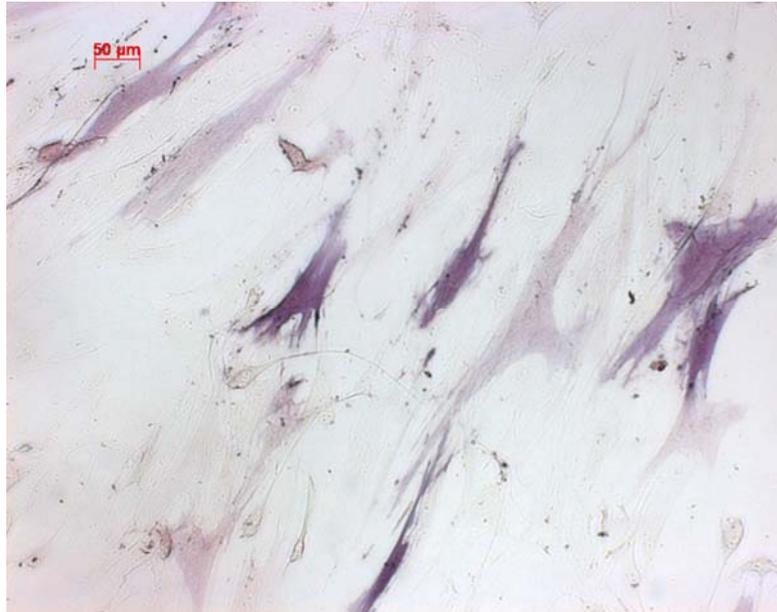
Nach Durchführung des ANOVA-Tests wurden in Post Hoc-Tests multiple Vergleiche zwischen den Mittelwerten der verschiedenen Ansätze angestellt. Verglichen wurden die verschiedenen Progesteronkonzentrationen sowie die unterschiedliche Versuchsdauer (14 vs. 28 Tage) und die Vorbehandlung oder Nicht-Behandlung mit Estradiol. Als Signifikanzniveau wurde  $\alpha=0.05$  festgelegt und darunter liegende p-Werten als statistisch signifikant angesehen (Irrtumswahrscheinlichkeit <5%).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Typisierungstests

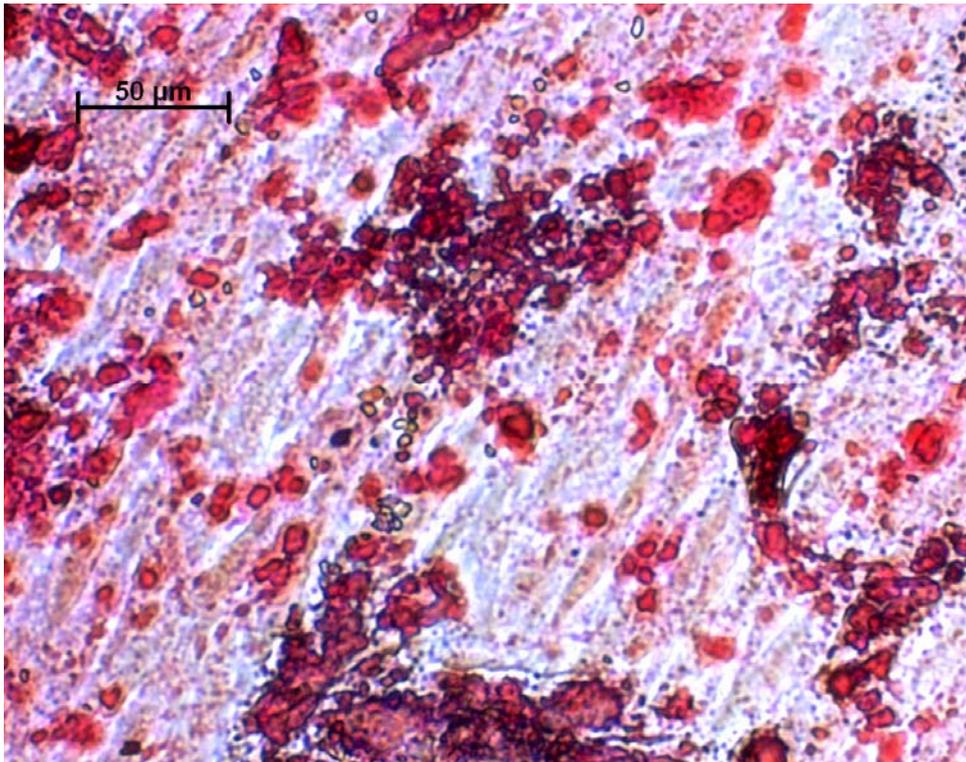
Um sicherzustellen, dass es sich bei den verwendeten Zellen um Osteoblasten handelte, wurden sie mit spezifischen Markern typisiert. Die ALP in situ-Färbung mittels NBT/BCIP Assay und die Anfärbung von calcifizierenden Gewebebestandteilen mittels Alizarinrot identifizierten Osteoblasten spezifisch.

Nur Kulturen mit einem Osteoblasten-Anteil (Anteil ALP-positiver Zellen) von mindestens 70% wurden für die Versuche verwendet. Diesem Anspruch wurden alle getesteten Kulturen gerecht. Abb. 4 zeigt eine Zellkultur nach ALP in situ-Färbung mittels NBT/BCIP-Assay, wie sie sowohl vor den Vor- als auch vor den Hauptversuchen durchgeführt wurde.



**Abb. 4: Osteoblasten-Zellkultur vor Beginn der Versuche, gefärbt mit NBT/BCIP.**

Im Vorfeld der Hauptversuche wurden zusätzlich calcifizierende Gewebebestandteile, ein weiteres Kriterium für die Knochenzell-Funktion, mit Alizarinrot angefärbt. Der Nachweis von calcifizierenden Anteilen in der Kultur, wie in Abb. 5 dargestellt, sicherte als einer der wichtigsten phenotypischen Osteoblasten-Marker zusätzlich ab, dass es sich um Osteoblasten-Kulturen handelte. Fibroblasten dagegen sind zu einer Calcifizierung nicht befähigt.



**Abb. 5: Kultur mit calcifizierenden Anteilen nach Alizarinrot-Färbung**

### **3.2 Ergebnisse der Vorversuche**

#### **Zellzahl**

In einem ersten Versuchsansatz wurden in die Wells der Zellkulturplatte 1500 Zellen für Versuche, die 28 Tage überdauern sollten, und 3000 Zellen für 14 Tages-Versuche, ausgesät. Bereits nach 7 bzw. 10 Tagen mussten diese Experimente abgebrochen werden, da die Osteoblasten abzusterben begannen, was sich in veränderter Morphologie und Verlust der Adhäsion äusserte. Nach weiteren Vorversuchen etablierte sich eine Ausgangszellzahl von 1000 Zellen pro Well für die für 14 Tage geplanten Hauptversuche und 800 Zellen pro Well für 28tägige Versuche. Für die Chamber slides zeigten sich die bereits zu Beginn getesteten Zellzahlen von 3000 je Kammer eines Objektträgers für 28 Tage dauernde Versuche und 6000 Zellen je Kammer für 14 Tage dauernde Versuche als angemessen, d.h. bis zum geplanten Ende der Versuche war ein Zellrasen von ausreichender Dichte, aber noch ohne Adhäsionsverlust entstanden.

#### **Hormonkonzentrationen**

Für die Vorversuche wurden Estradiolkonzentrationen von 1ng/ml, 0.1ng/ml und 0.01ng/ml ( $=10^{-9}$ - $10^{-11}$ M) gewählt. Dabei wurden die besten Proliferations-Werte bei

0.1ng/ml ( $10^{-10}$ M) festgestellt, so dass diese Konzentration auch in den Hauptversuchen Verwendung fand.

Zu Beginn wurden die Progesteronkonzentrationen 2ng/ml, 0.2ng/ml und 0.02ng/ml eingesetzt. Hier waren in der Proliferation keine signifikanten Differenzen zwischen den Konzentrationen erkennbar. Es konnte lediglich eine geringe Erhöhung der Werte durch Progesteron im Allgemeinen gegenüber Ansätzen ohne Progesteron festgestellt werden.

Bei den ALP-Messungen zeigten sich aussagekräftige Unterschiede weder zwischen den einzelnen Konzentrationen, noch im Vergleich mit Ansätzen ohne Progesteronzugabe, da in den Vorversuchen, wie unten erläutert, auf Dexamethason und Ascorbinsäure verzichtet worden war und keine messbare ALP-Expression stattfand.

### **Mediumzusätze**

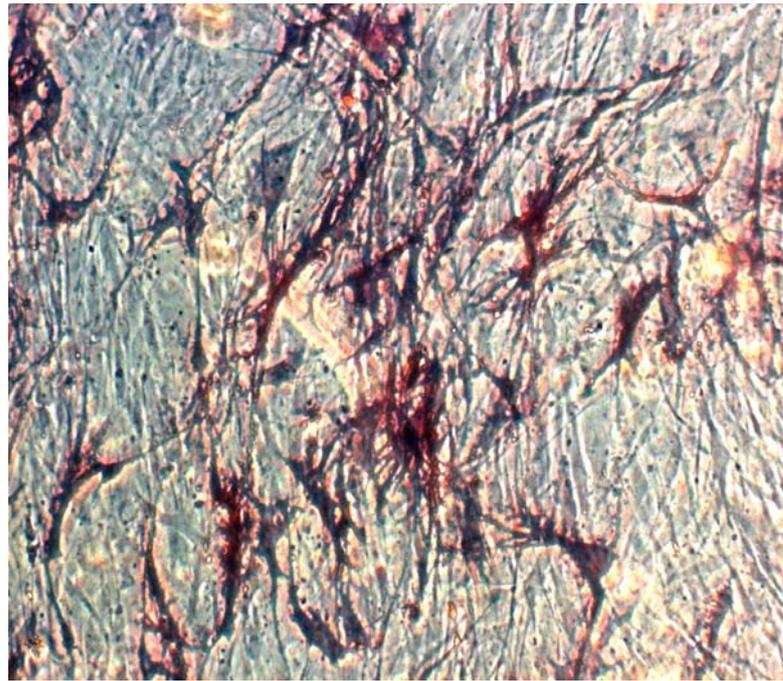
In den ersten Versuchsansätzen wurde auf Dexamethason und Ascorbinsäure zunächst verzichtet, um mögliche Interaktionen mit Progesteron zu vermeiden. In diesen Versuchsansätzen ließ sich keine ALP nachweisen, obwohl die Proliferationstests mittels Hexosaminidase-Reagenz durchweg hohe Zelldichte anzeigten. In zwei weiteren Versuchen wurde die Zugabe von Ascorbinsäure allein und Ascorbinsäure zusammen mit Dexamethason mit einem Ansatz ohne Dexamethason und Ascorbinsäure verglichen. Dabei war ALP gut messbar bei Dexamethason- und Ascorbinsäure-Zusatz, und auch die Ergebnisse bezüglich der Proliferation lagen im optimalen Messbereich (photometrisch bestimmte optische Dichte im Hexosaminidase-Test: 2-4). Ohne Zusätze und auch mit Ascorbinsäure ohne Dexamethason blieben die ALP-Ergebnisse im nicht messbaren Bereich, so dass in allen Hauptversuchen Dexamethason und Ascorbinsäure eingesetzt wurden.

## **3.3 Osteoblasten-Proliferation**

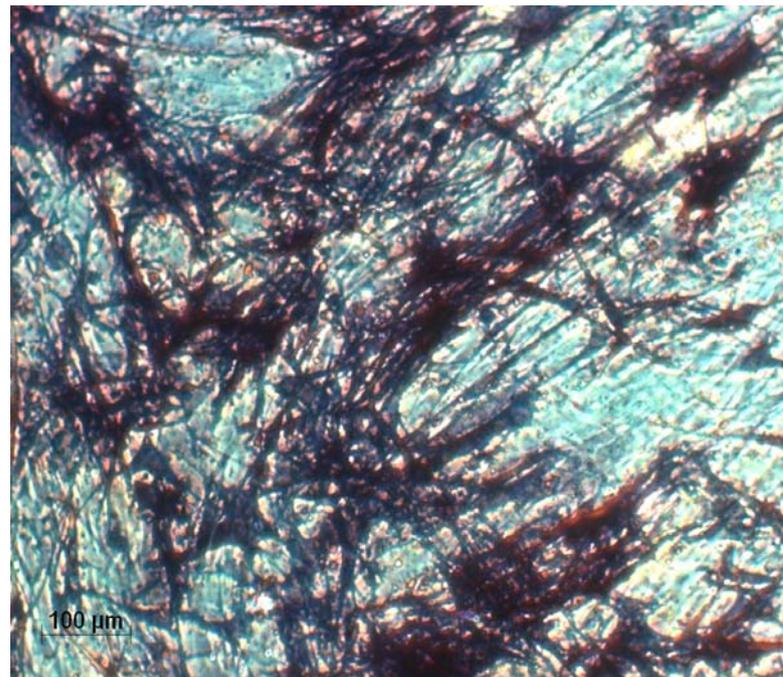
### **3.3.1 Ergebnisse der Zellzahlbestimmung mittels NBT/BCIP**

Wie unter Punkt 2.4.2 beschrieben, wurde bei jedem Versuch die Zellzahl auch auf den gefärbten und fotografierten Objektträgern bestimmt, u.a. um die Ergebnisse der Messungen im Überstand auf die jeweilige Zellzahl im entsprechenden Ansatz beziehen zu können (s. Punkt 3.4.4).

Abb. 6a und b zeigen gefärbte Kulturen jeweils nach 28 Tagen Versuchszeit mit Estradiol, einmal (a) ohne Progesteroninkubation, einmal (b) mit Progesteron für 21 Tage.



a



b

**Abb. 6: ALP in situ gefärbte Kulturen**

**a: nach 28 Tagen Inkubation mit Estradiol, kein Progesteron**

**b: nach 28 Tagen Inkubation mit Estradiol, 21 Tage Progesteron  $10^{-7}M$**

Durch die Verwendung von Progesteron in allen Konzentrationen wurde die Zellzahl sowohl nach 14 als auch nach 28 Tagen erhöht. Dabei wurde sie nach 14 Tagen maximal durch Progesteron  $10^{-7}M$  und  $10^{-9}M$  auf das 1.46- und das 1.40fache

gesteigert, nach 28 Tagen maximal durch  $10^{-8}\text{M}$  (1.63fach) und  $10^{-7}\text{M}$  (1.65fach) Progesteron.

Tab. 4 stellt den Mittelwert der Ergebnisse der Zellzahlbestimmungen von 2 Untersuchern sowie das Verhältnis der Zellzahl im jeweils gleichen Versuch nach 14 und nach 28 Tagen (4b/4a bzw. 5b/5a) dar.

Hormongehalt ->	E <sub>2</sub> 0	E <sub>2</sub> 0	E <sub>2</sub> 10 <sup>-10</sup> M					
Versuchs-Nr.	P 0	P 0, Ethanol	P 0	P 10 <sup>-10</sup> M	P 10 <sup>-9</sup> M	P 10 <sup>-8</sup> M	P 10 <sup>-7</sup> M	P 10 <sup>-6</sup> M
4a (14 Tage)	79	-	72	99	89	75	-	111
4b (28 Tage)	86	-	121	132	152	138	-	85
<i>4b/4a</i>	<i>1.09</i>	<i>-</i>	<i>1.67</i>	<i>1.32</i>	<i>1.71</i>	<i>1.84</i>	<i>-</i>	<i>0.77</i>
5a (14 Tage)	37	37	42	47	66	53	52	45
5b (28 Tage)	41	49	49	54	60	69	55	67
<i>5b/5a</i>	<i>0.93</i>	<i>1.32</i>	<i>1.16</i>	<i>1.13</i>	<i>0.9</i>	<i>1.31</i>	<i>1.06</i>	<i>1.48</i>

**Tab. 4: Zellzahl je Gesichtsfeld nach 14-(Versuch 4a und 5a) bzw. 28-(Versuch 4b und 5b) tägiger Inkubation mit Estradiol und 7 (Versuch 4a und 5a) bzw. 21 (Versuch 4a und 5a) Tagen Progesteron**

gemessener Parameter: Zellzahl, Zellzahlbestimmung je Gesichtsfeld nach Färbung mit NBT/BCIP

Versuchsanzahl: 4 Versuche im dreifachen Ansatz, Mittelwert eines jeden Versuchs einzeln

Versuchsdauer: 14 bzw. 28 Tage

Estradiolbehandlung: Tag 1 mit 14 bzw. 1 mit 28

Progesteronbehandlung: Tag 8 mit 14 bzw. 8 mit 28

Estradiolkonzentration: 0.1ng/ml

Progesteronkonzentrationen:  $10^{-6/(-7)/-8/-9/-10}\text{M}$

Zellzahl zu Versuchsbeginn: 6000 bzw. 3000 Zellen pro Kammer eines Objektträgers

Zellkulturmedium: DMEM phenolrotfrei, Dexamethason und Ascorbinsäure

Die relative Zellzahl errechnet sich aus der Zellzahl im jeweiligen Ansatz dividiert durch die Zellzahl im Kontrollansatz ohne Inkubation mit Hormonen. Je höher die relative Zellzahl ist, desto größer war die Steigerung der Proliferation durch die zugegebenen Hormonlösungen. Die Ergebnisse zeigt Tab. 5.

Hormongehalt ->	E <sub>2</sub> 0	E <sub>2</sub> 0	E <sub>2</sub> 10 <sup>-10</sup> M					
Versuchs-Nr.↓	P 0	P 0, Ethanol	P 0	P 10 <sup>-10</sup> M	P 10 <sup>-9</sup> M	P 10 <sup>-8</sup> M	P 10 <sup>-7</sup> M	P 10 <sup>-6</sup> M
4a (14 Tage)	1	-	0.92	1.26	1.13	0.95	-	1.41
5a (14 Tage)	1	1	1.14	1.28	1.79	1.43	1.40	1.23
<b>MW 14 Tage</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1.03</b>	<b>1.27</b>	<b>1.46</b>	<b>1.19</b>	<b>1.40</b>	<b>1.32</b>
4b (28 Tage)	1	-	1.41	1.54	1.78	1.61	-	0.99

5b (28 Tage)	1	1,20	1,20	1,32	1,47	1,70	1,34	1,64
<b>MW 28 Tage</b>	<b>1</b>	<b>1.20</b>	<b>1.31</b>	<b>1.43</b>	<b>1.63</b>	<b>1.65</b>	<b>1.34</b>	<b>1.32</b>

**Tab. 5: Zellzahl relativ je Gesichtsfeld nach 14 (Versuch 4a und 5a) bzw. 28 (Versuch 4b und 5b) Tagen Estradiol und 7 (Versuch 4a und 5a) bzw. 21 (Versuch 4a und 5a) Tagen Progesteron**

gemessener Parameter: Zellzahl, Zellzahlbestimmung je Gesichtsfeld nach Färbung mit NBT/BCIP; Ergebnis relativ zum Kontrollansatz für jeden Versuch und Mittelwert (MW) aus je zwei Versuchen mit 14 und 28 Tagen Versuchsdauer

Versuchsanzahl: 4 Versuche im dreifachen Ansatz

Versuchsdauer: 14 bzw. 28 Tage

Estradiolbehandlung: Tag 1 mit 14 bzw. 1 mit 28

Progesteronbehandlung: Tag 8 mit 14 bzw. 8 mit 28

Estradiolkonzentration:  $10^{-10}$ M

Progesteronkonzentrationen:  $10^{-6(-7)-8/-9/-10}$ M

Zellzahl zu Versuchsbeginn: 6000 bzw. 3000 Zellen pro Kammer eines Objektträgers

Zellkulturmedium: DMEM phenolrotfrei, Dexamethason und Ascorbinsäure

### 3.3.2 Osteoblasten-Proliferation nach sequentieller Inkubation mit Estradiol und Progesteron

Verglichen mit der Proliferation von Osteoblasten, die nicht mit Hormonen inkubiert wurden, verstärkten physiologische Estradiol- und Progesteronkonzentrationen die Osteoblastenproliferation bei Messung mit dem Hexosaminidase- oder auch sog. Adhäsions-Assay nicht signifikant.

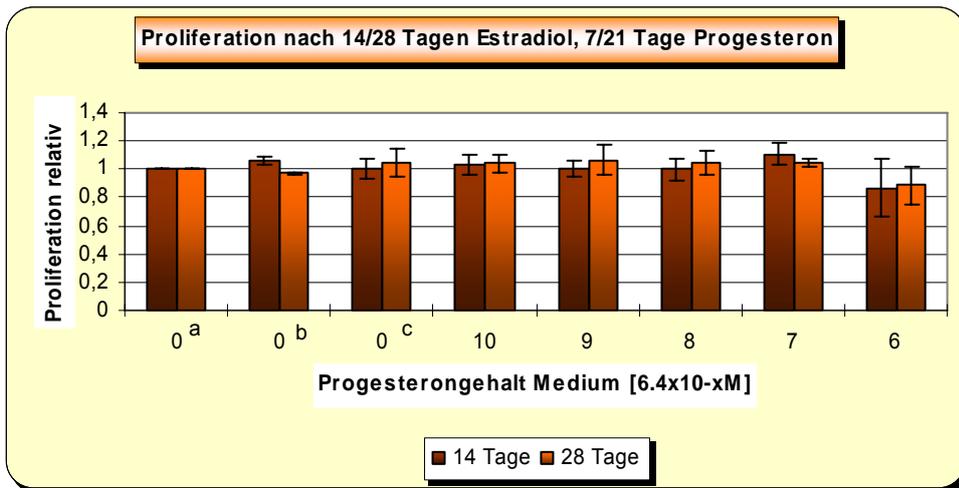
Eine Verminderung der Zelldichte auf 80% zeigte sich unter der supra-physiologischen Progesteronkonzentration  $10^{-6}$ M. Während diese hohe Progesteronkonzentration bereits nach 14tägiger Inkubationszeit eine deutlich erniedrigte optische Dichte im Hexosaminidase-Test zur Folge hatte, lagen alle anderen Werte, unabhängig von der vorhergehenden Behandlung der Zellen, etwa im gleichen Bereich (s. Abb. 1).

Nach einer Versuchsdauer von 28 Tagen traten ebenfalls nur minimale Unterschiede in der optischen Dichte nach Anwendung des Hexosaminidase-Assays auf. Die einzige Ausnahme bildeten auch hier die mit einer Progesteronkonzentration von  $10^{-6}$ M behandelten Zellen. Diese Ansätze zeigten im Durchschnitt der vier Versuche eine Verminderung auf 89% der Zelldichte von nicht hormonell behandelten Osteoblasten. Diese Unterschiede waren nicht statistisch signifikant (s. Abb. 7).

Im Vergleich zwischen den Proliferationswerten nach 14 und nach 28 Tagen zeigten sich minimale Unterschiede, welche nicht statistisch signifikant waren.

Nach 14 bzw. 28 Tagen Gesamtversuchszeit mit oder ohne Estradiol und 7 bzw. 21 Tagen Inkubation mit Progesteron ergaben sich bei Verwendung des

Adhäsionsassays in den einzelnen Versuchen Mittelwerte der gemessenen optischen Dichte aus drei Ansätzen, die dazugehörige Standardabweichung und die relative Proliferation (berechnet als Verhältnis aus dem Ergebnis der mit Estradiol und Progesteron behandelten Zellen und dem Ergebnis des Kontrollansatzes ohne Hormoninkubation), welche den Tab. 10 und Tab. 11 im Anhang zu entnehmen sind. Auf diesen Daten basiert die Abb. 7, welche die relative Proliferation nach 14 und 28 Tagen Versuchsdauer wiedergibt:



**Abb. 7: Proliferation nach 14- bzw. 28tägiger Inkubation mit Estradiol und 7- bzw. 21tägiger Einwirkung von Progesteron gegenüber nicht mit Hormonen behandelter Kontrolle (a)**

b: Ethanolkontrolllösung

Estradiol  $3.7 \times 10^{-10} \text{M}$  ab c

gemessener Parameter: Zelldichte, photometrisch bestimmt mit dem Hexosaminidase-Assay;

┴ Standardabweichung

Versuchsanzahl: 8 Versuche, jeweils im dreifachen Ansatz; hier jedem Balken zugrunde liegend ist der Mittelwert aus je 12 gemessenen Einzelwerten

Versuchsdauer: 14 bzw. 28 Tage

Estradiolbehandlung: Tag 1 mit 14 bzw. 28

Progesteronbehandlung: Tag 8 mit 14 bzw. 28

Estradiolkonzentration:  $10^{-10} \text{M}$

Progesteronkonzentrationen:  $10^{-6/-7/-8/-9/-10} \text{M}$

Zellzahl zu Versuchsbeginn: 1000 bzw. 800 Zellen pro Schale einer 96 Well Zellkulturplatte

Zellkulturmedium: DMEM phenolrotfrei, Dexamethason und Ascorbinsäure

**In den graphischen Darstellungen der Ergebnisse in den Abb. 7 und nachfolgend bis einschließlich Abb. 24 bedeuten die folgenden Angaben unter „Hormongehalt Medium“ Messung der**

*Blank*: Reagenzien der verwendeten Assays oder Medium, ohne zelluläre Bestandteile  
*P0, E0*: Zell-Lysate nach 14 bzw. 28tägiger alleiniger Inkubation mit Dexamethason und Ascorbinsäure in phenolrottfreiem DMEM

*P0, E2 10<sup>-10</sup>M*: Zell-Lysate nach 14/28tägiger Inkubation mit Dexamethason, Ascorbinsäure und physiologischer Estradiolkonzentration 0.1ng/ml (=3.7x10<sup>-10</sup>M)

*P10<sup>-10</sup>, E2 10<sup>-10</sup>M*: Zell-Lysate nach 14/28tägiger Inkubation mit Dexamethason, Ascorbinsäure und physiologischer Estradiolkonzentration 0,1ng/ml (=3.7x10<sup>-10</sup>M) unter Zusatz von Progesteron 0.2ng/ml (=6.4x10<sup>-10</sup>M; infraphysiologischer Konzentrationsbereich) ab Tag 8

*P10<sup>-9</sup>, E2 10<sup>-10</sup>M*: Zell-Lysate nach 14/28tägiger Inkubation mit Dexamethason, Ascorbinsäure und physiologischer Estradiolkonzentration 0.1ng/ml (=3.7x10<sup>-10</sup>M) unter Zusatz von Progesteron 2ng/ml (=6.4x10<sup>-9</sup>M; physiologischer Konzentrationsbereich bei Anovulation) ab Tag 8

*P10<sup>-8</sup>, E2 10<sup>-10</sup>M*: Zell-Lysate nach 14/28tägiger Inkubation mit Dexamethason, Ascorbinsäure und physiologischer Estradiolkonzentration 0.1ng/ml (=3.7x10<sup>-10</sup>M) unter Zusatz von Progesteron 20ng/ml (=6.4x10<sup>-8</sup>M; physiologischer Konzentrationsbereich in ovulatorischen Lutealphasen) ab Tag 8

*P10<sup>-7</sup>, E2 10<sup>-10</sup>M*: Zell-Lysate nach 14/28tägiger Inkubation mit Dexamethason, Ascorbinsäure und physiologischer Estradiolkonzentration 0.1ng/ml (=3.7x10<sup>-10</sup>M) unter Zusatz von Progesteron 200ng/ml (=6.4x10<sup>-7</sup>M; supraphysiologische Konzentration ausserhalb der Schwangerschaft, physiologisch im dritten Trimenon) ab Tag 8

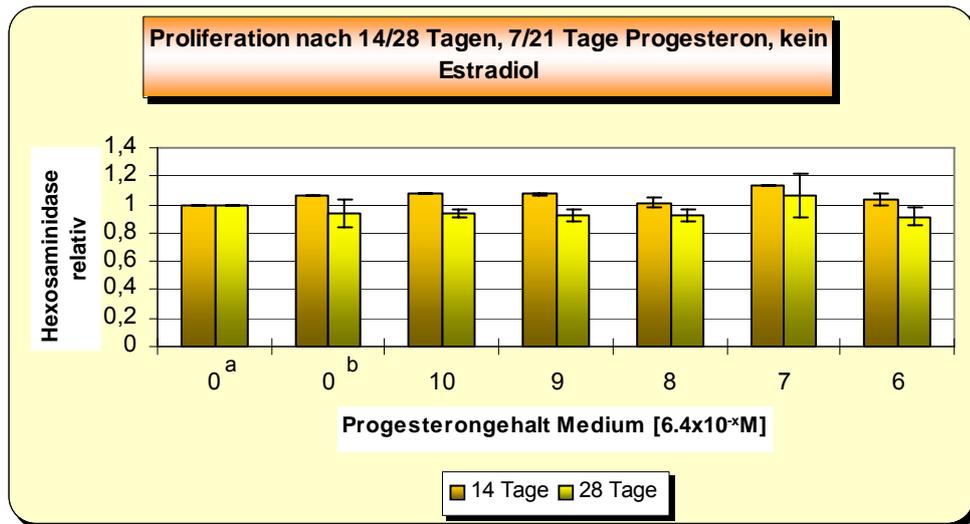
*P10<sup>-6</sup>, E2 10<sup>-10</sup>M*: Zell-Lysate nach 14/28tägiger Inkubation mit Dexamethason, Ascorbinsäure und physiologischer Estradiolkonzentration 0.1ng/ml (=3.7x10<sup>-10</sup>M) unter Zusatz von Progesteron 2µg/ml (=6.4x10<sup>-6</sup>M; supraphysiologischer Konzentrationsbereich) ab Tag 8

Die Messung erfolgte jeweils nach Inkubation der Zellen mit pNPP bzw. Hexosaminidase-Reagenz in der unter Methoden (siehe die Punkte 2.4.4 und 2.4.3) beschriebenen Weise

### **3.3.3 Osteoblasten-Proliferation nach Inkubation mit Progesteron ohne vorherige Estradiol-Exposition**

Ohne vorhergehende oder simultane Estradiol-Exposition wurde nach 14 Tagen durch jede Progesteronkonzentration die Proliferation geringfügig – statistisch nicht signifikant - gesteigert. Das Maximum lag hier bei 10<sup>-7</sup>M, das Minimum nicht wie in den Versuchen mit Estradiol bei 10<sup>-6</sup>M, sondern bei 10<sup>-8</sup>M.

Nach 21tägiger Behandlung der Zellen mit Progesteron ohne Estradiol trat mit Ausnahme der Progesteronkonzentration von 10<sup>-7</sup>M durchweg eine Verminderung der Proliferation gegenüber der Kontrolle auf. Das Minimum lag wieder bei der supraphysiologischen Konzentration von 10<sup>-6</sup>M (p>0.05).



b: mit Ethanol 0.2‰

**Abb. 8: Proliferation nach 7 bzw. 21 Tagen Progesteron ohne vorherige Estradiolbehandlung gegenüber nicht hormonell behandelter Kontrolle (a)**

gemessener Parameter: Zelldichte, photometrisch bestimmt nach immunhistochemischer Färbung mit Hexosaminidase-Reagenz;  $\pm$  Standardabweichung

Versuchsanzahl: 4 Versuche, jeweils im dreifachen Ansatz; hier jedem Balken zugrunde liegend ist der Mittelwert aus je 6 gemessenen Einzelwerten

Versuchsdauer: 14 bzw. 28 Tage

Estradiolbehandlung gesamt: 0 Tage

Progesteronbehandlung: Tag 8 mit 14 bzw. 28

Progesteronkonzentrationen:  $10^{-6/-7/-8/-9/-10}$  M

Zellzahl zu Versuchsbeginn: 1000 bzw. 800 Zellen pro Schale einer 96 Well Zellkulturplatte

Zellkulturmedium: DMEM phenolrotfrei, Dexamethason und Ascorbinsäure

Ohne vorherige Estradiolinkubation war die Zunahme der Zellmenge nach 7 Tage dauernder Einwirkung von Progesteron im Vergleich zu Zellen, welche kein Progesteron erhalten hatten, deutlicher gesteigert ( $10^{-7}$  M) als nach 21 Tagen Progesteronzugabe bzw. gesteigert und nicht vermindert ( $10^{-8}$  M -  $10^{-10}$  M).

Nach 14tägiger Versuchsdauer zeigte sich eine geringgradige Steigerung der Proliferation durch alleinige Inkubation mit Progesteron in den Konzentrationen von  $10^{-7}$  M bis  $10^{-10}$  M um 2% bis 13%. In den Ansätzen mit Estradiolzusatz fiel die Steigerung mit bis maximal 11% etwas niedriger aus. Eine Senkung der Proliferation durch  $10^{-6}$  M Progesteron um 13% trat bei Inkubation mit Estradiolzusatz auf, Progesteron ohne Estradiol hatte eine geringfügige Steigerung um 4% zur Folge.

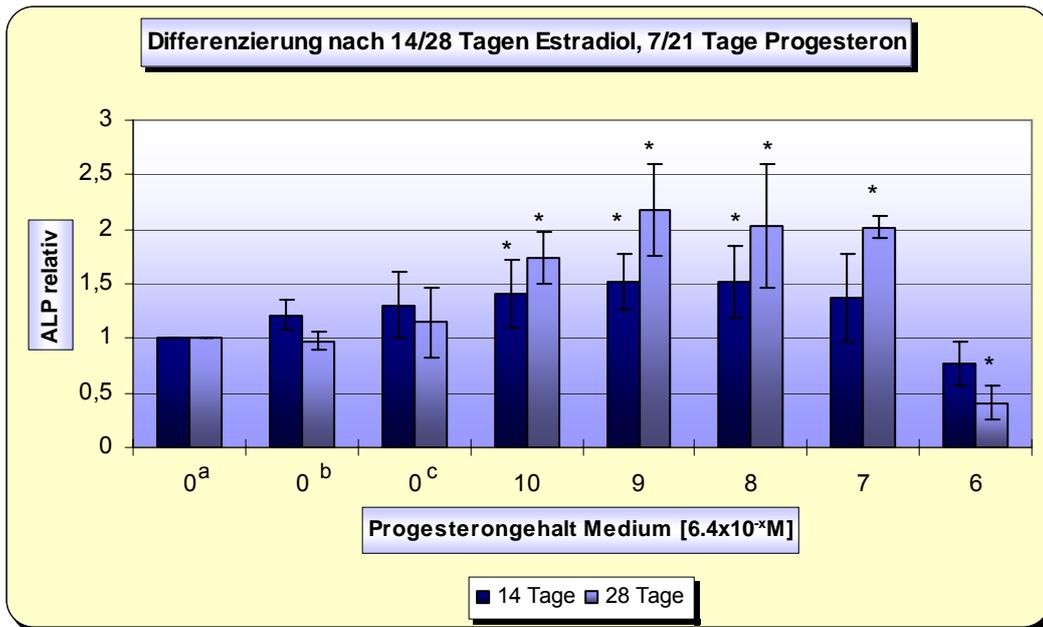
In den Versuchen mit 28 Tagen Versuchslaufzeit kehrte sich dies um. Durch Progesteron in Konzentrationen von  $10^{-7}$  M bis  $10^{-10}$  M, aber auch von  $10^{-6}$  M, ließ sich eine größere Erhöhung der Zellmenge um 5% bis 7% durch zusätzliche Gabe von Estradiol erreichen. Ohne Estradiol-Inkubation wurde der Proliferationsmarker auf bis zu 92% ( $10^{-6}$  M und  $10^{-8}$  M Progesteron) gesenkt und nur durch  $10^{-7}$  M auf 106% gesteigert (für alle Ergebnisse  $p > 0.05$ ).

### **3.4 Osteoblasten-Differenzierung**

#### **3.4.1 Intrazelluläre ALP-Messungen mittels pNPP nach sequentieller Inkubation mit Estradiol und Progesteron**

Bei der Differenzierung der Osteoblasten nach 14 und 28 Tagen wurde durch die physiologischen Progesteron-Konzentrationen  $10^{-7}$ - $10^{-10}$ M unter Berücksichtigung der Zelldichte eine signifikante Steigerung der ALP-Expression um 44%-51% nach 14 und um 112-134% nach 28 Tagen festgestellt. Eine signifikante Reduktion der ALP-Expression um 37% (nach 14 Tagen) bzw. 65% (nach 28 Tagen) wurde durch  $10^{-6}$ M Progesteron, eine Konzentration, wie sie nur im letzten Trimenon der Gravidität oder bei Depot-Gestagenen vorkommt, hervorgerufen.

Die optische Dichte des Zell-Lysats im Photometer nach Anwendung des p-Nitrophenylphosphat-Assays korreliert mit der intrazellulären ALP-Konzentration [Jones JV 1989, S.83] und wurde als Maß für den Differenzierungsgrad der humanen Osteoblasten-Kultur verwendet. Nach 14- sowie nach 28-tägiger Inkubationszeit wurden die optischen Dichten der Zelllysate nach histochemischer Färbung mit p-Nitrophenylphosphat bestimmt (s. Abb. 9). Die Einzelwerte in der Übersicht zeigt Tab. 8 im Anhang.



\* statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (p<0.05)

b: Ethanol 0.02%, Estradiol  $3.7 \times 10^{-10}$  M ab c

**Abb. 9: ALP relativ nach 28tägiger Inkubation mit Estradiol und 21 Tagen Progesteron gegenüber nicht mit Hormonen behandelter Kontrolle (a)**

gemessener Parameter: ALP intrazellulär, photometrisch bestimmt nach histochemischer Färbung mit pNPP

Versuchszahl: 8 Versuche im dreifachen Ansatz; hier dargestellt der Mittelwert

┴ Standardabweichung

Versuchsdauer: 14/28 Tage

Estradiolbehandlung: Tag 1 mit 14/28

Progesteronbehandlung: Tag 8 mit 14/28

Estradiolkonzentration:  $10^{-10}$  M

Progesteronkonzentrationen:  $10^{-6/-7/-8/-9/-10}$  M

Zellzahl zu Versuchsbeginn: 1000/800 Zellen pro Schale einer 96 Well Zellkulturplatte

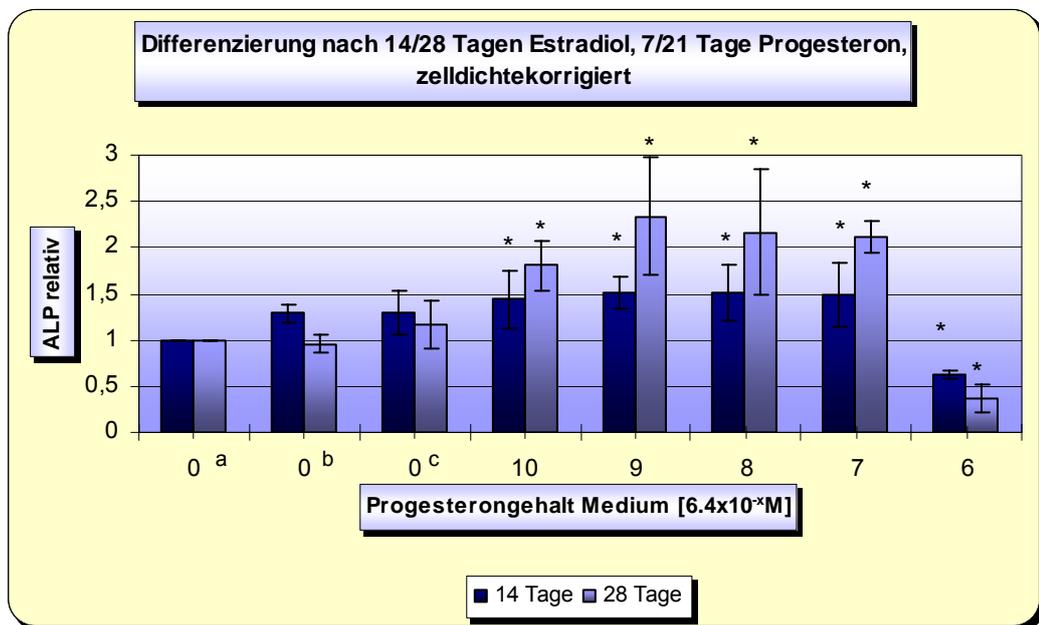
Zellkulturmedium: DMEM phenolrotfrei, Zusätze Dexamethason und Ascorbinsäure

Nach 14 Tagen verminderte sich durch die höchste Progesteronkonzentration von  $10^{-6}$  M der Differenzierungsmarker ALP signifikant sowohl gegenüber den anderen Progesteronkonzentrationen als auch gegenüber der Kontrolle, welche mit Zugabe von ausschließlich Estradiol durchgeführt wurde (p=0.01). Der intrazelluläre ALP-Gehalt unter Progesteronkonzentrationen im physiologischeren Bereich von  $10^{-8}$  M bis  $10^{-10}$  M unterschied sich signifikant von dem der Osteoblasten ohne Hormonexposition (p=0.01 – p=0.04 für verschiedene Konzentrationen), jedoch nicht untereinander. Das Maximum wurde mit einer Erhöhung auf 1.52fach unter Progesteron in der Konzentration von  $10^{-8}$  M (p=0.01), dicht gefolgt von  $10^{-9}$  M mit Erhöhung auf das 1.51Fache (p=0.01), erzielt.

Auch nach 28 Tagen zeigte sich eine U-förmige Dosisabhängigkeit. Die maximale Vervielfachung der optischen Dichte auf das 2.19-Fache des Ergebnisses ohne

Hormonzugabe trat bei Behandlung mit  $10^{-9}$ M Progesteron auf ( $p < 0.001$ ). Ebenso statistisch signifikant waren die Steigerungen mit Progesteron  $10^{-7}$ M,  $10^{-8}$ M und  $10^{-10}$ M auf das Doppelte ( $10^{-7}$ M,  $p = 0.002$ ;  $10^{-8}$ M,  $p < 0.001$ ) bzw. das 1.73-Fache ( $10^{-10}$ M,  $p = 0.004$ ). Bei Inkubation mit der supraphysiologischen Progesteronkonzentration  $10^{-6}$ M kam es zu einer statistisch signifikanten Verringerung auf das 0.41-Fache ( $p = 0.02$ ).

Die hormonell induzierten Veränderungen der ALP-Konzentrationen im Zell-Lysat wurden auf die im Hexosaminidase-Proliferationsassay bestimmte Zelldichte bezogen (s. Abb. 10).



\* statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle mit derselben Versuchsdauer ( $p < 0.05$ )  
 keine statistisch signifikanten Unterschiede 14 vs. 28 Tage  
 b: Ethanol 0.02%  
 Estradiol  $3.7 \times 10^{-10}$ M ab c

**Abb. 10: ALP relativ nach 14 bzw. 28 Tagen Estradiol und 7 bzw. 21 Tagen Progesteron gegenüber nicht mit Hormonen behandelten Zellen (a) unter Berücksichtigung der Zelldichte**

gemessener Parameter: ALP intrazellulär, photometrisch bestimmt nach histochemischer Färbung

Versuchszahl: je 4 Versuche mit 14 und 28 Tagen Dauer jeweils im dreifachen Ansatz; dargestellt der Mittelwert;  $\pm$  Standardabweichung

Versuchsdauer: 14 bzw. 28 Tage

Estradiolbehandlung: Tag 1 mit 14 bzw. 28

Progesteronbehandlung: Tag 8 mit 14 bzw. 28

Estradiolkonzentration:  $10^{-10}$ M

Progesteronkonzentrationen:  $10^{-6/-7/-8/-9/-10}$ M

Zellzahl zu Versuchsbeginn: 1000 (14 Tage) bzw. 800 (28 Tage) Zellen pro Well

Zellkulturmedium: DMEM phenolrotfrei, Dexamethason und Ascorbinsäure

Schon nach 14 Tagen Inkubation mit Estradiol und 7 Tagen Inkubation mit Progesteron zeigte sich eine signifikante Verminderung des ALP-Gehalts der

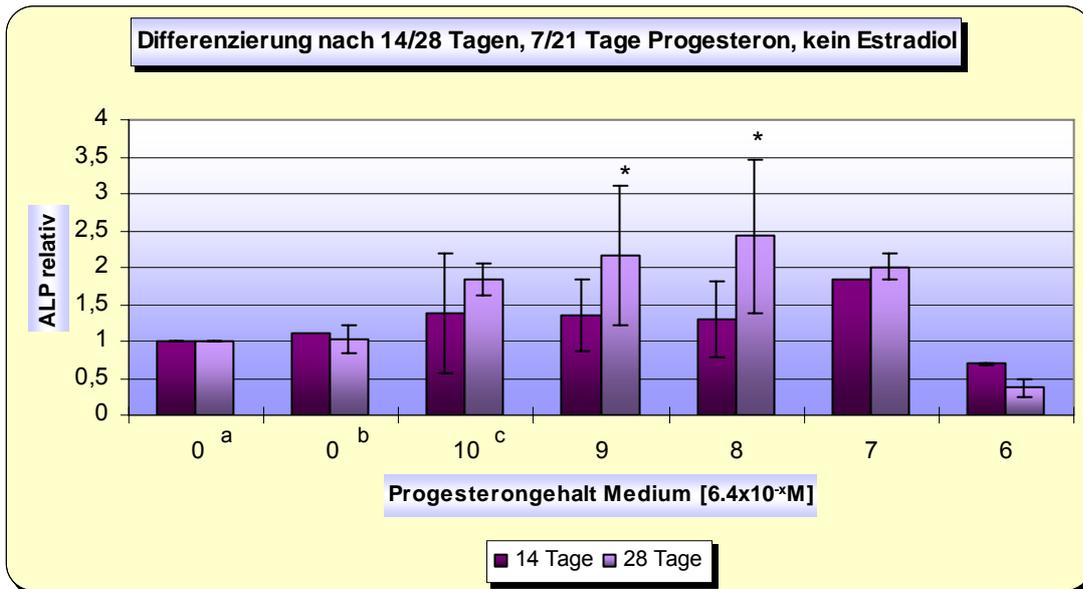
Osteoblasten durch die höchste Konzentration von  $10^{-6}$ M Progesteron um 37% gegenüber Zellen ohne Hormoneinfluss ( $p=0.03$ ). Verglichen mit niedrigeren Progesteronkonzentrationen war die Differenzierung sogar um mehr als die Hälfte reduziert ( $p<0.001$  bis  $p=0.003$ ). Alle physiologisch vorkommenden niedrigeren Progesteron-Konzentrationen führten im Vergleich zu nicht hormonell behandelten Osteoblasten zu einer signifikant erhöhten Bildung von ALP um 49-51% ( $p=0.004$  bis  $p=0.019$  für verschiedene Konzentrationen). Das ALP-Maximum lag mit Steigerung um 51% bei  $10^{-8}$ M und  $10^{-9}$ M ( $p=0.004$ ). Zwischen den Konzentrationen  $10^{-7}$ M bis  $10^{-10}$ M waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant. Eine minimale, statistisch nicht signifikante Steigerung der ALP-Konzentration war durch Estradiol-Inkubation ohne Zugabe von Progesteron erkennbar. Auch die Zugabe von Ethanol-Kontrolllösung in einer Konzentration von 0.02‰ hatte eine nicht signifikante Erhöhung der Produktion des Differenzierungsmarkers um 29% zur Folge.

Nach 28 Tagen Inkubation mit der höchsten Progesteronkonzentration von  $10^{-6}$ M war die statistisch signifikante Verminderung des Differenzierungsmarkers um 64% ( $p=0.033$ ) noch deutlicher als in den kürzeren Versuchen mit einer Verminderung um 37%. Die hier erreichten Ergebnisse unterschieden sich nicht nur gegenüber Zellen, welche nicht mit Hormonen behandelt worden waren, sondern auch gegenüber jenen, welche mit physiologischen Progesteronkonzentrationen inkubiert worden waren, signifikant. Alle untersuchten physiologischen Progesteron-Konzentrationen führten zu einer gesteigerten ALP-Konzentration mit einer nicht linearen, sondern U-förmigen Dosisabhängigkeit. Das Maximum wurde bei  $10^{-9}$ M Progesteron mit einer Steigerung um 134% erreicht ( $p<0.001$ ), doch auch  $10^{-7}$ M und  $10^{-8}$ M hatten mit einer Zunahme um 112% und 116% ( $p=0.004$ ,  $p<0.001$ ) mehr als eine Verdopplung des hormon-naiven ALP-Gehalts zur Folge. Eine ebenfalls signifikant gesteigerte Bildung von ALP durch die Osteoblasten ließ sich mit  $10^{-10}$ M Progesteron nachweisen ( $p<0.001$ ). Die alleinige Zugabe von Estradiol 0.1ng/ml oder Ethanol 0.02‰ zum Medium hatte mit einer Änderung auf das 1.17- (Estradiol) bzw. 0.96-fache (Ethanol) in diesen Versuchen nur geringfügige Effekte auf humane Osteoblasten ( $p>0.05$ ).

Der direkte Vergleich zwischen den Versuchen mit 14 Tagen und 28 Tagen Versuchsdauer zeigt, dass vor allem die Inkubation mit Progesteron in physiologischer Konzentration von  $10^{-7}$ - $10^{-9}$ M nach 28 Tagen eine deutlich größere Erhöhung der Expression von ALP um 112%, 116% und 134% (nach 14 Tagen 49%, 51% und 51%) nach sich zog. Dagegen war ALP nach Inkubation mit der höchsten Progesteronkonzentration von  $10^{-6}$ M nach 14 Tagen mit einer Verminderung auf 63%

statistisch signifikant weniger reduziert als nach 28 Tagen mit einer Verminderung auf 36% ( $p=0.034$ ). Mit Ethanol-Kontroll-Lösung und nur mit Estradiol ohne weiteren Progesteronzusatz waren die Ergebnisse nach 14 Tagen mit je 29% der Kontrolle leicht gegenüber den Messungen nach 28 Tagen mit 17% und -4% erhöht (n.s.).

### 3.4.2 Intrazelluläre ALP-Messungen mittels pNPP nach alleiniger Progesteron-Inkubation (ohne Estradiol-Exposition)



\*statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle ohne Hormone und Ethanol mit derselben Versuchsdauer ( $p<0.05$ )

b: Ethanol 0.02‰  
Estradiol  $3.7 \times 10^{-10}$  M ab c

**Abb. 11: ALP relativ nach 7/21tägiger Inkubation mit Progesteron gegenüber nicht mit Hormonen behandelten Zellen (a)**

gemessener Parameter: ALP intrazellulär, photometrisch bestimmt nach histochemischer Färbung

Versuchsanzahl: 5 Versuche im dreifachen Ansatz; dargestellt der Mittelwert aus 2 (14 Tage) bzw. 3 (28 Tage) Versuchen,  $\perp$  Standardabweichung

Versuchsdauer: 14 bzw. 28 Tage

Estradiolbehandlung: 0 Tage

Progesteronbehandlung: Tag 8 mit 14 bzw. 28

Estradiolkonzentration: 0.0M

Progesteronkonzentrationen:  $10^{-6/-7/-8/-9/-10}$  M

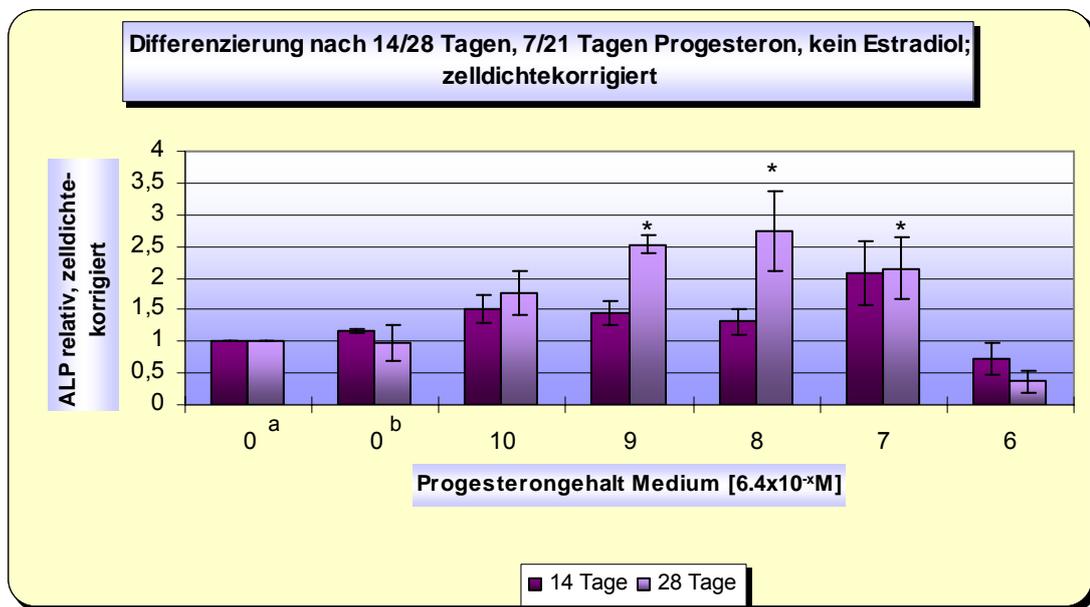
Zellzahl zu Versuchsbeginn: 1000/800 Zellen pro Schale einer 96 Well Zellkulturplatte

Zellkulturmedium: DMEM phenolrotfrei, Zusätze Dexamethason und Ascorbinsäure

Ohne Estradiol-Exposition zeigte sich nach 14 Tagen Versuchsdauer mit 7 Tagen Progesteron  $10^{-6}$  M eine Verminderung der ALP-Produktion um 30%. Dagegen stellte sich durch den Zusatz geringerer Konzentrationen eine Steigerung um 11 bis 84% ein, welche bei  $10^{-7}$  M Progesteron am größten war (dunkle Säulen in Abb. 11). Obgleich der relative intrazelluläre ALP-Gehalt bereits nach 14 Tagen Inkubation mit

Progesteron in physiologischen Konzentrationen, verglichen mit der suprphysiologischen Konzentration ( $10^{-6}\text{M}$ ), mehr als doppelt so hoch war, war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant.

21tägige Progesteron-Inkubation führte unter der Konzentration  $10^{-6}\text{M}$  zur Reduktion der Differenzierung um 63%. Gleichsinnig zu den oben beschriebenen 14-tägigen Versuchen zeigte sich durch den Zusatz von Progesteron in den physiologischen Konzentrationen von  $10^{-8}\text{M}$  bis  $10^{-10}\text{M}$  eine dosisabhängige Zunahme des Differenzierungsmarkers ALP ( $10^{-8}\text{M}$ :  $p=0.012$ ;  $10^{-9}\text{M}$ :  $p=0.034$ ;  $10^{-10}\text{M}$ :  $p>0.05$ , n.s.), die sich unter  $10^{-7}\text{M}$  Progesteron wieder abschwächte.



\*statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle mit derselben Versuchsdauer ( $p<0.05$ ); keine statistisch signifikanten Unterschiede 14 vs. 28 Tage  
b: Ethanol 0.02‰

**Abb. 12: ALP relativ nach 7 bzw. 21 Tagen Progesteron gegenüber nicht mit Hormonen behandelten Zellen (a) unter Berücksichtigung der Zelldichte**

gemessener Parameter: ALP intrazellulär, photometrisch bestimmt nach histochemischer Färbung

Versuchsanzahl: je 2 Versuche mit 14 und 28 Tagen Dauer im dreifachen Ansatz; Mittelwerte aus 6 gemessenen Einzelwerten

┴ Standardabweichung

Versuchsdauer: 14 bzw. 28 Tage

Estradiolbehandlung: 0 Tage

Progesteronbehandlung: Tag 8 mit 14 bzw. 21

Estradiolkonzentration: 0.0M

Progesteronkonzentrationen:  $10^{-6/-7/-8/-9/-10}\text{M}$

Zellzahl zu Versuchsbeginn: 1000 (14 Tage) bzw. 800 (28 Tage) Zellen pro Schale einer 96

Well Zellkulturplatte

Zellkulturmedium: DMEM phenolrotfrei, Zusätze Dexamethason und Ascorbinsäure

Nach Korrektur für die Zelldichte wurde unter dem Einfluss der höchsten Progesteronkonzentration  $10^{-6}\text{M}$  für 14 Tage eine Verminderung der ALP-Expression,

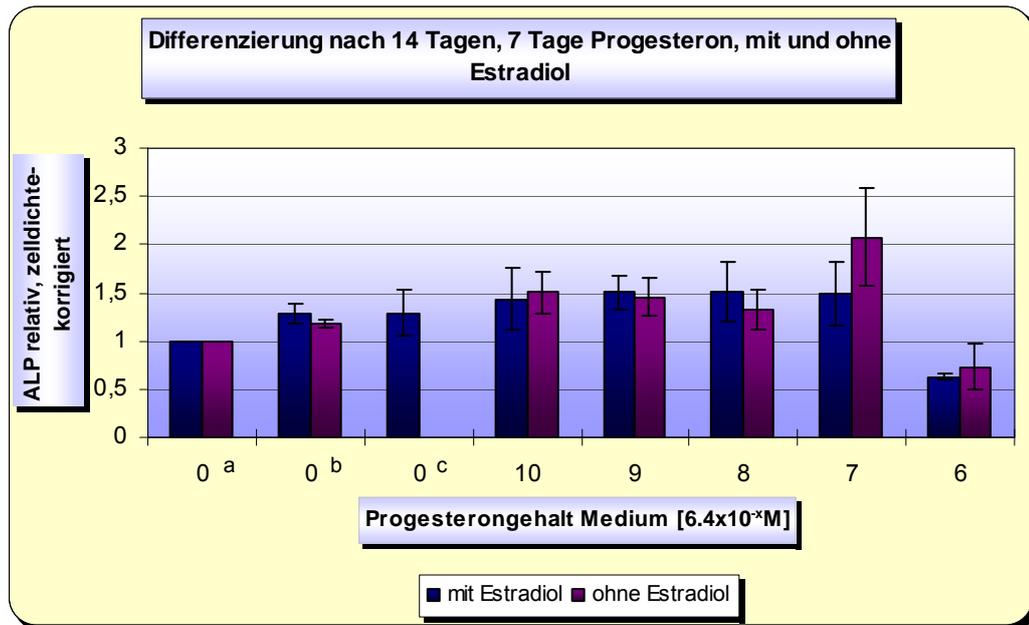
hier um 27% (n.s.), beobachtet. Hingegen führte die Inkubation mit physiologischen Progesteron-Konzentrationen in jedem Fall zu einer Steigerung. Das Maximum zeigte sich bei  $10^{-7}$ M Progesteron in einer Verdopplung des Werts, wobei dieser Ansatz nur einmal durchgeführt werden konnte (n.s.).

Nach einer Versuchszeit von 28 Tagen und Inkubation mit  $10^{-6}$ M Progesteron für 21 Tage verringerte sich der Gehalt des Differenzierungsmarkers erneut um 63% gegenüber den Zellen des Kontrollansatzes. Diese Verminderung war gegenüber den Osteoblasten, welche mit Progesteron in physiologischen Konzentrationen behandelt worden waren, statistisch signifikant ( $p < 0.001$  bis  $p = 0.005$ ). Bei  $10^{-7}$ M,  $10^{-8}$ M und  $10^{-9}$ M wurde eine statistisch signifikante Steigerung um 115% ( $p = 0.014$ ), 175% ( $p = 0.002$ ) und 152% ( $p = 0.004$ ) gegenüber dem Kontrollansatz ohne Estradiol- und Progesteronzugabe nachgewiesen. Das höchste Ergebnis bei  $10^{-8}$ M Progesteron unterschied sich auch signifikant von dem bei  $10^{-10}$ M gemessenen ( $p = 0.028$ ).

Auch die 28 Tage-Werte zeigten nach Korrektur für die Zelldichte gegenüber 14 Tagen physiologischer Progesteronkonzentration ohne Estradiol eine nicht signifikante Erhöhung der ALP-Produktion ( $p > 0.05$ ). Besonders deutlich war dies bei  $10^{-8}$ M (Steigerung um 31% vs. 175%) und  $10^{-9}$ M (Steigerung um 45% vs. 152%) Progesteron. Bei  $10^{-6}$ M Progesteron war ALP nach 28 Tagen gegenüber den Werten nach 14 Tagen vermindert (Verminderung gegenüber der Kontrolle nach 14 Tagen um 27% bzw. nach 28 Tagen um 63%; n.s.).

### **3.4.3 Vergleich der intrazellulären ALP-Messungen mittels pNPP, mit und ohne Inkubation mit Estradiol**

Beim Vergleich zwischen den Ergebnissen bei alleiniger Inkubation mit Progesteron bzw. bei Inkubation mit Estradiol und Progesteron nach 14 Tagen Versuchszeit zeigen sich nur geringfügige Unterschiede ohne statistische Signifikanz ( $p > 0.05$ ) (s. Abb. 13).



b: Ethanol 0.02‰  
Estradiol 3.7x10<sup>-10</sup>M ab c

**Abb. 13: ALP relativ nach 7 Tagen Progesteron mit und ohne Estradiol gegenüber nicht mit Hormonen behandelter Kontrolle (a) unter Berücksichtigung der Zelldichte gemessener Parameter: ALP intrazellulär, photometrisch bestimmt nach histochemischer Färbung**

Versuchsanzahl: 4 (mit Estradiol) bzw. 2 (ohne Estradiol) Versuche jeweils im dreifachen Ansatz; Mittelwerte aus 12 (mit Estradiol) bzw. 6 (ohne Estradiol) gemessenen Einzelwerten

┴ Standardabweichung

Versuchsdauer: 14 Tage

Estradiolbehandlung: 0 bzw. Tage 1 mit 14

Progesteronbehandlung: Tage 8 mit 14

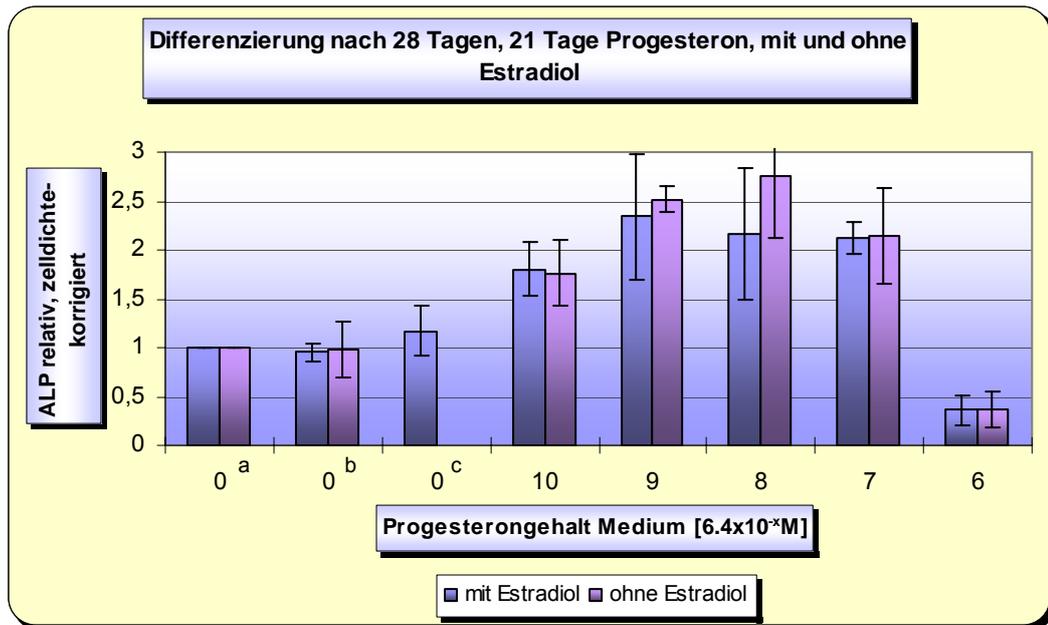
Estradiolkonzentration: 0.0M bzw. 10<sup>-10</sup>M

Progesteronkonzentrationen: 10<sup>-6/-7/-8/-9/-10</sup>M

Zellzahl zu Versuchsbeginn: 1000 Zellen pro Schale einer 96 Well Zellkulturplatte

Zellkulturmedium: DMEM phenolrotfrei, Zusätze Dexamethason und Ascorbinsäure

Zwischen mit Estradiol behandelten und nicht mit Estradiol behandelten Zellen zeigten sich nach 28 Tagen Inkubation mit der gleichen Progesteronkonzentration geringfügige Unterschiede ( $p > 0.05$ ). Am deutlichsten war der Unterschied bei Inkubation mit den physiologischen Konzentrationen von 10<sup>-8</sup>M und 10<sup>-9</sup>M Progesteron, bei 10<sup>-6</sup>M war er statistisch signifikant ( $p = 0.012$ ). Vergleicht man jeweils den Mittelwert für die gesamte Gruppe der mit Estradiol behandelten mit den nicht Estradiol-inkubierten Zellen, so war die Steigerung der ALP-Werte durch Progesteron ohne Estradiol höher als mit zusätzlich Estradiol ( $p = 0.039$ ).



b: Ethanol 0.02%  
Estradiol 3.7x10<sup>-10</sup>M ab c

**Abb. 14: ALP relativ nach 21 Tagen Progesteron mit und ohne Estradiol gegenüber nicht hormonell behandelter Kontrolle (a) unter Berücksichtigung der Zelldichte** gemessener Parameter: ALP intrazellulär, photometrisch bestimmt nach histochemischer Färbung

Versuchsanzahl: je 4 (mit Estradiol) bzw. 2 (ohne Estradiol) Versuche im dreifachen Ansatz; Mittelwerte aus 12 (mit Estradiol) bzw. 6 (ohne Estradiol) Einzelwerten

┴ Standardabweichung

Versuchsdauer: 14 bzw. 28 Tage

Estradiolbehandlung: 0 bzw. Tage 1 mit 14

Progesteronbehandlung: Tag 8 mit 28

Estradiolkonzentration: 0.0M bzw. 10<sup>-10</sup>M

Progesteronkonzentrationen: 10<sup>-6/-7/-8/-9/-10</sup>M

Zellzahl zu Versuchsbeginn: 800 (28 Tage) Zellen pro Schale einer 96 Well Zellkulturplatte

Zellkulturmedium: DMEM phenolrotfrei, Zusätze Dexamethason und Ascorbinsäure

### 3.4.4 Ergebnisse der ALP-Bestimmungen im Überstand

Die Messungen der extrazellulären ALP-Konzentration im Überstand (Durchführung im Labor Prof. P. Luppä, Institut für Klinische Chemie, TU München) ergaben Werte an der unteren Nachweisgrenze des Ostase-Assays. Die gemessenen Werte im Medium mit Zellen nach Hormon-Inkubation lagen nicht höher als die der Medium-Kontrolle ohne Zellen (s. Tab. 6).

<b>Estradiol</b>	0.0M	10 <sup>-10</sup> M				
<b>Progesteron</b>	0.0M	0	10 <sup>-10</sup> M	10 <sup>-9</sup> M	10 <sup>-8</sup> M	10 <sup>-6</sup> M
<b>ALP µg/l</b>	4,78	4,3	4,25	4,19	3,94	4,13

**Tab. 6: ALP im Überstand nach 28 Tagen Inkubation mit Hormonen**

gemessener Parameter: ALP im Überstand, gemessen mittels Access® Ostase-Assay  
92-100 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel

Versuchsanzahl: 1 Versuch im dreifachen Ansatz; Medium aus den drei Ansätzen gepoolt

Versuchsdauer: 28 Tage

Estradiolbehandlung gesamt: Tag 1 mit 28

Progesteronbehandlung: Tag 8 mit 28

Estradiolkonzentration: 10<sup>-10</sup>M

Progesteronkonzentrationen: 10<sup>-6/-8/-9/-10</sup>M

Zellzahl zu Versuchsbeginn: 3000 Zellen pro Kammer eines Objektträgers

Zellkulturmedium: DMEM phenolrotfrei, Dexamethason und Ascorbinsäure

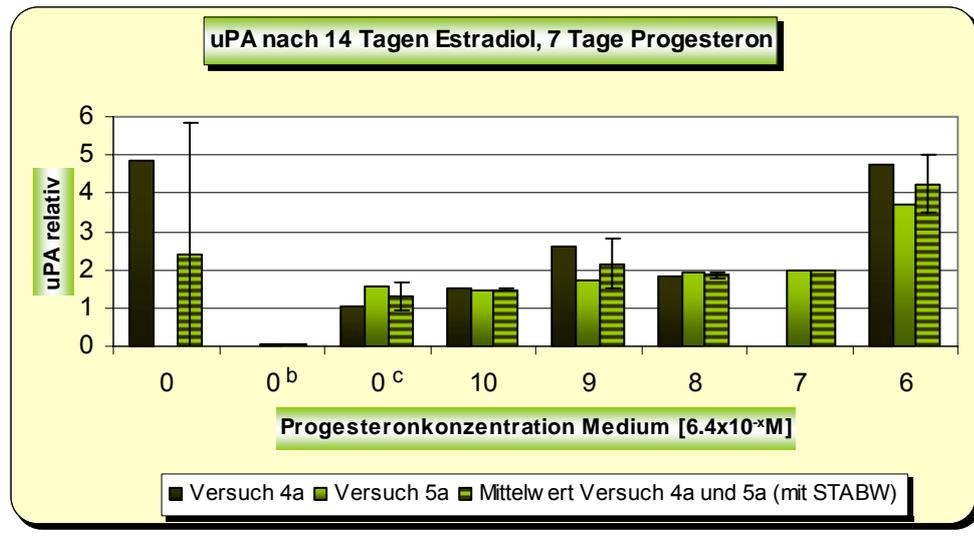
Die Ergebnisse wurden daher nicht auf die Gesamt-Zellzahl sowie den Anteil ALP-exprimierender Zellen bezogen wie ursprünglich geplant.

### 3.4.5 Bestimmung des Anteils ALP-positiver Zellen mittels NBT/BCIP

In der Übersichts-Betrachtung stellte sich der Zellrasen auf den Objektträgern nach 14 Tagen Versuchszeit in Versuch 4a weniger stark gefärbt, d.h. mit weniger ALP-positiven Zellen, dar als in Versuch 4b nach 28 Tagen. Im Gegensatz dazu waren die Osteoblasten in Versuch 5b nach 28 Tagen zu einem geringeren Anteil ALP-positiv als jene in Versuch 5a nach 14 Tagen.

Aufgrund der hinderlichen großen Zelldichte, die eine Identifikation einzelner Zellen vielfach unmöglich machte, und der mangelnden Relevanz bei ungenügenden Ergebnissen in der ALP-Bestimmung im Überstand, welche auf den Anteil ALP-exprimierender Zellen bezogen werden sollten, wurde auf eine exakte Bestimmung der Anzahl ALP-positiver und -negativer Zellen verzichtet. Stattdessen wurden die Ergebnisse der Hexosaminidase-Tests als Werte für die Zellzahl verwendet, um Ergebnisse anderer Tests darauf beziehen zu können.

### 3.5 uPA- und PAI-1-Messungen

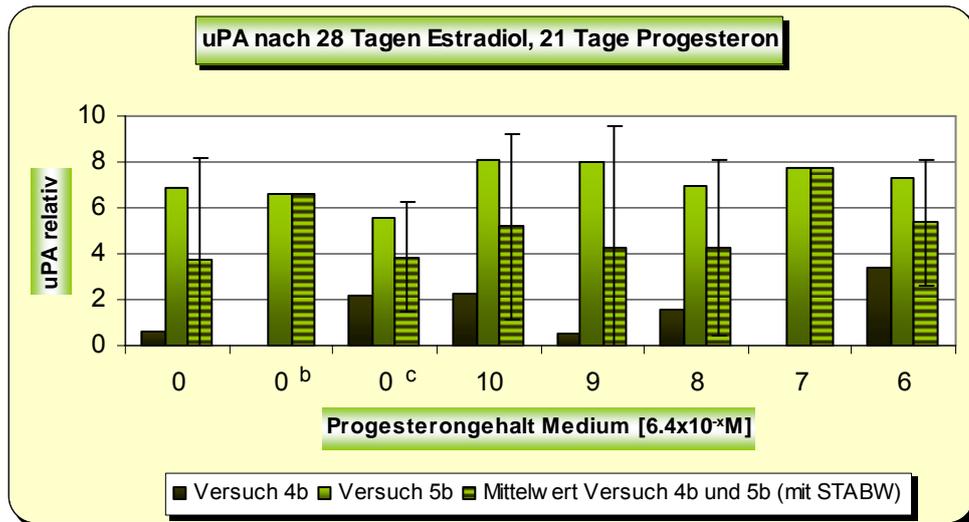


b: Ethanol 0.02‰  
Estradiol  $3.7 \times 10^{-10}$  M ab c

**Abb. 15: uPA im Überstand nach 14 Tagen Inkubation mit Estradiol und 7 Tagen Progesteron**

gemessener Parameter: uPA im Überstand des Zellkulturmediums, gemessen mittels Imubind® ELISA Kit  
92-100 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel, bezogen auf die Zelldichte gemäß Hexosaminidase-Test  
Versuchsanzahl: 2 Versuche mit 14 Tagen Dauer im dreifachen Ansatz; Medium aus den drei Ansätzen gepoolt  
Versuchsdauer: 14 Tage  
Estradiolbehandlung: Tag 1 mit 14  
Progesteronbehandlung: Tag 7 mit 14  
Estradiolkonzentration:  $10^{-10}$  M  
Progesteronkonzentrationen:  $10^{-6/-7/-8/-9/-10}$  M  
Zellzahl zu Versuchsbeginn: 6000 Zellen pro Kammer eines Objektträgers  
Zellkulturmedium: DMEM phenolrotfrei, Dexamethason und Ascorbinsäure

Nach 14tägiger Inkubationszeit fiel die gesteigerte uPA-Konzentration im Überstand bei Zugabe der höchsten Progesteronkonzentration von  $10^6$  M in beiden Versuchen auf. Beeinflussung der Osteoblasten durch mittlere Progesteronkonzentrationen hatte vergleichbare uPA-Konzentrationen zur Folge. Die niedrigste Progesteronkonzentration von  $10^{-10}$  M sowie der Zusatz allein von Estradiol zum Medium führten zu leicht reduzierten Werten. In Experiment Nr. 5a konnten in der Ethanol-Kontrolle ebenso wie in dem Ansatz mit reinem Medium ohne Progesteron, Estradiol und Ethanol nur minimale Werte gemessen werden. Im Gegensatz dazu wurde in Versuch Nr. 4a das höchste Ergebnis im Ansatz ohne Zusätze erzielt.



b: Ethanol 0.02‰  
Estradiol 10<sup>-10</sup>M ab c

**Abb. 16: uPA im Überstand nach 28 Tagen Estradiol und 21 Tagen Progesteron gemessener Parameter: uPA im Überstand, gemessen mittels Imubind® ELISA Kit 92-100 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel, bezogen auf die Zelldichte nach Hexosaminidase-Test**

Versuchsanzahl: 2 Versuche im dreifachen Ansatz; Medium aus den drei Ansätzen gepoolt

Versuchsdauer: 28 Tage

Estradiolbehandlung: Tag 1 mit 28

Progesteronbehandlung: Tag 8 mit 28

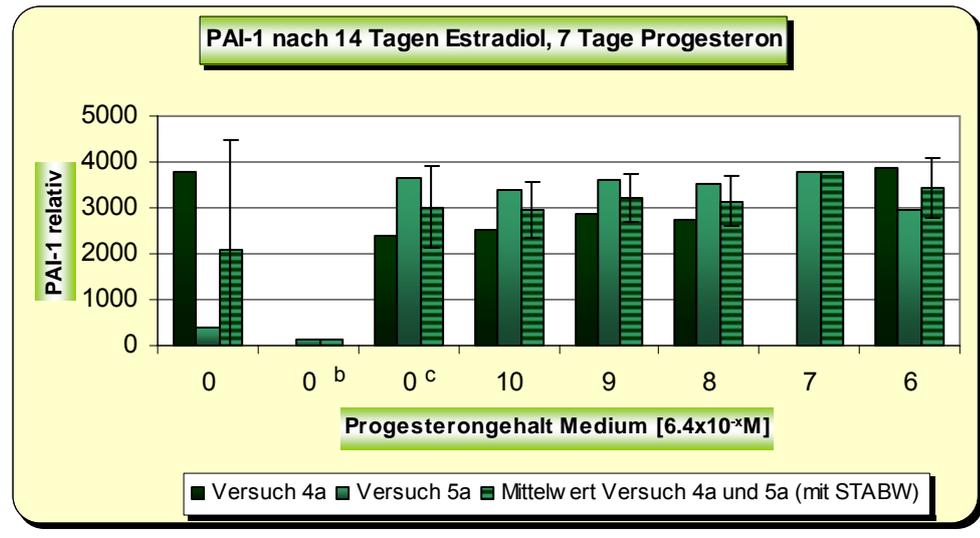
Estradiolkonzentration: 10<sup>-10</sup>M

Progesteronkonzentrationen: 10<sup>-6/-8/-9/-10</sup>M

Zellzahl zu Versuchsbeginn: 3000 Zellen pro Kammer eines Objektträgers

Zellkulturmedium: DMEM phenolrotfrei, Dexamethason und Ascorbinsäure

Wie Abb. 16 zeigt, wurden insgesamt eindeutig höhere Werte in Versuch 5b verglichen mit Versuch 4b gemessen. Dabei sind die erzielten Ergebnisse in Versuch 5b durchgehend bei Inkubation mit Progesteron erhöht gegenüber jenen ohne Progesteronzugabe. Das Minimum in diesem Versuch lag bei Zusatz von ausschließlich Estradiol zum Medium. Auch in Versuch 4b lag das Minimum nahe der Medium-Kontrolle, jedoch wurde es bei einer Progesteronkonzentration von 10<sup>-9</sup>M gemessen. Bei dieser Konzentration lag in Versuch 5b dagegen das Maximum. Bei Inkubation der Zellen mit 10<sup>-10</sup>M Progesteron sowie mit Estradiol ohne Progesteron wurden in 4b kaum voneinander abweichende Ergebnisse im mittleren Bereich gemessen. Das Maximum in diesem Versuch lag bei 10<sup>-6</sup>M. Auch dies stimmt nicht mit dem zweiten Versuch überein.



b: Ethanol-Kontrolllösung 0.02%  
 Estradiol  $3.7 \times 10^{-10} \text{ M}$  ab c

**Abb. 17: PAI-1 im Überstand nach 14 Tagen Inkubation mit Estradiol und 7 Tagen Progesteron**

gemessener Parameter: PAI-1 im Überstand, gemessen mittels Imubind® ELISA Kit 92-100 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel, bezogen auf die Zelldichte gemäß Hexosaminidase-Test

Versuchsanzahl: 2 Versuche im dreifachen Ansatz; Medium aus je drei Ansätzen gepoolt

Versuchsdauer: 14 Tage

Estradiolbehandlung: Tag 1 mit 14

Progesteronbehandlung: Tag 8 mit 14

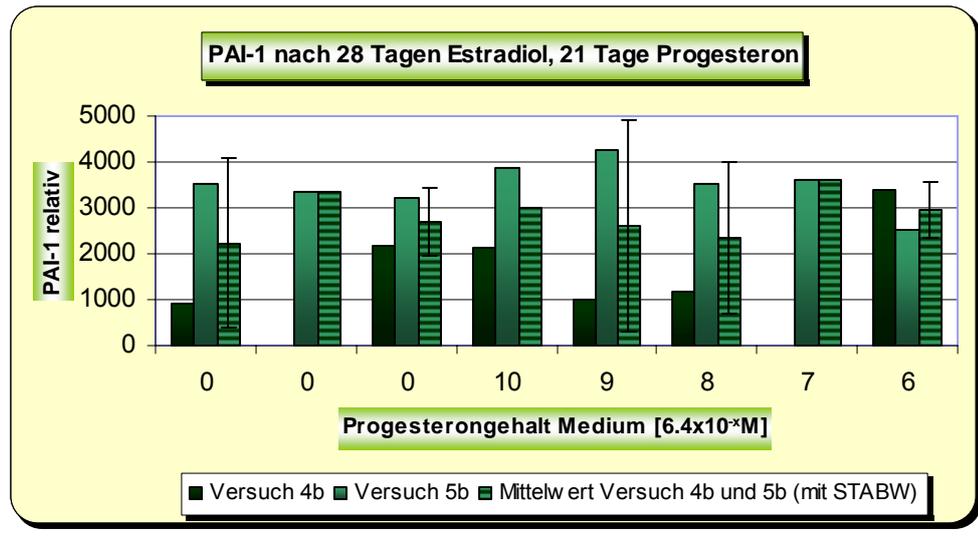
Estradiolkonzentration:  $10^{-10} \text{ M}$

Progesteronkonzentrationen:  $10^{-6/-8/-9/-10} \text{ M}$

Zellzahl zu Versuchsbeginn: 6000 Zellen pro Kammer eines Objektträgers

Zellkulturmedium: DMEM phenolrotfrei, Zusätze Dexamethason und Ascorbinsäure

Die Untersuchungen zur PAI-1-Konzentration im Überstand nach 14 Tagen Versuchsdauer zeigten für beide Versuche ähnlich hohe Ergebnisse. Von den mit Hormonen inkubierten Zellen produzierten in Versuch 5a jene am wenigsten PAI-1, welche mit der höchsten Progesteronkonzentration behandelt worden waren. Dagegen lag in Versuch 4a hier das Maximum.



b: Ethanol 0.02‰  
 Estradiol  $3.7 \times 10^{-10}$  M ab c

**Abb. 18: PAI-1 im Überstand nach 28 Tagen Inkubation mit Estradiol und 21 Tagen Progesteron**

gemessener Parameter: PAI-1 im Überstand, gemessen mittels Imubind® ELISA Kit 92-100 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel, bezogen auf die Zelldichte gemäß Hexosaminidase-Test

Versuchsanzahl: 2 Versuche im dreifachen Ansatz; das Medium aus den drei Ansätzen wurde gepoolt

Versuchsdauer: 28 Tage

Estradiolbehandlung: Tag 1 mit 28

Progesteronbehandlung: Tag 8 mit 28

Estradiolkonzentration:  $10^{-10}$  M

Progesteronkonzentrationen:  $10^{-6/-8/-9/-10}$  M

Zellzahl zu Versuchsbeginn: 3000 Zellen pro Kammer eines Objektträgers

Zellkulturmedium: DMEM phenolrotfrei, Dexamethason und Ascorbinsäure

Nicht nur für uPA, sondern auch für die PAI-1-Konzentration stellten sich nach 28 Tagen Versuchsdauer für Versuch Nr. 5b deutlich höhere Messwerte dar als in Versuch 4b. Das Maximum lag in Versuch 4b bei Inkubation mit  $10^{-6}$  M Progesteron, die niedrigsten Werte wurden für  $10^{-8}$  M und  $10^{-9}$  M Progesteron sowie für die Medium-Kontrolle ermittelt. Im mittleren Bereich lagen sie nach Inkubation mit  $10^{-10}$  M Progesteron und nach Inkubation nur mit Estradiol. In Versuch 5b lag das Maximum für PAI-I bei  $10^{-10}$  M.

Um das Verhältnis von uPA und PAI-1 zueinander zu analysieren, wurde die uPA-PAI-1-Ratio nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{uPA-PAI-1-Ratio} = \frac{\text{uPA}}{\text{PAI-1}/1000}$$

Bei der so ermittelten uPA/PAI-1 Ratio zeigten sich nach 14 Tagen Versuchszeit Werte kleiner 1, d.h. uPA war kleiner als 1/1000 PAI-1. Dies galt jedoch nicht für das Ergebnis nach Behandlung mit  $10^{-6}\text{M}$  Progesteron (uPA/PAI-1 Ratio 1.24). Nach 28 Tagen Versuchszeit lagen alle Werte über eins mit einem Minimum bei  $10^{-9}\text{M}$  Progesteron (uPA/PAI-1 Ratio 1.22) und einem Maximum bei  $10^{-7}\text{M}$  Progesteron (Ratio 2.14).

Vergleicht man das Verhältnis von uPA und PAI-1 zueinander nach 14 und nach 28 Tagen, so war dieses nach 28 Tagen größer als nach 14. Dies bedeutet im Mittel eine Zunahme von uPA gegenüber PAI-1. Am geringsten war diese nach Behandlung mit  $10^{-6}\text{M}$  Progesteron und nach Kultivierung der Zellen ohne Zusatz von Estradiol und Progesteron zum Medium (s. Abb. 19 und Abb. 20).

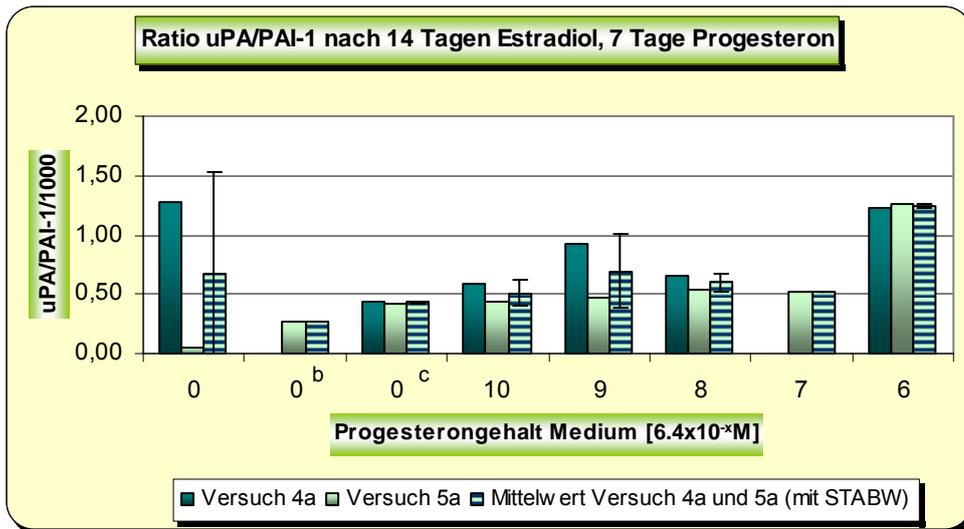


Abb. 19

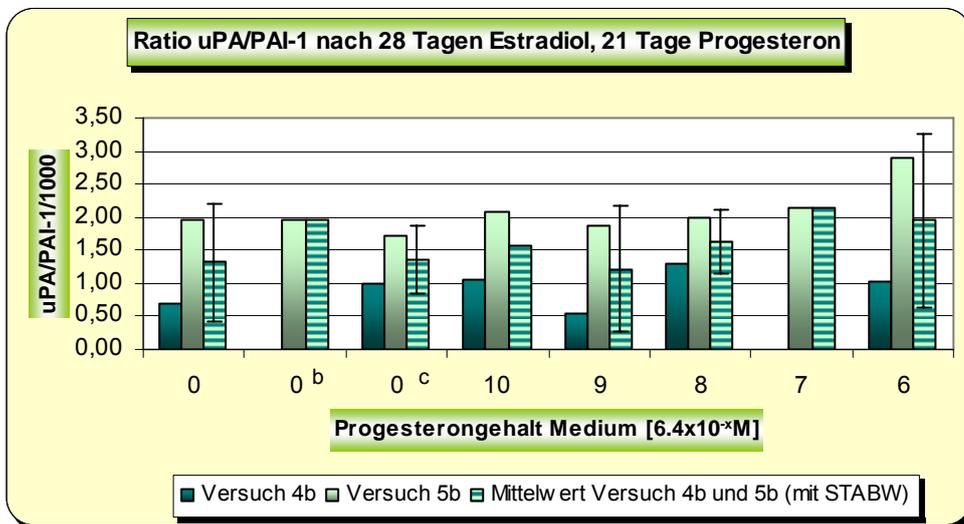


Abb. 20

**Abb. 19 und Abb. 20: uPA und PAI-1 im Überstand, Ratio uPA/PAI-1 nach 14/28 Tagen**  
 b: Ethanol 0.02%  
 Estradiol 3.7x10<sup>-10</sup>M ab c

gemessene Parameter: PAI-1 im Überstand, gemessen mittels Imubind® ELISA Kit  
 uPA im Überstand, gemessen mittels Imubind® ELISA Kit  
 gemessen 92-100 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel, bezogen auf die Zelldichte gemäß Hexosaminidase-Test  
 Versuchsanzahl: je 2 Versuche im dreifachen Ansatz; Medium aus je 2x3 Ansätzen gepoolt  
 Versuchsdauer: 14 Tage  
 Estradiolbehandlung: Tag 1 mit 14/28  
 Progesteronbehandlung: Tag 8 mit 14/28  
 Estradiolkonzentration: 10<sup>-10</sup>M  
 Progesteronkonzentrationen: 10<sup>-6/-7/-8/-9/-10</sup>M  
 Zellzahl zu Versuchsbeginn: 6000/3000 Zellen pro Kammer eines Objektträgers  
 Zellkulturmedium: DMEM phenolrotfrei, Dexamethason und Ascorbinsäure

## **4 Diskussion**

### **4.1 Diskussion der Methodik**

#### **4.1.1 Zellkultur**

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals in vitro Langzeit-Versuche an primären humanen Osteoblasten durchgeführt. U.a. die Heterogenität der Ergebnisse von Experimenten mit fetalen oder adulten Ratten-Osteoblasten, welche bisher häufig publiziert wurden, zeigt, dass deren Übertragbarkeit auf den Menschen in Frage gestellt werden muss [Slootweg MC 1992, S.R5-8; Ishida Y 1997, S. 17-25; Pei W 2003, S.822-830]. Die vorliegende Versuchsreihe wurde zudem durch klinische Studien der Arbeitsgruppe ergänzt.

Die Auswahl der Spender dieser Knochenzellen wurde mit Sorgfalt getroffen. Es wurden hier als Spender drei prä- und perimenopausale Frauen ohne bestehende Knochenerkrankungen ausgesucht, wobei insbesondere keine Osteoporose vorzuliegen hatte. Die Auswahl nach Geschlecht und Menopausenstatus sollte das Vorliegen eines vergleichbaren Hormonrezeptorstatus ermöglichen. Ishida fand eine unterschiedliche Beeinflussbarkeit zwischen von männlichen und von weiblichen Ratten stammenden Osteoblasten durch Progesteron heraus [Ishida 1997, S. 19], und auch Katzburg zeigte verschiedene Hormonsensitivität bei Osteoblasten, welche von Männern verschiedener Altersgruppen und Frauen mit verschiedenem Menopausenstatus stammten [Katzburg et al 1999, S.669-670]. Auch bezüglich des Estrogen-Rezeptors wurden in Funktion und Anzahl Unterschiede zwischen jüngeren (<50 Jahre) und älteren (>50 Jahre) Frauen beschrieben [Ankrom A 1998, S. 790-791].

Durch das Pooling der von drei verschiedenen Frauen abstammenden Zellen sollten interindividuelle Unterschiede weitgehend ausgeglichen werden.

Eine Problematik von Zellkulturversuchen stellt die Reinheit der Kultur dar. Osteoblasten sind von der Überwucherung durch schnell wachsende Fibroblasten gefährdet. Um möglicherweise vorhandene Fibroblasten, Blutzellen und andere nicht adhärent wachsende Zellspezies zu eliminieren, wurden die Knochenstücke bereits vor Beginn der Kultivierung und auch in den ersten Tagen der Kultivierung wiederholt mit frischem Medium gespült. Ausserdem wurden die ausgewachsenen Zellkulturen vor jedem Mediumwechsel morphologisch beurteilt und vor Beginn der Experimente zusätzlich mittels histologischer Färbung kontrolliert. Hierzu wurde der Osteoblasten-

Marker ALP verwendet, welcher von den die Osteoblasten gefährdenden Fibroblasten nicht exprimiert wird. Ab einem Anteil von 70% ALP-bildender Zellen wird die Knochenzell-Kultur allgemein als qualitativ hochwertig erachtet, was auch jeweils erreicht werden konnte. Dies konnte durch nachgewiesene beginnende Kalzifizierung vor den Versuchen zusätzlich bestätigt werden. Zu beachten bleibt, dass es sich bei beiden Methoden um qualitative bzw. semiquantitative Methoden handelt, die in repräsentativen Stichproben der Kultur durchgeführt werden und einer gewissen inter-observer-Variabilität unterliegen. Trotzdem konnte durch Kombination der Methoden eine Kontamination der Osteoblasten-Zellkultur ausgeschlossen werden. Eine Veränderung der Zell-Spezifität sollte ausserdem durch Vermeidung zu häufigen Passagierens verhindert werden, weshalb die Osteoblasten bis zur endgültigen Verwendung kryokonserviert wurden.

#### **4.1.2 Osteogene Mediumzusätze (Phenolrot, Dexamethason, Ascorbinsäure, FCS)**

Für die Versuche kam ausschließlich phenolrotfreies Medium zum Einsatz, da Phenolrot estrogenartige Wirkungen hat [Ernst M 1989, S.907-14; Welshons WV 1988, S.169-78]. Eine Konkurrenz von Phenolrot und Estradiol um den Estrogenrezeptor sowie eine Beeinflussung der ermittelten Estradiolwirkung durch zusätzliches Phenolrot im Medium sollte so verhindert werden. Andererseits gibt es Hinweise darauf, dass bereits nach 2-3wöchiger Kultivierung von Knochenzellen in phenolrotfreiem Medium ohne Estrogen ein irreversibler Verlust von Estrogenrezeptoren auftritt [Nasir J 1997, S. 240-241]. Daher wurden die Osteoblasten zunächst in phenolrothaltigem und erst ab Beginn der Versuche in phenolrotfreiem Medium und Estradiol kultiviert.

Fetales Kälberserum (FCS) wird verwendet, um das Wachstum von Zellen in Kultur zu fördern. Dies ist auch bei Osteoblasten-Kulturen eine bewährte Methode. Das verwendete Kälberserum wurde freundlicherweise vom Institut für Klinische Chemie auf den Gehalt von Estradiol und Progesteron getestet. Dabei ergab sich für Estradiol eine als knochenmetabolisch nicht relevant geltende Konzentration von 1.4pg/ml für 10% FCS enthaltendes Medium sowie ein Progesterongehalt, welcher unterhalb der Nachweisgrenze lag.

Die Gabe aller Zusatzstoffe wie FCS, Vitamine, Antibiotika und Glutamat wurde in allen Experimenten konstant gehalten, so dass eine Beeinflussung der Ergebnisse durch variable Zusätze ausgeschlossen werden kann.

Dies trifft bei den Hauptversuchen auch für Dexamethason und Ascorbinsäure zu. Ascorbinsäure spielt eine wichtige Rolle in der Differenzierung von Osteoblasten, und Dexamethason gewährleistet den Transport von Vitamin C in die Zellen [Pandipati 1998, S.85-91]. Trotzdem war in Vorversuchen auf deren Verwendung zunächst verzichtet worden, da Dexamethason und Progesteron an Cortisolrezeptoren in Osteoblasten kompetitiv binden und gegenseitige Beeinflussungen ihrer Wirkungen an Osteoblasten-Zellkulturen beschrieben sind [Tenenbaum HC 1995, S.200-210; Naylor PH 1981, S.1304-1305]. Wie sich jedoch zeigte, sind Osteoblasten in vitro ohne Dexamethason, auch bei isolierter Gabe von Ascorbinsäure, nicht ausreichend zur Differenzierung fähig. Eine messbare ALP-Bildung trat nicht auf. Schon die Ergebnisse von Bellows et al. wiesen darauf hin, dass eine ständige Exposition von Langzeit-Knochenzell-Kulturen gegenüber physiologischen Glucocorticoid-Konzentrationen notwendig ist [Bellows CG 1987, S.1985-92]. Andernfalls nimmt die Anzahl sogenannter bone nodules als Marker für osteoblastäre Differenzierung in Kulturen von Knochenvorläuferzellen bei zunehmender Subkultivierung ab [Bellows CG 1990, S. 132-8]. Bestätigt wurden diese Ergebnisse auch von Rickard et al. 1994, der eine Induktion der ALP-Expression und damit der osteoblastären Differenzierung durch  $10^{-8}$ M Dexamethason bei Knochenmarks-Stammzellen feststellte [Rickard DJ 1994, 218-28].

Ishida beschrieb 1999 zwei verschiedenartige Populationen bei Ratten-Osteoprogenitor-Zellen, nämlich Progesteron- und Dexamethason-abhängige Zellen. Auch eine Untergruppe von Zellen, die sowohl durch Dexamethason als auch durch Progesteron beeinflusst werden kann, wurde hier beschrieben. Estradiol-Zugabe wirkte verstärkend bei den Progesteron-abhängigen Zellen, bei den Dexamethason-abhängigen Zellen zeigte es keine Wirkung [Ishida 1999, S. 3210]

Pei veröffentlichte 2003 ganz ähnliche Beobachtungen [Pei 2003, S.822-830]. Er fügte noch hinzu, Estradiol verstärke nicht nur die Wirkung von Progesteron in Progesteron-anhängigen Zellen, sondern vermindere auch Proliferation und Differenzierung in Dexamethason-abhängigen Osteo-Progenitorzellen.

In den Vor-Versuchen ohne Zusatz von Dexamethason  $10^{-9}$ M konnte nach 14 und 28 Tagen auch mit Zusatz von Estradiol und/oder Progesteron keine Expression des Knochenaufbaumarkers ALP nachgewiesen werden, obwohl in den vor Beginn der Experimente stattgefundenen Typisierungstests ALP-haltige Zellen in situ angefärbt wurde. Bei zusätzlicher Dexamethason-Zugabe wurde in den nachfolgenden Versuchen ALP wieder messbar. Mit gleichbleibender Dexamethason-Konzentration und zusätzlicher Estradiol-Inkubation wurde in den Kontroll-Ansätzen eine geringe,

statistisch nicht signifikante Erhöhung der ALP-Expression gemessen. Zusätzliche Gabe von Progesteron steigerte die gemessene Alkalische Phosphatase noch weiter konzentrationsabhängig in statistisch signifikantem Ausmaß. Auch ohne Estradiol hatte Progesteron bei gleichzeitiger Dexamethason-Gabe eine konzentrationsabhängige Erhöhung der ALP-Bildung zur Folge, die vor allem nach 28 Tagen Versuchszeit noch über die Erhöhung mit zusätzlich Estradiol hinausging.

Da Ishida [Ishida 1999, S. 3217] Zellkolonien fand, welche sowohl unter Progesteron als auch unter Dexamethason ALP produzierten, spricht dies dafür, dass es sich bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen um eine zur ALP-Produktion von Dexamethason abhängige Population handelte, welche zusätzlich auf Progesteron reagieren kann. Dass es sich um von weiblichen Spenderinnen gewonnene Osteoblasten handelte, passt auch zu Ishidas Beobachtung, der bei von weiblichen Ratten stammenden Osteoblasten einen Einfluss von Progesteron auf die Anzahl der gebildeten Bone nodules fand, welcher bei von männlichen Ratten stammenden Osteoblasten nicht zu finden war [Ishida et al 1997, S.19-20]. Möglicherweise ist hier eine bestimmte Schwellenkonzentration von Dexamethason notwendig, um dann weitere Steigerungen durch verschiedene Progesteron-Konzentrationen zu ermöglichen. Zu beachten ist hier, dass die von den beiden anderen Gruppen verwendeten Progesteron-Konzentrationen mit  $10^{-5}$ M (Ishida) und  $10^{-4}$ - $10^{-5}$ M (Pei) deutlich höher lagen. Es ist also denkbar, dass eine Schwellenkonzentration von Progesteron notwendig ist, um ohne zusätzlich Dexamethason wirken zu können. In der hier vorliegenden Arbeit konnte die Progesteron-Wirkung jedoch nicht durch zusätzliche Gabe von Estradiol erhöht werden, was den Angaben der beiden anderen Autoren zufolge wiederum eher für eine Dexamethason-abhängige Population spricht.

#### **4.1.3 Steroidhormone**

Die Hormonkonzentrationen wurden entsprechend den physiologischen Konzentrationen sowie nach Vorarbeiten anderer Autoren und nach den Erfahrungen durch eigene Vorversuche gewählt. Die anfangs geplante Estradiolkonzentration von  $10^{-10}$ M konnte dabei nach den Vorversuchen beibehalten werden. Die Progesteronkonzentrationen ( $10^{-8}$ - $10^{-10}$ M) wurden nach den Vorversuchen zunächst um die höchste Konzentration von  $10^{-6}$ M, die im supraphysiologischen Bereich lag, von der aber eindeutige Ergebnisse erwartet wurden, erweitert. Da sich hierbei eine sehr deutliche Reduktion der exprimierten Proliferations- und Differenzierungsmarker zeigte, wurde in den letzten beiden Versuchen auch die dazwischen liegende Konzentration von  $10^{-7}$ M getestet, um eine etwaige Schwelle für diesen Effekt erfassen zu können.

In stichprobenartigen Messungen wurden die angestrebten Hormonkonzentrationen in diesen Lösungen durch das Institut für Klinische Chemie der TU München bestätigt. Eine Kontrolle enthielt 0.02‰ Ethanol, was der höchsten verwendeten Ethanolkonzentration entsprach. Dadurch konnte eine wesentliche Beeinflussung des osteoblastären Wachstums und der Differenzierung der Zellen durch das zur Lösung der lipophilen Hormone notwendige Ethanol ausgeschlossen werden.

#### **4.1.4 Untersuchungsmethoden: Hexosaminidase-Proliferations-Assay und ALP-Nachweis**

Die Methoden, mit welchen die Zellen der Kultur als Osteoblasten identifiziert wurden, wurden bereits unter Punkt 4.1.2 diskutiert.

Als Proliferationsmarker wurde Hexosaminidase gemessen. Es handelt sich dabei um ein lysosomales Enzym, welches als Marker für die Zellzahl anerkannt ist [Landegren U 1984, S.379-88]. Dabei werden alle Zellen, auch nicht osteoblastäre, erfasst. Aufgrund der Spezifizierung der Zellen vor und nach den Versuchen ist jedoch davon auszugehen, dass es sich bei der gemessenen Zell-Dichte um die Dichte der Osteoblasten handelte. Bei dem verwendeten Assay handelte es sich um ein kommerziell hergestelltes und im Zellkulturlabor der Orthopädischen Klinik etabliertes Testverfahren. Es muss jedoch kritisch angemerkt werden, dass die photometrisch gemessenen Werte bei diesem Testverfahren teilweise oberhalb des kritischen Bereichs der Optischen Dichte um 4 lagen, ab welchem aus technischen Gründen eine genaue Bestimmung nicht mehr uneingeschränkt möglich ist. Dies hat seinen Ursprung in der zu Beginn der Versuche auszusäenden Zellzahl, was bereits in Punkt 2.3.4 erörtert wurde.

Als Differenzierungsmarker wurde die Alkalische Phosphatase ALP gewählt. Sie ist nicht nur in der Zellkultur, sondern auch im klinischen Alltag in Form eines Serumparameters als Marker für Osteoblasten-Formation anerkannt [Miller Paul D. et al., 1999; Leung KS 1993]. Alkalische Phosphatase wird neben Knochengewebe auch u.a. von Leberzellen und Plazenta gebildet. Zum Ausschluß von ALP-Bildung durch andere Zell-Spezies wurden umfangreiche Spezifizierungstests durchgeführt.

Bei dem colorimetrischen pNPP-Test, mit dessen Hilfe die selbst gemessenen Ergebnisse erzielt wurden, handelte es sich wiederum um einen kommerziellen Assay, der im Orthopädischen Zellkulturlabor durch langjährige Erfahrung etabliert ist. Hier wird die intrazelluläre ALP in den adhärenen Zellen gemessen, da der

Überstand abgenommen und die dann noch adhärenen Zellen zunächst lysiert werden, bevor der ALP-Gehalt in diesem Zell-Lysat bestimmt wird.

Die Messung des ALP-Gehalts im Überstand sollte im Institut für Klinische Chemie mit dem gleichen Assay erfolgen, der bereits in einer vorhergehenden klinischen Studie verwendet worden war und hier durch Verminderung des ALP-Gehalts im Serum von Probandinnen einen Abfall der Knochenformation in der Perimenopause gezeigt hatte [Seifert-Klauss et al. 2002, 23-33; Seifert-Klauss et al. 2005, S.136]. Während bei der ALP-Messung mit dem pNPP-Assay nur die intrazelluläre ALP der adhärenen Zellen nachgewiesen wird, kann mit dieser Methode die gesamte, sowohl von adhärenen als auch nicht adhärenen Zellen in das Medium abgegebene ALP bestimmt werden. Wohl vor allem wegen der geringen Zellzahl im in vitro Versuch blieb ALP im Überstand des Zellkultur-Mediums unter der unteren Nachweisgrenze dieses kommerziellen, gewöhnlich für Messungen im Serum verwendeten Assays.

Um adhärenente Zellen zu spezifizieren und ihre Zahl mikroskopisch bestimmen zu können, wurden sie mittels NBT/BCIP gefärbt. Diese Methode führt zu einer Blaufärbung ALP-positiver Zellen. Vor Beginn der Versuche war es problemlos möglich, die Zellen zum Zweck der Spezifizierung zu färben, auszuzählen und den Anteil ALP-positiver Zellen zu bestimmen. Besonders nach 28, aber auch bereits nach 14 Tagen Versuchszeit war die Zelldichte z.T. so groß, dass eine exakte Zellzahlbestimmung mit dieser Methode nicht mehr möglich war. Daher wurden alle Ergebnisse auf die Zellzahl gemäß Hexosaminidase-Essay bezogen.

#### **4.1.5 Untersuchungsmethoden: uPA und PAI-1**

Die Messungen von uPA und PAI-1 im Überstand wurden von Mitarbeitern der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik im dortigen Labor durchgeführt. Bei den verwendeten Tests handelte es sich um kommerzielle ELISA-Kits, die im Labor etabliert waren. Üblicherweise werden sie verwendet, um uPA und PAI-1 im Serum von Patienten zu bestimmen, es ist jedoch auch die Verwendung zur Bestimmung der Konzentration im Zellkulturmedium möglich.

Ein Abfall der Konzentration von uPA, PAI-1 und auch ALP im Medium-Überstand in der Zeitspanne zwischen Abnahme und Messung wurde durch sofortiges Tiefgefrieren der Überstände bei -70°C unmittelbar nach der Abnahme verhindert.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse der Hauptversuche**

### **4.2.1 Progesteronkonzentration**

#### **Proliferation**

Die Proliferationstests nach Inkubation der Osteoblasten mit verschiedenen Progesteronkonzentrationen zeigten durchweg nur sehr geringfügige Abweichungen. Nur bei Behandlung der Zellen mit der supraphysiologischen Progesteronkonzentration von  $10^{-6}\text{M}$  zeigte sich eine Verringerung der Proliferation um durchschnittlich 13% bei 14 Tagen Versuchsdauer bzw. um durchschnittlich 11% bei 28 Tagen Versuchsdauer gegenüber den Kontrollansätzen ohne Estradiol, Progesteron und Ethanol im Medium.

Demgegenüber zeigten andere Autoren [Verhaar 1994, S.308-309] einen dosisabhängigen stimulierenden Effekt verschiedener Progesteron-Dosen auf die Proliferation von humanen Osteoblasten.

Bei Ishida [Ishida 1996, S.923] trat bei Verwendung von adulten Ratten-Osteoprogenitorzellen ein dosisabhängiger Effekt unter  $10^{-7}$ - $10^{-5}\text{M}$  Progesteron mit einem Maximum bei  $10^{-5}\text{M}$  nach 8 Tagen Inkubation auf. Eine Hemmung des Wachstums durch supraphysiologische Konzentrationen dagegen wurde bei Ishida erst bei  $3 \times 10^{-5}\text{M}$  Progesteron beobachtet. Vermutlich manifestiert sich erst nach ausreichender Versuchsdauer bzw. erst nach Induktion von Progesteronrezeptoren durch Estrogen die hemmende Wirkung auch einer zehnfach niedrigeren Progesteron-Konzentration ( $10^{-6}\text{M}$ ).

In früheren Versuchen konnte Scheven durch 24-48stündige Inkubation mit Progesteron  $10^{-12}\text{M}$ ,  $10^{-10}\text{M}$  und  $10^{-8}\text{M}$  eine Vervielfachung der Gesamtzellzahl beobachten, wobei das Maximum mit einer Vervielfachung um den Faktor 1.14 bei  $10^{-10}\text{M}$  lag [Scheven 1992, S.57]. Dieser Wert liegt über den jetzt gemessenen. Einen noch deutlicheren Effekt beschrieb Verhaar nach 24 Stunden Inkubation mit  $10^{-14}$ - $10^{-6}\text{M}$  Progesteron, mit einer maximalen Steigerung der Gesamtzellzahl um das 1.3fache bei  $10^{-10}\text{M}$  [Verhaar 1994, S.308-309]. Die von Scheven verwendeten Osteoblasten stammten von Patienten mit einem durchschnittlichen Alter von 70 Jahren, was deutlich über dem Alter der Spenderinnen der in den vorliegenden Experimenten verwendeten Zellen liegt. Dagegen gibt es Hinweise darauf, dass Kulturen von älteren Frauen (>55 Jahre) weniger Osteoblasten enthalten als Kulturen von jüngeren Frauen (<50 Jahre) [Katzburg 1999, S. 671]

Bei Verhaar handelte es sich um eine Progesteron-Behandlung ohne gleichzeitige oder vorausgehende Estrogen-Einwirkung. Auch die hier sehr lange Versuchsdauer, welche bei den anderen Arbeitsgruppen oft bei nur 24-48 Stunden lag, mag dazu

beitragen haben, dass sich die zunächst sichtbaren Unterschiede in der Proliferation später ausgeglichen haben. Dies wäre zu erklären durch die zunehmende Zelldichte, die ihrerseits wieder hemmend auf die Proliferation wirkt. Somit können sich der stimulierende Effekt durch die zugesetzten Hormone und der hemmende Effekt durch die zunehmende Zelldichte im zeitlichen Verlauf aufgehoben haben.

### **Differenzierung**

Der Differenzierungsmarker ALP wurde sowohl nach 14 als auch nach 28 Tagen bei  $10^{-6}$ M signifikant reduziert, bei  $10^{-7}$ M bis  $10^{-10}$ M dagegen signifikant erhöht gemessen. Das Maximum lag bei  $10^{-8}$ M und  $10^{-9}$ M, also im physiologischen Konzentrationsbereich der Lutealphase prämenopausaler Frauen. Sowohl die höhere, z.B. einer Schwangerschaft entsprechende Konzentration ( $10^{-7}$ M), als auch die geringere Konzentration ( $10^{-10}$ M), die für eine postmenopausale Frau physiologisch wäre, resultierten in (statisch nicht signifikant) geringeren ALP-Steigerungen. Dies lässt sich vereinbaren mit der Beobachtung, dass auf 4-24 Stunden Inkubation humaner Osteoblasten mit Progesteron  $10^{-10}$ M,  $10^{-9}$ M und  $10^{-8}$ M ein ebenfalls zeit- und dosisabhängiger Anstieg der knochenanabolen Faktoren TGF- $\beta_1$ , - $\beta_2$  und - $\beta_3$  mit einem Maximum nach 24 Stunden bei  $10^{-8}$ M folgt [Luo X-H 2002, S.330-332].

Die Verminderung der osteoblastären Differenzierung durch die supraphysiologische Konzentration von  $10^{-6}$ M lässt einen Bezug herstellen zu der Vermutung, Glucocorticoide und bestimmte Gestagene könnten um die Bindung am Cortisolrezeptor in Osteoblasten konkurrieren [Ishida 2002, S.603]. Bei hohen Konzentrationen kann demnach möglicherweise eine Bindung von Progesteron an Cortisolrezeptoren stattfinden und so eine corticosteroid-artige Wirkung auftreten, die wie langjährige Kortisontherapie zu verminderter Knochendichte führt, was für hochdosierte Gestagen-Depot-Präparate beobachtet wurde [Clark MK 2006, 1466-1474; Tang OS 1999, 25-29].

Schwangerschaft ist gelegentlich mit Osteoporose assoziiert, was zu Wirbelfrakturen und einem Verlust von einigen Zentimetern Größe führen kann [Hellmeyer 2003, 39-40]. Progesteron-Konzentrationen erreichen in der Schwangerschaft ein Maximum im dritten Trimester. Bisher wurden Progesteron-Spiegel in der Schwangerschaft nicht mit Knochendichteveränderungen in Verbindung gebracht. Ob ein dosisabhängiger stimulierender oder supprimierender Effekt von Progesteron allein oder in Kombination mit dem PTH-related protein, genetischen Rezeptor-Varianten oder anderen Faktoren in diesem Kontext eine Rolle spielen, ist bislang nicht bekannt.

Die Arbeitsgruppe um Scheven ermittelte nach einer Inkubationszeit von 24 bis 48 Stunden mit  $10^{-8}\text{M}$ ,  $10^{-10}\text{M}$  und  $10^{-12}\text{M}$  Progesteron ohne Estrogenbehandlung das Maximum in der Vervielfachung der Zahl ALP-produzierender Zellen bei  $10^{-10}\text{M}$  [Scheven 1992, S.57]. Es war also eine niedrigere Progesteronkonzentration notwendig, um den maximalen Effekt zu erreichen, welcher jedoch mit einer Steigerung um 14% deutlich unterhalb der in den vorliegenden Versuchen erzielten um 134% lag. Durch die Kombination aus längerer Inkubationszeit, simultaner Estradiolbehandlung und einer höheren Progesteronkonzentration ließ sich also eine Steigerung des Effekts erzielen. Durch die Induktion von mehr Progesteronrezeptoren durch Estradiol könnte eine Sättigung derselben erst bei einer höheren Progesteronkonzentration auftreten. Dieser These widerspricht, dass auch ohne Estradiol sehr ähnliche Ergebnisse gemessen wurden. Eine Induktion der Progesteronrezeptoren durch das zugebene Progesteron nach adäquater Inkubationsdauer mit ebenso späterer Sättigung und größerer Wirksamkeit erscheint unwahrscheinlich, da Liang keine Beeinflussung in der Expression der Progesteron-Rezeptoren A und B durch  $10^{-10}$ - $10^{-6}\text{M}$  Progesteron fand [Liang MM 2003, S.483]. Die in den vorliegenden Versuchen verwendeten Osteoblasten stammten von perimenopausalen Frauen. Eine Vor-Induktion von Progesteronrezeptoren durch präoperativ vorhandene Östrogenspiegel ist daher ebenfalls denkbar.

Verhaar beobachtete nach 24 Stunden Inkubation mit  $10^{-10}\text{M}$  Progesteron bei humanen Osteoblasten eine Steigerung der ALP-Expression um 20% [Verhaar 1994, S.310]. Dies liegt weit unter den hier nach 14 und 28 Tagen erzielten Werten mit einer Steigerung um 44% (14 Tage) und 80% (28 Tage) bei derselben Progesteronkonzentration. Hier zeigt sich eine Steigerung des Effekts mit der Zeit.

Bei den vorliegenden Versuchen wurde durch Progesteron ein größerer Effekt auf die Osteoblasten-Differenzierung mit dem Maximum bei einer höheren, physiologischen Progesteron-Konzentration ( $10^{-8}\text{M}$  und  $10^{-9}\text{M}$ ) beobachtet als in früheren Arbeiten. Da hier erstmals Langzeit-Versuche an primären humanen Osteoblasten durchgeführt wurden, die den physiologischen weiblichen Zyklus simulierten, dürften diese Ergebnisse näher an den realen Verhältnissen liegen.

## 4.2.2 Zyklizität von Estradiol und Progesteron

### Proliferation

Während nach 14tägiger Versuchsdauer eine geringfügig erhöhte Steigerung des Proliferationsmarkers durch alleinige Inkubation mit Progesteron in den Konzentrationen von  $10^{-7}M$  bis  $10^{-10}M$  gegenüber den Ansätzen mit Estradiolzusatz auftrat, war in den Versuchen mit 28 Tagen Versuchslaufzeit eine etwas größere Steigerung der Proliferation durch zusätzliche Estradiolbehandlung für alle Progesteronkonzentrationen zu beobachten. Die Unterschiede waren jedoch insgesamt nur minimal und erreichten keine statistische Signifikanz.

Derartige Ergebnisse waren zu erwarten, wenn man bedenkt, dass Estradiol v.a. im Sinne einer Inhibition der Apoptose, also einer Verlängerung der Lebenszeit von Osteoblasten [Manolagas 2000, S.20], zu einer Zunahme der Zellzahl führt. Betrachtet man des Weiteren die durchschnittliche Lebenszeit eines Osteoblasten von 3 Monaten [Manolagas 2000, S.15], so ist nach einer Lebenszeit der Knochenzellen bis zur Beendigung der Versuche von durchschnittlich 2,5 Monaten und einer max. Versuchsdauer von 28 Tagen noch nicht mit einer derartigen Wirkung des Estradiols in den Versuchen zu rechnen.

Slootweg et al. untersuchten das Zusammenwirken von Estrogen und Gestagenen in humanen Osteosarkomzellen sowie in Ratten-Osteoblasten. In ihren Versuchen konnten sie einen signifikanten Effekt auf Proliferation und Zellzahl nicht durch alleinige Zugabe von entweder  $17\text{-}\beta\text{-Estradiol}$  oder dem reinen Gestagen ORG 2058, wohl aber durch gleichzeitige Inkubation mit beiden Hormonen für 24 bis 48 Stunden feststellen [Slootweg 1992, S.R6-R7]. Trotz der kurzen Versuchsdauer und der Verwendung von Sarkomzellen und Ratten-Osteoblasten spricht dieses Ergebnis für eine mögliche anfängliche gegenseitige Beschleunigung des Estrogen- und Gestagen-Effekts. Nach einem angemessenen Zeitraum wie in den jetzt beschriebenen Versuchen tritt letzterer dann auch ohne Unterstützung durch Estradiol auf, da z.B. für Rezeptor-Induktion oder eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren ausreichend Zeit zur Verfügung stand.

Der Zusatz von Estradiol zu Progesteron (jeweils  $10^{-10}M$ ) hatte bei Verhaar [Verhaar 1994, S. 310] nach 24 Stunden ebenso wie in den vorliegenden Langzeit-Versuchen keine weitere Erhöhung der Proliferation humaner Osteoblasten gegenüber alleiniger Progesteron-Behandlung zur Folge.

### Differenzierung

Nach 14 Tagen Behandlung der Osteoblasten kam es bei Kombination von Estradiol und Progesteron zu einer größeren Steigerung des Differenzierungsmarkers ALP

verglichen mit alleiniger Progesteronbehandlung. Lediglich bei Verwendung der Progesteronkonzentration  $10^{-7}\text{M}$  wurde das Maximum ohne Estradiolzusatz beobachtet, bei  $10^{-8/-9}\text{M}$  Progesteron dagegen mit Estradiolzugabe. Nach 28 Tagen konnte insgesamt eine (statistisch nicht signifikant) größere Steigerung des exprimierten ALPs durch Progesteronbehandlung ohne zusätzliche Estradiol-Gabe erzielt werden. Das Maximum lag nach 28 Tagen bei Kombination der Hormone bei  $10^{-9}\text{M}$  Progesteron, unter alleiniger Inkubation mit Progesteron dagegen bei  $10^{-8}\text{M}$ . Es war also ohne Estradiol eine höhere Progesteronkonzentration notwendig, um maximale ALP-Werte zu erreichen. Bei Betrachtung der Standardabweichungen fällt jedoch eine größere Konstanz der Werte bei Behandlung der Zellen mit beiden Hormonen auf, während eine Behandlung nur mit Progesteron trotz der geringeren Anzahl an Werten zu einer zum Teil erheblichen Schwankungsbreite führte. Ausserdem wurden die Versuche ohne Estradiol nur zweifach für die 14 Tage dauernden Experimente und dreifach für die 28 Tage dauernden Experimente durchgeführt, während die Versuche mit Estradiol je vierfach ausgeführt wurden. Letztere Werte sind also robuster.

Nach 24-48 Stunden Versuchszeit konnte die Gruppe um Scheven durch  $10^{-10}\text{M}$  Progesteron und gleichzeitig Estradiol  $10^{-10}\text{M}$  weder eine Steigerung der gesamten ALP-Aktivität noch eine Zunahme der Anzahl ALP-positiver Zellen beobachten [Scheven 1992, S.57-58]. Auch Verhaar beschreibt nach 24stündiger Inkubation mit  $10^{-10}\text{M}$  Progesteron und zusätzlich Estradiol  $10^{-10}\text{M}$  keine signifikante Steigerung der ALP-Aktivität gegenüber ausschließlich Estradiol [Verhaar 1994, S.310]. Dies entspricht den hier erzielten Ergebnissen.

Pei et al. fanden bei Osteoprogenitorzellen von 1.5-6 Monate vorher ovariectomierten Ratten eine Abnahme der Progesteron- und Dexamethason-abhängigen Zellen und deren Bildung von Bone nodules und ALP-positiven Kolonien unter Inkubation mit Progesteron  $10^{-7}$ - $10^{-6}\text{M}$  oder Dexamethason  $10^{-9}$ - $10^{-7}\text{M}$ . Zusätzliche Gabe von Estrogen  $10^{-8}\text{M}$  führte bei den Progesteron-abhängigen Kolonien zu einer signifikanten Steigerung von Proliferation und Differenzierung, bei den Dexamethason-abhängigen dagegen zu einer signifikanten Verminderung [Pei W 2003, S.824-825]. Dies spricht, v.a. im Hinblick auf die Ergebnisse nach 28 Tagen, hier eher für das Vorliegen einer Dexamethason-abhängigen oder einer gemischten Kultur, da auch hier durch Estradiol keine Steigerung der ALP-Expression stattfand (s. Punkt 4.1.2).

Eine mögliche Erklärung für alle in den hier beschriebenen Versuchen gemachten Beobachtungen kann in einem Mechanismus gesucht werden, welcher durch Zugabe von Estradiol zunächst beschleunigt wird. Dies äussert sich vor allem in der

Erhöhung von ALP durch Estradiol zusammen mit Progesteron nach 24-48 Stunden in der Literatur, aber auch in der leicht verstärkten Erhöhung durch die Hormonkombination nach 14 Tagen. Spätestens nach 28 Tagen aber wird dieser Vorgang durch Estradiol eher gebremst, was sich in der etwas verstärkten Erhöhung der ALP-Werte ohne Estradiolzugabe zeigt. Dies lässt an einen sättigbaren Vorgang denken, wie z.B. die bereits mehrfach erwähnte Induktion von Progesteronrezeptoren. Allerdings wird diese nicht in allen Publikationen beschrieben. So fand Delaveyne-Bitbol keine Induktion von Progesteron-Rezeptoren bei von prä-, peri- und postmenarchalen Mädchen stammenden humanen Osteoblasten nach 3.5 Wochen Estradiol  $10^{-11}$ M- $10^{-8}$ M [Delaveyne-Bitbol 1999, S.379]. Möglicherweise bestand hier aber auch ein Zusammenhang mit der mehrwöchigen Verwendung von phenolrotfreiem Medium vor Beginn der Estrogen-Inkubation, die zu einem irreversiblen Verlust von Estrogen-Rezeptoren führen soll [Nasir 1997, S.441].

In Erwägung gezogen werden muss auch ein Zusammenhang mit Transkriptionsfaktoren, welche zunächst durch Estradiolzugabe verstärkt freigesetzt werden, deren Vorkommen danach jedoch erschöpft ist. Beispielsweise wurde in der Knochenmatrix von Ratten nach Ovariectomie und 7 Wochen andauernder, täglicher Injektion von supraphysiologischen Estradioldosen eine Steigerung des knochenanabol wirkenden IGF-I um 20% festgestellt [Erdmann J 1998, S.505-506]. Dieser Zusammenhang könnte auch in vitro bestehen, wurde in den hier vorgelegten Experimenten jedoch nicht untersucht.

Die Simulation des physiologischen Zyklus mit Zugabe von Progesteron und vorangehender sowie simultaner Estradioleinwirkung hatte in den vorliegenden Versuchen eine gesteigerte Differenzierung der Zellen gegenüber der hormon-naiven Kontrolle zur Folge. Somit belegen die Experimente die osteoanabole Wirkung von Progesteron in einem der Prämenopause entsprechenden hormonellen Milieu.

Wenn der anabole Effekt des Progesteron auf den Knochen, wie in den 28tägigen Versuchen, unabhängig ist von der antiresorptiven Wirkung des Estradiols, so könnte die An- oder Abwesenheit physiologischen Progesterons Einfluss nehmen auf den Grad des Knochenverlusts in Phasen erniedrigten Estrogens und erhöhten FSHs, für welches ein direkter Einfluss auf den Knochenverlust über FSH-Rezeptoren postuliert wurde [Sun L 2006, S.247-260].

In den Kontrollansätzen nur mit Estradiol  $10^{-10}$ M ohne Progesteron waren die Ergebnisse nicht signifikant unterschiedlich von den Kontrollen ohne Estradiol und Progesteron. Estrogenmangel gilt als wichtiger Faktor in der Entstehung der postmenopausalen Osteoporose, und auch in vitro wird Estradiol eine wichtige Rolle bei Proliferation und Differenzierung von Knochenzellen zugeschrieben. Dabei liegt

seine Bedeutung vor allem in der Resorptionshemmung und der Apoptosehemmung der Osteoblasten [Manolagas SC 2000, S.20]. Eine Vielzahl an Versuchen untersuchte bereits die genauen Wirkmechanismen von Estrogen auf verschiedene Knochenzellen und führte zu sehr heterogenen Ergebnissen, was u.a. auf die verschiedenen Zellarten, verschiedene Differenzierungsstadien von Osteoblasten oder unterschiedlichen Estrogen-Rezeptorstatus zurückgeführt wird [Rao LG 2000, S.174]. So konnte Katzburg keinen signifikanten Einfluss von Estradiol  $10^{-7/-8/-9}$ M auf die ALP-Expression humaner Osteoblasten feststellen [Katzburg 1999, S.669], Scheven dagegen beschreibt nach 24-48 Stunden Estradiol  $10^{-10}$ M ebenfalls bei humanen Osteoblasten eine Steigerung der ALP-Aktivität auf das 1.85fache [Scheven BAA 1992, S.58].

### **4.2.3 Versuchsdauer**

#### **Proliferation**

Sowohl nach 7 als auch nach 21 Tagen Inkubation der Zellen mit verschiedenen Progesteronkonzentrationen nach je 7tägiger Estradiolvorbehandlung konnten nur minimale Abweichungen in den Ergebnissen der Proliferationstests festgestellt werden. Einzig die Behandlung der Osteoblasten mit der höchsten Progesteronkonzentration von  $10^{-6}$ M ließ durchweg, unabhängig von der Versuchslaufzeit, eine Verminderung der Proliferationswerte erkennen, und zwar um 13% nach 14 Tagen bzw. um 11% nach 28 Tagen. In der Beeinflussung der Proliferation durch die Behandlung mit Progesteron in verschiedenen Konzentrationen sowie vor- und gleichzeitige Estradiolbehandlung war somit kein signifikanter Unterschied zwischen 14- und 28tägiger Versuchsdauer nachweisbar. Betrachtet man die direkt gemessenen Optischen Dichten im Versuch ohne Berechnung der relativen Proliferation, so sind diese tendenziell nach 28 Tagen höher als nach 14 Tagen. Die Werte der relativen Proliferation entsprechen bei zu Beginn der Experimente 800 Zellen je Kammer bei 28tägiger Versuchsdauer und 1000 Zellen je Kammer bei 14tägiger Versuchsdauer nicht ganz den zu erwartenden Verhältnissen ohne Hormonbehandlung. Bei einer angenommenen Verdopplungszeit von 7 Tagen ließen sich nach 28 Tagen bei einer Ausgangszellzahl von 800 Zellen pro Schale 6400 Zellen erwarten. Bei einer ebensolchen Verdopplungszeit, einer Versuchsdauer von 14 Tagen und einer Ausgangszellzahl von 1000 Zellen wäre am Ende des Versuchs mit 4000 Zellen pro Schale zu rechnen. Damit sollten auch die Messwerte im Proliferationstest nach 28 Tagen durchschnittlich 1.6fach so hoch sein wie nach 14 Tagen. Sie sind aber nur 1.15fach so hoch.

Hier ist davon auszugehen, dass in der Zeit zwischen 14 und 28 Tagen Versuchsdauer eine durch die Dichte der gewachsenen Zellen bedingte Plateauphase

erreicht wurde. Eine weitere Zunahme der Zellzahl wurde durch die Kontaktinhibition der Osteoblasten untereinander supprimiert.

Ein Vergleich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen lässt sich nicht anstellen, da Versuchsreihen von so langer Versuchsdauer hier erstmals durchgeführt wurden.

### **Differenzierung**

In beiden Versuchsreihen (14 und 28 Tage) war durch Progesteron  $10^{-7}$  bis  $10^{-10}$ M eine ALP-Erhöhung feststellbar. Dies war mit einer rund 2-2.5fachen Erhöhung jedoch weitaus deutlicher nach 28 Tagen als nach 14 Tagen mit einer nur rund 1.5fachen Erhöhung. Statistisch signifikant war dies bei  $10^{-9}$ M Progesteron ( $p=0.046$ ).

Eine Beeinflussung der Ergebnisse durch eine Veränderung der Zellzahl in der Kultur nach längerer Versuchszeit wurde bereits durch die Berücksichtigung des Proliferationsmarkers bei der Berechnung des relativen ALP-Gehalts ausgeschlossen. Es muss sich also um eine andere Einflussgröße handeln, welche zu dieser Verstärkung der Hormonwirkung geführt hat. Zugabe von Estradiol führte nach 28 Tagen zu einer verminderten Progesteronwirkung (siehe Punkt 3.4.3), so dass diese Verstärkung auch nicht allein in einer Induktion von Progesteron-Rezeptoren durch Estradiol begründet sein dürfte.

Die Verstärkung der Effekte nach längerer Versuchszeit führte zu einer Entzerrung der Werte, so dass nach 28 Tagen Hormonbehandlung die Wirkung deutlicher mit der Progesterondosis korrelierte.

Die maximalen ALP-Werte traten nach 28 Tagen Versuchsdauer bei Inkubation mit  $10^{-9}$ M Progesteron und damit in einem niedrigeren Konzentrationsbereich als nach 14 Tagen auf. Hier wurde das Maximum bei einer Konzentration von  $10^{-7}$ M und somit bei einer leicht supraphysiologischen Konzentration erreicht. Nach nur 14 Tagen Versuchslaufzeit war also eine höhere Progesteronkonzentration notwendig, um die maximale Differenzierung zu erreichen. Diese Beobachtung widerspricht den Ergebnissen anderer Autoren, welche nach wesentlich geringerer Versuchsdauer von nur 24-48 Stunden bei niedrigeren Gestagenkonzentrationen von  $10^{-12}$ M [Slootweg MC 1992, S.R6] bzw.  $10^{-10}$ M [Scheven BAA 1992, S.57-58] maximale ALP-Werte erreichten. Deren maximaler Effekt war jedoch deutlich geringer, und Scheven verzichtete auch auf eine simultane Estradiolbehandlung. Zur Möglichkeit eines hier eine Rolle spielenden sättigbaren Vorgangs siehe auch Punkt 0 - Differenzierung.

In der supraphysiologischen Konzentration  $10^{-6}$ M kam es zu einer Verminderung der Expression von Alkalischer Phosphatase auf 50% (nach 14 Tagen) bzw. 30% (nach 28 Tagen) gegenüber Kontrollen ohne Hormonzugabe. Die Differenz der ALP-

Expression durch diese hohen Progesteronkonzentration nach 14 und 28 Tagen war statistisch signifikant ( $p=0.034$ ).

Ishida fand 2002 Aktivität verschiedener Steroid-konvertierender Enzyme wie z.B.  $17\beta$ -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase (DSH) oder  $20\alpha$ -DSH in Zellkulturen von Ratten-Osteoblasten [Ishida Y 2002, S.237].  $20\alpha$ -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase katalysiert die Umwandlung von aktivem Progesteron in inaktives  $20\text{-OH}$ -Progesteron. Dabei fand die Gruppe um Ishida an Tag 5 der Kultivierung der Zellen 16fach höhere Aktivität als an Tag 13, d.h. geringere Aktivität bei höherem Differenzierungsgrad und damit höhere Konzentrationen an aktivem Progesteron bei zunehmender Differenzierung.

Es ist also denkbar, dass die Konzentration des metabolisch aktiven Progesterons auch in den hier beschriebenen Versuchen mit steigender Differenzierung der Zellen im Verlauf der Experimente zunahm. Vergleicht man die Ergebnisse nach 14 und nach 28 Tagen, so fallen nicht nur höhere Messwerte, sondern auch eine stärkere Konzentrationsabhängigkeit nach 28 Tagen auf. Dies könnte daran liegen, dass das in den ersten beiden Wochen der Experimente zugegebene Progesteron in allen Konzentrationen durch die  $20\alpha$ -HSD abgebaut wurde, so dass der Anteil an verfügbarem aktivem Progesteron letztlich weniger unterschiedlich war. Die höchste Progesteronkonzentration  $10^{-6}\text{M}$  überstieg dabei möglicherweise die Kapazität der  $20\alpha$ -HSD, so dass vergleichsweise viel Wirkung des aktiven Progesteron unvermindert blieb.

Auch hier ist ein direkter Vergleich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen nicht möglich, da deren Versuche keine vergleichbare Dauer aufwiesen.

#### **4.2.4 Einfluss der hormonellen Konzentration auf die Proteasen uPA- und PAI-1**

##### **uPA**

In beiden Versuchen zeigte sich nach 14 Tagen Versuchszeit eine kontinuierliche Steigerung von uPA durch zunehmende Progesteronkonzentrationen mit einem deutlichen Maximum bei  $10^{-6}\text{M}$ . Allerdings fiel beim Kontrollansatz ohne Hormonzugabe eine starke Abweichung zwischen den beiden Versuchen auf. Diese lässt sich am ehesten durch einen messtechnischen Fehler oder eine Verwechslung von Proben erklären, auch wenn ein solcher Fehler nicht erinnerlich ist und auch nicht mehr nachvollzogen werden kann. Beachtenswert ist jedoch die deutliche uPA-Erhöhung durch die supraphysiologische Progesteronkonzentration von  $10^{-6}\text{M}$ , der

Konzentration, bei welcher in den oben beschriebenen Versuchen zu Proliferation und Differenzierung durchweg eine Verringerung der Werte beobachtet wurde. Dies lässt sich mit der bereits mehrfach in der Literatur beschriebenen Verminderung der Knochenbildung durch uPA bzw. deren Erhöhung durch einen uPA-Mangel vereinbaren [Daci E 2003, S.1167-1176].

Nach 28 Tagen Versuchszeit zeigte sich besonders im zweiten Versuch eine ca. 3fach höhere Steigerung von uPA im Medium als in den 14tägigen Experimenten. Jedoch konnte in den beiden unter gleichen Voraussetzungen durchgeführten 28tägigen Experimenten keine eindeutige Korrelation zwischen uPA und Progesteron-Konzentration festgestellt werden. Lediglich die grundsätzliche Steigerung der uPA-Konzentration durch zusätzliche Behandlung mit Progesteron in verschiedenen Konzentrationen war in beiden Reihen erkennbar.

Nach Fukumoto kommt es durch 24 Stunden Inkubation mit Progesteron  $10^{-7}M$  oder  $17\beta$ -Estradiol  $10^{-7}M$  nicht zu einer Veränderung von uPA-Aktivität. Estradiol wurde in unseren Experimenten in der niedrigeren Dosis  $10^{-10}M$  verwendet, so dass ein direkter Vergleich unmöglich ist. Mit Progesteron  $10^{-7}M$  war das Ergebnis nach 14 Tagen um 19% erniedrigt gegenüber der Kontrolle, nach 28 Tagen lag hier das Maximum mit einer Steigerung um 75%. In Fukumotos Versuchen war die uPA-Aktivität im Überstand nach 24 Stunden Inkubation mit Dexamethason  $10^{-7}M$  bis  $10^{-10}M$  signifikant erniedrigt, uPA mRNA jedoch war davon unbeeinflusst [Fukumoto S 1992, S.797-803]. Da komplementär dazu PAI-1-Protein zunahm, ging er davon aus, dass Dexamethason über eine Steigerung der PAI-1-Expression zu einer verminderten Plasminogen-Aktivator-Aktivität führt. Da in unseren Versuchen Dexamethason  $10^{-9}M$  durchgehend in allen Ansätzen dem Medium zugesetzt war und das PAI-Protein, nicht jedoch die Aktivität gemessen wurde, ist eine Beeinflussung der vorliegenden Ergebnisse durch Dexamethason kaum denkbar.

### **PAI-1**

Die maximalen PAI-1-Konzentrationen wurden unter den höchsten Progesteron-Konzentrationen  $10^{-6}M$  und  $10^{-7}M$ , aber auch in den Kontrollen ohne Hormonzugabe gemessen, einer der vier Versuche ergab jedoch völlig gegenläufige Werte.

Die vor allem nach 28 Tagen z.T. erheblich höheren Messwerte in Versuch 5 lassen sich durch die biologische Schwankungsbreite in der Aktivität der zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgetauten Zellen mit erklären. Diese unterschiedliche Aktivität von

Bestandteilen derselben Zellpopulation, die sich nur durch den Zeitpunkt des Auftauens voneinander unterscheiden, ist ein bekanntes Problem im Umgang mit Osteoblasten-Zellkulturen. Es lässt sich möglicherweise durch z.B. nicht absolut konstante Temperaturen während des Auftauvorgangs erklären. Zudem ist jede Kultur ständig im Wandel, so kann sich beispielsweise der Anteil der verschiedenen Reifungsgrade der Osteoblasten verändern.

Bei Betrachtung von PAI-1 in Versuch 5 fallen sowohl nach 14 als auch nach 28 Tagen niedrigere Werte in jenen Ansätzen auf, die auch in den Differenzierungstests weniger ALP aufwiesen. Dabei handelt es sich um die Kontrollansätze ohne Estradiol und Progesteron sowie um den Ansatz mit  $10^{-6}$ M Progesteron. Dies entspricht der publizierten Ansicht, niedrigere Differenzierung gehe mit niedrigerer PAI-Aktivität einher [Pfeilschifter 1990, S. 701-711].

In einer früheren Publikation wurde PAI-1-Protein nicht durch Progesteron  $10^{-7}$ M oder  $17\beta$ -Estradiol  $10^{-7}$ M verändert [Fukumoto S 1992, S. 801]. In unseren Experimenten lag der Mittelwert aus Versuch 4 und 5 für PAI-1-Protein bei  $10^{-7}$ M Progesteron nach 14 und nach 28 Tagen am höchsten. Obwohl für Dexamethason  $10^{-7}$ M bis  $10^{-9}$ M eine signifikante Steigerung von PAI-1 beschrieben ist, dürfte auch für PAI-1 das verwendete Dexamethason keine Rolle gespielt haben, da es in allen Ansätzen in konstanter Konzentration verwendet wurde [Fukumoto S 1992, S. 799].

Vergleicht man für jeden Ansatz das Ergebnis für uPA und PAI-1 miteinander, so verlaufen diese überwiegend parallel zueinander (s. Abb. 21 bis Abb. 24 im Anhang). Dabei erscheint es nachvollziehbar, dass uPA und sein Inhibitor in gleichem Maße ansteigen und absinken, so dass es zu einer konstanten Wirkung der beiden Faktoren kommt. Dagegen zeigte sich in verschiedenen anderen Studien eine gegenläufige Entwicklung in der Konzentration von uPA und PAI-1 im Sinne eines feed-back-Mechanismus durch verschiedene Einflüsse wie z.B. IL-1 $\alpha$  [Fujisaki 2006, S.1975; Fukumoto S 1992, S.797-804; Pfeilschifter J 1990, S. 703-711].

Insgesamt liegen hier die Daten von zwei verschiedenen Versuchen mit jeweils einem Messwert vor, der durch Poolen des Mediums aus drei verschiedenen Ansätzen entstand. Die Datenbasis ist somit vorerst schmal, und da die vorliegenden Messungen inhomogen sind, verbietet sich derzeit eine abschließende Bewertung hinsichtlich der Proteasen.

### **4.3 Schlussfolgerungen und Ausblick**

Zusammenfassend lassen sich aus den gewonnenen Daten die folgenden Schlüsse ziehen:

Die Proliferation der Langzeit-Osteoblasten-Zellkultur war weitgehend unabhängig von eingesetzter Progesteronkonzentration, zusätzlicher Estradiolbehandlung und Versuchsdauer.

Die Differenzierung der Zellen ließ sich mit Progesteron in Konzentrationen von  $10^{-7}$ M bis  $10^{-10}$ M steigern (Maximum bei  $10^{-8}$  bis  $10^{-9}$ M, statistisch signifikant). Dabei war diese Steigerung nach 28 Tagen deutlicher als nach 14 Tagen Versuchsdauer. Simultane Estradiolzufuhr bewirkte nach 14 Tagen Inkubationszeit eine größere Steigerung der Expression des Differenzierungsmarkers ALP, nach 28 Tagen dagegen war die Differenzierung größer ohne Estradiol. Diese Daten belegen die osteoanabole Wirkung von Progesteron in einem hormonellen Milieu, das dem in der Prä- und Perimenopause entspricht.

Zusatz von  $10^{-6}$ M Progesteron (der höchsten, supraphysiologischen Dosis) führte in allen Experimenten, unabhängig von Versuchsdauer und zusätzlicher Estradiolgabe, zu einer Verminderung von sowohl Proliferation ( $p > 0.05$ , n.s.) als auch Differenzierung ( $p < 0.05$ ).

Neueste Ergebnisse haben einen direkten Einfluss von FSH auf die Osteoklastenbildung und -aktivierung gezeigt. Demnach soll FSH in der Regulation der Knochendichte eine mindestens ebenso große Rolle spielen wie Estrogen. Dessen Bedeutung in diesem Zusammenhang soll sogar gänzlich in Frage gestellt werden, da Knock out-Mäuse mit fehlendem FSH-Rezeptor auch bei erniedrigten Estrogen-Spiegeln keine signifikant verminderte Knochendichte aufwiesen [Sun L 2006, S.247]. Obwohl diese Erkenntnisse sich auf Osteoklasten beziehen und das Vorhandensein von FSH-Rezeptoren in Osteoblasten in derselben Arbeit widerlegt wurde [Sun L 2006, S.250], zeigen sie doch, dass in vitro Untersuchungen immer nur einen Ausschnitt der in vivo-Bedingungen nachahmen können. So werden in experimentellen Versuchsanordnungen nie alle Einflussgrößen berücksichtigt werden können, und es bleibt immer die Frage offen, ob unter physiologischen Bedingungen im Gesamtorganismus noch unbekannte und im Versuch nicht berücksichtigte Faktoren, wie im o.g. Fall übergeordnete Hormone, die Zusammenhänge weitreichend verändern.

Zudem konnte eine Arbeitsgruppe nun nachweisen, dass nicht nur wie bereits bekannt Adipozyten auf den Knochenstoffwechsel wirken, sondern umgekehrt im

Sinne eines feed-back-Mechanismus auch Osteoblasten via Osteocalcin-Expression Einfluss auf den Fettstoffwechsel nehmen [Lee 2007, S.456]. Dies betont noch weiter die Rolle des Knochens als Hormon-aktives Gewebe und führt auch zu der Frage, inwieweit nicht nur weibliche Steroidhormone wie z.B. in der vorliegenden Arbeit beschrieben den Knochen beeinflussen, sondern auch Osteoblasten über ein von ihnen produziertes Hormon auf das endokrine System der Frau wirken.

## **5 Zusammenfassung**

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals Langzeitversuche mit weiblichen Steroidhormonen an primären humanen Osteoblasten. Aufgrund der Beobachtung, dass bei Frauen in der Perimenopause mit noch normalen Östrogen-, aber bereits erniedrigten Progesteronspiegeln ein Knochendichte-Verlust stattfindet, stellte sich die Frage, inwieweit die Progesteronkonzentration und die physiologische Hormonzyklizität das Wachstum von Knochenzellen beeinflussen. Mit Langzeitversuchen an primären humanen Osteoblasten sollten die zugrunde liegenden Mechanismen charakterisiert werden.

Dazu wurden Osteoblasten aus der Spongiosa von Hüftköpfen dreier perimenopausaler Frauen gewonnen und kultiviert. Die gepoolten Zellen wurden 14 bzw. 28 Tage lang unter Zusatz einer konstanten Estradiol-Konzentration von 0.1 ng/ml kultiviert. Ab Tag 8 wurde Progesteron in Konzentrationen von  $10^{-6}$ M bis  $10^{-10}$ M zugegeben. Ein paralleler Ansatz erfolgte ohne Estradiolvorbereitung. Die Messung der Proliferation der Osteoblasten erfolgte mittels colorimetrischer Hexosaminidase-Bestimmung, die der Differenzierung anhand der intrazellulären Konzentration des Knochenaufbaumarkers alkalische Phosphatase. Ausserdem wurden uPA und PAI-1 im Überstand bestimmt.

Nach einwöchiger Estradiolvorbereitung führte bereits eine 7-tägige Progesteronbehandlung in physiologischen Konzentrationen ( $10^{-7}$ M,  $10^{-8}$ M,  $10^{-9}$ M) zu statistisch signifikant auf das 1.7fache erhöhten ALP-Werten, hingegen fand sich eine um 50% verminderte ALP-Messung bei der supraphysiologischen Progesteronkonzentration von  $10^{-6}$ M. Nach 28 Tagen Versuchsdauer (drei Wochen Progesteron) waren die ALP-Steigerungen noch deutlicher (bis zu 2.7fach). Die ALP-Konzentration nach Behandlung mit  $10^{-6}$ M Progesteron war mit einer Verringerung um 80% ebenfalls signifikant geringer, unter dieser höchsten Progesteronkonzentration war auch der Unterschied zwischen 14 und 28 Tagen Versuchsdauer statistisch signifikant. Simultane Estrogenzufuhr bewirkte nach 14 Tagen Inkubationszeit eine nicht signifikante Zunahme der Expression von ALP, nach 28 Tagen dagegen war die ALP-Steigerung ohne Estrogen geringfügig größer (n.s.).

Die Proteasen uPA- und PAI-1-Werten zeigten eine gleichsinnige Zunahme unter Progesteron. Eine klare Dosisabhängigkeit ließ sich nicht beweisen.

Aus den gewonnenen Daten lassen sich die folgenden Schlüsse ziehen:

1) Nach 28 Tagen, der Dauer eines physiologischen Zyklus entsprechend, zeigten sich Steigerungen in der Expression von ALP nach Estradiol- und Progesteronbehandlung mit einem Maximum bei einer Konzentration von  $10^{-9}\text{M}$ , welche der Progesteronkonzentration in ovulatorischen Lutealphasen entspricht. Dies belegt die osteoanbole Wirkung von Progesteron.

2) Supraphysiologische Gestagenkonzentrationen supprimieren den Knochenaufbaumarker ALP in vitro. Dies könnte die Beobachtung von verminderter Knochendichte nach langjähriger prämenopausaler Depotgestagen-Behandlung erklären.

## **Literaturverzeichnis**

### **Zeitschriftenartikel:**

1. Ankrom MA, Pattersen JA, d'Avis PA, Vetter UK, Blackman MR, Sponsellers PD, Tayback M, Robey PG, Shapiro JR, Fedarko NS. Age-related changes in human oestrogen receptor  $\alpha$  function and levels in osteoblasts. *Biochem J* 333(1998) 787-794
2. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN. Physiological concentrations of glucocorticoids stimulate formation of bone nodules from isolated rat calvaria cells in vitro. *Endocrinology* 121(1987): 1985-92
3. Bellows CG, Heersche JN, Aubin JE. Determination of the capacity for proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in the presence and absence of dexamethasone. *Dev Biol* 140 (1990) 132-8
4. Bowman BM, Miller SC. Elevated progesterone during pseudopregnancy may prevent bone loss associated with low estrogen. *J Bone Miner Res* 11(1996) 15-21.
5. Chiu KM, Ju J, Mayes D, Bacchetti P, Weitz S, Arnaud CD. Changes in bone resorption during the menstrual cycle. *J Bone Miner Res* 14(1999) 609-615
6. Clark MK, Sowers MF, Levy B, Nichols S. Bone mineral density loss and recovery during 48 months in first-time users of depot medroxyprogesterone acetate. *Fertility and Sterility* 86 (2006) 1466-1474
7. Coelho MJ, Fernandes MH: Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials* 21(2000) 1095-1102
8. Daci E, Everts V, Torrekens S, Van Herck E, Tigchelaar-Gutter W, Bouillon R, Carmeliet G: Increased bone formation in mice lacking plasminogen activators. *JBMR* 18(2003) 1167-1176
9. Delavayne-Bitbol R, Garabedian M. In vitro responses to  $17\beta$ -estradiol throughout pubertal maturation in female human bone cells. *Journal of bone and mineral research* 14 (1999) 376-385
10. Diehl P, Schmitt M, Schauwecker J, Eichelberg K, Gollwitzer H, Gradinger R, Goebel M, Preissner KT, Mittelmeier W, Magdolen U: Effect of high hydrostatic pressure on biological properties of extracellular bone matrix proteins. *International Journal of Molecular Medicine* 16(2005): 285-289

11. Erdmann J, Storch S, Pfeilschifter J, Ochlich P, Ziegler R, Bauss F. Effects of estrogen on the concentration of insulin-like growth factor-I in rat bone matrix. *Bone* 22 (1998) 503-507
12. Ernst M, Schmid C, Froesch ER: Phenol red mimics biological actions of estradiol: enhancement of osteoblast proliferation in vitro and of type I collagen gene expression in bone and uterus of rats in vivo. *J Steroid Biochem* 33 (1989) 907-914
13. Fujisaki K, Tanabe N, Suzuki N, Mitsui N, Oka H, Ito K, Maeno M. The Effect of IL-1 $\alpha$  on the expression of MMP, PA and their inhibitors in osteoblastic ROS 17/2.8 cells. *Life Sciences* 78 (2006) 1975-1982
14. Fukumoto S, Allan EH, Zeheb R, Gelehrter TD, Martin TJ. Glucocorticoid regulation of plasminogen activator inhibitor-1 messenger ribonucleic acid and protein in normal and malignant rat osteoblasts. *Endocrinology* 130 (1992) 797-804
15. Futamura Y. Effects of medroxyprogesterone acetate and  $\beta$ -estradiol on interleukin-6 production from osteoblasts and bone marrow macrophages of wistar rats of different ages. *The Journal of Toxicological Sciences* 20 (1995) 155-160
16. Grosse B, Kachkache M, Le Mellay V, Lieberherr M. Membrane signalling and progesterone in female and male osteoblasts. Involvement of intracellular Ca<sup>2+</sup>, inositol triphosphate and diacylglycerol, but not cAMP. *J Cell Biochem.* 79(2000) 334-45
17. Hellmeyer L, Hadji P, Ziller V, Wagner U, Schmidt S. Osteoporose in der Schwangerschaft. *Geburtshilfe Frauenheilkunde* 64 (2004) 38-45
18. Hessle L, Johnson KA, Anderson HC, Narlsawa S, Sali A, Goding JW, Terkeltaub R, Milan JL: Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralisation. *PNAS* 99(2002): 9445
19. Ishida Y, Tertinegg I, Heersche JNM. Progesterone and dexamethasone stimulate proliferation and differentiation of osteoprogenitors and progenitors for adipocytes and macrophages in cell populations derived from adult rat vertebrae. *Journal of bone and mineral research* 11 (1996) 921-930
20. Ishida Y, Heersche JNM. Progesterone stimulates proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in bone cell populations derived from adult female but not from adult male rats. *Bone* 20 (1997) 17-25

21. Ishida Y, Heersche JNM. Progesterone- and dexamethasone-dependent osteoprogenitors in bone cell populations derived from rat vertebrae are different and distinct. *Endocrinology* 140 (1999) 3210-3218
22. Ishida Y, Killinger DW, Khal MW, Yang K, Strutt B, Heersche JNM: Expression of steroid converting enzymes in osteoblasts derived from rat vertebrae. *Osteoporosis Int* 13 (2002) 235-40
23. Ishida Y, Heersche JNM: Pharmacologic doses of medroxyprogesterone may cause bone loss through glucocorticoid activity: An hypothesis. *Osteoporosis Int* 13 (2002) 601-605
24. Jones JV, Mansour M, James H, Sadi D, Carr RI: A substrate amplification system for enzyme-linked immunoassays II. Demonstration of its applicability for measuring anti-DNA antibodies. *Journal of Immunological Methods*, 118(1989)79-84
25. Kaplan Seidenfeld ME, Rickert VI: Impact of anorexia, bulimia and obesity on the gynaecologic health of adolescents. *American Family Physician* 34(2001) 445-50
26. Katzburg S, Lieberherr M, Ornoy A, Klein BY, Hendel D, Somjen D: Isolation and hormonal responsiveness of primary cultures of human bone-derived cells: Gender and age differences. *Bone* 25(1999) 667-673
27. Landegren U: Measurements of cell numbers by the means of the endogenous enzyme hexosaminidase. *J Immun Methods* 67(1984):379-88
28. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130 (2007) 456-469
29. Le Mellay V, Lieberherr M. Membrane signaling and progesterone in female and male osteoblasts. II. Direct involvement of G alpha q/11 coupled to PLC-beta 1 and PLC-beta 3. *J Cell Biochem* 79 (2000) 173-81
30. Leung KS, Fung KP, Sher AHL, Li CK, Lee KM. Plasma bone specific alkaline phosphatase as an indicator of osteoblastic activity. *J Bone Joint Surg.* 75-B (1993) 288-92
31. Liao EY, Luo XH, Su X. Comparison of the effects of 17 $\beta$ -E2 and progesterone on the expression of osteoprotegerin in normal human osteoblast-like cells. *J Endocrinol Invest* 25 (2002) 785-790
32. Liang M, Liao EY, Xu X, Luo XH, Xiao XH. Effects of progesterone and 18-methyl levonorgestrel on osteoblastic cells. *Endocr Res* 29 (2003) 483-501

33. Liu K, Feng Q, Gao H-J, Hu Z-Y, Zou R-J, Li Y-C, Liu Y-X. Expression and regulation of plasminogen activators, plasminogen activator inhibitor type-1, and steroidogenic acute regulatory protein in the rhesus monkey corpus luteum. *Endocrinology* 144 (2003) 3611-3617
34. Luo X-H, Liao E-Y, Su X. Progesterone upregulates TGF- $\beta$  isoforms ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  and  $\beta_3$ ) expression in normal human osteoblast-like cells. *Calcif. Tissue Int.* 71(2002) 329-334
35. Manolagas SC: Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Reviews*; 21(2000) 115-137
36. Miller PD, Baran TD, Bilezikian JP, Greenspan SL, Lindsay R, Riggs BL, Watts NB. Practical clinical application of biochemical markers of bone turnover: Consensus of an expert panel. *J Clin Densitom* 2 (1999) 323-342
37. Nasir J, Speirs V. Letter to the editor. Rapid and irreversible loss of estrogen receptor in human osteoblast-like cells following culture in phenol red-free medium. *In vitro cell devel biol-animal* 33 (1997) 240-242
38. Naylor PH, Gilani SS, Milholland RJ, Ip M, Rosen F. In vivo antiglucocorticoids: comparison between in vivo activity and in vitro competition of progestins for the glucocorticoid receptor. *Journal of steroid biochemistry* 14 (1981) 13030-1309
39. Pandipati, Driscoll, Franceschi. Glucocorticoid Stimulation of Na<sup>+</sup>-Dependent Ascorbic Acid Transport in Osteoblast-Like Cells. *Journal of Cellular Physiology* 176(1998) 85-91
40. Pei W, Bellows CG, Elsubeihi ES, Heersche JNM. Effect of ovariectomy on dexamethasone- and progesterone-dependent osteoprogenitors in vertebral and femoral rat bone cell populations. *Bone* 33 (2003):822-830
41. Pfeilschifter J, Erdmann J, Schmidt W, Naumann A, Minne HW, Ziegler R. Differential regulation of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor by osteotropic factors in primary cultures of mature osteoblasts and osteoblast precursors. *Endocrinology* 126 (1990) 703-711
42. Prior JC: Perimenopause: the complex endocrinology of the menopausal transition. *Endocrine Reviews* 19(1998) 397-428
43. Prior JC, Vigna YM, Barr SI, Rexworthy C, Lentle BC: Cyclic medroxyprogesterone treatment increases bone density: a controlled trial in active women with menstrual cycle disturbances. *American Journal of Medicine*; 96(1994) 521-530

44. Rickard JD, Sullivan TA, Shenker BJ, Leboy PS, Kazhdan. Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol.* 161 (1994 ) 218-28
45. Rickard JD, Waters KM, Ruesink TJ, Khosla S, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Riggs BL, Spelsberg TC. Estrogen receptor isoform-specific induction of progesterone receptors in osteoblasts. *JBMR* 17 (2002): 580-91
46. Rosenbrock H, Seifert-Klauss V, Kaspar S, Busch R, Luppä PB: Changes of biochemical markers during the menopausal transition. *Clin Chem Lab Med* 40 (2002) 143-151
47. Scheven BAA, Damen CA, Hamilton NJ, Verhaar HJJ, Duursma SA: Stimulatory effects of estrogen and progesterone on proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 186 (1992) 54-60
48. Seifert-Klauss V, Mueller JE, Luppä P, Probst R, Wilker J, Hoess C, Treumann T, Kastner C, Ulm K. Bone metabolism during the menopausal transition: a prospective study. *Maturitas* 41 (2002) 23-33
49. Seifert-Klauss V, Laakmann J, Rattenhuber J, Höß C, Luppä P, Kiechle M. Knochenstoffwechsel, Knochendichte und Östrogenspiegel in der Perimenopause: eine prospektive 2-Jahres-Untersuchung. *Zentralbl Gynäkol* 127 (2005) 132-139
50. Shibata H, Yagi T: Rate assay of N-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidase with 4-nitrophenyl N-acetyl-  $\beta$ -D-glucosaminide as an artificial substrate. *Clinica Chimica Acta* 251 (1996) 53-64
51. Slotweg MC, Ederveen AGH, Schot LPC, Schoonen WGEJ, Kloosterboer HJ: Oestrogen and progestogen synergistically stimulate human and rat osteoblast proliferation. *Journal of Endocrinology* 133 (1992) R5-8
52. Sun L, Peng Y, Sharrow AC, Iqbal J, Zhang Z, Papachristou DJ, Zaidi S, Zhu L-L, Yaroslavskij BB, Zhou H, Zallone A, Sairam MR, Kumar TR, Bo W, Braun J, Cardoso-Landa L, Schaffler MB, Moonga BS, Blair HC, Zaidi M: FSH directly regulates bone mass. *Cell* 125 (2006) 247-26
53. Tang OS, Tang G, Yip P, Li B, Fan S: Long-term depot-medroxyprogesterone acetate and bone mineral density. *Contraception.* 59 (1999):25-9.
54. Tenenbaum HC, Kamalia N, Sukhu B, Limebachk H, McCulloch CAG. Probing glucocorticoid-dependent osteogenesis in rat and chick cells in

- vitro by specific blockade of osteoblastic differentiation with progesterone and RU38486. *The Anatomical Record* 242 (1995) 200-210
55. Tremollieres F, Pouilles JM, Ribot C. Effect of long-term administration of progestogen on postmenopausal bone loss: result of a two-year, controlled randomized study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 38 (1993) 627-31
56. Verhaar HJ, Damen CA, Duursma SA, Scheven BA: Comparison of the action of 17- $\beta$ -estradiol and progestins with insulin-like growth factor -I/-II and transforming growth factor-beta 1 on the growth of normal adult human bone-forming cells. *Maturitas* 21(1995) 237-43
57. Verhaar HJJ, Damen CA, Duursma SA, Scheven BAA. A comparison of the action of progestins and estrogen on the growth and differentiation of normal adult human osteoblast-like cells in vitro. *Bone* 15 (1994) 307-311
58. Viereck V, Gründker C, Blaschke S, Niederkleine B, Siggelkow H, Frosch K-H, Raddatz D, Emons G, Hofbauer LC. Raloxifene concurrently stimulates osteoprotegerin and inhibits interleukin-6-production by human trabecular osteoblasts. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88 (2003) 4206-4213
59. Welshons WV, Wolf MF, Murphy CS, Jordan VC. Estrogenic activity of phenol red. *Mol Cell Endocrinol* 57(1988)169-78
60. Yee JA, Yan L, Dominguez JC, Allan EH, Martin TJ: Plasminogen-dependent activation of latent transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ) by growing cultures of osteoblast-like cells. *J Cell Physiol* 157(1993) 528-534
61. Zittermann A, Schwarz I, Scheld K, et al.: Physiologic fluctuations of serum estradiol levels influence biochemical markers of bone resorption in young women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85(2000): 95-101

**Buchbeitrag:**

Lindl, Toni: Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. 5., überarbeitete und erweiterte Auflage. Spektrum, Akademischer Verlag; Heidelberg, Berlin, 2002

## **Abbildungsverzeichnis**

ABB. 1: 96 WELL ZELLKULTURPLATTE.....	17
ABB. 2: VIER IN JE VIER KAMMERN UNTERTEILTE OBJEKTTRÄGER, SOG. CHAMBER SLIDES.....	17
ABB. 3: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DES VERSUCHSAUFBAUS MIT 14 UND 28 TAGEN VERSUCHSDAUER, MIT UND OHNE ESTRADIOL .....	22
ABB. 4: OSTEOLASTEN-ZELLKULTUR VOR BEGINN DER VERSUCHE, GEFÄRBT MIT NBT/BCIP. ..	27
ABB. 5: KULTUR MIT CALCIFIZIERENDEN ANTEILEN NACH ALIZARINROT-FÄRBUNG.....	28
ABB. 6: ALP IN SITU GEFÄRBTE KULTUREN.....	30
ABB. 7: PROLIFERATION NACH 14- BZW. 28TÄGIGER INKUBATION MIT ESTRADIOL UND 7- BZW. 21TÄGIGER EINWIRKUNG VON PROGESTERON GEGENÜBER NICHT MIT HORMONEN BEHANDELTEN KONTROLLE (A) .....	33
ABB. 8: PROLIFERATION NACH 7 BZW. 21 TAGEN PROGESTERON OHNE VORHERIGE ESTRADIOLBEHANDLUNG GEGENÜBER NICHT HORMONELL BEHANDELTEN KONTROLLE (A) ..	35
ABB. 9: ALP RELATIV NACH 28TÄGIGER INKUBATION MIT ESTRADIOL UND 21 TAGEN PROGESTERON GEGENÜBER NICHT MIT HORMONEN BEHANDELTEN KONTROLLE (A) .....	37
ABB. 10: ALP RELATIV NACH 14 BZW. 28 TAGEN ESTRADIOL UND 7 BZW. 21 TAGEN PROGESTERON GEGENÜBER NICHT MIT HORMONEN BEHANDELTEN ZELLEN (A) UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER ZELLDICHTE .....	38
ABB. 11: ALP RELATIV NACH 7/21TÄGIGER INKUBATION MIT PROGESTERON GEGENÜBER NICHT MIT HORMONEN BEHANDELTEN ZELLEN (A).....	40
ABB. 12: ALP RELATIV NACH 7 BZW. 21 TAGEN PROGESTERON GEGENÜBER NICHT MIT HORMONEN BEHANDELTEN ZELLEN (A) UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER ZELLDICHTE .....	41
ABB. 13: ALP RELATIV NACH 7 TAGEN PROGESTERON MIT UND OHNE ESTRADIOL GEGENÜBER NICHT MIT HORMONEN BEHANDELTEN KONTROLLE (A) UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER ZELLDICHTE .....	43
ABB. 14: ALP RELATIV NACH 21 TAGEN PROGESTERON MIT UND OHNE ESTRADIOL GEGENÜBER NICHT HORMONELL BEHANDELTEN KONTROLLE (A) UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER ZELLDICHTE .....	44
ABB. 15: UPA IM ÜBERSTAND NACH 14 TAGEN INKUBATION MIT ESTRADIOL UND 7 TAGEN PROGESTERON .....	46
ABB. 16: UPA IM ÜBERSTAND NACH 28 TAGEN ESTRADIOL UND 21 TAGEN PROGESTERON .....	47
ABB. 17: PAI-1 IM ÜBERSTAND NACH 14 TAGEN INKUBATION MIT ESTRADIOL UND 7 TAGEN PROGESTERON .....	48
ABB. 18: PAI-1 IM ÜBERSTAND NACH 28 TAGEN INKUBATION MIT ESTRADIOL UND 21 TAGEN PROGESTERON .....	49
ABB. 19: UPA UND PAI-1 IM ÜBERSTAND, RATIO UPA/PAI-1 NACH 14 TAGEN.....	51

ABB. 20: UPA UND PAI-1 IM ÜBERSTAND, RATIO UPA/PAI-1 NACH 28 TAGEN.....	51
ABB. 21: UPA UND PAI-1 IM ÜBERSTAND, VERSUCH 4A.....	90
ABB. 22: UPA UND PAI-1 IM ÜBERSTAND, VERSUCH 5A.....	90
ABB. 23: UPA UND PAI-1 IM ÜBERSTAND, VERSUCH 4B.....	91
ABB. 24: UPA UND PAI-1 IM ÜBERSTAND, VERSUCH 5B.....	91

## **Tabellenverzeichnis**

TAB. 1: VERWENDETE PROGESTERONKONZENTRATIONEN IN MOLAR UND G/L SOWIE DEREN PHYSIOLOGISCHES VORKOMMEN .....	15
TAB. 2: ÜBERSICHT DER EINZELVERSUCHE (EINSCHLIEßLICH VORVERSUCHE), FETT: HAUPTVERSUCHE, KURSIV: VERÄNDERUNG GEGENÜBER VORHERIGEM ANSATZ.....	18
TAB. 3: ÜBERSICHT DER EINZELVERSUCHE (EINSCHLIEßLICH VORVERSUCHE) OHNE ESTRADIOL; FETT: HAUPTVERSUCHE, KURSIV: VERÄNDERUNG GEGENÜBER VORHERIGEM ANSATZ .....	19
TAB. 4: ZELLZAHL JE GESICHTSFELD NACH 14-(VERSUCH 4A UND 5A) BZW. 28-(VERSUCH 4B UND 5B) TÄGIGER INKUBATION MIT ESTRADIOL UND 7 (VERSUCH 4A UND 5A) BZW. 21 (VERSUCH 4A UND 5A) TAGEN PROGESTERON .....	31
TAB. 5: ZELLZAHL RELATIV JE GESICHTSFELD NACH 14 (VERSUCH 4A UND 5A) BZW. 28 (VERSUCH 4B UND 5B) TAGEN ESTRADIOL UND 7 (VERSUCH 4A UND 5A) BZW. 21 (VERSUCH 4A UND 5A) TAGEN PROGESTERON .....	32
TAB. 6: ALP IM ÜBERSTAND NACH 28 TAGEN INKUBATION MIT HORMONEN .....	45
TAB. 7: BISHERIGE PUBLIKATIONEN ZUM THEMA .....	83
TAB. 8: ALP NACH 14- BZW. 28TÄGIGER INKUBATION VON ESTRADIOL UND 7- BZW. 21TÄGIGER INKUBATION VON PROGESTERON, DARGESTELLT IN FORM DER PHOTOMETRISCH GEMESSENEN OPTISCHEN DICHTENACH FÄRBUNG MIT DEM PNPP ASSAY .....	85
TAB. 9: ALP NACH 7- BZW. 21TÄGIGER INKUBATION MIT PROGESTERON, DARGESTELLT IN FORM DER PHOTOMETRISCH GEMESSENEN OPTISCHEN DICHTENACH FÄRBUNG MIT DEM PNPP ASSAY .....	86
TAB. 10: PROLIFERATION NACH 14- BZW. 28TÄGIGER INKUBATION MIT ESTRADIOL UND 7 BZW. 21 TAGEN PROGESTERON, PHOTOMETRISCH GEMESSENE OPTISCHE DICHTENACH FÄRBUNG MIT DEM HEXOSAMINIDASE-ASSAY .....	88
TAB. 11: PROLIFERATION NACH 7- ODER 21-TÄGIGER INKUBATION MIT PROGESTERON, PHOTOMETRISCH GEMESSENE OPTISCHE DICHTENACH FÄRBUNG MIT DEM HEXOSAMINIDASE-ASSAY .....	89

**Anhang**

Autor, Jahr	Zellen, Abstammung	Inkubation mit Hormonen, Dosis	Inkubation mit Hormonen,	gemessene Parameter	Ergebnisse max. Effekt bei, x-fach Kontrolle
Viereck V et al., 2003	humane Osteoblasten 5 Personen 36,4+-7,1J.	Raloxifen: $10^{-10}$ - $10^{-6}$ M	72 Std.	OPG ALP	$10^{-7}$ M 2.9x $10^{-7}$ M 2.2x
Di Jiang et al., 2003	Maus-Präosteoblasten u. -Knochenmarkzellen	PTH: $10^{-13}$ - $10^{-7}$ M	6 Std.	Osteocalcin mRNA	$10^{-10}$ - $10^{-8}$ M ca.3.00x
Pei W et al, 2003	Ratten-Osteoprogenitorzellen nach Ovariectomie	Prog.: $10^{-5/6/7/8}$ M Dex: $10^{-7/8/9}$ M E <sub>2</sub> : $10^{-8}$ M	19-22 Tage	Bone nodules %AP+ Kolonien	Dex $10^{-8}$ M: 280 Prog. $10^{-9}$ M: 90 Prog. $10^{-5}$ M+E <sub>2</sub> $10^{-8}$ M: 100 Dex $10^{-8}$ M: 1.7x Prog. $3 \times 10^{-6}$ M 1.6x
Ishida Y et al, 1997	Ratten-Osteoprogenitorzellen von männlichen und weiblichen	Prog.: $10^{-5/6/7/8}$ M E <sub>2</sub> : $10^{-7/8/9}$ M	8-10 Tage	Bone nodules/Dish	♂: kein Effekt ♀: $10^{-190}$ (P $10^{-5}$ M) 240 (P $10^{-5}$ M+ E <sub>2</sub> $10^{-8}$ M)
Ishida Y et al, 1996	Ratten-Osteoprogenitorzellen	Prog.: $10^{-5/6/7/8/9}$ M	20 Tage	Bone nodules	$30 \times 130 \times (10^{-5})$ $30 \times 130 \times (10^{-5})$
Scheven, B.A.A. et al., 1992	humane Osteoblasten Pool	Prog. $10^{-12}$ , $10^{-10}$ , $10^{-8}$ M E <sub>2</sub> : $10^{-12}$ , $10^{-10}$ , $10^{-8}$ M Prog+E <sub>2</sub> (je $10^{-10}$ )	24-48 Std.	Gesamtzellzahl  DNA-Synthese  Zahl ALP-pos. Zellen  ALP-Aktivität	$10^{-10}$ M 1.14x $10^{-10}$ M 1.08x Prog +E <sub>2</sub> $10^{-10}$ M: 1.45x  $10^{-10}$ M 1.30x $10^{-10}$ M 1.50x $10^{-10}$ 1.95x

Autor, Jahr	Zellen, Abstammung	Inkubation mit Hormonen, Dosis	Inkubation mit Hormonen, Dauer	gemessene Parameter	Ergebnisse max. Effekt bei, x-fach Kontrolle
<b>Sloutweg MC et al, 1992</b>	Humane Osteosarkomzellen und Ratten-Osteoblasten	E2: $10^{-8}M$ , $10^{-10}M$ , $10^{-12}M$ , $10^{-14}M$ Org 2058 (reines Gestagen): $10^{-8}M$ , $10^{-10}M$ , $10^{-12}M$ , $10^{-14}M$ ; einzel und komb.	24 (ROB) bzw. 48 Std. (SaOS-2)	$^3H$ TdR Inkorporation (Proliferation)  Gesamtzellzahl	E <sub>2</sub> $10^{-14}M$ + Org 2058 $10^{-12}M$ : 1.44x (SaOS) E <sub>2</sub> $10^{-12}M$ +Org 2058 $10^{-6}M$ : 1.37x(ROB) E <sub>2</sub> $10^{-14}M$ + Org $10^{-12}M$ : 1.4x (SaOS)
<b>Erdmann J et al., 1999</b>	Knochenmatrix weibliche Ratten, nach Ovx/Pfacebo-Op	E2: 5, 15, 50, 150 nmol/kg/Tag (in vivo, subkutan)	täglich, 7 Wochen lang	IGF-I	50nmol/kg 1.2x
<b>Katzburg, J. et al., 1999</b>	humane Osteoblasten Patientengruppen: Frauen <50J und >55J	Prog. $10^{-14}$ - $10^{-6}M$ E2: $10^{-10}M$  Prog. $10^{-10}M$ E2: $10^{-10}M$	nicht ersichtlich  48 Std.	ALP  Osteocalcin	jeweils kein signifikanter Effekt  ca. 5.00x
<b>Verhaar, H.J.J. et al., 1994</b>	humane Osteoblasten Patienten durchschnittl. 70 Jahre Poolbildung n= 3-5	humane Osteoblasten Patienten durchschnittl. 70 Jahre Poolbildung n= 3-5	24 Std.	Gesamtzellzahl  ALP	$10^{-10}M$ $10^{-10}M$ 1.08x  $10^{-10}M$ : 1.20x $10^{-9}M$ : 1.40x

Tab. 7: Bisherige Publikationen zum Thema

TUAnhang

	E2[ng/ml]	0	0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	blank
<b>Versuchsdauer /Nr.</b>	<b>P[M]</b>	<b>0</b>	<b>0, Eth.</b>	<b>0</b>	<b>10<sup>-10</sup></b>	<b>10<sup>-9</sup></b>	<b>10<sup>-8</sup></b>	<b>10<sup>-7</sup></b>	<b>10<sup>-6</sup></b>	
14 Tage/4a I	<b>Mittelwert</b>	<b>4,17</b>	<b>-</b>	<b>4,42</b>	<b>4,55</b>	<b>4,48</b>	<b>4,30</b>	<b>-</b>	<b>3,77</b>	<b>0,07</b>
	SD	0,20	-	0,30	0,37	0,22	0,22	-	0,44	0,00
	MW-blank	4,10	-	4,35	4,48	4,41	4,23	-	3,70	-
	<b>ALP relativ</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>1,06</b>	<b>1,08</b>	<b>1,08</b>	<b>1,03</b>	<b>-</b>	<b>0,9</b>	<b>-</b>
14 Tage/4a II	<b>Mittelwert</b>	<b>4,27</b>	<b>-</b>	<b>3,89</b>	<b>4,07</b>	<b>4,00</b>	<b>3,80</b>	<b>-</b>	<b>2,53</b>	<b>0,07</b>
	SD	0,11	-	0,13	0,20	0,15	0,25	-	0,45	0,00
	MW-blank	4,2	-	3,82	4,00	3,93	3,73	-	2,46	-
	<b>ALP relativ</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>0,91</b>	<b>0,95</b>	<b>0,94</b>	<b>0,89</b>	<b>-</b>	<b>0,58</b>	<b>-</b>
14 Tage/5a I	<b>Mittelwert</b>	<b>3,83</b>	<b>4,13</b>	<b>4,03</b>	<b>4,01</b>	<b>4,07</b>	<b>4,14</b>	<b>4,44</b>	<b>4,05</b>	<b>0,09</b>
	SD	0,41	0,151	0,30	0,28	0,05	0,24	0,10	0,21	0,00
	MW-blank	3,74	4,04	3,94	4,01	3,98	4,06	4,35	3,96	-
	<b>ALP relativ</b>	<b>1</b>	<b>1,08</b>	<b>1,05</b>	<b>1,07</b>	<b>1,06</b>	<b>1,08</b>	<b>1,16</b>	<b>1,06</b>	<b>-</b>
14 Tage/5a II	<b>Mittelwert</b>	<b>4,11</b>	<b>4,26</b>	<b>4,04</b>	<b>4,14</b>	<b>3,86</b>	<b>4,10</b>	<b>4,30</b>	<b>3,82</b>	<b>0,09</b>
	SD	0,09	0,17	0,19	0,26	0,18	0,19	0,30	0,21	0,00
	MW-blank	4,02	4,17	3,95	4,05	3,77	4,01	4,21	3,73	-
	<b>ALP relativ</b>	<b>1</b>	<b>1,04</b>	<b>0,98</b>	<b>1,01</b>	<b>0,94</b>	<b>1</b>	<b>1,05</b>	<b>0,93</b>	<b>-</b>
28 Tage/4b I	<b>Mittelwert</b>	<b>4,55</b>	<b>-</b>	<b>4,35</b>	<b>4,39</b>	<b>4,48</b>	<b>4,56</b>	<b>-</b>	<b>4,10</b>	<b>0,08</b>
	SD	0,09	-	0,09	0,34	0,29	0,33	-	0,46	0,00
	MW-blank	4,47	-	4,27	4,32	4,34	4,48	-	4,02	-
	<b>ALP relativ</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>0,96</b>	<b>0,97</b>	<b>0,97</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>0,9</b>	<b>-</b>
28 Tage/4b II	<b>Mittelwert</b>	<b>4,38</b>	<b>-</b>	<b>4,37</b>	<b>4,56</b>	<b>4,50</b>	<b>4,31</b>	<b>-</b>	<b>3,17</b>	<b>0,08</b>
	SD	0,13	-	0,14	0,15	0,02	0,25	-	0,96	0,00
	MW-blank	4,30	-	4,29	4,48	4,42	4,24	-	3,10	-
	<b>ALP relativ</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>1,04</b>	<b>1,03</b>	<b>0,99</b>	<b>-</b>	<b>0,72</b>	<b>-</b>
28 Tage/5b I	<b>Mittelwert</b>	<b>4,35</b>	<b>4,20</b>	<b>5,11</b>	<b>4,90</b>	<b>4,60</b>	<b>4,47</b>	<b>4,65</b>	<b>4,56</b>	<b>0,08</b>
	SD	0,10	0,09	0,33	0,57	0,42	0,36	0,29	0,44	0
	MW-blank	4,27	4,12	5,03	4,81	4,51	4,39	4,57	4,47	-
	<b>ALP relativ</b>	<b>1</b>	<b>0,97</b>	<b>1,18</b>	<b>1,13</b>	<b>1,06</b>	<b>1,03</b>	<b>1,07</b>	<b>1,05</b>	<b>-</b>
28 Tage/5b II	<b>Mittelwert</b>	<b>4,31</b>	<b>4,23</b>	<b>4,42</b>	<b>4,40</b>	<b>5,20</b>	<b>5,05</b>	<b>4,44</b>	<b>3,76</b>	<b>0,08</b>
	SD	0,09	0,06	0,21	0,18	0,71	0,84	0,03	1,82	0,00
	MW-blank	4,23	4,15	4,34	4,31	5,12	4,97	4,36	3,68	-
	<b>ALP relativ</b>	<b>1</b>	<b>0,98</b>	<b>1,03</b>	<b>1,02</b>	<b>1,21</b>	<b>1,17</b>	<b>1,03</b>	<b>0,87</b>	<b>-</b>

**Tab. 8: ALP nach 14- bzw. 28tägiger Inkubation von Estradiol und 7- bzw. 21tägiger Inkubation von Progesteron, dargestellt in Form der photometrisch gemessenen optischen Dichte nach Färbung mit dem pNPP Assay**

Für jeden Dreifachansatz Mittelwert (MW) und Standardabweichung (STABW), MW nach Subtraktion des Leerwerts (blank), Faktor

gemessener Parameter: ALP photometrisch bestimmt nach immunhistochemischer Färbung

Versuchsanzahl: 8 Versuche im dreifachen Ansatz, Ergebnisse eines jeden Versuchs einzeln eingetragen

Versuchsdauer: 14 bzw. 28 Tage

Estradiolbehandlung Tag 1 mit 14 bzw. 28

Progesteronbehandlung: Tag 8 mit 14 bzw. Tag 8 mit 28

Estradiolkonzentration: 0,1ng/ml

Progesteronkonzentrationen:  $10^{-6/(-7)/-8/-9/-10}$  M

Zellzahl zu Versuchsbeginn: 1000 bzw. 800 Zellen pro Schale einer 96 Well-Zellkulturplatte

Zellkulturmedium: DMEM phenolrotfrei, Dexamethason und Ascorbinsäure

	E2	0	0	0	0	0	0	0	blank
<b>Versuchsdauer/Nr.</b>	P [M]	0	0, Ethanol	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	
14 Tage/4c	<b>Mittelwert</b>	<b>0,24</b>	<b>0,26</b>	<b>0,21</b>	<b>0,25</b>	<b>0,24</b>	-	<b>0,20</b>	<b>0,06</b>
	SD	0,03	0,00	0,03	0,04	0,03	-	0,04	0,00
	MW-blank	0,20		0,16	0,20	0,18	-	0,14	-
	<b>ALP relativ</b>	<b>1</b>	<b>1,08</b>	<b>0,81</b>	<b>1</b>	<b>0,93</b>	-	<b>0,71</b>	-
14 Tage/5c	<b>Mittelwert</b>	<b>0,46</b>	<b>0,51</b>	<b>0,85</b>	<b>0,74</b>	<b>0,73</b>	<b>0,80</b>	<b>0,34</b>	<b>0,06</b>
	SD	0,78	0,09	0,10	0,07	0,15	0,03	0,03	0,00
	MW-blank	0,40	0,44	0,79	0,68	0,67	0,74	0,27	-
	<b>ALP relativ</b>	<b>1</b>	<b>1,11</b>	<b>1,96</b>	<b>1,69</b>	<b>1,67</b>	<b>1,84</b>	<b>0,68</b>	-
28 Tage/4d	<b>Mittelwert</b>	0,77	1,88	1,31	0,81	0,99	-	0,29	0,07
	SD	0,16	0,87	0,63	0,23	0,15	-	0,07	0,00
	MW-blank	<b>0,70</b>	<b>1,81</b>	<b>1,24</b>	<b>0,74</b>	<b>0,92</b>	-	<b>0,21</b>	-
	<b>ALP relativ</b>	<b>1</b>	<b>2,6</b>	<b>1,79</b>	<b>1,06</b>	<b>1,32</b>	-	<b>0,31</b>	-
28 Tage/5d I	<b>Mittelwert</b>	<b>1,07</b>	<b>0,96</b>	<b>1,73</b>	<b>2,76</b>	<b>2,65</b>	<b>1,96</b>	<b>0,34</b>	<b>0,06</b>
	SD	0,54	0,25	0,70	0,41	0,72	0,17	0,16	0,00
	MW-blank	1,00	0,89	1,66	2,69	2,58	1,89	0,27	-
	<b>ALP relativ</b>	<b>1</b>	<b>0,89</b>	<b>1,66</b>	<b>2,69</b>	<b>2,58</b>	<b>1,89</b>	<b>0,27</b>	-
28 Tage/5d II	<b>Mittelwert</b>	<b>0,83</b>	<b>0,95</b>	<b>1,65</b>	<b>2,15</b>	<b>2,63</b>	<b>1,69</b>	<b>0,46</b>	<b>0,06</b>
	SD	0,17	0,14	0,37	0,63	0,83	0,32	0,06	0,00
	MW-blank	0,76	0,89	1,60	2,09	2,56	1,62	0,39	-
	<b>ALP relativ</b>	<b>1</b>	<b>1,16</b>	<b>2,08</b>	<b>2,73</b>	<b>3,36</b>	<b>2,13</b>	<b>0,51</b>	-

**Tab. 9: ALP nach 7- bzw. 21tägiger Inkubation mit Progesteron, dargestellt in Form der photometrisch gemessenen optischen Dichte nach Färbung mit dem pNPP Assay**

Für jeden Dreifachansatz Mittelwert und Standardabweichung (STABW), Mittelwert nach Subtraktion des Leerwerts (blank), ALP relativ  
 gemessener Parameter: ALP photometrisch bestimmt nach histochemischer Färbung  
 Versuchsanzahl: 8 Versuche im dreifachen Ansatz, Ergebnisse eines jeden Versuchs einzeln eingetragen

Versuchsdauer: 14 bzw. 28 Tage

Estradiolbehandlung: keine

Progesteronbehandlung: Tag 8 mit 14 bzw. Tag 8 mit 28

Estradiolkonzentration: 0,0ng/ml

Progesteronkonzentrationen: 10<sup>-6/(-7)/-8/-9/-10</sup>M

Zellzahl zu Versuchsbeginn: 1000 bzw. 800 Zellen pro Schale einer 96 Well-Zellkulturplatte

Zellkulturmedium: DMEM phenolrotfrei, Dexamethason und Ascorbinsäure

TUAnhang

	E2 [ng/ml]	0	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	blank
<b>Versuchsdauer/ Nr.</b>	P [M]	0	0, Eth.	0	$10^{-10}$	$10^{-9}$	$10^{-8}$	$10^{-7}$	$10^{-6}$	
<b>14 Tage/4a I</b>	Mittelwert	4,17	-	4,42	4,55	4,48	4,30	-	3,77	0,07
	SD	0,19	-	0,30	0,37	0,22	0,22	-	0,44	0,00
	MW- blank	4,10	-	4,35	4,48	4,41	4,23	-	3,70	-
	<b>relativ</b>	<b>1</b>	-	<b>1,06</b>	<b>1,08</b>	<b>1,08</b>	<b>1,03</b>	-	<b>0,9</b>	-
<b>14 Tage/4a II</b>	Mittelwert	4,27	-	3,89	4,07	4,00	3,80	-	2,53	0,07
	SD	0,11	-	0,13	0,20	0,15	0,25	-	0,45	0,00
	MW- blank	4,2	-	3,81	3,99	3,93	3,73	-	2,45	-
	<b>relativ</b>	<b>1</b>	-	<b>0,91</b>	<b>0,95</b>	<b>0,94</b>	<b>0,89</b>	-	<b>0,58</b>	-
<b>14 Tage/5a I</b>	Mittelwert	3,83	4,13	4,03	4,10	4,07	4,14	4,43 8	4,05	0,09
	SD	0,41	0,15	0,30	0,28	0,05	0,24	0,09 5	0,20	0,00
	MW- blank	3,74	4,04	3,94	4,01	3,98	4,06	4,35	3,96	-
	<b>relativ</b>	<b>1</b>	<b>1,08</b>	<b>1,05</b>	<b>1,07</b>	<b>1,06</b>	<b>1,08</b>	<b>1,16</b>	<b>1,06</b>	-
<b>14 Tage/5a II</b>	Mittelwert	4,11	4,26	4,04	4,14	3,86	4,10	4,29 8	3,82	0,09
	SD	0,09	0,17	0,19	0,26	0,18	0,19	0,30 0	0,20	0,00
	MW- blank	4,02	4,17	3,95	4,05	3,77	4,01	4,20 9	3,73	-
	<b>relativ</b>	<b>1</b>	<b>1,04</b>	<b>0,98</b>	<b>1,01</b>	<b>0,94</b>	<b>1</b>	<b>1,05</b>	<b>0,93</b>	-
<b>28 Tage/4b I</b>	Mittelwert	4,55	-	4,35	4,39	4,48	4,56	-	4,10	0,08
	SD	0,09	-	0,09	0,34	0,29	0,33	-	0,46	0,00
	MW- blank	4,47	-	4,27	4,32	4,34	4,48	-	4,02	-
	<b>relativ</b>	<b>1</b>	-	<b>0,96</b>	<b>0,97</b>	<b>0,97</b>	<b>1</b>	-	<b>0,9</b>	-
<b>28 Tage/4b II</b>	Mittelwert	4,38	-	4,37	4,56	4,50	4,31	-	3,17	0,08
	SD	0,13	-	0,14	0,15	0,02	0,26	-	0,96	0,00
	MW- blank	4,30	-	4,29	4,48	4,42	4,24	-	3,10	-
	<b>relativ</b>	<b>1</b>	-	<b>1</b>	<b>1,04</b>	<b>1,03</b>	<b>0,99</b>	-	<b>0,72</b>	-

<b>28 Tage/5b I</b>	Mittelwert	4,35	4,20	5,11	4,90	4,60	4,47	4,65	4,56	0,08
	SD	0,10	0,09	0,33	0,57	0,42	0,36	0,29	0,44	0
	MW-blank	4,27	4,12	5,03	4,81	4,51	4,39	4,57	4,47	-
	relativ	1	0,97	1,18	1,13	1,06	1,03	1,07	1,05	-
<b>28 Tage/5b II</b>	Mittelwert	4,310	4,23	4,42	4,40	5,20	5,05	4,44	3,76	0,08
	SD	0,09	0,06	0,21	0,18	0,71	0,84	0,03	1,81	0,00
	MW-blank	4,23	4,15	4,34	4,31	5,12	4,97	4,36	3,68	-
	relativ	1	0,98	1,03	1,02	1,21	1,17	1,03	0,87	-

**Tab. 10: Proliferation nach 14- bzw. 28tägiger Inkubation mit Estradiol und 7 bzw. 21 Tagen Progesteron, photometrisch gemessene optische Dichte nach Färbung mit dem Hexosaminidase-Assay**

Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Mittelwert nach Subtraktion des Leerwert-MW (blank), Hexosaminidase relativ

Gemessener Parameter: Zelldichte, photometrisch bestimmt nach histochemischer Färbung mit Proliferations-Assay;

Versuchszahl: 8 Versuche im dreifachen Ansatz, hier einzeln aufgeführt

Versuchsdauer: 14 bzw. 28 Tage

Estradiolbehandlung gesamt: Tag 1 mit 14 bzw. 1 mit 28

Progesteronbehandlung: Tag 8 mit 14 bzw. 8 mit 28

Estradiolkonzentration: 0,1ng/ml

Progesteronkonzentrationen:  $10^{-6/1-7/1-8/1-9/1-10}$ M

Zellzahl zu Versuchsbeginn: 1000 bzw. 800 Zellen pro Schale einer 96 Well Zellkulturplatte

Zellkulturmedium: DMEM phenolrotfrei, Dexamethason und Ascorbinsäure

	E2	0	0	0	0	0	0	0	blank
<b>Versuchsdauer/Nr.</b>	<b>P [M]</b>	<b>0</b>	<b>0, Ethanol</b>	<b>10<sup>-10</sup></b>	<b>10<sup>-9</sup></b>	<b>10<sup>-8</sup></b>	<b>10<sup>-7</sup></b>	<b>10<sup>-6</sup></b>	
14 Tage/4c	<b>Mittelwert</b>	<b>4,11</b>	<b>4,41</b>	<b>4,42</b>	<b>4,44</b>	<b>4,28</b>	-	<b>4,38</b>	<b>0,07</b>
	SD	0,25	0,31	0,08	0,24	0,28	-	0,20	0,00
	MW-blank	4,04	4,34	4,34	4,37	4,21	-	4,31	-
	<b>relativ</b>	<b>1</b>	<b>1,08</b>	<b>1,08</b>	<b>1,08</b>	<b>1,04</b>	-	<b>1,07</b>	-
14 Tage/5c	<b>Mittelwert</b>	<b>3,52</b>	<b>3,72</b>	<b>3,80</b>	<b>3,77</b>	<b>3,79</b>	<b>3,98</b>	<b>3,56</b>	<b>0,09</b>
	SD	0,43	0,46	0,33	0,07	0,32	0,14	0,23	0,00
	MW-blank	3,43	3,63	3,71	3,67	3,70	3,89	3,47	-
	<b>relativ</b>	<b>1</b>	<b>1,06</b>	<b>1,08</b>	<b>1,07</b>	<b>0,99</b>	<b>1,13</b>	<b>1,01</b>	-
28 Tage/4d	<b>Mittelwert</b>	<b>5,0</b>	<b>4,38</b>	<b>4,60</b>	<b>4,51</b>	<b>4,44</b>	<b>4,73</b>	<b>4,37</b>	<b>0,08</b>
	SD	0,31	0,03	0,16	0,13	0,02	0,35	0,08	0,01
	MW-blank	4,92	4,30	4,52	4,44	4,36	4,64 <sub>9</sub>	4,29	-
	<b>relativ</b>	<b>1</b>	<b>0,87</b>	<b>0,92</b>	<b>0,9</b>	<b>0,89</b>	<b>0,95</b>	<b>0,87</b>	-
28 Tage/5d	<b>Mittelwert</b>	<b>4,61</b>	<b>4,55</b>	<b>4,45</b>	<b>4,43</b>	<b>4,38</b>	<b>5,38</b>	<b>4,42</b>	<b>0,08</b>
	SD	0,10	0,40	0,11	0,13	0,07	0,35	0,60	0,00
	MW-blank	4,53	4,47	4,37	4,35	4,29	5,3	4,34	-
	<b>relativ</b>	<b>1</b>	<b>1,01</b>	<b>0,96</b>	<b>0,96</b>	<b>0,95</b>	<b>1,17</b>	<b>0,96</b>	-

**Tab. 11: Proliferation nach 7- oder 21-tägiger Inkubation mit Progesteron, photometrisch gemessene optische Dichte nach Färbung mit dem Hexosaminidase-Assay**

Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Mittelwert nach Subtraktion des Leerwert-MW (blank), Hexosaminidase relativ

Gemessener Parameter: Zelldichte, photometrisch bestimmt nach histochemischer Färbung mit Proliferations-Assay;

Versuchsanzahl: 8 Versuche im dreifachen Ansatz, hier einzeln aufgeführt

Versuchsdauer: 14 bzw. 28 Tage

Estradiolbehandlung gesamt: keine

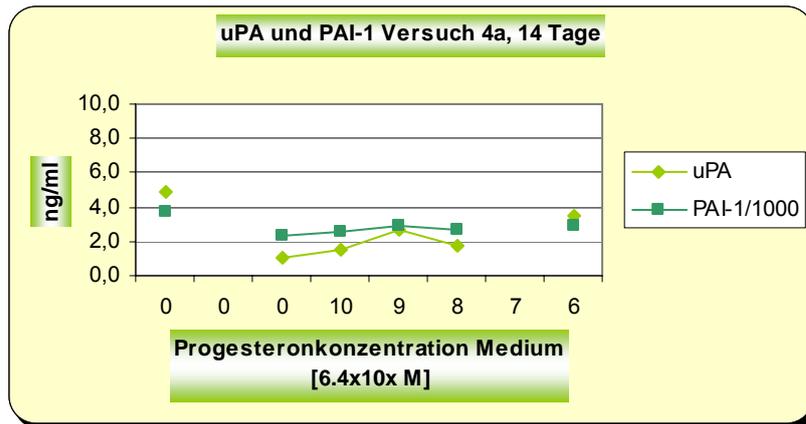
Progesteronbehandlung: Tag 8 mit 14 bzw. 8 mit 28

Estradiolkonzentration: 0.0ng/ml

Progesteronkonzentrationen: 10<sup>-6/-7/-8/-9/-10</sup>M

Zellzahl zu Versuchsbeginn: 1000 bzw. 800 Zellen pro Schale einer 96 Well Zellkulturplatte

Zellkulturmedium: DMEM phenolrotfrei, Dexamethason und Ascorbinsäure



**Abb. 21: uPA und PAI-1 im Überstand, Versuch 4a**

uPA und PAI-1 jeweils gemessen 92-100 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel Estradiol  $3.7 \times 10^{-10} \text{M}$  ab Punkt 3

gemessene Parameter: PAI-1 im Überstand, gemessen mittels Imubind® ELISA Kit  
uPA im Überstand, gemessen mittels Imubind® ELISA Kit

Versuchsanzahl: 1 Versuch im dreifachen Ansatz; Medium aus 3 Ansätzen gepoolt

Versuchsdauer: 14 Tage

Estradiolbehandlung: Tag 1 mit 14

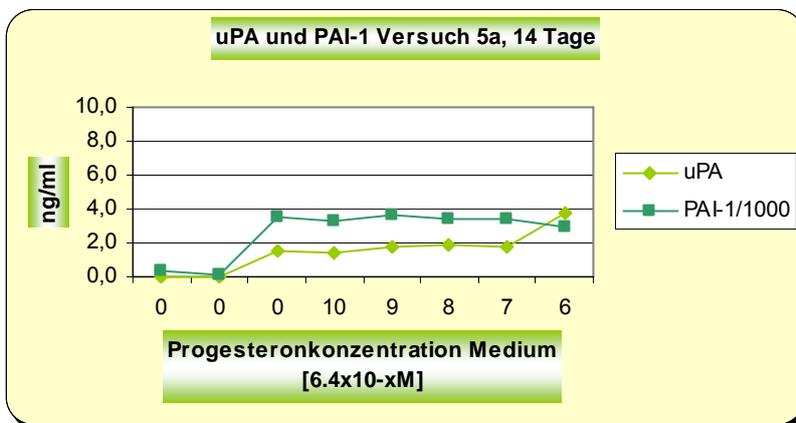
Progesteronbehandlung: Tag 8 mit 14

Estradiolkonzentration:  $10^{-10} \text{M}$

Progesteronkonzentrationen:  $10^{-6/-8/-9/-10} \text{M}$

Zellzahl zu Versuchsbeginn: 6000 Zellen pro Kammer eines Objektträgers

Zellkulturmedium: DMEM phenolrotfrei, Dexamethason und Ascorbinsäure



**Abb. 22: uPA und PAI-1 im Überstand, Versuch 5a**

zusätzlich Ethanol-Kontrollösung 0.02% bei Datenpunkt 2, Estradiol  $3.7 \times 10^{-10} \text{M}$  ab Punkt 3

gemessene Parameter: PAI-1 im Überstand, gemessen mittels Imubind® ELISA Kit  
uPA im Überstand, gemessen mittels Imubind® ELISA Kit

uPA und PAI-1 jeweils gemessen 92-100 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel

Versuchsanzahl: 1 Versuch im dreifachen Ansatz; Medium aus 3 Ansätzen gepoolt

Versuchsdauer: 14 Tage

Estradiolbehandlung: Tag 1 mit 14

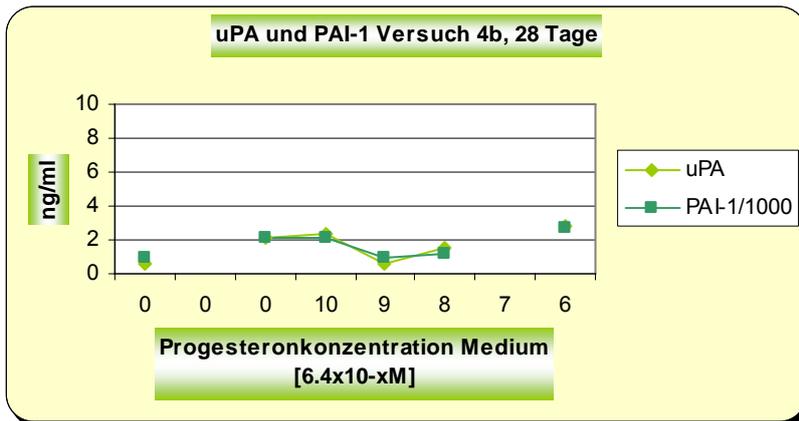
Progesteronbehandlung: Tag 8 mit 14

Estradiolkonzentration:  $10^{-10} \text{M}$

Progesteronkonzentrationen:  $10^{-6/-7/-8/-9/-10} \text{M}$

Zellzahl zu Versuchsbeginn: 6000 Zellen pro Kammer eines Objektträgers

Zellkulturmedium: DMEM phenolrotfrei, Dexamethason und Ascorbinsäure



**Abb. 23: uPA und PAI-1 im Überstand, Versuch 4b**

jeweils gemessen 92-100 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel

zusätzlich Estradiol  $3.7 \times 10^{-10} \text{M}$  ab Punkt 3

gemessene Parameter: PAI-1 im Überstand, gemessen mittels Imubind® ELISA Kit

uPA im Überstand, gemessen mittels Imubind® ELISA Kit

Versuchsanzahl: Versuch im dreifachen Ansatz; Medium aus 3 Ansätzen gepoolt

Versuchsdauer: 28 Tage

Estradiolbehandlung: Tag 1 mit 28

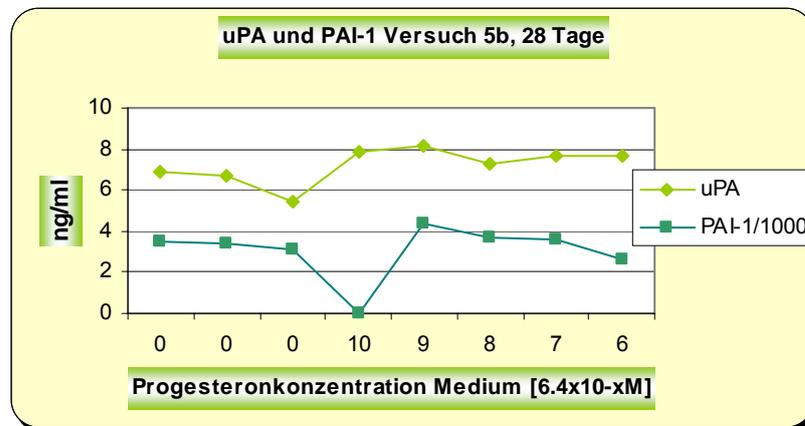
Progesteronbehandlung: Tag 8 mit 28

Estradiolkonzentration:  $10^{-10} \text{M}$

Progesteronkonzentrationen:  $10^{-6/-8/-9/-10} \text{M}$

Zellzahl zu Versuchsbeginn: 3000 Zellen pro Kammer eines Objektträgers

Zellkulturmedium: DMEM phenolrotfrei, Dexamethason und Ascorbinsäure



Das Ergebnis für PAI-1 für  $10^{-10} \text{M}$  Progesteron lag oberhalb des Messbereichs.

**Abb. 24: uPA und PAI-1 im Überstand, Versuch 5b**

uPA und PAI-1 jeweils gemessen 92-100 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel

zusätzlich Ethanol-Kontrolllösung 0.02‰ bei Datenpunkt 2, Estradiol  $3.7 \times 10^{-10} \text{M}$  ab Punkt 3

gemessene Parameter: PAI-1 im Überstand, gemessen mittels Imubind® ELISA Kit

uPA im Überstand, gemessen mittels Imubind® ELISA Kit

Versuchsanzahl: 1 Versuch im dreifachen Ansatz; Medium aus 3 Ansätzen gepoolt

Versuchsdauer: 28 Tage

Estradiolbehandlung: Tag 1 mit 28

Progesteronbehandlung: Tag 8 mit 28

Estradiolkonzentration:  $10^{-10} \text{M}$

Progesteronkonzentrationen:  $10^{-6/-7/-8/-9/-10} \text{M}$

Zellzahl zu Versuchsbeginn: 3000 Zellen pro Kammer eines Objektträgers

Zellkulturmedium: DMEM phenolrotfrei, Dexamethason und Ascorbinsäure

## **Danksagung**

Für die Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit danke ich

Frau Prof. Dr. M. Kiechle für die Möglichkeit, diese Arbeit in ihrer Abteilung durchzuführen und

Herrn Prof. Dr. R. Gradinger für die hervorragenden Arbeitsbedingungen in den Räumen des orthopädischen Forschungslabors sowie die großzügige Bereitstellung der Arbeitsmaterialien.

Besonders danke ich

Frau PD Dr. V. Seifert-Klauss für die Überlassung des Themas, die Aufnahme in die AG gynäkologische Endokrinologie und die stets zuverlässige Betreuung, Motivation und unermüdliche menschliche Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Niederschrift sowie bei verschiedenen Präsentationen der Arbeit, die oft weit über das zu erwartende Maß bei der Betreuung einer Promotion hinausging,

Frau J. Tübel, Frau Dr. U. Magdolen und Herrn Dr. J. Schauwecker für die ebenso tatkräftige wie unverzichtbare Unterstützung in der praktischen Durchführung der Versuche,

Herrn PD Dr. Magdolen und seinen Mitarbeiterinnen für die Durchführung der uPA- und PAI-1-Messungen im Labor der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik,

Herrn Prof. Dr. P. Luppä und Frau Dürmaier für die Durchführung verschiedener Messungen im Labor des Instituts für Klinische Chemie und für zahlreiche Anregungen zur Versuchsplanung sowie

Frau Dipl. Math. R. Busch für die Beratung bei Fragen zur statistischen Auswertung.