

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und  
Klinische Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Wirkmechanismen von Glucocorticoiden im Knochen und in der  
Prostata im Mausmodell

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Holger Henneicke

aus Hildesheim

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. F. Buttgereit  
2. Prof. Dr. med. M. Amling  
3. Prof. Dr. med. F. Jakob

Datum der Promotion: Freitag, der 25. Oktober 2013

# Inhaltsverzeichnis

1.	<b>Zusammenfassung</b> .....	1
1.1	Einleitung .....	3
1.2	Methoden .....	4
1.2.1	Transgenes Tiermodell .....	4
1.2.2	Validierung der Applikation von GC .....	4
1.2.3	GC Effekte in der Prostata und am Knochen .....	5
1.3	Ergebnisse .....	5
1.3.1	Validierung der Applikation von GC .....	5
1.3.2	GC Effekte in der Prostata und am Knochen .....	6
1.4	Diskussion .....	8
1.4.1	Technische Validierung .....	8
1.4.2	GC Effekte im Knochen .....	9
1.4.3	GC Effekte in der Prostata .....	11
1.4.4	Fazit .....	11
1.5	Literaturverzeichnis .....	13
2.	<b>Anteilerklärung</b> .....	15
3.	<b>Ausgewählte Publikationen im Original</b>	
3.1	Publikation 1: Herrmann et al. <i>Steroids</i> 2009 .....	17
3.2	Publikation 2: Simanainen et al. <i>The Prostate</i> 2010 .....	23
3.3	Publikation 3: Henneicke et al. <i>Bone</i> 2011 .....	33
4.	<b>Curriculum Vitae</b> .....	44
5.	<b>Publikationsliste</b> .....	46
6.	<b>Erklärung</b> .....	48
7.	<b>Danksagung</b> .....	49

## 1. Zusammenfassung

Die Wirkmechanismen von Glucocorticoiden (GC) im Knochen sowie in der Prostata sind bis dato nicht vollständig verstanden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war – neben der Validierung verschiedener Methoden zur Applikation von GC im Tiermodell – die Bestimmung des Einflusses des Osteoblasten auf die GC Wirkung im Knochen. Darüber hinaus wurde der Einfluss von GC auf Stroma- und Epithelzellen der Prostata charakterisiert.

**Methoden:** Zunächst wurden die technischen Grundlagen zur chronischen Applikation von GC im Mausmodell untersucht. Hierzu wurden repetitive subkutane Injektionen, die Implantation subkutaner osmotischer Pumpen sowie die subkutane Implantation von *slow-release Pellets* verglichen. Nach Etablierung der optimalen Methodik (*slow-release Pellet*) folgte eine Serie von in-vivo Experimenten, mittels derer der Effekt von GC auf spezifische Knochenzellen untersucht wurde. Hierbei kamen sog. Col2.3-11 $\beta$ -HSD2 transgene Mäuse zum Einsatz, bei denen GC auf Prä-Rezeptor-Ebene durch die selektive Überexpression des Enzyms 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 (11 $\beta$ -HSD2) ausschließlich im Osteoblasten inaktiviert werden. Insgesamt wurden 44 Wildtyp und 42 transgene Tiere entweder mit 1,5mg/Woche Corticosteron oder Placebo für 4 Wochen behandelt. Anschließend wurden Tibia und Wirbelsäule mittels Micro-CT, Histologie, Histomorphometrie und Immunohistochemie analysiert. In einem zweiten Ansatz wurden außerdem Prostata, Testes und Vesiculae seminales auf histologischer Ebene untersucht.

**Ergebnisse:** Die Implantation subkutaner *slow-release Pellets* führte zu einer chronischen und signifikanten Hypercorticosteronaemie in der Maus, wobei zum Erreichen prolongierter Effekte eine wöchentliche Re-Implantation der Pellets notwendig wurde. Wiederholte Injektionen oder die Implantationen GC-haltiger osmotischer Pumpen hatten dagegen keinen nachhaltigen Effekt auf die GC Serum Konzentration der Versuchstiere.

Nach 4-wöchiger Behandlung mit GC Pellets konnte in der Tibia von WT Mäusen ein endocorticaler Verlust von Knochen beobachtet werden, jedoch kam es gleichzeitig zu einem pericorticalen Anbau von Knochensubstanz. In den Wirbelkörpern dieser Mäuse wurde dagegen ein Verlust corticaler Knochenmasse festgestellt. Interessanterweise führte die gleiche GC-Behandlung weder in der Tibia noch in der Wirbelsäule von transgenen Tieren zu einem signifikanten Verlust von trabekulärer Knochensubstanz.

Nach der GC-Exposition imponierte in der anterioren Prostata (AP) der Maus eine deutliche Dysplasie des Epithels. Gleichzeitig konnte eine deutliche Induktion des GC-Rezeptors im Stroma - nicht aber im Epithel der AP - festgestellt werden. Weiterhin wurde im Stroma der AP eine deutlich erhöhte Expression von potentiell mutagenem Fibroblast Growth Factor (FGF) 2 und 10 als Folge der GC-Behandlung beobachtet. Im Gegensatz hierzu blieben ventrale sowie dorsolaterale Bereiche der Prostata von der Behandlung mit GC weitgehend unbeeinflusst.

**Fazit:**

1. Unter den getesteten Verfahren ist die wöchentliche Implantation subkutaner *slow-release Pellets* die beste Methode zur längerfristigen Induktion einer Hypercorticosteronaemie im Mausmodell.
2. Osteoblasten sind das primäre Ziel von GC im Knochen. Im corticalen Knochen können exogenen GC in Abhängigkeit von der Lokalisation (Endo- vs. Pericortex) sowohl katabole als auch anabole Wirkungen entfalten.
3. In der anterioren Prostata verursachen erhöhte Konzentrationen von GC eine selektive Epitheldysplasie, der möglicherweise ein FGF-vermitteltes, parakrines Signal des Stromas zugrunde liegt.

## 1.1 Einleitung

Seit ihrer Einführung in den klinischen Alltag in den 40iger und 50iger Jahren des letzten Jahrhunderts sind Glucocorticoide (GC) nicht mehr aus der Behandlung vieler akuter und chronischer Erkrankungen wegzudenken. Ihr erfolgreicher Einsatz – vor allem in höheren Dosierungen und für einen längeren Zeitraum – wird jedoch häufig durch mannigfaltige Nebenwirkungen wie Osteoporose [1, 2], einer Verschlechterung der Stoffwechsellage [3] und nicht zuletzt einer Haut- [4, 5] und Muskelatrophie [6] deutlich eingeschränkt. Um das therapeutische Potential von GC voll ausschöpfen zu können, ist es nicht nur erforderlich ihren klinischen Einsatz kritisch zu begleiten, sondern auch die Mechanismen ihrer Nebenwirkungen genauer zu ergründen.

Stellvertretend für den humanen Organismus wurden zu diesem Zweck zahlreiche Tiermodelle etabliert [7, 8]. Allerdings ist für die genaue Untersuchung der Wirkung chronisch erhöhter GC-Konzentrationen eine möglichst schonende, als auch konstante Gabe von GC erforderlich. Um dies zu erreichen, wurden daher zunächst verschiedene Methoden der GC-Applikation validiert.

Anschließend wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit die Reaktion des corticalen Knochens auf chronisch erhöhte GC-Konzentrationen untersucht. Ein deutlicher Verlust von trabekulärem Knochen bei hohen Konzentrationen von exogenen GC ist ein seit langem bekannter Effekt [7, 8]. Neue Studien zeigen jedoch einen besonderen Einfluss des corticalen Knochens auf die Entwicklung von pathologischen Frakturen und auch Osteoporose im Allgemeinen [9, 10]. Der Einfluss von GC auf dieses spezielle Knochenkompartiment ist jedoch unklar: Während hohe Konzentrationen von GC ein Verlust von Knochensubstanz herbeiführen [11], scheinen physiologische Konzentrationen für die normale Entwicklung von corticalem Knochen während des Wachstums unverzichtbar zu sein [12-14].

Durch den Einsatz eines transgenen Tiermodells wird ein tieferer Einblick in die zellulären Mechanismen von GC Effekten im Skelettsystem ermöglicht: Die spezifische Blockade des GC Signalwegs in Osteoblasten der transgenen „Col2.3-11 $\beta$ -HSD2 Maus“ [13] ermöglicht dabei eine Quantifizierung des Einflusses ebendieser Zellpopulation auf die Ausbildung von GC-induzierten Effekten im Knochen.

Über das Skelettsystem hinaus war die Prostata als weiteres Zielorgan von GC von Interesse: Obwohl die Expression von GC Rezeptoren auf Stromazellen der Prostata direkte Effekte von exogenen GC auf dieses Gewebe nahelegt [15], wurde bisher kein solcher Effekt beschrieben. Im Rahmen einer Kooperation wurde somit weiterhin der direkte Einfluss von GC auf das Stroma und Epithel der Prostata in vivo charakterisiert.

## **1.2 Methoden**

### **1.2.1 Transgenes Mausmodell**

Durch den Einsatz des für Osteoblasten und Osteozyten spezifischen 2.3kb-Kollagen Typ Ia1 (Col2.3) Promotors wird das GC-inaktivierende Enzym 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 (11 $\beta$ -HSD2) gezielt in Osteoblasten und Osteozyten überexprimiert [13]. Hierdurch wird der GC-Signalweg selektiv in Osteoblasten und Osteozyten auf Prä-Rezeptor-Ebene unterbrochen.

### **1.2.2 Validierung der Applikation von GC**

Im technischen Teil dieser Arbeit wurden die repetitive subkutane Injektion von Corticosteron (CS) (n=15) mit der subkutanen Implantation CS-haltiger osmotischer Pumpen (Alzet Osmotic Pumps, Cupertino, CA, USA) (n=20) bzw. subkutan implantierter CS-haltiger *slow-release Pellets* (Innovative Research of America, Sarasota, FL, USA) (n=10) in jeweils verschiedenen Dosen in wildtyp (WT) Mäusen verglichen. Es erfolgte jeweils eine Kontrolle durch Placebo. Blut wurde nach der Injektion von CS zunächst stündlich, dann zwei-stündlich zur Bestimmung der Serum Konzentrationen von CS und Osteocalcin (OCN) entnommen. Nach der Implantation subkutaner Pumpen bzw. Pellets erfolgte die Blutentnahme wöchentlich zur Bestimmung derselben Parameter.

In einem weiteren Versuch wurde an den Tagen 0, 7, 14 und 21 die subkutane Implantation von entweder Placebo (n=5) oder 10mg CS Pellets (n=5) vorgenommen. Nach wöchentlichen Blutentnahmen zur Bestimmung von CS bzw. OCN im Serum erfolgte nach 28 Tagen schließlich die Entnahme der rechten Tibia sowie der Wirbelsäule zur Micro-CT Analyse.

### 1.2.3 GC Effekte in der Prostata und am Knochen

In WT (n=44) und Col2.3-11 $\beta$ -HSD2-transgenen Mäusen (tg) (n=42) erfolgte die wöchentliche Implantation von 1,5mg CS Pellets oder Placebos für eine Gesamtdauer von 4 Wochen. Blut wurde zur Bestimmung der Konzentration von CS, OCN und der Tartrate-Resistant-Acid-Phosphatase-5b (TRAP5b) wöchentlich entnommen. Nach 28 Tagen wurden Tibia und Wirbelsäule sowie Prostata, Testes und Vesiculae seminales zur histomorphometrischen, immunohistochemischen, und/oder Micro-CT Analyse entnommen.

## 1.3 Ergebnisse

### 1.3.1 Validierung der Applikation von GC

Nach der subkutanen Injektion von 2mg/kg CS konnte keine signifikante Erhöhung der Serum CS Konzentration festgestellt werden. Eine Erhöhung der Injektionsdosis auf 10mg/kg führte zu einem Anstieg der Serum CS Konzentration auf Werte bis zu 2600 $\mu$ g/L, wobei vier Stunden nach der Injektion wieder Normalwerte (hier: <500 $\mu$ g/L) erreicht wurden. Die Konzentration von OCN im Serum blieb von einer einmaligen CS Injektion unbeeinflusst.

Die subkutane Implantation CS-haltiger osmotischer Pumpen führte in keiner der getesteten Konzentration (5 mg/kg/d und 30 mg/kg/d) zu einer verlässlichen Erhöhung der Serum CS Konzentrationen. Auch der Einsatz verschiedener Trägersubstanzen mit unterschiedlicher Viskosität wie Polyethylenglycol (PEG-400) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) führte zu keiner signifikanten Hypercorticosteronaemie. Dagegen führte die subkutane Implantation von *slow-release Pellets* (10mg CS/Pellet) am ersten Tag nach Implantation zu einem Anstieg der Serum CS-Konzentration auf bis zu 1400 $\mu$ g/L. Diese fiel bis zum siebten Tag nach Implantation jedoch wieder auf physiologische Werte ab (hier: <500 $\mu$ g/L). Die Serum OCN Konzentration wurde nach Pellet Implantation für sieben Tage supprimiert und erreichte erst am Tag 14 nach Implantation wieder physiologische Spiegel.

Eine konstante Suppression der Serum OCN Konzentrationen über 28 Tage wurde mittels wöchentlicher subkutaner Re-Implantation der CS Pellets (10mg CS/Pellet) erreicht, bei allerdings nur intermittierend erhöhten CS Konzentrationen im Serum. Nach ebendieser Behandlung mit CS Pellets für die Dauer von vier Wochen zeigte eine Micro-CT Analyse sowohl der Tibia als auch des dritten Lendenwirbelkörpers deutliche Zeichen von GC-induzierter Osteoporose: So waren sowohl das Knochenvolumen (BV/TV) als auch die



Anzahl (Tb.No.) und Durchmesser (Tb.Th.) der Knochen trabekel im Vergleich zur Placebo-Gruppe signifikant reduziert.

### **1.3.2 GC Effekte in der Prostata und am Knochen**

*Serum CS Konzentration und Knochenmarker:* Die wöchentliche Implantation von 1,5mg CS *slow-release Pellets* erhöhte die Serum CS Konzentration von  $101 \pm 25$  nmol/L (Placebo behandelte Tiere) auf  $401 \pm 40$  nmol/L (CS behandelte Tiere). Bei altersentsprechendem Abfall der Serum Konzentrationen von OCN and TRAB5b im Verlauf des vierwöchigen Experiments in beiden Placebogruppen führte eine CS Exposition sowohl in WT als auch in tg Mäusen zu konstant supprimierten OCN Serumkonzentrationen. Trotz des Abfalls der OCN Konzentration in tg Mäusen unter CS-Behandlung, zeigten diese zu allen Zeitpunkten signifikant höhere OCN Serum Spiegel als WT Mäuse. Der Aktivitätsmarker für Osteoclasten, TRAP5b, stieg unter Behandlung mit CS in WT Mäusen an Tag 21 deutlich über das Niveau der entsprechenden Placebogruppe. In tg Mäusen war dieser Effekt hingegen nicht zu beobachten.

*Corticaler Knochen (Tibia - Endocortex):* WT Mäusen zeigten nach vierwöchiger CS Exposition einen nahezu vollständigen Verlust von Osteoblasten am Endocortex der Tibia, bei gleichzeitig deutlich erhöhter Anzahl von Osteoclasten an dieser Stelle. Tg Mäuse erfuhren zwar eine Reduktion der Anzahl an Osteoblasten am Endocortex auf ungefähr 50% im Vergleich zu Placebo, allerdings führte die CS Behandlung hier nicht zu einer Induktion endocorticaler Osteoclasten. In der Folge kam es in tg Mäusen auf struktureller Ebene zu keinen signifikanten Veränderungen am Endocortex, während in WT Mäuse eine deutliche Ausweitung des Knochenmarkraums beobachtet werden konnte.

*Corticaler Knochen (Tibia - Pericortex):* Am Pericortex zeigte sich in WT Mäusen eine Reduktion der Anzahl von Osteoclasten als Folge der CS Behandlung. Gleichzeitig offenbarte die Micro-CT Analyse hier sowohl eine erhöhte pericorticale Fläche als auch eine größere pericorticale Zirkumferenz nach CS Exposition. In tg Mäusen hingegen kam es weder auf zellulärer noch auf struktureller Ebene zu pericorticalen Veränderungen als Folge der CS Behandlung.

Die Exposition gegenüber CS führte weder in WT noch in tg Tieren zu einer signifikanten Änderung der Dicke des corticalen Knochens (im Querschnitt). Allerdings konnte in tg Mäusen nach CS Behandlung eine signifikante, wenngleich auch gering ausgeprägte Verminderung der corticalen Knochenfläche festgestellt werden (ebenfalls im Querschnitt). Die mechanische Stabilität dagegen wurde in keiner der untersuchten Versuchsgruppen signifikant beeinflusst.

*Corticaler Knochen (Wirbelkörper):* Sowohl die Dicke des corticalen Knochens als auch die corticale Knochenfläche (beides im Querschnitt) waren in WT Mäusen nach 28-tägiger CS Behandlung deutlich verringert. Beide Parameter blieben in tg Mäusen von der Behandlung unbeeinflusst.

*Trabekulärer Knochen:* Nach CS Behandlung konnte in der Tibia von WT und tg Mäusen eine signifikante Verminderung des Knochentrabekeldurchmessers festgestellt werden. Weiterhin zeigte sich in tg Mäusen eine verringerte Anzahl von Osteoblasten, jedoch ohne eine korrespondierende Induktion von Osteoclasten. Alle übrigen Parameter der trabekulären Knochenqualität blieben von der Behandlung unbeeinflusst.

*Prostata:* Die 28-tägige Behandlung mit CS führte zu einer deutlichen Gewichtszunahme der anterioren Prostata (AP). In der histologischen Analyse dieses Areals wurde eine deutliche Dysplasie des Epithels deutlich. Weiterhin zeigte sich nach CS Exposition in der immunhistochemischen Analyse eine clusterförmig erhöhte Proliferationsrate des luminalen Epithels, ohne dass eine erhöhte Apoptoserate festgestellt werden konnte. Eine hohe Expression des Glucocorticoid Rezeptors (GR) wurde sowohl in Stromazellen als auch den basalen Epithelzellen der AP histologisch nachgewiesen. Luminale Epithelzellen dagegen zeigten lediglich eine schwache Expression des GR. Die Real-time PCR Analyse der GR mRNA zeigte eine deutliche Induktion nach CS Exposition in der AP. Darüber hinaus konnte nach CS Behandlung eine erhöhte Expression von Fibroblast Growth Factor (FGF) 10 und 2 in der AP festgestellt werden bei gleichzeitig erhöhter Expression des FGF-Rezeptors. Die Expression des Androgen Rezeptors dagegen blieb von der CS Behandlung unbeeinflusst. Ebenso unbeeinflusst blieb das Gewicht der Testes sowie deren Testosteron Gehalt.

## 1.4 Diskussion:

Zunächst konnte im Rahmen dieser Arbeit die Implantation subkutaner *slow-release Pellets* als eine geeignete Methode zur Induktion längerfristig erhöhter CS Serum Konzentrationen im Mausmodell etabliert werden. Weiterhin wurde der Osteoblast als das primäre Ziel von exogenen GC im Knochen identifiziert. Es erfolgte darüber hinaus eine genaue Charakterisierung der Wirkmechanismen von exogenen GC im corticalen Knochen sowie in der Prostata.

So können GC im corticalen Knochen in Abhängigkeit von der Lokalisation (Endo- vs. Pericortex) sowohl katabole als auch anabole Wirkungen entfalten. In der Prostata sind erhöhte Konzentrationen exogener GC ursächlich für eine selektive Epitheldysplasie in der AP. Dieser liegt möglicherweise ein FGF-vermitteltes, parakrines Signal des AP Stromas zugrunde.

### 1.4.1 Technische Validierung

Das Ziel konstant erhöhter CS Serum Konzentrationen in Versuchstieren konnte mit keiner der getesteten Methoden erreicht werden. Während die Implantation subkutaner osmotischer Pumpen unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel zu keiner signifikanten Erhöhung der Serumkonzentration von CS führte, konnte sowohl durch die subkutane Injektion von CS als auch durch den Einsatz subkutaner CS Pellets ein vorübergehender Anstieg der Serum Level von CS erreicht werden. Die subkutane Injektion von CS führte zu einem raschen Anstieg der Serum CS Konzentration, jedoch wurden bereits vier Stunden nach der Injektion wieder Normwerte gemessen. Somit scheinen subkutane Injektionen für die langfristige CS Behandlung ungeeignet.

Durch den Einsatz subkutan implantierter *slow-release Pellets* (10mg CS / Pellet) wurde ebenfalls keine konstant erhöhte CS Konzentration im Serum der Versuchstiere erreicht. Diese Ergebnisse decken sich nicht mit den Angaben des Herstellers, der eine Freisetzungsdauer von 21 Tagen für die hier verwendeten Pellets angibt. Allerdings konnte nach zumindest initial erhöhten CS Serum Konzentrationen in den Versuchstieren eine 7-tägige Suppression der OCN Spiegel beobachtet werden. Bei OCN handelt es sich um ein von Osteoblasten produziertes Molekül, welches sehr sensitiv auf erhöhte GC Serum Level reagiert [16-18]. Folglich überdauert der biologische Effekt den gemessenen Abfall von CS im Serum und deutet auf einen prolongierten Effekt des Steroids auf den Osteoblasten hin.

Durch die wöchentliche Re-Implantation von 10mg CS Pellets konnte somit eine dauerhafte Suppression der Aktivität von Osteoblasten gewährleistet werden, bei jedoch nur intermittierend erhöhten Serum CS-Werten. Die Effektivität dieses Administrationsweges konnte durch die Micro-CT Analyse von Tibia and Wirbelkörper der behandelten Mäusen gezeigt werden: Es offenbarte sich eine deutliche verminderte Qualität des trabekulären Knochens nach vierwöchiger Behandlung mit CS.

#### **1.4.2 GC Effekte im Knochen**

Im Gegensatz hierzu führte eine die wöchentliche Re-Implantation von 1,5mg CS Pellets in WT Mäusen zu nur geringfügigen Veränderungen der trabekulären Knochenparameter – vornehmlich auf zellulärer und nicht auf struktureller Ebene. Allerdings konnte unter der Behandlung mit geringerer CS Dosis nicht nur der bekannte katabole Effekt chronisch erhöhter CS Serum Level gezeigt werden, sondern auch ein lokaler, pericorticaler anaboler Effekt.

So zeigte sich auf zellulärer Ebene ein nahezu vollständiger Verlust von Osteoblasten am Endocortex der mit 1,5mg CS Pellets behandelten Mäuse bei gleichzeitig massiver Induktion von endocorticalen Osteoclasten. Auf struktureller Ebene führte diese deutlich erhöhte Knochenresorption zu einem Verlust von endocorticaler Knochenmasse und damit zu einer Ausdehnung des Markraums. An der pericorticalen Matrix zeigte sich ein gegensätzlicher Effekt: Hier offenbarte die histomorphometrische Analyse einen deutlichen Verlust von Osteoclasten bei unveränderter Osteoblastenaktivität. Gleichzeitig konnte in der Mikro-CT Analyse eine deutliche Ausweitung der Knochenmatrix am Pericortex der Tibia gezeigt werden. Bei Knochenabbau am Endocortex und Knochenanbau am Pericortex konnte im Rahmen dieses Versuchs kein Netto Verlust von corticalem Knochen an der Tibia festgestellt werden. Ebenso wenig wurden die mechanische Stabilität durch die CS Exposition kompromittiert.

Am Wirbelkörper kam es bei nicht signifikanten Veränderungen im trabekulären Knochen zu einem deutlichen Verlust von corticalem Knochen. Genau wie der Endocortex der Tibia scheint der corticale Knochen des Wirbelkörpers sehr sensitiv auf bereits geringfügig erhöhte Konzentrationen von CS zu reagieren.

Interessanterweise konnte bereits Laan et al. gegensätzliche GC Effekte am corticalen Knochen in Patienten mit rheumatoider Arthritis feststellen [19]. Ebenso einhergehend mit den Ergebnissen dieser Studie stellten Wetzstone et al. bei Kindern unter GC Therapie fest, dass speziell in der Tibia dieser Kinder nicht nur eine Ausweitung des pericorticalen Perimeters sondern auch eine Erhöhung der corticalen Knochenmineraldichte (BMD) zu beobachten war [20].

Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass unter Einfluss von exogenen Glucocorticoiden nicht nur eine Induktion der Knochenresorption herbeigeführt wird, sondern auch eine lokale anabole Reaktion zu beobachten ist. Ob es sich hier um einen direkten anabolen Effekt von GC auf pericortical Osteoblasten handelt oder ob es vielmehr eine pericortical Antwort auf die deutlich erhöhte Knochenresorption am Endocortex darstellt, ließ sich in diesem Versuch nicht eruieren.

Durch den selektiven Schutz des Osteoblasten vor GC im Col2.3-11 $\beta$ -HSD2 transgenen Mausmodell wurden GC Wirkungen im Knochen nahezu vollständig verhindert. So waren in tg Mäusen keine GC Effekte im corticalen Knochen des Wirbelkörpers nachweisbar. Ebenso zeigte die histomorphometrische Analyse einen partiellen Erhalt der Osteoblastenfunktion am Endocortex der Tibia. Dieser partielle Schutz auf zellulärer Ebene führte bereits zu einem kompletten Erhalt der endocorticalen Knochenstruktur trotz 4-wöchiger Behandlung mit GC. Folglich konnte in tg Mäusen auch keine anabole Reaktion am Pericortex nach GC Exposition nachgewiesen werden. Somit legen die Ergebnisse dieser Arbeit den Schluss nahe, dass GC Wirkungen im corticalen Knochen zu einem großen Anteil über den Osteoblasten vermittelt werden. Im trabekulären Knochen konnten Rauch et al. ähnliche Beobachtung machen und identifizierten an dieser Stelle ebenso den Osteoblasten als Hauptziel von GC im Knochen [8].

In tg Mäusen kam es nach GC Exposition – im Gegensatz zu WT Mäusen – zu keinem Anstieg des Osteoclastenmarkers TRAB5b. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass auch GC Effekte auf den Osteoclasten über den Osteoblasten vermittelt werden. Eine direkte Interaktion von GC und Osteoclasten wie von Kim et al. beschrieben kann natürlich nicht ausgeschlossen werden [21], allerdings scheinen direkte Effekte von GC auf Osteoclasten den über den Osteoblasten vermittelten Auswirkungen deutlich nachgeordnet zu sein.

### 1.4.3 GC-Effekte in der Prostata

Obwohl GC häufig als last-line Therapie bei metastasiertem Prostatakarzinom eingesetzt werden, sind die Auswirkungen dauerhaft erhöhter GC Serum Level auf die Prostata bis dato nicht vollständig verstanden. So beobachteten Lerman et al. in CS behandelten Ratten eine deutliche Involution des Prostataepithels [22]. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der hier vorliegenden Arbeit eine deutliche Dysplasie desselben, besonders in der AP. Die in dieser Studie beobachtete unterschiedliche Sensitivität der verschiedenen Prostata Anteile gegenüber GC lässt sich über eine unterschiedlich hohe Expression des GR erklären. Im Allgemeinen konnte im betroffenen, luminalen Epithel der AP nur eine geringe Expression des GR festgestellt werden. Im Gegensatz dazu ließ sich im Stroma der AP jedoch eine deutlich höheren Expression des GR nachweisen, auch im Vergleich zu anderen Prostatalappen (ventral und dorsolateral). Diese Beobachtungen deuten auf das Stroma als Hauptziel von GC in der Prostata hin. Da parakrine Signalwege wie FGF10 nicht nur in der Entwicklung der Prostata von großer Bedeutung sind, sondern auch mit Prostataepitheldysplasien in Verbindung gebracht werden [23, 24], wurde deren Expression in der Prostata nach GC Exposition untersucht. So konnte nach Behandlung mit GC besonders in der AP sowohl eine deutliche Induktion der Expression von FGF10 und FGF2 als auch des korrespondierenden Rezeptors festgestellt werden. Somit ließe sich die epitheliale Dysplasie der Prostata in diesem Modell als eine parakrin vermittelte Reaktion, ausgelöst durch GC Wirkungen im Stroma, erklären. Weiterhin scheint dieser Signalweg spezifisch für die AP zu sein, da sowohl die epitheliale Dysplasie als auch die erhöhte GC-Rezeptor und FGF10 Expression in anderen Prostatalappen nicht beobachtet werden konnten.

Eine Veränderung der Serumlevel von Androgenen als Folge der GC Exposition ist ein weiterer denkbarer Mechanismus hinter den beobachteten Veränderungen in der Prostata. Da jedoch sowohl die Expression des Androgen Rezeptors in der Prostata als auch das Gewicht und der Testosteron Gehalt der Testes unverändert blieb, scheint ein systemischer Androgen Effekt eher unwahrscheinlich.

### 1.4.4 Fazit

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit mehrere Administrationswege für GC in Mäusen validiert werden. Auch wenn mit keiner der hier getesteten Methoden die gewünschte kontinuierliche CS Erhöhung im Serum erreicht wurde, stellt die subkutane Implantation von

CS Pellets die effektivste Methode zur Induktion einer Hypercorticosteronaemie dar. Darüber hinaus zeigte sich durch das weitgehende Ausbleiben von GC Effekten am Knochen von tg Mäusen, dass GC ihre Hauptwirkung im Knochen über Osteoblasten entfalten. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass GC speziell am corticalen Knochen für sowohl katabole als auch anabole Effekte verantwortlich sind.

In der anterioren Prostata scheint die GC Wirkung auf das Stroma über ein FGF vermitteltes, parakrines Signal zu einer Dysplasie des luminalen Epithels zu führen.

---

## 1.5 Literaturverzeichnis

1. Saag, K.G., et al., *Alendronate for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis Intervention Study Group.* N Engl J Med, 1998. **339**(5): p. 292-9.
2. Buttgerit, F., G.R. Burmester, and B.J. Lipworth, *Inflammation, glucocorticoids and risk of cardiovascular disease.* Nat Clin Pract Rheumatol, 2009. **5**(1): p. 18-9.
3. Gounarides, J.S., et al., *Effect of dexamethasone on glucose tolerance and fat metabolism in a diet-induced obesity mouse model.* Endocrinology, 2008. **149**(2): p. 758-66.
4. Perez, P., et al., *Altered skin development and impaired proliferative and inflammatory responses in transgenic mice overexpressing the glucocorticoid receptor.* FASEB J, 2001. **15**(11): p. 2030-2.
5. Huscher, D., et al., *Dose-related patterns of glucocorticoid-induced side effects.* Ann Rheum Dis, 2009. **68**(7): p. 1119-24.
6. Schakman, O., H. Gilson, and J.P. Thissen, *Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy.* J Endocrinol, 2008. **197**(1): p. 1-10.
7. Weinstein, R.S., et al., *Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone.* J Clin Invest, 1998. **102**(2): p. 274-82.
8. Rauch, A., et al., *Glucocorticoids suppress bone formation by attenuating osteoblast differentiation via the monomeric glucocorticoid receptor.* Cell Metab, 2010. **11**(6): p. 517-31.
9. Zebaze, R.M., et al., *Intracortical remodelling and porosity in the distal radius and post-mortem femurs of women: a cross-sectional study.* Lancet, 2010. **375**(9727): p. 1729-36.
10. Wang, Q., et al., *Rapid growth produces transient cortical weakness: A risk factor for metaphyseal fractures during puberty.* J Bone Miner Res, 2010. **25**(7): p. 1521-6.
11. Sun, P., et al., *Effects of alendronate and strontium ranelate on cancellous and cortical bone mass in glucocorticoid-treated adult rats.* Calcif Tissue Int, 2010. **86**(6): p. 495-501.



- 
12. Zhou, H., et al., *Glucocorticoid-dependent Wnt signaling by mature osteoblasts is a key regulator of cranial skeletal development in mice*. *Development*, 2009. **136**(3): p. 427-36.
  13. Sher, L.B., et al., *Transgenic expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in osteoblasts reveals an anabolic role for endogenous glucocorticoids in bone*. *Endocrinology*, 2004. **145**(2): p. 922-9.
  14. Sher, L.B., et al., *Impaired cortical bone acquisition and osteoblast differentiation in mice with osteoblast-targeted disruption of glucocorticoid signaling*. *Calcif Tissue Int*, 2006. **79**(2): p. 118-25.
  15. Mohler, J.L., et al., *Androgen and glucocorticoid receptors in the stroma and epithelium of prostatic hyperplasia and carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 1996. **2**(5): p. 889-95.
  16. Kuroki, Y., et al., *Short-term effects of glucocorticoid therapy on biochemical markers of bone metabolism in Japanese patients: a prospective study*. *J Bone Miner Metab*, 2008. **26**(3): p. 271-8.
  17. Leclerc, N., et al., *Glucocorticoids inhibit osteocalcin transcription in osteoblasts by suppressing Egr2/Krox20-binding enhancer*. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(3): p. 929-39.
  18. Dovoio, A., et al., *Immediate fall of bone formation and transient increase of bone resorption in the course of high-dose, short-term glucocorticoid therapy in young patients with multiple sclerosis*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(10): p. 4923-8.
  19. Laan, R.F., et al., *Differential effects of glucocorticoids on cortical appendicular and cortical vertebral bone mineral content*. *Calcif Tissue Int*, 1993. **52**(1): p. 5-9.
  20. Wetzsteon, R.J., et al., *Divergent effects of glucocorticoids on cortical and trabecular compartment BMD in childhood nephrotic syndrome*. *J Bone Miner Res*, 2009. **24**(3): p. 503-13.
  21. Kim, H.J., et al., *Glucocorticoids suppress bone formation via the osteoclast*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(8): p. 2152-60.
  22. Lerman, S.A., et al., *Effects of corticosterone on reproduction in male Sprague-Dawley rats*. *Reprod Toxicol*, 1997. **11**(6): p. 799-805.
  23. Thomson, A.A. and G.R. Cunha, *Prostatic growth and development are regulated by FGF10*. *Development*, 1999. **126**(16): p. 3693-701.
  24. Chung, L.W., et al., *Stromal-epithelial interaction in prostate cancer progression*. *Clin Genitourin Cancer*, 2006. **5**(2): p. 162-70.

## 2. Anteilserklärung

Holger Henneicke hat folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

### **Publikation 1:**

Herrmann M, Henneicke H, Street J, Modzelewski J, Kalak R, Buttgerit F, Dunstan CR, Zhou H, Seibel MJ *The Challenge of Continuous Exogenous Glucocorticoid Administration in Mice*. Steroids 2009;74(2):245-249.

45 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Herr Henneicke hat den Großteil der *In Vivo* Experimente sowie die Assays zur Bestimmung der Serummarker durchgeführt. Weiterhin hat Herr Henneicke bei der Statistischen Auswertung der Ergebnisse geholfen und das Manuskript korrekturgelesen.

### **Publikation 2:**

Simanainen U, Lampinen A, Henneicke H, Brennan TC, Heinevetter U, Harwood DT, McNamara K, Herrmann M, Seibel MJ, Handelsman DJ, Zhou H *Long-Term Corticosterone Treatment Induced Lobe-Specific Pathology in Mouse Prostate*. The Prostate 2010;71:289–97.

15 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Herr Henneicke hat den Großteil der *In Vivo* Experimente durchgeführt. Weiterhin hat er bei der statistischen Auswertung geholfen und das Manuskript der Publikation korrekturgelesen.

**Publikation 3:**

Henneicke H, Herrmann M, Kalak R, Brennan-Speranza TC, Heinevetter U, Bertollo N, Day RE, Huscher D, Buttgerit F, Dunstan CR, Seibel MJ, Zhou H *Corticosterone selectively targets endo-cortical surfaces by an osteoblast-dependent mechanism*. Bone 2011;49:733–742.

55 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Herr Henneicke hat die *In Vivo* Experimente, die anschließende Micro-CT Analyse sowie die Assays zur Bestimmung der Serummarker durchgeführt. Weiterhin hat Herr Henneicke bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse geholfen sowie das Manuskript der Publikation verfasst.

---

Prof. Dr. med. Frank Buttgerit

---

Holger Henneicke

### 3.1 Publikation 1: Herrmann et al. *Steroids* 2009

Herrmann M, Henneicke H, Street J, Modzelewski J, Kalak R, Buttgereit F, Dunstan CR, Zhou H, Seibel MJ The *Challenge of Continuous Exogenous Glucocorticoid Administration in Mice*. *Steroids* 2009;74(2):245-249.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2008.11.009>













**3.2 Publikation 2: Simanainen et al. *The Prostate* 2010**

Simanainen U, Lampinen A, Henneicke H, Brennan TC, Heinevetter U, Harwood DT, McNamara K, Herrmann M, Seibel MJ, Handelsman DJ, Zhou H *Long-Term Corticosterone Treatment Induced Lobe-Specific Pathology in Mouse Prostate*. *The Prostate* 2010;71:289–97.

<http://dx.doi.org/10.1002/pros.21242>





















### 3.3 Publikation 3: Henneicke et al. *Bone* 2011

Henneicke H, Herrmann M, Kalak R, Brennan-Speranza TC, Heinevetter U, Bertollo N, Day RE, Huscher D, Buttgereit F, Dunstan CR, Seibel MJ, Zhou H *Corticosterone selectively targets endo-cortical surfaces by an osteoblast-dependent mechanism*. *Bone* 2011;49:733–742.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2011.06.013>























#### **4. Curriculum Vitae**

Der Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version der Arbeit nicht veröffentlicht.





---

## 5. Publikationsliste

### Publikationen

Henneicke H\*, Herrmann M\*, Kalak R, Brennan-Speranza TC, Heinevetter U, Bertollo N, Day RE, Huscher D, Buttgereit F, Dunstan CR, Seibel MJ, Zhou H *Corticosterone selectively targets endo-cortical surfaces by an osteoblast-dependent mechanism*. Bone 2011;49:733–742. Impact Factor: 4.601

\* equal contribution

Simanainen U, Lampinen A, Henneicke H, Brennan TC, Heinevetter U, Harwood DT, McNamara K, Herrmann M, Seibel MJ, Handelsman DJ, Zhou H *Long-Term Corticosterone Treatment Induced Lobe-Specific Pathology in Mouse Prostate*. The Prostate 2010;71:289–97. Impact Factor: 3.377

Herrmann M\*, Henneicke H\*, Street J, Modzelewski J, Kalak R, Buttgereit F, Dunstan CR, Zhou H, Seibel MJ *The Challenge of Continuous Exogenous Glucocorticoid Administration in Mice*. Steroids 2009;74(2):245-249. Impact Factor: 2.626

\* equal contribution

### Konferenzvorträge

Henneicke H, Herrmann M, Street J, Modzelewski J, Buttgereit F, Zhou H, Seibel MJ *Glucocorticoid-Induced Fat Accrual is Mediated by the Osteoblast*. American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting, Denver, Colorado, September 2009

Henneicke H, Herrmann M, Street J, Modzelewski J, Buttgereit F, Zhou H, Seibel MJ *Glucocorticoid-Induced Fat Accrual is Mediated by the Osteoblast*. American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, Philadelphia, Pennsylvania, October 2009

**Konferenzposter**

Herrmann M, Henneicke H, Street J, Modzelewski J, Kalak R, Buttgerit F, Dunstan CR, Zhou H, Seibel MJ *The Challenge of Continuous Exogenous Glucocorticoid Administration in Mice*. American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting, Montréal, Québec, Canada, September 2008

## **6. Erklärung**

Ich, Holger Henneicke, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Wirkmechanismen von Glucocorticoiden im Knochen und in der Prostata im Mausmodell“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum: \_\_\_\_\_

Unterschrift: \_\_\_\_\_

Holger Henneicke

## 7. Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater Prof. Dr. Frank Buttgerit für die kontinuierliche Unterstützung meiner Arbeit und hervorragende Betreuung. Die Aufnahme in die Kooperation mit dem ANZAC Research Institute in Sydney hat mir neue Wege aufgezeigt und mich nachhaltig geprägt. Dafür bin ich zu großem Dank verpflichtet.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bedanken bei Prof. Dr. Markus J. Seibel sowie bei A/Prof. Dr. Hong Zhou. Die Betreuung vor Ort im ANZAC Research Institute hätte nicht besser sein können. Vielen Dank für die freundliche Aufnahme ins Bone Biology Program, immerwährende Unterstützung meiner Vorhaben und nicht zuletzt die zahlreichen Diskussionen und Anregungen.

Weiterer Dank gilt den zahlreichen Mitarbeitern und Doktoranden des ANZAC Research Institutes. Im Besonderen: Dr. Robert Kalak, A/Prof. Dr Colin Dunstan, Dr. Tara Speranza, Janine Street, Dr. Li Laine Ooi, Anastasia Mikuscheva und Sylvia Gasparini.

Ein grosses Dankeschön gebührt an dieser Stelle auch meinen Eltern und meiner Familie, die mich während meiner Promotion immer wieder in jeglicher Form unterstützt haben.