

Aus der Klinik für Kieferorthopädie
(Prof. Dr. med. dent. P. Meyer-Marcotty)
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Untersuchung zur Expression von Sexualhormonrezeptoren in hPDL-Zellen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Annegret Bohnsack

aus

Bad Gandersheim

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in: Prof. Dr. med. dent. P. Meyer-Marcotty

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. med. N. Miosge

Prüfungskommission

Referent/in: Prof. Dr. med. dent. P. Meyer-Marcotty

Ko-Referent/in: i. V. Prof. Dr. rer. nat. C. Gründker

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung: 18.08.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Untersuchung zur Expression von Sexualhormonrezeptoren in hPDL-Zellen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 18.08.2022

.....

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Quast A, Martian V, **Bohnsack A**, Batschkus S, Meyer-Marcotty P, Miosge N (2021):

Donor variation and sex hormone receptors in periodontal ligament cells. Arch. Oral Biol
122, 105026

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Klinischer Hintergrund.....	2
1.2 Das parodontale Ligament.....	4
1.3 Steroidhormonrezeptoren.....	6
1.3.1 Estrogenrezeptoren.....	6
1.3.2 Androgenrezeptor	10
1.3.3 Progesteronrezeptor.....	12
1.4 Ziele der Dissertation	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Material.....	14
2.1.1 Probenmaterial: Primäre Zellen und Zelllinien	14
2.1.2 Antikörper	15
2.1.3 Primer.....	16
2.1.4 Chemikalien und biologische Substanzen	16
2.1.5 Puffer.....	18
2.1.6 Färbelösungen.....	18
2.1.7 Medien.....	19
2.1.8 Kits.....	19
2.1.9 Verbrauchsmaterialien	20
2.1.10 Geräte	20
2.1.11 Software	21
2.2 Methoden.....	22
2.2.1 Explantation und Kultivierung von hPDL-Zellen.....	22
2.2.2 Steroidhormonbehandlung	23
2.2.3 Passagieren der Zellkultur und Zellernte.....	23
2.2.4 Isolation der mRNA	24
2.2.5 RNA Quantifizierung	24
2.2.6 cDNA-Synthese mit dem Biozym cDNA Synthese Kit	25
2.2.7 Quantitative Real-Time PCR.....	25
2.2.8 Statistische Auswertung nach Pfaffl	26
2.2.9 SPSS.....	27
2.2.10 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
2.2.11 Western Blot.....	29
2.2.12 Proteinfärbung der PVDF-Membran.....	30
2.2.13 Immunreaktion Chemolumineszenz des Western Blots.....	30
2.2.14 Immunzytochemie.....	31

2.2.15	Mikroskopieren.....	32
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Quantitative Real-Time PCR.....	33
3.1.1	Pfaffl.....	33
3.1.2	Relatives mRNA Level.....	36
3.2	Western Blot Analyse.....	41
3.2.1	Androgenrezeptor.....	42
3.2.2	Estrogenrezeptor α	44
3.2.3	Estrogenrezeptor β	46
3.2.4	Progesteronrezeptor.....	48
3.3	Immunzytochemie.....	49
3.3.1	Androgenrezeptor.....	50
3.3.2	Estrogenrezeptor α	51
3.3.3	Estrogenrezeptor β	52
3.3.4	Progesteronrezeptor.....	53
4	Diskussion.....	54
4.1	Expressionsanalyse der Steroidhormonrezeptoren.....	54
4.1.1	Androgenrezeptor.....	54
4.1.2	Estrogenrezeptoren.....	55
4.1.3	Progesteronrezeptor.....	57
4.2	Einfluss einer 24-stündigen Steroidhormoninkubation.....	58
4.3	Ausblick.....	59
5	Zusammenfassung.....	61
6	Literaturverzeichnis.....	63

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie des Zahns und Zahnhalteapparates.....	5
Abbildung 2: Proteindarstellung der Estrogenrezeptoren ER α und ER β	6
Abbildung 3: Genomischer Wirkmechanismus.....	7
Abbildung 4: Nicht-genomischer Wirkmechanismus.....	7
Abbildung 5: Übersicht der Isoformen des Estrogenrezeptors ER α	8
Abbildung 6: Übersicht der Isoformen des Estrogenrezeptors ER β	9
Abbildung 7: Domänen des AR.....	10
Abbildung 8: Wirkungsmechanismen der ligandenabhängigen AR Wirkung.....	11
Abbildung 9: Struktur des PR.....	12
Abbildung 10: Pfaffl-Tabelle am Beispiel PDL 7.....	27
Abbildung 11: Zusammenbau Blotkassette.....	30
Abbildung 12: Übersicht der Ratio-Mittelwerte aller Zielgene.	37
Abbildung 13: Auswirkung der Hormonstimulation auf die Genexpression aller Zielgene.	38
Abbildung 14: Coomassie Färbung zum Western Blot (Immunreaktion AR, weiblich).	42
Abbildung 15: Western Blot, Immunreaktion AR, weiblich (Chemolumineszenz).....	42
Abbildung 16: Coomassie Färbung zum Western Blot (Immunreaktion AR, männlich).....	43
Abbildung 17: Western Blot, Immunreaktion AR, männlich (Chemolumineszenz).	43
Abbildung 18: Coomassie Färbung zum Western Blot (Immunreaktion ER α , weiblich).	44
Abbildung 19: Western Blot, Immunreaktion ER α , weiblich (Chemolumineszenz).....	44
Abbildung 20: Coomassie Färbung zum Western Blot (Immunreaktion ER α , männlich).....	45
Abbildung 21: Western Blot, Immunreaktion ER α , männlich (Chemolumineszenz).....	45
Abbildung 22: Coomassie Färbung zum Western Blot (Immunreaktion ER β , weiblich).	46
Abbildung 23: Western Blot, Immunreaktion ER β , weiblich (Chemolumineszenz).	46
Abbildung 24: Coomassie Färbung zum Western Blot (Immunreaktion ER β , männlich).	47
Abbildung 25: Western Blot, Immunreaktion ER β , männlich (Chemolumineszenz).....	47
Abbildung 26: Coomassie Färbung zum Western Blot (Immunreaktion PR, w/m).....	48
Abbildung 27: Western Blot, Immunreaktion PR, w/m (Chemolumineszenz).....	48
Abbildung 28: Immunzytochemie: AR, DAPI, Alexa Fluor 555.....	50
Abbildung 29: Immunzytochemie: ER α , DAPI, Alexa Fluor 555.....	51
Abbildung 30: Immunzytochemie: ER β , DAPI, Alexa Fluor 555.	52
Abbildung 31: Immunzytochemie: PR, DAPI, Alexa Fluor 555.....	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete PDL-Zelllinien.	14
Tabelle 2: Verwendete primäre Antikörper; Western Blot und ICC.....	15
Tabelle 3: Verwendete sekundäre Antikörper; Western Blot.	15
Tabelle 4: Verwendete sekundäre Antikörper; ICC.....	15
Tabelle 5: Verwendete Primer.	16
Tabelle 6: Verwendete Chemikalien und biologische Substanzen.....	16
Tabelle 7: Verwendete Puffer.	18
Tabelle 8: Verwendete Färbelösungen.	18
Tabelle 9: Verwendete Medien.	19
Tabelle 10: Verwendete Kits.....	19
Tabelle 11: Verwendete Verbrauchsmaterialien.	20
Tabelle 12: Verwendete Geräte.	20
Tabelle 13: Verwendete Software.....	21
Tabelle 14: Verwendete Zellmengen im Rahmen der Zellkultur/-ernte.	23
Tabelle 15: Einstellungen Mastercycler ep gradient S realplex 2.	26
Tabelle 16: Versuchsaufbau Immunzytochemie.....	32
Tabelle 17: Pfaffl-Ratio des Zielgens <i>AR</i>	33
Tabelle 18: Pfaffl-Ratio des Zielgens <i>ESR1</i>	34
Tabelle 19: Pfaffl-Ratio des Zielgens <i>ESR2</i>	35
Tabelle 20: Pfaffl-Ratio des Zielgens <i>PR</i>	36
Tabelle 21: Vergleich der relativen mRNA Level nach Geschlecht; Mann-Whitney-U-Test. ...	39
Tabelle 22: Vergleich der relativen mRNA Level nach Geschlecht; Mann-Whitney-U-Test. ...	39
Tabelle 23: Vergleich der relativen mRNA Level nach Steroidhormoninkubation; Wilcoxon- Test.....	40
Tabelle 24: Vergleich der relativen mRNA Level nach Steroidhormoninkubation; Wilcoxon- Test.....	40

Abkürzungsverzeichnis

AF	Aktivierungsfunktion
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	Androgenrezeptor
<i>AR</i>	Gen des Androgenrezeptors
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
COX-2	Cyclooxygenase 2
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DEPC	Diethylcarbonat
DG	Deckgläschen
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E2	17- β -Östradiol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EREs	<i>Estrogen responsive elements</i>
ER α	Estrogenrezeptor α
ER β	Estrogenrezeptor β
<i>ESR1</i>	Gen des Estrogenrezeptors α
<i>ESR2</i>	Gen des Estrogenrezeptors β
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
h.i.	Hitzeinaktiviert
HKG	<i>Housekeeping-gene</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
hTERT, hT	Humane Telomerase-Reverse-Transkriptase
IBM	<i>International Business Machines Corporation</i>

ICC	Immunzytochemie
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LNCaP	<i>Lymph node carcinoma of the prostate</i>
m	Männlich
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation -7</i>
MEM NEAA	<i>Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids Solution</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
n	Probenmenge
OPG	Osteoprotegerin
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PDL	Parodontales Ligament
PDLcs	Parodontale Ligamentzellen
Pg	Progesteron
pH	pH-Wert
PR	Progesteronrezeptor
PR	Gen des Progesteronrezeptors
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative Real-Time PCR
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SM	<i>Second messenger</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
T	Testosteron
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TE	Trypsin-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiam
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett (Strahlung)
w	Weiblich
β 2M	beta2-Mikroglobulin

1 Einleitung

Ziel der kieferorthopädischen Behandlung ist es Zähne im Knochen an eine funktionell und ästhetisch möglichst ideale Position im Kiefer zu bewegen. Dabei werden Zahnbewegungen durch orthodontisch applizierte Kräfte möglich, die kontinuierliche Umbauvorgänge am Knochen induzieren (Reitan 1967; Melsen 1999; Baloul 2015). Dieses Remodelling wird durch die Zellen des parodontalen Ligaments (PDLs) vermittelt (Kanzaki et al. 2002; Jiang et al. 2016) und setzt sich aus Knochenresorption in Druckzonen und -adsorption in Zugzonen zusammen.

Aktuell betreffen wissenschaftliche Bemühungen im kieferorthopädischen Bereich besonders die Verkürzung der Behandlungszeit (Makrygiannakis et al. 2018; Fu et al. 2019), da sie bislang nur unzureichend vorausgesagt werden kann und zwischen einzelnen Patienten stark variiert (Giannopoulou et al. 2016). Als Schlüsselmediatoren gelten in diesem Zusammenhang unter anderem die Sexualhormone (Celebi et al. 2013; Macari et al. 2016). Vor dem Hintergrund der zunehmenden Nachfrage erwachsener Patienten an kieferorthopädischen Leistungen wird deshalb in den nächsten Jahren insbesondere das Patientenkontingent in den therapeutischen Vordergrund rücken, welches in Verbindung mit einem verändertem Hormonstatus steht. Dies kann bspw. aufgrund von Schwangerschaft, Einnahme oraler Kontrazeptiva, weiterer Hormontherapien oder im Rahmen des Klimakteriums der Fall sein.

Diesem interessanten Themenkomplex widmet sich auch diese Dissertation: Durch Untersuchung der PDLs in Hinblick auf die Expression der klassischen Steroidhormonrezeptoren (Androgenrezeptor (AR), Estrogenrezeptor α (ER α), Estrogenrezeptor β (ER β), Progesteronrezeptor (PR)) in Abhängigkeit des Geschlechts und einer 24-stündigen Steroidhormonstimulation, soll diese Arbeit der weiteren Erfassung des potenziellen Einflusses verschiedener Steroidhormone auf die kieferorthopädische Zahnbewegung dienen.

Die PDLs nehmen eine wichtige Vermittlungsposition zwischen angewandter kieferorthopädischer Kraft und der biologischen Reaktion durch Anpassung ihrer Form, Gen- und Proteinexpression ein (Araujo et al. 2007). So werden Umbauprozesse auf molekular-genetischer Ebene von einem veränderten Genexpressionsverhalten der PDLs begleitet, bei denen mechanischer Stress unter anderem zu einer Regulierung des *Receptor*

Activator of NF- κ B Ligand (RANKL), der Cyclooxygenase 2 (COX-2) und Ephrin führt (Kanzaki et al. 2002; Diercke et al. 2011; Fleissig et al. 2018).

Im Gewebe des parodontalen Ligaments (PDL) konnten Osteo- und Zementoprogenitorzellen nachgewiesen werden (Roberts und Jee 1974; Gould et al. 1980; Roberts und Morey 1985; Roberts et al. 1987), die sich zu Osteo- bzw. Zementoblasten differenzieren und so in der Lage sind knochenartiges Gewebe zu produzieren. *In vitro* wiesen PDLCs durch Bildung mineralischer Knötchen osteoblastenähnliche phänotypische Eigenschaften auf, wodurch die Fähigkeit zur Selbstregeneration bewiesen werden konnte (Mukai et al. 1993; Basdra und Komposch 1997). Östradiol fördert diese osteoblastischen Eigenschaften (Morishita et al. 1999a; Morishita et al. 1998). Der zugrundeliegende molekulare Mechanismus durch den Östradiol die Knochen- und Remodellierungseffekte in PDLCs vermittelt, bleibt jedoch umstritten (Morishita et al. 1999b; Cao et al. 2007; Tang et al. 2008). Daneben nehmen neben hormoneller Stimulation möglicherweise auch das Geschlecht oder eine frühere orthodontische Zahnbewegung aufgrund verschiedener bzw. veränderter Genexpressionslevel Einfluss auf die PDLC-Biologie (Araujo et al. 2007; Ronen und Benvenisty 2014).

Wissenschaftliche Untersuchungen zu PR und AR in PDLCs sind selten und teils widersprüchlich (Parkar et al. 1996; Jönsson et al. 2005; Yuan et al. 2010). Einige Studien gestalten sich zudem aufgrund fehlender Informationen zu spender- oder zahnspezifischen Faktoren und Bedingungen der Zellkultur schwierig in ihrer Interpretation (Marchesan et al. 2011).

Die Motivation dieser Arbeit liegt darin, zu einer Klärung der inkonsistenten Aussagen bezüglich der Sexualhormonrezeptorexpression in PDLCs unter Berücksichtigung des Geschlechts sowie möglicher autoregulatorischer Wirkungen beizutragen. Hierdurch soll ein weiterer Baustein für die Entwicklung einer individualmedizinischen Patientenbetreuung mit personalisierten Behandlungsstrategien in der Kieferorthopädie gelegt werden.

1.1 Klinischer Hintergrund

Zunehmend belegen wissenschaftliche Untersuchungen, was schon lange im klinischen Alltag erahnt werden konnte: Die Geschwindigkeit von Zahnbewegung im Rahmen kieferorthopädischer Therapien unterliegt deutlichen interindividuellen Differenzen. Unter verschiedenen Probanden konnten dabei sogenannte *Slow Mover* und *Fast Mover* identifiziert werden, wobei die Zahnbewegungsgeschwindigkeiten innerhalb desselben Subjekts stark

korrelierten (Giannopoulou et al. 2014). Bestimmte Behandlungen scheinen bei erwachsenen Patienten zeitaufwändiger zu sein als bei Kindern oder Jugendlichen (Göz 1990). Dies könnte auf einen sich während des Alterns verändernden Knochenstoffwechsel zurückzuführen sein (Klingsberg und Butcher 1960; Baumhammers et al. 1965), oder auch an der Verwendung unangemessener Stimuli liegen, da die biologischen Anforderungen für die Induktion optimaler Gewebereaktionen bei Personen verschiedenen Alters unterschiedlich sein können (Melsen 1991). Vor diesem Hintergrund wird jedoch nicht nur das Alter, sondern auch das Geschlecht als möglicher Einflussfaktor diskutiert:

Sexualhormone stehen in dem Verdacht die Knochenhomöostase zu verändern und dadurch die Geschwindigkeit der kieferorthopädischen Zahnbewegung zu beeinflussen. 2016 wurde erstmals ein Fallbericht zu kieferorthopädischen Nebenwirkungen als Reaktion auf eine Östrogenbehandlung vorgestellt, in dessen Rahmen ausgeprägte Wurzelresorptionen nach Beginn einer geschlechtsangleichenden Hormontherapie beobachtet werden konnten (Scharf et al. 2016). Da die Forschung am Menschen jedoch erheblichen ethischen und praktischen Einschränkungen unterliegt, erfolgte der überwiegende Anteil darauffolgender Studien an verschiedenen Tiermodellen: Ein aktueller Review vergleicht das Ausmaß der kieferorthopädischen Zahnbewegung zwischen schwangeren/stillenden und nicht trächtigen Tieren (Omar und Kaklamanos 2020). Eine darunter beschriebene Studie zeigte, dass sich die Zahnbewegungsrate unter Laktationseinfluss um 50% erhöht. Der Anstieg während der Schwangerschaft hingegen zeigte keine statistische Signifikanz (Macari et al. 2018).

Im Rahmen einer Schwangerschaft verändert sich neben dem Gewebemetabolismus durch Steigerung des Östrogen- und Progesteronspiegels (Skouteris 2018a) auch der Bedarf an Mineralien zur Mineralisierung des fetalen Skeletts, sodass es zu einer Verringerung der mütterlichen Knochenmineraldichte kommt (Tojo et al. 1998; Skouteris 2018b). Angesichts dessen obliegt dem Östrogen aller Voraussicht nach eine osteoprotektive Wirkung, die sich vermutlich durch eine Verhinderung der Osteoklastogenese sowie die Wirkung auf das RANKL/OPG System erklärt (Srivastava et al. 2001; Nakamura et al. 2007; Drake et al. 2015). Da in einer anderen Studie aber auch der Nachweis einer signifikant erhöhten Zahnbewegung bei weiblichen im Vergleich zu männlichen Ratten gelang (Seifi et al. 2015), bedarf es zu einer abschließenden Aussage bezüglich der Funktions- und Wirkungsweise des Östrogens weiterer Untersuchungen.

Aller Voraussicht nach ebenfalls osteoprotektiv wirkt auch Progesteron, da es über die zugehörigen Rezeptoren in Osteoblasten agiert und die Knochenmatrix über Hemmung der Metalloproteinasen reguliert (Wei et al. 1993; Singh et al. 2013; Allen et al. 2014).

Die darauffolgende Phase der Laktation ist von Östrogenmangel, Schwankungen des Androgenspiegels, einem Osteoklastenanstieg und der damit insgesamt einhergehenden Knochenmassenreduktion geprägt (Prior et al. 1997; Clément-Lacroix et al. 1999; Abraham et al. 2003). Zu diesem Zeitpunkt fungiert das osteoresorptiv wirkende Prolaktin als Schlüsselregulator des Knochenumbaus durch Modulation des Sexualhormonspiegels (VanHouten und Wysolmerski 2003; Bernard et al. 2019). Vor diesem Hintergrund ist folglich eine möglicherweise erhöhte Zahnbewegungsrate in Phasen hormonell bedingter, verringerter Kieferknochenmineralisation anzunehmen.

Diese Auswirkung auf die kieferorthopädische Zahnbewegung durch adaptive Veränderungen in der Knochenhomöostase legt auch eine weitere Studie nahe, die die Variation des Ausmaßes der kieferorthopädisch induzierten Zahnbewegung beim Menschen und mögliche Zusammenhänge zwischen dem Ausmaß der Zahnbewegung mit dem Alter und dem behandelten Kiefer untersucht: Zwischen den beobachteten Individuen mit verschiedenem biologischem Profil (Alter, Geschlecht) variierte die Strecke der zurückgelegten Zahnbewegung erheblich (Giannopoulou et al. 2016). Damit rückt nicht nur der weibliche, sondern auch der männliche Hormonstatus ins Blickfeld.

Wie Östrogen wirken auch Androgene auf den Knochenstoffwechsel und besitzen eine essentielle Rolle für die Reifung und Aufrechterhaltung des männlichen Skeletts (Prakasam et al. 1999; Fujita et al. 2004; Seifi et al. 2015). Der Wirkmechanismus ist dabei noch nicht in allen Details vollständig erforscht, aber grundsätzlich als multifaktoriell zu beschreiben: Testosteron wirkt einerseits direkt auf Osteoblasten, andererseits aber auch auf verschiedene Mediatoren wie *Transforming Growth Factors*, über die Verringerung des knochenresorptiven Interleukin 1 oder durch Hemmung der Prostaglandin E₂-Synthese (Colvard et al. 1989; Fukayama und Tashjian 1989). Zumindest teilweise erfolgt die knochenstimulierende Wirkung von Androgenen zudem über die Metabolisierung zu Östradiol (Kudlacek et al. 1999).

1.2 Das parodontale Ligament

Anatomisch besteht das Parodontium von außen nach innen aus der Gingiva, dem Alveolarknochen, dem PDL sowie dem Wurzelzement (Kleber 1998)(Abbildung 1). Das PDL enthält hauptsächlich Kollagenfasern und ist primär fibrös, setzt sich aber auch aus Blutgefäßen, Lymphgefäßen, Nerven, der extrazellulären Matrix und einer Vielzahl an Zellen zusammen (Bevelander und Nakahara 1968; Lekic et al. 1997). Der zelluläre Anteil besteht neben einem Hauptanteil an Fibroblasten (Osborn 1981; Nanci und Bosshardt 2006) unter

anderem aus Osteoblasten und -klasten, Osteo- und Zementoprogenitorzellen, Zementoblasten, Dentoklasten, epithelialen Zellresten und Leukozyten (Schroeder 2000).

In erster Linie ermöglicht das PDL eine bindegewebige Aufhängung des Zahnes in der Alveole über die Sharpey-Fasern und schafft damit eine gelenkartige Verbindung zwischen Zahn und Knochen. Daneben erfüllt es weitere diverse Funktionen wie Unterstützung des Zahndurchbruchs (Popowics et al. 2014; Rabea 2018), Gewährleistung der physiologischen Zahnbeweglichkeit, Vermittlung sensorischer Reize auf das mastikatorische System (Beertsen et al. 1997) und den physiologischen oder induzierten Umbau des Alveolarknochens.

Im Ruhezustand liegen die Sharpey-Fasern in gewellter Form vor, können aber durch Belastung (z.B. Kauen) gestreckt werden und so durch ihren schrägen Faserverlauf auftretende Druckkräfte in auf den Knochen wirkende Zugkräfte umwandeln. Je nach gerichteter, falscher oder fehlender Belastung kommt es zum Knochenaufbau (bzw. -erhalt), -abbau oder -umbau, welches sich kieferorthopädische Therapiemaßnahmen durch zielgerichtete Druck- und Zugbelastung zur Korrektur von Zahn- und Kieferfehlstellungen zu Nutze machen (Davidovitch 1991; Schroeder 2000; Kawarizadeh et al. 2004). Das mutmaßliche osteoblastische Potential der PDLCs ist dabei von entscheidender Bedeutung, um die biologischen Grundlagen vieler klinischer Strategien in der Kieferorthopädie zu verstehen.

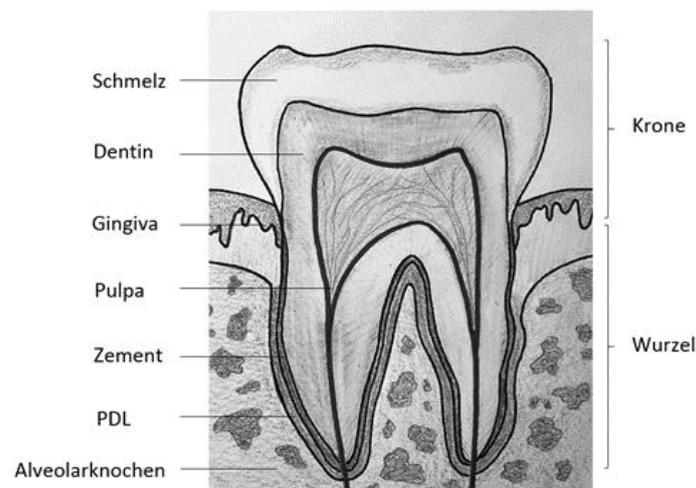


Abbildung 1: Anatomie des Zahns und Zahnhalteapparates. Lokalisation des parodontalen Ligaments zwischen Zahnzement und Alveolarknochen.

1.3 Steroidhormonrezeptoren

1.3.1 Estrogenrezeptoren

Die Steroidhormonrezeptoren ER α und ER β gehören zu den nuklearen Rezeptoren der Gruppe NR3I (*nuclear receptor subfamily 3, group I*) und werden durch das Steroidhormon Estrogen aktiviert.

Ihre wichtigste Funktion ist ihre Wirkung als DNA-bindender Transkriptionsfaktor (Evans 1988; Beato 1989). Estradiol reguliert über die Rezeptoren eine Vielzahl physiologischer Prozesse wie die Proliferation, Differenzierung und Physiologie des weiblichen reproduktiven Systems (Pearce und Jordan 2004), den Leber-, Fett- und Knochenzellstoffwechsel, die kardiovaskuläre und neuronale Aktivität sowie die embryonale und fetale Entwicklung (Norman und Litwack 1987; George und Wilson 1988; Auchus und Fuqua 1994). Zudem ist bekannt, dass Östrogene auch verschiedene pathologische Prozesse beeinflussen: Darunter die Entstehung von Mamma-, Endometrium- und Ovarialkarzinomen (Henderson et al. 1988; Russo et al. 2006) und Osteoporose (Horowitz 1993).

Seit 1996 sind zwei Estrogenrezeptoren bekannt (Kuiper et al. 1996), die jeweils aus acht Exons und sieben Introns bestehen. Auf Proteinebene erfolgt die Einteilung in sechs Regionen, bei der jede für diverse funktionelle Untereinheiten steht (Ascenzi et al. 2006) (Abbildung 2). Sie werden von verschiedenen Genen codiert (Green et al. 1986; Kuiper et al. 1996; Mosselman et al. 1996).

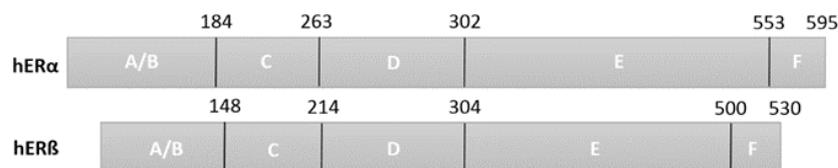


Abbildung 2: Proteindarstellung der Estrogenrezeptoren ER α und ER β . Aminosäureanzahl und Untereinheiten A bis F. (Eigene modifizierte Darstellung nach Matthews und Gustafsson 2003)

Beide Estrogenrezeptoren kommen intra- und extrazellulär über den gesamten Körper verteilt vor und zeigen unterschiedliche, aber überlappende Expressionsmuster in verschiedenen Geweben (Matthews und Gustafsson 2003). Da sie sowohl im Sinne eines Transkriptionsfaktors als auch im Zytoplasma oder an Membranen wirken, unterscheidet man einen genomischen und nicht-genomischen Wirkungsmechanismus.

Abbildung 3 zeigt die direkte Genaktivierung auf genomischer Ebene, bei der die Bindung von Estrogen eine Konformationsänderung des Rezeptors mit anschließender Dimerisierung bedingt.

Das Dimer vereinigt sich im Anschluss mit einer spezifischen DNA-Sequenz (*estrogen responsive elements*, EREs), wodurch das Gen aktiviert und transkribiert wird (Nilsson et al. 2001).

Abbildung 4 zeigt die Aktivierung des nicht-genomischen Wirkmechanismus über *second messenger* (SM) Proteine. Die Signalweiterleitung erfolgt innerhalb von Sekunden, ohne dabei auf genomischer Ebene zu fungieren (Szego und Davis 1967). Hierbei ist jedoch nicht abschließend geklärt, ob es sich dabei um die gleichen Rezeptoren oder um G-Protein gekoppelte Steroidrezeptoren handelt (Maggiolini et al. 2004; Funakoshi et al. 2006; Pedram et al. 2006; Warner und Gustafsson 2006).

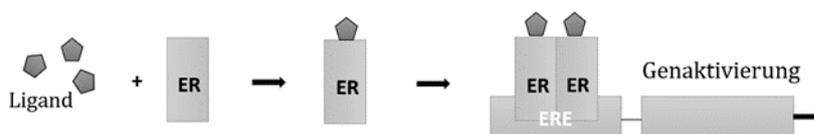


Abbildung 3: Genomischer Wirkmechanismus. Direkte Genaktivierung durch Dimerisierung und Bindung an den ERE Promoter. (Eigene modifizierte Darstellung nach Morani et al. 2008)

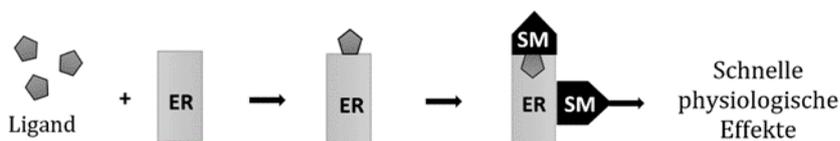


Abbildung 4: Nicht-genomischer Wirkmechanismus. Aktivierung des nicht-genomischen Wegs über second messenger (SM) Proteine. (Eigene modifizierte Darstellung nach Morani et al. 2008)

Der Vorgang des alternativen Splicings führt zur Existenz mehrerer Isoformen von ER α und ER β (Fuqua et al. 1999; Poola et al. 2000; Lewandowski et al. 2002; Ascenzi et al. 2006).

Zu ER α 66 sind folgende Isoformen bekannt: ER α 46, ER α 36 und ER α 80. Sie wirken der ER α 66 Form entgegen. 2005 konnte erstmals neben ER α 66 die Isoform ER α 46 in der MCF-7 Brustkrebszelllinie identifiziert werden (Penot et al. 2005). ER α 66 ist an der Regulation der Zellproliferation beteiligt. Die Isoform ER α 46 tritt ER α 66 gegenüber als Gegenspieler auf und wird vermehrt bei hoher Zelldichte und Proliferationsstagnation exprimiert (Penot et al. 2005). ER α 36 befindet sich hauptsächlich an der Plasmamembran und im Zytoplasma (Rao et al. 2011). Sie nutzt den nicht-genomischen Wirkungsmechanismus und kann mittels schneller Signalübertragung z.B. die

Zellproliferation erhöhen oder den genomischen Wirkungsmechanismus von ER α und ER β inhibieren (Wang et al. 2005).

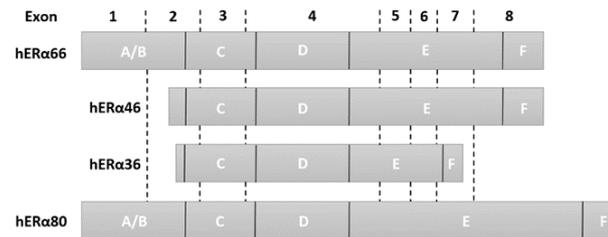


Abbildung 5: Übersicht der Isoformen des Estrogenrezeptors ER α . Schematischer Vergleich zwischen ER α 66 und den am häufigsten beschriebenen Isoformen ER α 46, ER α 36 und ER α 80. (Eigene modifizierte Darstellung nach Sotoca et al. 2012)

ER β wird in die fünf am häufigsten vorkommenden Isoformen eingeteilt: ER β 1, ER β 2, ER β 3, ER β 4 und ER β 5 (Moore et al. 1998). ER β 1 ist aus acht Exons translatiert und wird von 530 Aminosäuren codiert (Zhao et al. 2008). Sie ist die bislang am besten erforschte Isoform, während ER β 2 und ER β 5 in ihrer funktionellen Bedeutung bis dato weniger analysiert wurden. *In-vitro*-Studien zeigen, dass ER β 4 und ER β 5 mit ER β 1 heterodimerisieren und dessen Transaktivierung in ligandenabhängiger Weise verstärken können (Leung et al. 2006). Die Expression von ER β 3 scheint auf den Hoden beschränkt zu sein (Moore et al. 1998). ER β 2 hemmt die ligandeninduzierte ER α -Transkriptionsaktivität auf einem ERE-Reportergeräten (Ogawa et al. 1998) und induziert, vermutlich durch die Bildung von ER β 2/ER α -Heterodimeren, einen proteasomabhängigen Abbau von ER α (Zhao et al. 2007). ER β 2, 4 und 5 bilden keine Homodimere und weisen keine eigene Aktivität auf. Deshalb wird unter anderem angenommen, dass ER β 1 der obligatorische Partner eines ER β -Dimers ist, während die anderen Isoformen als variable Dimer-Partner mit Enhancer-Aktivität fungieren (Leung et al. 2006). Im Vergleich zu ER α wird ER β eine Regulationsfunktion im Bereich der Differenzierung zugesprochen (Ogawa et al. 1998; Leung et al. 2006; Kao et al. 2018).

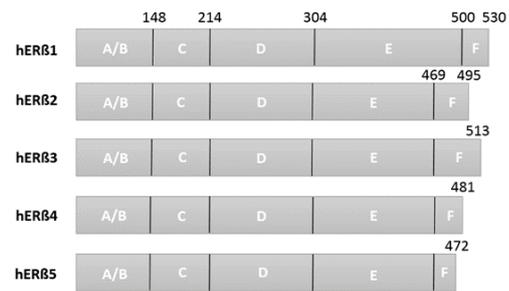


Abbildung 6: Übersicht der Isoformen des Estrogenrezeptors ER β . Schematischer Vergleich zwischen ER β 1 und den am häufigsten beschriebenen Isoformen ER β 2, 3, 4, 5. (Eigene modifizierte Darstellung nach Sotoca et al. 2012)

1.3.2 Androgenrezeptor

Die Wirkung von Androgenen wie Testosteron und Dihydrotestosteron wird über den AR vermittelt. Der AR trägt die systematische Bezeichnung NR3C4 und gehört als ligandenabhängiger Kerntranskriptionsfaktor, wie auch die ER, PR, Glukokortikoid- und Mineralokortikoidrezeptoren, zur Familie der Steroidhormon-Kernrezeptoren (Davey und Grossmann 2016).

Der AR wird in unterschiedlichen Geweben exprimiert und ist an einer Vielzahl von biologischen Prozessen, wie beispielsweise der Entwicklung und Aufrechterhaltung des reproduktiven, muskuloskelettalen, kardiovaskulären, immunen, neuralen und hämatopoetischen Systems, beteiligt (Davey und Grossmann 2016).

Das AR-Gen (*AR*) besteht aus acht Exons, die ein 110-kDa-Protein (*full-length*) codieren. In der Literatur werden drei Hauptfunktionsbereiche des Rezeptors beschrieben: Die N-terminale transkriptionale Regulationsdomäne, die DNA-Bindungsdomäne (DBD) und die Ligandenbindungsdomäne (LBD) (Gelman 2002; Guo et al. 2009) (Abbildung 7). Bindet Testosteron oder Dihydrotestosteron an die LBD, wird die Translokation des Rezeptors in den Kern und so die anschließende Transkriptionsregulation von Genen, die auf Androgene reagieren, ermöglicht (Shang et al. 2002).

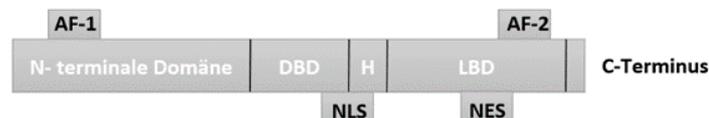


Abbildung 7: Domänen des AR. N-terminale-Domäne, DNA-Bindungsdomäne (DBD), Ligandenbindungsdomäne (LBD), Gelenkregion (H), Transkriptionsaktivierungsfunktion 1 (AF-1), Transkriptionsaktivierungsfunktion 2 (AF-2), Kernlokalisierungssignal (NLS), Kernexportsignal (NES). (Eigene modifizierte Darstellung nach Davey und Grossmann 2016)

Die Aktivierung des AR erfolgt nach erfolgreicher Bindung eines Androgenmoleküls über die Konformitätsänderung des Rezeptors. In jüngeren Studien wurden unter anderem ligandenunabhängige Wirkungsweisen des AR beschrieben (Lyons et al. 2008; Kim und Lee 2009), nachfolgend seien jedoch die zwei klassischen Varianten der ligandenabhängigen Wirkungsmechanismen benannt:

Über den DNA-Bindungs-abhängigen Mechanismus wird bspw. die Transkription eines Zielgens reguliert und über den Nicht-DNA-Bindungs-abhängigen Mechanismus schnellere zelluläre Ereignisse geleitet, wie z.B. die Phosphorylierung von SM-Signalkaskaden (Davey und Grossmann 2016) (Abbildung 8).

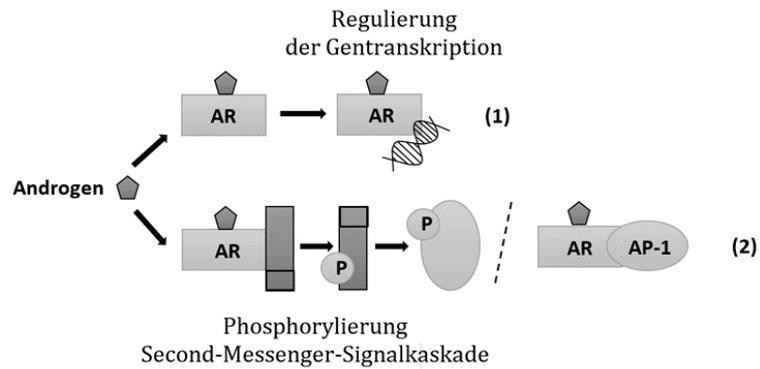


Abbildung 8: Wirkungsmechanismen der ligandenabhängigen AR Wirkung. Mechanismen der ligandenabhängigen Wirkung des AR: (1) DNA-bindungsabhängig (DBD) und (2) Nicht-DNA-Bindung (DBD) -abhängig. Aktivatorprotein 1 (AP-1). (Eigene modifizierte Darstellung nach Rana et al. 2014)

In der Literatur sind zwei Isoformen des AR bekannt: AR-A (87kDA) und AR-B (110kDA). Sowohl AR-A als auch AR-B sind in einer Vielzahl von Geweben vorhanden und ähneln strukturell den Isoformen von PR-A und PR-B (Wilson und McPhaul 1996).

1.3.3 Progesteronrezeptor

Der PR gehört als ligandenaktivierter Kerntranskriptionsfaktor unter der Bezeichnung NR3C3 ebenfalls zur Familie der Steroidhormon-Kernrezeptoren (Evans 1988; McEwan et al. 2004). Es existieren *in vivo* zwei Isoformen: PR-A und PR-B, die durch dasselbe Gen kodiert werden (Kastner et al. 1990; Gronemeyer et al. 1991). Die dritte Isoform PR-C wird *in vivo* nicht exprimiert und hat keine physiologisch bedeutsame Wirkung (Samalecos und Gellersen 2008). Im Nachfolgenden werden deshalb nur PR-A und PR-B weiter betrachtet:

Die humane PR-B-Form setzt sich aus 933 Aminosäuren zusammen und hat einen längeren N-Terminus als die PR-A-Form (Abbildung 9). Dieser beinhaltet die zusätzliche Aktivierungsfunktion AF-3 (Sartorius et al. 1994). PR-A besteht aus 769 Aminosäuren. Beide PR-Subtypen besitzen eine LBD, die die Dimerisierung des Rezeptors vermittelt, in Kombination mit der Aktivierungsfunktion AF-2, die für die ligandenabhängige Transaktivierung verantwortlich ist (Hovland et al. 1998).



Abbildung 9: Struktur des PR. Progesteronrezeptor A (PR-A), Progesteronrezeptor-B (PR-B), DNA-Bindungsdomäne (DBD), Liganden-Bindungsdomäne (LBD), Aktivierungsfunktion 1-3 (AF-1,2,3). (Eigene modifizierte Darstellung nach Freissmuth und Böhm 2012)

Sowohl PR-A als auch PR-B sind von physiologischer Bedeutsamkeit: Neben der Vermittlung verschiedener gewebsspezifischer Wirkungen beim Menschen, spielt Progesteron insbesondere bei der Regulation der physiologischen weiblichen Fortpflanzungsfunktion eine Rolle. Die Wirkungsvermittlung von Progesteron erfolgt dabei über die beschriebenen Rezeptoren (Scarpin et al. 2009). Dabei kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und führt zur Dissoziation von Chaperonen, Dimerisierung, Bindung an Gestagenantwortelementen und Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren, wodurch eine Modulation der Gen-Transkription ermöglicht wird (Beato et al. 1987; Gronemeyer et al. 1991; Tata 2002).

Abgesehen davon kann die Transkription auch über nicht-genomische Wege reguliert werden, wie beispielsweise die Aktivierung von SM-Signalkaskaden (Lange et al. 1998; Nilsen und Brinton 2002; Leonhardt et al. 2003; Nilsen und Brinton 2003).

Beim Menschen werden PR-A und PR-B in den meisten Zielzellen äquivalent exprimiert, was darauf hindeutet, dass alternative Mechanismen die Vielfalt der Progesteronwirkungen

steuern. Vermutet wird, dass PR-A und PR-B verschiedene Genuntergruppen regulieren und darüber unterschiedliche Funktionen erfüllen. Detailliertere Wirkungsmechanismen sind bislang jedoch noch nicht abschließend geklärt (Jacobsen und Horwitz 2012).

1.4 Ziele der Dissertation

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation soll zur weiteren Klärung explizit folgender Fragestellungen beigetragen werden:

1. Expressieren die Zellen des parodontalen Ligaments die klassischen Steroidhormonrezeptoren AR, ER α , ER β und PR? Und wenn ja, liegen im Vergleich der Rezeptoren untereinander geschlechtsspezifische Unterschiede vor?
2. Welche Konsequenz hat eine 24-stündige Steroidhormonbehandlung der PDLCS auf die Expression der Zielgene? Ist ein Nachweis autoregulatorischer Wirkungen der Sexualhormone auf ihre Rezeptoren nachweisbar? Und wenn ja, treten signifikante Differenzen zwischen den Geschlechtern auf?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Probenmaterial: Primäre Zellen und Zelllinien

Die mithilfe der humanen Telomerase-Reverse-Transkriptase (hTERT, hT) immortalisierten Gewebeproben des PDLs stammen von drei weiblichen und drei männlichen Patienten im Alter von 22 bis 30 Jahren. Die Extraktion des dazugehörigen Zahnmaterials erfolgte im Rahmen der kieferorthopädischen Behandlung aufgrund von Platzmangel. Alle verwendeten Zähne unterlagen bis zu diesem Zeitpunkt keiner kieferorthopädischen Bewegung. Die Entnahme und Verwendung der Restgewebe wurde von der Ethik-Kommission der Universitätsmedizin Göttingen, Von-Siebold-Straße 3, 37075 Göttingen unter dem Studientitel „Untersuchung der Reaktionsbereitschaft des parodontalen Ligaments im Kontext kieferorthopädischer Zahnbewegung“ (Antragsnummer 23/7/15) genehmigt. Die teilnehmenden Patienten wurden über die Hintergründe dieser Studie aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Studienteilnahme. Zu den genannten PDLs fanden die humanen Zelllinien MCF-7 und LNCaP Verwendung. Hierbei handelt es sich um Zelllinien des Mamma- (MCF-7) und Prostatakarzinoms (LNCaP), die von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen wurden (MCF-7: ACC 256; LNCaP: ACC 115).

Tabelle 1: Verwendete PDL-Zelllinien.

Zelllinie	Alter [Jahre]	Geschlecht
PDL 7	30	w
PDL 26	25	w
PDL 35	24	w
PDL 15	22	m
PDL 19	22	m
PDL 28	27	m

2.1.2 Antikörper

Tabelle 2: Verwendete primäre Antikörper; Western Blot und ICC.

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Hersteller/Nummer
α -Tubulin	Mouse, monoclonal	WB: 1:5000	Sigma Aldrich (B512) (T6074)
Androgen Receptor	Mouse, monoclonal	WB: 1:100-1:200 ICC: 1:25-1:50	ThermoFisher (AR441) (MA5-13426)
Estrogen Receptor α	Mouse, monoclonal	WB: 1:250-1:800 ICC: 1:500-1:1000	ThermoFisher (1D5) (MA5-13191)
Estrogen Receptor β	Rabbit, polyclonal	WB: 1:250-1:500 ICC: 1:100-1:1000	abcam (ab3576)
Progesterone Receptor	Mouse, monoclonal	WB: 1:50	Santa Cruz (F-4) (sc-166169)
Progesterone Receptor	Mouse, monoclonal	ICC: 1:200	Santa Cruz (AB-52) (sc-810)

Tabelle 3: Verwendete sekundäre Antikörper; Western Blot.

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Hersteller/Nummer
Anti-Mouse IgG (Fab specific)	Goat, polyclonal	1:40000	Sigma Aldrich (A9917)
Anti-Rabbit IgG (whole molecule)	Goat, polyclonal	1:100000	Sigma Aldrich (A0545)

Tabelle 4: Verwendete sekundäre Antikörper; ICC.

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Hersteller/Nummer
Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 555)	Donkey, polyclonal	1:1000	abcam (ab150074)
Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 555)	Goat, polyclonal	1:1000	abcam (ab150114)

Die in Tabelle 4 aufgelisteten sekundären Antikörper wurden zur Markierung des Nukleus (blau) mit DAPI (KPL, Gaithersburg, USA) versetzt.

2.1.3 Primer

Die in Tabelle 5 aufgeführten Primer wurden mithilfe der Software von Primer3Plus designt (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) und von der Eurofin Genomics GmbH mit Sitz in Ebersberg, Deutschland hergestellt.

Tabelle 5: Verwendete Primer.

Zielgen	Sequenz	Annealing Temperatur
<i>AR</i>	fw.:5'-AGGAACTCGATCGTATCATTTGC-3' rev.:5'-GAAGACATCTGAAAGGGGC-3'	63°C
<i>ESR1</i>	fw.: 5'-TGGAGACCACACAAATCAACTA-3' rev.: 5'-GGGAAATCAAATCAAAGACTGC-3'	60°C
<i>ESR2</i>	fw.: 5'-TATAGCCCTGCTGTGATGAATT-3' rev.: 5'-GGTAAGGTGTGTTCTAGCGATCTT-3'	53°C
<i>PR</i>	fw.: 5'-GCGAGAGGCAACTTCTTTCA-3' rev: 5'-GCCACATGGTAAGGCATAA-3'	56°C
<i>β2-Mikroglobulin</i>	fw.: 5'-TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT-3' rev.: 5'-TCTCTGCTCCCCACCTCTAA-3'	61°C

2.1.4 Chemikalien und biologische Substanzen

Tabelle 6: Verwendete Chemikalien und biologische Substanzen.

Substanz	Hersteller
Acrylamid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Coomassie Brilliant Blau R250	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
DAPI (710301)	KPL (Gaithersburg, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Dulbecco´s modified Eagle Medium mit Glutamax™ (DMEM)	Gibco (Carlsbad, USA)
Essigsäure 100%	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)

Substanz	Hersteller
β-Estradiol	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ethanol abs. p.a.	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco (Carlsbad, USA)
Fluorescens Mounting Medium	DAKO (Hamburg, Deutschland)
Gentamycin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glycerin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glycin	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Magermilchpulver	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
MEM NEAA (Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids Solution)	Gibco (Carlsbad, USA)
Humanes Insulin	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Methanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Page Ruler Prestained protein Ladder	ThermoFisher (Bremen, Deutschland)
Paraformaldehyd	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Progesteron	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
RPMI 1640 Medium	Gibco (Carlsbad, USA)
Salzsäure (HCL)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Testosteron	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tetramethylethyldiamid (TEMED)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Triton X100	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Trypsin-EDTA (TE)	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
Tween-20	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
β-Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

2.1.5 Puffer

Tabelle 7: Verwendete Puffer.

Puffer	Zusammensetzung	pH-Wert
3x SDS Probenpuffer	0,3 M Tris 9% SDS 22,5% Glycerin 1 Spatelspitze Bromphenolblau Frisch: 10% β -Mercaptoethanol	6,7
Laufpuffer	50 mM Tris-HCl 380 mM Glycin 0,1% SDS	8,7
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl	6,8
Strippingpuffer	62,5 mM Tris-HCl 2% SDS 150 mM β -Mercaptoethanol	6,7
TBS-T (10x)	200 mM Tris-HCl 1,5 M NaCl 0,5% Tween 20	7,4
Transferpuffer	25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 10% Methanol	8,9
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl	8,9

2.1.6 Färbelösungen

Tabelle 8: Verwendete Färbelösungen.

Färbelösung	Zusammensetzung
Proteinfärbelösung	0,1 g Brilliant-Blau R 250 50 ml Methanol 7 ml Essigsäure Aqua dest. auf 100 ml auffüllen
Entfärber	50 ml Methanol 7 ml Essigsäure Aqua dest. auf 100 ml auffüllen

2.1.7 Medien

Tabelle 9: Verwendete Medien.

Medium	Zusammensetzung
PDLC Medium	500 ml DMEM 10 % FCS 50 µg/ml Gentamycin
MCF-7 Medium	100 ml RPMI 1640 10% h.i. FCS 1 ml MEM NEAA 111 µl Pyruvat (1g/10ml) 100 µl humanes Insulin 100 µl Gentamycin
LNCaP Medium	500 ml RPMI 1640 20% h.i. FCS 625 µl Gentamycin
Einfriermedium	700 µl DMEM 200 µl FCS 100 µl DMSO

2.1.8 Kits

Tabelle 10: Verwendete Kits.

Kit	Hersteller
Biozym cDNA Synthesis Kit	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Kapa SYBR Fast qPCR Kit	Kapa Biosystems (Wilmington, USA)
peqGOLD Total RNA Kit	peqLab (Erlangen, Deutschland)
WesternBright™ Sirius	Biozym (Oldendorf, Deutschland)
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	ThermoFisher (Rockford, USA)

2.1.9 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller
15 ml, 50 ml-Falcon-Tube-Röhrchen	Sarstedt (Nürnberg, Deutschland)
24-Well-Platte mit Deckel	Starlab (Hamburg, Deutschland)
GB 40 Blotting- Papier B004	Heinemann Labortechnik (Duderstadt, Deutschland)
Eppendorf Safe-Lock Röhrchen	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Handschuhe	Starlab (Hamburg, Deutschland)
Immobilon-P Membran, PVDF, 0,45 µm	Millipore Merck (Darmstadt, Deutschland)
Multiplatte 96, weiß, unskirted	Biozym (Oldendorf, Deutschland)
Objektträger (7695002)	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, Deutschland)
Pipettenspitzen (10µl, 20µl, 200µl, 1000µl, 5000µl)	Starlab (Hamburg, Deutschland)
TC-Flasche T75, T25	Sarstedt (Nürnberg, Deutschland)
TC-Platte 6 Well	Sarstedt (Nürnberg, Deutschland)

2.1.10 Geräte

Tabelle 12: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
Axiovert 40 CFL Zeiss	Zeiss (Göttingen, Deutschland)
Biometra Elektrophoresekammer	Nachbau (wissenschaftliches Labor, UMG Göttingen)
C-DiGit Blot Scanner	LI-COR (Bad Homburg, Deutschland)
CanonScan 9000F Mark II	Canon (Krefeld, Deutschland)
Centrifuge 5810	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Centrifuge 5425 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Duomax 1030	Heidolph (Schwabach, Deutschland)

Gerät	Hersteller
Herasafe™ KS12	ThermoFisher (Wilmington, USA)
inoLab ph 720	WTW (Weilheim, Deutschland)
Fluoreszenzmikroskop BZ-X710	KEYENCE (Neu-Isenburg, Deutschland)
Labotect C200 Inkubator	Labotect (Göttingen, Deutschland)
Mastercycler ep gradient S realplex 2	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
PerfectBlue Elektrobloetter	peqLab (Erlangen, Deutschland)
NanoDrop™1000 Spectrophotometer	ThermoFisher (Wilmington, USA)
Nexcelom Cellometer™ Auto T4	peqLab (Erlangen, Deutschland)
Sartorius Extend	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

2.1.11 Software

Tabelle 13: Verwendete Software.

Software	Zugehöriges Gerät
BZ-X Viewer	Fluoreszenzmikroskop BZ-X710
Canon Scan IJ	CanonScan 9000F Mark II
Cellometer Auto	Nexcelom Cellometer™ Auto T4
Image Studio Digits	C-DiGit Blot Scanner
ND-1000	NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer
Mastercycler ep realplex	Mastercycler ep gradient S realplex 2
IBM SPSS Statistics 25	Acer TravelMate P276 series

2.2 Methoden

2.2.1 Explantation und Kultivierung von hPDL-Zellen

Somerman et al. (1988) beschrieb ein Explantationsverfahren von PDLCs. An dieses Protokoll angelehnt wurde eine zuletzt von Dr. Gökhan Cingöz im Jahr 2017 überarbeitete Version als Standardverfahren etabliert. Hierzu wurden von einem desinfizierten Zahn kleine Gewebestücke des mittleren Wurzel Drittels unidirektional abgeschabt und auf geeigneten Deckgläschen in 6-Well-Platten kultiviert. Am Boden fixiert folgte eine zehntägige Inkubation bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Gehalt von 5 % in einem separaten Brutschrank ohne mechanische Irritation oder Wechsel des Kulturmediums. Mit ausreichendem Bewuchs wurden die ausgewanderten Zellen in Zellkulturflaschen (T25) überführt und bis zu einer Konfluenz von 70-80 % weiterkultiviert. Die Primärkulturen fanden ihre Lagerung in flüssigem Stickstoff und wurden unter Dokumentation von Patientenummer, Alter und Geschlecht mit den fortlaufenden Kürzeln PDL 1 bis PDL 32 gekennzeichnet.

Neben der unter Tabelle 1 aufgeführten PDLC-Kulturen fanden zudem die MCF-7- und LNCaP-Zelllinien als Positivkontrollen Verwendung.

Da die direkt aus dem Gewebe gewonnenen primären Zellen in ihrem Teilungspotential beschränkt sind, wurden alle Zelllinien mit der hTERT, einer Untereinheit der Telomerase, immortalisiert, um eine uneingeschränkte Proliferationsfähigkeit der Zellen zu erhalten (Porter et al. 2006; Maqsood et al. 2013).

Sowohl die beschriebene Explantation der PDL-Zellen als auch die Immortalisierung aller Zelllinien erfolgte vor Aufnahme dieser Dissertation im Rahmen vorausgegangener Forschungsprojekte der Abteilung für Kieferorthopädie (Universitätsmedizin Göttingen) und Arbeitsgruppe der Oralen Biologie und Geweberegeneration (Universitätsmedizin Göttingen).

2.2.2 Steroidhormonbehandlung

Zur Detektion des Einflusses der Sexualhormone wurde bei gesondert vorbereiteten T25 Flaschen aller PDLCs das Medium für 24 h jeweils einzeln mit physiologischen Konzentrationen von β -Estradiol (0,2 ng/ml), Progesteron (15 ng/ml) und Testosteron (5 ng/ml) versetzt.

Identisch zu diesem Protokoll wurden die Krebszelllinien gesondert kultiviert und anschließend mit denselben Steroidhormonkonzentrationen für 24 h behandelt. Dabei diente die MCF-7 Zelllinie zur Kontrolle für ER α , ER β und PR, die LNCaP Zelllinie zur Kontrolle für AR - analog zu Koelling und Miosge (2010).

2.2.3 Passagieren der Zellkultur und Zellernte

Nach Konfluenz von 70-80 % wurde das Kulturmedium über den adhärenen Zellverbänden abgeschüttet und im Anschluss zweimal mit PBS (5-10 ml) gewaschen.

Mithilfe mikroskopischer Kontrolle folgte darauf die Trypsinierung mit TE (2 ml). Die gelösten Zellen wurden in ein 50 ml-Falcon-Tube-Röhrchen überführt, die zum Abstoppen der Trypsin-Aktivität mit 2 ml Kulturmedium vorbereitet waren. Es erfolgte ein zwei- bis dreimaliges Waschen der Flaschen zur maximalen Gewinnung der herangewachsenen Zellen mit anschließender Abzentrifugation für 10 min bei 1200 rpm (270 g).

Nach Entfernung des Überstandes war es möglich jedes Zellpellet in einem Milliliter PBS zu resuspendieren und die Zellzahl mithilfe des Nexcelom Cellometers™ Auto T4 zu ermitteln. Ein Teil der geernteten Zellen diente zur Weiterkultivierung, der andere zur Herstellung der Zellpellets zur Weiterverwendung im Rahmen der wissenschaftlichen Versuchsreihen. Dazu wurden die in Tabelle 14 aufgeführten Zellmengen erneut bei 300 g zentrifugiert und nach Dekantieren des Überstandes bei -80 °C eingefroren.

Das Vorgehen zur Gewinnung der Zellpellets erfolgte für die steroidhormonbehandelten Zellkulturen identisch.

Tabelle 14: Verwendete Zellmengen im Rahmen der Zellkultur/-ernte.

Zelllinie	Weiterkultivierung T25 Flasche	Herstellung Zellpellets
PDLCs	5x10 ⁴ Zellen	2x10 ⁵ Zellen
MCF-7	5x10 ⁵ Zellen	2x10 ⁵ Zellen
LNCaP	5x10 ⁵ Zellen	2x10 ⁵ Zellen

2.2.4 Isolation der mRNA

Einzelnen behandelt und stets gekühlt fand die Isolierung der mRNA von 10^5 Zellen niedriger Passage mithilfe des peqGOLD Total RNA Kit der Firma peqLab (Erlangen, Deutschland) nach Herstellerangaben statt.

Im ersten Schritt wurde das Zellpellet mit 400 μ l Lysis Buffer T homogenisiert und auf eine DNA Removing Column gegeben. Aufgesteckt auf zugehörigem Sammelröhrchen folgte die Zentrifugation für 1 min bei 12.000 g und anschließendes Verwerfen des DNA Removing Column.

Es schloss sich das Versetzen des Durchflusses mit 350 μ l des 70 %igen Ethanol an, das als Gemisch in ein Perfect Bind RNA Column gegeben und erneut bei 10.000 g für 1 min zentrifugiert wurde. Es folgten 3 weitere Waschschrirte mit 1 x 500 μ l RNA Wash Buffer I und 2 x 600 μ l RNA Wash Buffer II, bei denen nach jeder Zentrifugation (10.000 g; 30 s) der Durchfluss verworfen wurde. Abschließend wurde für 2 min bei 10.000 g bei offenem Deckel trocken zentrifugiert.

Für das Herauslösen der adsorbierten RNA wurde ein RNase Collection Tube verwendet. Dazu wurde die trockene Binding Column in das RNase Collection Tube gesteckt und mit 30 μ l RNase freiem Wasser (DEPC, Diethylcarbonat) benetzt. Nach dreiminütiger Inkubationszeit erhielt man nach finaler Zentrifugation (5000 g) den RNA enthaltenden Durchfluss, dessen mRNA-Konzentration nun mithilfe des NanoDrop™1000 Spectrophotometer bestimmt werden konnte. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.5 RNA Quantifizierung

Mithilfe des NanoDrop™1000 Spectrophotometer konnte die optische Dichte (OD) der isolierten RNA bei einer Absorption von 260 nm gemessen werden. Dies ermöglichte einerseits die Quantifizierung als auch die Beurteilung der Reinheit. Für RNA gilt: Eine OD_{260nm} entspricht 40 μ g/ml RNA, d.h. $c [ng/\mu l] = OD_{260nm} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 ng/\mu l$.

Für die Durchführung wurden zur Einstellung des Blindwertes (Blank) zunächst 2 μ l DNase-freies Wasser (H₂O DEPC) und anschließend je 2 μ l RNA-Lösung auf die Messoberfläche gegeben und gemessen. Anhand der Ratio 260/280 konnte die Reinheit des Gemisches evaluiert werden. Der Referenzbereich lag dabei optimalerweise für RNA bei 2,0 für DNA bei 1,8.

2.2.6 cDNA-Synthese mit dem Biozym cDNA Synthese Kit

Die Umschreibung der gewonnen RNA in eine doppelsträngige cDNA wurde unter Gebrauch des Biozym cDNA Synthese Kit nach Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt. Dazu wurden 200 ng mRNA mit 2 μ l 10 mM dNTPs, 1 μ l 25 mM hexamer Primer, 4 μ l Puffer, 0,5 μ l RNase Inhibitor (40 u/ μ l) und 1 μ l der Reversen Transkriptase vermengt und im Anschluss mit RNase freiem Wasser (H₂O DEPC) auf 20 μ l aufgefüllt.

Es folgte eine dreistufige Inkubation des Reaktionsansatzes zunächst für 10 min bei 30 °C, dann für 30 min bei 52 °C und final für 5 min bei 99 °C. Um eine Endkonzentration von 1 ng/ μ l cDNA zu erreichen wurde der Reaktionsansatz durch erneutes Zugeben von 180 μ l RNase freiem Wasser (H₂O DEPC) komplettiert. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.7 Quantitative Real-Time PCR

Die Durchführung der quantitativen real-time PCR (qPCR) erfolgte mithilfe des Kapa SYBR Fast qPCR Kits des Unternehmens Kapa Biosystems (Wilmington, USA) und diente zur Untersuchung der Expressionslevel von AR, ER α , ER β , PR und β 2M.

Benötigt wurde dazu jeweils ein Primer- und ein Master-Mix, die vorbereitend hergestellt wurden. Der Primer-Mix bestand aus 160 μ l H₂O DEPC mit 20 μ l forward Primer (100 pmol/ μ l) und 20 μ l reverse Primer (100 pmol/ μ l). Um den Master-Mix herzustellen, wurden pro Ansatz dem Primer-Mix 2 μ l entnommen und einem Gemisch, bestehend aus 2 μ l RNase freiem Wasser (H₂O DEPC) und 5 μ l SYBR-green, beigefügt. Für jedes Probenmaterial wurden 3 Ansätze des Master-Mix in eine dauerhaft gekühlte 96-Well-Platte pipettiert und die entsprechende cDNA hinzugegeben (9 μ l Master-Mix + 1 μ l der cDNA). Die Konglomerate wurden im Anschluss kurz abzentrifugiert und standen dann zur Messung im Mastercycler ep gradient S realplex 2 oder der Aufbewahrung bei -20 °C bereit.

Für aussagekräftige Ergebnisse wurde sich für je drei technische und drei biologische Replikate entschieden. Als Kontrolle dienten die Zelllinien MCF-7 und LNCaP. Die Normalisierung erfolgte mittels des Referenzgens β 2M.

Folgende Einstellungen wurden für die Messung genutzt:

Tabelle 15: Einstellungen Mastercycler ep gradient S realplex 2.

Plate Layout	Einstellung	PCR-Programm	Einstellung
Filter 520 nm	SYBR	1. Initiale Aktivierung	95 °C, 5 min
Reference Dye	NONE	2. Denaturierung (40 Zyklen)	95 °C, 15 s
Sample vol.	10 µl	3. Annealing (Tabelle 5)	15 s
Probe	SYBR	4. Elongation	72 °C, 20 s
Background	MJ white 10 µl Flatcap	5. Final Extension	72 °C, 10 min

2.2.8 Statistische Auswertung nach Pfaffl

Zur statistischen Auswertung der aus der PCR erhaltenen Ct-Werte (threshold cycle) fand die Methode nach Pfaffl (Pfaffl 2001) Anwendung, bei der die gemessenen Fluoreszenz-Emissionen, mit denen des Referenzgens verglichen wurden. Ziel dieses Vorgehens war der Rückschluss auf die relative quantitative Expression des Zielgens. Die Ct-Werte geben dabei an, zu welchem Zeitpunkt das Fluoreszenz-Signal das erste Mal den Schwellenwert übersteigt. Je früher dies im zeitlichen Verlauf geschieht, desto mehr Ausgangsmenge an cDNA ist in der Probe enthalten (Kück 2005). Mögliche Einflussfaktoren der RNA-Extraktion und der cDNA-Synthese auf das Ergebnis wurden durch die Normalisierung mit $\beta 2M$ vermindert, da eventuelle Beeinflussungen sowohl Ziel- als auch Referenzgen betreffen würden. Ein geeignetes Referenzgen unterliegt in seiner Expression keiner in- oder extrinsischen Regulation und exprimiert konstant in allen Geweben. Da $\beta 2M$ sich bereits in vorherigen Experimenten als geeignetes Referenzgen herausstellte wurde es auch für diese Versuchsreihe ausgewählt. Mithilfe der Effizienz korrigierten $\Delta\Delta CT$ Methode (Extensionseffizienz 1,7-1,9) konnten relative quantitative Differenzen zwischen Probe und Kontrollprobe ermittelt werden.

Die Pfaffl Tabelle in Abbildung 10 bildet beispielhaft für die weibliche Zelllinie PDL 7 (ohne Steroidhormoninkubation) die ermittelte Ratio von $ER\alpha$ ab. Verwendung fanden hier je neun Ct-Werte der Probe (1) und die zugehörigen Ct-Werte der Kontrollproben (MCF-7) (2) sowie des Referenzgens ($\beta 2M$) (3, 4). Letzteres diente zur Normalisierung. Durch Berechnungen der Software ergaben sich abschließend neun Ratio (5), die in einem finalen Mittelwert (6) mit Standardabweichung zusammengefasst wurden.

Dieser als Ratio gekennzeichnete Wert spiegelt das relative mRNA Level in Bezug zur Kontrollprobe wider. Folglich wird den Kontrollproben ein Ausgangswert von 1 (=100%) zugewiesen und daran die Menge des Zielgens in den PDLcs gemessen. In dem dargelegten Beispiel enthält PDL 7 somit ca. 2,2 % der mRNA (ER α) im Vergleich zu der MCF-7-Kontrollzellprobe.

Die rot markierten Werte signalisieren den Wert mit der größten Abweichung zum Mittelwert. Im Fall besonders großer Differenzen, bei denen sogenannte Ausreißerwerte eine Standardabweichung von > 0,5 verursachen, wurde die PCR erneut durchgeführt.

Probe: PDL 7 Kontrolle: MCF-7 Primer: ER α HKG: beta2M					
Probe: Ct: Wert 1: 28,67 Ct - Mittelwert : 0,45 Wert 2: 28,79 Ct - Mittelwert : 0,33 Wert 3: 28,83 Ct - Mittelwert : 0,29 Wert 4: 29,08 Ct - Mittelwert : 0,04 Wert 5: 29,12 Ct - Mittelwert : 0,00 Wert 6: 29,32 Ct - Mittelwert : 0,20 Wert 7: 29,33 Ct - Mittelwert : 0,21 Wert 8: 29,38 Ct - Mittelwert : 0,26 Wert 9: 29,58 Ct - Mittelwert : 0,46 Mittelwert: 29,1222 S.D.: 0,30829		Kontrolle: Ct: Wert 1: 23,99 Ct - Mittelwert : 0,28 Wert 2: 23,94 Ct - Mittelwert : 0,23 Wert 3: 23,89 Ct - Mittelwert : 0,18 Wert 4: 23,81 Ct - Mittelwert : 0,10 Wert 5: 23,73 Ct - Mittelwert : 0,02 Wert 6: 23,65 Ct - Mittelwert : 0,06 Wert 7: 23,47 Ct - Mittelwert : 0,24 Wert 8: 23,46 Ct - Mittelwert : 0,25 Wert 9: 23,42 Ct - Mittelwert : 0,29 Mittelwert: 23,7067 S.D.: 0,21846		Pfaffl: Pfaffl-Ratio: 0,02938 Ratio - Mittelwert : 0,01 0,02704 Ratio - Mittelwert : 0,01 0,0263 Ratio - Mittelwert : 0,00 0,02211 Ratio - Mittelwert : 0,00 0,02151 Ratio - Mittelwert : 0,00 0,01873 Ratio - Mittelwert : 0,00 0,0186 Ratio - Mittelwert : 0,00 0,01796 Ratio - Mittelwert : 0,00 0,01564 Ratio - Mittelwert : 0,01 Mittelwert: 0,02192 S.D.: 0,00471	
Housekeeping gene: Ct: Wert 1: 24,72 Ct - Mittelwert : 0,12 Wert 2: 24,89 Ct - Mittelwert : 0,05 Wert 3: 24,75 Ct - Mittelwert : 0,09 Wert 4: 24,73 Ct - Mittelwert : 0,11 Wert 5: 24,8 Ct - Mittelwert : 0,04 Wert 6: 24,9 Ct - Mittelwert : 0,06 Wert 7: 24,87 Ct - Mittelwert : 0,03 Wert 8: 24,97 Ct - Mittelwert : 0,13 Wert 9: 24,95 Ct - Mittelwert : 0,11 Mittelwert: 24,8422 S.D.: 0,09497		Housekeeping gene: Ct: Wert 1: 24,86 Ct - Mittelwert : 0,11 Wert 2: 24,87 Ct - Mittelwert : 0,10 Wert 3: 24,90 Ct - Mittelwert : 0,07 Wert 4: 24,94 Ct - Mittelwert : 0,03 Wert 5: 24,95 Ct - Mittelwert : 0,02 Wert 6: 24,99 Ct - Mittelwert : 0,02 Wert 7: 25,02 Ct - Mittelwert : 0,05 Wert 8: 25,09 Ct - Mittelwert : 0,12 Wert 9: 25,09 Ct - Mittelwert : 0,12 Mittelwert: 24,9678 S.D.: 0,08657		Ratio: 0,02192 S.D.: 0,00471	
				Primereffizienz Zielgen: 2 Primereffizienz HKG: 2	

Abbildung 10: Pfaffl-Tabelle am Beispiel PDL 7. (1, 3) Ct-Werte der PDLc-Probe mit HKG β 2M, (2, 4) Ct-Werte der Kontrollprobe mit HKG β 2M, (5) Pfaffl-Ratio, (6) Mittelwert, (7) Primereffizienz. Rot gekennzeichnet ist jeweils der Wert mit der größten Abweichung.

2.2.9 SPSS

Die statistische Auswertung der qPCR-Ergebnisse erfolgte unter Zuhilfenahme der Statistik- und Analysesoftware SPSS Statistics von IBM (Version 25, Armonk). Dabei wurden in das Programm jeweils alle aus der Pfaffl-Tabelle erhaltenen Ratio übertragen, da sie die relativen mRNA Level der Proben im Verhältnis zum Referenzgen widerspiegeln. Es erfolgte eine Zuordnung entsprechend der Variablen (Rezeptor/Hormonbehandlung/Geschlecht).

Bei unabhängigen Stichproben kam der Mann-Whitney-U-Test und bei abhängigen Stichproben der Wilcoxon-Test zur Anwendung. In den durchgeführten Analysen wurden

alle Variablen miteinander und untereinander verglichen. Daraus erhaltene Mittelwerte fanden ihre Visualisierung in ebenfalls mithilfe von SPSS erstellten Barplots.

Zusätzlich erfolgte eine Analyse des mittleren Verhältnisses von *ESR2* zu *ESR1* zwischen steroidhormonbehandelten und -unbehandelten PDLCs beider Geschlechter. Die anschließende Signifikanzüberprüfung unterlag der Beurteilung nach Wasserstein und Lazar (2016), wonach ein p-Wert von unter 5 % als ein signifikantes und ein p-Wert von unter 1 % als ein hochsignifikantes Ergebnis zu werten ist.

2.2.10 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche Gelelektrophorese diente zur Charakterisierung von Proteinen und zur Überprüfung derer Reinheit. Aufgrund der unterschiedlichen elektrischen Ladungen und Molekülgröße ergab sich eine verschiedene Wanderungsgeschwindigkeit und -richtung in elektrischen Feldern, sodass eine Auftrennung einzelner Proteine möglich wurde. Die Verwendung eines Gels vermied mögliche Diffusionseffekte.

Zur Herstellung wurden als erstes je zwei Glasplatten mit Ethanol gereinigt und unter Verwendung eines Dichtungsgummis zusammengesetzt. Vom unteren Rand der eingekerbten Glasplatte wurde ein Bereich von 6 cm markiert, um die Höhe des Übergangs von Trenn- und Sammelgel immer identisch zu gestalten.

Trenn- und Sammelgel setzten sich wie folgt zusammen:

Trenngel (10 %)		Sammelgel (5 %)	
H ₂ O DEPC	2 ml	H ₂ O DEPC	1,35 ml
Trenngelpuffer	1,4 ml	Sammelgelpuffer	0,625 ml
Acrylamid	1,85 ml	Acrylamid	0,4 ml
SDS (10 %)	55 µl	SDS (10 %)	25 µl
TEMED	5 µl	TEMED	2,5 µl
APS (10 %)	0,25 ml	APS (10 %)	0,1 ml

Zwischen die Glasplatten wurde bis zur Markierung das Trenngel gegeben und mit Ethanol zur Säuberung der Abschlusskante überschichtet. Nach Polymerisation und Entfernung des Ethanols war es möglich das Sammelgel einzufüllen und ein Kamm zur Taschenbildung einzusetzen. Nach 30 min konnten Kamm und Dichtungsgummi entfernt werden. Die Lagerung erfolgte zwischen feuchtem Papier in einem Container bei 4 °C.

Im weiteren Schritt erfolgte die Gelelektrophorese in einer Biometra Elektrophoresekammer. Sowohl die Kammer selbst auch die Taschen des eingesetzten Gels wurden vor der Proteinauftrennung mit Laufpuffer befüllt.

Aufgetragen wurden Zellpellets aller Zelllinien (PDLCs, MCF-7, LNCaP) unter folgender Vorbereitung: Alle Proben wurden mit 3x SDS Probenpuffer (10 µl/1 x 10⁵ Zellen) und β-Mercaptoethanol (1/10 des Gesamtvolumens) vermengt und anschließend für 5 min bei 95 °C im Heizblock denaturiert. Während des Denaturierungsprozesses wurde jeweils 4 µl Bandenmarker (Page Ruler) in entsprechende Tasche gegeben um darauffolgend auch die vorbehandelten Proben zeitnah einzubringen (20 µl mit je 200.000 Zellen).

Pro Kammer wurde eine Stromstärke im Bereich des Sammelgels von 15 mA gewählt, die auf 20 mA mit Erreichen der Trenngelkante erhöht wurde. Beendet wurde die Gelelektrophorese mit Erreichen des Farbmarkers an der Gelunterkante.

2.2.11 Western Blot

Das Verfahren des Western Blots dient dazu die zuvor in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran zu übertragen.

Im ersten Schritt erfolgte dazu eine Aktivierung der Membran in 100 % Methanol. Die aktivierte Membran wurde anschließend gemeinsam mit zwei Schwämmen und sechs Filterpapieren für mindestens 15 min in kaltem Transferpuffer (Tabelle 7), worauf sich der luftblasenfreie Zusammenbau der Blotkassette (Abbildung 11) und die korrekte Positionierung dieser in der Blotkammer anschloss. Unter Verwendung eines Rührfisches wurde die Kammer bis Abschlusskante der Elektrodenplatte mit Transferpuffer befüllt und an das Kühlwasser angeschlossen. Der Transfer erfolgte für ein bis zwei eingebrachte Kassetten bei 350 mA für 90 min.

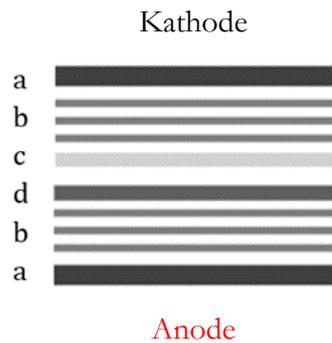


Abbildung 11: Zusammenbau Blotkassette. (a) Schwamm, (b) Filterpapier, jeweils 3-fach, (c) Trenngel, (d) PVDF-Membran

2.2.12 Proteinfärbung der PVDF-Membran

Eine gelungene Übertragung der Proteine aus dem SDS-Gel auf die PVDF-Membran ist erst nach der Coomassie-Blau-Färbung zu erkennen. Dazu wurde die PVDF-Membran direkt nach dem Übertragungsprozess für 5-10 min in der Coomassie Färbelösung auf dem Duomax 1030 bei Raumtemperatur gefärbt und anschließend für 5 min entfärbt (Coomassie Entfärber-Lösung I). Zur Auswaschung der in der Entfärber-Lösung enthaltenen Methanol- und Essigsäurebestandteile folgte das Waschen mit TBS-T. Danach konnte die Membran beschriftet und mithilfe des CanonScan 9000F Mark II zu Dokumentation eingescannt werden.

2.2.13 Immunreaktion Chemolumineszenz des Western Blots

Nach Dokumentation der gefärbten PVDF-Membran folgte das Blocken unspezifischer Proteinbindungsstellen. Dazu wurde eine Lösung vorbereitet, die 1 g Milchpulver je 20 ml TBS-T enthielt. Für eine Stunde folgte die Inkubation der PVDF-Membran mit 10 ml der Blocklösung auf dem Duomax 1030 bei Raumtemperatur.

Der anschließende spezifische Proteinnachweis erfolgte unter Zuhilfenahme von primären und sekundären Antikörpern: Dazu wurden für jeden Proteinnachweis Containerbehältnisse mit 5 ml frisch angesetzter Blocklösung befüllt und der entsprechende primäre Antikörper hinzugegeben (Tabelle 2). Die Inkubation erfolgte bei $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht auf dem Duomax 1030. Am nächsten Tag wurde die Antikörper-Blocklösung abpipettiert und die PVDF-Membran mehrfach mit TBS-T gewaschen (fünf Mal für je 5 min), sodass nach Verwerfen der Waschlösung der jeweilige sekundäre Antikörper Verwendung fand (Tabelle 3). Es erfolgte eine entsprechende Verdünnung des Antikörpers in 5 ml Blocklösung und eine erneute Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Duomax 1030. Nach

Ablauf des Zeitintervalls konnte die PVDF-Membran in TBS-T erneut fünf Mal für je 5 min gewaschen werden.

Die Bestätigung der Immunreaktion erfolgte durch eine chemilumineszente Reaktion. Für die Detektion der mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierten Sekundärantikörper fand das WesternBright™ Chemolumineszenz-Substrat Sirius und das SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate nach Herstellerangaben Verwendung. Die Markerbanden wurden in beiden Fällen mit dem WesternBright ChemiPen gekennzeichnet. Anschließend konnten die vorbereiteten PVDF-Membranen mithilfe des C-DiGit Blot Scanners von LICOR für 12 min detektiert werden. Die Aufbewahrung erfolgte nach Spülung mit TBS-T und Methanol in getrocknetem Zustand bei -20 °C.

2.2.14 Immunzytochemie

Das Verfahren der Immunzytochemie (ICC) diente zur spezifischen Detektion gesuchter Proteine in den einzelnen Zelllinien.

Dazu wurde unter sterilen Bedingungen eine 24-Well-Platte mit Deckgläschen (DG) versehen (ein DG pro Well) und unter Verwendung einer UV-Lampe für 30 min sterilisiert. Nach abgeschlossener Vorbereitung der Wells mit Zugabe von je 1 ml Medium erfolgte die Aussaat (vergleiche 2.2.1) und Steroidhormonbehandlung (vergleiche 2.2.2) aller Zelllinien nach in Tabelle 16 dargestelltem Schema.

Bei einer Konfluenz von 70-80 % der DG konnten diese unter nicht mehr sterilen Bedingungen auf einer mit Parafilm bezogene Kunststoffplatte mit der bewachsenen Seite nach oben überführt und im Anschluss zweimal mit je 100 µl PBS gewaschen werden. Die Wasch- und Inkubationslösungen wurden mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Es folgte ein 15-minütiger Fixierungsschritt mit 2 % Paraformaldehyd in PBS bei Raumtemperatur (100 µl/DG). Nach erneutem zweimaligem Waschgang (100 µl PBS/DG) wurde mit 0,25 % Triton-X100 in PBS (100 µl/DG) bei Raumtemperatur für 10 min permeabilisiert. Danach musste so lange das Waschen mit PBS erfolgen, bis das Triton -X100 komplett entfernt war und sich eine Wiederherstellung der Oberflächenspannung zeigte.

Im nächsten Schritt kam nach einem 15-minütigem Blockvorgang mit 1 % BSA in PBS (100 µl/DG; Raumtemperatur) der jeweils zugehörige primäre Antikörper zum Einsatz (Tabelle 2). Dieser wurde in 1 % BSA in PBS verdünnt zu je 50 µl/DG aufgebracht und über 60 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Es schloss sich ein zweimaliger Waschschrift mit PBS (100 µl/DG) und die Inkubation mit dem sekundären

Antikörper (Tabelle 4) an. Dieser wurde erneut mit 1 % BSA in PBS + DAPI verdünnt (1:1000) und die Proben mit je 100 μ l/DG für 30-60 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer versetzt.

Nach einem letzten doppelten Waschdurchgang mit PBS waren die DG bereit mit 10 μ l Fluorescens Mounting Medium (DAKO) unter Verwendung eines Objektträgers eingedeckelt zu werden und standen daraufhin für Fluoreszenzaufnahmen oder die kurzzeitige Aufbewahrung im Kühlschrank bei 4 °C zur Verfügung.

Tabelle 16: Versuchsaufbau Immunzytochemie.

	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4	Well 5	Well 6	Rezeptor
PDLCs (m/w)	ohne T +24 h T	ohne T +24 h T	ohne T +24 h T	frei frei	Negativkontrollen Negativkontrollen		AR AR
PDLCs (m/w)	ohne E2 +24 h E2	ohne E2 +24 h E2	ohne E2 +24 h E2	frei frei	Negativkontrollen Negativkontrollen		ER α , β ER α , β
PDLCs (m/w)	ohne Pg +24 h Pg	ohne Pg +24 h Pg	ohne Pg +24 h Pg	frei frei	Negativkontrollen Negativkontrollen		PR PR
LNCaP LNCaP	ohne T +24 h T	ohne T +24 h T	ohne T +24 h T	frei frei	Negativkontrollen Negativkontrollen		AR AR
MCF-7 MCF-7	ohne E2 +24 h E2	ohne E2 +24 h E2	ohne E2 +24 h E2	frei frei	Negativkontrollen Negativkontrollen		ER α , β ER α , β
MCF-7 MCF-7	ohne Pg +24 h Pg	ohne Pg +24 h Pg	ohne Pg +24 h Pg	frei frei	Negativkontrollen Negativkontrollen		PR PR

2.2.15 Mikroskopieren

Die Fluoreszenzaufnahmen entstanden mithilfe des KEYENCE BZ-X710 nach Herstellerangaben. Die einzelnen DG wurden zunächst bei 4-facher Vergrößerung im Durchlichtmodus gesucht. Bei 20-facher Vergrößerung wurden die blau fluoreszierenden Zellkerne (DAPI) identifiziert und mithilfe der MCF-7/LNCaP Positivkontrolle im roten Kanal der Primärantikörper detektiert. Die Einstellung der Belichtungszeit und die eigentliche Fotografie beider Kanäle (rot, blau, Overlay) vollzog sich bei 40-facher Vergrößerung. Die Negativkontrollen, bei denen die Behandlung mit dem primären Antikörper ausgelassen wurde, dienten zur Einstellung der Belichtung. Diese wurde so eingestellt, dass bei den Kontrollzelllinien (MCF-7/LNCaP) im roten Kanal gerade keine Fluoreszenz mehr zu sehen ist. Ausgehend davon wurden alle weiteren Proben mit derselben Belichtungszeit untersucht und dokumentiert.

3 Ergebnisse

3.1 Quantitative Real-Time PCR

3.1.1 Pfaffl

Im Nachfolgenden sind die Ratio (inkl. Prozentangabe und Standardabweichung σ) aller Zielgene kategorisch aufgelistet (Tabelle 17 - Tabelle 20). Die ersten beiden Absätze jeder Tabelle geben die Pfaffl-Ratio in Abhängigkeit des Geschlechts und der Steroidhormoninkubation im Vergleich zu den Kontrollzellen (MCF-7/ LNCaP) wieder. Der jeweils dritte Absatz (PDL +24h/ PDL ohne T/E2/Pg) untersucht die Veränderung der Genexpression nach 24-stündiger Steroidhormoninkubation.

Tabelle 17: Pfaffl-Ratio des Zielgens *AR*.

PDL ohne/ LNCaP ohne T	Ratio	in [%]	σ
PDL 7 (w)	0,30387	30,4	0,09790
PDL 26 (w)	0,03475	3,5	0,01038
PDL 35 (w)	0,30433	30,4	0,10926
PDL 15 (m)	0,02063	2,1	0,00362
PDL 19 (m)	0,03102	3,1	0,00679
PDL 28 (m)	0,05441	5,4	0,01603
PDL +24h/ LNCaP ohne T	Ratio	in [%]	σ
PDL 7 (w)	0,04256	4,3	0,00909
PDL 26 (w)	0,00787	0,8	0,00118
PDL 35 (w)	0,07908	7,9	0,01726
PDL 15 (m)	0,01107	1,1	0,00232
PDL 19 (m)	0,00774	0,8	0,00194
PDL 28 (m)	0,01405	1,4	0,00314
PDL +24h/ PDL ohne T	Ratio	in [%]	σ
PDL 7 (w)	0,14683	14,7	0,03137
PDL 26 (w)	0,23587	23,6	0,03542
PDL 35 (w)	0,27389	27,4	0,05977
PDL 15 (m)	0,54335	54,3	0,11411
PDL 19 (m)	0,25469	25,5	0,06389
PDL 28 (m)	0,26840	26,8	0,05997

Tabelle 18: Pfaffl-Ratio des Zielgens *ESR1*.

PDL ohne/ MCF-7 ohne E2	Ratio	in [%]	σ
PDL 7 (w)	0,02192	2,2	0,00471
PDL 26 (w)	0,04628	4,6	0,00819
PDL 35 (w)	0,04809	4,8	0,00637
PDL 15 (m)	0,00611	0,6	0,00131
PDL 19 (m)	0,01709	1,7	0,00571
PDL 28 (m)	0,00516	0,5	0,00142
PDL +24h/ MCF-7 ohne E2	Ratio	in [%]	σ
PDL 7 (w)	0,00305	0,3	0,00064
PDL 26 (w)	0,00965	1,0	0,00198
PDL 35 (w)	0,00557	0,6	0,00140
PDL 15 (m)	0,01362	1,4	0,00249
PDL 19 (m)	0,02537	2,5	0,00612
PDL 28 (m)	0,00929	0,9	0,00089
PDL +24h/ PDL ohne E2	Ratio	in [%]	σ
PDL 7 (w)	0,14194	14,2	0,02976
PDL 26 (w)	0,21134	21,1	0,04336
PDL 35 (w)	0,11684	11,7	0,02932
PDL 15 (m)	2,27321	227,3	0,41529
PDL 19 (m)	1,56014	156,0	0,37602
PDL 28 (m)	1,85767	185,8	0,17777

Tabelle 19: Pfaffl-Ratio des Zielgens *ESR2*.

PDL ohne/ MCF-7 ohne E2	Ratio	in [%]	σ
PDL 7 (w)	0,34246	34,3	0,03417
PDL 26 (w)	0,11609	11,6	0,00673
PDL 35 (w)	0,28861	28,9	0,03006
PDL 15 (m)	0,02225	2,2	0,00205
PDL 19 (m)	0,05722	5,7	0,00512
PDL 28 (m)	0,02227	2,2	0,00207
PDL +24h/ MCF-7 ohne E2	Ratio	in [%]	σ
PDL 7 (w)	0,02868	2,9	0,00224
PDL 26 (w)	0,04599	4,6	0,00152
PDL 35 (w)	0,06462	6,5	0,00141
PDL 15 (m)	0,04846	4,9	0,00258
PDL 19 (m)	0,03900	3,9	0,00135
PDL 28 (m)	0,05075	5,1	0,01077
PDL +24h/ PDL ohne E2	Ratio	in [%]	σ
PDL 7 (w)	0,88514	88,5	0,01174
PDL 26 (w)	0,39674	39,7	0,01309
PDL 35 (w)	0,22501	22,5	0,00491
PDL 15 (m)	2,18624	218,6	0,11652
PDL 19 (m)	0,68391	68,4	0,02369
PDL 28 (m)	2,28797	228,8	0,48566

Tabelle 20: Pfaffl-Ratio des Zielgens *PR*.

PDL ohne/ MCF-7 ohne Pg	Ratio	in [%]	σ
PDL 7 (w)	0,00399	0,4	0,00158
PDL 26 (w)	0,00373	0,4	0,00128
PDL 35 (w)	0,00063	0,06	0,00024
PDL 15 (m)	0,00155	0,2	0,00020
PDL 19 (m)	0,00455	0,5	0,00059
PDL 28 (m)	0,00015	0,02	0,00008
PDL +24h/ MCF-7 ohne Pg	Ratio	in [%]	σ
PDL 7 (w)	0,00083	0,08	0,00022
PDL 26 (w)	0,00038	0,04	0,00010
PDL 35 (w)	0,00003	0,0	0,00001
PDL 15 (m)	0,00132	0,1	0,00032
PDL 19 (m)	0,00266	0,3	0,00042
PDL 28 (m)	0,00014	0,01	0,00007
PDL +24h/ PDL ohne Pg	Ratio	in [%]	σ
PDL 7 (w)	0,22118	22,1	0,05960
PDL 26 (w)	0,10863	10,9	0,02792
PDL 35 (w)	0,04412	4,4	0,01757
PDL 15 (m)	0,85381	85,4	0,20765
PDL 19 (m)	0,58875	58,9	0,09242
PDL 28 (m)	1,04202	104,2	0,52738

3.1.2 Relatives mRNA Level

In Abbildung 12 sind die Ratio-Mittelwerte der unter 3.1.1 aufgelisteten Ergebnisse als Barplots grafisch dargestellt. Alle Rezeptoren konnten mit unterschiedlichem relativen Expressionslevel auf mRNA Ebene nachgewiesen werden: Steroidhormonunbehandelt exprimieren die weiblichen PDLCs im Vergleich zu den Kontrollzelllinien (MCF-7/ LNCaP) 21,4 % *AR*, 3,9 % *ESR1*, 24,9 % *ESR2* und 0,3 % *PR*. Die männlichen PDLCs lagen mit 3,5 % *AR*, 1,0 % *ESR1*, 3,4 % *ESR2* und 0,2 % *PR* jeweils darunter (Tabelle 17-20). Nach Hormonstimulation exprimierten die weiblichen PDLCs 4,3 % *AR*, 0,6 % *ESR1*, 4,6 % *ESR2* und 0,04 % *PR*, die männlichen PDLCs 1,1 % *AR*, 1,6 % *ESR1*, 4,6 % *ESR2* und 0,1 % *PR*. Auch in diesem Fall dienen als Bezugsgröße die Kontrollzelllinien MCF-7/ LNCaP.

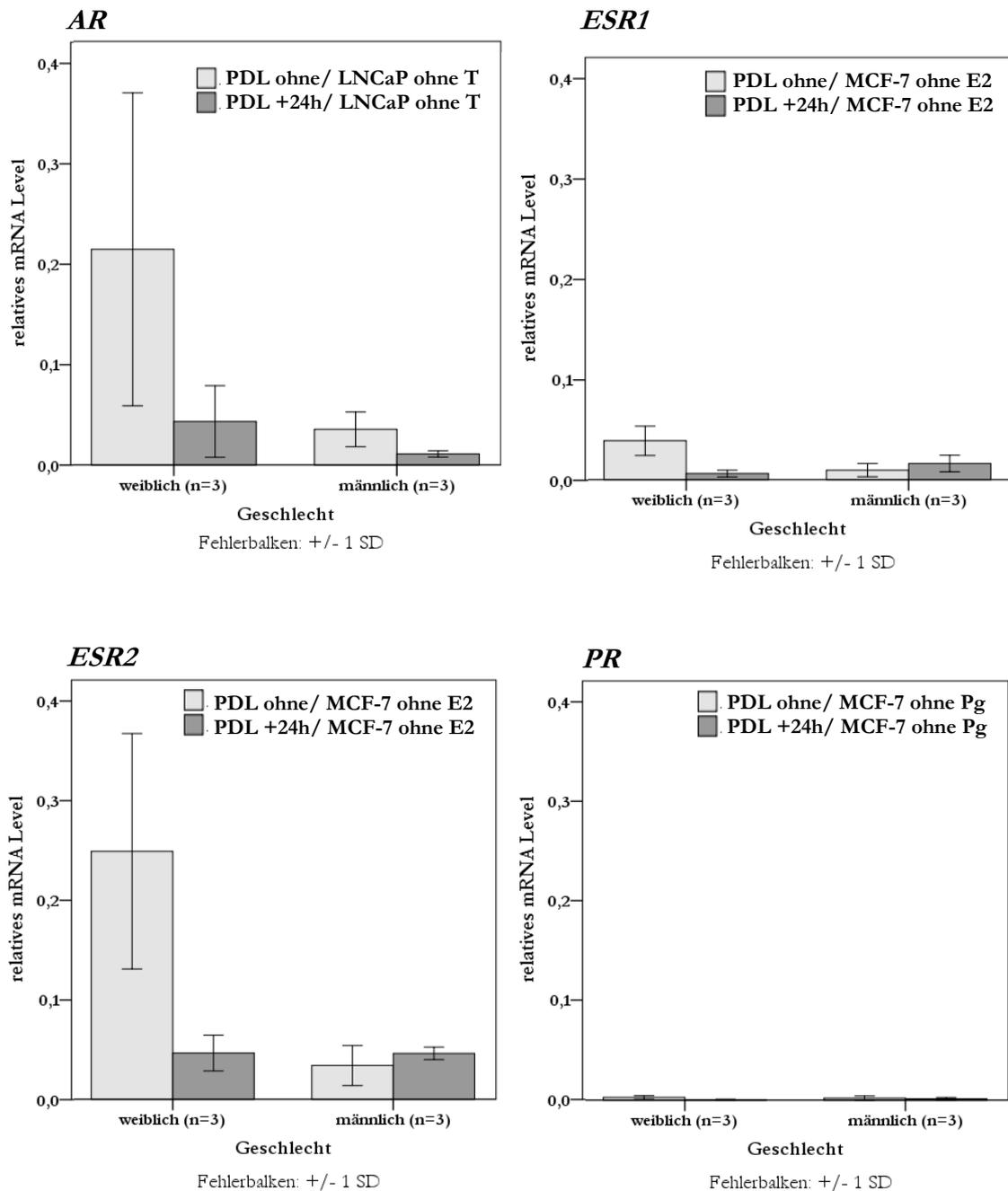


Abbildung 12: Übersicht der Ratio-Mittelwerte aller Zielgene. Dargestellt sind die Pfaffl-Ratio-Mittelwerte des Androgenrezeptors (*AR*), Estrogenrezeptors α (*ESR1*), Estrogenrezeptors β (*ESR2*) und des Progesteronrezeptors (*PR*). Diese sind jeweils untergliedert in die Kategorien weiblich/männlich und steroidhormonunbehandelt/-behandelt. Die Fehlerbalken stellen den positiven und negativen Wert der Standardabweichung σ dar. Die y-Achse kennzeichnet das relative mRNA Level in Bezug auf die jeweilige Kontrollprobe (LNCaP/MCF-7 = 1).

Um autoregulatorische Wirkungen der Sexualhormone auf ihre entsprechenden Rezeptoren zu beurteilen, wurde eine Hormonstimulation für 24 Stunden durchgeführt. Hierbei reagierten die PDLCs von männlichen und weiblichen Spendern gegensätzlich der Östradiolstimulation: Während bei männlichen PDLCs tendenziell eine Hochregulation von *ESR1* und *ESR2* stattfand (*ESR1*: $p = 0,109$, *ESR2*: $p = 0,285$), konnte bei den weiblichen PDLCs eine Herunterregulation beobachtet werden (*ESR1*: $p = 0,109$, *ESR2*: $p = 0,109$). Dieser Effekt war statistisch nicht signifikant. Das mittlere Verhältnis von *ESR2/ESR1* war bei den männlichen Zellproben zwischen steroidhormonstimulierten und nicht steroidhormonstimulierten PDLCs gleich ($ESR2/ESR1_{\text{ohne E2}} = 3,64$; $ESR2/ESR1_{+24h E2} = 3,56$; $p = 0,593$). Bei den weiblichen Zellproben verdoppelte sich das *ESR2/ESR1*-Verhältnis ($ESR2/ESR1_{\text{ohne E2}} = 6,0$; $ESR2/ESR1_{+24h E2} = 11,6$; $p = 0,109$). Die Testosteron- und Progesteronstimulation induzierte für beide Geschlechter eine Herunterregulation der zugehörigen Gene (*AR* (w): $p = 0,109$, *AR* (m): $p = 0,109$; *PR* (w): $p = 0,109$, *PR* (m): $p = 0,285$). Im Vergleich der geschlechtsspezifischen Veränderungen der Genexpression wurde kein signifikanter Unterschied beobachtet (*AR*: $p = 0,4$; *ESR1*: $p = 0,1$; *ESR2*: $p = 0,2$; *PR*: $p = 0,1$).

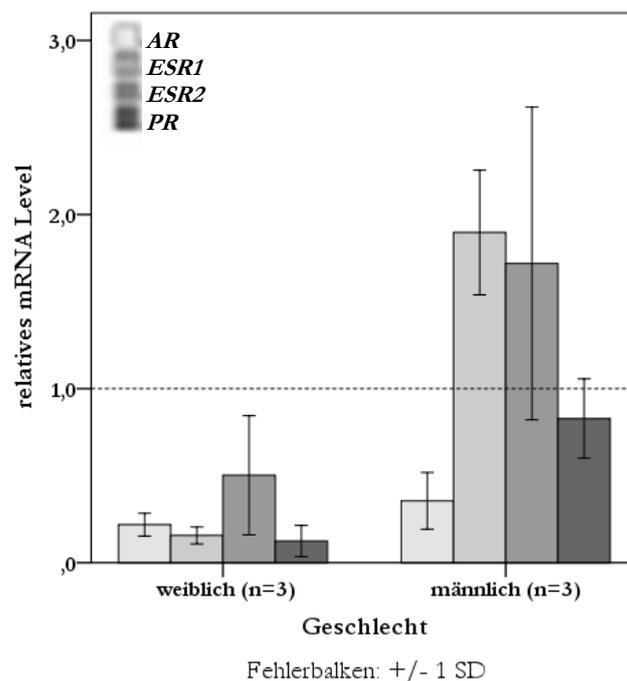


Abbildung 13: Auswirkung der Hormonstimulation auf die Genexpression aller Zielgene. Dargestellt sind die Pfaffl-Ratio-Mittelwerte der steroidhormonbehandelten Zellproben im Vergleich zu den steroidhormonunbehandelten Zellproben (+24 h/ohne) aller untersuchten Steroidhormonrezeptoren (AR, ER α , ER β , PR). Die Ergebnisse sind untergliedert in weiblich/männlich. Die Fehlerbalken stellen den positiven und negativen Wert der Standardabweichung σ dar. Die y-Achse kennzeichnet das relative mRNA Level.

Die Ergebnisse des Mann-Whitney-U- und des Wilcoxon-Tests belegen, dass insgesamt keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der Genexpressionsveränderungen bestehen. Damit bestimmt weder das Geschlecht noch die Hormonstimulation die Expression der Zielgene aller untersuchten Rezeptoren signifikant. Die zugehörigen p-Werte sind in Tabelle 21, 22, 23 und 24 aufgeführt.

Tabelle 21: Vergleich der relativen mRNA Level nach Geschlecht; Mann-Whitney-U-Test.

		Median		
Rezeptor	Betrachtet: w/m	weiblich	männlich	p-Wert
AR	PDL ohne/ LNCaP ohne T	0,30387	0,03102	0,200
AR	PDL +24 h/ LNCaP ohne T	0,04256	0,01107	0,400
ER α	PDL ohne/ MCF-7 ohne E2	0,04628	0,00611	0,100
ER α	PDL +24 h/ MCF-7 ohne E2	0,00557	0,01362	0,200
ER β	PDL ohne/ MCF-7 ohne E2	0,28861	0,02227	0,100
ER β	PDL +24 h/ MCF-7 ohne E2	0,04599	0,04846	1,000
PR	PDL ohne/ MCF-7 ohne Pg	0,00373	0,00155	1,000
PR	PDL +24 h/ MCF-7 ohne Pg	0,00038	0,00132	0,400

Tabelle 22: Vergleich der relativen mRNA Level nach Geschlecht; Mann-Whitney-U-Test.

		Median		
Rezeptor	Betrachtet: w/m	weiblich	männlich	p-Wert
AR	PDL +24 h/ PDL ohne T	0,23587	0,26840	0,400
ER α	PDL +24 h/ PDL ohne E2	0,14194	1,85767	0,100
ER β	PDL +24 h/ PDL ohne E2	0,39674	2,18624	0,200
PR	PDL +24 h/ PDL ohne Pg	0,10863	0,85381	0,100

Tabelle 23: Vergleich der relativen mRNA Level nach Steroidhormoninkubation; Wilcoxon-Test.

Rezeptor	Betrachtet: +24 h/ohne	Median		p-Wert
		ohne	+24 h T	
AR	PDL +24 h/ LNCaP ohne T (w)	0,30387	0,04256	0,109
AR	PDL +24 h/ LNCaP ohne T (m)	0,03102	0,01107	0,109
ER α	PDL +24 h/ MCF-7 ohne E2 (w)	0,04628	0,00557	0,109
ER α	PDL +24 h/ MCF-7 ohne E2 (m)	0,00611	0,01362	0,109
ER β	PDL +24 h/ MCF-7 ohne E2 (w)	0,28861	0,04599	0,109
ER β	PDL +24 h/ MCF-7 ohne E2 (m)	0,02227	0,04846	0,109
PR	PDL +24 h/ MCF-7 ohne Pg (w)	0,00373	0,00038	0,109
PR	PDL +24 h/ MCF-7 ohne Pg (m)	0,00155	0,00132	0,109

Tabelle 24: Vergleich der relativen mRNA Level nach Steroidhormoninkubation; Wilcoxon-Test.

Rezeptor	Betrachtet: +24 h/ohne	Median	p-Wert
AR	PDL +24 h/ PDL ohne T (w)	0,23587	0,109
AR	PDL +24 h/ PDL ohne T (m)	0,26840	0,109
ER α	PDL +24 h/ PDL ohne E2 (w)	0,14194	0,109
ER α	PDL +24 h/ PDL ohne E2 (m)	1,85767	0,109
ER β	PDL +24 h/ PDL ohne E2 (w)	0,39674	0,109
ER β	PDL +24 h/ PDL ohne E2 (m)	2,18624	0,285
PR	PDL +24 h/ PDL ohne Pg (w)	0,10863	0,109
PR	PDL +24 h/ PDL ohne Pg (m)	0,85381	0,285

3.2 Western Blot Analyse

Auf Proteinebene wurde ein zu den Ergebnissen auf mRNA-Ebene ähnliches Ergebnis erwartet. Zum Zeitpunkt der Erhebung der Western Blot Ergebnisse war die Zelllinie PDL 35 noch kein Bestandteil des laboreigenen Zellkatalogs, sodass den nachfolgenden Untersuchungen nur zwei statt drei weibliche Zelllinien (PDL 7, 26) zugrunde liegen (weibliche Zellproben ($n = 2$; steroidunbehandelt/-behandelt); männliche Zellproben ($n = 3$; steroidunbehandelt/-behandelt)). Zudem wurde die Versuchsreihe für den PR mangels Probenmaterial in reduziertem Umfang durchgeführt (weibliche Zellproben ($n = 1$; steroidunbehandelt/-behandelt); männliche Zellproben ($n = 2$; steroidunbehandelt/-behandelt)).

Im Nachfolgenden sind die Ergebnisse der Immunreaktion und Chemolumineszenz von AR, ER α , ER β und PR sowie der Ladekontrolle (α -Tubulin) dargestellt (Abbildung 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27). Die zugehörigen Coomassie-Färbungen (Abbildung 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26) finden sich jeweils oberhalb der Western Blot Ergebnisse. Teilweise erscheinen die eingescannten PVDF-Membranen aufgrund der unterschiedlichen Einwirkzeiten der Coomassie Entfärber-Lösung I als unterschiedlich farbintensiv. Zur vereinfachten Orientierung wurden die Markerbanden entsprechend ihrer zugehörigen kDa-Angabe beschriftet.

Auf Proteinebene konnte AR im Rahmen des Western Blot Verfahrens nur eindeutig für die Kontrollzelllinien identifiziert werden. In der Immunreaktion zeigten sich bei beiden Geschlechtern teils unspezifische Signale auf Höhe von 170 kDa. Bei den männlichen PDLs konnte AR (110 kDa) unabhängig der Hormonstimulation unsteret nachgewiesen werden (Abbildung 15, 17).

Erfolgreich bestätigt werden konnte hingegen die Synthese von ER α und ER β : Im Rahmen der Untersuchungen wurde allerdings nicht die erwartete Isoform ER α 66 (66 kDa) identifiziert, sondern ER α 36 (Abbildung 19, 21). ER β wurde in verschiedenen Isoformen gefunden: Neben einigen verkürzten Varianten wie ER β -3 (53 kDa), zeigte sich die *full-length* Isoform ER β -1 (59 kDa) als Hauptprodukt (Moore et al. 1998) (Abbildung 23, 25). Die Nachweise gelten für beide Geschlechter sowohl in steroidhormonunbehandelter als auch -behandelter Form.

Der PR ließ sich analog zum AR nur eindeutig für die Kontrollzelllinien identifizieren (Abbildung 27). Die Coomassie Färbungen bestätigten eine korrekte Proteinauftrennung (Abbildung 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26).

3.2.1 Androgenrezeptor

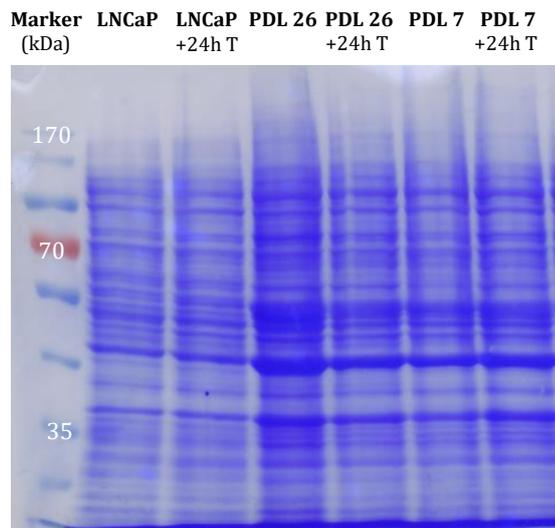


Abbildung 14: Coomassie Färbung zum Western Blot (Immunreaktion AR, weiblich). Gleichmäßig beladenes Gel. Darstellung der weiblichen Zelllinien PDL 26, 7; Kontrollzellprobe: LNCaP. Unterteilt in steroidhormonunbehandelt und -behandelt.

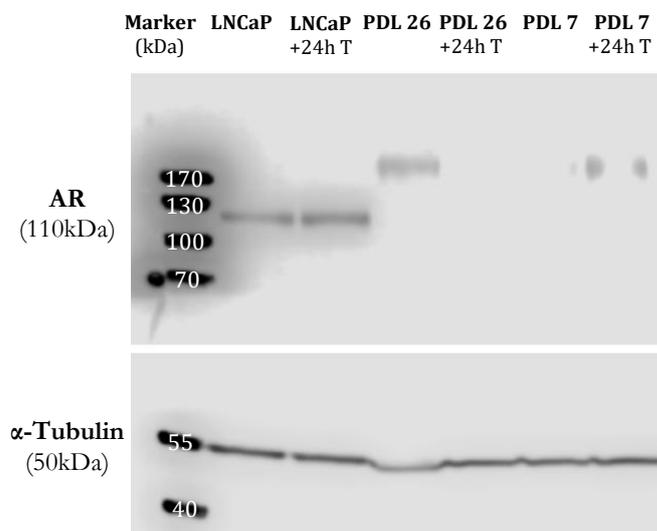


Abbildung 15: Western Blot, Immunreaktion AR, weiblich (Chemolumineszenz). Zusammenschnitt. Darstellung der weiblichen Zelllinien PDL 26, 7; Kontrollzellprobe: LNCaP. Unterteilt in steroidhormonunbehandelt und -behandelt. Sichtbare Banden bei 110 kDa für die steroidhormonunbehandelten und -behandelten Kontrollzellproben. Ladekontrolle (α -Tubulin) ist positiv. Unspezifische Signale auf Höhe von 170 kDa bei PDL 26 und 7. Erfolgreiche Immunreaktion.

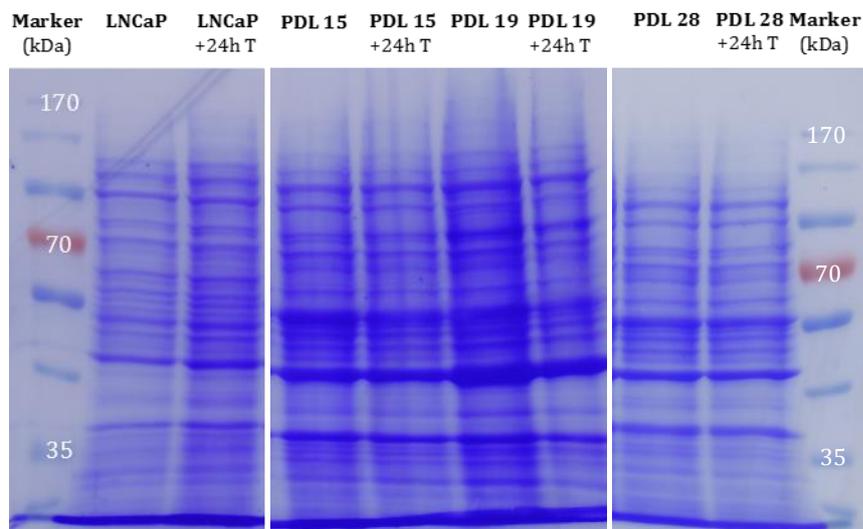


Abbildung 16: Coomassie Färbung zum Western Blot (Immunreaktion AR, männlich). Zusammenschnitt. Gleichmäßig beladenes Gel. Darstellung der männlichen Zelllinien PDL 15, 19, 28; Kontrollzellprobe: LNCaP. Unterteilt in steroidhormonunbehandelt und -behandelt.

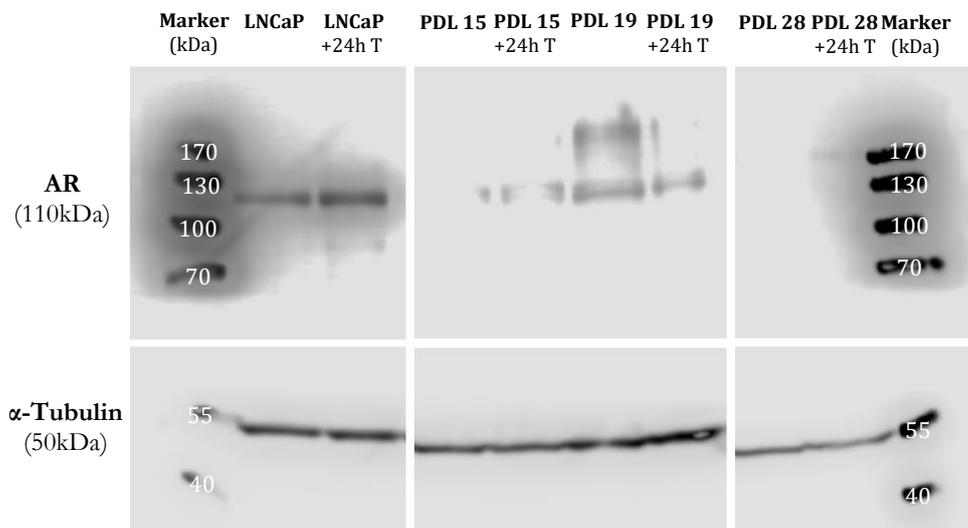


Abbildung 17: Western Blot, Immunreaktion AR, männlich (Chemolumineszenz). Zusammenschnitt. Darstellung der männlichen Zelllinien PDL 15, 19, 28; Kontrollzellprobe: LNCaP. Unterteilt in steroidhormonunbehandelt und -behandelt. Sichtbare Banden bei 110 kDa für die steroidhormonunbehandelten und -behandelten Kontrollzellproben. Ladekontrolle (α -Tubulin) ist positiv. Unstete Banden auf Höhe von 110 kDa im Bereich von PDL 15 und 19 (steroidhormonunbehandelt/-behandelt). Unspezifisches Signal auf Höhe von 170 kDa bei PDL 19. Erfolgreiche Immunreaktion.

3.2.2 Estrogenrezeptor α

Marker (kDa)	MCF-7	MCF-7 +24h E2	PDL 26	PDL 26 +24h E2	PDL 7	PDL 7 +24h E2
-----------------	-------	------------------	--------	-------------------	-------	------------------

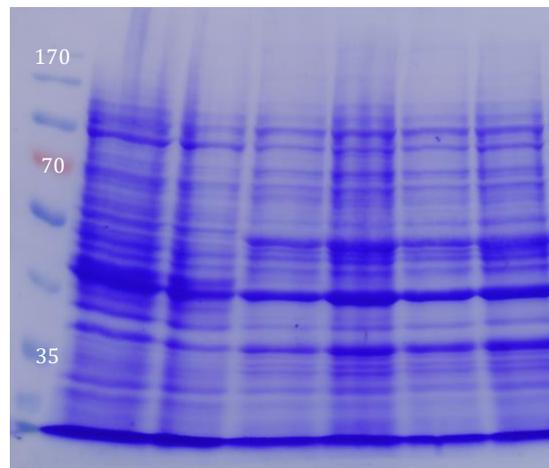


Abbildung 18: Coomassie Färbung zum Western Blot (Immunreaktion ER α , weiblich). Gleichmäßig beladenes Gel. Darstellung der weiblichen Zelllinien PDL 26, 7; Kontrollzellprobe: MCF-7. Unterteilt in steroidhormonunbehandelt und -behandelt.

Marker (kDa)	MCF-7	MCF-7 +24h E2	PDL 26	PDL 26 +24h E2	PDL 7	PDL 7 +24h E2
-----------------	-------	------------------	--------	-------------------	-------	------------------

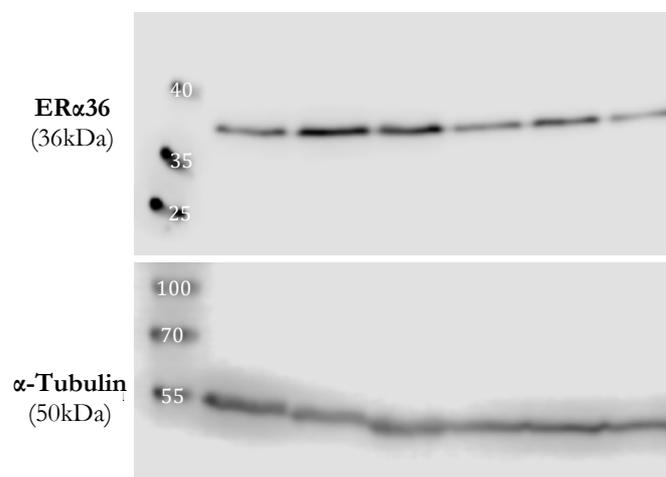


Abbildung 19: Western Blot, Immunreaktion ER α , weiblich (Chemolumineszenz). Zusammenschnitt. Darstellung der weiblichen Zelllinien PDL 26, 7; Kontrollzellprobe: MCF-7. Unterteilt in steroidhormonunbehandelt und -behandelt. Durchgehend sichtbare Banden bei 36 kDa. Die Ladekontrolle (α -Tubulin) ist positiv. Erfolgreiche Immunreaktion.

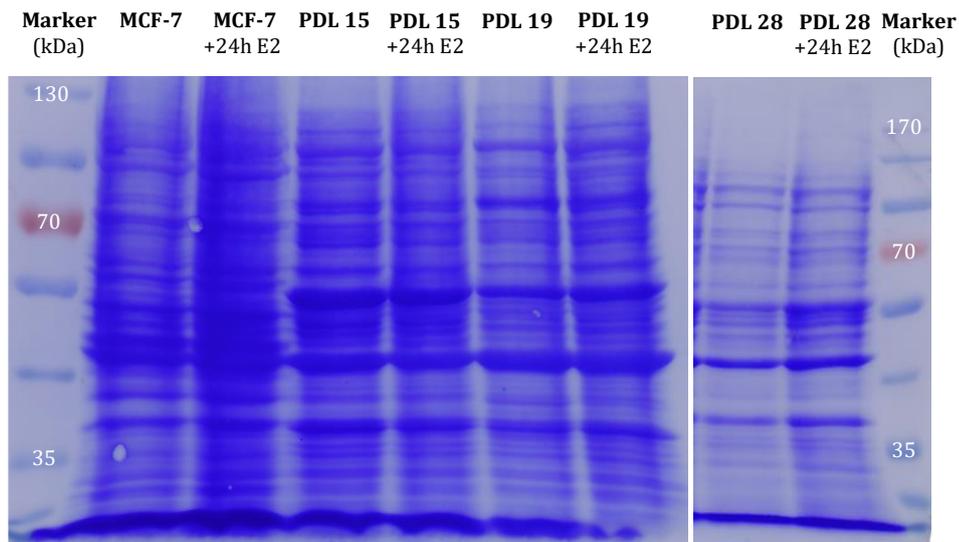


Abbildung 20: Coomassie Färbung zum Western Blot (Immunreaktion ER α , männlich). Zusammenschnitt. Gleichmäßig beladene Gele. Darstellung der männlichen Zelllinien PDL 15, 19, 28; Kontrollzellprobe: MCF-7. Unterteilt in steroidhormonunbehandelt und -behandelt.

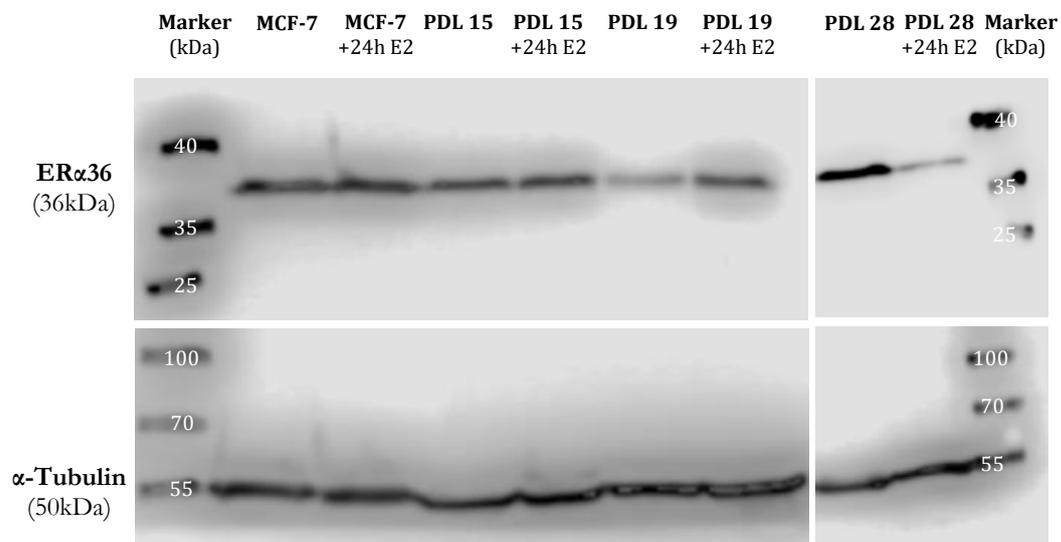


Abbildung 21: Western Blot, Immunreaktion ER α , männlich (Chemolumineszenz). Zusammenschnitt. Darstellung der männlichen Zelllinien PDL 15, 19, 28; Kontrollzellprobe: MCF-7. Unterteilt in steroidhormonunbehandelt und -behandelt. Durchgehend sichtbare Banden bei 36 kDa. Die Ladekontrolle (α -Tubulin) ist positiv. Erfolgreiche Immunreaktion.

3.2.3 Estrogenrezeptor β

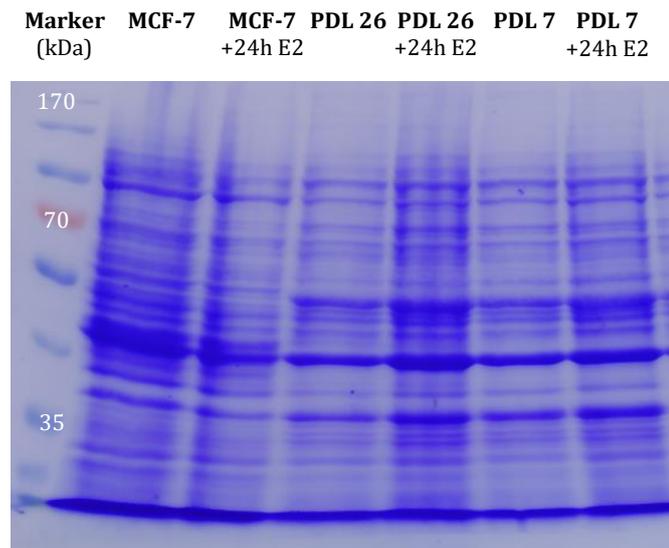


Abbildung 22: Coomassie Färbung zum Western Blot (Immunreaktion ER β , weiblich). Gleichmäßig beladenes Gel. Darstellung der weiblichen Zelllinien PDL 26, 7; Kontrollzellprobe: MCF-7. Unterteilt in steroidhormonunbehandelt und -behandelt.

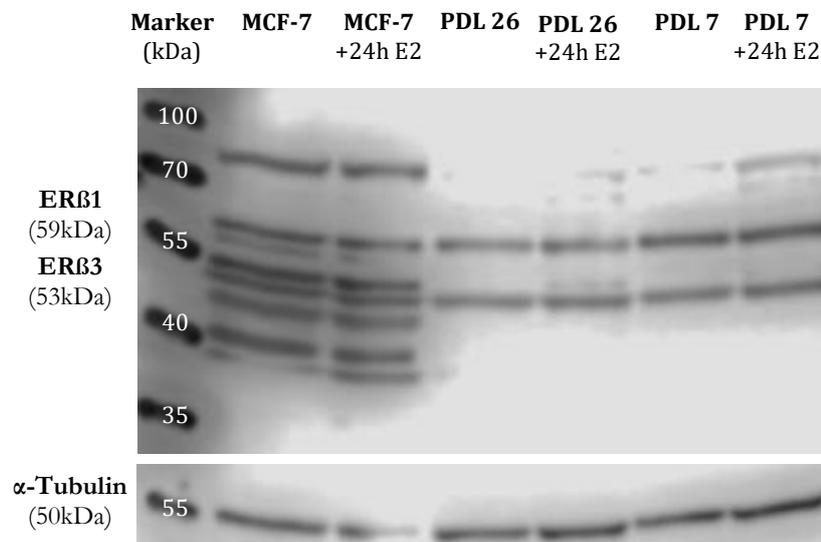


Abbildung 23: Western Blot, Immunreaktion ER β , weiblich (Chemolumineszenz). Zusammenschnitt. Darstellung der weiblichen Zelllinien PDL 26, 7; Kontrollzellprobe: MCF-7. Unterteilt in steroidhormonunbehandelt und -behandelt. Durchgehend sichtbare Banden bei 59 kDa und 53 kDa. Die MCF-7-Zelllinie zeigt sechs weitere Isoformen. Die Ladekontrolle (α -Tubulin) ist positiv. Erfolgreiche Immunreaktion.

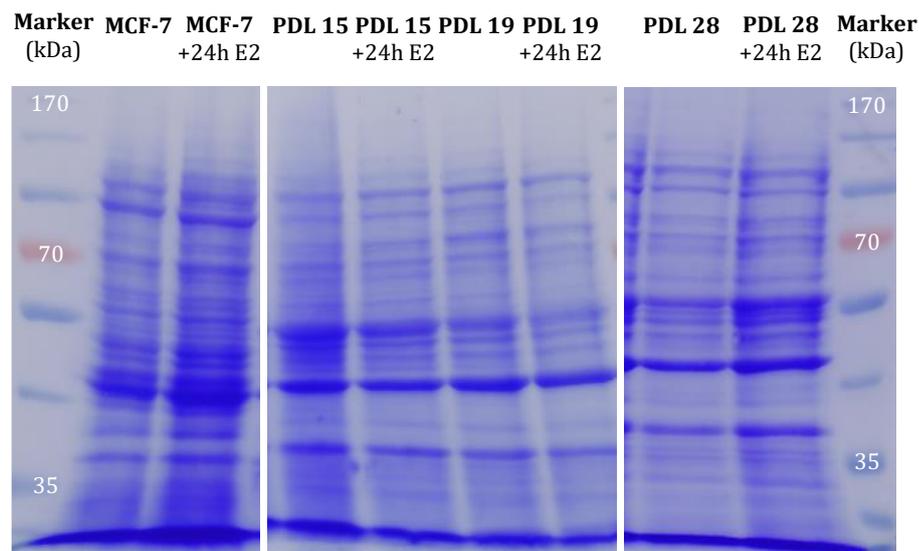


Abbildung 24: Coomassie Färbung zum Western Blot (Immunreaktion ER β , männlich). Zusammenschnitt. Gleichmäßig beladene Gele. Darstellung der männlichen Zelllinien PDL 15, 19, 28; Kontrollzellprobe: MCF-7. Unterteilt in steroidhormonunbehandelt und -behandelt.

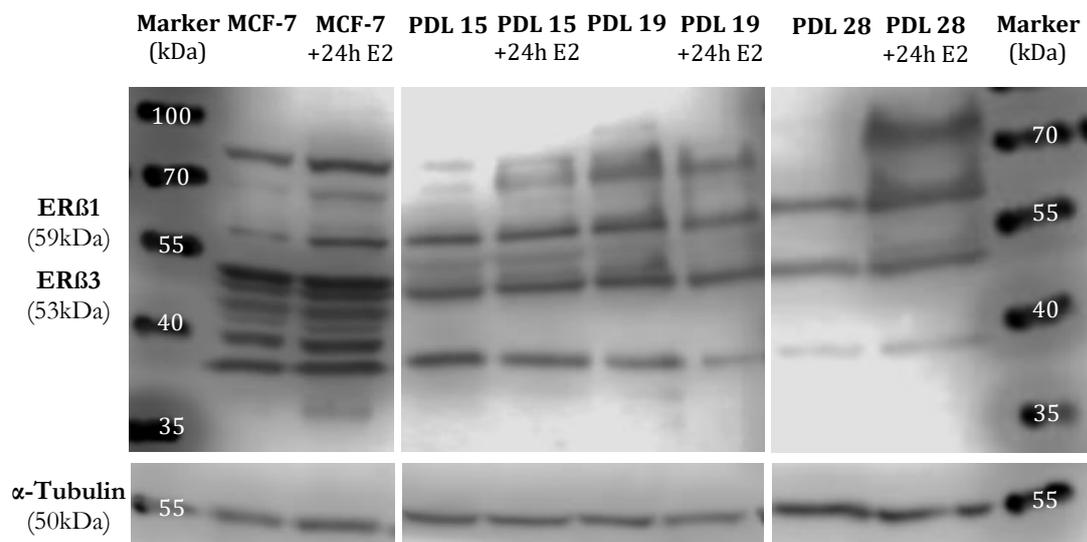


Abbildung 25: Western Blot, Immunreaktion ER β , männlich (Chemolumineszenz).

Zusammenschnitt. Darstellung der männlichen Zelllinien PDL 15, 19, 28; Kontrollzellprobe: MCF-7. Unterteilt in steroidhormonunbehandelt und -behandelt. Durchgehend sichtbare Banden bei 59 kDa, 53 kDa und <40 kDa. Die MCF-7-Zelllinie zeigt sechs weitere Isoformen, die sich auch bei den steroidhormonunbehandelten und -behandelten PDL-Zelllinien teilweise wiederfinden. Ladekontrolle (α -Tubulin) ist positiv. Erfolgreiche Immunreaktion.

3.2.4 Progesteronrezeptor

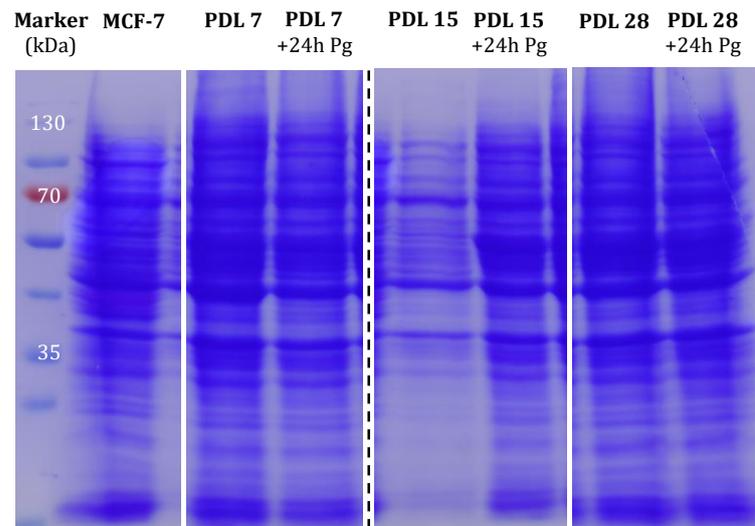


Abbildung 26: Coomassie Färbung zum Western Blot (Immunreaktion PR, w/m). Zusammenschnitt. Gleichmäßig beladene Gele. Links: weiblich (PDL 7); rechts: männlich (15, 28); Kontrollzellprobe: MCF-7. Unterteilt in steroidhormon-unbehandelt und -behandelt (Ausnahme: MCF-7: ausschließlich steroidhormonunbehandelt).

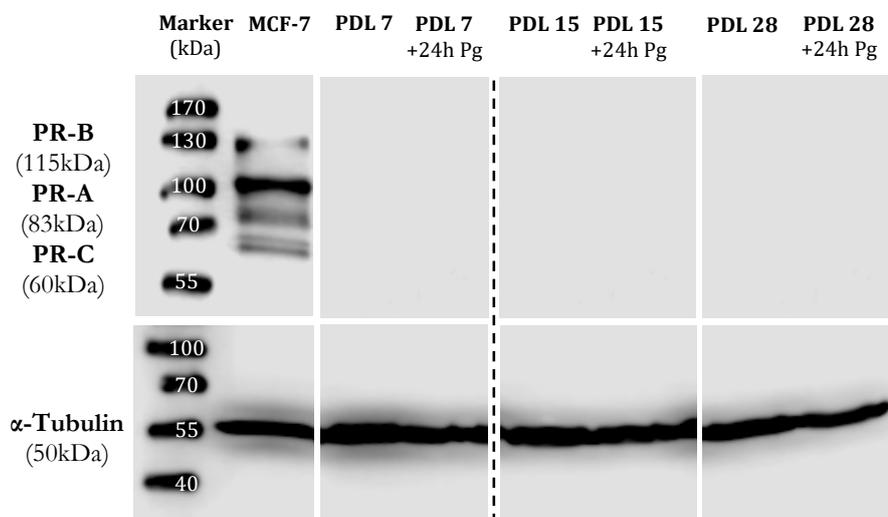


Abbildung 27: Western Blot, Immunreaktion PR, w/m (Chemolumineszenz). Zusammenschnitt. Links: weiblich (PDL 7); rechts: männlich (PDL 15, 28). Unterteilt in steroidhormonunbehandelt und -behandelt. Als Kontrollprobe diente MCF-7 (nicht steroidhormonbehandelt). Sichtbare Bande bei 115 kDa, 83 kDa und 60 kDa bei MCF-7. Zusätzlich angedeutete Bande auf Höhe von ca. 130 kDa. Ladekontrolle (α -Tubulin) ist positiv. Erfolgreiche Immunreaktion.

3.3 Immunzytochemie

Mithilfe der ICC wurden die einzelnen Steroidhormonrezeptoren in den PDLs lokalisiert und mittels Fluoreszenz sichtbar gemacht. Die verwendeten Antikörper sind Tabelle 2 und Tabelle 4 zu entnehmen. Da diese Methode ebenfalls die Proben auf Proteinebene analysiert war ein Ergebnis zu vermuten, dass dem der Western Blot-Analyse ähnelt.

Im Nachfolgenden ist für jeden Rezeptor beispielsweise anhand je einer männlichen (PDL 15) und einer weiblichen Ziellinie (PDL 26, für PR: PDL 7) die Reaktion der ICC im Overlay dargestellt. Als Kontrollzellen dienten wiederum MCF-7 (ER α , ER β , PR) und LNCaP (AR).

Die Lokalisation der Steroidhormonrezeptoren ist teilweise nur sehr schwach zu erkennen, da als Ausgangssituation die Intensität der jeweiligen Positivkontrolle (MCF-7, LNCaP) gewählt wurde. Aus diesem Grund wurden Sterne zur Markierung herangezogen.

Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (blau) markiert die Zellkerne (DNA) und dient zur Anfärbung der Negativkontrollen, bei denen keine rote Fluoreszenz zu sehen ist. Alexa Fluor 555 (rot) visualisiert die Lage der Rezeptoren. Der Balken gibt die Länge von 100 μm an.

3.3.1 Androgenrezeptor

Die ICC des AR zeigt ausschließlich für die Kontrollzelllinie (LNCaP; steroidhormon-unbehandelt/-behandelt) ein positives Ergebnis. AR ist insbesondere nach der Steroidhormonbehandlung mit Testosteron überwiegend nukleär positioniert, welches sich gut anhand des durch Überlagerung entstehenden Farbtönen (lila) erkennen lässt.

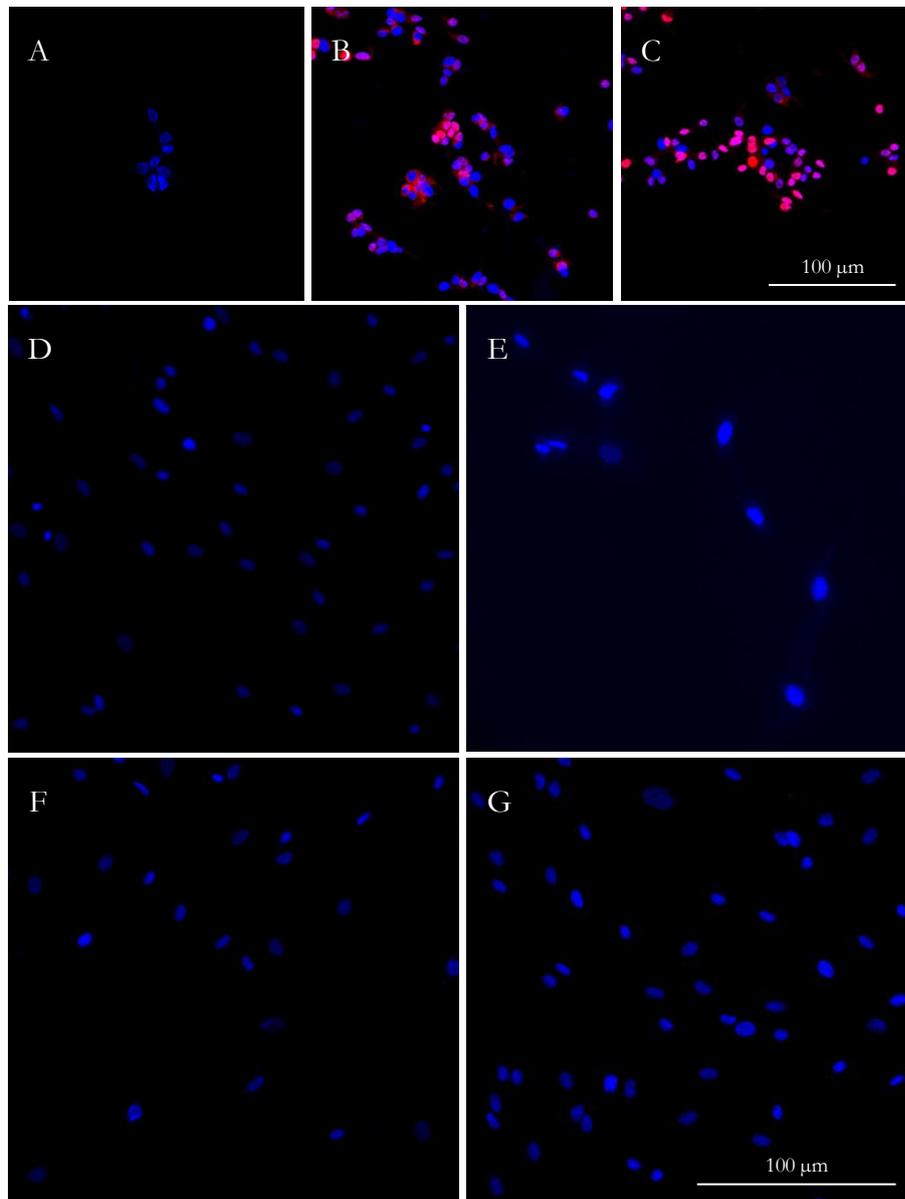


Abbildung 28: Immunzytochemie: AR, DAPI, Alexa Fluor 555. (A) Negativkontrolle LNCaP im Overlay. Positivkontrolle LNCaP: (B) steroidhormonunbehandelt, (C) steroidhormonbehandelt. PDLC-Proben (Weiblich): (D) PDL 26 (steroidhormonunbehandelt), (E) PDL 26 (steroidhormonbehandelt). PDLC-Proben (Männlich): (F) PDL 15 (steroidhormonunbehandelt), (G) PDL 15 steroidhormonbehandelt. Balken 100 µm, Vergrößerung 40x. (A-G): Identische Bildkorrektur.

3.3.2 Estrogenrezeptor α

ER α konnte für die MCF-7-Zelllinie und die PDLcs beider Geschlechter sowohl in steroidhormonunbehandeltem als auch -behandeltem Zustand nachgewiesen werden (rot). Bei den PDLcs zeigt sich eine durchgehend zytoplasmatische Positionierung der Rezeptoren, im Fall der MCF-7-Zelllinie ist ein Großteil von ER α im Zellkern lokalisiert.

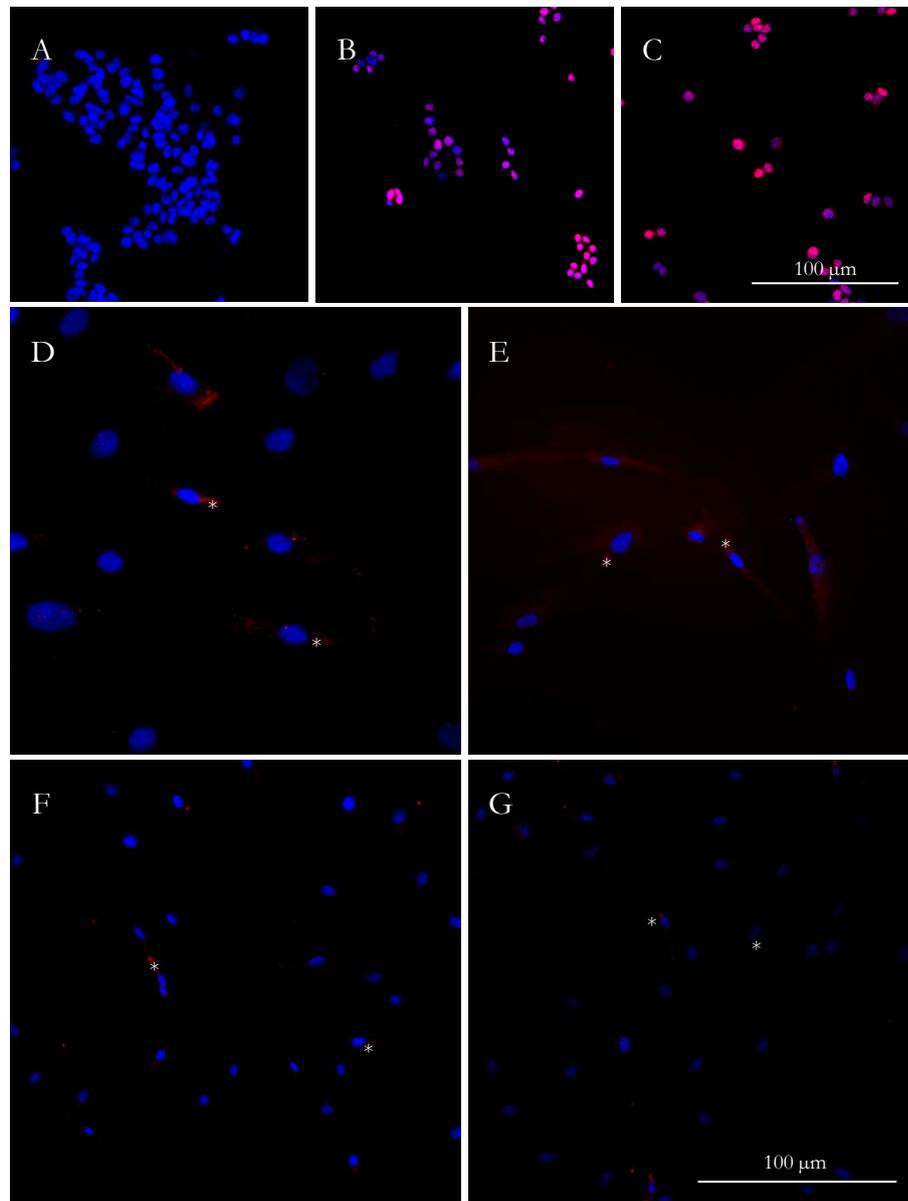


Abbildung 29: Immunzytochemie: ER α , DAPI, Alexa Fluor 555. (A) Negativkontrolle MCF-7 im Overlay. Positivkontrolle MCF-7: (B) steroidhormonunbehandelt, (C) steroidhormonbehandelt. PDLc-Proben (Weiblich): (D) PDL 26 (steroidhormonunbehandelt), (E) PDL 26 (steroidhormonbehandelt). PDLc-Proben (Männlich): (F) PDL 15 (steroidhormonunbehandelt), (G) PDL 15 steroidhormonbehandelt). Balken 100 μ m, Vergrößerung 40 x. (A-G): Identische Bildkorrektur. Sterne markieren positive Immunreaktion mit ER α .

3.3.3 Estrogenrezeptor β

ER β konnte ebenfalls sowohl für die Kontroll-, als auch die PDL-Zelllinien beider Geschlechter unabhängig der Hormoninkubation nachgewiesen werden (rot). In allen Fällen zeigt sich eine weitestgehende Translokation der Rezeptoren in den Kern nach hormoneller Stimulation mit Östradiol aus vorheriger zytoplasmatischer Positionierung.

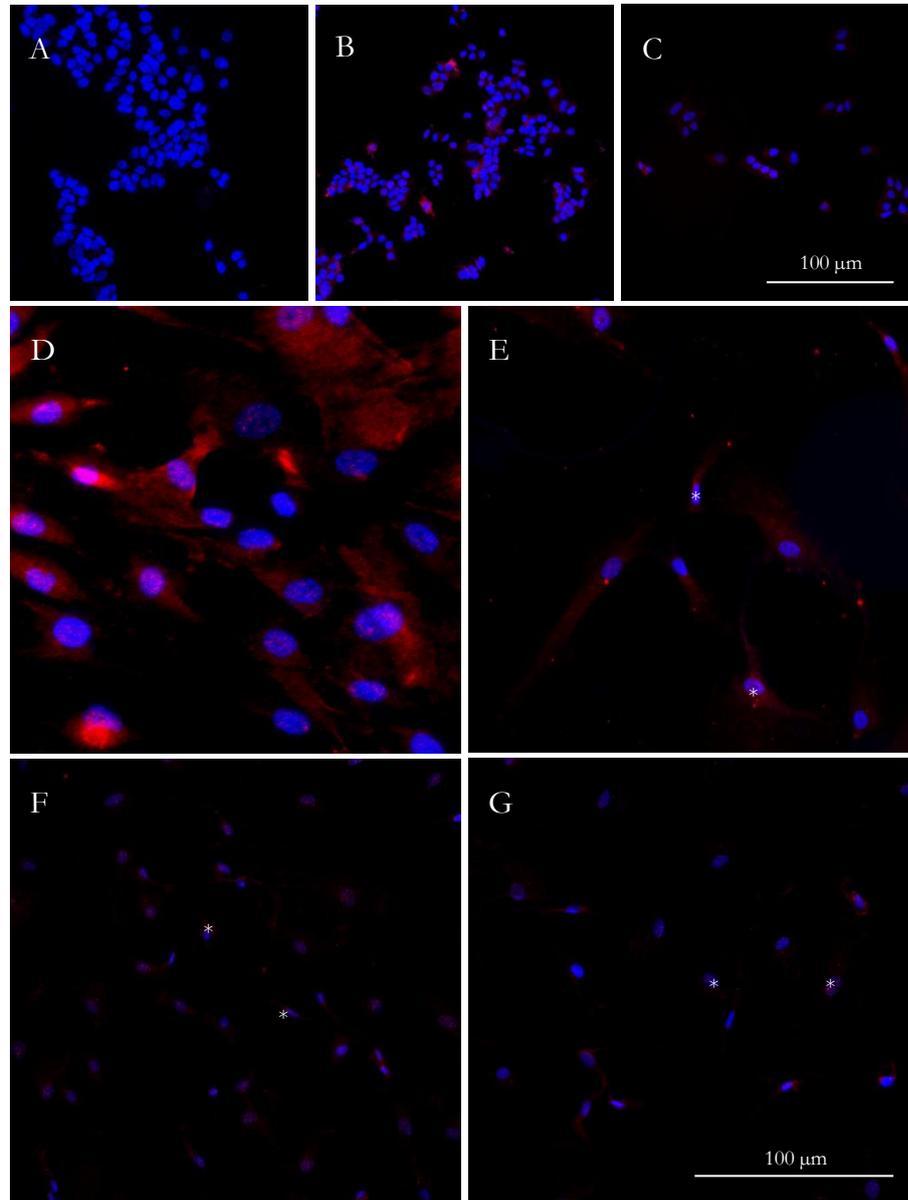


Abbildung 30: Immunzytochemie: ER β , DAPI, Alexa Fluor 555. (A) Negativkontrolle MCF-7 im Overlay. Positivkontrolle MCF-7: (B) steroidhormonunbehandelt, (C) steroidhormonbehandelt. PDL-C-Proben (Weiblich): (D) PDL 26 (steroidhormonunbehandelt), (E) PDL 26 (steroidhormonbehandelt). PDL-C-Proben (Männlich): (F) PDL 15 (steroidhormonunbehandelt), (G) PDL 15 steroidhormonbehandelt. Balken 100 μ m, Vergrößerung 40 x. (A-G): Identische Bildkorrektur. Sterne markieren positive Immunreaktion mit ER β .

3.3.4 Progesteronrezeptor

Im Gegensatz zu den Western Blot Ergebnissen zeigt PR im Rahmen der ICC ein positives Signal. PR konnte für die Kontroll- und die PDL-Zelllinien beider Geschlechter unabhängig der Hormoninkubation nachgewiesen werden (rot). Ähnlich ER β zeigt sich in allen Fällen eine weitestgehende nukleäre Translokation der Rezeptoren nach hormoneller Stimulation.

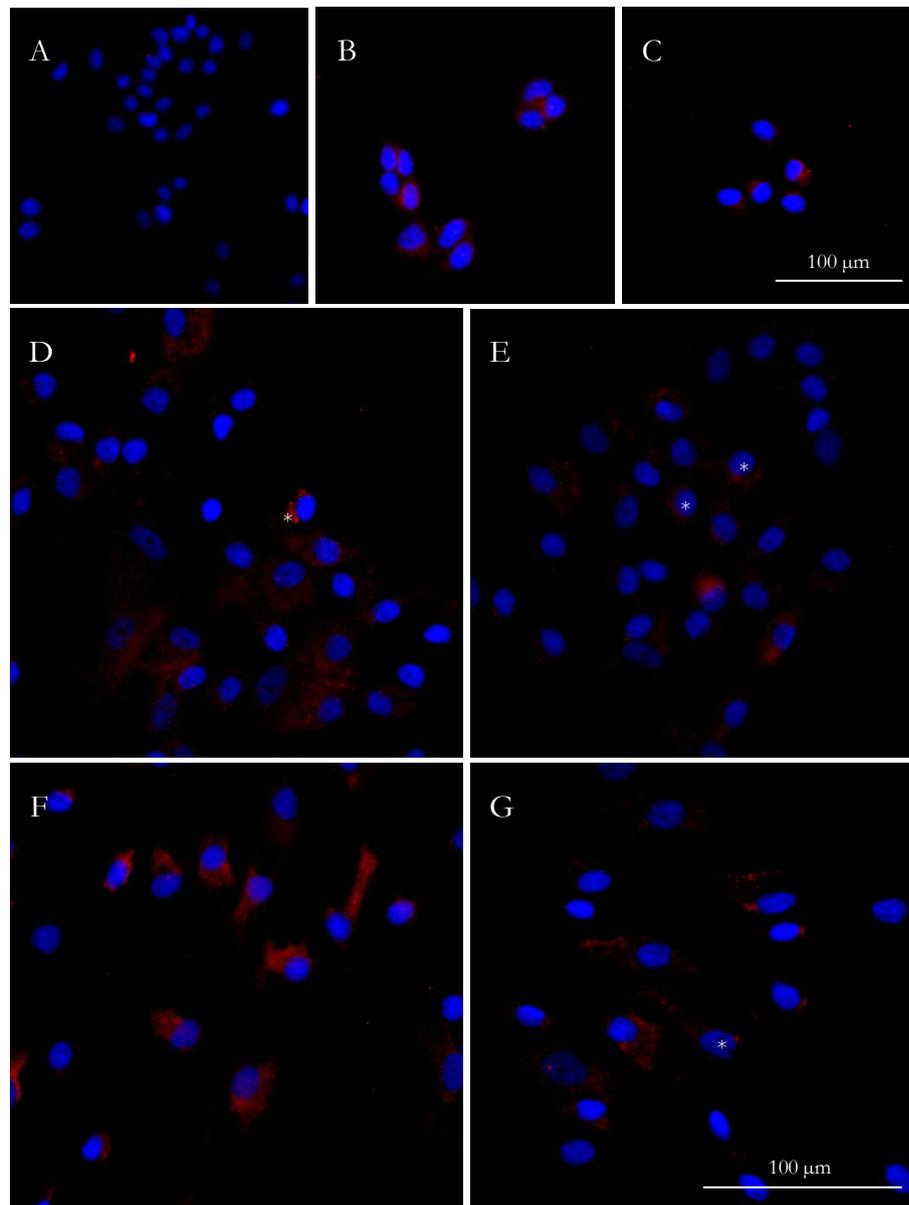


Abbildung 31: Immunzytochemie: PR, DAPI, Alexa Fluor 555. (A) Negativkontrolle MCF-7 im Overlay. Positivkontrolle MCF-7: (B) steroidhormonunbehandelt, (C) steroidhormonbehandelt. PDLC-Proben (Weiblich): (D) PDL 7 (steroidhormonunbehandelt), (E) PDL 7 (steroidhormonbehandelt). PDLC-Proben (Männlich): (F) PDL 15 (steroidhormonunbehandelt), (G) PDL 15 (steroidhormonbehandelt). Balken 100 µm, Vergrößerung 40 x. (A-G): Identische Bildkorrektur. Sterne markieren positive Immunreaktion mit PR.

4 Diskussion

Die wiederkehrende Frage nach einem möglichen Einfluss verschiedener Steroidhormone auf die kieferorthopädische Zahnbewegung ist als Kernelement der wissenschaftlichen Untersuchungen dieser Arbeit anzusehen. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte zur weiteren Klärung dieser und weiterführenden Teilfragestellungen, insbesondere vor dem Hintergrund der sich aktuell teils widersprechenden Aussagen bezüglich der Steroidhormonrezeptorexpression in den PDLCS (Parkar et al. 1996; Liang et al. 2008; Yuan et al. 2010; Pan et al. 2011), beigetragen werden.

4.1 Expressionsanalyse der Steroidhormonrezeptoren

4.1.1 Androgenrezeptor

In den PDLCS wurde 1996 erstmals die Expression des AR auf mRNA-Ebene bestätigt (Parkar et al. 1996). Dieser Nachweis von *AR* auf mRNA-Ebene gelang auch im Rahmen dieser Dissertation, wobei *AR* im Vergleich zu der Kontrollzelllinie LNCaP interessanterweise etwa sechsfach stärker bei den weiblichen PDLCS exprimiert wurde als bei den männlichen. Durch die Überexpression des *AR*-Gens in den androgensensitiven humanen Prostata-Adeno-Karzinomzellen führt der Vergleich der PDLCS/LNCaP zu relativ geringen prozentualen Genexpressionsangaben, welches die Ergebnisinterpretation zwischen den Geschlechtern jedoch nicht weiter beeinträchtigt. Der Unterschied im Vergleich der Geschlechter war nicht signifikant. Um dieses Ergebnis belastbar zu verifizieren, bedarf es vor dem Hintergrund der geringen Patientenzahl in dieser Arbeit ($n(w) = 3$; $n(m) = 3$) aber sicherlich weiterer Untersuchungen mit erweitertem Patientenkollektiv.

Im Gegensatz dazu war die Detektion des AR-Proteins nicht nur in der Immunzytochemie, sondern auch mit Ausnahme einiger unstenen Reaktionsbanden bei den männlichen PDLCS im Western Blot, nicht möglich. Hierfür ursächlich könnte beispielsweise eine mangelnde Proteinstabilität oder eine zu geringe Proteinsynthese sein. Abgesehen davon wäre eine von den PDLCS exprimierte AR-Isoform denkbar, die mit dem verwendeten Antikörper im Bereich von 110 kDa nicht detektierbar ist. Die unspezifischen Reaktionen im Rahmen des Western Blots können ihren Ursprung ebenfalls in verschiedenen Ursachen haben: In Frage kämen dafür zum Beispiel Kreuzreaktionen, bei denen die Bindung des Antikörpers an andere Strukturen als den Zielanalyten erfolgt. Dies kommt häufig bei strukturell oder

sterisch ähnlichen Molekülen vor. Eine weitere Ursache könnten auch endogene Bestandteile der Probe sein, die die Zugänglichkeit des Antikörpers zum Analyten erschweren oder Letzteren maskieren. Nicht außer Acht zulassen sind grundsätzlich dazu Störungen durch Chemikalien und Puffer. Aufgrund der nicht von Störungen betroffenen, aber unter den gleichen Bedingungen stattgefundenen Immunreaktionen der anderen Steroidhormonrezeptoren, ist diese Erklärung jedoch unter diesen Umständen eher zurückzustellen.

In jüngerer Vergangenheit konnte *in vivo* interessanterweise ein durch Androgene beeinflusster parodontaler Knochenstoffwechsel identifiziert werden (Seifi et al. 2015). Da Testosteron im Allgemeinen selbst als kaum bioaktiv beschrieben wird, könnte diese Annahme möglicherweise damit erklärt werden, dass die lokale Aromatase Testosteron in Östradiol umwandelt und es folgend über die Estrogenrezeptoren wirkt. Eine solche Umwandlung von Androgenen in Östrogene und biologisch aktivere Androgenderivate konnte in osteoblastenähnlichen Zellen bereits gefunden werden (Shimodaira et al. 1996).

4.1.2 Estrogenrezeptoren

In der Wissenschaft beschäftigen sich die meisten Studien zu Sexualhormonrezeptoren in PDLCs mit ER α und ER β (Jönsson et al. 2004; Liang et al. 2008; Tang et al. 2008; Pan et al. 2011; Martian 2019). Während das Vorhandensein der Estrogenrezeptoren ursprünglich nur in den MCF-7-Zellen beschrieben wurde (Parkar et al. 1996), bezeugen heutzutage mehrere wissenschaftliche Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen den Estrogenrezeptoren und den PDLCs: So wird in einigen Publikationen von einer auf mRNA-Ebene ausschließlichen ER β -Expression berichtet (Morishita et al. 1999b; Liang et al. 2008). Andere bezeugen die Expression beider Estrogenrezeptoren (Cao et al. 2007; Tang et al. 2008; Pan et al. 2011).

Auch in dieser Arbeit konnte die Expression beider Estrogenrezeptoren auf mRNA-Ebene durch Nachweis der spezifischen mRNAs im Rahmen der qPCR bestätigt werden: Während *ESR1* insgesamt sehr schwach auftritt, wird *ESR2* deutlich stärker exprimiert. Da die Steroidhormonrezeptoren jeweils mit der Kontrollzelllinie MCF-7 verglichen wurden, gestalten sich die prozentualen Expressionsangaben der einzelnen Gene gering. Im direkten Vergleich der Rezeptoren untereinander stellt dies jedoch keine Interpretationsproblematik dar. Der Unterschied im Vergleich der Geschlechter war nicht signifikant. Dieses Ergebnis ist möglicherweise aufgrund der geringen Patientenzahl ($n(w) = 3$; $n(m) = 3$) in Frage zu stellen. Zwar konnte auch in der Parallelstudie zu dieser Arbeit, die sich unter anderem mit der Expression von ER α und ER β in kieferorthopädisch bewegten

und unbewegten hPDLs, sowie deren Differenzierungspotential beschäftigt, kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern herausgestellt werden (Martian 2019), für weitere Studien erscheint es aber dennoch sinnvoll geschlechtsspezifische Einflüsse nicht auszuklammern (vgl. Deasy et al. 2007).

Auch auf Proteinebene konnten die Estrogenrezeptoren ER α und ER β detektiert werden. Da im Western Blot nur die Isoform ER α 36 statt ER α 66 in den PDLs identifiziert werden konnte, muss der Nachweis von ER α hierbei allerdings differenzierter betrachtet werden. Im Rahmen des in dieser Arbeit betrachteten Zellkollektivs wurde die Isoform ER α 36 bislang mit einer Ausnahme (Martian 2019; Parallelarbeit zu dieser Dissertation) lediglich in MCF-7-Zellen beschrieben (Wang et al. 2012; Li et al. 2013; Deng et al. 2014), in denen sie seltener als die *full-length* Isoform ER α 66 auftritt (Al-Bader et al. 2011). Während ER α 66 im Gegensatz zu ER α 36 über die Bildung funktioneller Homo- oder Heterodimere als ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor auf die DNA wirkt, fehlen ER α 36 beide Transkriptionsaktivierungsdomänen. Zudem ist ER α hauptsächlich im Zytoplasma und an der Plasmamembran lokalisiert. Dort erfolgt die Wirkung über schnelle Signalwege (Wang et al. 2005; Deng et al. 2014). Diese Beobachtung spiegelt sich auch in dieser Arbeit wider, da ER α im Rahmen der ICC mit einer Persistenz im Zytoplasma auf die Östradiolstimulation reagiert (vgl. Abschnitt 4.2).

Im Bereich der ER β ist ER β 1 als die einzige, vollkommen funktionsfähige Isoform bekannt. ER β 1 heterodimerisiert als obligatorischer Partner mit ER β 2, - β 4 oder - β 5 mit dem Resultat einer verstärkten Transaktivierungsaktivität im Vergleich einer ER β 1-Homodimerisierung (Leung et al. 2006). In erster Linie ist ER β für die Differenzierung osteoblastischer Zellen verantwortlich und beeinflusst die Knochenbildungskapazität (Liang et al. 2008). Im Allgemeinen verhalten sich ER α und ER β im Wechselspiel, sodass sie in vielen Geweben die Wirkungen des jeweils anderen Rezeptors antagonisieren oder synergisieren (Matthews und Gustafsson 2003). Beobachtet werden konnte eine östradiolabhängige Änderung des Medianverhältnisses von *ESR1/ESR2* zugunsten der ER β -Synthese für weibliche PDLs, während es bei den männlichen PDLs, trotz Hochregulation beider Rezeptoren, konstant blieb. Insgesamt könnte dies auf eine geschlechtsspezifische Regulation der Rezeptorexpression hinweisen. Unter Einfluss mechanischer Belastung, wie sie beispielsweise bei der orthodontischen Zahnbewegung auftritt, vermindert ER β die Knochenreaktion, während ER α sie erhöht (Lee et al. 2004). Insgesamt lässt sich folglich vermuten, dass möglicherweise eine Verhältnismodulation von *ESR1/ESR2* für die Reaktion auf mechanische Reize entscheidender ist als das Rezeptorexpressionsniveau selbst.

In der Vergangenheit konnte ER β auch in den Kernen gingivaler Epithelzellen nachgewiesen werden. Laut den Studienergebnissen gab es dort weder signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern noch zwischen gesundem und erkranktem Gewebe (Nebel et al. 2011). In den PDL-Zellkernen gelang der immunzytochemische Nachweis einer ER β -Immunreaktivität in etwa 40 % der Zellkerne, während keine ER α -Immunreaktivität nachgewiesen werden konnte (Jönsson et al. 2004). Daraufhin anzunehmen ist eine auf die Gentranskription bevorzugte Wirkung von Estrogen über ER β in humanen PDLCs.

Die immunzytochemischen Ergebnisse dieser Arbeit untermauern die Ergebnisse aus qPCR und Western Blot. Sowohl ER α als auch ER β konnten detektiert werden. Da allerdings auch hier der Vergleich zu MCF-7 für beide Estrogenrezeptoren stattfand, fiel die Intensität der Positivkontrolle jeweils deutlich stärker aus als für die PDLCs. Die geringe Fluoreszenz der Proben führte leider zu einer gewissen Darstellungsproblematik. Einerseits erschwert dies zwar die Interpretation der Aufnahmen untereinander, andererseits untermauert die auftretende Problematik weiter das verhältnismäßig geringe Vorkommen der Rezeptoren in den Versuchszelllinien.

4.1.3 Progesteronrezeptor

Die Expression des PR in den PDLCs ist wissenschaftlich umstritten: Während auf der einen Seite eine PR-Immunreaktivität nur in Kernen von MCF-7-Zellen, nicht aber in PDLCs beobachtet werden konnte (Jönsson et al. 2005), beschreibt eine andere Studie den erfolgreichen Nachweis der PR-mRNA in ihren Ergebnissen, bei der unter Zuhilfenahme immunzytochemischer Methoden zusätzlich auch das zugehörige PR-Protein im Kern und Zytoplasma der PDLCs detektiert werden konnte (Yuan et al. 2010).

Unter den experimentellen Bedingungen dieser Arbeit exprimieren die PDLCs auf mRNA-Ebene im Vergleich zu der Kontrollzelllinie MCF-7 sehr wenig PR. Analog zu den anderen untersuchten Steroidhormonrezeptoren AR, ER α und ER β besteht auch in diesem Fall das Problem der geringen prozentualen Genexpressionsangaben, welches die Ergebnisinterpretation zwischen den Geschlechtern zwar nicht beeinträchtigt, die grafische Darstellbarkeit jedoch erschwert.

Der Unterschied im Vergleich der Geschlechter war nicht signifikant, wobei die Beurteilung dieses Ergebnisses wiederum unter Berücksichtigung der geringen Patientenzahl ($n(w) = 3$; $n(m) = 3$) erfolgen sollte.

Die Western Blot Ergebnisse lieferten ausschließlich ein positives Ergebnis für die MCF-7-Zellen, in denen alle drei bekannten Isoformen nachgewiesen werden konnten. Angesichts der in der qPCR beobachteten sehr geringen Genexpression liegt die ausgebildete Proteinmenge damit vermutlich unter der Nachweisgrenze. Anders gestaltete sich dies im Rahmen der ICC: Geschlechtsunabhängig fand sich sowohl für die Kontroll- als auch die PDL-Zelllinien ein positives Signal. Eine Erklärung hierfür könnte in der Verwendung des separaten Antikörpers liegen (Tabelle 2).

Die PR werden in den meisten osteoblastenähnlichen Zellen exprimiert, da das zugehörige Hormon eine entscheidende Rolle im Knochenstoffwechsel einnimmt (MacNamara et al. 1995). Auch PDLCs weisen solche osteoblastenähnliche Merkmale auf und tragen zur Regeneration parodontaler Gewebe bei (Nojima et al. 1990; Morishita et al. 1998), weshalb sie als multipotente Zellen gelten (Gould et al. 1980). Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit dennoch eine eher untergeordnete Rolle des PR in der PDLC-Biologie, obwohl Progesteron die Proliferation und Differenzierung der Zellen verbessern könnte (Yuan et al. 2010).

4.2 Einfluss einer 24-stündigen Steroidhormoninkubation

2016 wurde ein Fallbericht eines Patienten mit kieferorthopädischen Nebenwirkungen als Reaktion auf eine geschlechtsangleichende Hormontherapie mit Östrogen publik, bei der ausgeprägte Wurzelresorptionen beobachtet werden konnten (Scharf et al. 2016). Auch am Tiermodell wurde der Einfluss bestimmter Hormonstatus mit unterschiedlichen Ergebnissen untersucht, mit der überwiegenden Annahme, dass Östradiol und Progesteron die Zahnbewegung und Knochenresorption reduzieren (Sirisoontorn et al. 2011; Celebi et al. 2013; Ghajar et al. 2013; Olyaei et al. 2013; Seifi et al. 2015). Den Berichten zufolge lag folglich nicht nur die Untersuchung der Expression der Steroidhormonrezeptoren selbst, sondern auch die Beurteilung autoregulatorischer Wirkungen der Sexualhormone auf die Rezeptoren nahe:

Häufig regulieren Hormone ihre eigenen Rezeptoren herunter, um einen Ausgleich des homöostatischen Systems zu gewährleisten (Jablonka et al. 1992). Diese Herunterregulierung zeigte sich auch in den Versuchen dieser Arbeit: Nach hormoneller Stimulation waren alle Sexualhormonrezeptoren mit der Ausnahme von *ESR1* und *ESR2* in männlichen PDLCs von der Herunterregulation betroffen. Angesichts der Tatsache, dass die Reaktion der PDLCs auf die hormonelle Stimulation nur einmal nach 24 h gemessen wurde, muss dieses Ergebnis in ihrer Aussagekraft jedoch mit gewisser Limitation betrachtet werden. Insgesamt

beeinflusste weder das Geschlecht noch die Hormonstimulation die Genexpression aller untersuchten Rezeptoren signifikant.

Im Rahmen der ICC reagierten ER β und PR auf die hormonelle Stimulation mit einer weitestgehenden nukleären Translokation der Rezeptoren. Dies spricht für stattfindende autoregulatorische Wirkungen im Nukleus. Im Fall von ER α konnte keine Positionsverschiebung der Rezeptoren beobachtet werden, welches anhand beschriebener Wirkung über schnelle Signalwege erklärt werden könnte (Wang et al. 2005; Deng et al. 2014).

4.3 Ausblick

Die Ergebnisse verdeutlichen ein von Spendervariationen (Geschlecht/Alter) unabhängiges, komplexes Zusammenspiel von ER α und ER β in den PDLcs. Hiervon abgeleitet werden könnte als klinische Konsequenz eine veränderte orthodontische Zahnbewegung bei Patienten jeder Altersgruppe und beider Geschlechter aufgrund hormoneller Veränderungen. Um diese und weitere Fragestellungen genauer zu klären, sollten weitere Untersuchungen, insbesondere vor dem Hintergrund der teils übereinstimmenden, teils aber leider auch kontrovers diskutierten Ergebnisse, durchgeführt werden. Neben eines erweiterten Patientenkollektivs, könnte auch eine veränderte Methodenauswahl zum besseren Verständnis beitragen.

Parallel zu dieser Arbeit wurden PDLcs von bewegten und unbewegten Zähnen untersucht und in Hinblick auf ihr Differenzierungsverhalten betrachtet (Martian 2019). In einer weiteren Arbeit wurde eine genauere Analyse des multipotenten Differenzierungsvermögens der PDLcs zu Chondrozyten, Adipozyten und Osteozyten durchgeführt (Weeber unpubliziert).

Zu allen bislang aufgezeigten Untersuchungsansätzen sollten vertiefende Studien mit dem Ziel der Herausstellung spezifischer Charakteristika der Expression der Steroidhormonrezeptoren angefertigt werden. Vor dem kieferorthopädischen Hintergrund könnten insbesondere auch Untersuchungen von RANKL, Osteoprotegerin und Sklerostin zur Analyse der Knochen auf- und abbauenden Wirkung der PDLcs dienen.

Ein sicherlich weiter beachtenswerter Teilaspekt betrifft die Aromatase-Aktivität in PDLcs. Da Testosteron selbst schwach bioaktiv ist, besteht der Verdacht einer Katalyse des Moleküls zu Estrogen, durch die eine indirekte Wirkung des Testosterons über die Estrogenrezeptoren ER α und ER β bestehen könnte.

In Gänze werden die Erkenntnisse aller Studien in der Formulierung therapeutischer Konsequenzen und der möglichen Entwicklung neuer klinischer Leitfäden münden. Auf dem Weg hin zur Individualmedizin wäre bspw. eine patientenspezifische Einbeziehung hormoneller Einflüsse auf den Knochenmetabolismus oder die -regeneration denkbar.

5 Zusammenfassung

Zum aktuellen Zeitpunkt verfolgen wissenschaftliche Bemühungen im kieferorthopädischen Kontext insbesondere das Ziel einer Verkürzung individueller Behandlungszeiten, da diese bislang zwischen einzelnen Patienten stark variieren und nur unzureichend vorausgesagt werden können. Zahnbewegungen werden durch orthodontisch applizierte Kräfte möglich, die kontinuierliche Umbauvorgänge am Knochen induzieren. Dieses Remodelling wird durch die PDLCs durch Anpassung ihrer Form, Gen- und Proteinexpression vermittelt und setzt sich aus Knochenresorption in Druckzonen und -adsorption in Zugzonen zusammen.

Für die Entwicklung individueller Behandlungsstrategien ist es dabei wichtig, die Genexpression und Proteinsynthese der klassischen Steroidhormonrezeptoren in den PDLCs in Abhängigkeit spender- und zahnspezifischer Faktoren zu verstehen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Expressionsmuster von Östrogen- (ER α und ER β), Androgen- (AR) und Progesteron- (PR) receptoren unter Berücksichtigung des Geschlechts und einer 24-stündigen-Hormonstimulation in den PDLCs von sechs gesunden Spendern ((w): n = 3, (m): n = 3) untersucht.

Mithilfe drei verschiedener Nachweisverfahren wurde das Probenmaterial geschlechts- und hormonspezifisch untersucht: Die Ergebnisse der qPCR, des Western Blots und der ICC wiesen eine zentrale Rolle des ER α und ER β nach, während sich eine eher unzureichende Proteinsynthese für den AR und PR darstellte.

Für den ER β konnten neben der *full-length*-Isoform ER β -1 auch mehrere verkürzte Varianten gefunden werden. Für den ER α wurde entgegen den Erwartungen die Expression der Isoform ER α 36 (statt ER α 66) festgestellt.

Zur Beurteilung autoregulatorischer Wirkungen der Sexualhormone auf ihre entsprechenden Rezeptoren diente die Durchführung der 24-stündigen-Hormonstimulation: Hierbei wurden alle Gene nach hormoneller Stimulation mit der Ausnahme von *ESR1* und *ESR2* in männlichen PDLCs herunterreguliert. Insgesamt beeinflusste weder das Geschlecht noch die Hormonstimulation die Genexpression aller untersuchten Rezeptoren signifikant.

Die ICC zeigte eine überwiegend zytoplasmatische Positionierung aller Rezeptoren, wobei ER β und PR auf die hormonelle Stimulation mit einer weitestgehenden nukleären Translokation der Rezeptoren reagierten.

Insgesamt verdeutlichen die Ergebnisse ein von Spendervariationen (Geschlecht/Alter) unabhängiges, komplexes Zusammenspiel von ER α und ER β in den PDLCs. Hiervon als

klinische Konsequenz abgeleitet werden könnte eine veränderte orthodontische Zahnbewegung bei Patienten jeder Altersgruppe und beider Geschlechter aufgrund hormoneller Veränderungen. Um diese und weitere Fragestellungen genauer zu klären, sollten weitere Untersuchungen, insbesondere vor dem Hintergrund der teils mit der Literatur übereinstimmenden, teils aber leider auch kontrovers diskutierten Ergebnisse, durchgeführt werden. Neben eines erweiterten Patientenkollektivs, wäre sicherlich auch eine veränderte Methodenauswahl einem umfassenderen Verständnis zuträglich.

6 Literaturverzeichnis

- Abraham G, Halbreich U, Friedman RH, Josiassen RC (2003): Bone mineral density and prolactin associations in patients with chronic schizophrenia. *Schizophr Res* 59, 17–18
- Al-Bader M, Ford C, Al-Ayadhy B, Francis I (2011): Analysis of estrogen receptor isoforms and variants in breast cancer cell lines. *Exp Ther Med* 2, 537–544
- Allen TK, Feng L, Grotegut CA, Murtha AP (2014): Progesterone Receptor Membrane Component 1 as the Mediator of the Inhibitory Effect of Progestins on Cytokine-Induced Matrix Metalloproteinase 9 Activity In Vitro. *Reprod Sci* 21, 260–268
- Araujo RMSD, Oba Y, Moriyama K (2007): Identification of genes related to mechanical stress in human periodontal ligament cells using microarray analysis. *J Periodontol Res* 42, 15–22
- Ascenzi P, Bocedi A, Marino M (2006): Structure–function relationship of estrogen receptor α and β : Impact on human health. *Mol Aspects Med* 27, 299–402
- Auchus RJ, Fuqua SAW (1994): The oestrogen receptor. *Baillière Clin Endocrinol Metab* 8, 433–449
- Baloul SS (2015): Osteoclastogenesis and Osteogenesis during Tooth Movement. *Front Oral Biol* 18, 75–79
- Basdra EK, Komposch G (1997): Osteoblast-like properties of human periodontal ligament cells: an in vitro analysis. *Eur J Orthod* 19, 615–621
- Baumhammers A, Stallard RE, Zander HA (1965): Remodeling of Alveolar Bone. *J Periodontol* 36, 439–442
- Beato M (1989): Gene Regulation by Steroid Hormones. *Cell Press* 56, 335–344
- Beato M, Arnemann J, Chalepakis G, Slater E, Willmann T (1987): Gene regulation by steroid hormones. *J Steroid Biochem* 27, 9–14
- Beertsen W, McCulloch CAG, Sodek J (1997): The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000* 13, 20–40
- Bernard V, Young J, Binart N (2019): Prolactin - a pleiotropic factor in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 15, 356–365
- Bevelander G, Nakahara H (1968): The fine structure of the human periodontal ligament. *Anat Rec* 162, 313–325
- Cao M, Shu L, Li J, Su J, Zhang W, Wang Q, Guo T, Ding Y (2007): The expression of estrogen receptors and the effects of estrogen on human periodontal ligament cells. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 29, 329–335
- Celebi AA, Demirer S, Catalbas B, Arıkan S (2013): Effect of ovarian activity on orthodontic tooth movement and gingival crevicular fluid levels of interleukin-1 β and prostaglandin E₂ in cats. *Angle Orthod* 83, 70–75
- Clément-Lacroix P, Ormandy C, Lepescheux L, Ammann P, Damotte D, Goffin V, Bouchard B, Amling M, Gaillard-Kelly M, Binart N et al. (1999): Osteoblasts are a new target for prolactin: analysis of bone formation in prolactin receptor knockout mice. *Endocrinology* 140, 96–105

- Colvard DS, Eriksen EF, Keeting PE, Wilson EM, Lubahn DB, French FS, Riggs BL, Spelsberg TC (1989): Identification of androgen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 854–857
- Davey RA, Grossmann M (2016): Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *Clin Biochem Rev* 37, 3–15
- Davidovitch Z (1991): Tooth Movement. *Crit Rev Oral Biol Med* 2, 411–450
- Deasy BM, Lu A, Tebbets JC, Feduska JM, Schugar RC, Pollett JB, Sun B, Urish KL, Gharaibeh BM, Cao B et al. (2007): A role for cell sex in stem cell-mediated skeletal muscle regeneration: female cells have higher muscle regeneration efficiency. *J Cell Biol* 177, 73–86
- Deng H, Zhang XT, Wang ML, Zheng HY, Liu LJ, Wang ZY (2014): ER- α -Mediated Rapid Estrogen Signaling Positively Regulates ER-Positive Breast Cancer Stem/Progenitor Cells. *PLoS One* 9, e88034
- Diercke K, Sen S, Kohl A, Lux CJ, Erber R (2011): Compression-dependent Up-regulation of Ephrin-A2 in PDL Fibroblasts Attenuates Osteogenesis. *J Dent Res* 90, 1108–1115
- Drake MT, Clarke BL, Lewiecki EM (2015): The Pathophysiology and Treatment of Osteoporosis. *Clin Ther* 37, 1837–1850
- Evans R (1988): The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889–895
- Fleissig O, Reichenberg E, Tal M, Redlich M, Barkana I, Palmon A (2018): Morphologic and gene expression analysis of periodontal ligament fibroblasts subjected to pressure. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 154, 664–676
- Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S (Hrsg.): *Pharmakologie und Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*. Springer-Verlag, Heidelberg 2012
- Fu T, Liu S, Zhao H, Cao M, Zhang R (2019): Effectiveness and Safety of Minimally Invasive Orthodontic Tooth Movement Acceleration: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Dent Res* 98, 1469–1479
- Fujita T, Ohtani J, Shigekawa M, Kawata T, Kaku M, Kohno S, Tsutsui K, Tenjo K, Motokawa M, Tohma Y, Tanne K (2004): Effects of Sex Hormone Disturbances on Craniofacial Growth in Newborn Mice. *J Dent Res* 83, 250–254
- Fukayama S, Tashjian AH (1989): Direct Modulation by Androgens of the Response of Human Bone Cells (SaOS-2) to Human Parathyroid Hormone (PTH) and PTH-Related Protein. *Endocrinology* 125, 1789–1794
- Funakoshi T, Yanai A, Shinoda K, Kawano MM, Mizukami Y (2006): G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 346, 904–910
- Fuqua SAW, Schiff R, Parra I, Friedrichs WE, Su JL, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Willson TM, Moore JT (1999): Expression of Wild-Type Estrogen Receptor β and Variant Isoforms in Human Breast Cancer. *Cancer Res* 59, 5425–5428
- Gelmann EP (2002): Molecular Biology of the Androgen Receptor. *J Clin Oncol* 20, 3001–3015
- George FW, Wilson JD: Sex determination and sex differentiation. In: Knobil E, Neil J (Hrsg.): *The Physiology of Reproduction*. 2. Auflage; Raven Press, New York 1988, 3–28

- Ghajar K, Olyae P, Mirzakouchaki B, Ghahremani L, Garjani A, Dadgar E, Marjani S (2013): The effect of pregnancy on orthodontic tooth movement in rats. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 18, 351–355
- Giannopoulou C, Dudic A, Mombelli A, Kiliaridis S: Bone Remodeling Markers Determine Slow vs Fast Orthodontic Tooth Movement. Konferenzbeitrag im Rahmen der IADR General Session and Exhibition, Kapstadt, 25.06.-28.06.2014
- Giannopoulou C, Dudic A, Pandis N, Kiliaridis S (2016): Slow and fast orthodontic tooth movement: an experimental study on humans. *Eur J Orthod* 38, 404–408
- Gould TRL, Melcher AH, Brunette DM (1980): Migration and division of progenitor cell populations in periodontal ligament after wounding. *J Periodontal Res* 15, 20–42
- Göz G (1990): The age dependence of the tissue reaction in tooth movements. *Fortschr Kieferorthop* 51, 4–7
- Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P (1986): Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320, 134–139
- Gronemeyer H, Meyer ME, Bocquel MT, Kastner P, Turcotte B, Chambon P (1991): Progesterin receptors: Isoforms and antihormone action. *J Steroid Biochem Mol Biol* 40, 271–278
- Guo Z, Yang X, Sun F, Jiang R, Linn DE, Chen Hege, Chen Hegang, Kong X, Melamed J, Tepper CG et al. (2009): A Novel Androgen Receptor Splice Variant Is Upregulated during Prostate Cancer Progression and Promotes Androgen-depletion-resistant Growth. *Cancer Res* 69, 2305–2313
- Henderson BE, Ross R, Bernstein L (1988): Estrogens as a Cause of Human Cancer: The Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res* 48, 246–253
- Horowitz MC (1993): Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science* 260, 626–627
- Hovland AR, Powell RL, Takimoto GS, Tung L, Horwitz KB (1998): An N-terminal Inhibitory Function, IF, Suppresses Transcription by the A-isoform but Not the B-isoform of Human Progesterone Receptors. *J Biol Chem* 273, 5455–5460
- Jablonka E, Lachmann M, Lamb MJ (1992): Evidence, mechanisms and models for the inheritance of acquired characters. *J Theor Biol* 158, 245–268
- Jacobsen BM, Horwitz KB (2012): Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. *Mol Cell Endocrinol* 357, 18–29
- Jiang N, Guo W, Chen M, Zheng Y, Zhou J, Kim SG, Embree MC, Songhee Song K, Marao HF, Mao JJ (2016): Periodontal Ligament and Alveolar Bone in Health and Adaptation: Tooth Movement. *Front Oral Biol* 18, 1–8
- Jönsson D, Andersson G, Ekblad E, Liang M, Bratthall G, Nilsson B-O (2004): Immunocytochemical demonstration of estrogen receptor β in human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol* 49, 85–88
- Jönsson D, Wahlin Å, Idvall I, Johnsson I, Bratthall G, Nilsson B-O (2005): Differential effects of estrogen on DNA synthesis in human periodontal ligament and breast cancer cells. *J Periodontal Res* 40, 401–406

- Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H (2002): Periodontal Ligament Cells Under Mechanical Stress Induce Osteoclastogenesis by Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand Up-Regulation via Prostaglandin E2 Synthesis. *J Bone Miner Res* 17, 210–220
- Kao T-L, Kuan Y-P, Cheng W-C, Chang W-C, Jeng L-B, Yeh S, Ma W-L (2018): Estrogen receptors orchestrate cell growth and differentiation to facilitate liver regeneration. *Theranostics* 8, 2672–2682
- Kastner P, Bocquel MT, Turcotte B, Garnier JM, Horwitz KB, Chambon P, Gronemeyer H (1990): Transient expression of human and chicken progesterone receptors does not support alternative translational initiation from a single mRNA as the mechanism generating two receptor isoforms. *J Biol Chem* 265, 12163–12167
- Kawarizadeh A, Bourauel C, Zhang D, Götz W, Jäger A (2004): Correlation of stress and strain profiles and the distribution of osteoclastic cells induced by orthodontic loading in rat. *Eur J Oral Sci* 112, 140–147
- Kim HJ, Lee WJ (2009): Ligand-independent activation of the androgen receptor by insulin-like growth factor-I and the role of the MAPK pathway in skeletal muscle cells. *Mol Cells* 28, 589–593
- Kleber BM (Hrsg.): *Parodontologie-Kompodium für Studierende und Zahnärzte*. Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln 1998
- Klingsberg J, Butcher EO (1960): Comparative Histology of Age Changes in Oral Tissues of Rat, Hamster, and Monkey. *J Dent Res* 39, 158–169
- Koelling S, Miosge N (2010): Sex differences of chondrogenic progenitor cells in late stages of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 62, 1077–1087
- Kück U (Hrsg.): *Praktikum der Molekulargenetik*. 1. Auflage; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2005
- Kudlacek S, Freudenthaler O, Willvonseder R (1999): Einfluß androgener Hormone auf den Knochenstoffwechsel des Mannes. *J Urol Urogynakologie* 6, 17–19
- Kuiper GGJM, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996): Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 5925–5930
- Lange CA, Richer JK, Shen T, Horwitz KB (1998): Convergence of progesterone and epidermal growth factor signaling in breast cancer. Potentiation of mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 273, 31308–31316
- Lee KCL, Jessop H, Suswillo R, Zaman G, Lanyon LE (2004): The adaptive response of bone to mechanical loading in female transgenic mice is deficient in the absence of oestrogen receptor-alpha and -beta. *J Endocrinol* 182, 193–201
- Lekic PC, Pender N, McCulloch CAG (1997): Is fibroblast heterogeneity relevant to the health, diseases, and treatments of periodontal tissues? *Crit Rev Oral Biol Med* 8, 253–268
- Leonhardt SA, Boonyaratanakornkit V, Edwards DP (2003): Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms. *Steroids* 68, 761–770
- Leung Y-K, Mak P, Hassan S, Ho S-M (2006): Estrogen receptor (ER)- β isoforms: A key to understanding ER- β signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 13162–13167

- Lewandowski S, Kalita K, Kaczmarek L (2002): Potential functional significance of a variety of mRNA isoforms. *FEBS Lett* 524, 1–5
- Li G, Zhang J, Jin K, He K, Zheng Y, Xu X, Wang Haohao, Wang Haiyong, Li Z, Yu X et al. (2013): Estrogen receptor- α 36 is involved in development of acquired tamoxifen resistance via regulating the growth status switch in breast cancer cells. *Mol Oncol* 7, 611–624
- Liang L, Yu J, Wang Y, Ding Y (2008): Estrogen regulates expression of osteoprotegerin and RANKL in human periodontal ligament cells through estrogen receptor beta. *J Periodontol* 79, 1745–1751
- Lyons LS, Rao S, Balkan W, Faysal J, Maiorino CA, Burnstein KL (2008): Ligand-independent activation of androgen receptors by Rho GTPase signaling in prostate cancer. *Mol Endocrinol* 22, 597–608
- Macari S, Ajay Sharma L, Wyatt A, Knowles P, Szawka RE, Garlet GP, Grattan DR, Dias GJ, Silva TA (2016): Osteoprotective Effects of Estrogen in the Maxillary Bone Depend on ER α . *J Dent Res* 95, 689–696
- Macari S, Sharma LA, Wyatt A, da Silva JM, Dias GJ, Silva TA, Szawka RE, Grattan DR (2018): Lactation induces increases in the RANK/RANKL/OPG system in maxillary bone. *Bone* 110, 160–169
- MacNamara P, O’Shaughnessy C, Manduca P, Loughrey HC (1995): Progesterone receptors are expressed in human osteoblast-like cell lines and in primary human osteoblast cultures. *Calcif Tissue Int* 57, 436–441
- Maggiolini M, Vivacqua A, Fasanella G, Recchia AG, Sisci D, Pezzi V, Montanaro D, Musti AM, Picard D, Andò S (2004): The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *J Biol Chem* 279, 27008–27016
- Makrygiannakis MA, Kaklamanos EG, Athanasiou AE (2018): Does common prescription medication affect the rate of orthodontic tooth movement? A systematic review. *Eur J Orthod* 40, 649–659
- Maqsood MI, Matin MM, Bahrami AR, Ghasroldasht MM (2013): Immortality of cell lines: challenges and advantages of establishment. *Cell Biol Int* 37, 1038–1045
- Marchesan JT, Scanlon CS, Soehren S, Matsuo M, Kapila YL (2011): Implications of cultured periodontal ligament cells for the clinical and experimental setting: A review. *Arch Oral Biol* 56, 933–943
- Martian V: Untersuchung des Differenzierungsverhaltens von humanen Zellen des parodontalen Ligaments, Masterarbeit, Universitätsmedizin Rostock 2019
- Matthews J, Gustafsson JÅ (2003): Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv* 3, 281–292
- McEwan IJ, Escriva H, Bertrand S, Laudet V (2004): The evolution of the nuclear receptor superfamily. *Essays Biochem* 40, 11–26
- Melsen B (Hrsg.): *Current Controversies in Orthodontics*. Quintessence Publishing Company, Inc Chicago 1991
- Melsen B (1999): Biological reaction of alveolar bone to orthodontic tooth movement. *Angle Orthod* 69, 151–158

- Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Jones SA, Horne EL, Su JL, Kliewer SA, Lehmann JM, Willson TM (1998): Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 247, 75–78
- Morani A, Warner M, Gustafsson J-A (2008): Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alfa and beta in epithelial tissues. *J Intern Med* 264, 128–142
- Morishita M, Shimazu A, Iwamoto Y (1999b): Analysis of oestrogen receptor mRNA by reversetranscriptase-polymerase chain reaction in humanperiodontal ligament cells. *Arch Oral Biol* 44, 781–783
- Morishita M, Yamamura T, Shimazu A, Bachchu AH, Iwamoto Y (1999a): Estradiol enhances the production of mineralized nodules by human periodontal ligament cells. *J Clin Periodontol* 26, 748–751
- Morishita M, Yamamura T, Bachchu MAH, Shimazu A, Iwamoto Y (1998): The effects of oestrogen on osteocalcin production byhuman periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol* 43, 329–333
- Mosselman S, Polman J, Dijkema R (1996): ER β : Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392, 49–53
- Mukai M, Yoshimine Y, Akamine A, Maeda K (1993): Bone-like nodules formed in vitro by rat periodontal ligament cells. *Cell Tissue Res* 271, 453–460
- Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y et al. (2007): Estrogen Prevents Bone Loss via Estrogen Receptor α and Induction of Fas Ligand in Osteoclasts. *Cell* 130, 811–823
- Nanci A, Bosshardt DD (2006): Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000* 40, 11–28
- Nebel D, Bratthall G, Ekblad E, Norderyd O, Nilsson BO (2011): Estrogen regulates DNA synthesis in human gingival epithelial cells displaying strong estrogen receptor β immunoreactivity. *J Periodontal Res* 46, 622–628
- Nilsen J, Brinton RD (2002): Impact of Progestins on Estrogen-Induced Neuroprotection: Synergy by Progesterone and 19-Norprogesterone and Antagonism by Medroxyprogesterone Acetate. *Endocrinology* 143, 205–212
- Nilsen J, Brinton RD (2003): Divergent impact of progesterone and medroxyprogesterone acetate (Provera) on nuclear mitogen-activated protein kinase signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 10506–10511
- Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JÅ (2001): Mechanisms of Estrogen Action. *Physiol Rev* 81, 1535–1565
- Nojima N, Kobayashi M, Shionome M, Takahashi N, Suda T, Hasegawa K (1990): Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts. *J Periodontal Res* 25, 179–185
- Norman AW, Litwack G (Hrsg.): *Hormones*. 1. Auflage; Academic Press, San Diego 1987
- Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Hiroi H, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M (1998): The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 243, 122–126

- Olyae P, Mirzakouchaki B, Ghajar K, Seyyedi SA, Shalchi M, Garjani A, Dadgar E (2013): The effect of oral contraceptives on orthodontic tooth movement in rat. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 18, 146–150
- Omar M, Kaklamanos EG (2020): Does the rate of orthodontic tooth movement change during pregnancy and lactation? A systematic review of the evidence from animal studies. *BMC Oral Health* 20, 237
- Osborn JW (Hrsg.): *Dental anatomy and embryology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1981
- Pan F, Zhang R, Wang G, Ding Y (2011): Oestrogen receptors are involved in the osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells. *Biosci Rep* 31, 117–124
- Parkar M, Newman H, Olsen I (1996): Polymerase chain reaction analysis of oestrogen and androgen receptor expression in human gingival and periodontal tissue. *Arch Oral Biol* 41, 979–983
- Pearce ST, Jordan VC (2004): The biological role of estrogen receptors α and β in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 50, 3–22
- Pedram A, Razandi M, Levin ER (2006): Nature of Functional Estrogen Receptors at the Plasma Membrane. *Mol Endocrinol* 20, 1996–2009
- Penot G, Le Péron C, Mérot Y, Grimaud-Fanouillère E, Ferrière F, Boujrad N, Kah O, Saligaut C, Ducouret B, Métivier R, Flouriot G (2005): The Human Estrogen Receptor- α Isoform hER α 46 Antagonizes the Proliferative Influence of hER α 66 in MCF7 Breast Cancer Cells. *Endocrinology* 146, 5474–5484
- Pfaffl MW (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, 45e
- Poola I, Koduri S, Chatra S, Clarke R (2000): Identification of twenty alternatively spliced estrogen receptor alpha mRNAs in breast cancer cell lines and tumors using splice targeted primer approach. *J Steroid Biochem Mol Biol* 72, 249–258
- Popowics T, Boyd T, Hinderberger H (2014): Eruptive and functional changes in periodontal ligament fibroblast orientation in CD44 wild-type vs. knockout mice. *J Periodontal Res* 49, 355–362
- Porter PC, Clark DR, McDaniel LD, McGregor WG, States JC (2006): Telomerase-immortalized human fibroblasts retain UV-induced mutagenesis and p53-mediated DNA damage responses. *DNA Repair (Amst.)* 5, 61–70
- Prakasam G, Yeh JK, Chen MM, Castro-Magana M, Liang CT, Aloia JF (1999): Effects of growth hormone and testosterone on cortical bone formation and bone density in aged orchietomized rats. *Bone* 24, 491–497
- Prior JC, Vigna YM, Wark JD, Eyre DR, Lentle BC, Li DKB, Ebeling PR, Atley L (1997): Premenopausal Ovariectomy-Related Bone Loss: A Randomized, Double-Blind, One-Year Trial of Conjugated Estrogen or Medroxyprogesterone Acetate. *J Bone Miner Res* 12, 1851–1863
- Rabea AA (2018): Recent advances in understanding theories of eruption (evidence based review article). *Future Dent J* 4, 189–196
- Rana K, Davey R, Zajac J (2014): Human androgen deficiency: insights gained from androgen receptor knockout mouse models. *Asian J Androl* 16, 169–177

- Rao J, Jiang X, Wang Y, Chen B (2011): Advances in the understanding of the structure and function of ER- α 36, a novel variant of human estrogen receptor-alpha. *J Steroid Biochem Mol Biol* 127, 231–237
- Reitan K (1967): Clinical and histologic observations on tooth movement during and after orthodontic treatment. *Am J Orthod* 53, 721–745
- Roberts WE, Jee WSS (1974): Cell Kinetics Of Orthodontically-Stimulated And Non-Stimulated Periodontal Ligament Cells In The Rat. *Arch Oral Biol* 19, 17–21
- Roberts WE, Morey ER (1985): Proliferation and differentiation sequence of osteoblast histogenesis under physiological conditions in rat periodontal ligament. *Am J Anat* 174, 105–118
- Roberts WE, Wood HB, Chambers DW, Burk DT (1987): Vascularly oriented differentiation gradient of osteoblast precursor cells in rat periodontal ligament: Implications for osteoblast histogenesis and periodontal bone loss. *J Periodontal Res* 22, 461–467
- Ronen D, Benvenisty N (2014): Sex-Dependent Gene Expression in Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep* 8, 923–932
- Russo J, Fernandez SV, Russo PA, Fernbaugh R, Sheriff FS, Lareef HM, Garber J, Russo IH (2006): 17-Beta-Estradiol induces transformation and tumorigenesis in human breast epithelial cells. *FASEB J* 20, 1622–1634
- Samalecos A, Gellersen B (2008): Systematic Expression Analysis and Antibody Screening Do Not Support the Existence of Naturally Occurring Progesterone Receptor (PR)-C, PR-M, or Other Truncated PR Isoforms. *Endocrinology* 149, 5872–5887
- Sartorius CA, Melville MY, Hovland AR, Tung L, Takimoto GS, Horwitz KB (1994): A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. *Mol Endocrinol* 8, 1347–1360
- Scarpin KM, Graham JD, Mote PA, Clarke CL (2009): Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. *Nucl Recept Signal* 7, e009
- Scharf S, Graf I, Neuschulz J, Braumann B: Kieferorthopädische Nebenwirkung als Reaktion auf eine Östrogenbehandlung. Konferenzbeitrag im Rahmen der DGKFO, Hannover, 14.09.-18.09.2016
- Schroeder H (Hrsg.): *Orale Strukturbiologie*. 5. Auflage; Thieme, Stuttgart 2000
- Seifi M, Ezzati B, Saedi S, Hedayati M (2015): The Effect of Ovariectomy and Orchiectomy on Orthodontic Tooth Movement and Root Resorption in Wistar Rats. *J Dent (Shiraz)* 16, 302–309
- Shang Y, Myers M, Brown M (2002): Formation of the Androgen Receptor Transcription Complex. *Mol Cell* 2, 601–610
- Shimodaira K, Fujikawa H, Okura F, Shimizu Y, Saito H, Yanaihara T (1996): Osteoblast cells (MG-63 and HOS) have aromatase and 5 α -reductase activities. *Biochem Mol Biol Int* 39, 109–116
- Singh AK, Chattopadhyay R, Chakravarty B, Chaudhury K (2013): Altered circulating levels of matrix metalloproteinases 2 and 9 and their inhibitors and effect of progesterone supplementation in women with endometriosis undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 100, 127-134

- Sirisootorn I, Hotokezaka H, Hashimoto M, Gonzales C, Luppapornlarp S, Darendeliler MA, Yoshida N (2011): Tooth movement and root resorption; The effect of ovariectomy on orthodontic force application in rats. *Angle Orthod* 81, 570–577
- Skouteris CA (Hrsg.): *Dental Management of the Pregnant Patient*. John Wiley & Sons, New York 2018a
- Skouteris CA: Physiologic Changes and Their Sequelae in Pregnancy. In: Skouteris CA (Hrsg.): *Dental Management of the Pregnant Patient*. John Wiley & Sons, New York 2018b, 5–23
- Somerman M, Archer SY, Imm GR, Foster RA (1988): A Comparative Study of Human Periodontal Ligament Cells and Gingival Fibroblasts in vitro. *J Dent Res* 67, 66–70
- Sotoca A, Vervoort J, Rietjens I, Gustafsson JA: Human ER α and ER β Splice Variants: Understanding Their Domain Structure in Relation to Their Biological Roles in Breast Cancer Cell Proliferation. In: Ekinici D (Hrsg.): *Biochemistry*. IntechOpen, Rijeka 2012, 141–161
- Srivastava S, Toraldo G, Weitzmann MN, Cenci S, Ross FP, Pacifici R (2001): Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)-induced JNK activation. *J Biol Chem* 276, 8836–8840
- Szego CM, Davis JS (1967): Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 58, 1711–1718
- Tang X, Meng H, Han J, Zhang L, Hou J, Zhang F (2008): Up-regulation of estrogen receptor- β expression during osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells. *J Periodontol Res* 43, 311–321
- Tata JR (2002): Signalling through nuclear receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 702–710
- Tojo Y, Kurabayashi T, Honda A, Yamamoto Y, Yahata T, Takakuwa K, Tanaka K (1998): Bone structural and metabolic changes at the end of pregnancy and lactation in rats. *Am J Obstet Gynecol* 178, 180–185
- VanHouten JN, Wysolmerski JJ (2003): Low estrogen and high parathyroid hormone-related peptide levels contribute to accelerated bone resorption and bone loss in lactating mice. *Endocrinology* 144, 5521–5529
- Wang D, Huang P, Zhu B, Sun L, Huang Q, Wang J (2012): Induction of estrogen receptor α -36 expression by bone morphogenetic protein 2 in breast cancer cell lines. *Mol Med Rep* 6, 591–596
- Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie BW, Chang Y, Deuel TF (2005): Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor- α 36, a novel variant of human estrogen receptor- α 66. *Biochem Biophys Res Commun* 336, 1023–1027
- Warner M, Gustafsson JÅ (2006): Nongenomic effects of estrogen: Why all the uncertainty? *Steroids* 71, 91–95
- Wasserstein RL, Lazar NA (2016): The ASA Statement on p-Values: Context, Process, and Purpose. *Am Stat* 70, 129–133
- Weeber FM: Differenzierungspotential humaner primärer Parodontalligament-Zellen von Patienten mit gesundem Zahnhalteapparat. Med. Diss. Göttingen 2021

- Wei LL, Leach MW, Miner RS, Demers LM (1993): Evidence for Progesterone Receptors in Human Osteoblast-like Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 195, 525–532
- Wilson CM, McPhaul MJ (1996): A and B forms of the androgen receptor are expressed in a variety of human tissues. *Mol Cell Endocrinol* 120, 51–57
- Yuan G, Cai C, Dai J, Liu Y, Zhang R, Dai Y, Wen L, Ding Y (2010): Progesterone Modulates the Proliferation and Differentiation of Human Periodontal Ligament Cells. *Calcif Tissue Int* 87, 158–167
- Zhao C, Matthews J, Tujague M, Wan J, Ström A, Toresson G, Lam EWF, Cheng G, Gustafsson JÅ, Dahlman-Wright K (2007): Estrogen Receptor β 2 Negatively Regulates the Transactivation of Estrogen Receptor α in Human Breast Cancer Cells. *Cancer Res* 67, 3955–3962
- Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JÅ (2008): Estrogen Receptor β : An Overview and Update. *Nucl Recept Signal* 6, e003

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Möglichkeit ergreifen, mich bei allen Menschen herzlich zu bedanken, die diese Dissertation ermöglicht haben.

Zuallererst gilt besonderer Dank meinen beiden Doktorvätern Herrn Prof. Dr. P. Meyer-Marcotty und Herrn Prof. Dr. N. Miosge für das entgegengebrachte Vertrauen meine Person als Doktorandin in ihren Arbeitskreis aufzunehmen. Mit der Durchführung der vorliegenden Arbeit durfte ich wertvolle Einblicke in die Welt der klinischen Forschung gewinnen und Gelerntes in selbstständiges wissenschaftliches Arbeiten umsetzen.

Ein herzliches Dankeschön gebührt zudem meiner Betreuerin Frau Dr. A. Quast, die mir diesen sehr interessanten Themenbereich zur Anfertigung meiner Dissertation überlassen hat und zu jeder Zeit mit Rat und Tat verlässlich und kompetent zur Seite stand. Ganz besonders sei dabei ihre geduldige Korrektur dieser Arbeit und die zahlreichen methodischen und fachlichen Anregungen über den gesamten Entstehungsprozess hinweg zu nennen.

Frau C. Bode, Frau E. Henze, Herrn J. Janßen und Herrn S. Lesemann sei zudem überaus für ihre freundliche Hilfsbereitschaft in der Einarbeitung in alle anfallenden Laborprozesse gedankt.