

Aus der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand Univ. Prof. Dr. med. R. Putz

**Charakterisierung skelettaler Veränderungen**  
**„Insulin-like growth factor binding-protein 2“ (IGFBP-2) transgener Mäuse**  
**mit und ohne Wachstumshormon-Überexpression**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Tatjana Pavicic

Derventa

2004

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Felix Eckstein

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. M. Reincke  
Priv.-Doz. Dr. med. K. Parhofer

Mitbetreuung durch den  
Promovierten Mitarbeiter: Priv.-Doz. Dr. med. Andreas Höflich

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juli 2004

**Meinen Eltern und meinem allerliebsten Schatz.**

---

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b>	5
<b>2. Allgemeine Grundlagen und Literaturübersicht</b>	8
2.1. Wachstumshormon / Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (GH/IGF)-Achse	8
2.2. Das Wachstumshormon (GH) und Knochen	12
2.3. Insulin ähnliche Wachstumsfaktoren (IGF) und Knochen	13
2.4. IGF-Bindungsproteine (IGFBPs)	18
<b>3. Fragestellung / Hypothese</b>	27
<b>4. Material und Methode</b>	28
4.1. Material	28
4.2. Morphologische Untersuchungen und DXA-Analysen	28
4.3. pQCT- Analyse	32
4.4. Statistische Auswertung	36
<b>5. Ergebnisse</b>	37
5.1. Skelettale Veränderungen an den IGFBP-2 transgenen Mäusen	37
5.2. Skelettale Veränderungen an den GH-transgenen Mäusen	40
5.3. Skelettale Veränderungen an den Doppel-transgenen Mäusen	41
<b>6. Diskussion</b>	47
6.1. Methodikdiskussion	47
6.1.1. Das transgene Mausmodell	47
6.1.2. Dual-Energy-X-Ray-Absorptiometry (DXA)	47
6.1.3. Periphere quantitative Computertomographie (pQCT)	49
6.2. Ergebnisdiskussion	49
6.3. Limitationen und abschließende Interpretation	52
<b>7. Schlussfolgerungen</b>	55
<b>8. Zusammenfassung</b>	56
<b>9. Literaturverzeichnis</b>	57
<b>10. Danksagung</b>	69
<b>11. Lebenslauf</b>	70

## 1. Einleitung

Die Wachstumshormon (GH)-, „Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren“ (IGF)-Achse spielt eine sehr wichtige Rolle in der postnatalen Entwicklung des Skelettes, seiner Erhaltung und seinem Umbau sowie beim altersabhängigen Knochenverlust (Johansson et al. 1994, Ohlsson 1998, Mohan und Baylink 1999, Rosen 2000, Yakar et Rosen 2003). IGFs werden außer an ihrem Hauptsyntheseort, der Leber auch von den Osteoblasten produziert (Mohan et Baylink 1991, 1996, Jones et Clemmons 1995) und regulieren den Knochenstoffwechsel sowohl als endokrine wie auch als parakrine / autokrine Mediatoren (McCarthy et Centrella 2001). IGF-I aktiviert den Knochenumbau und übt einen sehr starken mitogenen und anabolen Effekt auf die Osteoblasten aus. So konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der IGF-I-Wirkung die Proliferationsrate der Osteoblasten um 50% reduziert (Mohan et al. 1993). In vivo steigert eine GH-Überexpression den IGF-I-Serumspiegel (Wolf et al. 1993, Höflich et al. 2001, Eckstein et al. 2002) und führt dadurch zu phänotypischen Veränderungen, die eine unterschiedlich starke Ausprägung sowohl an den einzelnen Knochen (Wolf et al. 1991 a,b) als auch am kortikalen bzw. am trabekulären Kompartiment zeigen (Graichen et al. 1999, Eckstein et al. 2002).

Da der größte Teil von IGF-I nicht in freier Form sondern gebunden an IGF-Bindungsproteine (IGFBPs) zirkuliert (Jones et Clemmons 1995), bestimmen die IGFBPs entscheidend die Konzentration von IGF-I am Wirkort und seinen Effekt auf den Knochenaufbau. IGFBPs können aber auch direkte Wirkung auf Zielzellen haben und wurden daher als Multifunktionsproteine charakterisiert (Mohan und Baylink 2000). Bisher wurden sechs verschiedene IGFBPs (IGFBP-1 bis -6) beschrieben, welche von Chondrozyten und Osteoblasten synthetisiert werden (Shimasaki et Ling 1991, Olney et al. 1992, Wang et al. 1995, De los Rios et Hill 1999). Sie modulieren das Zusammenspiel zwischen GH und IGF (Jones and Clemmons 1995), beeinflussen die Bioverfügbarkeit von IGF und vermitteln und regeln dessen Effekte in verschiedenen Geweben (Rajaram et al. 1997, Schneider et al. 2000, Wolf et al. 2000). IGFBPs beeinflussen den Knochenmetabolismus sowohl indirekt, indem sie IGF-I binden und dadurch eine Aktivierung des IGF-I-Rezeptors verhindern (Rosen et al. 1994), als auch direkt durch Bindung an ihre eigenen Rezeptoren (Feyen et al. 1991, Mohan et al. 1995).

Die biologische Aktivität von IGF-I wird durch IGFBP-3 und IGFBP-5 verstärkt, während IGFBP-4 und IGFBP-2 als potente Inhibitoren der IGF-Wirkung charakterisiert wurden (Mohan 1993, Mc Carthy et al. 1994, Rajaram et al. 1997, Miyakoshi et al. 1999).

IGFBP-2 ist eines der wichtigsten Bindungsproteine und übt eine antiproliferative Wirkung auf Zellen aus. Eine gesteigerte Konzentration konnte im Serum von Mäusen mit einem im Vergleich zum durchschnittlichen Gewicht einer 8 Wochen alten Maus zu niedrigen Körpergewicht gemessen werden (Höflich et al. 1998a). An IGFBP-2-Knock-out-Mäusen konnten allerdings nur geringe Veränderungen festgestellt werden (Gosiewsa et al. 1994).

Um die Bedeutung von IGFBP-2 und seine Wechselwirkung mit dem Wachstumshormon genauer zu erforschen, generierten Höflich et al. IGFBP-2-transgene (2001 a) und GH/IGFBP-2-doppel-transgene-Mäuse (2001 b). Letztere weisen hohe GH- und hohe IGFBP-2-Serumspiegel auf. Die Tiere mit einer systemischen IGFBP-2-Überexpression weisen ein deutlich reduziertes Körpergewicht postnatal auf, sowohl in An- wie auch in Abwesenheit von GH/IGF-I-Überschuss (Höflich et al. 1999, 2001). Dies weist darauf hin, dass die erhöhte IGFBP-2-Konzentration bei den kleinen Tieren kein Epiphänomen darstellt, sondern dass es sich bei IGFBP-2 tatsächlich um einen wichtigen negativen Regulator des Wachstums handelt.

Die Bedeutung von IGFBP-2 bei altersabhängigen Veränderungen des Knochens wurde in mehreren klinischen Studien untersucht. Kim et al. (1996) fanden bei Frauen, die nach der Menopause an Osteoporose litten, eine signifikant erhöhte IGFBP-2-Konzentration und eine negative Korrelation mit der Knochendichte. Diese Beobachtungen wurden auch durch Sugimoto et al (1997) bestätigt. Einen signifikanten Zusammenhang mit der Zahl der vorhandenen Wirbelkörperfrakturen konnten letztere Autoren allerdings nicht nachweisen. In anderen Studien konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der IGFBP-2-Konzentration jüngerer (< 60 Jahre) Patientinnen mit postmenopausaler Osteoporose und derjenigen bei gesunden Frauen (pre- oder postmenopausal) festgestellt werden (Nasu et al. 1997, Kim et al. 1999).

Dass sich die IGFBP-2-Konzentration umgekehrt proportional zur Knochendichte verhält, konnte im Zusammenhang mit der renalen Osteopathie nachgewiesen werden, einem Krankheitsprozess, der sich infolge zunehmender Niereninsuffizienz einstellt und mit einem Anstieg des IGFBP-2-Serumspiegels einhergeht. Histologische Untersuchungen bestätigten eine positive Korrelation zwischen dem IGFBP-2-Serumspiegel und Serumparametern des

Knochenabbaus, sog. „Bmc-Marker“ (Jehle et al. 2000). Hieraus ergab sich die Frage, ob IGFBP-2 im Pathomechanismus der Osteoporose eine kausale Rolle spielt oder nicht?

Bisher liegt keine Studie vor, in welcher ein Effekt von IGFBP-2-Überexpression auf den Knochenmetabolismus *in vivo* charakterisiert wurde. Das Ziel der vorliegenden Studie war daher die Untersuchung skelettaler Veränderungen einer IGFBP-2-Überexpression im transgenen Mausmodell, sowohl in der Ab- als auch Anwesenheit von GH-Überexpression. Um Doppel-transgenen Mäuse zu generieren, wurden GH-transgene mit den IGFBP-2-transgenen Mäusen gekreuzt (Höflich et al. 2001), und die Auswirkungen der GH- und IGFBP-Co-Überexpression auf die Knochengröße, -masse und -dichte zu bestimmen.

## 2. Allgemeine Grundlagen und Literaturübersicht

### 2.1. Die Achse des Wachstumshormons und der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren

Untersuchungen in Knochenzellkulturen und in vivo haben gezeigt, dass die Wachstumsfaktoren eine bedeutende regulatorische Funktion im Knochenstoffwechsel ausüben (Liu et LeRoith 1999, Jehle et al. 2000, Kopchick et Andry 2000). Eine außerordentlich wichtige Rolle in der postnatalen Entwicklung, dem Erhalt und dem altersabhängigen Verlust des Skelettes sowie bei Osteoporose spielt die Achse des Wachstumshormons (GH) und der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF) (Johansson et al. 1992, Ohlsson et al. 1998, 2000, Beamer et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit sollen zunächst die Funktionen der beiden Hauptakteure (GH und IGF-I) in der Achse sowie die entsprechenden Regelmechanismen dargestellt werden. Anschließend werden die einzelnen Faktoren mit Schwerpunkt auf ihre Rolle im Metabolismus des Knochens beschrieben.

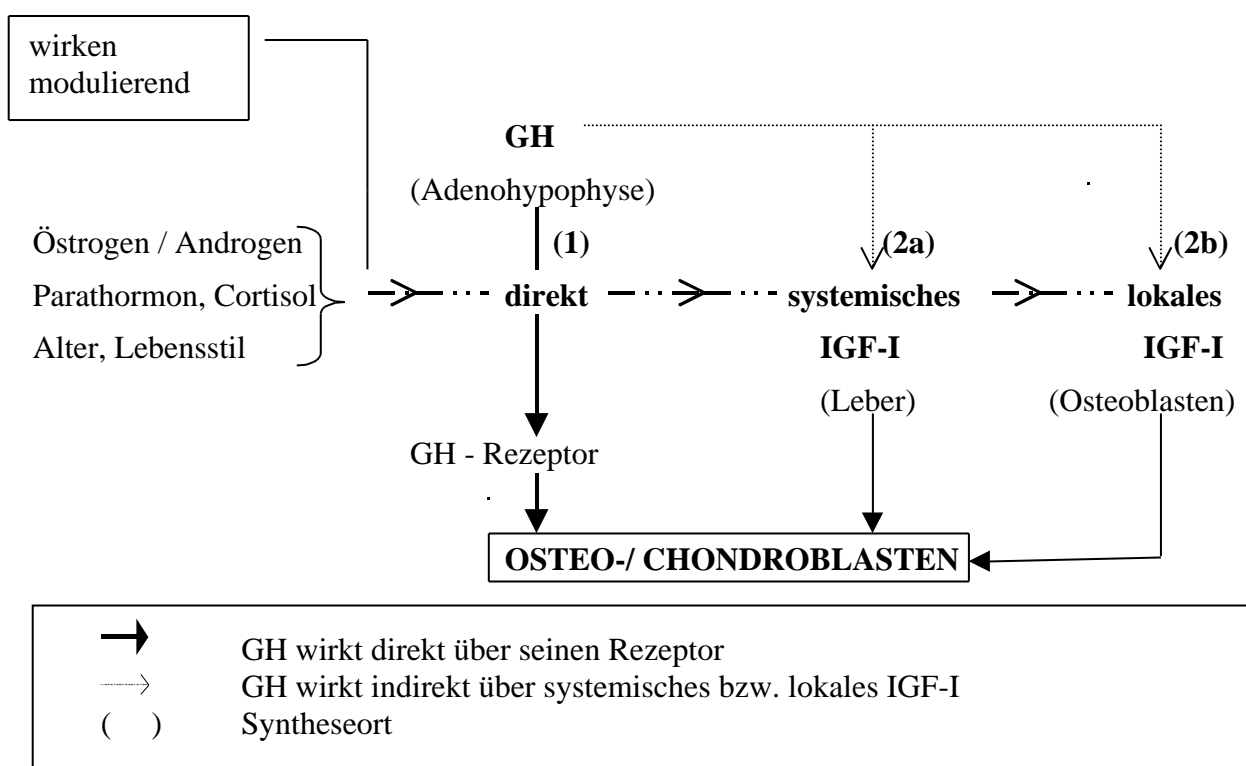


Abb.1: Die GH/IGF-Achse und ihr Einfluss auf Osteo- und Chondroblasten (Daten aus Ohlsson et al. 1998)



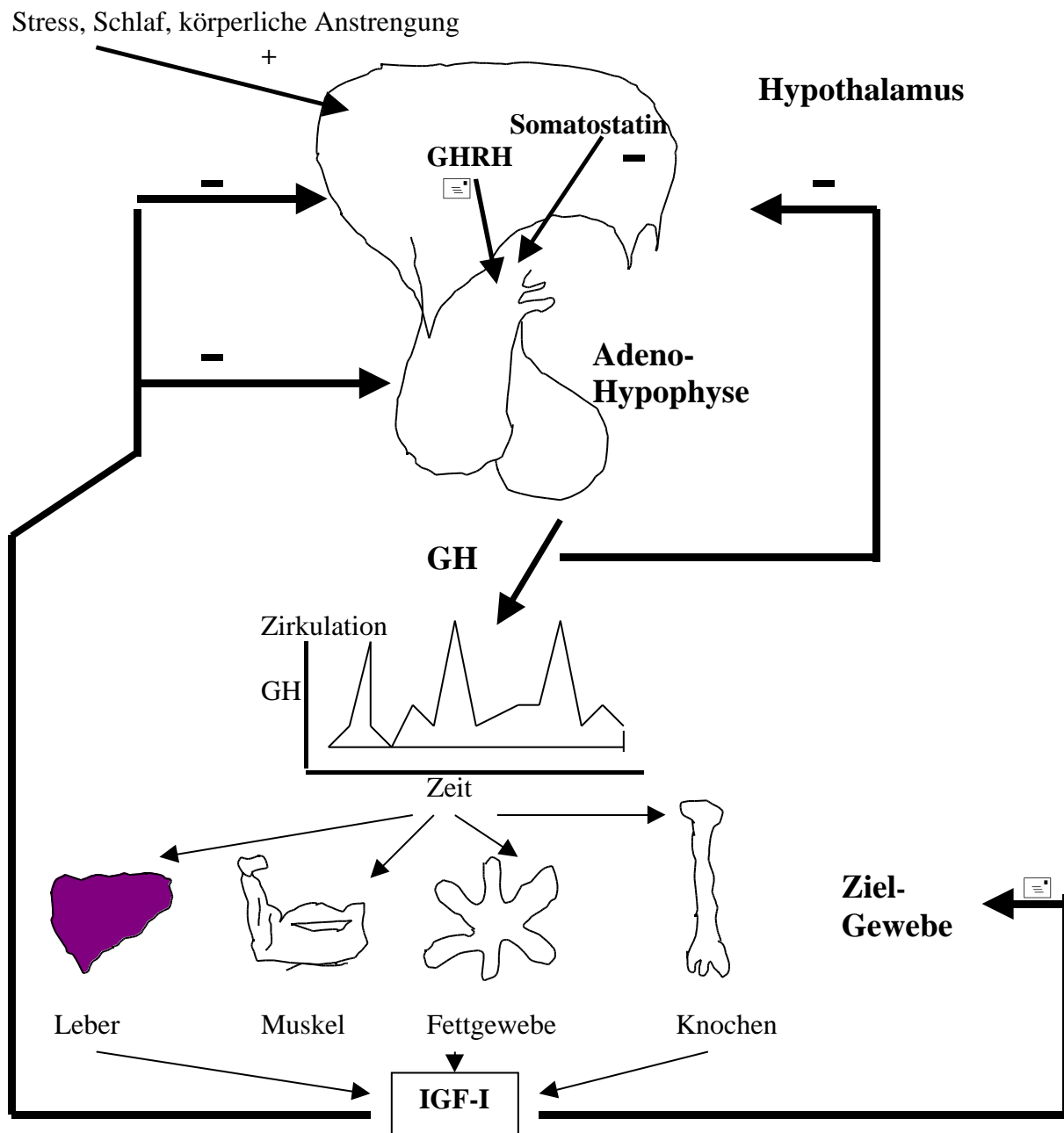


Abb.2: GH: Sekretion und Wirkprinzipien (Zeichnung aus Kopchick und Andry 2000)

GH ist ein Hormon, das in den somatotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens synthetisiert wird. Seine Wirkungen auf den Knochen werden zum einen durch direkte Interaktion mit den Wachstumshormon-Rezeptoren (GHR) auf den Osteoblasten vermittelt (Ohlsson et al.1998, 2000), (Abb. 1.1, Abb. 3.2). Diese reagieren auf einen GH-Reiz hin mit erhöhter Proliferation sowie mit einer Erhöhung ihrer metabolischen Aktivität. Dies äußert

sich in einem deutlichen Anstieg der Parameter des Knochenaufbaus im Serum wie z.B. der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase (B-ALP), Osteocalcin und in einer gesteigerten Expression von Kollagen Typ I (Kassem et al. 1993). Zum anderen induziert GH die Synthese von IGF-I in der Leber, welches seinerseits als ein endokriner Faktor das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und den Zellstoffwechsel (Stewart et al. 1996) sowohl während der intrauterinen Entwicklung als auch in der Zeit des postnatalen Wachstums (Liu et al. 1993, Woods et al. 1996) fördert (Abb.1, Teil 2a; Abb.3.1). Dieser Weg ist in der Literatur als die sog. „Somatomedin-Hypothese“ bekannt (Rosen et al. 1994, Ohlsson et al. 1998, 2000). Wie erwartet wiesen GH-transgene Mäuse erheblich höhere IGF-I-Serumspiegel auf als die Kontrolltiere (Wolf et al. 1993, Höflich et al. 2001, Eckstein et al. 2002). „IGF-I-Knock-out (KO)-Mäuse“, bei denen das IGF-I-Gen unterdrückt wird, wiesen bei normaler bis erhöhter GH-Sekretion eine signifikant verminderte Körpergröße auf (um 35% bei der Geburt, um 65% im Erwachsenenalter), die auch nach einer 6-wöchigen Therapie mit GH keine Veränderungen zeigte (Liu und Le Roith 1999). Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass der Einfluss von GH auf die Körpergröße hauptsächlich durch IGF-I-Produktion vermittelt wird. Dies entspräche der sog. „Somatomedin-Hypothese“.

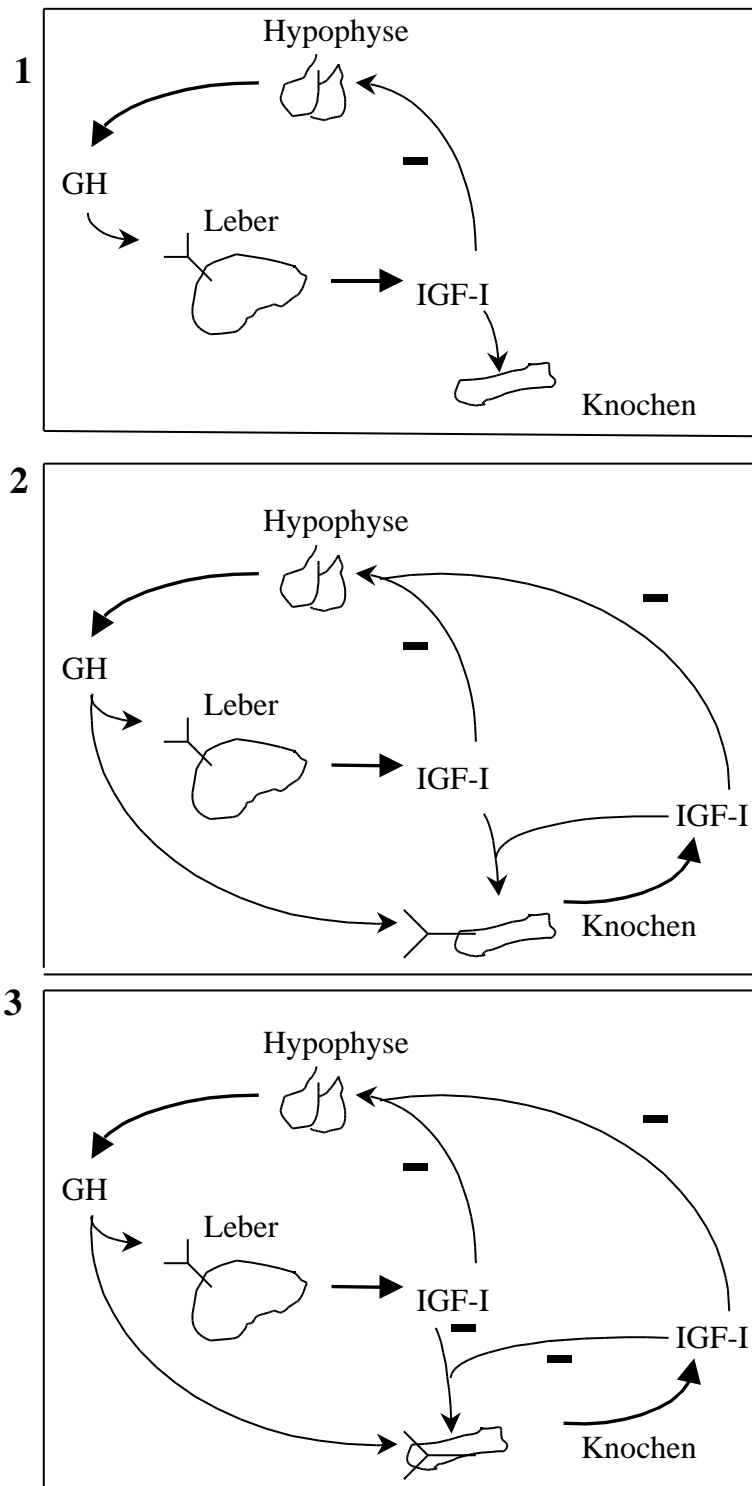
Diese Hypothese wurde ergänzt („Erweiterte Somatomedin-Hypothese“), als Isaksson et al. (1982) zeigten, dass eine direkte GH-Injektion in die Tibia von Ratten die gewebseigene IGF-I-Produktion anregt und dadurch das Längenwachstum der Knochen stimuliert (Ohlsson et al. 1998). Dies deutet darauf hin, dass das lokal synthetisierte IGF-I neben systemisch zirkulierendem IGF-I eine wichtige Rolle für die Vermittlung der GH-Wirkung spielt (Abb.1, Teil 2b; Abb.3.2).

Durch drei verschiedene Feedback-Mechanismen wird die GH/IGF-Achse im Gleichgewicht gehalten, siehe Abb.3:

- 1) **Klassischer negativer Feedback-Mechanismus:** Entsprechend der „Somatomedin-Hypothese“ stimuliert GH die IGF-I-Synthese in der Leber. Dieses zirkulierende IGF-I hemmt die GH-Sekretion aus der Adenohypophyse.
- 2) **Modifizierter klassischer negativer Feedback-Mechanismus:** Neben dem o.g. Prozess stimuliert GH die lokale IGF-I-Synthese im Knochen. Dieses IGF-

I aus den nicht hepatischen Quellen verstärkt die inhibitorische Funktion des IGF-I aus der Leber.

- 3) **Periphere negative Schleife:** Das unter GH-Einfluss produzierte IGF-I im Knochen hemmt die lokale Wirkung von GH durch Abnahme der Rezeptor (GHR)-Moleküle.



---

**Abb.3: Schematische Darstellung des Regelkreises zwischen GH, IGF-I und dem Knochen  
(Zeichnung aus Ohlsson et al. 1998)**

Eine Störung dieser Regelkreise, durch pathologische Prozesse oder therapeutisches Eingreifen, führt zu einer Gleichgewichtsverschiebung im Knochenmetabolismus zugunsten von Formation oder Resorption und somit zu veränderten Knocheneigenschaften.

In den folgenden Kapiteln wird die Rolle der einzelnen Komponente des GH-IGF-IGFBP-Systems für den Knochenmetabolismus vorgestellt.

## **2.2. Wachstumshormon (GH) und Knochen**

Ein Überschuss an GH, z. B. verursacht durch einen Hypophysentumor, führt zur Akromegalie, die sich durch eine Verdickung der Kortikalis, eine Verbreiterung der terminalen Phalangen und eine Vergrößerung von Kinn und Nase sowie von Eingeweiden äußert. Die Untersuchungen des Knochenmineralgehalts (BMC) und der –dichte bei Patienten mit Akromegalie ergaben jedoch keine einheitlichen Ergebnisse (Ohlsson et al. 1998). Da bei manchen Erkrankten ein erhöhter Knochenumsatz festgestellt werden konnte, wurde die Akromegalie als eine mögliche Ursache der Osteoporose betrachtet. Neuere Studien zeigen jedoch, dass Patienten bei denen zwar die Akromegalie aber noch kein Hypogonadismus feststellbar ist, eine normale oder sogar erhöhte Knochenmasse aufweisen (Jockenhovel et al. 1996, Lesse et al. 1998). Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass die Hypophyse auch andere endokrine Systeme, die den Knochenstoffwechsel stark beeinflussen, wie denen der Geschlechts-, Steroid- und Schilddrüsenhormone reguliert (Lesse et al. 1998).

Um den Effekt einer supraphysiologisch hohen GH-Serumkonzentration auf verschiedene Organsysteme in vivo untersuchen zu können, wurden GH-transgene Mäuse mit diversen Promotorsystemen, z.B. Metallothionein (MT) oder Phosphoenolcarboxykinase (PEPCK) generiert (Brem et al. 1989). Hierdurch wurden GH-Spiegel erreicht, die um ein Vielfaches über der Norm lagen (Wolf et al. 1993). Die GH-transgenen Mäuse unter der Kontrolle eines MT-Promotors entwickelten eine dysproportionale Größenzunahme der Knochen (Wolf et al 1991 a, b). Am Femur zeigte sich eine mäßige Zunahme der Knochenlänge und der –breite, während am Radius die Zunahme überproportional zur Körpergröße und zum Körpergewicht war. In mechanischen Kompressionstests wurden an

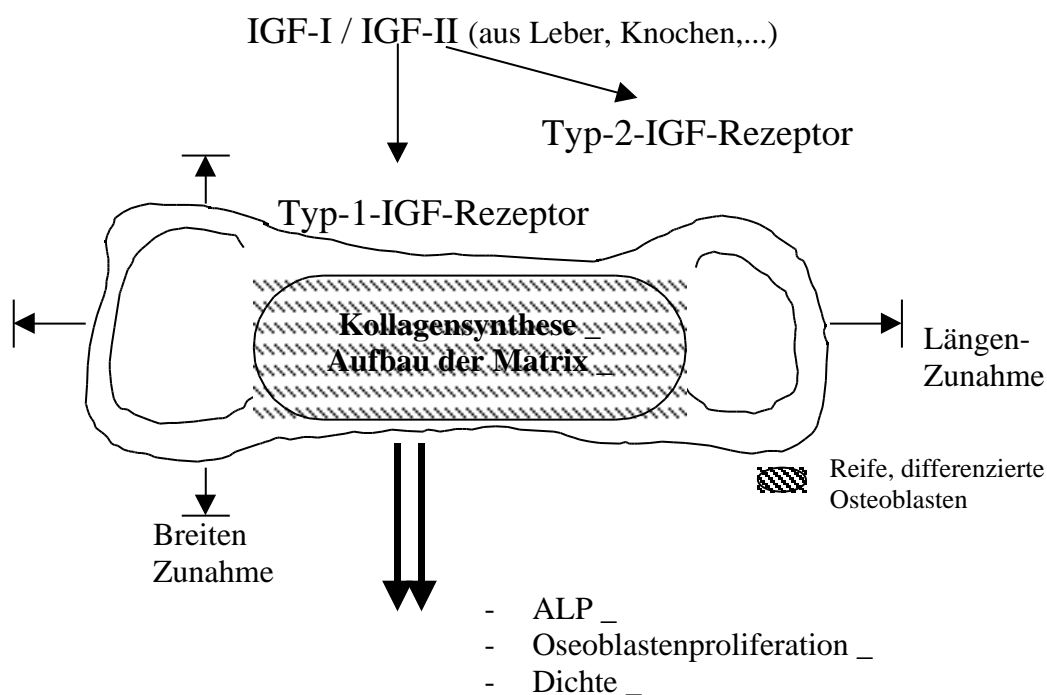
den kaudalen Wirbelkörpern von GH-transgenen Mäusen signifikant höhere Werte für die maximale Tragfähigkeit (Bruchlast) und die axiale Steifigkeit beobachtet (Steinke et al. 1999). Neuere Untersuchungen ergaben einen wesentlich höheren absoluten, aber einen vergleichbaren relativen Knochenmineralgehalt (Anteil am Gesamtkörpergewicht) bei männlichen und weiblichen GH-transgenen Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren (Lochmüller et al. 1999, Eckstein et al. 2002 a). Am Femur war die Zunahme des BMC ebenfalls proportional zum Anstieg des Körpergewichts, während unterschiedliche Effekte zwischen den beiden Geschlechtern auf die Größe des Femurs nachgewiesen wurden (Eckstein et al. 2002 a). Bei beiden Geschlechtern wurde allerdings eine reduzierte Knochendichte ( $\text{g} / \text{cm}^3$ ) nachgewiesen. Der Effekt des GH auf die Knochenstruktur bei den GH-transgenen Tieren scheint wesentlich von der Interaktion mit den männlichen und den weiblichen Geschlechtshormonen abzuhängen (Sandstedt et al. 1994).

Vergleicht man die einzelnen Knochenkompartimente miteinander, so betrifft die o.g. Zunahme des Knochenmineralgehaltes bei Mäusen v.a. die Kortikalis, während der trabekuläre Knochen kaum Veränderungen zeigt (Slootweg 1993). Die selektive Zunahme der Kortikalis konnte ebenso bei alten Ratten mit normaler GH-Sekretion nachgewiesen werden (Andreassen et al. 1995). Diese Ergebnisse legen nahe, dass GH einen stärkeren anabolen Effekt auf das kortikale als auf das trabekuläre Knochenkompartiment ausübt.

Ein Mangel an GH führt sowohl beim Menschen als auch beim Tier zu einem reduzierten Längenwachstum der Knochen, zu einer Verminderung des BMC und zu einem gesteigerten Frakturrisiko (Ohlsson et al. 2000, Beamer et al. 2000). Abhängig vom Zeitpunkt, zu dem der Mangel einsetzt, kommt es zur Ausprägung verschiedener Krankheitsbilder (Ohlsson et al. 1998). Ein Defizit an GH im Kindesalter hat eine relative Osteopenie und eine verzögerte Skelettentwicklung (Ohlsson et al. 1998), beim Erwachsenen dagegen eine Osteoporose zur Folge (Degerblad et al. 1995). Eine Substitution von GH führt bei Patient(inn)en mit GH-Defizienz zu einer Zunahme des Knochenaufbaus und damit zu einer Erhöhung von Knochenmasse und -dichte, so dass der Substitution mit dem Hormon bei der adulten GH-Defizienz klinisch eine wichtige Rolle zukommt (Ohlsson et al. 1998).

### 2.3. Insulin ähnliche Wachstumsfaktoren (IGF) und Knochen

IGF-I und -II spielen sowohl als lokale als auch systemische Faktoren eine wichtige Rolle bei der Bildung von trabekulärem und kortikalem Knochen. Sie stimulieren die Proliferation und die Differenzierung von Chondrozyten und Osteoblasten in der Epiphysenfuge (McCarthy et al. 1989) (Abb.4).



**Abb. 4: IGF-Wirkprinzipien und Effekte (Daten aus McCarthy et al. 1989, Miyakoshi et al. 1999)**

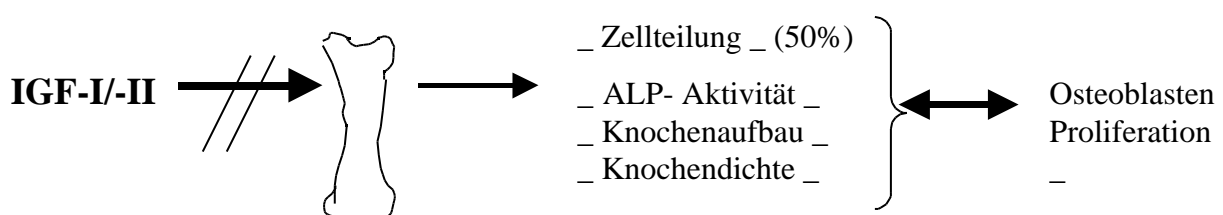
Lokal appliziertes IGF-I steigert sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die ALP-Aktivität, die Bildung des Kollagens Typ-I in den Osteoblasten und die lokale Knochenformation (Chihara und Sugimoto 1997). Eine systemische Gabe von IGF-I führt zu einem gesteigerten Knochenaufbau, sowohl im trabekulären als auch im kortikalen Kompartiment und zu einem signifikanten Anstieg der biochemischen Marker der Osteoblastenfunktion (Ghiron et al. 1995, Miyakoshi et al. 1999) (Abb.4). Diese Daten belegen den anabolen Effekt sowohl von lokalen als auch von systemischen IGF-I auf den Knochen.

Eine Blockade der IGF-I- und der IGF-II-Wirkung *in vitro* reduzierte die Zellteilung im Knochen um 50% (Mohan 1993). Sowohl im Mausmodell als auch bei Menschen, bei denen ein IGF-I-Gendefekt vorlag, wurden eine deutliche Verzögerung des Knochenaufbaus

(Liu et al. 1993), eine starke Reduktion der Aktivität der ALP (Whyte 1994) und eine signifikant erniedrigte Knochendichte gefunden (Woods et al. 1996).

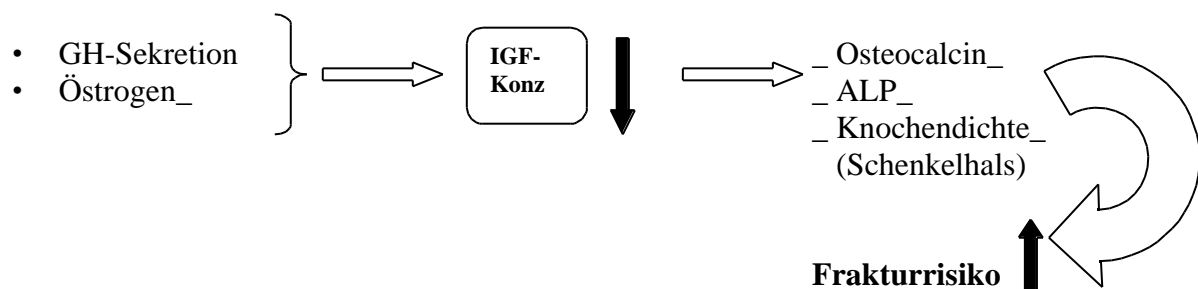
IGF-I-Knockout (KO)-Mäuse zeigten eine signifikante Reduktion des Körpergewichts im Vergleich zu den gleichaltrigen, normalen Mäusen (Liu und Le Roith 1999, Bikle et al. 2001). Die kortikale Dicke der proximalen Tibia war um 17 % reduziert. Das trabekuläre Knochenvolumen (BV / TV) der Tibia war dagegen bei den männlichen Tieren um 23 % und bei den weiblichen Tieren um 88 % erhöht. Dies kam durch die dichtere Anordnung und die höhere Anzahl der Trabekel zustande. An den Wirbelkörpern konnten keine ähnlichen Veränderungen festgestellt werden. Daraus folgerten Bikle et al. (2001), dass ein Mangel an IGF-I zwar zu einem kleineren, aber auch zu einem „kompakteren“ Knochen führt.

Kasukawa et al. (2003) stellten eine signifikante Verlangsamung des enchondralen Ossifikationsprozesses und einen starken Anstieg der Resorption sowohl des enchondralen als auch des perichondralen Knochens in der Tibia von IGF-I-KO-Mäusen fest. Zhang et al. (2002) generierten Mäuse, bei denen der IGF-I-Rezeptor am Osteoblasten selektiv ausgeschaltet wurde. Diese erreichten eine altersentsprechende Körpergröße und ein altersentsprechendes Körpergewicht, wiesen aber im Gegensatz zu den Ergebnissen von Bikle et al. (2001) eine starke Abnahme des trabekulären Knochenvolumens (BV / TV), der Trabekelzahl und der Mineralisierungsrate des Osteoids. Der Vergleich zwischen den IGF-I-KO-, den IGF-II-KO und den GH-KO-Mäusen ergab die deutlichste Reduktion der Länge, der Größe und der Dichte des Femurs bei den IGF-I-KO-Tieren (Mohan et al. 2003). Der IGF-I-Mangel führte bei diesen Mäusen zum völligen Ausbleiben des perichondralen Knochenwachstums während der Pubertät. Dies spricht ebenfalls für eine verminderte Knochenformationsrate beim Fehlen von IGF-I (Abb.5). Daraus wird ersichtlich, dass eine Abnahme der IGF-I-Konzentration im Serum zu einer Hemmung der Knochenformation und damit zu einem Ungleichgewicht zugunsten der Resorption führt. Dies äußert sich in einer reduzierten Knochengröße beim wachsenden Skelett sowie in Entstehung von minderwertigen, brüchigen Knochen beim erwachsenen Skelett.



**Abb. 5: Knochenmetabolismus beim Fehlen von IGF-I/-II (Daten aus Liu et al. 1993, Whyte 1994, Woods et al. 1996)**

Entsprechend den o.g. Beobachtungen wurden erniedrigte Plasmaspiegel von IGF-I bei Osteoporosepatientinnen nach der Menopause gemessen (Wuster et al. 1993, Kim et al. 1996, Sugimoto et al. 1997, Nasu et al. 1997). Die genauen Ursachen für diese Reduktion des IGF-I-Spiegels und ihre Rolle für die Pathogenese der postmenopausalen Osteoporose sind bisher unklar. Zum einen könnte dies mit einer Abnahme der GH-Sekretion, zum anderen mit einer gonadalen Fehlfunktion und der dadurch reduzierten Östrogenkonzentration zusammenhängen (Abb.6). Bei jungen Mäusen, bei denen die gonadale Funktion noch intakt war, hemmte IGF-I die Knochenresorption (Jonsson et al 1996). Bei den Frauen in der Postmenopause, bei denen bereits ein Östrogendefizit herrschte, führte eine kurzzeitige Gabe von IGF-I sogar zu einem gesteigerten Knochenabbau (Ghiron et al. 1995). Dies spricht für die essentielle Rolle des Östrogens in der Vermittlung anaboler IGF-I-Effekte.



**Abb. 6: IGF-Konzentration vs. Osteoporose (Daten aus Liu und Le Roith 1999 Sugimoto et al. 1997)**

Im Bezug auf die Osteoporose eignet sich IGF-I unter anderem, um den Schweregrad der Erkrankung und insbesondere das Risiko einer Schenkelhalsfraktur abzuschätzen (Nakaoka et al. 2001). Es hat einen hohen Voraussagewert für die Konzentration von Osteocalcin und ALP sowie für die Knochendichte am Schenkelhals und kann als ein unabhängiger Marker für den BMC angesehen werden (Boonen et al. 1996). Der positive Zusammenhang zwischen der IGF-I-Konzentration im Serum und der Knochendichte besteht auch beim Gesunden (Johansson et al. 1994).



**Tabelle 1: Übersicht der Untersuchungen der IGF-I-Konzentrationen im Zusammenhang mit Osteoporose**

Autor	Johansson 1994	Ghiron 1995	Jonsson 1996	Kim 1996	Boonen 1996	Nasu 1997	Sugimoto 1997	Nakaoka 2001
Statement Über IGF-I	Beim Gesunden: Positive Korrelation mit Dichte	Kurzzeitige Gabe steigert den Abbau	Hemmt die Resorption	Postmeno Pausal IGF-I _	Unabh. Marker für BMC Voraussage über: OSC, ALP, Dichte	Postmeno Pausal: IGF-I _	Postmeno Pausal: IGF-I _	Schätzwert für: Schweregr ad der Ostoporose Frakturrisi ko

Die vorausgehenden Ausführungen belegen den Zusammenhang zwischen der GH-IGF-Achse und dem Knochenmetabolismus. Sie sprechen für eine enge Korrelation zwischen der Konzentration einzelner Akteure in dieser Achse und pathologischer Prozesse im Knochen, die mit einer Störung in diesem System einhergehen.

## 2.4. IGF-Bindungsproteine (IGFBPs)

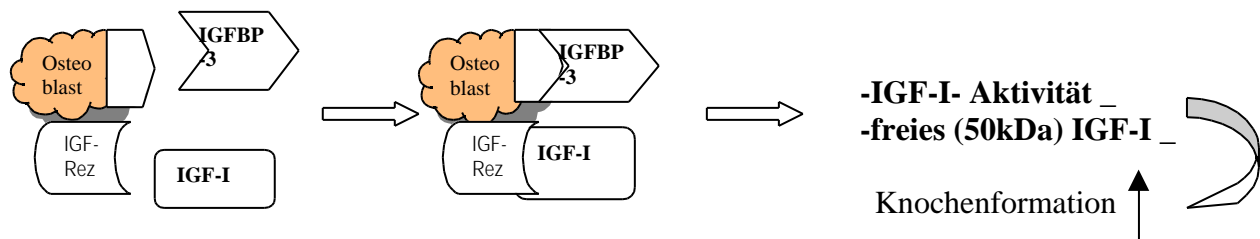
Die GH/IGF-Achse und ihre Wirkung auf den Knochenmetabolismus wird durch sechs verschiedene IGFBPs (IGFBP-1 bis -6) moduliert. IGFBPs sind strukturell verwandte Proteine, die IGF mit hoher Affinität binden und somit seine Wirkung auf den Knochen sowohl verstärken als auch hemmen können (Jones et Clemmons 1995). Mohan und Baylink (2000) zeigten, dass die Bedeutung der IGFBPs weit über ihre traditionelle Funktion als Bindungsproteine für IGF-I hinausgeht. Über eigene spezifische Oberflächenrezeptoren vermitteln IGFBPs ihre Effekte auf verschiedene Zielzellen und wirken somit selbst als Wachstumsfaktoren. Dieser Mechanismus ist unabhängig von der Anwesenheit von IGF-I-Rezeptoren. Weitere „IGF-I-unabhängige“ Effekte üben IGFBPs durch Induktion der Gentranskription aus, wenn sie zum Zellkern transportiert werden. IGFBPs stellen somit außergewöhnliche multifunktionelle Moleküle dar, deren Funktion von einem einfachen Bindungspartner bis zu einem selbständigen, IGF-I-unabhängigen Wachstumsfaktor reicht (Mohan et Baylink 2000). Da in dieser Studie besonderes Interesse IGFBP-2 gilt, werden zunächst andere für den Knochen wichtige IGFBPs (IGFBP-3, -4 und -5) und anschließend gesondert IGFBP-2 vorgestellt.

### IGFBP-3

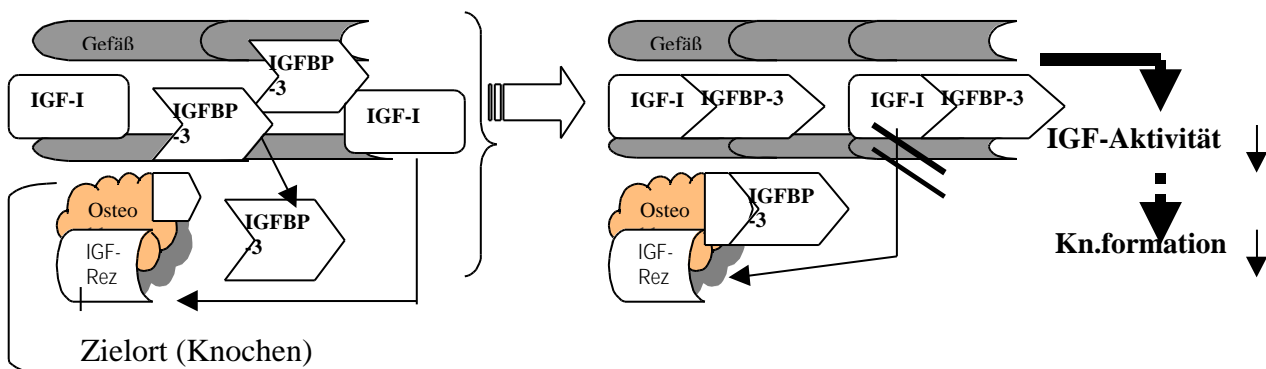
IGFBP-3 ist das bisher am besten untersuchte BP. Es verstärkt die IGF-Aktivität, wenn es an die zellulären Oberflächenstrukturen (Rezeptoren, Ankerproteine, etc.) gebunden ist (Conover 1992) (Abb.7 a). Als ein frei gelöstes Molekül im Serum hemmt es diese (Baxter et al. 1998) (Abb.7 b). Über einen oberflächen-gebundenen Rezeptor mit Serinkinase-Aktivität übt IGFBP-3 auch IGF-I-unabhängige Effekte aus (Werner et LeRoith 1997, Martin et Baxter 1999).

IGFBP-3 spielt auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Osteoporose. Wuster et al. (1993) wiesen nach, dass eine positive Korrelation zwischen der Knochendichte und der IGFBP-3-Konzentration im Serum der postmenopausalen Frauen mit Osteoporose besteht. Dies konnte durch andere Studien bestätigt werden (Sugimoto et al. 1997, Kim et al. 1999, Boonen et al. 1999, Gillberg et al. 2002). Der stärkste Zusammenhang zwischen der

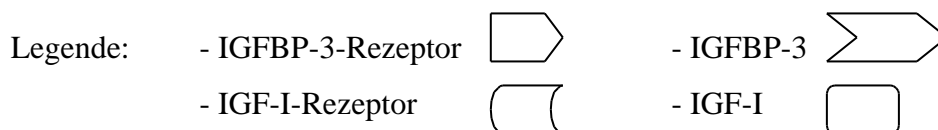
Knochendichte und der IGFBP-3-Konzentration im Serum wurde am Radius, welcher zu über 90% aus kortikalem Knochen besteht, nachgewiesen (Boonen et al. 1999). Daher scheint IGFBP-3 genauso wie GH wichtiger für die Regulation des kortikalen als des trabekulären Knochens zu sein.



**Abb. 7a: IGFBP-3, gebunden an die zellulären Oberflächenstrukturen, z. B an IGFBP-3-Rezeptor (Daten aus Conover 1992)**

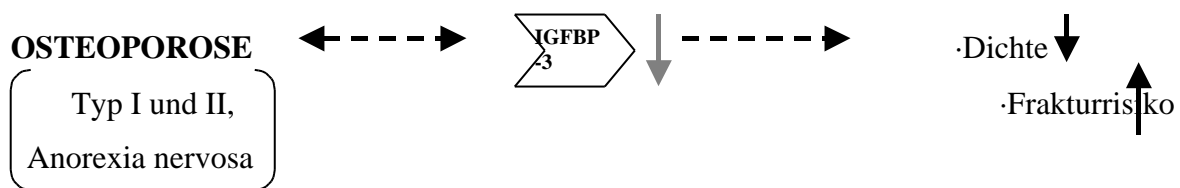


**Abb. 7b: IGFBP-3 in löslicher Form, z.B. im Gefäßlumen (Daten aus Baxter et al. 1998)**



Erniedrigte IGFBP-3-Werte wurden bei Patientinnen mit postmenopausaler Osteoporose (Typ I) gemessen (Kim et al. 1996, Sugimoto et al. 1997, Boonen et al. 1999). Eine Reduktion des IGFBP-3-Spiegels konnte auch bei anderen Patienten mit verminderter Knochendichte festgestellt werden, so z.B. bei Männern mit idiopathischer Osteoporose (TypII) (Johansson et al. 1997) und bei den Patienten mit Anorexia nervosa (Hotta et al. 2000). Es scheint, dass diese Abnahme der IGFBP-3-Konzentration nicht nur mit einer Verminderung der Knochendichte einhergeht, sondern auch mit einem erhöhten Frakturrisiko (Abb. 8). Bei Patientinnen mit einer Fraktur konnte im Vergleich zu denen ohne eine Fraktur eine

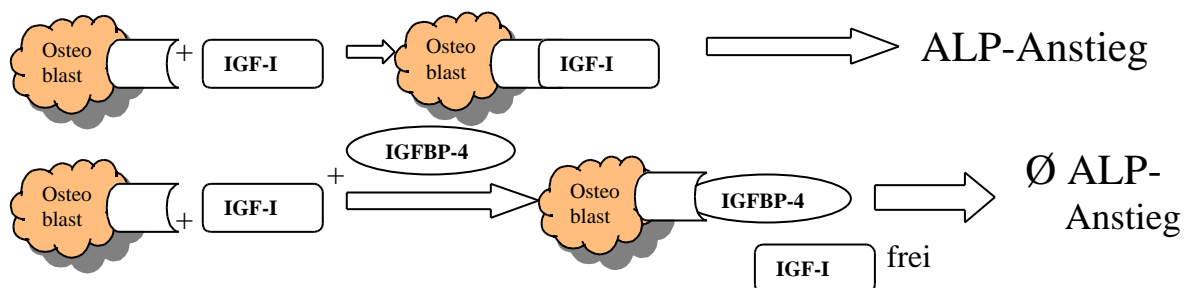
signifikante Abnahme der IGFBP-3- sowie der IGF-I-Konzentration nachgewiesen werden (Sugimoto et al. 1997). Die Ergebnisse legen eine Rolle von IGFBP-3 für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Knochenformation und -resorption sowie einen Zusammenhang zwischen der IGFBP-3-Konzentration und Osteoporose nahe. Im Gegensatz dazu konnten jedoch Nasu et al. (1997) keine Reduktion des IGFBP-3-Spiegels bei den postmenopausalen Frauen feststellen.



**Abb.8: Veränderungen der IGFBP-3-Konzentration bei Osteoporose und deren Folgen**  
(Daten aus Sugimoto et al. 1997)

#### IGFBP-4

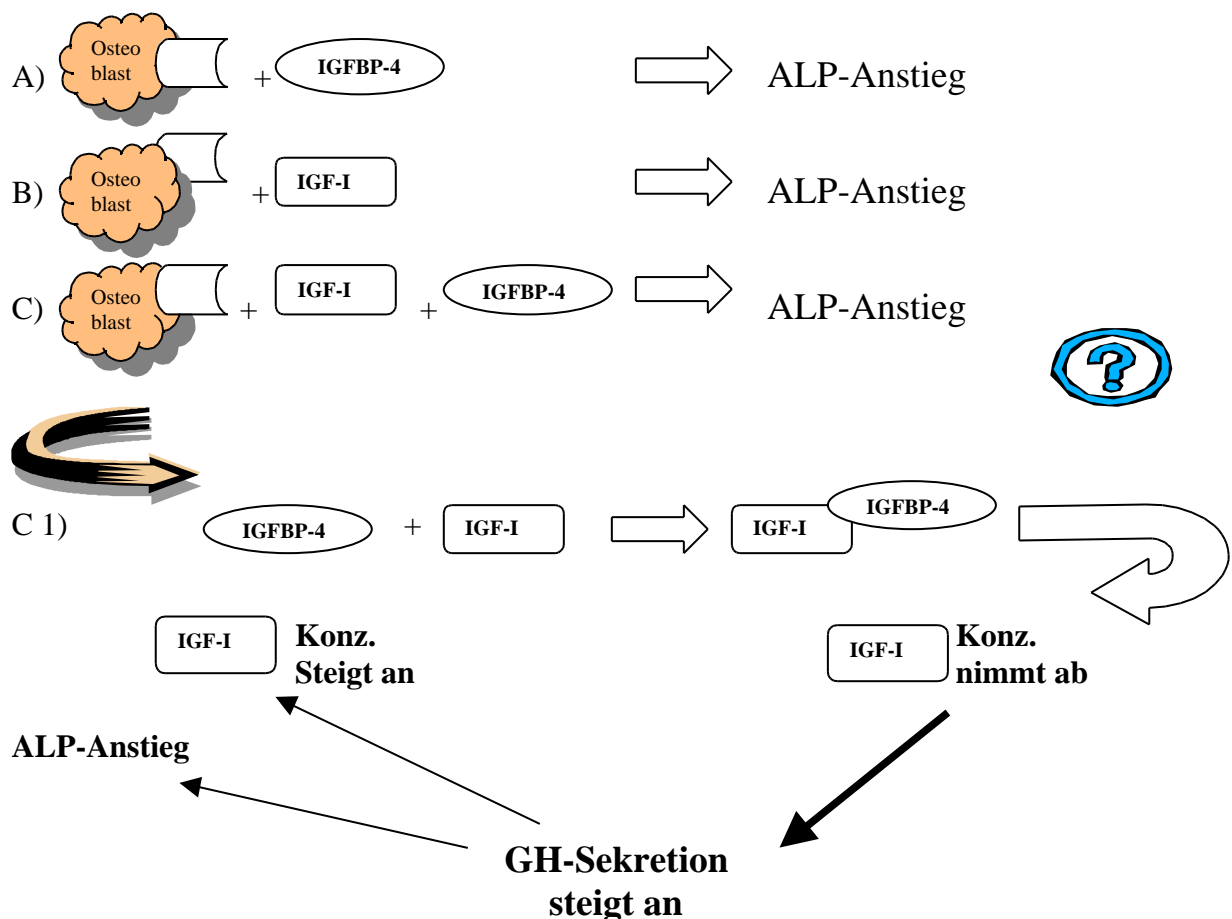
Der Effekt von IGFBP-4 auf die IGF-I-Wirkung hängt davon ab, ob es lokal oder systemisch wirkt. Miyakoshi et al. (1999) zeigten, dass IGFBP-4 die Aktivitätszunahme von ALP, hervorgerufen durch eine lokale IGF-I-Applikation am Os parietale, vollständig unterbinden kann (Abb. 9). Dieser inhibitorische Effekt, der auch in vitro gezeigt werden konnte (Mohan et Baylink 1996, van Kleffens et al. 1998, Baxter et al. 1998), wird vermutlich durch eine kompetitive Hemmung des IGF-Rezeptors vermittelt.

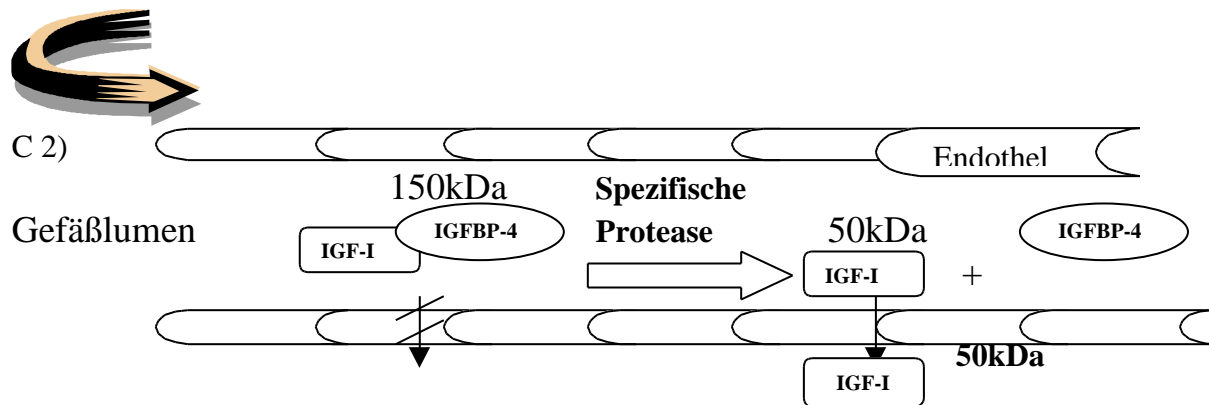


**Abb. 9: Lokal gegebenes IGFBP-4 hemmt den durch IGF-I bedingten Anstieg der ALP durch kompetitive Hemmung des IGF-I-Rezeptors** (Daten aus Miyakoshi et al. 1999)

Im Gegensatz dazu wurden durch systemische Gabe von IGFBP-4 (Abb.10, A) die Parameter der Knochenformation im gleichen Maße wie durch IGF-I allein (Abb.10, B) oder durch

beide Proteine zusammen (Abb.10, C) gesteigert. Dies überrascht, da IGFBP-4 die IGF-Effekte unter In-vitro-Bedingungen in allen Studien reduzierte (Mohan et Baylink 1996, van Kleffens et al. 1998, Baxter et al. 1998). Dieser anabole Effekt von IGFBP-4 lässt sich durch verschiedene Ansätze erklären. Einerseits senkt IGFBP-4 die Menge an freiem IGF-I, wodurch die Sekretion von GH gesteigert wird, welches direkt oder indirekt den Knochenaufbau stimulieren kann (Thoren et al. 1998), (Abb.10, C1). Andererseits wird durch die IGF-abhängigen IGFBP-4-spezifischen Proteasen IGF-I von der 150 kDa-Form in die 50 kDa-Form gespalten. Da dieser kleine Komplex die endotheliale Barriere leichter passieren kann, wird dadurch die Bioverfügbarkeit und die Aktivität von IGF-I im Zielgewebe erhöht (Abb.10, C2). Eine Injektion von IGFBP-4 bewirkt genau diese Konzentrationsverschiebung zugunsten der 50 kDa-Form (Miyakoshi et al. 1999). Dieser Mechanismus scheint wahrscheinlicher, da bei den Protease-resistenten-transgenen Mäusen nach Gabe von IGFBP-4 kein Anstieg des Osteocalcins oder der ALP-Aktivität beobachtet werden konnte (Miyakoshi et al. 2001). Somit könnte auch eine Abnahme der Proteasenaktivität zum verstärkten Knochenabbau beitragen.





**Abb. 10: Systemische Zugabe von IGFBP-4 steigert die Aktivität der ALP, allein (A) und mit IGF-I zusammen (C) (C1, C2: Erklärungsansätze);**

**(Daten aus Thoren et al. 1998, Miyakoshi et al. 1999, 2001)**

## **IGFBP-5**

Der Effekt von IGFBP-5 auf die IGF-Wirkungen hängt von seiner Konzentration ab. Unter physiologischen Bedingungen potenziert IGFBP-5 *in vitro* und *in vivo* die wachstumstimulierende Wirkung der IGFs (Richman et al. 1999). Durch Bindung an verschiedene Bestandteile der extrazellulären Matrix verliert es jedoch seine Fähigkeit, IGF zu binden und steigert dadurch die Konzentration an freiem IGF im Serum (Jones et al. 1993). Dies führt zu einer dosisabhängigen Zunahme der ALP-Aktivität und der Osteocalcinkonzentration bzw. der Knochenformation (Richman et al. 1999). Dabei wird die periostale Knochenformation selektiv stimuliert, während der trabekuläre Knochen keine Veränderungen zeigt (Bauss et al. 2001).

Im Gegensatz zu diesem anabolen Effekt zeigten Devlin et al. (2002), dass eine Überexpression von IGFBP-5 bei der Maus zu einer Reduktion der ALP-Aktivität um mehr als 50 %, zu einer Reduktion der Knochendichte des gesamten Skeletts, des Femurs und des Wirbelsäule zwischen 14 und 27% und zu einer Verminderung des trabekulären Volumenanteils (BV / TV) führte. Untersuchungen an Osteoblastenzellkultur untermauerten diese *In-Vivo*-Beobachtungen (Richman et al. 1999). Die o.g. Ergebnisse sprechen dafür, dass im Gegensatz zu der ursprünglichen Meinung, IGFBP-5 in supraphysiologischer Konzentration die Osteoblastenfunktion *in vivo* und *in vitro* hemmt.

Ähnlich wie bei IGFBP-3 wurden bei den Patienten mit Osteoporose Typ II, einem Prozess, bei dem die Resorption erhöht und die Formation vermindert ist, erniedrigte IGFBP-5-Serumspiegel gemessen (Boonen et al. 1999). Demzufolge scheint für den Erhalt der Knochensubstanz im Alter der anabole Effekt von IGFBP-5 wichtig zu sein.

Die verschiedenen, z.T. gegensätzlichen Effekte der IGFBP, verdeutlichen die Komplexität und die Empfindlichkeit des GH-IGF-IGFBP-Systems sowie die Wichtigkeit eines Gleichgewichts zwischen den einzelnen Faktoren für die Aufrechterhaltung eines normalen Knochenmetabolismus. Gleichzeitig werden dadurch die multiplen Ansätze für präventive und therapeutische Eingriffe in dieses System aufgezeigt, die zukünftig erforscht werden müssen.

Da in der vorliegenden Studie besonderes Interesse dem IGFBP-2 und seiner Bedeutung für den Knochenstoffwechsel und für die Pathogenese der Osteoporose gilt, wird dieses nun detailliert dargestellt.

## **IGFBP-2**

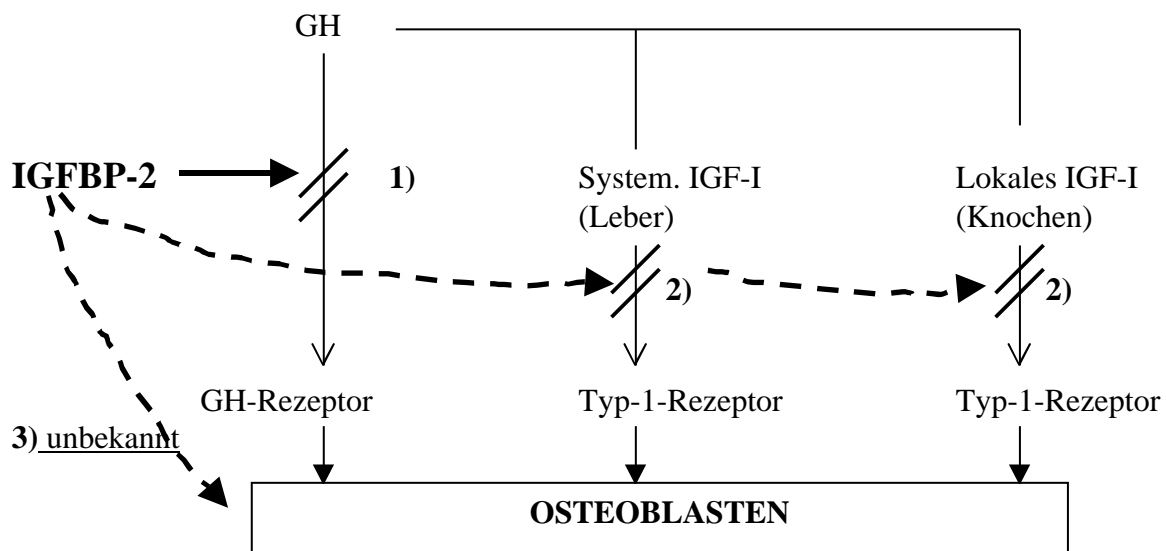
IGFBP-2 weist die zweithöchste Konzentration aller IGFBP im Serum auf und bindet IGF-II mit höherer Affinität als IGF-I (Clemmons et al. 1991, Michell et al. 1997). Seine Konzentration korreliert negativ mit dem Ernährungsstatus (Hotta et al. 2000), negativ mit der GH-, IGF- und IGFBP-3-Konzentration sowie positiv mit dem Lebensalter (Donahue et al. 1990, Kim et al. 1996). Erhöhte Werte von IGFBP-2 wurden bei Prozessen gemessen, die mit einer verminderten anabolen bzw. gesteigerten katabolen Aktivität einhergehen, z.B. nach dem Fasten, beim chronischen Nierenversagen (Jehle et al. 2000) bzw. bei manchen Leukämie-formen (Blum et al. 1993).

IGFBP-2 übt eine wachstumshemmende Wirkung aus. Hohe IGFBP-2-Serumspiegel führten bei nicht-transgenen Schweinen zu einer signifikanten Reduktion der Kollagensynthese (Gosiewska et al. 1994). Bei nicht-transgenen Mäusen waren hohe IGFBP-2-Konzentrationen mit einem im Vergleich zum Altersdurchschnitt zu niedrigen Körpergewicht assoziiert (Höflich et al. 1998a). Eine Ausschaltung des IGFBP-2-Gens hat allerdings kaum phänotypische Veränderungen zur Folge (Gosiewska et al. 1994).

Um die hemmende Wirkung von IGFBP-2 in vivo untersuchen zu können, wurden IGFBP-2- und GH-IGFBP-2-doppel-transgene Mäuse generiert. Beide zeigten signifikant erhöhte IGFBP-2-Spiegel (4- bis 9-fach). Der hemmende Effekt von IGFBP-2 auf das Körpergewicht zeigte sich sowohl in An- als auch in Abwesenheit von GH/IGF-I-Überschuss (Höflich et al. 1999, 2001). Als Ursache für diesen wachstumshemmenden Effekt von IGFBP-2 wurden bisher in der Literatur drei mögliche Mechanismen diskutiert (Abb. 11):

- 1) IGFBP-2 konkurriert mit den direkten Effekten von GH
- 2) IGFBP-2 hemmt die durch IGF-I vermittelten Wirkungen von GH
- 3) IGFBP-2 hemmt das Wachstum unabhängig von GH u./o. von IGF-I durch einen bisher unbekanntem Mechanismus

Dass der hemmende Effekt von IGFBP-2 über eine Antagonisierung direkter GH-Wirkungen und nicht über IGF-I vermittelt wird (s.o. 1), sprechen die Befunde an der Leber von IGF-transgenen Mäusen. Die Leber ist das einzige Organ, welches bei diesen Tieren trotz einer dreifach erhöhten IGF-I-Konzentration keine Größenzunahme zeigte (Mathews et al. 1988).



**Abb. 11: Wachstumshemmende Mechanismen von IGFBP-2 (Daten aus Mathews et al. 1988, Hadsell et al. 1996)**

Andererseits spricht ein Vergleich zwischen IGF-I-transgenen Hasen und den „des(1-3)IGF-I“-transgenen Mäusen dafür, dass die inhibitorische Wirkung von IGFBP-2 auf das Wachstum über einen IGF-I-abhängigen Mechanismus abläuft (Hadsell et al. 1996) (s.o. 2).



„Des(1-3)IGF-I“ entsteht aus intaktem IGF-I durch proteolytische Abspaltung von drei N-terminalen Resten. Es hat eine wesentlich geringere Affinität zu IGFBPs und dadurch eine 10- bis 50-fach stärkere Wirkung als intaktes IGF-I (Yamamoto und Murphy 1995). Obwohl bei beiden Tierarten hohe IGFBP-2-Konzentrationen in der Milch gemessen wurden, entwickelten nur „des(1-3)IGF-I“-transgene Mäuse morphologische Alterationen an der Mamma (Wolf et al. 1997, Hadsell et al. 1996). Dies ergibt sich daraus, dass IGFBP-2 „des(1-3)IGF-I“ mit einer wesentlich niedrigeren Affinität als IGF-I bindet und somit seine Effekte kaum hemmt. Diese Beobachtungen sprechen für eine Inhibition der GH-Effekte durch eine Komplexbildung zwischen IGFBP-2 und IGF-I (s.o. 2).

Am doppel-transgenen Mausmodell konnte gezeigt werden, dass IGFBP-2 in Anwesenheit erhöhter GH- bzw. IGF-I-Spiegel eine stärkere Hemmung auf das Körperwachstum ausübt als bei normaler GH/IGF-I-Konzentration. Dies spricht für eine additive Wirkung beider Hemmechanismen von IGFBP-2 (Höflich et al. 2001).

Kim et al. (1996) fanden bei 14 an Osteoporose erkrankten Frauen einen signifikant erhöhten relativen IGFBP-2-Anteil (IGFBP-2 im Verhältnis zur Gesamtmenge der IGFBPs) und eine negative Korrelation mit der mittels DXA gemessenen Knochendichte. Sugimoto et al. (1997) fanden bei 165 Frauen im Alter von 43 bis 88 Jahren eine negative Korrelation zwischen IGFBP-2 und IGF-I im Serum sowie zwischen IGFBP-2 und der Knochendichte. Es konnte allerdings kein Zusammenhang zwischen der Frakturhäufigkeit und der IGFBP-2-Konzentration festgestellt werden, da diese keine Differenz zwischen Frauen mit und ohne Fraktur aufwies (Sugimoto et al. 1997). Eine negative Korrelation zwischen der IGFBP-2-Konzentration und der Knochendichte konnte, wie oben bereits erwähnt auch bei renaler Osteopathie nachgewiesen werden (Jehle et al. 2000). Sie stellt einen Krankheitsprozess dar, der mit einem Anstieg des IGFBP-2-Serumspiegels sowie zunehmendem Knochenverlust einhergeht (Jehle et al. 2000). Die o.g. Befunde legen nahe, dass IGFBP-2 einen hemmenden Effekt auf den Knochen ausübt, und dass IGFBP-2 eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Osteoporose spielt. Im Gegensatz dazu konnten Nasu et al. (1997) und Kim et al. (1999) bei Frauen mit und ohne Osteoporose nach der Menopause jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen der IGFBP-2-Konzentration feststellen. Auch bei Männern mit Osteoporose (Typ II) konnte keine erhöhte IGFBP-2-Konzentration festgestellt werden (Johansson et al. 1997). Vielmehr wurden erhöhte IGFBP-2- und IGF-II-Serumspiegel im

Zusammenhang mit gesteigerter Knochenformation bei Patienten mit Hepatitis-C-assoziiierter Osteosklerose gemessen. De los Rios und Hill (1999) zeigten, dass exogenes IGFBP-2 einen biphasischen Effekt auf die DNS-Synthese in den Chondrozyten von Ratten ausübt. Einerseits verstärkt IGFBP-2 in sehr niedriger Konzentration ( $< 1$  nM) die Wirkung von IGF-II, während es in höheren Konzentrationen die Effekte von IGF-II hemmt.

Conover et al. (2002) zeigten in vivo, dass durch die Behandlung mit einem Komplex aus IGF-II und IGFBP-2 die Abnahme der Knochendichte bei diffuser Osteoporose verzögert und beim Gesunden sogar die Knochenformation gesteigert werden kann. Dieser anabole Effekt betraf insbesondere den subkortikalen und trabekulären Knochen. Dies widerspricht der Annahme, dass der Anstieg der IGFBP-2-Konzentration in einem kausalen Zusammenhang mit der Osteoporose steht.

**Tabelle 2: IGFBP-2-Konzentrationsveränderungen im Zusammenhang mit Osteoporose**

Autor	Kim 1996	Sugimoto 1997	Johansson 1997	Nasu 1997	Kim 1999	Conover 2002
Statement	Postmenop. Osteoporose: - IGFBP-2 _ - Negative Korrel. mit d. Dichte	Postmenop. Osteoporose: - IGFBP-2 _ - Negative Korrel. mit d. Dichte - Kein erhöhtes Frakturrisiko	Senile Osteoporose: - Kein IGFBP-2- Anstieg	Postmenop. Osteoporose: - Kein IGFBP-2- Anstieg	Postmenop. Osteoporose: - Kein IGFBP-2- Anstieg	<b>Diffuse Osteoporose: - IGFBP-2+IGF-II- Substitution_ Knochenformation stimuliert</b>

### 3. Aufgabenstellung und wissenschaftliche Fragen

Wie aus den vorhergehenden Ausführungen ersichtlich, wird die IGF-Aktivität nicht nur durch GH und die Expression des IGF-Polypeptids selbst, sondern auch durch den Typ und die lokale Konzentration der IGFBPs beeinflusst (Baxter 2000).

Der hemmende Effekt von IGFBP-2 auf den Knochen sowie seine kausale Wirkung (Dichteabnahme bei der Osteoporose) werden derzeit in der Literatur kontrovers diskutiert. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Studie die Effekte von IGFBP-2-Überexpression auf die Knochengröße (Länge und Volumen), Knochenmineralgehalt (BMC), Knochendichte sowie die strukturellen Eigenschaften des trabekulären und kortikalen Knochenkompartimentes analysiert. Um die Effekte von IGFBP-2 sowohl in An- als auch in Abwesenheit von GH/IGF-I-Überschuss charakterisieren zu können, wurden GH/IGFBP-2-doppel-transgene Mäuse (Höflich et al. 1999, 2001) untersucht. Mit Hilfe dieses Mausmodells sollten folgende Hypothesen geprüft werden:

- 1) IGFBP-2-transgene Mäuse zeigen im Vergleich zu den Kontrolltieren eine reduzierte Knochengröße sowie geringere BMC- und Knochendichte-Werte
- 2) Die anabolen Effekte von GH auf den Knochen werden durch erhöhte IGFBP-2-Spiegel reduziert oder sogar vollständig gehemmt
- 3) Die Wirkung einer systemisch hohen IGFBP-2-Konzentration ist, so wie bei GH (Wolf et al. 1991 a,b, Eckstein et al. 2002), von der skelettalen Lokalisation und vom Knochenkompartiment (trabekulär / kortikal) abhängig.

## **4. Material und Methode**

### **4.1. Material**

In dieser Studie wurden 43 männliche Mäuse im Alter von 4 Monaten untersucht, davon 14 Kontrollen, 7 IGFBP-2-transgene, 12 GH-transgene und 10 GH/IGFBP-2-doppel-transgene Tiere. Bevor Kopf, Haut und innere Organe entfernt wurden, wurde das Körpergewicht mit einer Hochpräzisionswaage (Mettler PM 100, Mettler, Giessen) und die Nasen-Rumpf-Länge mit einem elektronischen Kalipper bestimmt. Anschließend wurden die Karkassen mit der bereits erwähnten Hochpräzisionswaage gewogen. Die Tiere wurden bei  $-20^{\circ}$  C aufbewahrt. GH-transgene Mäuse (PEPCK-Promotor) weisen im Vergleich zu Kontrolltieren eine 10-fache GH-(Wolf et al. 1993) und eine zwei- bis dreifache IGF-I-Konzentration im Serum auf. Die IGFBP-2-transgenen Mäuse wurden durch eine pronukeäre Mikroinjektion eines Expressionsvektors, der die komplementäre (c) DNS von IGFBP-2 einer Maus enthielt (Dr. S. Drop, Rotterdam, NL) und eines Zytomegalie-Virus (CMV)-Promotors, zuständig für die Transkriptionskontrolle, generiert (Höflich et al. 1998 a, 2001). Die IGFBP-2-Serumspiegel waren bei den IGFBP-2-transgenen Tieren sowohl mit (Höflich et al. 2001) als auch ohne (Höflich et al. 1999) GH-Überexpression ca. 3 bis 9 Mal höher als bei den Kontrollmäusen. Die Konzentrationen von IGF-I und IGF-II waren bei IGFBP-2-transgenen Tieren jedoch unverändert. Die Doppel-transgenen Mäuse entstammen der Paarung einer weiblichen hemizygoten CMV-IGFBP-2-transgenen Maus mit einer männlichen hemizygoten PEPCK-bGH-transgenen Maus. Der GH-Serumspiegel wurde durch die IGFBP-2-Überexpression nicht beeinflusst und lag wie bei den GH-transgenen Tieren bei  $2 \mu\text{g/ml}$ . Die IGFBP-2-Serumkonzentration erreichte das gleiche Niveau wie bei den IGFBP-2-transgenen Mäusen.

### **4.2. Morphologische Untersuchungen und DXA-Analysen an IGFBP-2-transgenen Mäusen**

Für die Messungen des Knochenmineralgehalts der Karkassen benutzten wir ein Zweienergie-Röntgen-Absorptiometrie (DXA)-Gerät der Firma Sabre, Nordland/Stratec (Pforzheim) mit einem  $12 \times 15$  cm großen Messfeld (Abb. 12). Dieses ist speziell für die Untersuchungen an kleinen Tieren angepasst.



**Abb. 12: DXA-Gerät mit dem die Messungen des BMC vorgenommen wurden**

Der Scanner besteht aus einer 50x150  $\mu\text{m}$  Röntgenröhre (Beschleunigungs-spannung 60 kV, Anodenstromstärke 250  $\mu\text{A}$ ), deren emittiertes Spektrum durch K-Kanten Filterung (250  $\mu\text{m}$  Sn) in zwei Energiegipfel bei 28 keV und 48 keV aufgeteilt wird, wodurch eine effektive Unterscheidung zwischen Knochen und Weichteil auf Basis der Schwächungs-unterschiede ermöglicht wird. Zum Ausgleich der stärkeren Schwächung der niederener-getischen Strahlung durch das Körpergewebe beträgt das Intensitätsverhältnis 2:1 (niedriger Energiebereich : hoher Energiebereich). Die Strahlung wird nach Durchdringen der Teile von 2 Kadmium-Tellurid-Detektoren registriert (Lochmüller et al. 2001). Mit dieser Technik wurde der absolute (BMC in g) und der relative Knochenmineralgehalt der Karkassen (BMC / Karkassengewicht), der absolute und der relative Fettanteil sowie die Weichteilmasse gemessen. Auf eine Auswertung des sog. BMD ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) wurde verzichtet, da diese Werte aufgrund der unterschiedlichen Knochengrößen nicht vergleichbar sind. Die Mäuse wurden vor den Messungen aufgetaut und danach mit abduzierten Extremitäten auf dem Rücken liegend auf dem Messfeld positioniert. Zuerst wurde ein Übersichtsbild (Scout-View) erstellt und das Messfeld festgelegt (Abb. 13). Wir bestimmten BMC sowie die Karkassenmasse (BMC+Weichteil+Fett) (Abb. 13). Das mit der DXA bestimmte Karkassengewicht wurde mit der auf einer Laborwaage bestimmten Masse (s.o.) verglichen. Für die darauf folgenden Messungen wurde eine Geschwindigkeit von 20 mm/s und eine Auflösung von 0,5 x 0,5 mm<sub>2</sub> gewählt.

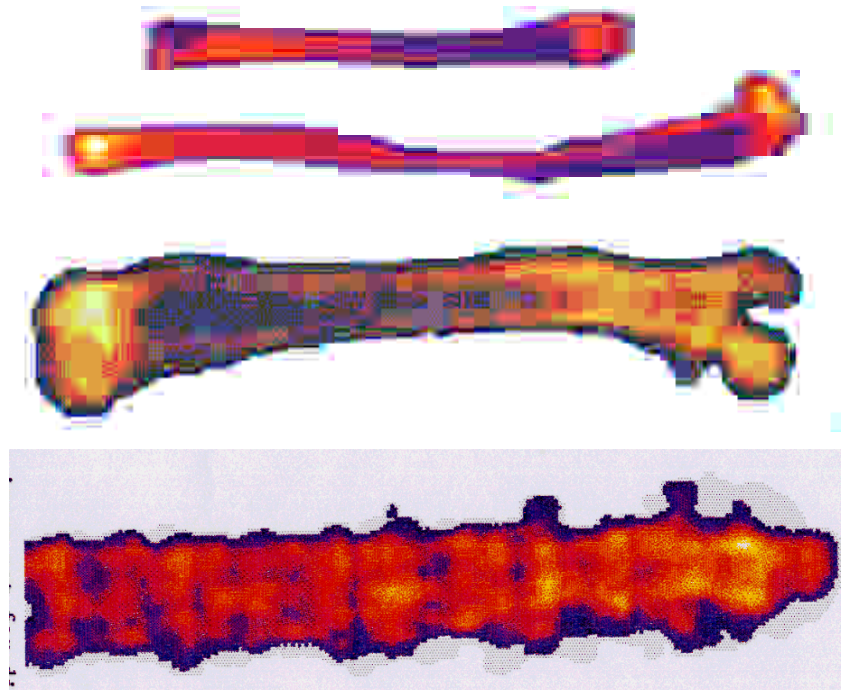


**Abb. 13: DXA: Scan einer ganzen Maus**

Um die potenziell unterschiedlichen Auswirkungen von GH und IGFBP-2 auf verschiedene Skelettregionen zu überprüfen, wurden im Anschluss an die Ganzkörpermessungen den Mäusen einzelne Knochen entnommen und vermessen (Abb. 14). Am linken Bein wurde das Femur im Hüftgelenk luxiert, der Bandapparat durchtrennt und die Weichteile entfernt. Danach wurde die Tibia frei präpariert, indem die Bänder des Knie- und des oberen Sprunggelenkes durchgeschnitten wurden. Anschließend wurde das gesamte Muskelgewebe von den Knochen entfernt. Das gleiche Verfahren wurde auch an der linken oberen Extremität angewendet, um den Humerus freizulegen. Schließlich wurde die Wirbelsäule am thorakolumbalen und am lumbosakralen Übergang abgesetzt, um die Lendenwirbelkörper (LWK 1-6) zu isolieren. Für die Lagerung wurden die Präparate in mit 0,9-prozentige NaCl-Lösung getränkte Gaze eingewickelt und in beschriftete Filmdosen bei  $-77^{\circ}\text{C}$  in einem Gefrierschrank aufbewahrt.

Für die Bestimmung des Mineralgehaltes der einzelnen Knochen (Femur, Tibia, Humerus, Lendenwirbelkörper) mit der DXA-Technik wurde ein Scout-View erstellt, dann das Messfeld eingestellt und anschließend die Messung bei einer Scangeschwindigkeit von 1 mm/s und einer Auflösung von  $0,1 \times 0,1 \text{ mm}_x$  (Messfeld  $2,5 \times 2,5 \text{ cm}$ ) durchgeführt (Abb. 14). Während der Messung wurden die Präparate in einem Plexiglas-Gefäß mit 0,9%-iger NaCl-Lösung, parallel zum Boden positioniert gehalten. Das Femur, die Tibia, der Humerus und die LWS einer Maus wurden in einem Messdurchgang analysiert (Abb. 14). Für die Auswertung wurde dann jedem Knochen eine Region of Interest (ROI) zugeordnet. Die so

erhaltenen Meßregionen wurden anschließend mit der installierten Software analysiert. Der Vorgang nahm ca. 1 Stunde pro Maus in Anspruch.



**Abb. 14: DXA: Scan von Femur, Tibia, Humerus, LWS**

Die Knochenlänge wurde mit einem elektronischen Kalipper gemessen. Um die volumetrische Knochendichte berechnen zu können, bestimmten wir das Volumen der einzelnen Knochen nach dem Archimedes-Prinzip (Abb. 15). Dafür wurde eine Glaspipette mit Wasser gefüllt und luftdicht verschlossen. Danach wurde sie von außen getrocknet und mit dem zu messenden Knochen auf eine Hochpräzisionswaage gewogen. Anschließend wurde die Pipette entleert, der Knochen eingebracht, das System erneut mit Wasser gefüllt, mit einem Stöpsel abgedichtet und das Gewicht bestimmt. Aus der Differenz beider Messungen konnte dann das Knochenvolumen berechnet werden (spezifisches Gewicht von Wasser 1 g/cm<sub>3</sub>). Der Quotient aus dem in der DXA gemessenen BMC und diesem Wert ergab die apparente volumetrische Knochendichte [ $D = \text{BMC (g)} / \text{Vol. (cm}^3\text{)}$ ]. Das Volumen der LWS konnte nicht bestimmt werden, da eine vollständige Entfernung der Weichteile nicht möglich war.

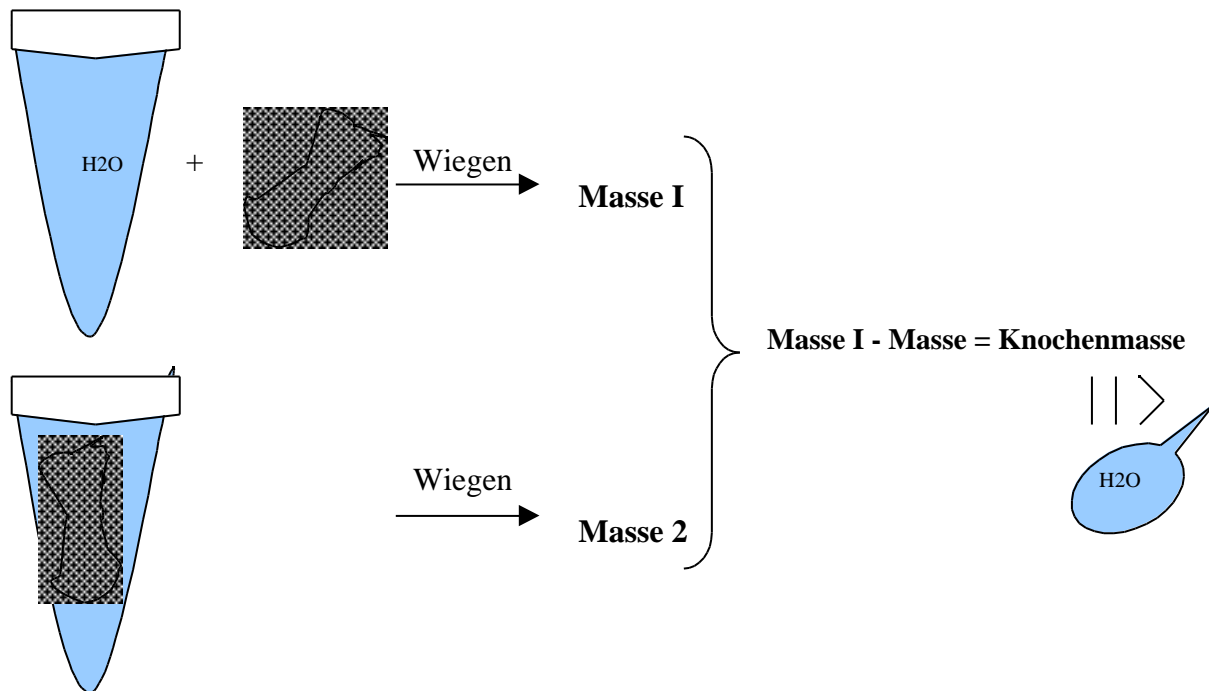


Abb. 15: Bestimmung des Volumens nach dem Archimedes Prinzip

### 4.3. pQCT- Analyse

Um strukturelle Unterschiede der Knochen und insbesondere Kompartiment-spezifische Unterschiede (kortikal, trabekulär) bestimmen zu können, wurden Messungen der Femora und der LWS mit einem speziell an die Maus angepassten Translations-Rotations-Computertomographie (XCT-Research-M)-Gerät der Fa. Stratec Medizintechnik (Pforzheim) mit 12 Detektoren durchgeführt (Schmidt et al. 2003), (Abb. 16). Mit diesem Gerät können im Einzelschnitt-Mode im Winkel von  $1^\circ$  Abschwächungsprofile gewonnen werden (Beschleunigungsspannung  $50 \pm 2$  kV, Anodenstrom  $< 0,3$  mA, Brennfleckdurchmesser  $< 0,05 \times 0,05$  mm; mittlere Röntgenenergie  $38 \pm 2$  keV; Breite des Energiegipfels  $19 \pm 1$  keV). Die Schichtdicke betrug dabei  $500 \mu\text{m}$  und die Auflösung  $100 \mu\text{m}$ . Auf Basis einer gefilterten Rückprojektion wurden Querschnittsbilder des Knochens berechnet (Eckstein et al. 2002b, Schmidt et al. 2003).

Die Knochen wurden für ca. 15 Min. in 0,9 %iger NaCl- Lsg. liegend im Vakuum entlüftet und unter der Flüssigkeitsoberfläche in eine Spritze eingebracht, um Lufteinschlüsse zu vermeiden. Die den Femur und Kochsalzlösung enthaltende Insulinspritze wurde so im



Gerät positioniert, dass die Kondylen aus dem Gerät heraus zeigten und der Femurkopf zuerst hineingeschoben wurde (Abb. 17).

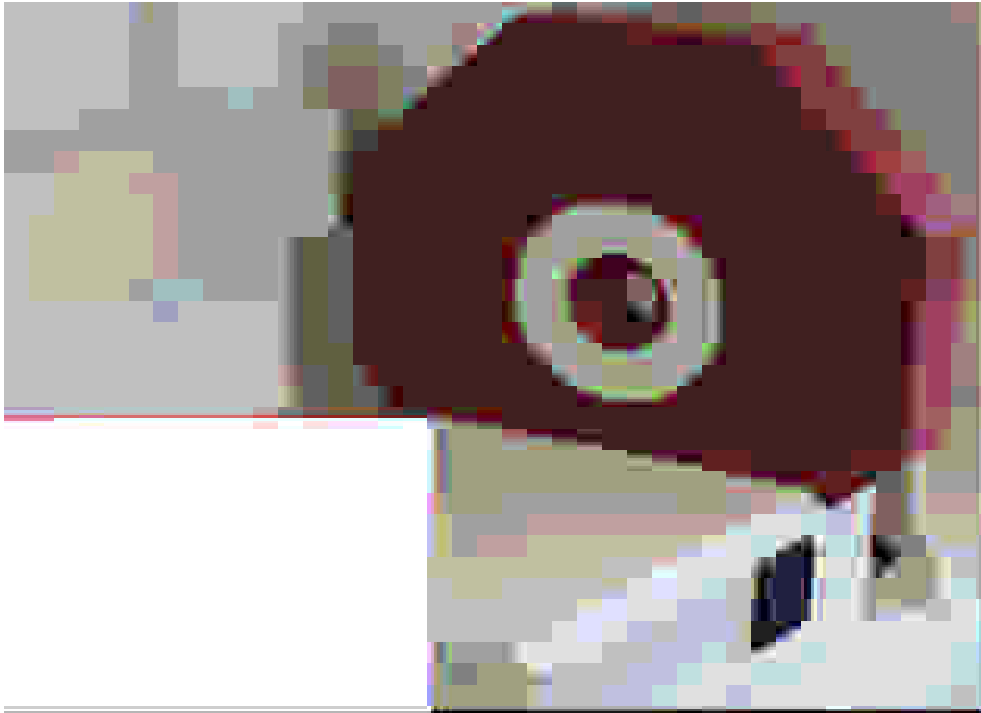
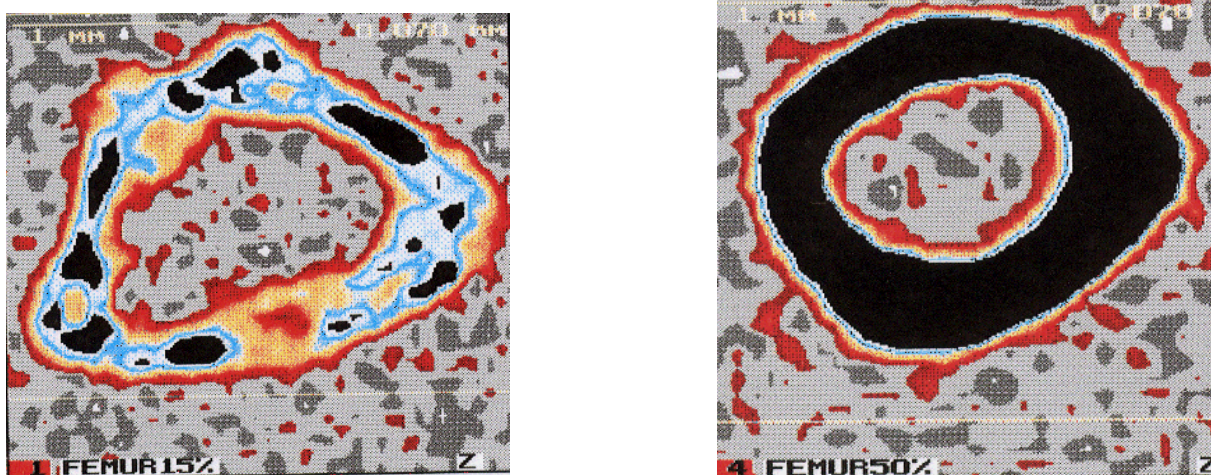


Abb. 16: pQCT-Gerät;



Abb. 17: Position der Spritze im pQCT-Gerät

An der distalen Metaphyse wurden insgesamt drei Messungen durchgeführt, jeweils bei 15 %, 17.5 % und 20 %-Knochenlänge. Diese Messungen erfolgten proximal der Epyphysenfuge, welche eine wesentlich höhere Dichte aufweist als die Metaphyse. Um die genauen Schnittlokalisationen zu erhalten, wurde der Knochen im Scout-View-Bild durch 21 Linien, die erste bei 0% (Femurkondylen), die letzte bei 100% (Kopfende) unterteilt, wodurch eine Liniendistanz von 5% erreicht werden konnte. Nach der Identifikation der 15%- und 20%-Schnitte wurde in der Mitte noch eine zusätzliche Linie (~17.5%) eingebracht. Nur diese drei und der Schnitt in der Schaftmitte (~50%) wurden im Messgang analysiert (Abb. 18). Die pQCT-Messungen des Femurs wurden insgesamt zwei Mal durchgeführt.



**Abb. 18: pQCT: Messung des Femurs: links: Schnitt in der Metaphyse; rechts: Schnitt in der Diaphyse**

Die longitudinale Achse der LWS wurde senkrecht zum Strahlengang ausgerichtet (Schmidt et al. 2003). Um die Position während der ganzen Messung konstant zu halten, wurde ein Silikonfaden am Spritzenkolben befestigt, der dann durch den Spinalkanal gezogen wurde. Das Fadenende ragte danach aus der Spritze heraus und konnte so mit einem Stopfstopfen unter Spannung gehalten werden. Die 2 ml Spritze wurde so im Gerät befestigt, dass die Dornfortsätze nach unten zeigten. Nachdem im Scout-View die einzelnen Wirbelkörper voneinander abgegrenzt wurden, wurde die erste Messlinie an den unteren Rand eines Wirbelkörpers gelegt. Dann wurde die Zahl der Linien auf drei erhöht und die dritte bis zum Unterrand des folgenden Wirbelkörpers geschoben. Die mittlere (~2.) Linie kam dadurch

genau in der Mitte des zu analysierenden Wirbels zu liegen. Anschließend wurden Querschnittsbilder nur aus der Mitte der Lendenwirbelkörper 2-4 erhoben (Abb. 19).

Anschließend wurden die Bilder mit Hilfe einer vom Hersteller bereitgestellten Software analysiert. Bei der distalen Femurmetaphyse und den Wirbelkörpern wurden die Knochenquerschnittsfläche ( $\emptyset A$ ), der BMC im Schnittbild (in mg/mm) und die Knochendichte (mg/cm<sub>3</sub>), entsprechend dem Quotienten aus BMC und  $\emptyset A$  bestimmt.



**Abb. 19: pQCT: Querschnitt eines Wirbelkörpers**

Zur Differenzierung von trabekulären und (sub)kortikalen Kompartiment wurden zwei verschiedene Algorithmen verwendet:

a) Peelmode 2

Die Unterscheidung zwischen trabekulärem und kortikalem Knochen erfolgt an Hand eines konstanten Schwellenwertes von 600 mg/ml. Alle Pixel, deren Dichte < 600 mg/cm<sub>3</sub> beträgt, werden dabei dem trabekulären Kompartiment und alle Pixel mit einer Dichte > 600 mg/cm<sub>3</sub> dem kortikalen Kompartiment zugerechnet. Dabei muss beachtet werden, dass der prozentuale Anteil der trabekulären bzw. der kortikalen Fläche in Abhängigkeit von der Dichteverteilung im Schnittbild variieren kann.

b) Peelmode 20

Die Unterscheidung zwischen trabekulärem und kortikalem Knochen erfolgt an Hand von einem konstanten prozentuellen Flächenanteil. Dabei werden 40% der Gesamtquerschnittsfläche mit der niedrigsten Dichte im Peelmode 2 dem trabekulären und

60% der Gesamtquerschnittsfläche mit den höchsten Dichtewerten dem kortikalen Knochenkompartiment zugerechnet.

Für die kortikale und trabekuläre Dichte wurden aus den drei Messlokalisationen am Femur und aus den Analysen der Lendenwirbelkörpern 2-4 in der Wirbelsäule jeweils die Durchschnittswerte berechnet.

An den kortikalen Messlokalisationen wurde für die Separierung vom Markraum ein Grenzwert von 710 mg/cm<sub>3</sub> gewählt. Hier wurden die Daten für die Gesamtquerschnittsfläche ( $\emptyset$  A), die absolute und die relative kortikale Fläche (CRT A) (kortikale Fläche / Querschnittsfläche in %), der kortikale Knochenmineralgehalt (CRT CNT) und die kortikale Dichte (CRT DEN) (Dichte gemittelt über die kortikale Fläche) ermittelt. Weiterhin wurden geometrische Parameter des Knochens bestimmt: Kortikale Dicke (mm), definiert als der mittlere Abstand zwischen dem äußeren und dem inneren Rand der kortikalen Schicht; Polares (I polar), minimales und maximales Flächenträgheitsmoment, welches in Abhängigkeit von der Belastungsart und -richtung die jeweilige Biege- und Torsionssteifigkeit des Knochens angibt; Und polares Widerstandsmoment, definiert als der Quotient aus dem Trägheitsmoment und dem Außendurchmesser. Diese Parameter weisen eine hohe Korrelation mit der biomechanischen Festigkeit des Knochens auf (Ferretti 1998).

#### **4.4.Statistische Auswertung**

Die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die absoluten Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen wurden in Excel berechnet und anschließend im Rahmen einer Varianzanalyse (ANOVA) mittels Statview 4.5-Software (Abacus Concepts, Berkely, CA) auf signifikante Unterschiede geprüft. Insgesamt wurden vier paarweise Vergleiche durchgeführt (IGFBP-2-transgene vs. Kontrollen; GH-transgene vs. Kontrollen; Doppel-transgene vs. Kontrollen und Doppel-transgene- vs. GH-transgenen Mäusen). In Anbetracht der mehrfachen Testung wurden Signifikanzniveaus bei  $p < 0,05$  (Einzeltest) sowie bei  $p < 0.125$  und bei  $p < 0.0025$  gesetzt, um ein globales Signifikanzniveau von 5% bzw. 1% einzuhalten.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Skelettale Veränderungen an IGFBP-2 transgenen Mäusen

Das Körpergewicht (Abb. 20), die Nasen-Rumpf-Länge sowie die Knochenlänge und das Knochenvolumen von Femur, Tibia und Humerus waren an IGFBP-2-transgenen Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren vermindert (Tab. 1, 2). Der BMC der Karkassen (Abb. 21), des Femurs (Abb. 22) und der Tibia war signifikant erniedrigt. Keine signifikante Reduktion konnte dagegen bei den Messungen des Humerus und der Wirbelkörper (Abb. 23) festgestellt werden (Tab. 1, 2). Der relative Karkassen-BMC und der relative Fettanteil (+44%) zeigten eine tendenzielle Zunahme, ohne allerdings Signifikanz zu erreichen. Die pQCT-Analyse im Bereich der Femurmetaphyse ergab keine signifikanten Veränderungen für den BMC und die subkortikale Dichte, allerdings eine signifikante Abnahme der Querschnittsfläche (Abb. 24), (Tab. 3, 4) und einen signifikanten Anstieg an trabekulärer Dichte. An den Wirbelkörpern konnten für alle Messparameter kaum Unterschiede zu den Kontrolltieren festgestellt werden.

Der BMC und die kortikale Fläche in der Schaftmitte des Femurs zeigten eine signifikante Verminderung gegenüber Kontrollen, die deutlicher ausgeprägt war als an der Femurmetaphyse (Tab. 3, 4). Die relative kortikale Fläche (% des Gesamtquerschnittsfläche) war gegenüber Kontrolltieren unverändert. Die Werte für die geometrischen Knocheneigenschaften bei den IGFBP-2 transgenen Mäusen wiesen eine signifikante Reduktion auf (Tab. 3, 4).

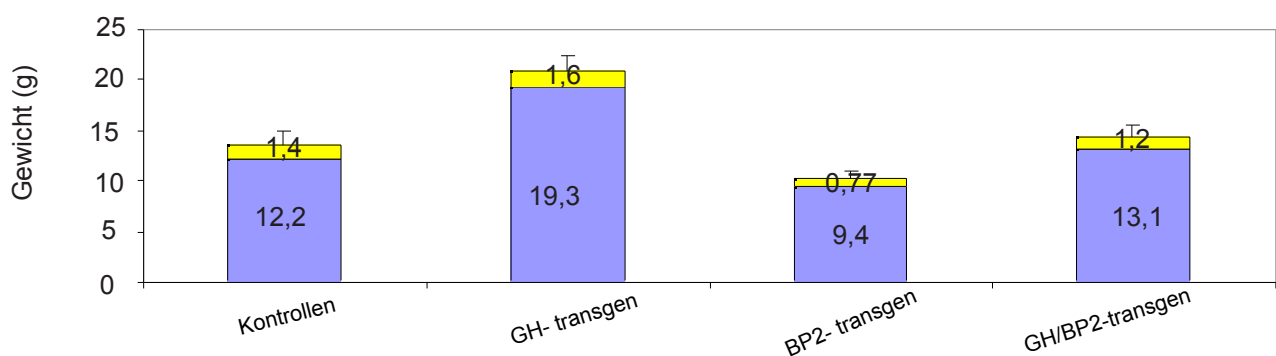
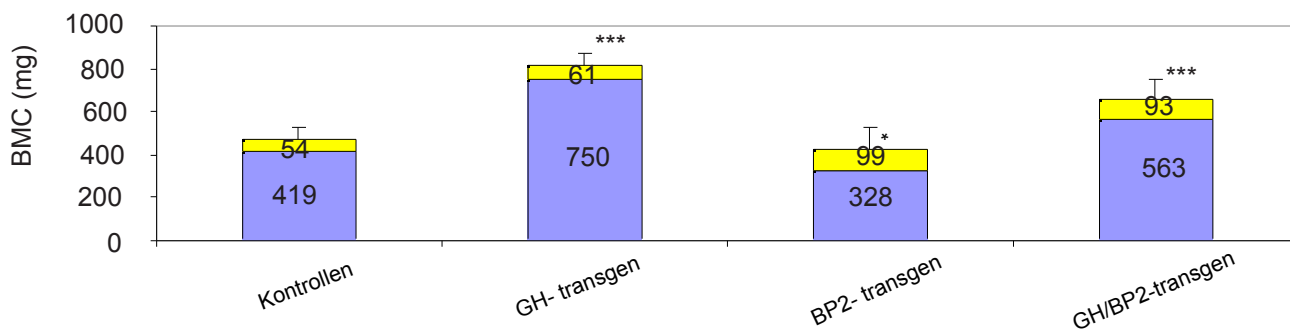
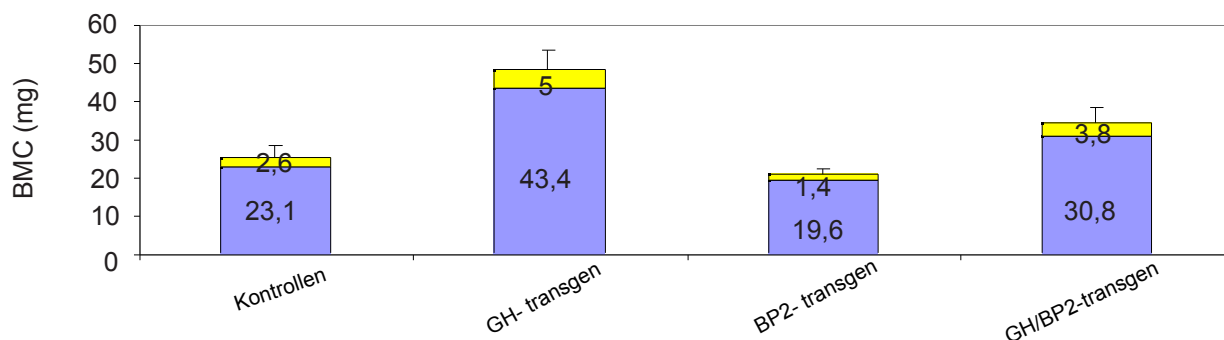


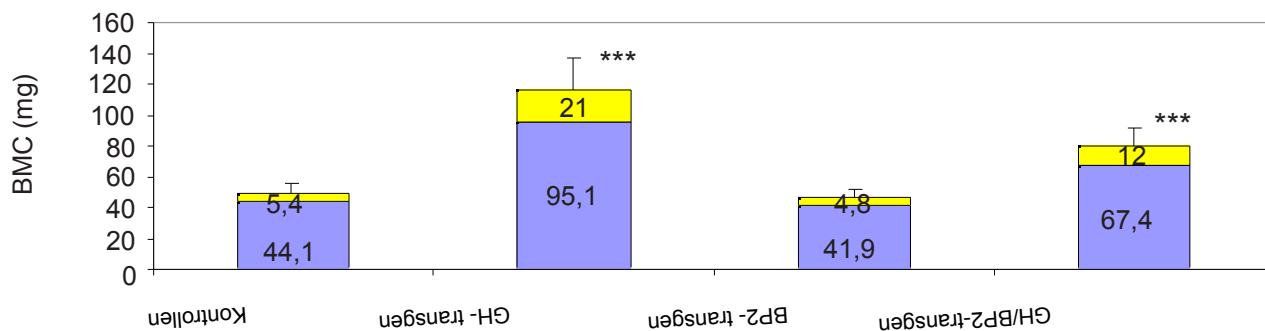
Abb. 20: Karkassengewicht für unterschiedliche Untersuchungsgruppen



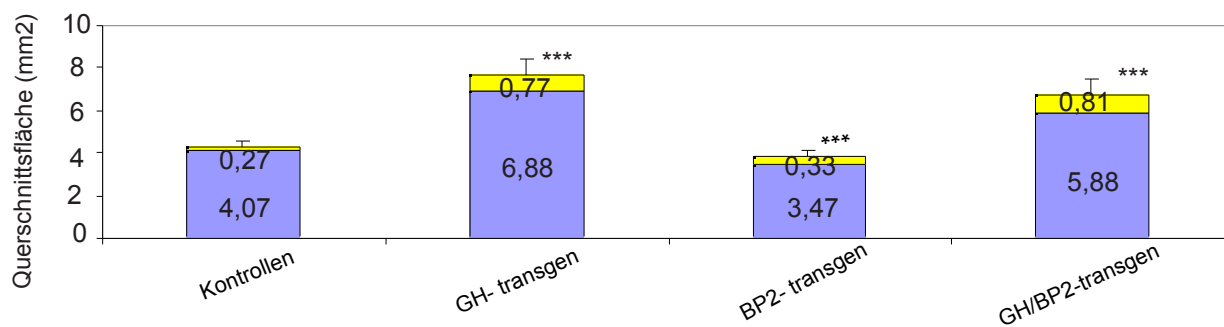
**Abb. 21: Karkasse: Knochenmineralgehalt (BMC) für unterschiedliche Untersuchungsgruppen**



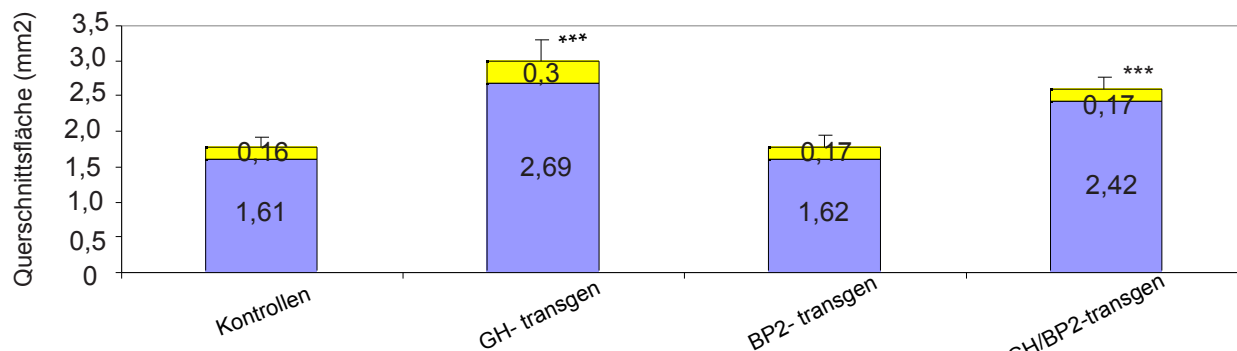
**Abb. 22: Femur: Knochenmineralgehalt mittels DXA für unterschiedliche Untersuchungsgruppen**



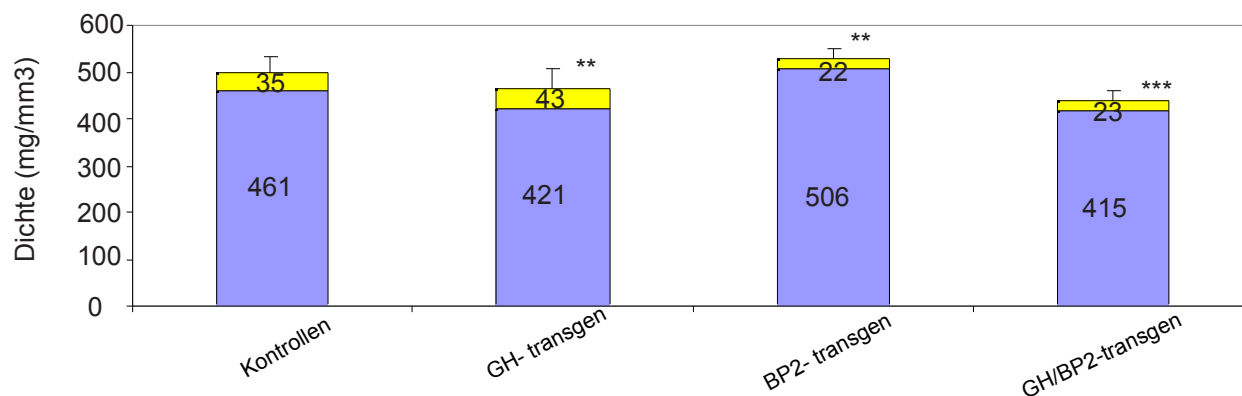
**Abb. 23: Wirbelkörper: Knochenmineralgehalt mittels DXA für unterschiedliche Untersuchungsgruppen**



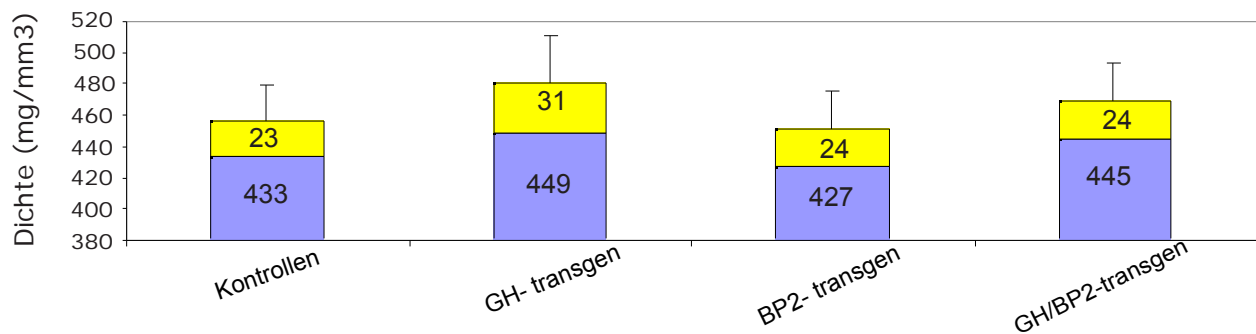
**Abb. 24: Femur: Gesamt-Querschnittsfläche im pQCT für unterschiedliche Untersuchungsgruppen**



**Abb.25: Wirbelkörper: Gesamt-Querschnittsfläche im pQCT für unterschiedliche Untersuchungsgruppen**



**Abb. 26: Femur: Gesamtdichte im pQCT für unterschiedliche Untersuchungsgruppen**



**Abb. 27: Wirbelkörper: Gesamtdichte im pQCT für unterschiedliche Untersuchungsgruppen**

## 5.2. Skelettale Veränderungen an GH-transgenen Mäusen

Das Körpergewicht (Abb. 20), die Nasen-Rumpf-Länge, der BMC der Karkassen (Abb. 21) sowie die Knochenlänge, das Knochenvolumen und der BMC von Femur (Abb. 22), Tibia und Humerus (Tab. 1, 2) waren bei GH-transgenen Mäusen gegenüber den Kontrollen signifikant ( $p < 0,01$ ) erhöht (Abb. 20, 21, 22). Insgesamt konnte ein stärkerer Effekt der GH-Überexpression auf den BMC an den Lendenwirbelkörpern (Abb. 23) als an Femur (Abb. 22), Tibia oder Humerus nachgewiesen werden. Der relative Karkassen-Mineralgehalt (% Körpergewicht) sowie die Zusammensetzung der Karkassen (%Weichteile, %Fett) zeigten keine signifikanten Veränderungen (Tab. 1, 2). Der BMC und die Querschnittsfläche (Abb. 24, 25) (pQCT) der Femurmetaphyse, der Diaphyse sowie der Wirbelkörper waren signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht (Tab. 3, 4). Der Gewinn war am deutlichsten an den Wirbelkörpern ausgeprägt (Tab. 3). Die Messungen der mittleren Knochendichte im Bereich der Femurmetaphyse ergaben einen niedrigeren Wert bei den GH-transgenen als bei den Kontrollmäusen (Abb. 26). Dies konnte insbesondere auf einen signifikanten Verlust im subkortikalen Bereich zurückgeführt werden (Tab. 3, 4). Die Dichte in den Wirbelkörpern zeigte dagegen eher eine tendenzielle Zunahme v.a. für den trabekulären Knochen (Tab. 3, 4; Abb. 27). Ein Zugewinn an relativer kortikaler Fläche konnte am Femurschaft nicht festgestellt werden. Die Werte für die geometrischen Knocheneigenschaften bei den GH-transgenen Mäusen wiesen im Vergleich zu den Kontrolltieren eine signifikante Erhöhung auf (Tab. 3, 4).



### 5.3. Skelettale Veränderungen an Doppel-transgenen Mäusen

Die sowohl GH- wie auch IGFBP-2-transgenen Tiere zeigten im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikante Zunahme des Körpergewichtes (Abb. 20), der Nasen-Schwanz-Länge, der Knochenlänge und des Knochenvolumenens des Femurs, der Tibia und des Humerus (Tab. 1, 2). Der absolute (Abb. 21) und relative Karkassen-BMC sowie der relative Fettanteil waren ebenfalls gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. Außer für Tibia konnte für alle Knochen eine signifikante BMC-Erhöhung verzeichnet werden (Tab. 2). Weiterhin konnte im pQCT eine signifikante Zunahme des BMC und der Querschnittsfläche an der Femurmetaphyse (Abb. 24) festgestellt werden (Tab. 3, 4). Die Erhöhung der Querschnittsfläche war stärker als die BMC-Erhöhung ausgeprägt, so dass sich eine signifikant geringere Dichte ergab (Abb. 26). Dieser Effekt betraf nur das subkortikale Kompartiment, während die trabekuläre Dichte unverändert war. In den Wirbelkörpern dagegen entsprach die BMC- der Querschnittsflächen-Zunahme (Abb. 25), wodurch kaum Differenzen (Abb. 27) sowohl für die trabekuläre als auch für die subkortikale Dichte festgestellt werden konnten (Tab. 3, 4). An der Femurdiaphyse konnten für die Gesamtquerschnittsfläche, den kortikalen BMC, die kortikale Fläche und die kortikale Dicke nur geringe Unterschiede zu den Kontrollen festgestellt werden (Tab. 3, 4). Die Werte für die geometrischen Knocheneigenschaften bei den Doppel-transgenen Mäusen wiesen im Vergleich zu den Kontrolltieren ebenfalls keine deutlichen Differenzen auf. Hier wurden die anabolen Effekte der GH-Überexpression durch IGFBP-2 fast vollständig kompensiert.

Verglichen mit den GH-transgenen Tieren wiesen die Doppel-transgenen Mäuse eine signifikante Reduktion des Körpergewichtes und der Nasen-Schwanz-Länge auf (Tab. 1, 2). Die Knochenlänge war ebenfalls signifikant vermindert. Am Femur konnte eine signifikante Volumenabnahme festgestellt werden. Dies konnte an der Tibia und am Humerus nicht bestätigt werden (Tab. 1, 2). Der absolute Karkassen-BMC war signifikant niedriger als bei den GH-transgenen Tieren (Abb. 21), der relative BMC dagegen höher (Tab. 1, 2). Alle Knochen zeigten eine signifikante BMC-Abnahme. Die pQCT-Analyse ergab einen erniedrigten BMC und eine geringere Querschnittsfläche (Abb. 24) als bei den GH-transgenen Mäusen, allerdings keine Veränderung der Dichte (Abb. 26), (Tab. 3, 4). An den Wirbelkörpern konnten im pQCT ähnliche Veränderungen der o.g. Parameter wie am Femur festgestellt werden (Abb. 25, 27). Der kortikale BMC, die kortikale Fläche wie auch die

geometrischen Parameter an der Femurdiaphyse wiesen eine signifikante Reduktion auf, während die relative kortikale Fläche im Vergleich zur alleinigen GH-Überexpression gleich blieb (Tab. 3, 4).

**Tabelle 1: Allgemeine morphologische und DXA-Messungen in Kontrollen, Wachstumshormon-(GH), IGFBP-2-, and Doppel-transgenen Mäusen; Mittelwerte und Standardabweichungen.**

		Kon	GH	IGFBP-2	Doppel
Körpergewicht (g)		35,2 ± 3,1	65,1 ± 5,2	30,8 ± 3,0	54,5 ± 6,0
Nase-Rumpf- Länge (cm)		10.3 ± 0.2	13.1 ± 0.4	9.8 ± 0.2	12.0 ± 0.6
Knochen	Femur	16,4 ± 0,4	19,5 ± 0,3	15,9 ± 0,4	18,1 ± 0,5
Länge	Tibia	19,0 ± 0,2	22,2 ± 0,5	18,7 ± 0,2	20,9 ± 0,7
(mm)	Humerus	12,6 ± 0,3	15,2 ± 0,4	12,3 ± 0,2	14,0 ± 0,9
Knochen	Femur	69,1 ± 10	124 ± 23	53,4 ± 9,0	96,0 ± 14
Volumen	Tibia	52,5 ± 0,8	95,4 ± 18	34,9 ± 8,5	90,8 ± 18
(mm <sup>3</sup> )	Humerus	30,9 ± 7,36	59,1 ± 8,3	18,1 ± 4,5	50,4 ± 12
DXA Karkasse	% Fett	22,0 ± 8,3	25,7 ± 9,9	31,7 ± 17,8	31,3 ± 11,1
	% Weichteile	73,7 ± 8,5	69,5 ± 10,3	63,6 ± 19,1	62,9 ± 11,8
	BMC (mg)	419 ± 54	750 ± 61	328 ± 99	563 ± 93
	% BMC	4,29 ± 0,36	4,28 ± 0,6	4,69 ± 1,4	5,71 ± 0,80
DXA Femur	BMC (mg)	23,1 ± 2,6	43,4 ± 5	19,6 ± 1,4	30,8 ± 3,8
	Dichte (mg/ml)	338 ± 48	364 ± 94	372 ± 46	324 ± 36
DXA Tibia	BMC (mg)	19,4 ± 3,2	30,8 ± 4,2	15,4 ± 1,0	21,0 ± 3,0
	Dichte (mg/ml)	372 ± 57	340 ± 114	464 ± 110	235 ± 37
DXA Humerus	BMC (mg)	9,42 ± 1,9	15,5 ± 3,9	8,29 ± 1,3	12,8 ± 2,8
	Dichte (mg/ml)	317 ± 83	323 ± 102	469 ± 88	264 ± 73
DXA Wirbel	BMC (mg)	44,1 ± 5,4	95,1 ± 21	41,9 ± 4,8	67,4 ± 12

DXA = Zweienergie - Röntgenabsorptiometrie; BMC = Knochenmineralgehalt (in mg) in DXA

**Tabelle 2: Allgemeine morphologische und DXA-Messungen in Kontrollen, Wachstumshormon-(GH), IGFBP-2-, and Doppel-transgenen Mäusen ; prozentuale Unterschiede zwischen den Gruppen**

		GH vs. Kon	IGFBP-2 vs. Kon	Doppel vs. Kon	Doppel vs. GH
Körpergewicht (g)		+85% ***	-13% ***	+55% ***	-16% ***
Nasen-Rumpf-Länge (cm)		+27% ***	-5% ***	+18% ***	-8% ***
Knochen	Femur	+19% ***	-3% **	+10% ***	-7% ***
Länge	Tibia	+17% ***	-2% **	+10% ***	-6% ***
(mm)	Humerus	+21% ***	-2% *	+12% **	-8% ***
Knochen	Femur	+80% ***	-23% **	+39% ***	-23% **
Volumen	Tibia	+82% ***	-34% ***	+73% ***	-5%
(mm <sup>3</sup> )	Humerus	+91% ***	-41% ***	+63% ***	-15%
DXA Karkasse	% Fett	+17%	+44%	+43% *	+22%
	% Weichteile	-5,8%	-14%	-15% *	-9%
	BMC (mg)	+79% ***	-22% *	+34% ***	-25% ***
	% BMC	+12% *	+9%	+33% ***	+18% **
DXA Femur	BMC (mg)	+88% ***	-15% ***	+33% ***	-29% ***
	Dichte (mg/ml)	+8%	+10%	-4%	-11%
DXA Tibia	BMC (mg)	+59% ***	-21% **	+8%	-32% ***
	Dichte (mg/ml)	-8% *	+25% *	-37% ***	-31% ***
DXA Humerus	BMC (mg)	+96% ***	-12%	+37% **	-30% ***
	Dichte (mg/ml)	+2%	+48% **	-17%	-18% *
DXA Wirbel	BMC (mg)	+116% ***	-5%	+53% ***	-29% ***

BMC = Knochenmineralgewicht (in mg) in DXA-Scan;

\* p < 0.05 im Einzeltest; \*\* p < 0.05 auf dem Gesamtniveau [< 0.125 im Einzeltest];

\*\*\* p < 0.01 auf dem Gesamtniveau [< 0.0025 im Einzeltest]

**Tabelle 3: pQCT-Messungen in Kontrollen, Wachstumshormon- (GH), IGFBP-2-, und Doppeltransgenen Mäusen; Mittelwerte und Standardabweichungen**

		Kon	GH	IGFBP-2	Doppel
<b>Femur</b>	Mineralgehalt (mg/mm)	1,88 ± 0,16	2,87 ± 0,30	1,74 ± 0,11	2,47 ± 0,36
<b>Meta-</b>	Ø A (mm <sup>2</sup> )	4,07 ± 0,27	6,88 ± 0,77	3,47 ± 0,32	5,88 ± 0,81
<b>physe</b>	Dichte (mg/ml)	461 ± 35	421 ± 43	506 ± 22	415 ± 23
	% Trab. Fläche 600	60,7 ± 4,4	70,9 ± 9,5	55,8 ± 3,5	64,4 ± 2,7
	Trab. Dichte 600	226 ± 46	240 ± 22	266 ± 23	248 ± 37
	SC Dichte 600	803 ± 31	763 ± 35	804 ± 18	735 ± 31
	Trab. Dichte 40%	141 ± 52	170 ± 20	199 ± 23	167 ± 31
	SC Dichte 40%	680 ± 47	578 ± 34	714 ± 40	594 ± 33
<b>Femur</b>	Ø A (mm <sup>2</sup> )	2,47 ± 0,16	3,23 ± 0,55	1,89 ± 0,28	2,45 ± 0,38
<b>Schaft</b>	Crt Mineralgehalt (mg/mm)	1,45 ± 0,09	1,86 ± 0,13	1,13 ± 0,09	1,45 ± 0,20
	% Crt. Fläche (%)	46,4 ± 3,6	47,2 ± 8,2	47,4 ± 4,3	48,1 ± 9,4
	Crt. Dicke	237 ± 10	263 ± 13	212 ± 7	241 ± 17
	I polar (mm <sup>4</sup> )	67,6 ± 8,3	119 ± 23	38,7 ± 11	65,9 ± 20
	RP <sup>d</sup> (mm <sup>3</sup> )	6,36 ± 0,61	9,88 ± 1,2	4,21 ± 0,71	5,00 ± 5,6
	I Minimum (mm <sup>4</sup> )	20,7 ± 2,5	37,1 ± 13	11,5 ± 3,1	22,4 ± 6,7
	I Maximum (mm <sup>4</sup> )	44,2 ± 4,8	67,0 ± 26	26,0 ± 7,8	40,9 ± 13
<b>Wirbel</b>	Mineralgehalt (mg/mm)	0,70 ± 0,09	1,21 ± 0,16	0,693 ± 0,08	1,06 ± 0,10
<b>L2-4</b>	Ø A (mm <sup>2</sup> )	1,61 ± 0,16	2,69 ± 0,30	1,62 ± 0,17	2,42 ± 0,17
	Dichte (mg/ml)	433 ± 23	449 ± 31	427 ± 24	445 ± 24
	% Trab. Fläche 600	55,7 ± 11	60,2 ± 3,4	53,1 ± 11	61,6 ± 4,1
	Trab. Dichte 600	334 ± 41	377 ± 29	300 ± 52	367 ± 31
	SC. Dichte 600	546 ± 38	555 ± 48	555 ± 27	568 ± 31
	Trab. Dichte 40%	282 ± 31	304 ± 38	258 ± 58	287 ± 38
	SC. Dichte 40%	534 ± 35	545 ± 34	541 ± 20	550 ± 23

L2-4 = Lendenwirbelkörper 2-4, Ø A = Querschnittsfläche, trab. = trabekulär; SC = subkortikal; 600 (in mg/ml) = Trennschwelle zwischen trabekulärem und kortikalem Knochen mit Peelmode 2, 40%: im Peelmode 2 wurden 40% der Ø A mit der niedrigsten Dichte dem trabekulären Knochen zugerechnet; I = Trägheitsmoment; Rp<sup>d</sup> = dichte-gewichteter Widerstandsmoment.

**Table 4: pQCT-Messungen in Kontrollen, Wachstumshormon- (GH), IGFBP-2-, und Doppeltransgenen Mäusen; Unterschiede zwischen den Gruppen: Prozente und Signifikanzen**

		GH vs. Kon	IGFBP-2 vs. Kon	Doppel vs. Kon	Doppel vs. GH
<b>Femur</b>	Mineralgehalt (mg/mm)	+53% ***	-7%	+31% ***	-14% *
<b>Meta-</b>	Ø A (mm <sup>2</sup> )	+69% ***	-15% ***	+44% ***	-15% *
<b>physe</b>	Dichte (mg/ml)	-9% **	+10% **	-10% ***	-2%
	% Trab. Fläche 600	+17% ***	-8% *	+6% **	-9% *
	Trab. Dichte 600	+6%	+18% *	+10%	+4%
	SC Dichte 600	-5% **	0%	-8% ***	-4%
	Trab. Dichte 40%	+21%	+42% **	+18%	-2%
	SC Dichte 40%	-15% ***	+5%	-13% ***	+3%
<b>Femur</b>	Ø A (mm <sup>2</sup> )	+30% ***	-24% ***	-1%	-24% ***
<b>Schaft</b>	Cort. Mineralgehalt (mg/mm)	+28% ***	-22% ***	0%	-22% ***
	% Crt Fläche (%)	+2%	+2%	+4%	+2%
	Crt. Dicke	+11% ***	-11% ***	+2%	-8% **
	I polar (mm <sup>4</sup> )	+76% ***	-43% ***	-3%	-45% ***
	RP <sup>d</sup> (mm <sup>3</sup> )	+55% ***	-34% ***	0%	-35% ***
	I Minimum (mm <sup>4</sup> )	+79% ***	-45% ***	+8%	-40% ***
	I Maximum (mm <sup>4</sup> )	+52% ***	-41% ***	-8%	-39% ***
<b>Wirbel</b>	Mineralgehalt (mg/mm)	+72% ***	-1%	+51% ***	-12%
<b>Säule</b>	Ø A (mm <sup>2</sup> )	+66% ***	0%	+50% ***	-10% **
<b>L2-L4</b>	Dichte (mg/ml)	+4%	-1%	+3%	-1%
	% Trab. Fläche 600	+8%	-5%	+11%	+2%
	Trab. Dichte 600	+13% *	-10%	+10%	-3%
	SC. Dichte 600	+2%	+2%	+4%	+2%
	Trab. Dichte 40%	+8%	-8%	+2%	-6%
	SC. Dichte 40%	+2%	+1%	+3%	+1%

\* p < \* 0.05 im Einzeltest; \*\* p < 0.05 auf dem Gesamtniveau [< 0.125 im Einzeltest];

\*\*\* p < 0.01 auf dem Gesamtniveau [< 0.0025 im Einzeltest]; andere Abkürzungen wie in der

Tabelle 3

## **6. Diskussion**

In der vorliegenden Studie sollten die Effekte einer IGFBP-2-Überexpression auf das Skelett in An- und Abwesenheit von GH-Überexpression charakterisiert werden. Insbesondere sollte untersucht werden, ob 1) IGFBP-2-Überexpression zu einer Reduktion der Knochenlänge, des Knochenvolumens, des BMC und der Knochendichte führt. Darüber hinaus sollte überprüft werden, ob 2) die anabolen GH-Effekte auf den Knochen durch erhöhte IGFBP-2-Spiegel reduziert oder sogar vollständig gehemmt werden, und ob 3) die Wirkung einer hohen systemischen IGFBP-2-Konzentration auf die Knochenstrukturen von der skelettalen Lokalisation und vom Knochenkompartiment (trabekulär / kortikal) abhängig ist.

### **6.1. Methodikdiskussion**

#### **6.1.1. Transgene Mausmodelle**

Mit Hilfe von transgenen Tiermodellen lassen sich die Effekte verschiedener Gene und ihrer Produkte auf den Knochenstoffwechsel *in vivo* untersuchen. Durch pronukeäre Mikroinjektion können gewünschte Gene (z.B. GH, IGF, IGFBP-2 etc.) fremder Spezies in die befruchtete Eizelle integriert und der Kontrolle eines unabhängigen Promotors unterstellt werden. GH-transgene Tiere zeigen eine sehr hohe endogene Produktion des Wachstumshormons, ohne dass sich hieraus immunologische Probleme wie bei der externen Gabe des Proteins ergeben. In der vorliegenden Studie wurden die Auswirkungen alleiniger IGFBP-2- und GH-Überexpression sowie der gemeinsamen Koexpression untersucht.

#### **6.1.2. Zweienergie - Röntgenabsorptiometrie (DXA)**

Die DXA wird für die nicht-invasiven Untersuchungen des Knochenmineralgehaltes (BMC) und der Körperzusammensetzung verwendet. Die ermittelten Werte für BMC und Fettanteil wurden an der Maus im Vergleich zu chemischen Analysen und der Mikro-CT-Technik validiert (Eckstein et al. 2002 a, b). Bereits frühere Untersuchungen zeigten einen hohen Zusammenhang zwischen DXA und Veraschungsanalysen (Jilka et al. 1996, Klein et al. 1998,

Nagy et Clair 2000). Die absoluten Werte für den BMC werden mittels DXA signifikant unterschätzt (4% für den BMC des Schädels und 35% für den BMC des Gesamtkörpergewichts) (Eckstein et al. 2002 b). Es besteht jedoch ein hoher linearer Zusammenhang zwischen DXA- und Aschegewicht bzw. Kalziumgehalt. Der Schätzfehler liegt für den Schädel der Maus bei 6,1% ( $r=0,98$ ) und für den Gesamtkörper bei 5,7% ( $r=0,98$ ) (Eckstein et al 2002 b). Die Analysen einzelner Knochen (ex situ) ergaben ebenfalls eine Unterschätzung der absoluten Ergebnisse mittels DXA. Die Abweichungen reichten zwischen -49% und -7%. Allerdings konnte auch hier ein hoher linearer Zusammenhang festgestellt werden, mit einem Schätzfehler von 5,7% und einem Korrelationskoeffizient von 0,996 (Eckstein et al. 2002 b). Der Schätzfehler (SEE) betrug für die Tibia 6,2% ( $r=0,994$ ), für das Femur 3,8% ( $r=0,998$ ) und für die Wirbelkörper 5,3% ( $r=0,995$ ). Die Präzision (Reproduzierbarkeit) der DXA-Messung an den einzelnen Knochen schwankte bei Tibia zwischen 1,4% und 5,7%, am Femur zwischen 0,1% und 4,2% und an der Wirbelsäule zwischen 0,7% und 8,6% (Eckstein et al. 2002 b).

Insgesamt fällt auf, dass sich die prozentuale Unterschätzung des BMC umgekehrt proportional zum absoluten Gewicht verhält. Für dieses Problem existieren zwei Erklärungsansätze. Nagy et Clair (2000) behaupteten, dass außer Knochen auch andere Gewebe einen relevanten Gehalt an mineralisierten Substanzen enthalten, DXA aber nur die im Knochen enthaltenen Mineralien misst. Dadurch könnte der Mineralgehalt des Gesamtkörpers unterschätzt werden. Da aber auch der Mineralgehalt einzelner Knochen (Weichteile entfernt) unterschätzt wird, gehen wir davon aus, dass mittels DXA kleine Knochen und der Mineralgehalt in dünnen Knochenregionen nicht erfasst werden (Eckstein et al. 2002a,b). Es ist jedoch keine absolute Übereinstimmung der Werte, sondern ein hoher linearer Zusammenhang zwischen DXA und Aschegewicht erforderlich, um prozentuale Unterschiede zwischen den Gruppen zuverlässig zu ermitteln (Eckstein et al. 2002b). Diese Bedingungen sind, wie die oben genannten Ergebnisse zeigen, für die DXA der Maus mit dem verwendeten System erfüllt. Als Nachteil der DXA ist anzumerken, dass keine getrennte Messung des trabekulären und kortikalen Kompartimentes möglich ist, keine Informationen zur volumetrischen Knochendichte ( $\text{g/cm}^3$ ) gewonnen werden können, und keine strukturellen Messungen geometrischer Knocheneigenschaften vorgenommen werden können. Derartige Messungen sind jedoch mit dem peripheren Computertomographen (pQCT) durchführbar (s. Kap. 6.3.3.)



### 6.1.3. Periphere quantitative Computertomographie (pQCT)

Das pQCT stellt eine ideale Ergänzungsmethode zur DXA dar. Die mittels pQCT bestimmten Werte wurden zur Validierung mit denen aus dem  $\mu$ CT verglichen (Eckstein et al. 2002a). Der Schätzfehler betrug 15% für die trabekuläre Dichte im pQCT vs. trabekuläre Fraktion am Knochenvolumen im  $\mu$ CT ( $r=0,96$ ), 1,4% für Gesamtquerschnittsfläche ( $r=0,99$ ), 2,4% für die kortikale Fläche ( $r=0,99$ ) und 4,2% für die kortikale Dicke ( $r=0,95$ ) (Eckstein et al. 2002 a,b). Die Validität der pQCT für die Messungen am Mausskelett wurde durch den Vergleich mit Werten aus der  $\mu$ CT und histologischen Untersuchungen ermittelt (Schmidt et al. 2003). Die Korrelation zwischen der Dichte im pQCT und dem in den histomorphometrischen Untersuchungen bestimmten Knochenvolumenanteils (BV / TV) betrug  $r = 0,79$  (Tibia, Femur und Wirbelsäule). Mit dem Knochenvolumenanteil in der  $\mu$ CT (Femur) zeigte sie eine Korrelation von  $r = 0,94$ . An der Diaphyse wurde die höchste Genauigkeit für das Femur bestimmt, mit einer Korrelation zum  $\mu$ CT von  $r > 0,77$ . Was die Präzision (Reproduzierbarkeit) der Messungen angeht, so wurde bei den Einzelknochen (Tibia, Femur, Wirbelsäule) unter Ex-situ-Bedingungen die höchste Präzision an der distalen Femurmetaphyse festgestellt (CV  $< 1\%$  für die Knochendichte und  $< 2\%$  für die Fläche). Die Präzision der In-vivo-Messungen betrug für die Knochendichte am distalen Femur 2,3 – 5,1 % und für die absolute und relative kortikale Fläche an der Tibia jeweils 3,1 % und 2,2 % (Schmidt et al. 2003). Diese Ergebnisse zeigen, dass mit dem pQCT die Knochen einer Maus mit einer befriedigenden Genauigkeit und Präzision charakterisiert werden können.

## 6.2. Ergebnisdiskussion

Eckstein et al. (2002a) zeigten, dass bei den Metallothionein (MT)-bGH-transgenen Mäusen der Knochenmineralgehalt (BMC) proportional zum Körpergewicht zunimmt. In der vorliegenden Studie führte die GH-Überexpression jedoch zu einem überproportionalen Anstieg von BMC im Vergleich zum Körpergewicht. Hierdurch wurde die Balance zwischen diesen beiden Faktoren durch GH zugunsten der Knochenmasse verschoben. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Befunde in beiden Studien kann man zum derzeitigen Zeitpunkt nicht geben.

Die Effekte der GH-Überexpression sind an verschiedenen Knochen unterschiedlich stark, mit der Folge eines disproportionalen skelettalen Gigantismus (Wolf et al. 1991 a,b). Die Knochenlängen bzw. -volumina von Femur, Tibia und Humerus waren in der vorliegenden Studie unter GH-Überexpression in unterschiedlichem Ausmaß vergrößert.

Rosen et al. (1995) berichteten, dass eine Behandlung mit GH und IGF-I an den Ratten zu einer Zunahme von BMC und der Knochengröße, aber zu einer Abnahme der Knochendichte führt. Auch in unserer Studie wurde an GH-transgenen Mäusen eine signifikante Dichteverminderung in der Femurmetaphyse gemessen. Diese war v. a. auf eine überproportionale Vergrößerung der Querschnittsfläche im Vergleich zu BMC zurückzuführen. Bereits früher wurde gezeigt, dass GH insbesondere bei männlichen Mäusen zu einer starken Zunahme des Knochendurchmessers führt (Tseng et al. 1996, Eckstein et al. 2002a). Die Dichteabnahme betraf v. a. das subkortikale Kompartiment, während das trabekuläre unverändert blieb, trotz einer signifikanten Vergrößerung der trabekulären Fläche.

Am Femurschaft führte die GH-Überexpression zu einem signifikanten Zuwachs des absoluten kortikalen Mineralgehalts und der Gesamtquerschnittsfläche, ohne einer Veränderung der prozentualen kortikalen Fläche. Geometrische Knochenparameter wie die kortikale Dicke, das Flächenträgheits- sowie das dichte-gewichtete Widerstandsmoment nahmen signifikant zu. Tseng et al. (1996) beobachteten, dass am Femur von Mäusen mit einer osteoblasten-spezifischen (lokalen) GH-Überexpression (Osteocalcin-Promotor) eine signifikante Zunahme der Knochengröße, insbesondere der Querschnittsfläche, nicht von einer proportionalen Zunahme der Biegefestigkeit begleitet wurde. In der genannten Studie wies der kortikale Knochen an der Diaphyse deutlich schlechtere mechanischen Eigenschaften auf und histomorphometrische Untersuchungen ergaben eine erhöhte Porosität. Die Ergebnisse dieser Studie konnten nicht direkt mit unseren verglichen werden, da es sich einmal um mechanische Testung und andermal um pQCT-Messungen handelt.

Sandstedt et al. (1994) berichteten, dass bei MT-bGH-transgenen Mäusen die männlichen Gonaden unabhängig von GH das Wachstum der Wirbelsäule in der Pubertät stimulieren und das Wachstum der Tibia bei den erwachsenen Tieren hemmen. In unserer Studie wurde eine signifikante Zunahme der Fläche und proportional dazu des BMC gemessen, so dass die Dichte unverändert blieb. An der Tibia waren Länge, Volumen und BMC signifikant erhöht, die apparente Dichte allerdings vermindert. Da die hierbei

---

untersuchten Mäuse 4 Monate alt und damit adult waren, lassen die Ergebnisse nur einen eingeschränkten Vergleich zu.

Mit den oben beschriebenen Methoden konnten wir bei den IGFBP-2-transgenen Mäusen sowohl mit als auch ohne GH-Überexpression eine Reduktion der Knochengröße und -masse, aber nicht der Dichte feststellen. Wie bei GH (Wolf et al. 1991 a,b, Eckstein et al. 2002a, b) sind die IGFBP-2-Effekte teilweise von der Skelettregion und vom Knochenkompartiment abhängig. GH übt den stärksten anabolen Effekt auf die Wirbelkörper aus (+116%), während IGFBP-2 gerade hier die geringsten Veränderungen des BMC (-5%) hervorruft. IGFBP-2 erreicht sein Wirkmaßmaximum an der Tibia (-21%), wo GH die kleinste BMC-Zunahme (+59%) bewirkte. Insgesamt konnte ein stärkerer inhibitorischer Effekt von IGFBP-2 auf die Knochengröße als auf die Knochenmasse festgestellt werden. Dies spiegelte sich in einer Zunahme der apparenten Knochendichte von Tibia und Humerus wieder.

Wie bereits erwähnt variieren GH- und IGFBP-2-Effekte zwischen den Knochenkompartimenten. Die BMC-Reduktion durch IGFBP-2 war am deutlichsten im kortikalen Bereich (Femurschaft) ausgeprägt, während die GH-Überexpression die stärkste BMC-Zunahme an der Metaphyse bedingte. Entgegen den Erwartungen führte die IGFBP-2-Überexpression zu einer Erhöhung und nicht zu einer Erniedrigung der trabekulären Dichte in der Femurmetaphyse. An den Wirbelkörpern wurden keine Veränderungen festgestellt.

IGFBP-2-Überexpression reduziert die Zunahme der Knochengröße und -masse bei gleichzeitiger GH-Überexpression. Das inhibitorische Potential von IGFBP-2 auf den anabolen Effekt von GH ist allerdings nicht überall gleich stark. So zeigte sich, dass IGFBP-2 die aufbauenden Effekte von GH an der Diaphyse vollständig antagonisieren kann, dass an der Metaphyse und den Wirbelkörpern diese hemmende Wirkung jedoch wesentlich geringer ausgeprägt ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie legen damit eine stärkere Reduktion des perichondralen Knochenwachstums als des Knochenlängenwachstums durch IGFBP-2 nahe. Im Gegensatz dazu konnte keine signifikante Reduktion der Knochendichte durch IGFBP-2-Überexpression (in An- oder Abwesenheit von GH-Überexpression) festgestellt werden.

### 6.3. Limitationen und abschließende Interpretation

Eine Einschränkung der vorliegenden Studie ist, dass nur männliche Tiere und keine weiblichen Tiere untersucht wurden. Ein Vergleich zwischen beiden Geschlechtern ist Gegenstand einer weiterführenden Untersuchung. Auch wurden anschließend erwachsene Mäuse untersucht, aber keine Tiere im späten embryonalen oder frühen postnatalen Entwicklungsstadium, so dass auf Knochenwachstumsprozesse nur annähernd zurückgeschlossen werden kann.

Unabhängig von den genannten Einschränkungen zeigt diese Studie deutlich, dass IGFBP-2 ein potenter negativer Regulator des (Knochen-) wachstums in vivo ist. Daraus lässt sich ableiten, dass die hohe Konzentration von IGFBP-2, welche bei kleinen Tieren gemessen wurde, kein Epiphänomen darstellt, sondern dass IGFBP-2 vielmehr einen wichtigen Faktor für die Wachstumsregulation darstellt.

In mehreren klinischen Studien wurde IGFBP-2 eine wichtige Rolle für den gesteigerten Knochenverlust bei der Osteoporose zugeschrieben. Diesem pathologischen Prozess liegt ein Ungleichgewicht zwischen der Knochenformation und der Knochenresorption zugrunde. Die Befunde der klinischen Studien sind jedoch widersprüchlich. Während manche Autoren eine negative Korrelation zwischen IGFBP-2-Konzentration und Knochendichte berichten (Kim et Lee 1996, Sugimoto et al. 1997), konnten andere keinen signifikanten Unterschied der IGFBP-2-Konzentration zwischen Frauen mit postmenopausaler Osteoporose (Typ I) und gesunden Frauen pre- oder postmenopausal (Nasu et al 1997, Kim et al. 1999) feststellen. Ebenso konnte bei Männern mit idiopathischer Osteoporose im Vergleich mit den gesunden Probanden kein Anstieg des IGFBP-2-Spiegels nachgewiesen werden (Johansson et al. 1997).

In unserer Studie war der prozentuale Anteil des Knochens an der Gesamtmasse bei den IGFBP-2-transgenen Mäusen leicht erhöht und die Knochendichte eher gesteigert als vermindert. Demzufolge bietet die vorliegende Studie keinen Anhalt dafür, dass IGFBP-2 am Knochenverlust bei der Osteoporose und an einem erhöhten Frakturrisiko ursächlich beteiligt ist. Da die skelettalen Veränderungen bei den IGFBP-2-transgenen Mäusen proportional zu denen des Körpergewichts waren, überschreiten die mechanischen Lasten, die auf den Knochen einwirken, seine mechanische Kompetenz bei diesen Tieren nicht. Weiterhin sollte

beim Vergleich berücksichtigt werden, dass im klinischen Alltag die Messungen von BMD beim Menschen mittels DXA (in g/cm<sup>3</sup>) erfolgen. Die so gewonnenen Werte werden durch die Knochengröße beeinflusst. So werden bei kleineren Personen, die auch entsprechend kleinere Knochen haben, niedrigere Werte für BMD gemessen (Lochmüller et al. 2000).

Die Ergebnisse der Studien am Menschen und der an der Maus scheinen im Widerspruch zueinander zu stehen. Einerseits könnte IGFBP-2 beim älteren Menschen eine andere Wirkung als bei der adulten Maus auf das Skelett ausüben. Die Betrachtung der IGFBP-3-Konzentration im Alter könnte jedoch eine weitere Erklärung für diese klinischen Beobachtungen liefern. Aus mehreren Studien geht hervor, dass IGFBP-3 mit der Knochendichte positiv korreliert und dass seine Konzentration bei Osteoporosepatienten vermindert ist (Wuster et al. 1993, Kim et Lee 1996, Sugimoto et al. 1997, Johansson et al. 1997, Kim et al. 1999, Boonen et al. 1999). Normalerweise wird IGFBP-3 im Zellinneren prozessiert und an der -oberfläche exprimiert. Dabei verstärkt es die Aktivität von IGF-I, v.a. auf der Rezeptorebene (Conover 1992, Oh et al. 1993). Die nach der Menopause beobachtete Abnahme der IGF-I- und der IGFBP-3-Konzentration könnte für die verminderte IGF-I-Verfügbarkeit im Knochen verantwortlich sein und dadurch die Osteoblastenfunktion und die Knochenformation beeinträchtigen. Ergebnisse anderer Studien lassen darauf schließen, dass IGFBP-3 an einen auf den Osteoblasten lokalisierten, spezifischen IGFBP-3-Rezeptor bindet und die Zellproliferation auf diesem Weg direkt beeinflusst (Oh et al. 1993). Demzufolge würde eine Abnahme des IGFBP-3-Spiegels unabhängig von IGF-I zu einer Reduktion der Knochenformation führen. Insgesamt könnte die Abnahme aller anabolischen Komponenten des IGF-Systems (IGF-I, IGF-II, IGFBP-3 und -5) im Alter (Typ II-Osteoporose) (Boonen et al. 1999) eine verminderte Knochenformation nach sich ziehen und dadurch das pathologische Ungleichgewicht zwischen Knochenauf- und -abbau mitverursachen. Die Abnahme der anabolen IGF-Faktoren wird v.a. durch im Alter häufig anzutreffende Unterernährung und den daraus resultierenden Proteinmangel ausgelöst. Ein Zusammenhang zwischen den Komponenten des IGF-Systems und dem Ernährungszustand wurde bereits im Kapitel 2 beschrieben. Es ist bekannt, dass die IGFBP-2-Konzentration mit zunehmendem IGFBP-3-Mangel kompensatorisch ansteigt (Zapf et al. 1990), um als ein zusätzlicher IGF-Carrier zu dienen. Aufgrund dessen könnte der in manchen Studien beobachtete Anstieg der IGFBP-2-Konzentration bei der Osteoporose eher auf einen inversen Zusammenhang

zwischen den Komponenten der GH-IGF-I-IGFBP-3-Achse und IGFBP-2 (Sugimoto et al. 1997) als auf eine direkte, kausale Funktion von IGFBP-2 zurückgeführt werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie an IGFBP-2-transgenen Mäusen unterstützen diese Hypothese.

## 7. Schlußfolgerungen

- 1) IGFBP-2-transgene Mäuse weisen eine deutliche Verminderung der Knochengröße, d.h. der Länge, des Volumens und insbesondere der Querschnittsfläche, sowie von BMC, nicht aber der Knochendichte auf. Dies zeigte sich sowohl mit als auch ohne gleichzeitige GH-Überexpression. Hieraus geht hervor, dass IGFBP-2 einerseits das Knochenwachstum negativ reguliert, dass aber andererseits erhöhte IGFBP-2-Spiegel in keinem kausalen Zusammenhang mit einer Abnahme der Knochendichte stehen. Diese Effekte zeigen sich sowohl bei normalen als auch bei supraphysiologischen GH-Konzentrationen.
- 2) IGFBP-2 reduziert signifikant den anabolen Effekt von GH auf die Knochengröße, den Mineralgehalt und die Querschnittsfläche in der Metaphyse des Femurs und in den Wirbelkörpern. An der Diaphyse zeigte sich sogar eine vollständige Aufhebung der GH-Wirkung, so dass die Doppel-transgenen Mäuse in diesem Messbereich kaum Unterschiede zu den Kontrolltieren zeigen. Die Ergebnisse zeigen, dass die anabolen Effekte der GH-Überexpression durch IGFBP-2 abhängig von der Lokalisation deutlich (metaphysär) oder sogar vollständig antagonisiert (kortikal) werden kann.
- 3) Die Wirkung einer systemisch hohen IGFBP-2-Konzentration ist von der Lokalisation und vom Knochenkompartiment abhängig. Der schwächste Effekt auf BMC wurde in der Wirbelsäule, der stärkste in der Tibia gemessen. Die deutlichste Abnahme von BMC und der Größe wurde im kortikalen Knochen beobachtet. Wir vermuten daher, dass IGFBP-2 zu einer stärkeren Reduktion des perichondralen Knochenwachstums als des Knochenlängenwachstums führt.

## 8. Zusammenfassung

Das Insulin-ähnliche-Wachstumsfaktor-Bindungsprotein (IGFBP)-2 wird als ein negativer Regulator des Knochenwachstums diskutiert. Ziel der vorliegenden Studie war die Untersuchung skelettaler Veränderungen einer IGFBP-2-Überexpression im transgenen Mausmodell sowohl in der Ab- als auch Anwesenheit von Wachstumshormon (GH)-Überexpression.

Es wurden 43 männliche Mäuse im Alter von vier Monaten untersucht (7 IGFBP-2-, 12 GH-, 10 GH/IGFBP-2-doppel-transgene Mäuse und 14 Kontrollen). Der Knochenmineralgehalt (BMC) des Gesamtskeletts sowie einzelner Knochen wurde mittels Zweiennergie-Röntgenabsorptiometrie (DXA) bestimmt. Für die Untersuchungen von trabekulärem bzw. kortikalem Kompartiment sowie geometrischen Eigenschaften des kortikalen Knochens wurde die periphere quantitative Computertomographie (pQCT) eingesetzt.

IGFBP-2-Überexpression führte zu einer signifikanten Abnahme des Körpergewichts, der Knochengröße (Länge und Volumen), des Knochenmineralgehaltes (BMC), der Querschnittsfläche sowie geometrischer Knocheneigenschaften. Dies wurde sowohl in An- als auch in Abwesenheit von GH-Überschuss nachgewiesen. Die wachstumshemmende Wirkung von IGFBP-2 war jedoch von der skelettalen Lokalisation und vom Knochenkompartiment abhängig. Dies zeigte sich insbesondere bei gleichzeitiger GH-Überexpression. In der Metaphyse und in den Wirbelkörpern reduzierte IGFBP-2 die anabole Wirkung von GH. An der Diaphyse konnten bei den Doppel-transgenen Mäusen kaum Unterschiede zu den Kontrolltieren festgestellt werden. Im kortikalen Bereich wurde der anabole Effekt von GH durch die gleichzeitige IGFBP-2-Überexpression vollständig gehemmt. Anders als erwartet konnte bei den IGFBP-2-transgenen Mäusen keine Reduktion der Knochendichte am Femur oder den Wirbelkörpern nachgewiesen werden. Vielmehr führte die IGFBP-2-Überexpression bei diesen Mäusen zu einer höheren Dichte in der Metaphyse als bei den Kontrolltieren.

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass IGFBP-2 ein potenter negativer Regulator des (Knochen-) wachstums in vivo ist, dass erhöhte IGFBP-2-Serumspiegel aber nicht zu einer Reduktion der Knochendichte führen. IGFBP-2 übt damit einen negativen Effekt auf die Knochengröße und auf den Mineralgehalt, nicht aber auf die Dichte des Knochens aus.



## 9. Literaturverzeichnis

**Andreassen TT; Jorgensen PH; Flyvbjerg A; Orskov H; Oxlund H**

Growth hormone stimulates bone formation and strength of cortical bone in aged rats.

J Bone Miner Res 10(7): 1057-67 (1995)

**Amling M, Hentz MW, Priemel M, Delling G**

Transgenic and gene knock-out animals in skeletal research.

In Novel approaches to treatment of osteoporosis. Russel RGG, Skerry TM, Kollenkirchen U, eds. Springer,

Berlin: 123-155 (1998)

**Asada N, Takahashi Y, Honjo M**

Effects of 22K or 20K Human Growth Hormone on Lipolysis, Leptin Production in Adipocytes in the Presence and Absence of Human Growth Hormone Binding Protein.

Horm Res 54(4): 203-7 (2000)

**Beamer WG, Donahue LR, Rosen CJ**

Insulin-like growth factor I and bone: from mouse to man.

Growth Horm IGF Res 10 Suppl B:103-105 (2000)

**Boonen S, Mohan S, Dequeker J, Aerssens J, Vanderschueren D, Verbeke G, Broos P, Bouillon R, Baylink DJ**

Down-regulation of the serum stimulatory components of the insulin-like growth factor (IGF) System (IGF-I, IGF-II, IGF binding protein [BP]-3, and IGFBP-5) in age-related (Type II) femoral neck osteoporosis.

J Bone Miner Res 14:2150-2158 (1999)

**Baxter RC**

Insulin-like growth factor-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities.

Am J Physiol Endocrinol Metab 278: E967-E976 (2000)

**Berelowitz M, Szabo M, Frohman LA, Firestone S, Chu L, Hintz RL**

Somatomedin-C mediates growth hormone negative feedback by effects on both the hypothalamus and the pituitary.

Science 212: 1279-1281 (1981)

**Bikle D, Majumdar S, Laib A, Powell-Braxton L, Rosen C, Beamer W, Nauman E, Leary C, Halloran B**

The skeletal structure of insulin-like growth factor I-deficient mice.

---

J Bone Miner Res 16 (12): 2320-9 (2001)

**Blum WF, Horn N, Kratzsch J, Jorgensen JOL, Juul A, Teale D, Mohnike K, Ranke MB**

Clinical studies of IGFBP-2 by radioimmunoassay.

Growth Reg 3: 100-103 (1993)

**Baxter RC, Binoux MA, Clemmons DR, Conover CA, Drop SLS, Holly JMP, Mohan S, Oh Y, Rosenfeld RG**

Recommendations for nomenclature of the insulin-like growth factor binding protein superfamily.

Endocrinology 139: 4036 (1998)

**Bauss F, Lang K, Dony C, Kling L**

The complex of recombinant human insulin-like growth factor-I (rhIGF-I) and its binding protein-5 (IGFBP-5) induces local bone formation in murine calvariae and in rat cortical bone after local or systemic administration.

Growth Horm Res 11(1):1-9 (2001)

**Chihara K, Sugimoto T**

The action of GH/IGF-I/IGFBP in osteoblasts and osteoclasts.

Horm Res 48, 5:45-9 (1997)

**Clemmons DR, Snyder DK, Busby Jr. WH**

Variables controlling the secretion of insulin-like growth factor-binding protein in normal human subjects.

J Clin Endocrinol Metab 73: 727-733 (1991)

**Conover CA, Johnstone EW, Turner RT, Evans GL, John Ballard FJ, Doran PM, Khosla S**

Subcutaneous administration of insulin-like growth factor (IGF)-II/IGF binding protein-2 complex stimulates bone formation and prevents loss of bone mineral density in a rat model of disuse osteoporosis.

Growth Horm IGF Res 12 (3): 178-83 (2002)

**Conover C**

Potentiation of insulin-like growth factor (IGF) action by IGF-binding protein-3: Studies of underlying mechanisms.

Endocrinology 130: 3139-3199 (1992)

**Degerblad M, Bengtsson BA, Brammert M, Johnell O, Manhem P, Rosen T, Thoren M**

Reduced bone mineral density in adults with growth hormone (GH) deficiency: increased bone turnover during 12 months of GH substitution therapy.

Eur J Endocrinol 133: 180-188 (1995)

**De los Rios P, Hill DJ**

Cellular localization and expression of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding proteins within the epiphyseal growth plate of the ovine fetus: possible functional implications.

Can J Physiol Pharmacol 77:235-249 (1999)

**Devlin RD, Du Z, Buccilli V, Jorgetti V, Canalis E**

Transgenic mice overexpressing insulin-like growth factor binding protein-5 display transiently decreased osteoblastic function and osteopenia.

Endocrinology 143:3955-3962 (2002)

**Donahue LR; Hunter SJ; Sherblom AP; Rosen C**

Age-related changes in serum insulin-like growth factor-binding proteins in women.

J Clin Endocrinol Metab 71(3): 575-9 (1990)

**Eckstein F, Lochmüller E-M, Koller B, Wehr U, Weusten A, Rambeck W, Hoeflich A, Wolf E**

Body composition, bone mass and microstructural analysis in GH-transgenic mice reveals that skeletal changes are specific to bone compartment and gender.

Growth Horm IGF Res 12(2): 116-25 (2002a)

**Eckstein F; Pavicic T; Nedbal S; Schmidt C; Wehr U; Rambeck W; Wolf E; Hoeflich A**

Insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGFBP-2) overexpression negatively regulates bone size and mass, but not density, in the absence and presence of growth hormone/IGF-I excess in transgenic mice.

Anat Embryol 206(1-2): 139-48 (2002b)

**Ferretti JL**

Peripheral quantitative computed tomography (pQCT) for evaluating structural and mechanical properties of small bone.

A Practical Guide for Mechanical Testing of Bone. Boca Raton: CRC Press (1998)

**Ghiron LJ, Thompson JL, Holloway L, Hintz RI, Butterfield GE, Hoffman AR, Marcus R**

Effects of recombinant insulin-like growth factor-I and growth hormone on bone turnover in elderly women.

J Bone Miner Res 10: 1844-1852 (1995)

**Gillberg P, Olofsson H, Mallmin H, Blum WF, Ljunghall S, Nilsson AG**

Bone mineral density in femoral neck is positively correlated to circulating insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein (IGFBP-3) in Swedish men.

Calcif Tissue Int 70(1): 22-9 (2002)

**Gosiewska A, Wilson S, Kwon D, Peterkofsky B**

Evidence for an in vivo role of insulin-like growth factor-binding protein-1 and -2 as inhibitors of collagen gene expression in vitamin C-deficient and fasted guinea pigs.

Endocrinology 134(3):1329-39 (1994)

**Höflich A, Lahm H, Blum W, Kolb H, Wolf E**

Insulin-like growth factor binding protein-2 inhibits cell proliferation in human embryonic kidney fibroblasts and of IGF- responsive colon carcinoma cell lines,.

FEBS Lett. 434: 329-334 (1998b)

**Höflich A, Schmidt P, Föll J, Rottmann O, Weber MM, Kolb HJ, Pirchner J, Wolf E**

Altered growth of mice divergently selected for body weight is associated with complex changes in the growth hormone/ insulin-like growth factor system.

Growth Horm IGF Res 8; 113-123 (1998a)

**Höflich A, Wu E, Mohan S, Föll J, Wanke R, Froehlich T, Arnold GJ, Lahm H, Kolb HJ, Wolf E**

Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in transgenic mice reduces postnatal body weight gain.

Endocrinology 140: 5488-5496 (1999)

**Höflich A, Nedbal S, Blum W, Erhard M, Lahm H, Brem G, Kolb HJ, Wanke R, Wolf E**

Growth inhibition in giant growth hormone transgenic mice by overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2.

Endocrinology 142: 1889-1898 (2001a)

**Hoeflich A; Reisinger R; Lahm H; Kiess W; Blum WF; Kolb HJ; Weber MM; Wolf E**

Insulin-like growth factor-binding protein 2 in tumorigenesis: protector or promoter?

Cancer Res 15; 61(24): 8601-10 (2001b)

**Hadsell DL, Greenberg NM, Fligger JM, Baumrucker CR, Rosen JR**

Targeted expression of des(1-3) human insulin-like growth factor I in transgenic mice influences mammary gland development and IGF- binding protein expression.

Endocrinology 137: 321-330 (1996)

**Hotta M, Fukada I, Sato K, Hizuka N, Shibasaki T, Takano K**

The relationship between bone turnover and body weight, serum insulin- like growth factor (IGF) I, and serum IGF- binding protein levels in patients with anorexia nervosa.

J Clin Endocrinol Metab 85: 200-6 (2000)

**Isaksson OG; Jansson JO; Gause IA**

Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly.

Science 11;216 (4551): 1237-9 (1982)

**Johansson AG, Forslund A, Hambraeus J, Blum WF, Ljunghall S**

Growth hormone dependent insulin-like growth factor binding protein is a major determinant of bone mineral density in healthy men.

J Bone Miner Res 9: 915-921 (1994)

**Johansson AG, Lindh E, Ljunghall S**

Insulin-like growth factor I stimulates bone turnover in osteoporosis.

Lancet 339: 1619 (1992)

**Johannsson G, Bengtsson BA**

Growth hormone and the acquisition of bone mass.

Horm Res 48 Suppl 5:72-77 (1997)

**Jehle PM, Ostertag A, Schulten K, Schulz W, Jehle DR, Stracke S, Fiedler R, Deuber HJ, Keller F, Boehem BO, Baylink DJ, Mohan S**

Insulin-like growth factor system components in hyperparathyroidism and renal osteodystrophy.

Kidney Int 57: 423-436 (2000)

**Jilka RL, Weinstein RS, Takahashi K, Parfitt AM, Manolagas SC**

Linkage of decreased bone mass with impaired osteoblastogenesis in a murine model of accelerated senescence.

J Clin Invest 97(7): 1732-40 (1996)

**Jones JL, Gockerman A, Busby Jr WH, Camacho-Hubner C, Clemmons DR**

Extracellular matrix contains insulin-like growth factor-binding protein-5: potentiation of the effects of IGF-I.

Cell Biol 121: 679-687 (1993)

**Jones JL, Clemmons DR**

Insulin-like growth factor and their binding proteins: biological actions.

Endocr Rev 16(1):3-34 (1995)

**Johansson AG, Baylink DJ, Ekenstam AF, Lindh E, Mohan S, Ljunghall S**

Circulating levels of insulin-like growth factor-I and -II, and IGF-binding protein-3 in inflammation and after parathyroid hormone infusion.

---

Bone Miner 24: 25-31 (1994)

**Jonsson KB, Wiberg K, Ljunghall S, Ljunggren O**

Insulin-like growth factor I does not stimulate bone resorption in cultured neonatal mouse calvarial bones.  
Calcif Tissue Int 59: 366-370 (1996)

**Kassem M, Blum W, Ristelle J, Mosekilde L, Eriksen EF**

Growth hormone stimulates proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells in vitro.  
Calcif Tissue Int 52: 222-226 (1993)

**Kasukawa Y, Baylink DJ, Wergedal JE, Amaar Y, Srivastava AK, Guo R, Mohan S**

Lack of Insulin-like growth factor I exaggerates the effect of calcium deficiency on bone accretion in mice.  
Endocrinology 144 (11): 4682-9 (2003)

**Kim JG, Shin CS, Choi YM, Moon SY, Kim SY, Lee JY**

The relationship among circulating insulin-like growth factor components, biochemical markers and bone mineral density in postmenopausal women under the age of 60.  
Clinical Endocrinology 51: 301-307 (1999)

**Kim JG et Lee JY**

Serum insulin-like growth factor binding protein profiles in postmenopausal women: Their correlation with bone mineral density.  
Am J Obstet Gynecol 174: 1511-7 (1996)

**van Kleffens M, Groffen C, Rosato RR, van den Eijnde SM, van Neck JW, Lindenberg- Kortleve DJ, Zwarthoff EC**

Drop SLS mRNA expression patterns of the IGF system during mouse limb bud development: determined by whole mount in situ hybridisation.  
Mol Cell Endocrinol 138: 151-161 (1998)

**Klein RF, Mitchell SR, Phillips TJ, Belknap JK, and Orwell ES**

Quantitative trait loci affecting peak bone mineral density in mice.  
J Bone Miner Res 13: 1648-1656 (1998)

**Kopchick JJ, Andry JM**

Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction.  
Molecular Genetics and Metabolism 71: 293-314 (2000)

**Li XJ, Müller R, Stevens ML, Golden J, Seeherman H, Bouxsein ML**

Evaluation of trabecular bone morphometry: Comparison of micro-computed tomography and histomorphometry.

Bone 23: 59-66 (1998)

**Liu JP; Baker J; Perkins AS; Robertson EJ; Efstratiadis A**

Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r).

Cell 75(1): 59-72 (1993)

**Liu JL, LeRoith**

Insulin-like growth factor I is essential for postnatal growth in response to growth hormone.

Endocrinology 140: 5178-5184 (1999)

**Lesse GP, Fraser WD, Farquharson R, Hipkin L, Vora JP**

Gonadal status is an important determinant of bone density in acromegaly.

Clin Endocrinol Oxf 48: 59-65 (1998)

**Lochmüller EM, Miller P, Bürklein D, Wehr U, Rambeck W, Eckstein F**

In situ femoral dual-energy X-ray absorptiometry related to ash weight, bone size and density, and its relationship with mechanical failure loads of the proximal femur.

Osteoporosis Int 11: 361-367 (2000)

**Lochmüller EM, Jung V, Weusten A, Wehr U, Wolf E, Eckstein F**

Precision of high-resolution dual energy X-ray absorptiometry measurements of bone mineral status and body composition in small animal models.

European cells and materials 1: 43-51 (2001)

**Michell NP, Langman MJ, Eggo MC**

Insulin-like growth factors and their binding proteins in human colonocytes: preferential degradation of insulin-like growth factor binding protein-2 in colonic cancers.

Br J Cancer 76: 60-66 (1997)

**Mathews LS, Hammer RE, Behringer RR, D'Ercole AJ, Bell GI, Brinster RL, Palmiter RD**

Growth enhancement of transgenic mice expressing human insulin-like growth factor I.

Endocrinology 123: 2827-2833 (1988)

**McCarthy TL; Casinghino S; Centrella M; Canalis E**

Complex pattern of insulin-like growth factor binding protein expression in primary rat osteoblast enriched cultures: regulation by prostaglandin E2, growth hormone, and the insulin-like growth factors.

J Cell Physiol 160(1): 163-75 (1994)

**McCarthy TL; Ji C; Casinghino S; Centrella M**

Alternate signaling pathways selectively regulate binding of insulin-like growth factor I and II on fetal rat bone cells.

J Cell Biochem 68(4): 446-56 (1998)

**Miyakoshi N, Richman C, Qin X, Baylink DJ, Mohan S**

Effects of recombinant insulin-like growth factor-binding protein-4 on bone formation parameters in mice.

Endocrinology 140: 5719-5728 (1999)

**Miyakoshi N, Qin X, Kasukawa Y, Richman C, Sriwastava AK, Baylink DJ, Mohan S**

Systemic administration of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 (IGFBP-4) increases bone formation parameters in mice by increasing IGF bioavailability via an IGFBP-4 protease-dependent mechanism.

Endocrinology 142(6): 2641-8 (2001)

**Mohan S**

Insulin-like growth factor binding proteins in bone cell regulation.

Growth Regul 3:67-70 (1993)

**Mohan S, Baylink DJ**

Insulin-like growth factor system components and the coupling of bone formation to resorption.

Horm Res 45 (1): 59-62 (1996)

**Mohan S, Baylink DJ**

IGF system components and their role in bone metabolism.

In: Rosenfeld RG, Roberts Jr. CT (eds.) The IGF System. Humana Press Totowa, New Jersey (1999)

**Mohan S, Richman C, Guo R, Amaar Y, Donahue LR, Wergedal J, Baylink DJ**

Insulin-like growth factor regulates peak bone mineral density in mice by both growth hormone-dependant and -independent mechanisms.

Endocrinology 144 (3): 929-36 (3) (2003)

**Muller R, Van Campenhout H, Van Damme B, Van Der Perre G, Dequeker J, Hildebrand T, Ruegsegger P**



---

Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography.

Bone 23(1): 59-66 (1998)

**Nakaoka D; Sugimoto T; Kaji H; Kanzawa M; Yano S; Yamauchi M; Sugishita T; Chihara K**

Determinants of bone mineral density and spinal fracture risk in postmenopausal Japanese women.

Osteoporos Int 12(7): 548-54 (2001)

**Nasu M, Sugimoto T, Chihara M, Hiraumi M, Kurimoto F, Chihara K**

Effect of natural menopause on serum levels of IGF-I and IGF-binding proteins: relationship with bone mineral density and lipid metabolism in perimenopausal women.

Eur J of Endocrinology 136: 608-616 (1997)

**Nagy TR, Clair AL**

Precision and accuracy of dual-energy X-ray absorptiometry for determining in vivo body composition of mice.

Obes Res 8(5):392-8 (2000)

**Oh Y; Muller HL; Lee DY; Fielder PJ; Rosenfeld RG**

Characterization of the affinities of insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins 1-4 for IGF-I, IGF-II, IGF-I/insulin hybrid, and IGF-I analogs.

Endocrinology 132(3): 1337-44 (1993)

**Ohlsson C, Bengtsson BA, Isaksson OG, Andreassen TT, Słotweg MC**

Growth hormone and bone.

Endocrine Reviews 19: 55-79 (1998)

**Ohlsson C, Jansson JO, Isaksson O**

Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on body growth and adult bone metabolism.

Curr Opin Rheumatol 12:346-348 (2000)

**Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S**

Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions.

Endocr Rev 18: 801-831 (1997)

**Richman C, Baylink DJ, Lang K, Dony C, Mohan S**

Recombinant human insulin-like growth factor-binding protein-5 stimulates bone formation parameters in vitro and in vivo.

Endocrinology 140: 4699-4705 (1999)

**Rosen CJ; Donahue LR; Hunter SJ**

Insulin-like growth factors and bone: the osteoporosis connection.

Proc Soc Exp Biol Med 206(2): 83-102 (1994)

**Rosen HN, Chen V, Citadini A, Greenspan SL, Douglas PS, Moses AC, Beamer WG**

Treatment with growth hormone and IGF-I in growing rats increase bone mineral content but not bone mineral density.

J Bone Miner Res 10: 1352-1358 (1995)

**Rosen CJ (2000)**

Pathophysiology of osteoporosis.

Clin Lab Med 20(3):455-68. Review

**Schmidt C, Priemel M, Kohler T, Weusten A, Müller R, Amling M, Eckstein F**

Precision and accuracy of peripheral quantitative computed tomography (pQCT) in the mouse skeleton compared with histology and microcomputed tomography (microCT).

J Bone Miner Res 18 (8): 1486-96 (2003)

**Sandstedt J, Ohlsson C, Norjavaara E, Nilsson J, Tornell J**

Disproportional bone growth and reduced weight gain in gonadectomized male bovine growth hormone transgenic and normal mice.

Endocrinology 135(6): 2574-80 (1994)

**Sugimoto T, Nishiyama K, Kuribayashi F, Chihara K**

Serum levels of insulin-like growth factor (IGF) I, IGF-binding protein (IGFBP)-2 and IGFBP-3 in osteoporotic patients with and without spinal fracture.

J Bone Miner Res 12: 1272-1279 (1997)

**Steinke B, Patwardhan AG, Havey RM, King D**

Human growth hormone transgene expression increases the biomechanical structural properties of mouse vertebrae.

Spine 24 (1): 1-4 (1999)

**Stewart CEH, Rotwein P**

Growth, differentiation and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factor.

Physiol Rev 76: 1005-1026 (1996)

**Sjorgen K, Liu JL, Blad K, Skrtic S, Vidal O, Wallenius V, LeRoith D, Tornell J, Isaksson OG, Jansson JO, Ohlsson C**

Liver- derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice.

Proc Natl Acad Sci USA 96: 7088-7092 (1999)

**Thoren M, Hilding A, Brismar T, Magnusson P, Degerblad M, Larsson L, Saaf M, Baylink DJ, Mohan S**

Serum levels of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP)-4 and -5 correlate with bone mineral density in growth hormone (GH)- deficient adults and increase with GH replacement therapy.

J Bone Miner Res 13: 891-899 (1998)

**Tseng KF, Bonadio JF, Stewart TA, Baker AR, Goldstein SA**

Local expression of human growth hormone in bone results in impaired mechanical integrity in the skeletal tissue of transgenic mice.

J Orthop Res 14(4): 598-604 (1996)

**Woods, KA., Camacho- Hubner, C., Savage, MO., Clark, AJ.**

Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene.

N Engl J Med 335:1363-1367 (1996)

**Wuster C, Blum WF, Schlemilch S, Ranke MB, Ziegler R**

Decreased serum levels of insulin-like growth factors and IGF binding protein 3 in osteoporosis.

J Intern Med 234: 249-255 (1993)

**Whyte MP**

Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization.

Endocr Rev 15: 439-461 (1994)

**Wolf E, Rapp K, Brem G**

Expression of metallothionein-human growth hormone fusion genes in transgenic mice results in disproportionate skeletal gigantism.

Growth Dev Aging 55:117-127 (1991a)

**Wolf E, Rapp K, Wanke R, Hermanns W, Pirchner F, von Butler-Wemken I, Brem G**

Growth characteristics of metallothionein-human growth hormone transgenic mice as compared to mice selected for high eight-week body weight and unselected controls. II. Skeleton.

---

Growth Dev Aging 55:237-248 (1991b)

**Wolf E, Kahnt E, Ehrlein J, Hermanns W, Brem G, and Wanke R**

Effects of long-term elevated serum levels of growth hormone on life expectancy of mice: lessons from transgenic animal models.

Mech Ageing Dev: 68: 71-87 (1993)

**Wolf E, Jehle PM, Weber MM, Sauerwein H, Daxenberger A, Breier BH, Besenfelder U, Frenyo L, Brem G**

Human insulin-like growth factor-I produced in the mammary glands of transgenic rabbits: yield, receptor binding, mitogenic activity, and effects on IGF- binding proteins.

Endocrinology 138: 307-313 (1997)

**Wolf E, Lahm H, Wu M, Wanke R, Höflich A**

Effects of IGFBP-2 overexpression in vitro and in vivo.

Pediatr Nephrol 14: 572-578 (2000)

**Yakar S, Rosen CJ**

From mouse to man: redefining the role of insulin-like growth factor-I in acquisition of bone mass.

Exp Biol Med (Maywood) 228(3): 245-52

**Zapf J, Schmid C, Guler HP, Waldvogel M, Hauri C, Futo E, Hossenlopp P, Froesch ER**

Regulation of binding proteins for insulin-like growth factors (IGF) in humans. Increased expression of IGF binding protein 2 during IGF treatment of healthy adults and in patients with extrapancreatic tumor hypoglycemia.

J Clin Invest 86(3): 952-61 (1990)

**Zhang M, Xuan S, Bouxsein ML, von Stechow D, Akeno N, Faugere MC, Malluche H, Zhao G, Rosen CJ, Efsaeridis A, Clemens TL**

Osteoblast-specific knockout of the insulin-like growth factor (IGF) receptor gene reveals an essential role of IGF signaling in bone matrix mineralization.

J Biol Chem 277 (46): 44005-12 (2002)

## 10. Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. Felix Eckstein für die Überlassung des Themas und die tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken. Seine Tür stand stets für neue Ideen und Vorschläge offen, und er nahm sich stets Zeit zur konstruktiven Besprechung meiner Fragen. Zudem gab er mir die wichtige Möglichkeit, die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit auf Kongressen und in Fachzeitschriften zu präsentieren.

Bei Herrn Prof. Dr. Putz, Vorstand der Anatomischen Anstalt München, möchte ich mich für die Unterstützung bei der Arbeit in seinem Institut bedanken.

Für die Bereitstellung der Mäuse sowie für die hervorragende Kooperation danke ich Herrn Prof. Dr. Ekard Wolf, Herrn Dr. Andreas Höflich und Frau Dr. Sabine Nedbal, am Institut für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie des Genzentrums der LMU München.

Der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) und der Firma Stratec Pforzheim habe ich die Bereitstellung der technischen Infrastruktur zu verdanken.

Des weiteren möchte ich mich bei Frau Dr. Corinna Schmidt und Herrn Dr. Volker Kuhn für ihre Hilfe und Anregungen sowie für die Beantwortung vieler, insbesondere technischer Fragen bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Stefan Klemm für seine tatkräftige Unterstützung, geduldige Erklärungen über das Wesen eines Computers und nicht zuletzt für das Ertragen meiner Launen in dieser Zeit. Er hat es immer wieder geschafft, mich aufzumuntern und mich aufs neue zu motivieren.

Vom ganzen Herzen danke ich meinen Eltern, die mir mein Studium und damit die Entstehung dieser Promotionsarbeit durch ihre Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Liebe ermöglicht haben.

## 11. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Tatjana Pavicic  
 Geburtsdatum: 17. April 1977  
 Geburtsort: Derventa (Bosnien)

### Ausbildung:

1997-2003	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
August 1999	ärztliche Vorprüfung
August 2000	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
September 2002	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
November 2003	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
1993-1997	Gymnasium Tegernsee math.-naturwissenschaftlicher Zweig Abschluss: Allgemeine Hochschulreife Städt. Gymnasium, Derventa (Bosnien)
1983-1991	Grundschule Zeravac (Bosnien)

### Vortrag auf wissenschaftlichen Kongressen:

„Osteologie 2001“, Gemeinschaftsveranstaltung der DGO, CRHUKS, OGO und ÖGEKM,  
 Wiesbaden, 5. – 7. April 2001

Abstract: “IGFBP-2 overexpression negatively regulates bone growth in vivo and suggests growth hormone action via local IGF”. Osteologie 10 (Suppl 1), FV 8.5: 93

### Mitautorschaft bei folgender Originalarbeit:

Insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGFBP-2) overexpression negatively regulates bone size and mass, but not density, in the absence and presence of growth hormone/IGF-I excess in transgenic mice. Anat Embryol 206(1-2): 139-48 (2002)