

---

Aus der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Univ. Prof. Dr. med. R. Putz

---

**Nichtinvasive Analyse der Knochenmasse und –dichte  
am Modell der Wachstumshormon-transgenen Maus –  
Reproduzierbarkeit und longitudinale Messung in vivo mit  
hochauflösender Zweienergie-Röntgen-Absorptiometrie (DXA)**

Dissertation  
Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Axel Julius Weusten  
aus  
München  
2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. F. Eckstein

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. W. Plitz

Prof. Dr. L. J. Wurzinger

Dekan : Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung. 27. 04. 2006

---

1. Einleitung.....	4
2. Theoretische Grundlagen und Literaturübersicht.....	5
2.1. Das humane Wachstumshormon (hGH).....	5
2.1.1. Physiologische Regulation von Wachstumshormon.....	6
2.1.2. Das Somatotropin .....	6
2.1.3. Das Somatostatin .....	6
2.1.4. Der Wachstumshormonrezeptor .....	7
2.1.5. Insulin like Growth Factors (IGF-I; IGF-II).....	7
2.1.6. Wirkung des Wachstumshormons auf das Fettgewebe.....	8
2.1.7. Wirkung des Wachstumshormons auf das Muskelgewebe .....	9
2.1.8. Wirkung des Wachstumshormons auf das Knochengewebe.....	10
2.1.9. Wachstumshormonmangel und Wirkung auf den Knochen .....	11
2.1.10. Wachstumshormonüberschuss und Wirkung auf den Knochen.....	13
2.2. Densitometrische Verfahren.....	15
2.2.1. Zweienergie-Röntgen-Absorptiometrie – (DXA).....	15
2.2.2. Anwendung der DXA bei Versuchstieren.....	16
2.3. Transgene Versuchstiere.....	19
2.3.1. Charakterisierung Wachstumshormon (GH) – transgener Versuchstiere.....	20
3. Fragestellung.....	27
4. Material und Methoden .....	28
4.1. Die Messapparatur (DXA - Gerät) .....	28
4.2. Versuchstiere.....	30
4.3. Querschnittstudie.....	30
4.4. Longitudinale Studie.....	32
5. Ergebnisse.....	33
5.1. Messgeschwindigkeit.....	33
5.2. Technische Präzision .....	33
5.3. Biologische Variabilität .....	35
5.4. Querschnittstudie - Ganzkörpermessung .....	35
5.5. Querschnittstudie – Messung des Femurs.....	38
5.6. Longitudinale Studie.....	41
6. Diskussion.....	46
6.1. Methodikdiskussion.....	47
6.2. Diskussion der Befunde.....	50
6.2.1. Diskussion der Querschnittstudie .....	50
6.2.2. Diskussion der Befunde am Femur.....	51
6.2.3. Diskussion der longitudinalen Studie .....	53
6.3. Wachstumshormon und Osteoporose beim Menschen.....	56
6.4. Schlussfolgerungen.....	58
7. Zusammenfassung.....	59
8. Literaturverzeichnis.....	61
9. Danksagung.....	68
10. Lebenslauf.....	69

## 1. Einleitung

In der postnatalen Entwicklung des Skelettsystems spielt das von der Hypophyse sezernierte Wachstumshormon (Growth Hormone - GH) eine bedeutende Rolle. Es hat entscheidenden Einfluss insbesondere auf das Längenwachstum der Knochen, die Skelettreifung und die Knochenmasse (Isaksson et al. 1982; Johannsson und Bengtsson 1997; Marcus 1997; Rosen und Wüster 2003). Dieser Einfluss konnte auch unter Schwerelosigkeit bei Untersuchungen an heranwachsenden Ratten im Weltraum gezeigt werden, also unabhängig von der biomechanischen Krafteinwirkung durch das erhöhte Körpergewicht auf den Knochen (Turner et al. 1995). Nach dem Schluss der Epiphysenfugen ist GH auch von grosser Bedeutung für den Erhalt der Knochenmasse (Inzucchi und Robbins 1994; Wüster et al. 2001). Diese Wirkung ist zum einen direkt durch Stimulation der GH-Rezeptoren (GHR) der Osteoblasten und möglicherweise auch der Osteoklasten zu erklären, zum anderen indirekt durch Stimulation von IGF (Insulin like growth factor, Wüster et al. 2001).

Bei einem Fehlen von GH kommt es sowohl beim Menschen als auch im Tierversuch zu einem eingeschränkten Längenwachstum, zu einer Reduktion der Knochendichte im Sinne eines verminderten Knochenmineralgehaltes und gehäuft zu Frakturen (Jansson et al. 1982; Hyer et al. 1992; Johannsson und Bengtsson 1997; Geusens und Boonen 2002). Ein Mangel an GH soll auch in vielen Fällen der senilen Osteoporose Typ II vorliegen, so dass die Gabe von GH als mögliches Therapeutikum bei osteoporotischen Erkrankungen diskutiert wird (Geusens und Boonen 2002; Gillberg et al. 2002; Landin-Wilhelmsen et al. 2003). Im Gegensatz zu den meisten Medikamenten gegen Osteoporose, welche lediglich die Knochenresorption hemmen, hat das GH die Eigenschaft, die Knochenformation zu erhöhen (Marcus 2000; Rosen and Bilezikian 2001; Landin-Wilhelmsen et al. 2003).

Auch bei anderen Erkrankungen, die das Skelettsystem betreffen, spielt GH eine bedeutende Rolle. Bei GH-Überschuss, z.B. bei Vorliegen eines Hypophysenadenoms, findet sich vor Schluss der Epiphysenfuge ein Gigantismus. Tritt das Adenom mit dem entsprechenden GH-Überschuss im Erwachsenenalter auf, so kommt es zum Krankheitsbild der Akromegalie, welche durch eine Vergrösserung der inneren Organe und der Extremitäten (Akren) charakterisiert ist. Hinsichtlich der Knochenqualität bei Akromegalie gibt es in der Literatur jedoch widersprüchliche Angaben, welche von erniedrigter über unveränderter bis hin zu erhöhter Knochenmasse und -dichte reichen (Halse et al. 1981; Ho et al. 1992; Hübsch et al.

1993; Kotzmann et al. 1993; Jockenhövel et al. 1996; Kayath und Vieira 1997; Bolanowski et al. 2000; Ueland et al. 2002; Scillitani et al. 2003).

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Auswirkungen hoher GH-Spiegel auf das Skelettsystem zu analysieren. Eine herausragende Bedeutung hat hier die In-vivo-Analyse transgener Tiere, in denen einzelne Gene spezifisch überexprimiert oder ganz ausgeschaltet werden können (Rossant und Nagy 1995; Wynshaw-Boris 1996; McCauley 2001; Priemel et al. 2002), um die Funktion dieser Gene zu untersuchen. Als Modell eignet sich die GH-transgene Maus, in welcher supraphysiologische Serumkonzentrationen an GH vorliegen (Palmiter et al. 1982; Wolf et al. 1993). Bei der Überexprimierung dieses Genes treten zudem keine immunologischen Probleme auf, wie es bei der externen Gabe eines Genproduktes einer anderen Spezies zu erwarten wäre.

## **2. Theoretische Grundlagen und Literaturübersicht**

### **2.1. Das humane Wachstumshormon (hGH)**

Das humane Wachstumshormon (human Growth Hormone – hGH) wird in der Adenohypophyse gebildet und besteht aus 191 Aminosäuren. Die chemische Struktur des GHs wurde erstmals von Li und Dixon (1971) entschlüsselt. Beim Menschen wurden zwei GH-Gene identifiziert, welche in der Plazenta (hGH-V) und in der Hypophyse (hGH-N) exprimiert werden. Beide Gene befinden sich auf dem langen Arm von Chromosom 17 (17q22-q24). Ungefähr 90% der Plasmakonzentration entfallen auf die sog. 22-K-Form (22 kD), 10% auf eine durch Splicing entstehende Variante mit 20 kD, die jedoch weniger wirksam ist. Innerhalb von 24 Stunden synthetisiert die Hypophyse etwa 1-3 mg an GH (Carrel und Allen 2000; Wüster et al. 2001). Die Ausschüttung des Somatotropen Hormones erfolgt pulsatil, d.h. einer kurzen Ausschüttung in Intervallen von ca. 3 Stunden folgen längere Sekretionspausen. Die konstanteste Ausschüttung erfolgt 30-90 Minuten nach Beginn des Schlafes. Insgesamt 2/3 der Sekretion innerhalb von 24 Stunden finden während der Schlafperiode statt. Die Halbwertszeit des GHs liegt bei 15-20 Minuten (Wüster et al. 2001). Im Säuglingsalter und während der Pubertät ist sowohl die Amplitude als auch die Gesamtsekretion deutlich erhöht und nimmt beim Erwachsenen bis zum Senium kontinuierlich ab (Rudman et al. 1981; Wüster 2001).

### **2.1.1. Physiologische Regulation von Wachstumshormon**

Die physiologische Regulation von GH unterliegt komplexen Regelkreisen, die bereits embryonal vorhanden sind (Wüster et al. 2001). Die Sekretion wird massgeblich durch die Balance zwischen dem Somatokrinin (GHRH, Growth Hormone Releasing Hormone) und dem Somatostatin (GHRH, Growth Hormone Release Inhibiting Hormone) bestimmt. Endokrine Einflüsse auf die GH-Sekretion bestehen ausserdem durch die Schilddrüsenhormone, Nebennierenrindensteroiden und die gonadalen Steroide. Das Schilddrüsenhormon hat einen stimulierenden Effekt sowohl auf die Synthese als auch auf die Sekretion von GH. Die Rolle der Nebennierensteroiden ist bislang noch unklar, sie scheinen jedoch keinen konsistenten Einfluss auf die GH-Synthese zu haben. Der Angriffspunkt der Sexualsteroiden liegt vermutlich sowohl auf hypothalamischer als auch auf hypophysärer Ebene und ist für die geschlechtsspezifischen Unterschiede des GH-Sekretionsmusters verantwortlich. Allerdings sind diese Unterschiede je nach Spezies sehr verschieden ausgeprägt und beim Menschen vergleichsweise moderat (Wüster et al. 2001; Felig und Frohmann 2001).

### **2.1.2. Das Somatokrinin**

Das Somatokrinin (GHRH) ist ein Peptidhormon aus 44 Aminosäuren, das vorzugsweise im Nucleus arcuatus des Hypothalamus gebildet wird und über die Axone dieser Zellen in den hypothalamisch-hypophysären Portalkreislauf eingeschleust wird. Die Synthese des GHs wird durch eine erhöhte Gen-Transkription angehoben. GHRH steigert die Menge an GH, welche pro pulsatiler Sekretion ins Blut sezerniert wird. Sowohl das cholinerge als auch das adrenerge- dopaminerge Neurotransmitter-System wirken modulierend auf das hypothalamisch-hypophysäre System. Andere Stimulatoren der GH-Sekretion sind Hypoglykämie, Proteinmangel, Stress (physisch und psychisch), sowie  $\alpha$ -adrenerge Agonisten,  $\beta$ -adrenerge Antagonisten und Dopamin-Agonisten (Spinas und Fischli 2001). Deren genauer Wirkmechanismus ist jedoch meist nicht exakt geklärt (Wüster et al. 2001; Felig und Frohmann 2001).

### **2.1.3. Das Somatostatin**

Das Somatostatin (GHRH) ist ein Peptidhormon aus 14 Aminosäuren, das vorwiegend in den periventriculären Regionen des Hypothalamus gebildet wird. Seine Synthese ist jedoch an zahlreichen Stellen des Nervensystems, sowie in den Inselzellen der Pankreas und im

Gastrointestinaltrakt nachweisbar. Seine Wirkung liegt sowohl in der direkten Inhibition der spontanen pulsatilen Sekretion des GHs, als auch indirekt in der Inhibition der GHRH stimulierten Sekretion der somatotrophen Zellen (Wüster et al. 2001). Das GH selbst wirkt über einen negativen Feedback Mechanismus hemmend auf die Sekretion von GHRH. Daneben können Hyperglykämie, erhöhte Fettsäuren im Blut,  $\alpha$ -adrenerge Antagonisten,  $\beta$ -adrenerge Agonisten und Dopamin-Antagonisten die Sekretion inhibieren (Spinas und Fischli 2001).

#### **2.1.4. Der Wachstumshormonrezeptor**

Das GH entfaltet seine Wirkung zum einen durch spezifische Bindung an den Wachstumshormonrezeptor (GHR) der Zielzelle. Dieser gehört zur Superfamilie der Zytokinrezeptoren und ca. 15 - 35% des zirkulierenden GHs sind im Plasma an ihn gebunden. Eine modifizierte Form des GHR stellen die GH-Bindungsproteine dar (GHBP). Ihre Funktion ist noch nicht endgültig geklärt. Durch eine GHR vermittelte Kaskade von Proteinphosphorylierungen wird die Aktivierung von nukleären Proteinen und Transkriptionsfaktoren ausgelöst (Ohlsson et al. 1998). Die Wirkung des GHs auf den menschlichen Organismus erfolgt nicht nur durch den GHR-Komplex, sondern auch indirekt über Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren (IGF = Insulin-like growth factor; Felig und Frohmann 2001).

#### **2.1.5. Insulin like Growth Factors (IGF-I; IGF-II)**

IGF-I ist ein basisches Peptid aus 70 Aminosäuren, das zu ca. 40% mit dem Proinsulin übereinstimmt. Der früher verwendete Name Somatomedin wird aufgrund dieser Strukturähnlichkeit nicht mehr verwendet. Die vielfältigen Wirkungen des IGF-I im Stoffwechsel sind zum Teil auch auf diese Ähnlichkeit zurückzuführen. Dazu gehören unter anderem die Stimulation des Kohlenhydratstoffwechsels, der Proteinsynthese und der zellulären Glukoseaufnahme, die Stimulation der DNA- und RNA-Synthese und der zellulären Differenzierung als auch die Zunahme der Erythropoese, des renalen Blutflusses und des longitudinalen Knochenwachstums. Im Blut kommt IGF-I nur in geringer Konzentration in freier Form vor, etwa 99% liegt an Bindungsproteine (IGFBP = IGF Binding Protein) gekoppelt vor. IGF-I wird in einer Vielzahl von Geweben gebildet und mit autokriner oder parakriner Wirkung sezerniert. Der grösste Anteil wird jedoch von der Leber synthetisiert (Feld und Hirschberg 1996; Ohlsson et al. 1998; Wüster et al. 2001). Über einen

negativen Feedback-Mechanismus hemmt IGF-I die Synthese und Sekretion des GHs. Die Tatsache, dass sowohl das GH als auch IGF-I das longitudinale Wachstum der Knochen stimulieren, wirft die Frage auf, welche Wirkungsweise die bedeutendere ist. Die klassische „Somatomedin-Hypothese“ geht davon aus, dass die Wirkung des GHs massgeblich über das in der Leber gebildete IGF-I vermittelt wird (Daughaday 1981). Die Zweifaktoren-Theorie postuliert jedoch eine getrennte Wirkung beider Hormone (Green et al. 1985, Ohlsson et al. 1998).

Die systemische Verabreichung von GH und IGF-I bei hypophysektomierten Ratten zeigte, dass beide Hormone unabhängige und unterschiedliche Wirkungen haben (Clark et al 1994; Fielder et al. 1996). Wurden beide Hormone, GH und IGF-I, zusammen verabreicht, konnten synergistische Effekte beobachtet werden (Clark et al 1994; Hazel et al. 1994). Bei der Überexpression von GH bzw. IGF-I in Abwesenheit des jeweils anderen Hormons, wuchsen jedoch die GH stimulierten Versuchstiere auf die doppelte Körpergrösse an, während die IGF-I überexprimierten Tiere lediglich eine normale Grösse erreichten (Palmiter et al. 1982; Behringer et al. 1990; Ohlsson et al. 1998).

### **2.1.6. Wirkung des Wachstumshormons auf das Fettgewebe**

Die Effekte des GHs sind vielschichtig und abhängig von der metabolischen Grundsituation und dem entsprechenden hormonellen Milieu. GH beeinflusst sowohl die Entwicklung als auch die metabolischen Prozesse in den Adipozyten (Carrel und Allen 2000). GHR und die Expression der GHR-mRNA konnten in Praeadipozyten Kulturen und in reifen Adipozyten nachgewiesen werden, bei letzteren jedoch wesentlich stärker (Carrel und Allen 2000). In Zellkulturen von Adipozyten-Vorläufer-Zellen stimulierte das GH die Proliferation dieser unreifen Zellen und reduzierte deren Differenzierung zu reifen Adipozyten (Richelsen 1997). Darüber hinaus induziert es die Bildung von IGF-I, welches im Fettgewebe in höherer Konzentration anzutreffen ist als in anderen Geweben (Richelsen et al. 1994). Während GH sowohl direkt als auch über IGF-I den Fettstoffwechsel beeinflusst, ist die genaue biologische Rolle des im Fettgewebe produzierten IGF-I noch nicht hinreichend bekannt. GH inhibiert die für die Verstoffwechslung der Triglyzeride erforderliche Lipoprotein-Lipase und stimuliert die Hydrolyse der Triglyzeride in Glycerol und freie Fettsäuren, sowie die Fettoxidation (Raben und Hollenberg 1959; Richelsen 1997). Es fördert den Transport der freien Fettsäuren zur Leber und verhindert deren Rück-Veresterung (Goodman 1968). Gleichzeitig wird die Hormon-Sensitive-Lipase (HSL), die den limitierenden Schritt für die Freisetzung der gespeicherten Triglyzeride darstellt, zur Lipolyse angeregt (Carrel und Allen 2000).

Rudman et al. (1981) wiesen bereits auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Abnahme der GH-Sekretion im späteren Erwachsenenalter und der Zunahme des Körperfettanteils hin. Bengtsson und Johannsson (1998) konnten über erste therapeutische Erfolge einer balancierten Therapie mit GH bei Fettstoffwechselerkrankungen mit vermehrter Fettspeicherung (sog. Metabolisches Syndrom X) berichten. Auch Asada et al. (2000) konnten den starken lipolytischen Charakter des GHs in einer Zellkultur mit Adipozyten bestätigen, stellten jedoch eine Abschwächung dieses Effektes durch das GH-Bindungsprotein (GHBP) fest.

### **2.1.7. Wirkung des Wachstumshormons auf das Muskelgewebe**

Sowohl mit In-vitro-Studien als auch mit In-vivo-Studien wurden die Auswirkungen des GHs auf den Muskel eingehend untersucht. Wurde hypophysectomierten Tieren GH verabreicht, so konnte ein deutlicher Anstieg des Muskelgewichts, des Protein- und RNA-Gehaltes, der Ribosomen und aller beteiligter Enzyme in der Muskelzelle nachgewiesen werden (Florini et al. 1996). GH stimulierte den Aminosäuretransport und deren Aufnahme in die Zelle und steigerte auf diesem Weg die Muskelprotein-Synthese (Florini et al. 1996). Es begünstigt damit einerseits die Retention von Phosphat und trägt so zur Aufrechterhaltung der zellulären ATP Homöostase bei, andererseits erhöht es die Stickstoffretention und erlaubt eine effektivere Futtermittelverwertung (Florini et al. 1996; Carrel und Allen 2000). Längere Verabreichung von GH erhöht die Muskelmasse durch bessere Nutzung der Aminosäuren bzw. deren verbesserte Zuführung zur Glukoneogenese oder Oxidation (Carrel und Allen 2000). Unklar ist jedoch wiederum, ob dieser Effekt hauptsächlich auf den direkten Einfluss von GH zurückgeführt werden kann oder auf den Effekt des lokal oder in der Leber synthetisierten IGF-I (Florini et al. 1996; Carrel und Allen 2000). Die Anwesenheit von GHR in Muskelzellen konnte zwar nachgewiesen werden, aber eine spezielle Bindung von GH an Myoblasten konnte bislang in-vitro nicht demonstriert werden (Carrel und Allen 2000). Demgegenüber ist die Rolle des IGF-I wesentlich klarer. IGF-I stimuliert sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung der Myoblasten (Ohlsson et al. 1998; Carrel und Allen 2000).

### 2.1.8. Wirkung des Wachstumshormons auf das Knochengewebe

Der Knochen unterliegt einem kontinuierlichen An- und Abbau, (Modeling und Remodeling) (Ohlsson et al. 1998; Ohlsson et al. 2000). Altes Knochenmaterial wird durch Osteoklasten resorbiert und neuer Knochen durch Osteoblasten aufgebaut (Ohlsson et al. 1998; Ohlsson et al. 2000; Beamer et al. 2000; Lissett und Shalet 2000). Dieser Prozess wird u.a. durch das hormonelle System gesteuert, z.B. Parathormon, gonadale Steroide, Thyroxin, Cortisol und auch durch GH (Harris and Heaney 1969; Inzucchi and Robbins 1994; Ohlsson et al. 1998). Rezeptoren sowohl für GH als auch für IGF-I werden an Osteoblasten und Osteoklasten exprimiert (Inzucchi und Robbins 1994; Murray und Shalet 2000). Während des longitudinalen Knochenwachstums differenzieren Praechondrozyten der Keimzellschicht und werden einer limitierten klonalen Expansion unterzogen, um dann die Chondrozyten-Säulen der Wachstumsfuge zu formen (Kember 1978; Isaksson et al. 1987). Dort reifen sie und werden in die longitudinale Knochenneubildung einbezogen.

Unklar war bislang jedoch, ob das GH direkt auf das Knochengewebe wirkt oder seine Wirkung hauptsächlich über in der Leber synthetisiertes IGF-I entfaltet (Daughaday et al. 1972; Daughaday 1981; Daughaday und Rotwein 1989). Nach der klassischen „Somatomedin-Hypothese“ stimuliert GH die Produktion von IGF-I in der Leber und dieses wiederum stimuliert das Längenwachstum des Knochens (Daughaday 1981). Isaksson et al. (1982) konnten jedoch zeigen, dass die direkte Injektion von GH in die Tibiaepiphyse von Ratten das longitudinale Wachstum an der Injektionsstelle beschleunigt. So wurde die Zweifaktoren-Hypothese („dual effector theory“) von Green et al. (1985), die den Einfluss von GH und IGF-I auf die Adipozytenentwicklung beschrieb, auch auf die Knochenentwicklung ausgedehnt. Nach der Hypothese von Green et al. (1985) erfolgt der Einfluss von GH zu verschiedenen Zeitpunkten auf die Zellentwicklung, sowohl direkt als auch indirekt: GH stimuliert junge Praeadipozyten, IGF-I hingegen die klonale Expansion an einer späteren Stufe der Entwicklung.

An der epiphysealen Wachstumsfuge stimuliert GH die Differenzierung der Praechondrozyten in Chondrozyten, die ihrerseits die Produktion von IGF-I anregen. IGF-I wiederum stimuliert die klonale Expansion und Reifung der Chondrozyten (Ohlsson et al. 1994; Ohlsson et al. 1998). GH ist also der bestimmende Faktor des longitudinalen Knochenwachstums.

Sowohl GH als auch IGF-I reduzieren darüberhinaus die Dauer des Zellzyklus (Ohlsson et al. 1998; Carrel und Allen 2000). Auch In-vitro-Versuche konnten die Bedeutung von GH in diesem Zusammenhang nachweisen. Maor et. al (1989) kultivierten Knorpelstücke

der Rattenmandibula auf Kollagenschwämmen in Abwesenheit und Anwesenheit von GH. Nach 3-tägiger Inkubation mit GH konnte eine deutliche Steigerung der DNA-Synthese und der Grösse der Proben verzeichnet werden, diese Steigerung nahm auch nach 6 Tagen weiterhin zu. Zudem zeigte sich nach 6 Tagen ein ausgeprägtes Trabekelwerk in der extrazellulären Matrix. Dieses Trabekelwerk enthielt Osteozyten-artige Zellen in engem Kontakt mit Osteoblasten-artigen und Osteoklasten-artigen Zellen. Unbehandelte Proben hingegen enthielten keine Knochen-artigen Strukturen. Daraus lässt sich schliessen, dass GH, zumindest in-vitro, auch direkt die Knochenneubildung induziert.

GH stimuliert ausserdem direkt die Osteoblasten, wie Morel et al. (1993) an einer klonalen Osteoblastenzellreihe von Rattenkalvarien feststellten. Zugabe von GH führte zu einem signifikanten Anstieg der alkalischen Phosphatase. Durch immunzytologische Methode konnte die Expression von GHR-spezifischer mRNA in den Osteoblasten nachgewiesen werden. Um die Rolle des IGF-I in diesem Prozess zu klären gaben Ernst und Froesch (1988) ein Antiserum gegen IGF-I zu Knochenzellkulturen hinzu und konnten beobachten, dass die proliferative Wirkung des GHs ausblieb. Der genaue Mechanismus der Induktion von IGF-I durch GH ist noch unklar, ein Teil der Wirkung von GH scheint aber über die Regulation lokal gebildeter IGF-Bindungsproteine (IGFBP) vermittelt zu werden (Hayden et al. 1995). GH übt seine Wirkung indes nicht nur auf Osteoblasten aus, sondern auch auf Osteoklasten. Es induziert direkt und indirekt über IGF-I die Knochenresorption durch Osteoklasten, indem es sowohl die Differenzierung der Osteoklasten stimuliert als auch die reifen Osteoklasten aktiviert (Nishiyama et al. 1996). Allerdings konnte dieser stimulierende Effekt nicht in allen Studien bestätigt werden (Ransjö et al. 1996). Es ist bislang noch unklar, ob Osteoklasten entsprechende GHR exprimieren (Ohlsson et al. 1998).

### **2.1.9. Wachstumshormonmangel und Wirkung auf den Knochen**

Es sind sowohl Erkrankungen bekannt, bei denen ein Mangel des Hormons vorliegt als auch solche, bei denen ein Überschuss an GH produziert wird. Die Folgen eines juvenilen oder adulten GH-Mangels (GHD = Growth Hormone Deficiency) sind ein reduziertes Längenwachstum, eine reduzierte Knochenmasse und gehäufte Frakturen, insbesondere der Wirbelkörper (Murray und Shalet 2000). Häufigste Ursache eines GH-Mangels im Erwachsenenalter sind Tumoren im Bereich des Hypothalamus und der Hypophyse bzw. die Folgeerscheinung einer chirurgischen oder strahlentherapeutischen Behandlung (Wüster et al. 2001). Die Symptome umfassen unter anderem das Herz-Kreislaufsystem, die Niere, das hämatopoetische System und den Knochenstoffwechsel (Lissett und Shalet 2000; Murray und

Shalet 2000). Erwachsene mit GH-Mangel weisen eine verminderte Knochenmasse und eine signifikant erhöhte Frakturrate auf (Wüster et al. 2000; Murray und Shalet 2000; Wüster et al. 2001). Besonders ausgeprägt ist die Minderung an Knochenmasse, wenn der GH-Mangel bereits vor der Pubertät (childhood-onset GHD) auftritt (Hyer et al. 1992; Johannsson und Bengtsson 1997). Patienten mit diesem frühen Krankheitsbeginn erreichen eine geringere maximale Knochenmasse („Peak Bone Mass“) in ihrem Leben, sofern sie nicht frühzeitig mit GH behandelt werden (Hyer et al. 1992; Bengtsson und Johannsson 1998; Wüster et al. 2001).

Hinsichtlich des GH-Mangels mit Beginn im Erwachsenenalter (adult onset GHD) sind einige wenige widersprüchliche Angaben zur Knochenqualität zu finden. So berichten Degerblad et al. (1995) über eine normale Knochendichte bei Männern mit GH-Mangel (adult onset GHD) am Femur, den Wirbelkörpern und in der Ganzkörpermessung mittels DXA. Kaji et al. (1997) ermittelten ebenso eine normale Knochendichte bei GH-defizienten Patienten mit Beginn im Erwachsenenalter, gemessen an Wirbelsäule und Radius.

Ebenfalls widersprüchliche Angaben finden sich bei der Therapie des GH-Mangels mit GH. So berichten einige Autoren über keine Zunahme oder sogar geringfügige Abnahme der Knochenmasse und Knochendichte unter Gabe von GH bei Adoleszenten (Amato et al. 1993; Thoren et al. 1993; Vandeweghe et al. 1993; Balducci et al. 1995; Sartorio et al. 1996). Andere Studien konnten dagegen eine Zunahme an Knochenmasse und –dichte verzeichnen (Baum et al. 1996; Johannsson et al. 1996), die jedoch erst nach einer Therapiedauer von 18 Monaten auftrat.

Nach Ansicht von Ohlsson et al. (1998) erfolgt der Knochenumbau unter Wirkung von GH in zwei Phasen („Biphasic Model“): In einem ersten Schritt wird die Knochenresorption gesteigert mit einem intermittierendem Verlust an Knochenmasse, gefolgt von einem späteren Anstieg der Knochenneubildung in einem zweiten Schritt. Erst wenn der Zeitpunkt der maximalen Knochenresorption durchschritten ist („transition point“), findet ein Zuwachs an Knochenmasse statt. Messungen der Knochenmasse während der ersten Phase würden gemäss Ohlsson et al. (1998) demnach erniedrigte Werte zeigen.

Die Mehrzahl der Autoren geht derzeit von einem positiven Einfluss der GH-Therapie bei GH-Mangel aus, sowohl beim Erwachsenen als auch bei Kindern bzw. Jugendlichen (Lissett und Shalet 2000; Wüster et al. 2001; Hennessey et al. 2001; Rosen und Wüster 2003). Das Ausmass des Therapieerfolges ist dabei umso höher, je stärker der Mangel an GH ausgeprägt ist (Lissett und Shalet 2000; Murray und Shalet 2000; Cowell und Wüster 2000; Wüster et al. 2001).

### **2.1.10. Wirkung auf den Knochen bei Wachstumshormonüberschuss**

Halse et al. (1981) entnahmen Patienten mit Akromegalie Knochenbiopsien aus dem Beckenkamm und stellten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe eine deutlich höhere Knochendichte fest, sowohl trabekulär als auch kortikal. Ho et al. (1992) bedienten sich der Zweienergie-Röntgen-Absorptiometrie, um die Knochendichte (BMD) bei Akromegalie zu untersuchen. Ihre Messungen am proximalen Femur und der lumbalen Wirbelsäule ergaben jedoch, dass die Knochendichte bei Patienten mit Akromegalie durchweg dem BMD der gesunden Kontrollgruppe entsprach, selbst wenn die Patienten zusätzlich an Hypogonadismus litten. Auch Lesse et al. (1998) stellten bei DXA-Untersuchungen einen unveränderten BMD bei akromegalen Patienten fest, mit Ausnahme von erniedrigten Werten im Bereich des Oberschenkelhalses. Im Unterschied zu Ho et al. (1992) fanden sie jedoch einen signifikanten Einfluss der Geschlechtshormone auf die Knochendichte: Akromegale Patienten mit Hypogonadismus zeigten eine signifikant niedrigere Knochendichte als eugonadale akromegale Patienten und als die gesunde Kontrollgruppe. Kotzmann et al. (1993) untersuchten ebenfalls akromegale und gesunde Patienten mittels DXA und beobachteten keinen höheren BMD im Bereich der lumbalen Wirbelsäule. Im Gegensatz zu Lesse et al. (1998) stellten sie jedoch einen signifikant höheren BMD am Oberschenkelhals fest. Eine höhere BMD bei Akromegalie wurde hingegen von Hübsch et al. (1993) an beiden Messregionen beobachtet, unter Verwendung von DXA fanden diese Autoren eine deutlich höhere Knochendichte sowohl an der lumbalen Wirbelsäule, als auch im Bereich des Oberschenkelhalses.

Jockenhövel et al. (1995; 1996) bedienten sich der peripheren Computertomographie, um Knochenveränderungen bei Akromegalie zu analysieren. Am distalen Radius war die kortikale Dichte bei akromegalen Frauen höher als bei Männern und Frauen der Kontrollgruppe; die trabekuläre Dichte hingegen unterschied sich nicht zwischen Patienten und der Kontrollgruppe. Auch Scillitani et al. (1997) benutzten die quantitative Computertomographie zur Messung am distalen Radius, sowie die DXA zur Untersuchung der lumbalen Wirbelsäule und des Femurs. Insgesamt zeigte sich bei Akromegalie eine erhöhte Knochendichte in allen gemessenen Regionen. Die gemessenen Regionen profitierten in unterschiedlichem Ausmass vom GH-Überschuss und zeigten sich abhängig von der Anwesenheit normaler Östrogenspiegel.

Kayath und Vieira (1997) stellten fest, dass die mittels DXA gemessene Knochendichte von Wirbelsäule und Femur bei Akromegalie nicht erhöht war. Eine erniedrigte BMD an Wirbelsäule und Femur konnten sie beobachten, wenn die Patienten mit

Akromegalie zusätzlich einen sehr langjährigen Hypogonadismus aufwiesen. Bolanowski et al. (2000) untersuchten die Knochendichte der lumbalen Wirbelsäule der quantitativen Computertomographie bei akromegalen Patienten. Sie konnten keine signifikanten Unterschiede der Knochendichte der lumbalen Wirbelsäule gegenüber der Kontrollgruppe verzeichnen.

**Tabelle 2-1:**

**Auswirkung von Akromegalie auf die Knochendichte nach verschiedenen Autoren**

Autor	Messregion	Messmethode	BMD
Halse et al. (1981)	Beckenkamm	Knochenbiopsien	↑
Ho et al. (1992)	Femur, WS	DXA	↔
Kotzmann et al. (1993)	Femur, WS	DXA	↑ ↔
Hübsch et al. (1993)	Femur, WS	DXA	↑
Jockenhövel et al. (1995; 1996)	Radius	pQCT	↑ ↔
Scillitani et al. (1997)	Radius, Femur, WS	pQCT, DXA	↑
Kayath und Vieira (1997)	Femur, WS	DXA	↓ ↔
Lesse et al. (1998)	Femur, WS	DXA	↓ ↔
Bolanowski et al. (2000)	WS	pQCT	↔

BMD = bone mineral density; DXA = dual energy x-ray absorptiometry; pQCT = peripheral quantitative computer tomography; WS = Wirbelsäule; ↑ = Erhöhung der BMD; ↔ = Keine Änderung der BMD; ↓ = Erniedrigung der BMD.

Die widersprüchlichen Angaben hinsichtlich der Knochendichte bei Akromegalie sind auf mehrere Faktoren zurückzuführen: Die Autoren bedienten sich zum Teil sehr unterschiedlicher und untereinander nicht direkt vergleichbarer Techniken bei der Bestimmung der Knochendichte. Nachdem sich zahlreiche Untersucher der DXA als Messmethode bedienten, muss darauf hingewiesen werden, dass die Zweienergie-Röntgen-Absorptiometrie eine zweidimensionale Messmethode ist und daher auch eine Beeinflussung der gemessenen Werte durch die Knochengröße denkbar ist (siehe Kapitel 2.2). Zudem wurden von den Autoren verschiedene Körperregionen gemessen, die entweder überwiegend kortikalen Knochen enthalten, wie z.B. der distale Radius, oder überwiegend Spongiosa, wie z.B. die Wirbelkörper der Lendenwirbelsäule (siehe Tabelle 2-1). Eine Interaktion der

Geschlechts-, Schilddrüsen-, und Nebennierenrindenhormone mit dem entsprechenden zeitlichen Verlauf, sowie die unterschiedliche Genese und Therapie der Akromegalie wurde ebenso nicht von allen Autoren in Betracht gezogen.

## **2.2. Densitometrische Verfahren**

Densitometrische Verfahren, d.h. nicht-invasive Methoden der Knochendichtemessung wurden bereits in den oben genannten Kapiteln angesprochen und sollen hier näher erklärt werden, da diese auch in der vorliegenden experimentellen Studie zum Einsatz kamen.

Die Abschätzung des Knochenmineralgehaltes aus einem konventionellen Röntgenbild ist wenig aussagefähig, da erst Verluste von mehr als 30% erkannt werden können, sowie aufgrund der Abhängigkeit von der Qualität der Aufnahme, der Grösse und Positionierung des Patienten, sowie der Erfahrung des untersuchenden Arztes. Aus diesem Grund wurden seit den Sechziger Jahren neue röntgenologische Verfahren entwickelt, die eine quantitative Messung der Knochendichte bzw.-masse erlauben (Adams 1997).

### **2.2.1. Zweienergie-Röntgen-Absorptiometrie – (DXA)**

Bei der DXA wird als Strahlenquelle eine Röntgenröhre verwendet. Je nach Hersteller werden zwei Röntgenstrahlen mit unterschiedlichen Energiemaxima (z.B. 28 keV und 48 keV) durch einen Röntgengenerator produziert oder aus dem Spektrum der Röntgenstrahlung selektiv herausgefiltert. Die zwei verschiedenen Energiebereiche führen zu maximalen Schwächungsunterschieden zwischen Weichteilgewebe und Knochen, so dass der Knochenmineralgehalt quantitativ angegeben werden kann, auch wenn Weichteilgewebe oder Fett den Knochen umgibt.

Eine Limitation der DXA liegt darin, dass eine Unterscheidung von kortikalem Knochen und Spongiosa nicht möglich ist. Da die Zweienergie-Röntgen-Absorptiometrie ein zweidimensionales Projektionsverfahren ist, wird die Knochendichte nicht volumetrisch, sondern lediglich als flächenbereinigte Knochenmasse in  $\text{g}/\text{cm}^2$  angegeben (Grier et al. 1996). Daher ist die BMD abhängig von der Dimension bzw. Tiefe des gemessenen Knochens (Grier et al. 1996; Antonacci et al. 1996). Beim Menschen wurde die In-vivo-Präzision bei der Messung der lumbalen Wirbelsäule mit 0,5-1,5% angegeben (Genant et al. 1996). Am proximalen Femur wurde die Präzision mit 1-5% beschrieben (Adams 1997).

### 2.2.2. Anwendung der DXA bei Versuchstieren

Die Anwendung der Zweienergie-Röntgen-Absorptiometrie erfolgte anfangs nur am Menschen, hauptsächlich im Rahmen der Osteoporose Diagnostik (Adams et al. 1997). Die Notwendigkeit Veränderungen der Körperzusammensetzung longitudinal im Tiermodell zu charakterisieren, machte jedoch eine sukzessive Verbesserung der Hard- und Software erforderlich. Zu Beginn der Neunziger Jahre war dies nur bei grösseren Versuchstieren wie Schafe, Hunde und Katzen möglich. Brunton et al. (1993) benutzten kleine Schweinchen zwischen 1,6 kg und 6 kg Körpergewicht, um die Situation einer Messung am Neugeborenen zu simulieren. Bei 3 Wiederholungsmessungen erreichten sie einen CV% zwischen 0,2% für das Körpergewicht und 6,3% für die Fettmasse.

Weitere Verbesserungen der Hard- und Software ermöglichten Messungen an Tieren mit geringerer Körpermasse, z.B. bei grösseren Nagetieren, insbesondere an der Ratte. Diese werden häufig in der Erforschung des Knochens und des Knochenmineralhaushaltes genutzt (Grier et al. 1996). Hagiwara et al. (1993) untersuchten Präzision und Genauigkeit von Knochenmineralmessungen bei 6 Monate alten Ratten mit einem Durchschnittsgewicht von 283g mit DXA-Geräten zweier unterschiedlicher Hersteller (Norland XR und Hologic QDR). Nach sechsmaliger Ganzkörpermessung wurden die rechten Femora herauspräpariert und ebenfalls sechsfach gemessen. Die Femura wurden bei 800 Grad Celsius über 24 Stunden verascht und das Aschegewicht bestimmt. Beide DXA Systeme wiesen eine sehr gute Korrelation mit dem Aschegewicht auf ( $r = 0,98$ ), jedoch war die Präzision der Femur Messungen mit dem QDR-Gerät (0,5-0,9%) etwa zwei bis vierfach besser als mit dem XR (1,5-4,3%).

Während Hagiwara et al. (1993) ihre Messungen nur an getöteten Tieren vornahmen, untersuchten Casez et al. (1994) 10 Ratten mit einem Gewicht von 50 bis 265g unter Narkose. Das Skelett wurde im Anschluss verascht und der gesamte Kalziumgehalt mit Spektrophotometrie bestimmt. Der Präzisionsfehler für den Ganzkörper BMC lag bei 1,3%, die Korrelation zwischen Lebendmessung und Veraschung lag bei  $r = 0,99$ . Der Präzisionsfehler für die DXA Lebendmessungen lag bei 8,5% für alle Tiere und bei 5,7% unter Ausschluss der 50g Ratten.

Rozenberg et al. (1995) untersuchten die Reproduzierbarkeit bei Messungen in verschiedenen Regions of Interest (ROI). 15 Ratten mit einem Gewicht zwischen 127 - 398g wurden narkotisiert und jeweils zweimal in Bauch- und in Rückenlage gemessen. Ausserdem wurde eine Interessensregion (ROI) im Bereich des linken Femurs und der Tibia ausgewertet. Nach Tötung der Tiere wurden Femur und Tibia explantiert und in unterschiedlicher

Positionierung zweifach ex-vivo gemessen. Die Messungen wurden von zwei verschiedenen Untersuchern unabhängig voneinander durchgeführt. Der skelettale Knochenmineralgehalt wurde anschließend durch Veraschung und chemische Analyse bestimmt. Der Reproduzierbarkeitsfehler betrug ex-vivo <1%, der in-vivo Präzisionsfehler war jedoch höher (bis 6,0%). Die Korrelation zwischen in-vivo und ex-vivo BMC-Messungen betrug  $r = 0,98$  für den Femur und  $r = 0,97$  für die Tibia. Die Korrelation der ex-vivo Messung zur Veraschung lag bei  $r = 0,99$ . Rozenberg et al. (1994) führten eine hohe Variabilität zwischen unterschiedlichen Untersuchern auf Probleme bei der Positionierung zurück und schlugen vor, in zukünftigen Experimenten immer gleiche Positionierungen durch nur einen einzelnen Untersucher vornehmen zu lassen.

Makan et al. (1997) verglichen zwei DXA-Geräte und untersuchten neben dem Knochenmineralgehalt auch die Weichteilmasse (Lean) und Fettmasse in Bezug auf die Reproduzierbarkeit. 20 Ratten (150-600g) wurden je Gerät (Hologic 1000W und 4500A) einmal gemessen. 26 weitere Ratten wurden nur mit einem DXA-Gerät (4500A) gemessen, eine Ratte daraus sechsfach mit nachfolgender Bestimmung der Körpermasse durch Veraschung und chemische Analyse. Der Korrelationskoeffizient zwischen beiden Systeme betrug für die Weichteilmasse (Lean)  $r = 0,99$ , für die Fettmasse  $r = 0,95$  und für den BMC  $r = 0,99$ . Der Variationskoeffizient für die Wiederholungsmessungen lag bei 0,4% für die Weichteilmasse, 2,5% für den Fettgehalt und unter 2% für BMC und BMD. Die Autoren konstatierten eine gute Reproduzierbarkeit der neuen DXA-Geräte im Tierversuch, wiesen jedoch auf die Problematik der abnehmenden Reproduzierbarkeit bei kleineren Versuchstieren hin.

Auch Rose et al. (1998) konnten zeigen, dass die Zweienergie-Röntgen-Absorptiometrie verlässliche Werte bei der Analyse der Körperzusammensetzung bei Ratten liefert. 36 Ratten (200-600g) wurden einem Diätprogramm unterzogen, davon wiesen 18 Ratten zuchtbedingt einen höheren, 18 einen niedrigeren Fettgehalt auf. Den Versuchstieren wurde über 8 Wochen Guargummi zugefüttert und im Anschluss eine DXA-Messung vorgenommen. Darauf folgten Veraschung und chemische Analyse. Die Korrelation zwischen DXA und chemischer Analyse betrug  $r = 0,99$  für den Fettanteil,  $r = 0,96$  für den Anteil an Lean (Weichteil) und  $r = 0,81$  für den BMC. Rose et al. (1998) stellten jedoch fest, dass DXA den prozentualen Fettanteil um etwa 30% überschätzte.

Feely et al. (2000) stellten fest, dass die DXA verlässliche Aussagen über den Knochenmineralgehalt erlaubt, nicht jedoch über die Fettmasse. Um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen wurden 6 Ratten (374-430g) zweifach mit Repositionierung zwischen den

Durchgängen gemessen. Der Variationskoeffizient für den BMC betrug 2,6%, für die Weichteilmasse (Lean) 2,2% und für Fettgewebe 7,9%. Die grössten Variationskoeffizienten wurden dabei an den Ratten mit dem niedrigsten Anteil an Körperfett beobachtet.

Jilka et al. (1996) konnten aufzeigen, dass die Repositionierung keinen massgeblichen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit ihrer Messungen an der Maus habe. Die zweifache Messung von 32 Mäusen nach Repositionierung ergab, dass die Differenz aus dem BMD beider Messungen nicht signifikant verschieden von Null war. Darüberhinaus untersuchten Jilka et al. (1996) den Zusammenhang zwischen der Osteoblastenzahl im Knochenmark, der Knochenformation und der Knochendichte mit Hilfe der DXA. 47 Mäuse (9,0 - 69,8g) wurden unter Aussparung des Kopfes mit DXA gemessen, Wirbelsäule und Hinterbeine wurden gesondert analysiert. Der Vergleich zwischen DXA, chemischer Analyse und Veraschung ergab eine hohe lineare Korrelation von  $r = 0.98$  ( $p < 0,001$ ) für den Knochenmineralgehalt des gesamten Körpers. Bei der Wirbelsäule lag die Korrelation bei  $r = 0.99$  ( $p < 0,001$ ) und bei den Hinterbeinen bei  $r = 0.97$  ( $p < 0,001$ ).

Klein et al. (1998) untersuchten 12 Wochen alte weibliche Mäuse aus einer Inzucht Kreuzung (C57BL/6 und DBA/2) mit DXA, um den Einfluss verschiedener genetischer Hintergründe auf die „Peak Bone Mass“ des Knochens und auf die Gesamtkörpermasse zu bestimmen. 12 Mäuse (10-24g) wurden mit DXA gemessen, verascht und chemisch analysiert. Der Variationskoeffizient für den BMC lag bei  $0,99 \pm 0,51\%$  und für den BMD bei  $1,71 \pm 0,33\%$ . Der Vergleich zwischen DXA, chemischer Analyse und Veraschung ergab eine hohe lineare Korrelation von  $r = 0.98$  ( $p < 0,001$ ) für den Knochenmineralgehalt.

Auch Nagy und Clair (2000) ermittelten die Präzision der DXA an Mäusen im Vergleich mit Veraschung und chemischer Analyse. Die Messungen wurden an 25 männlichen Mäusen (19 bis 29g) im Alter zwischen 6 und 11 Wochen unter In-vivo-Bedingungen durchgeführt. Dabei wurden die Tiere 3 Mal mittels DXA, jeweils nach Repositionierung, unter Aussparung des Kopfes gemessen und im Anschluss chemisch die Fettmasse extrahiert, sowie bei 10 Tieren Weichteilmantel und Skelett getrennt. Der Körper (ohne den Kopf) wurde durch Veraschung bei 600 Grad Celsius analysiert und mit den DXA Messwerten verglichen. Die DXA ermittelte den Veraschungsgehalt des Knochens mit 100%, die Weichteilmasse mit 97%, sowie den Fettgehalt mit 209%, bei Variationskoeffizienten für die Messwiederholung von 0,8% bis 2,2%. Die Zweienergie-Röntgen-Absorptiometrie unterschätzte also den Weichteilanteil und überschätzte den Fettgehalt, konnte aber den Veraschungsgehalt des Knochens akkurat ermitteln.

### 2.3. Transgene Versuchstiere

Der Begriff „transgene“ Mäuse wurde erstmals von Gordon und Ruddle (1981) geprägt und beschreibt Tiere, denen fremde, in-vitro rekombinierte DNA-Sequenzen experimentell in ihre somatischen Zellen und meist auch in ihre Keimbahnzellen eingeschleust wurden. Transgenität ist definiert durch die stabile Integration dieser Sequenzen im Genom. So können sowohl Genkonstrukte aus regulatorischen und kodierenden Bereichen verwendet werden. Die Integration fremder Gene konzentrierte sich anfangs zumeist auf das Mausmodell, stellt aber unterdessen eine etablierte wissenschaftliche Methode auch an anderen Säugetieren dar (Wolf et al 1993; Rossant und Nagy 1995; Wynshaw-Boris 1996; McCauley 2001; Priemel et al. 2002).

Dabei stehen im Wesentlichen drei verschiedene Möglichkeiten zur Integration von fremden Genen in das Mausgenom zur Verfügung (Palmiter et al. 1984):

- A:** Die direkte prosomale Mikroinjektion von Genen in die Vorkerne befruchteter Eizellen.
- B:** Die Transduktion fremder DNA auf den Embryo mittels viraler Vektoren (Retroviren, Adenoviren) während verschiedener Stufen der Entwicklung.
- C:** Die Benutzung genetisch transformierter pluripotenter Teratokarzinom-Zellen oder embryonaler Stammzellen als Vehikel.

Die häufigste dieser Methoden, die auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, stellt die prosomale Mikroinjektion, d.h. die Mikroinjektion von Genkonstrukten in die Vorkerne von Zygoten dar. Nach Superovulation der Spendermäuse und Gewinnung einzelner Zygoten werden 1-2pl einer DNA-Lösung mit einigen hundert Kopien des Genkonstruktes in den männlichen Pronukleus der Zygote injiziert. Das Volumen der Zelle schwillt dabei sichtbar an und es erfolgt die Integration der fremden DNA nach dem Zufallsgesetz. Der Hauptvorteil dieser Methode liegt darin, dass die Integration der Gene meistens vor dem ersten DNA Replikationszyklus stattfindet. Damit ist der Anteil von Mosaiken in den Erblinien relativ gering (20-30%). Der Begriff genetisches Mosaik bezieht sich auf Individuen, die von einer einzelnen Zygote stammen, aber aus Zellpopulationen bestehen, die verschiedenen genetischen Informationen tragen. Ein weiterer Vorteil der DNA Mikroinjektion ist die reproduzierbare Effizienz im Bereich von ca. 20-30 Prozent transgener Tiere pro injizierte Zygote ((Palmiter et al. 1984)).

### 2.3.1. Charakterisierung Wachstumshormon–transgener Versuchstiere

Da fremde Wachstumshormone nicht unter der Kontrolle ihrer eigenen regulierenden DNA-Sequenzen exprimiert werden, ist ein eigener Promotor notwendig. Wie auch in der vorliegenden Studie wurde zur Expression von GH bei transgenen Tieren aufgrund der höheren Lebenserwartung vorwiegend Metallothionein (MT) verwendet. Wolf et al. (1993) charakterisierten den Einfluss verschiedener Promotoren an der GH-transgenen Maus. Es wurden Gruppen transgener Tiere unter Verwendung von Metallothionein (MT) bzw. Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (PCK) als Promotor hergestellt. Die kodierenden GH-Abschnitte waren humanen (hGH) bzw. bovinen (bGH) Ursprungs. Im Vergleich zur nicht-transgenen Kontrollgruppe wiesen die transgenen Tiere signifikant höhere Serumspiegel an GH auf: Die MThGH transgenen 3000 bis 900000 ng/ml, die PCKbGH transgenen 320 bis 2960 ng/ml und die MTbGH transgenen Tiere mit 34 bis 1050 ng/ml. Die Lebenserwartung der transgenen Tiere zeigte sich in Abhängigkeit zur Höhe des Serumspiegels signifikant reduziert. Eine Lebenszeit von einem Jahr wurde von 90% der Kontrollmäuse erreicht, jedoch nur von 3% der MThGH-transgenen Tiere, von 25% der PCKbGH-transgenen Tiere und von 44% der MTbGH-transgenen Tiere. Dies lässt sich auf die erheblichen Organveränderungen zurückführen, die bereits von Brem et al. (1989) beschrieben wurden. Bei 51 untersuchten MThGH-transgenen Mäusen stellten Brem et al. (1989) eine signifikante Zunahme des Organgewichtes von Herz, Lunge, Milz, Leber und Nieren fest. Auch unter Berücksichtigung der höheren Gesamtmasse der transgenen Tiere gegenüber den nichttransgenen Kontrollmäusen zeigte sich das relative Organgewicht von Herz, Lunge, Leber und Nieren signifikant erhöht, nur bei der Milz erreichte der Unterschied keine statistische Signifikanz. Die durchschnittliche Lebenserwartung der MThGH-transgenen Mäuse war ebenso signifikant erniedrigt, weniger als 30% überlebten länger als 6 Monate. Brem et al. (1989) unterzogen die inneren Organe einer lichtmikroskopischen pathologischen Untersuchung direkt nach dem Tod der Versuchstiere. Neben einer generellen Vergrößerung der Organe, insbesondere der Nieren und Leber, zeigten sich erhebliche Organschäden: Es konnten massive pathologischen Veränderungen der Nieren festgestellt werden. Mikroskopisch zeigten sich glomerulopathologische Veränderungen. Es imponierte eine zystische Erweiterung der Nierentubuli, interstitielle Fibrose, Glomerulohyalinose und Glomerulosklerose.

Die Untersuchung der Leber (Brem et al. 1989) ergab bei den GH-transgenen Tieren neben einer makroskopischen Vergrößerung und teilweise nodulärem Umbau eine mikroskopische zentrolobuläre hepatozelluläre Hypertrophie mit Nekrose einzelner

Hepatozyten. Auch die Nekrose ganzer Leberzellgruppen, Fibrose, proliferative Veränderungen der Gallengänge und noduläre Regeneration konnte aufgezeigt werden. Alle transgenen Tiere zeigten Zeichen von Kardiomegalie. Histologisch fand sich multifokale Myokardfibrose bei etwa einem Drittel aller transgenen Versuchstiere.

Brem et al. (1989) analysierten zudem das Skelett der transgenen Mäuse durch Vermessung der äusseren Dimensionen der Versuchstiere. Die Gesamtlänge des Rumpfes lag bei den transgenen Mäusen bei 10,8 cm und war damit um 20% grösser als bei den Kontrolltieren (9,0 cm). Auch Wolf et al. (1991a,b) nahmen Messungen an GH-transgenen Tieren (MThGH) und deren Kontrollen vor. Dabei wurde die Geschlechts-spezifische Gewichtszunahme analysiert sowie die externen Dimensionen anhand der Rumpflänge von der Nase zu Schwanzwurzel als auch die Länge der Hinterbeine. Die Kontrolltieren waren in zwei Gruppen getrennt, normale unselektierte Kontrollmäuse und nach hohem Körpergewicht bei 8 Wochen Lebenszeit (N8) selektierte nicht-transgene Mäuse. Bei den transgenen Tieren konnte eine wesentlich steilere Wachstumskurve verzeichnet werden als bei den unselektierten Kontrolltieren und den weiblichen N8-Mäusen, jedoch ohne signifikante Unterschiede zu den männlichen N8-Mäusen. Die rapide Gewichtszunahme war bei allen Gruppen ähnlich und endete um den 90. Lebenstag. Die Gewichtszunahme der transgenen Tiere zeigte keine offensichtlichen Geschlechts-spezifische Unterschiede, wohingegen N8 Männchen und Kontrollmännchen eine signifikant steilere Zuwachskurve zeigten als die Weibchen. Die transgenen Tiere erreichten ihr maximales Körpergewicht mit einem Alter von  $144 \pm 55$  Tagen (Männchen) bzw.  $130 \pm 60$  Tagen (Weibchen), die Kontrolltiere beiderlei Geschlechtes mit  $165 \pm 50$  Tagen. Die N8-Mäuse erreichten ihr Maximalgewicht bei 240 Tagen. Sowohl bei den Kontrollmäusen als auch bei den N8-Mäusen zeigten die Männchen ein signifikant höheres Maximalgewicht und Endgewicht zum Zeitpunkt des Todes. Im Gegensatz dazu war das Endgewicht bei den transgenen Mäusen um 20% gegenüber dem Maximalgewicht verringert. Die Autoren führen dies auf die massiven Organveränderungen und die damit verbundene präfinale Kachexie zurück.

Bei der Rumpflänge von Nase zu Schwanzwurzel (NSL), Kopfscheitel zu Schwanzwurzel (KSL) und der Länge der Hinterbeine (HBL) fanden Wolf et al. (1991a,b) die höchsten Werte bei den transgenen Mäusen, gefolgt von den N8 Mäusen. Der Zuwachs war am höchsten für KSL und am niedrigsten für HBL. Bei der relativen Länge bezogen auf das Körpergewicht waren die Abmessungen jedoch bei den Kontrolltieren signifikant höher als bei den N8-Mäusen beiderlei Geschlechtes und den weiblichen transgenen Mäusen. Die transgenen Männchen hatten lediglich eine geringere relative NSL, wohingegen sich KSL und

HBL nicht signifikant von einander unterschieden. Die Autoren stellten abschliessend fest, dass der absolute Zuwachs der äusseren Körperdimensionen bei transgenen Tieren signifikant höher war als bei den zwei Vergleichsgruppen, der relative Zuwachs bei den transgenen Weibchen aber signifikant geringer als bei den Kontrolltieren. Dies führten sie auf das höhere Körpergewicht der transgenen Weibchen verglichen mit den transgenen Männchen zurück.

In einem weiteren Schritt wurden die knöchernen Dimensionen von Schädel, Unterkiefer, Atlas, Skapula, Becken und der langen Röhrenknochen in standardisierter Weise (Dicke, Länge und Breite) vermessen und mit den N8 Mäusen und den unselektierten Kontrolltieren verglichen (Wolf et al. 1991b). Alle absoluten Werte, ausser der Höhe der Skapula bei Männchen und der Dicke der Femurdiaphyse an der schmalsten Stelle bei Weibchen, waren bei transgenen Tieren signifikant grösser als bei den Kontrolltieren. Diese Unterschiede lagen zwischen 3% und 32% bei den Männchen und zwischen 6% und 28% bei den Weibchen. Im Unterschied dazu konnte bei N8-Mäuse kein Skelettwachstum von >10% beobachtet werden. Bei Berechnung des relativen Skelettwachstums gemessen am Körpergewicht, übertrafen die äusseren Dimensionen der Kontrolltiere die N8-Mäuse und oft sogar die transgenen Tiere. Die einzige Ausnahme war die Dicke der Radiusdiaphyse die bei männlichen und weiblichen transgenen Tieren signifikant höher war als bei den Kontrolltieren gleichen Geschlechts. Zusammenfassend stellten Wolf et al. (1991b) fest, dass die Überexpression von GH das Knochenwachstum der transgenen Tiere in Geschlechtsspezifischer Weise beeinflusst. Bei männlichen MT-hGH transgenen Tieren war die Wachstumssteigerung der langen Röhrenknochen mehr durch appositionelles Wachstum charakterisiert als durch Längenwachstum. Bei den transgenen Weibchen hingegen überstieg das Längenwachstum die Dickenzunahme der Diaphysen der langen Röhrenknochen mit Ausnahme des Radius. Die Tatsache, dass die Knochen der transgenen Tiere generell grösser waren als bei den etwa gleich schweren N8 Mäusen führten die Autoren auf den direkten lokalen und systemischen Einfluss des GHs auf das Skelett zurück, der den blossen Einfluss eines höheren Körpergewichtes übersteigt.

Sandstedt et al. (1994) analysierten die Knochenentwicklung an der bGH transgenen Maus im Hinblick auf den Einfluss der Sexualsteroiden. 25-29 Tage nach der Geburt wurden 62 Versuchstiere gonadektomiert oder Sham-(Placebo-) operiert sowie die Menge an bGH und IGF-I zum Operationszeitpunkt und nach Tötung (80.-98. Tag) im Blut bestimmt. Die Länge der Tibia und lumbalen Wirbelsäule wurden mit einer konventionellen Röntgentechnik ermittelt. Die Einteilung erfolgte in vier Gruppen, transgen/ nicht transgen und gonadektomiert/ shamoperiert, mit 5-11 Tieren pro Gruppe. Die GH-Spiegel im Blut

unterschieden sich nach dem operativem Eingriff nicht zwischen den Gruppen. Transgene Tiere wiesen signifikant höhere IGF-I Spiegel im Blut auf, diese unterschieden sich jedoch nicht zwischen gonadektomierten und nicht gonadektomierten Tieren. Es zeigte sich eine maximale Gewichtszunahme bei 30-60 Lebenstagen (peripubertär), und eine langsamere Gewichtszunahme nach dem 60. Lebenstag (adult). Männliche und weibliche Transgene wiesen eine höhere peripubertäre und adulte Gewichtszunahme auf als die Kontrolltiere, wobei die peripubertäre Gewichtszunahme der gonadektomierten Männchen, sowohl transgener als auch nicht transgener Herkunft, deutlich niedriger lag. Die Gewichtszunahme im adulten Alter wurde durch Gonadektomie nicht beeinflusst. Ebenso blieben weibliche Versuchstiere durch Gonadektomie unbeeinflusst. Die transgenen Versuchstiere beiderlei Geschlechts wiesen ein erhöhtes Wachstum der Tibia und der lumbalen Wirbelsäule gegenüber den Kontrolltieren auf. Die Gonadektomie hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Tibia während der peripubertären Wachstumsphase, bei männlichen Kontrolltieren führte sie sogar zu einer Zunahme während der adulten Phase. Hinsichtlich der lumbalen Wirbelsäule zeigte sich eine Verminderung des peripubertären Wachstums bei den Kontrollmännchen, während der adulten Phase jedoch zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Die Epiphysendicke zum Zeitpunkt der Tötung lag bei den bGH-transgenen Tieren signifikant über den Kontrolltieren, die gonadektomierten Männchen (sowohl transgen als auch Kontrollen) wiesen eine breitere Epiphyse auf als die Shamgruppe, bei den Weibchen zeigten sich keine Unterschiede. Die Autoren stellten fest, dass Sexualsteroiden einen wichtigen Faktor des Wachstums darstellen. Der Wirkungsmechanismus der Sexualsteroiden liegt jedoch wahrscheinlich nicht allein auf der Modulation der GH Ausschüttung. Gonadektomierte männliche Tiere sowohl Transgene als auch Kontrolltiere wiesen ein dysproportionales Wachstum des Skeletts auf, nicht aber weibliche Tiere. Während der Skelettentwicklung scheinen die Gonaden bei Männchen demnach eine andere Funktion aufzuweisen als bei Weibchen.

Sandstedt et al. (1996) untersuchten in einem weiteren Versuch den Einfluss der Ovarien auf den Knochenmineralgehalt bei GH-transgenen Mäusen. 20 weibliche Mäuse, davon 10 MT-bGH-transgene Weibchen, wurden in vier Gruppen unterteilt, transgen/ nicht transgen und ovariektomiert/ scheinoperiert. Die Ovariektomie bzw. Scheinoperation erfolgte 25-29 Tage nach Geburt, nach 90 Tagen wurden die Versuchstiere getötet und analysiert. Dazu wurde ein 6 mm messender kortikaler Zylinder aus der rechten Tibia entnommen. Als Beispiel für vorwiegend spongiösen Knochen diente der 6. Lendenwirbel. Die Analyse des Knochenmineralgehaltes erfolgte mittels DXA, Wasserverdrängung nach Archimedes, sowie

Veraschung. Die Autoren stellten fest, dass der Knochenmineralgehalt und das –volumen bei den GH-transgenen Tieren signifikant höher war als bei den Kontrolltieren, sowohl an der Tibia als auch am Lendenwirbel. Bei den transgenen ovariektomierten Tieren waren der Knochenmineralgehalt und das –volumen jedoch nicht höher als bei den Kontrolltieren. Bei den nicht-transgenen Kontrolltieren hatte die Ovariektomie keinen signifikanten Einfluss auf die Knochendichte. Die Autoren folgerten daraus, dass intakte Ovarien eine Voraussetzung für den stimulierenden Effekt des GHs auf das Knochengewebe sind.

Tseng et al. (1996) untersuchten den Einfluss von GH auf die geometrische, biomechanische und histomorphometrische Qualität des Knochens am hGH-transgenen Mausmodell. Insgesamt 24 männliche Versuchstiere im Alter von 15 Wochen, davon 10 hGH-transgene und 14 Kontrolltiere wurden analysiert. Nach Entnahme von Femora und Humeri wurden die rechten Femora mit Mikro-CT auf Höhe der Schaftmitte vermessen und im Anschluss unter 4 Punkt Fixierung in einer servohydraulischen Testmaschine auf ihre Versagenslast überprüft. Aus der Schaftmitte der kontralateralen Femora wurden  $120 \times 120 \times 1000 \mu\text{m}$  grosse kortikale Zylinder entnommen und entweder unter 4 Punkt Fixierung auf ihre Versagenslast überprüft oder histomorphometrisch analysiert. Aus den Humeri wurden nach Explantation in Schaftmitte 5mm lange Proben geschnitten, diese auf ihr Trockengewicht hin untersucht und unter einheitlichen Bedingungen bei  $600^\circ\text{C}$  verascht. Wie erwartet zeigten sich die transgenen Mäuse als signifikant grösser und schwerer als die Kontrollmäuse (+21%). Ebenso signifikant grösser waren die geometrischen Dimensionen der Femora in Schaftmitte (+8%), der gesamte Querschnitt in Schaftmitte (+16%), der kortikale Anteil in Schaftmitte (+11%) und das Trägheitsmoment der Biegebeanspruchung (+29%). Auch das Widerstandsmoment im 4 Punkt Test der transgenen Tiere war signifikant höher, aber es wurde kein signifikanter Unterschied in der Biegesteifigkeit der Knochen transgener Tiere gegenüber den Kontrolltieren ersichtlich. Die Veraschung ergab signifikant niedrigere Werte für die Humeri der transgenen Männchen pro Volumeneinheit Knochen. Bei der histomorphometrischen Analyse der Humeri fanden sich bei den transgenen Tieren signifikant grössere Inseln von Knorpelzellen und Geflechtknochen in Schaftmitte als bei den Kontrollmännchen. Zusammenfassend stellten die Autoren fest, dass das Elastizitätsmodul des Knochengewebes und die kortikale Festigkeit der transgenen Tiere gegenüber den nicht-transgenen Kontrolltieren signifikant reduziert war. Der Zuwachs an geometrischen Eigenschaften in Schaftmitte war nicht mit einem proportionalen Zuwachs an Biegesteifigkeit verbunden. Dies führten die Autoren hauptsächlich auf die beschriebenen histomorphometrischen Veränderungen.

Saban et al. (1996) untersuchten die Auswirkungen des humanen GHs (hGH) auf die Knochenmasse und -dichte bei Mäusen mit einer nicht-systemisch regulierenden Sequenz. Unter Verwendung von  $\beta$ -Globin Regulationseinheiten und Mikroinjektion der DNA in einzellige Embryos sowie Transfer der Embryos auf pseudoträchtige Empfängerweibchen gelang die Herstellung zweier hemizygoter transgener Erblinien, TG 420 und TG 450, mit jeweils sechs bzw. fünf Kopien des GH-Transgens. Die Plasmakonzentrationen an hGH lagen bei 72 ng/ml im Alter von 55 Tagen, also signifikant niedriger als bei GH-transgenen Tieren mit Metallothionein (MT) oder Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) als Promotor. Im Gegensatz zur pulsatilen Sekretion durch die Hypophyse konnten Saban et al. (1996) eine kontinuierliche Ausschüttung des GHs durch die erythroiden Zellen erreichen. Diese erythroiden Zellen exprimieren das humane GH beim Mäusefetus in der Leber, bei der adulten Maus im Knochenmark. Die Versuchstiere wurden über einen Zeitraum von 13 Monaten regelmässig radiologisch auf ihre Knochendichte hin untersucht. Im Anschluss erfolgte die Explantation der Tibiae, Vermessung und Einbettung in Paraffin sowie Färbung zur autoradiographischen Analyse. Die transgenen Tiere zeigten eine signifikant höhere Knochendichte beginnend mit 3 Wochen Lebensalter. Dabei fand sich eine verzögerte Ossifikation der Epiphysen bei den jungen transgenen Mäusen. Die Messungen zum letzten Zeitpunkt (13 Monate) ergaben 25-30% höhere Werte für die transgenen Tiere als für die Kontrollmäuse. Die Tibiae der Transgenen zeigten eine signifikant grössere kortikale Dicke (20-45%). Die normalerweise bei GH-transgenen Mäusen beobachteten Effekte wie Unfruchtbarkeit, Arthritis, reduzierte Serumspiegel an Insulin mit hohen Blutglukosespiegeln und reduzierte Lebenserwartung blieben hingegen aus. Auch eine stärkere lokale Stimulation von IGF-I ohne Anhebung des systemischen IGF-I wurde durch die Autoren als mögliche Ursache diskutiert.

Tseng et al. (1998) vertieften ihre vorangegangenen Untersuchungen (1996) über die Auswirkungen von GH auf den Knochenstoffwechsel und die Knochenqualität unter Nutzung eines weiteren transgenen Mausmodells. Unter der Kontrolle eines Metallothionein-Promotors wurden Mäuse mit dem humanen Somatotropin-releasenden Hormon (GHRH, Growth Hormone Releasing Hormone) hergestellt. Unter dem Einfluss hoher GHRH-Spiegel wurden die somatotropen Zellen der Adenohypophyse zur Produktion von GH stimuliert. Im Alter von 16 Wochen erreichten die transgenen Tiere GH-Serumspiegel von 6229 ng/ml im Vergleich zu 26 ng/ml bei den Kontrollen. Insgesamt 75 männliche Versuchstiere, davon 39 GHRH-transgene Mäuse wurden in mehreren Untergruppen analysiert. Nach 9, 16, 24 und 30 Lebenswochen wurden jeweils einer Untergruppe die Humeri und Femora entnommen. Diese

wurden mittels Mikro-CT vermessen, biomechanisch unter 4 Punkt Fixierung des gesamten Knochens sowie einzelnen Knochenzylinder des kontralateralen Knochens auf ihre Versagenslast überprüft, oder histomorphometrisch analysiert. Zusätzlich wurden 3 Transgene und 3 Kontrollmäuse mit Fluoreszenzfarbstoffen (Oxytetracyclin, Calcein-Grün und Xylenol-Orange) zwischen der 28. und 30. Lebenswoche durch intraperitoneale Injektion markiert und im Anschluss histomorphometrisch analysiert. Von den Humeri wurden nach Explantation in Schaftmitte 5 mm lange Proben gewonnen, das Trockengewicht bestimmt und unter einheitlichen Bedingungen bei 600°C verascht. Zwischen der 4. und 9. Lebenswoche stieg das Körpergewicht der transgenen und nicht-transgenen Versuchstiere exponentiell an, im Alter von 6 Wochen waren die GHRH-transgenen Mäuse erstmals signifikant schwerer als die Kontrolltiere. Nach 10 Lebenswochen erreichte die Gewichtszunahme beider Gruppen ein Plateau, nach 12 Wochen waren die transgenen Mäuse 25-30% schwerer als die Kontrolltiere. Die geometrischen Dimensionen der Femora in Schaftmitte folgten diesem Trend bis einschliesslich der 16. Lebenswoche: Die Querschnittsfläche in Schaftmitte lag bei den transgenen Tieren 16% über den Kontrolltieren, die kortikale Dicke um 13%, das Trägheitsmoment um 44% und das Widerstandsmoment um 60% über den Kontrollen. In der 24. und 30. Lebenswoche zeigten sich jedoch alle geometrischen Werte im Bereich der Kontrolltiere, signifikante Unterschiede konnten nicht mehr verzeichnet werden. Die biomechanische Testung ergab keine Unterschiede in der 9. und 16. Lebenswoche. Die 4-Punkt Testung der kontralateralen Knochenzylinder ergab ein signifikant niedrigeres Elastizitätsmodul der transgenen Tiere in jedem Lebensalter ausser bei 9 Wochen. Die mechanischen Eigenschaften beider Gruppen erreichten ein Plateau bei 16 bis 24 Lebenswochen und fielen dann ab. Die Veraschung der Humeri zeigte bei allen Lebenswochen einen signifikant niedrigeren Aschegehalt der transgenen Mäuse als der Kontrollen. Auch hier erreichten die Werte ein Plateau bei 16 Wochen. Wie bereits in vorangegangenen Untersuchungen (Tseng et al. 1996) ergab die histomorphometrische Analyse der Humeri signifikant grössere Inseln von Knorpelzellen und Geflechtknochen in Schaftmitte der transgenen Versuchstiere. Auch die Porosität im Bereich der Schaftmitte war bei den transgenen Versuchstieren signifikant höher. Bei der Analyse der Fluoreszenzmarkierung zeigte sich bei den transgenen Mäusen eine periostale und endokortikale Knochenneubildung vor allem im lateralen und posterioren Quadranten der Schaftmitte, bei den Kontrolltieren lediglich periostal im lateralen Quadranten, ohne endokortikale Knochenneubildung. Die Autoren stellten zusammenfassend fest, dass die Überexpression von GH die Produktion von hohen Anteilen an minderwertigem

Knochengewebe stimuliert, insbesondere die Bildung von Geflechtknochen und grösseren Inseln von Knorpelzellen. Der initial erhöhten Knochenneubildung folgte zudem ein Prozess der übermässigen Knochenresorption, die zu minderwertigen mechanischen Eigenschaften des Knochens führte. Aufgrund des höheren Gewichtes und der damit verbundenen hohen mechanischen Beanspruchung konnte als Anpassung daran eine Veränderung der kortikalen Geometrie verzeichnet werden. Tseng und Mitarbeiter (1998) schlossen daraus, dass bei der transgenen Maus die Aufrechterhaltung der knöchernen Integrität aufgrund der niedrigen feingeweblichen Qualität nur durch eine Querschnittszunahme gewährleistet werden kann.

### 3. Fragestellung

In der vorliegenden Studie sollten die folgenden konkreten Fragen untersucht werden:

1. Ist die Zweienergie-Röntgen-Absorptiometrie geeignet, eine präzise, d.h. reproduzierbare Analyse der Knochenmasse an der GH-transgenen Maus durchzuführen?
2. Findet sich bei den transgenen Tieren ein Zuwachs an Knochenmasse, welcher proportional zur Zunahme des Körpergewichtes ist, oder fällt dieser geringer oder höher als die Zunahme des Körpergewichtes aus?
3. Ist ein möglicherweise anaboler Effekt, d.h. eine höhere Knochenmasse bei männlichen und weiblichen transgenen Tieren unterschiedlich ausgeprägt? Erreichen die transgenen Tiere im Laufe des Lebens eine „Peak Bone Mass“, also einen Zeitpunkt der höchsten Knochenmasse, oder liegt ein kontinuierlicher Anstieg des Knochenmineralgehaltes bis in das hohe Alter vor?

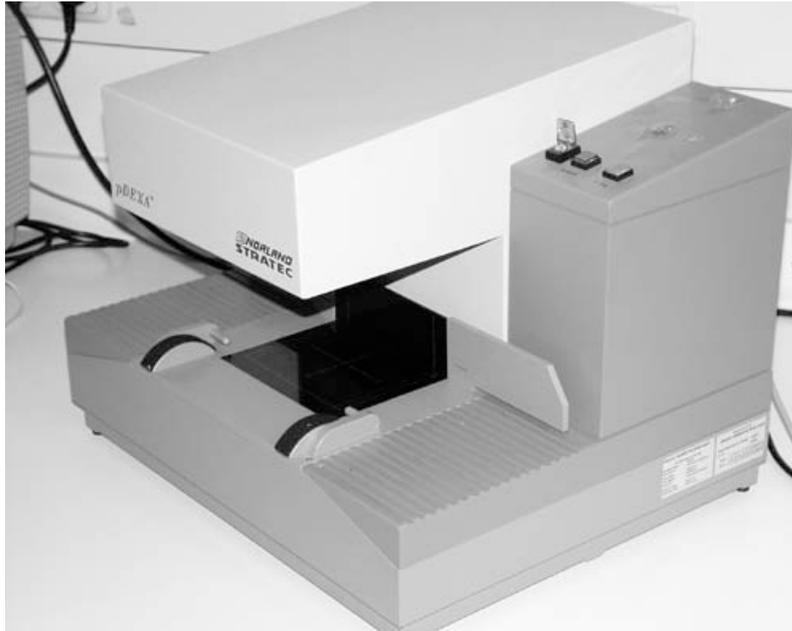
Die Ziele der vorliegenden Arbeit wurden anhand zweier getrennter Schritte verfolgt:

1. In einer transversalen Pilotstudie wurde die Präzision der Methode zur Untersuchung von Kontrollmäusen und GH-transgenen Versuchstieren mit der Zweienergie-Röntgen-Absorptiometrie (DXA) ex vivo bestimmt sowie Unterschiede zwischen den Gruppen im Alter von 12 Wochen charakterisiert.
2. In einer anschließenden longitudinalen Studie wurde diese neue Methode zur In-vivo-Analyse der GH-transgenen Mäuse und der Kontrolltiere im Alter von 3 Wochen bis 9 Monaten angewendet.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Die Messapparatur (DXA-Gerät)

In der vorliegenden Studie wurde ein Zweienergie-Röntgen-Absorptiometrie (DXA) Gerät der Firma Norland/Stratec (Stratec Medizintechnik, Pforzheim) verwendet. Dieses Gerät wurde ursprünglich für Messungen des Knochenmineralgehaltes am menschlichen Unterarm im Rahmen der Osteoporose-diagnostik konzipiert. Durch eine Anpassung der Hard- und



Software ist jedoch auch eine Messung an Kleintieren (Mäuse, Ratten etc.) möglich. Die Grösse des eigentlichen Messfeldes beträgt 120 x 150 mm (Abb.4-1). Das DXA-Gerät arbeitet mit einer Röntgenröhre mit Zinn-Filtrierung. Nach Durchstrahlung des Messobjektes wird die Röntgenstrahlung von zwei Kadmium- Tellurid- Detek-

Abbildung 4-1: DXA-Gerät (Norland Stratec)

toren aufgenommen. Durch Absorption mit Hilfe einer K-Kantenfilterung ( $250 \mu\text{m Sn}$ ) wird das primär emittierte Spektrum in zwei schmalbandige Energiegipfel aufgeteilt, deren Intensitätsmaxima bei 28 keV und 48 keV liegen. Zum Ausgleich der stärkeren Schwächung der niederenergetischen Strahlung durch das Körpergewebe beträgt das Intensitätsverhältnis 2 : 1 zwischen dem niedrigen und dem hohen Energiebereich.

Die Röntgenröhre und der Detektor sind auf einem gemeinsamen Transporterarm befestigt und fahren das Messobjekt meanderförmig ab, dabei werden zwei Linien gleichzeitig aufgenommen. Der Querschnitt des Röntgenstrahls wird durch Verwendung einer Fein-Fokus-Röhre auf einen Brennfleckdurchmesser von  $50\mu\text{m}$  reduziert. Die Beschleunigungsspannung liegt bei 60 kV bei einem Anodenstrom von  $250\mu\text{A}$ .

Die Unterscheidung von Knochen und Weichteilen orientiert sich an einem Algorithmus, der den jeweiligen Erfordernissen angepasst werden kann. Dieser Schwellenwert zwischen Knochen und Weichteilgewebe wurde von der Herstellerfirma an

Hand von Phantommodellen bestimmt und kann vom Benutzer im Bedarfsfall manuell korrigiert werden (Norland Stratec User Manual, Pforzheim 1997).

Der Untersuchungsablauf erfolgt in mehreren Schritten:

1. Anfertigung einer Übersichtsaufnahme des gesamten Untersuchungsobjektes, der sogenannte Scout-View.
2. Festlegung des eigentlichen Messfeldes auf eine bestimmte Interessensregion (Region of Interest, ROI).
3. Messung dieser Interessensregion und Darstellung des gescannten Objektes (Abb. 4-2).
4. Ausgabe der quantitativen Parameter.

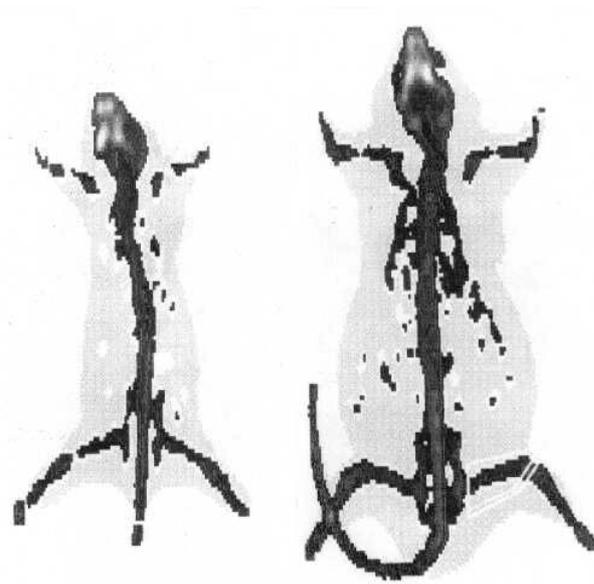


Abb. 4-2: Weibl. transgene –und Kontrollmaus  
in  $\text{g}/\text{cm}^3$  angegeben werden müsste. Der BMD errechnet sich aus dem BMC geteilt durch die Projektionsfläche des Knochens. Das Gesamtgewicht des Untersuchungsobjektes kann als Summe aus den Werten BMC, Fettgehalt und der sog. Lean mass berechnet werden.

Aus den gewonnenen Daten kann der Gesamtgehalt an mineralisiertem Gewebe (BMC = bone mineral content), der Fettgehalt (Fat) und die restliche Weichteilmasse (Lean mass) im Messfeld bestimmt werden. Darüber hinaus ermittelt die Software automatisch die Knochendichte im Sinne einer flächenkorrigierten Knochenmasse (BMD = bone mineral density in  $\text{g}/\text{cm}^2$ ). Hierbei handelt es sich, wie im Literaturteil erklärt, nicht um eine volumetrische Knochendichte, da diese

## 4.2. Versuchstiere

Die in der vorliegenden Studie untersuchten Mäuse stammten aus der Züchtung von Charles River-Wiga (Sulzfeld, Deutschland). Alle Tiere waren Nachkommen der 14. Generation von Auszuchtmäusen des Naval Medical Research Institute (NMRI), die ursprünglich von Dr. T. E. Wagner (Edison Biotechnology Center, Ohio Universität, Athens, Ohio, USA) hergestellt wurde. Die Mäuse wurden am Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Haustiergenetik der LMU- München angezchtet.

Untersucht wurden bGH-transgene und Kontrollmäuse. Die Transkriptionskontrolle erfolgte durch einen MT-Promoter (Wolf et al. 1993). Ungefähr 2-3 Wochen nach der Geburt wurden die Tiere hinsichtlich ihres Genotyps geprüft. Hierzu wurde ein kleines Stück des Schwanzes (0,5 cm) abgetrennt und mittels DNS-Hybridisierungstechnik und Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) auf das Vorhandensein des fremden Genmaterials untersucht. Die Identifikation jeder Maus wurde durch farbliche Tätowierung der Extremitäten und durch Ohrlochmarkierungen sichergestellt.

Haltung und Pflege der Tiere wurde am Institut für Molekulare Tierzucht und Haustiergenetik des Genzentrums der Ludwig-Maximilians-Universität unter einheitlichen Bedingungen gewährleistet. Die Haltung erfolgte in vergitterten Makrolonkäfigen auf Tierstreu (Ssniff, Soest, Deutschland). Alle Tiere hatten freien Zugang zu Leitungswasser und Futter einer entsprechenden Nagetiermischung (Ssniff V1126, Soest, Deutschland). Der Tag-Nacht-Rhythmus war mittels Zeitschaltuhr von 19 h bis 7 h (Nacht) bzw. von 7 h bis 19 h (Tag) geregelt. Die Temperatur lag bei konstant 21°C, die relative Luftfeuchtigkeit bei 55%.

Der Tierversuch wurde unter dem Aktenzeichen 211-2531-31/96 mit Überarbeitung vom 4.08.1998 von der Regierung von Oberbayern gemäss Tierschutzgesetz (TierSchG) i.d.F. vom 25.05.1998 (BGBl I S.1105) genehmigt.

## 4.3. Querschnittstudie

Zunächst wurden im Rahmen einer Querschnittstudie 28 Tiere untersucht, davon 14 weibliche Tiere und 14 männliche Tiere. Jeweils 7 Tiere waren transgen und 7 waren Kontrollen. Die Versuchstiere wurden schmerzfrei im Alter von 12 Wochen durch zervikale Dislokation im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz getötet. Sie wurden bis zur Untersuchung tiefgefroren bei -20°C aufbewahrt. Jedes Versuchstier wurde vor der DXA-Untersuchung mit einer Präzisionswaage (Mettler PM 100, Mettler, Giessen, Deutschland) gewogen.

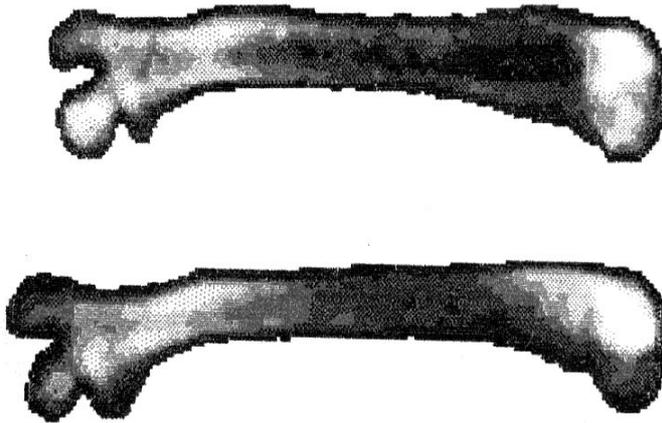


Abbildung 4-3: Darstellung der Femora einer Kontrollmaus (oben) und einer transgenen Maus (unten)

Die Mäuse wurden in Rückenlage mit abduzierten Extremitäten auf dem Messfeld positioniert. Im Verlauf von 3 Wochen wurde insgesamt 4 Mal gemessen. Jeder Messdurchgang fand jeweils an einem unterschiedlichen Tag statt und erfolgte nach erneuter Kalibrierung der Messapparatur.

Die DXA-Messung erfolgte bei einer Scangeschwindigkeit von 20mm/s. Je nach Grösse des zu messenden Tieres konnte nach dem Scout-View das tatsächlich benötigte Messfeld reduziert werden. Die Messdauer pro Tier lag bei etwa 15 - 20 min. Um den Einfluss der Messgeschwindigkeit auf die Ergebnisse zu evaluieren wurden zwei Mäuse (eine leichte Kontrollmaus und eine schwere transgene Maus) bei verschiedenen Geschwindigkeiten von 5 mm/s bis 40 mm/s gemessen.

Im Anschluss wurden die rechten Femora aller Mäuse freipräpariert, in feuchte Kompressen gehüllt und bei -20°C aufbewahrt. Diese Femora wurden einer weiteren Messung unter ex-situ-Bedingungen unterzogen.

Zur Analyse der Präzision wurde jeweils ein Femur eines Kontrollweibchens und ein Femur eines transgenen Männchens gemessen. Alle Messungen wurden 4 Mal wiederholt (an 4 verschiedenen Tagen) jeweils nach erneuter Kalibrierung des Gerätes. Bei ex-situ-Messungen von sehr kleinen Objekten in Luft tritt das Problem auf, dass der Algorithmus nicht präzise arbeitet, weil keine Weichteile vorhanden sind, daher wurden die Femora in einer dünnen Acryl-Petrischale mit 5mm Wasser bedeckt gemessen. Die Positionierung der Femora erfolgte dabei einheitlich parallel zum Boden, mit dem distalen Femurende in Richtung Transporterarm (Abb. 4-4).

Bei sehr kleinen Objekten kann zudem ein Projektionsfehler auftreten, weil für die bildliche Darstellung und die Flächenbestimmung die Schwächungsinformation auf eine Ebene 3 cm über der Auflagefläche des Objektes projiziert wird. Daher wurde die Petrischale am Rand auf zwei Acrylglasdeckel aufgestützt, so dass das Objekt exakt auf 3 cm über die Auflagefläche angehoben werden konnte. Diese Acrylglasdeckel befanden sich ausserhalb des eigentlichen Messfeldes (Abb. 4-4). Das Messfeld wurde für die ex-situ-Messung auf 25mm x 15mm eingeschränkt. Es wurde die maximal erreichbare Auflösung von 100µm x 100µm

(250 x 150 Pixel) und die minimal mögliche Messgeschwindigkeit von 1mm/s gewählt. Die Messdauer betrug 38 Minuten pro Femur einschliesslich des Scout-Views. Nach der DXA wurde das Gewicht jedes Femurs mit einer Präzisionswaage gemessen (Mettler PM 100, Mettler, Giessen). Die Länge sowie der antero-posteriore Durchmesser des Schaftes wurde mit Hilfe einer Schieblehre (Kaliper) bei 50% Knochenlänge bestimmt. Schliesslich wurde das Gesamtvolumen der Femora durch Wasserverdrängung nach dem Archimedesprinzip



Abbildung 4-4: DXA-Messung mit Anhebung der Petrischale auf 3cm über der Auflagefläche

ermittelt. Aus diesen Werten wurde die apparente Knochendichte errechnet, d.h. der Knochenmineralgehalt (BMC) aus der DXA dividiert durch das verdrängte Volumen.

Alle erhobenen Daten wurden mit dem Programm StatView 4.5 (Abacus Concepts, Berkley CA, USA) statistisch ausgewertet. Diese Auswertung umfasste

den Gruppenvergleich zwischen transgenen Tieren und Kontrolltieren, sowie geschlechtsspezifisch zwischen männlichen und weiblichen Tieren unter Verwendung eines nicht-parametrischen Testes (Mann-Whitney-U).

Zur Bestimmung der Messpräzision wurde der Variationskoeffizient ( $CV\% = \text{Standardabweichung} / \text{Mittelwert}$ ) für jeden Parameter bestimmt und der „Root-Mean-Square“ der individuellen Variationskoeffizienten als Mass der technischen Messpräzision nach Glüer et al. (1995) berechnet.

#### 4.4. Longitudinale Studie

Im zweiten longitudinalen Teil der Studie wurden 42 Mäuse über einen Zeitraum von 38 Wochen (9 Monate) unter In-vivo-Bedingungen untersucht. Von diesen überlebten 38 Tiere bis zum Ende der Studie. Vorzeitig verstorbene Tiere wurden rückwirkend aus der Studie ausgeschlossen. Zur abschließenden Auswertung kamen 10 weibliche Kontrolltiere und 10 weibliche transgene Mäuse sowie 7 männliche Kontrolltiere und 11 männliche transgene Mäuse. Die Messzyklen wurden während der Wachstumsphase engmaschiger gewählt als bei adulten Tieren. Die erste Messung fand 3 Wochen nach Geburt statt, weitere Messungen 6, 9, 12, 26, und 38 Wochen nach Geburt.

Für die DXA-Messung wurden die Versuchstiere narkotisiert. Die Narkose wurde mit einer Insulinspritze (1ml) und einer 0,4mm Kanüle intraperitoneal appliziert. Es wurde eine

Mischung aus 1 ml Ketamin 10% (Ketaminhydrochlorid), 0,25 ml Rompun 2% (Xylazin) und 5 ml physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) hergestellt. Die Dosierung betrug 0,5-3  $\mu$ l pro Gramm Körpergewicht, d.h. 100 mg/kg Körpergewicht Ketamin und 5 mg/kg Körpergewicht Xylazin. Da bei Anästhesierung kleiner Säugetiere die Gefahr einer tödlichen Unterkühlung besteht, wurden alle Versuchstiere im Anschluss an die Messung bis zum Erwachen auf eine Wärmeplatte mit 37°C gelagert. Die Augen der Tiere wurden durch Bepanthen<sup>R</sup>-Salbe vor Austrocknung geschützt.

## **5. Ergebnisse**

### **5.1. Messgeschwindigkeit**

Der Vergleich unterschiedlicher Messgeschwindigkeiten zeigte, dass mit zunehmender Geschwindigkeit die Präzisionsfehler (Reproduzierbarkeitsfehler) für den BMC und das Gesamtgewicht bei der leichteren Kontrollmaus geringfügig zunahm, während dies bei der transgenen Maus nicht beobachtet wurde. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde für alle folgenden Messungen eine Geschwindigkeit von 20mm/s gewählt.

### **5.2. Technische Präzision**

Die Präzisionsanalyse aller 28 Tiere der Querschnittstudie ergab einen relativen Anteil der individuellen Standardabweichungen am Mittelwert (CV%) von 0,9% für das mit der DXA ermittelte Gesamtkörpergewicht. Für den Knochenmineralgehalt (BMC) betrug der Präzisionsfehler 4,4% und für den prozentualen Anteil des BMC am Körpergewicht 4,5%. Die Präzisionswerte waren in allen Untergruppen relativ ähnlich (Tab. 5-2).

### 5.3. Biologische Variabilität

Die Variabilität der Messwerte zwischen den 28 Tieren betrug für den BMC 30% (CV%), für die BMD 9% und für den %BMC 15% (Tab.5-3). Die BMD und der %BMC zeigen im Unterschied zum BMC ein geringeres Mass an Streuung.

**Tabelle 5-1: Einfluss der Messgeschwindigkeit in der DXA auf die Reproduzierbarkeit (CV%) der Messung und die absoluten Messgrößen (g).**

Messgeschwindigkeit	5 mm/s	10 mm/s	20 mm/s	40 mm/s
<b>BMC Reproduzierbarkeit</b>				
Kontrolltier	1,2%	1,4%	1,8%	3,6%
Transgene Maus	1,8%	1,7%	0,8%	2,1%
<b>BMC Absolut</b>				
Kontrolltier	1,03g	1,02g	0,99g	1,05g
Transgene Maus	1,50g	1,51g	1,49g	1,44g
<b>Gewicht Reproduzierbarkeit</b>				
Kontrolltier	0,4%	0,9%	1,0%	2,1%
Transgene Maus	1,8%	0,8%	0,9%	0,5%
<b>Gewicht Absolut</b>				
Kontrolltier	40,5 g	39,9 g	38,0 g	37,5 g
Transgene Maus	47,4 g	46,5 g	46,1 g	44,2 g

BMC = bone mineral content = Knochenmineralgehalt (in g). Das auf der Waage bestimmte absolute Gewicht des Kontrolltieres betrug 41,0 g und das der transgenen Maus 47,9 g.

Ein Vergleich dieser Werte (Tab.5-3) mit der technischen Präzision der Messungen (Tab.5-2) ergab, dass die interindividuellen Unterschiede zwischen den Tieren um ein Vielfaches höher lagen als die Streuung der Werte bei Messwiederholungen. Somit ist eine verlässliche Unterscheidung zwischen den untersuchten Gruppen möglich und bis zu einem gewissen Grad auch zwischen den Tieren einer Gruppe.

**Tabelle 5-2: Technische Präzision (Reproduzierbarkeit) der DXA Messungen bei 20mm/s. CV% = Standardabweichung der 4 Messungen / Mittelwert x 100**

	Kontrollen männlich n = 7	Kontrollen weiblich n = 7	Transgene männlich n = 7	Transgene weiblich n = 7	Alle n = 28
Gewicht	1,0%	0,9%	1,0%	0,8%	0,9%
BMC	3,9%	2,9%	4,7%	5,7%	4,4%
% BMC	3,8%	3,1%	4,5%	6,0%	4,5%
BMD	1,9%	1,4%	1,9%	3,9%	2,5%

BMC= Knochenmineralgehalt in g; BMD = flächenprojizierte Knochenmasse in g/cm<sup>2</sup>; %BMC = prozentualer Anteil des BMC am Körpergewicht in %.

**Tabelle 5-3: Biologische Variabilität des BMC, der BMD, des Körpergewichtes und des %BMC zwischen den Tieren in den 4 Untersuchungsgruppen. CV% = Standardabweichung bei je 7 Tieren / Mittelwert x 100.**

	Kontrollen männlich n = 7	Kontrollen weiblich n = 7	Transgene männlich n = 7	Transgene weiblich n = 7	Alle n = 28
BMC	6,6%	16,2%	13,6%	18,4%	30,0%
BMD	5,9%	4,3%	4,2%	4,4%	9,0%
Gewicht (Waage)	4,7%	9,5%	10,2%	5,9%	12,0%
%BMC	4,3%	9,5%	6,8%	14,0%	15,0%

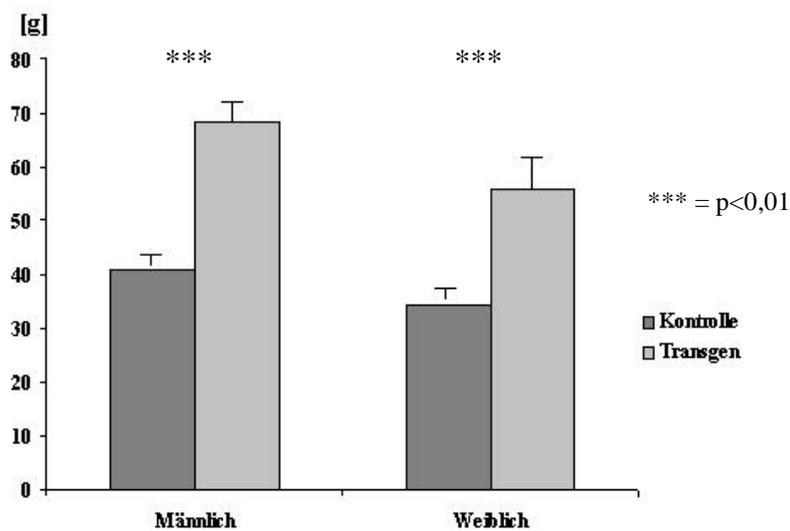
BMC= Knochenmineralgehalt in g; BMD = flächenprojizierte Knochenmasse in g/cm<sup>2</sup>; %BMC = prozentualer Anteil des BMC am Körpergewicht in %.

#### 5.4. Querschnittstudie - Ganzkörpermessung

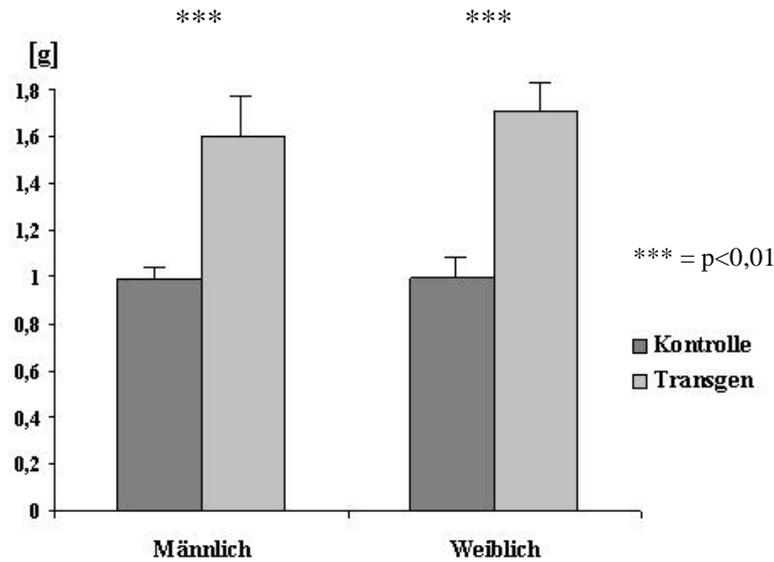
Das Gewicht der transgenen Mäuse lag mit  $55,7 \pm 3,2\text{g}$  (Weibchen) und  $68,2 \pm 6,9\text{g}$  (Männchen,) signifikant höher als bei den Kontrolltieren (Abb.5-1). Der Vergleich des mittels Waage gemessenen Körpergewichtes mit den durch DXA bestimmten Werten ergab bei den Kontrolltieren eine systematische Abweichung von  $-6,6 \pm 1,2\%$ ,  $p < 0,01$  ( $-7,5 \pm 0,7\%$  bei den Weibchen und  $-5,7 \pm 0,9\%$  bei den Männchen) für die DXA. Die systematische Abweichung bei den transgenen Mäusen lag bei  $-3,4 \pm 0,7\%$  ( $p < 0,01$ ) für die DXA ( $-3,8 \pm 0,57\%$  bei den Weibchen und  $-3,0 \pm 0,65\%$  bei den Männchen). Zwischen den Messungen (DXA vs. Waage)

existierte ein sehr hoher linearer Zusammenhang, der Korrelationskoeffizient betrug bei Berücksichtigung aller 28 Tiere  $r = 0,99$ . In allen 4 Gruppen wurden hohe Korrelationskoeffizienten ( $>0,98$ ) zwischen der Gewichtsbestimmung mit der DXA und mit der Waage beobachtet.

Die absolute Knochenmasse (BMC) lag bei den weiblichen Kontrolltieren etwas höher als bei den männlichen Tieren (+ 0,6%), der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (Abb. 5-2). Die transgenen Tiere wiesen gegenüber den Kontrolltieren eine wesentlich höhere Knochenmasse auf (+ 71% bei den weiblichen und + 62% bei den männlichen Tieren;  $p < 0,01$ ). Die Analyse der BMD (Knochenmasse pro Projektionsfläche) zeigte ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen transgenen Mäusen und Kontrolltieren, wenn auch weniger stark ausgeprägt als beim BMC (Abb. 5-4).

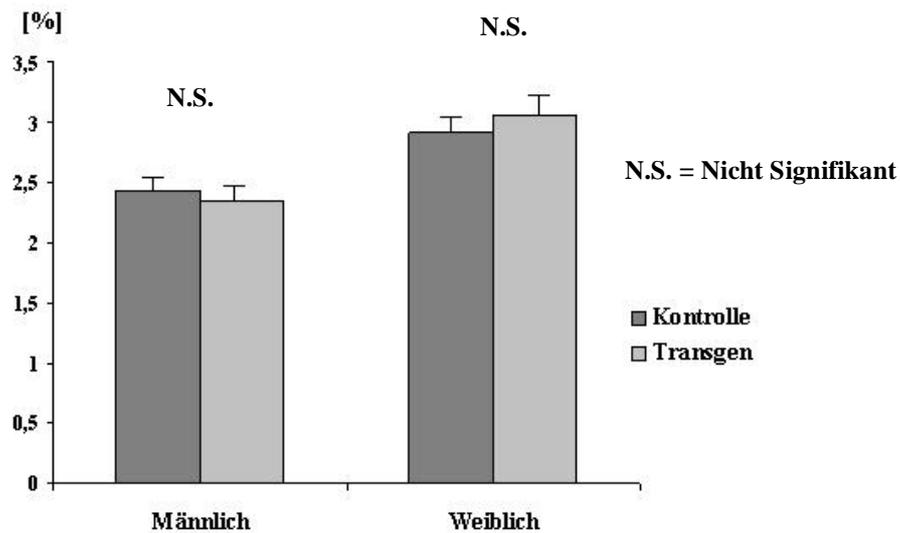


**Abb. 5-1: Befunde der Querschnittstudie – Körpergewicht in g**



**Abb. 5-2: Knochenmineralgehalt (BMC) in g**

Wenn man die Knochenmasse auf das Körpergewicht bezieht (%BMC), ergaben sich signifikant höhere Werte für das weibliche als für das männliche Geschlecht (+ 21%,  $p<0,01$ ). Der %BMC war bei transgenen und normalen Weibchen nahezu identisch (Differenz = 0,9%). Bei den Männchen lagen die transgenen Tiere mit  $-7,2\%$  ( $p<0,05$ ; Abb. 5-3) unter den Kontrollen.



**Abb. 5-3: Prozentualer Knochenmineralgehalt (%BMC)**

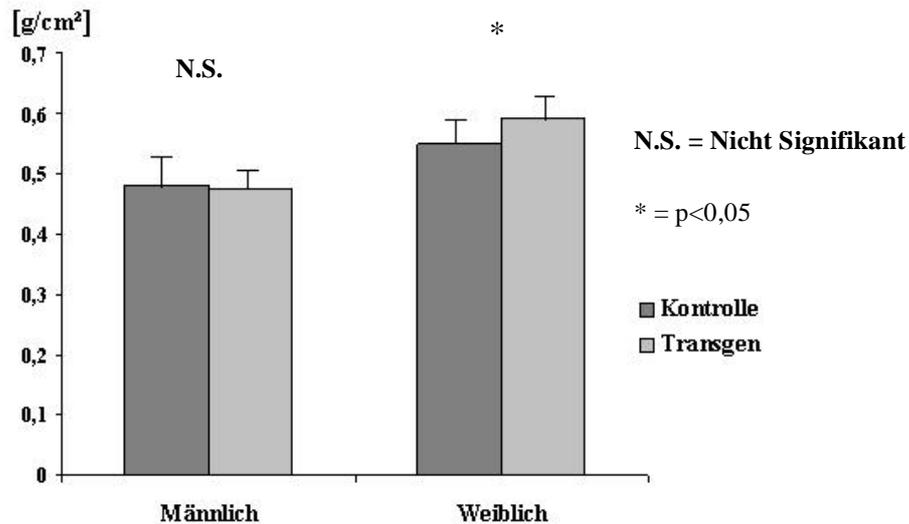


Abb. 5-4: Knochendichte (BMD) in g/cm<sup>2</sup>

### 5.5. Querschnittstudie – Messung des Femurs

Der femorale Knochenmineralgehalt (BMC) war mit  $30,9 \pm 4,6$  mg für die weiblichen Kontrollen und  $29,6 \pm 4,5$  mg für die männlichen Kontrollen nicht signifikant unterschiedlich. Bei den transgenen Tieren war der femorale Knochenmineralgehalt signifikant erhöht ( $51,1 \pm 8,9$  mg,  $p < 0,01$  bei Weibchen und  $48,4 \pm 4,7$  mg bei Männchen,  $p < 0,01$ ; Abb. 5-5). Der BMD lag bei Weibchen höher als bei Männchen und bei Kontrollen niedriger als bei transgenen Tieren (Abb. 5-7).

Die morphologischen Parameter Femurlänge, a.p.-Durchmesser, Femurgewicht und Volumen des Femurs waren zwischen männlichen und weiblichen Kontrolltieren nicht signifikant unterschiedlich, aber signifikant höher bei männlichen als bei weiblichen transgenen Mäusen (Tab. 5-4). Das Volumen des Femurs betrug bei den transgenen Weibchen  $87,9 \pm 7,6$  mm<sup>3</sup>, verglichen mit  $56,1 \pm 6,3$  mm<sup>3</sup> bei den weiblichen Kontrollmäusen und  $102,4 \pm 10,7$  mm<sup>3</sup> bei den transgenen Männchen, verglichen mit  $62,3 \pm 11,8$  mm<sup>3</sup> bei den männlichen Kontrollmäusen (Abb. 5-6). Die apparente Knochendichte (g/cm<sup>3</sup>) war bei den männlichen Kontrollmäusen niedriger ( $0,48 \pm 0,067$  g/ml) als bei den weiblichen Kontrollmäusen ( $0,55 \pm 0,051$  g/ml), der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant. Die transgenen Tiere wiesen keine signifikant höhere apparente Knochendichte als ihre gleichgeschlechtlichen Kontrollen auf (Abb. 5-7).

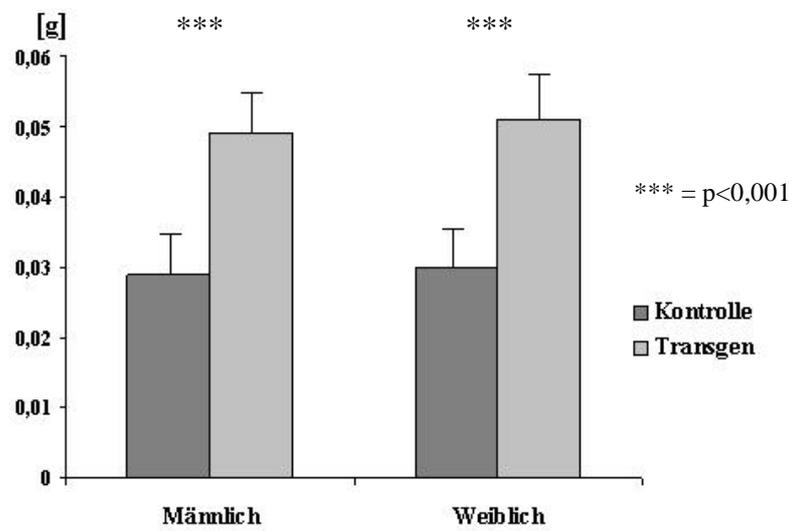


Abb. 5-5: Femoraler Knochenmineralgehalt (BMC) in g

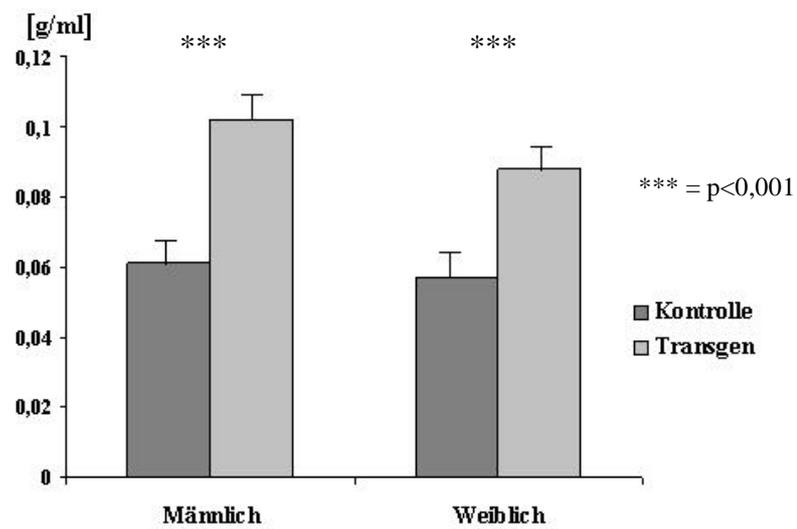
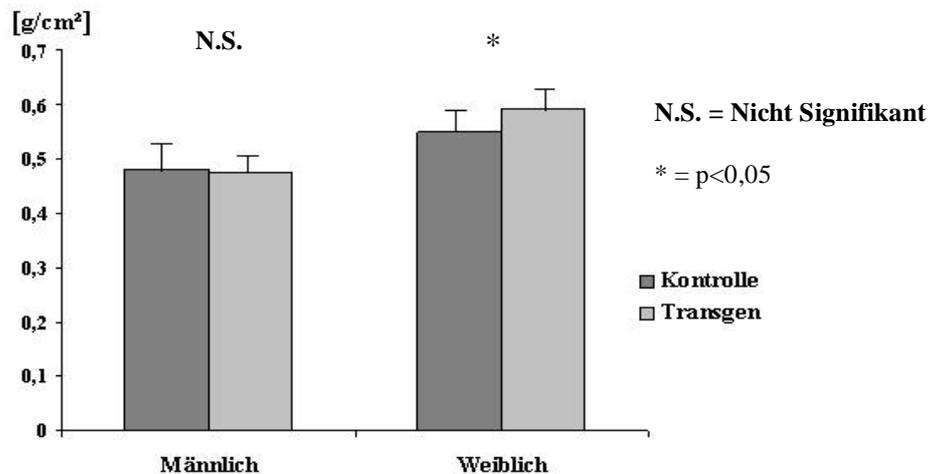


Abb. 5-6: Femorales Volumen in g/ml



**Abb. 5-7: Femorale Knochendichte (BMD) in g/cm<sup>2</sup>**

### 5.6. Longitudinale Studie

Abbildung 5-8 zeigt die Gewichtszunahme der untersuchten Tiere von Woche 3 bis 38. In der 3. Woche waren die Mäuse durchschnittlich 13 g schwer und zeigten noch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Im Alter von 6 Wochen hatte das Gewicht auf Werte von ca. 25 bis 40 g zugenommen. Die männlichen Kontrolltiere waren signifikant ( $p < 0,01$ ) schwerer als die weiblichen Kontrollen. Die transgenen Weibchen waren schwerer als die weiblichen Kontrollen (18,3%,  $p < 0,01$ ), die transgenen Männchen wiesen jedoch zu diesem Zeitpunkt noch keinen signifikanten Unterschied zu den männlichen Kontrolltieren auf (Abb. 5-8). Zu späteren Zeitpunkten waren die Unterschiede jedoch auch bei den Männchen signifikant, wobei die transgenen Männchen mit durchschnittlich 66g in der 38. Woche die insgesamt höchste Körpermasse aufwiesen (Tab. 5-5). Im Zeitraum von 26 bis 38 Wochen war bei den Kontrolltieren noch ein signifikanter Zuwachs an Körpermasse zu verzeichnen, nicht jedoch bei den transgenen Tieren (Abb. 5-8).

**Tabelle 5-4: Femorale Dimensionen**

	Kontrolle männlich n = 7	Kontrolle weiblich n = 7	Transgen männlich n = 7	Transgen weiblich n = 28
Femurlänge (mm)	15,7 ( $\pm$ 0,5)	15,9 ( $\pm$ 0,7)	18,4 ( $\pm$ 0,8)	17,1 ( $\pm$ 0,5)
a.p. Femur- Durchmesser (mm)	1,40 ( $\pm$ 0,11)	1,37 ( $\pm$ 0,07)	1,70 ( $\pm$ 0,09)	1,57 ( $\pm$ 0,09)
Femurgewicht (mg)	92,0 ( $\pm$ 6,7)	94,6 ( $\pm$ 10,4)	151,0 ( $\pm$ 13,5)	136,0 ( $\pm$ 12,3)

a.p. Femur = Messung des anterior – posterioren Durchmessers;

Der skeletale Mineralgehalt (BMC) nahm bei den Kontrolltieren bis zur 38. Woche kontinuierlich zu, während die Transgenen im Alter von 26 Wochen eine „Peak Bone Mass“ erreichten und die Werte danach nicht mehr signifikant zunahmten (Abb. 5-9). Während die männlichen Kontrolltiere konstant höhere Werte aufweisen als die weiblichen Kontrollen, überholten die transgenen Weibchen die transgenen Männchen im Lebensalter von 12 Wochen. Während die transgenen Männchen von der 6. bis zur 26. Woche stets signifikant höhere BMC-Werte aufwiesen als die Kontrollen, ergab sich bei 38 Wochen durch die weitere Zunahme bei den Kontrolltieren und die leichte Abnahme bei den transgenen Tieren kein signifikanter Unterschied mehr (Tab. 5-8).

Der prozentuale Anteil des Knochenmineralgehaltes am Körpergewicht nahm von ca. 1% in der 3. Lebenswoche auf Werte zwischen 2,5 und 4% in der 38. Woche zu (Abb. 5-10). Ab der 6. Lebenswoche wiesen die transgenen Weibchen gegenüber den gleichgeschlechtlichen Kontrollen signifikant höhere Werte auf. Dies galt jedoch nicht für die Männchen, die tendenziell sogar eher niedrigere Werte aufwiesen als die Kontrollen (Tab. 5-10).

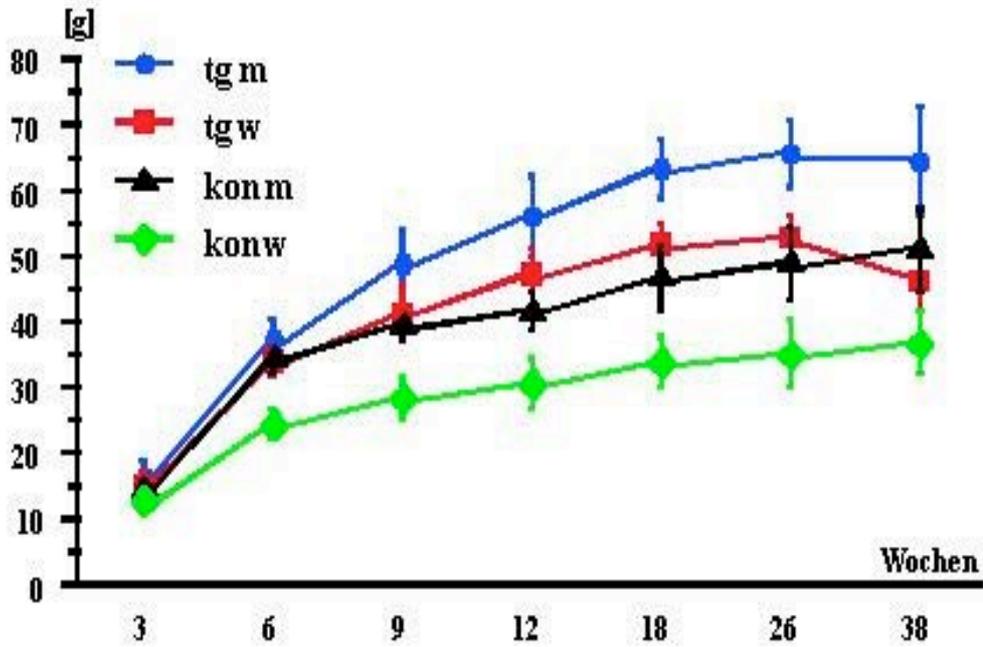


Abb. 5-8: Körpergewicht von der 3. bis zur 38. Lebenswoche in g

Tab. 5-5: Durchschnittliches Körpergewicht (in g) von 3-38 Lebenswochen

Wochen	Kontrolle		Transgen	
	männlich	weiblich	männlich	weiblich
3	14,5 ± 1,0	13,2 ± 1,5	16,0 ± 2,8	15,3 ± 1,9
6	34,3 ± 2,0	25,1 ± 2,3	37,2 ± 2,8	34,5 ± 3,5
9	39,3 ± 1,9	28,6 ± 3,1	49,2 ± 4,8	42,0 ± 4,4
12	41,7 ± 2,6	31,2 ± 3,5	56,7 ± 5,9	47,8 ± 4,4
18	46,8 ± 4,9	34,3 ± 3,7	63,6 ± 4,7	52,4 ± 3,6
26	50,2 ± 5,2	36,2 ± 4,5	65,4 ± 4,4	55,2 ± 3,9
38	52,3 ± 6,3	38,5 ± 5,3	66,1 ± 8,5	52,3 ± 9,6

Tab. 5-6: Gruppendifferenzen im Körpergewicht von 3-38 Lebenswochen

	Männliche vs. weibliche Kontrolle	Transgen weiblich vs. Kontrolle	Transgen männlich vs. Kontrolle
3	+ 9%	+ 16%	+ 11%
6	+ 37% ***	+ 37% ***	+ 8% *
9	+ 37% ***	+ 47% ***	+ 25% ***
12	+ 33% ***	+ 53% ***	+ 36% ***
18	+ 36% ***	+ 53% ***	+ 36% ***
26	+ 39% ***	+ 53% ***	+ 30% ***
38	+ 36% ***	+ 36% ***	- 26% ***

Signifikanzniveau: \* =  $p < 0,05$  ; \*\* =  $p < 0,016$  ; \*\*\* =  $p < 0,0033$

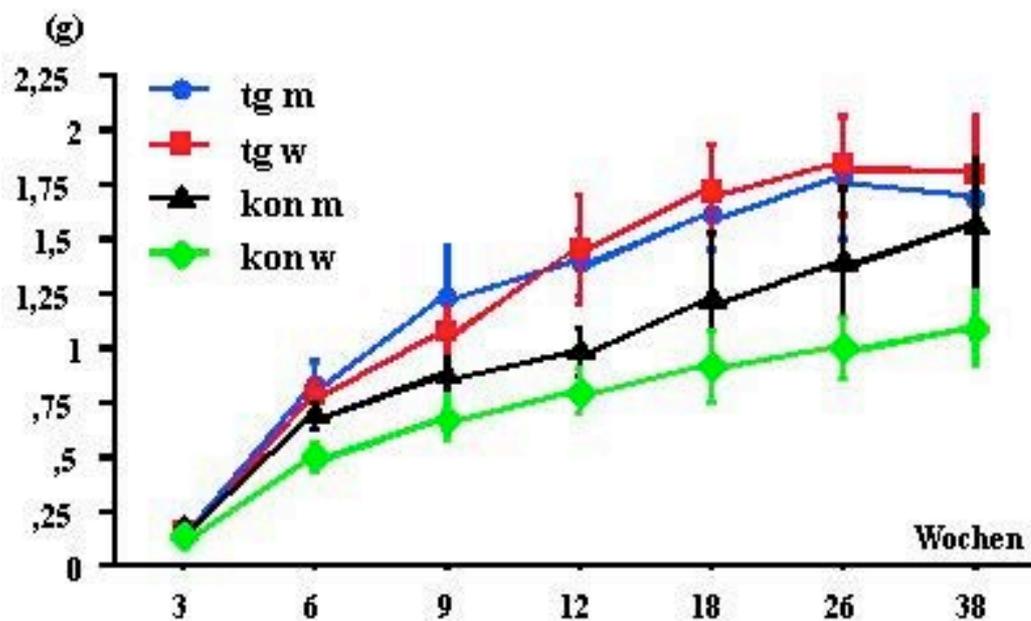


Abb. 5-9: Knochenmineralgehalt von der 3. bis zur 38. Lebenswoche in g

**Tab. 5-7: Durchschnittlicher Knochenmineralgehalt (BMC) von 3-38 Lebenswochen (g)**

Wochen	Kontrolle		Transgen	
	männlich	weiblich	männlich	weiblich
3	0,21 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0,22 ± 0,04	0,20 ± 0,04
6	0,64 ± 0,07	0,51 ± 0,05	0,73 ± 0,09	0,69 ± 0,08
9	0,79 ± 0,06	0,64 ± 0,07	1,04 ± 0,15	1,06 ± 0,12
12	0,89 ± 0,11	0,76 ± 0,09	1,28 ± 0,12	1,24 ± 0,11
18	1,07 ± 0,13	0,87 ± 0,13	1,60 ± 0,21	1,67 ± 0,24
26	1,28 ± 0,39	0,91 ± 0,11	1,66 ± 0,26	1,73 ± 0,26
38	1,30 ± 0,21	1,00 ± 0,13	1,49 ± 0,11	1,71 ± 0,21

**Tab. 5-8: Gruppendifferenzen im Knochenmineralgehalt (BMC) von 3-38 Lebenswochen**

	Männliche vs. weibliche Kontrolle	Transgen weiblich vs. Kontrolle	Transgen männlich vs. Kontrolle
3	+ 17%	+ 12%	+ 6%
6	+ 26% ***	+ 36% ***	+ 14% *
9	+ 25% ***	+ 66% ***	+ 31% ***
12	+ 18% *	+ 63% ***	+ 43% ***
18	+ 23% *	+ 91% ***	+ 49% ***
26	+ 40% **	+ 89% ***	+ 30% **
38	+ 29% ***	+ 71% ***	+ 15% *

Signifikanzniveau: \* =  $p < 0,05$  ; \*\* =  $p < 0,016$  ; \*\*\* =  $p < 0,0033$

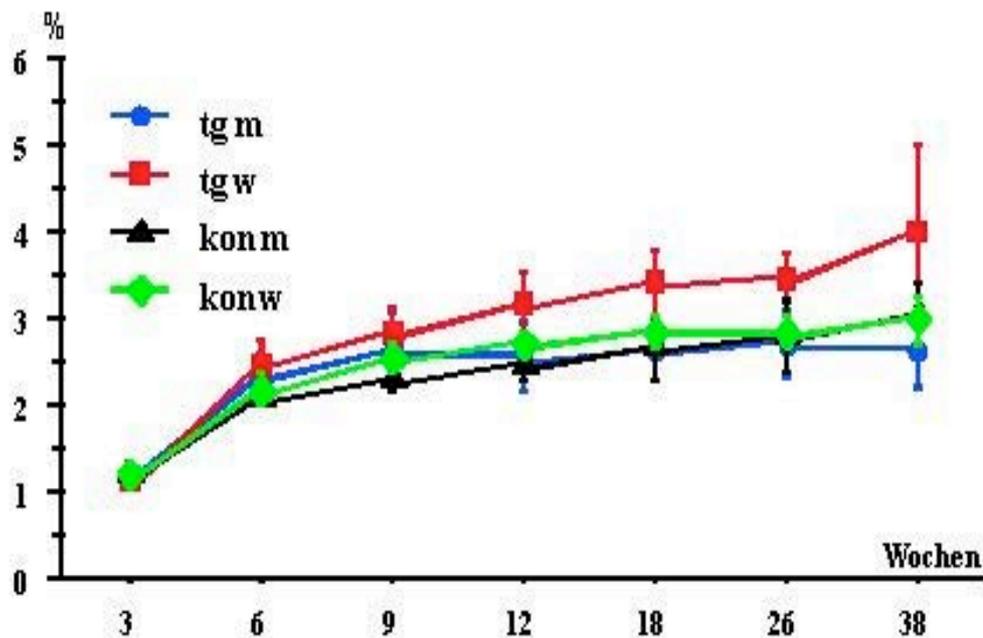


Abb. 5-10: Prozentualer Knochenmineralgehalt von der 3. bis zur 38. Lebenswoche

Tab. 5-9: Durchschnittlicher prozentualer Knochenmineralgehalt (%BMC) von 3-38 Lebenswochen

Wochen	Kontrolle		Transgen	
	männlich	weiblich	männlich	weiblich
3	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,2
6	1,9 ± 0,2	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,3
9	2,0 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,1 ± 0,3	2,5 ± 0,1
12	2,1 ± 0,2	2,4 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,6 ± 0,1
18	2,3 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,4	3,2 ± 0,4
26	2,5 ± 0,5	2,5 ± 0,2	2,6 ± 0,4	3,1 ± 0,4
38	2,5 ± 0,3	2,6 ± 0,1	2,3 ± 0,2	3,4 ± 0,6

**Tab.5-10: Gruppendifferenzen im prozentualen Knochenmineralgehalt von 6-38 Lebenswochen**

	<b>Männliche vs. weibliche Kontrolle</b>	<b>Transgen weiblich vs. Kontrolle</b>	<b>Transgen männlich vs. Kontrolle</b>
3	+ 6%	- 4%	- 4%
6	- 8%	- 1%	+ 5%
9	- 9%*	+ 13%***	+ 5%
12	- 12%***	+ 7%**	+ 6%
18	- 10%*	+ 25%***	+ 10%
26	- 1%*	+ 24%***	+ 2%
38	- 5%	+ 31%***	- 8%

Signifikanzniveau: \* =  $p < 0,05$  ; \*\* =  $p < 0,016$  ; \*\*\* =  $p < 0,0033$

## 6. Diskussion

Ziel der vorliegenden Studie war die Analyse der Auswirkung supraphysiologischer GH-Spiegel auf den Knochenmineralstatus am Modell der GH-transgenen Maus. Zusätzlich wurde die Präzision eines DXA-Gerätes für die nicht-invasive Analyse des Knochenmineralstatus an der Maus bestimmt.

Es wurden die folgenden konkreten Fragen untersucht:

1. Ist die Zweiennergie-Röntgen-Absorptiometrie geeignet, eine präzise, d.h. reproduzierbare Analyse der Knochenmasse an der GH-transgenen Maus durchzuführen?
2. Findet sich bei den transgenen Tieren ein Zuwachs an Knochenmasse, welcher proportional zur Zunahme des Körpergewichtes ist, oder fällt dieser geringer oder höher als die Gewichtszunahme aus?
3. Ist ein möglicherweise anaboler Effekt, d.h. eine höhere Knochenmasse, bei männlichen und weiblichen transgenen Tieren identisch oder unterschiedlich ausgeprägt?
4. Erreichen die transgenen Tiere im Laufe des Lebens eine „Peak Bone Mass“, also einen Zeitpunkt der höchsten Knochenmasse oder liegt ein kontinuierlicher Anstieg des Knochenmineralgehaltes bis in das hohe Alter vor?

## 6.1. Methodikdiskussion

Während Brunton et al. (1993) kleine Schweine untersuchten und konstatierten, dass die DXA für Messungen am kleineren Objekt noch nicht hinreichend einsatzfähig sei, steht seit kurzer Zeit diese Technologie mit neu adaptierter Hard- und Software zur Verfügung, die auch eine Messung am Kleintier ermöglicht. Bisher wurden Messungen am Tiermodell hauptsächlich an der Ratte vorgenommen (Grier 1996; Makan 1997; Rose 1998). Für präzise Untersuchungen an der Maus fehlte bislang die erforderliche Auflösung (Sandstedt 1996; Ammann 1997). Erst durch eine weitere Verbesserung der Hard- und Software konnte die Messung auch an sehr kleinen Objekten durchgeführt werden.

Jilka et al. (1996) verglichen den Knochenmineralgehalt von 47 Mäusen gemessen mit DXA mit der Analyse der Veraschung und der chemischen Analyse und konnten eine hohe lineare Korrelation von  $r^2 = 0,96$  für den Knochenmineralgehalt des ganzen Körpers aufzeigen. Auch unsere Analyse des Knochenmineralgehaltes mittels DXA wurde durch Veraschung überprüft (Eckstein et al. 2002). Der Knochenmineralgehalt mittels DXA wies ebenfalls eine hohe Korrelation mit der Veraschung auf ( $r = 0,97$ ; Eckstein et al. 2002).

Klein et al. (1998) untersuchten 12 Wochen alte Mäuse und fanden ebenso eine hohe lineare Korrelation des Knochenmineralgehaltes aus der DXA mit der Veraschung ( $r^2 = 0,96$ ). Die Präzision ihrer Messungen lag bei  $1,0 \pm 0,5\%$  (CV%) für den BMC und bei  $1,7 \pm 0,3\%$  für den BMD. Die Autoren gaben jedoch weder Aufschluss über die Anzahl der Tiere, die analysiert wurden, noch Informationen über die genaue Versuchsdurchführung der Präzisionsmessung oder die Anzahl der Wiederholungsmessungen. Nagy und Claire (2000) ermittelten ebenfalls die Validität der DXA im Vergleich mit Veraschung und chemischer Analyse bei 25 männlichen Mäusen im Alter von 6 bis 11 Wochen (19g bis 29g). Die Werte aus der DXA betragen für den Knochenmineralgehalt der Mäuse aus der Veraschung 100%, für die Weichteilmasse 97%, und für den Fettgehalt 209% (chemische Analyse). Die Autoren stellten fest, dass auch das nicht-knöchernen Körpergewebe relevante Mengen an Mineralgehalt aufweist (z.B. bei Arteriosklerose) und die DXA den Knochenmineralgehalt valide bestimmt, den Gesamtkörper-Mineralgehalt aber unterschätzt. Auch in unserer Validierung (Eckstein et al. 2002) unterschätzte die DXA den Knochenmineralgehalt im Vergleich zur Veraschung des gesamten Körpers um etwa 30%. Dies ist unserer Auffassung nach – jedoch abweichend zu Nagy und Clair (2000) – auf den nichterfassten Mineralgehalt kleinerer Knochen mittels DXA zurückzuführen. Hinsichtlich des Fettgehaltes machten wir ebenso eine gegenteilige Feststellung (Eckstein et al. 2002). Während bei Nagy und Clair (2000) der Fettgehalt überschätzt wurde, unterschätzte die DXA in unserer Studie den

Fettgehalt im Vergleich zur chemischen Analyse (Eckstein et al. 2002). Eine schlüssige Erklärung für diese Diskrepanz haben wir nicht.

Jilka et al. (1996) untersuchten die Reproduzierbarkeit von Messungen der flächenprojizierten Knochendichte (BMD) bei 32 Mäusen mit der DXA. Für die Ganzkörperregion lag der Variationskoeffizient der zweifachen Wiederholungsmessung bei 2,2%, für die Wirbelsäule bei 2,2% und für die Hinterläufe bei 3,1%. Dies steht im Einklang mit unseren Ergebnissen, der CV% lag bei unseren Messungen bei 2,5% für den Ganzkörper-BMD. In der vorliegenden Studie wurde bei der Ganzkörperregion der Schädel jedoch nicht ausgespart. Die Repositionierung in unserer Versuchsanordnung erfolgte vier Mal an jeweils unterschiedlichen Tagen nach neuer Kalibrierung des Gerätes und lässt damit eine robustere Einschätzung als diejenige von Jilka und Mitautoren zu, die nur 2 Messungen am gleichen Tag vornahmen.

Wie auch bei Jilka et al. (1996) erfolgten die Messungen des skelettalen BMC durch Nagy und Clair (2000) unter Aussparung des Schädels, da das Messfeld mit nur 80 x 65 mm eine Analyse grösserer Tiere nicht zuließ. Die Messungen in der vorliegenden Studie erfolgten unter Einbeziehung des Schädels; hierbei erzielten wir ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der Präzision (Lochmüller et al. 2001, Eckstein et al. 2002). In einer detaillierten Analyse zeigte sich eine Abhängigkeit der Präzision vom Körpergewicht der Versuchstiere (Lochmüller et al. 2001). Es konnte gezeigt werden, dass der Knochenmineralgehalt bei 10g und 20g schweren Tieren mit moderater Präzision durchführbar ist (CV% = 12,8% bzw. 9,7%), und bei 40g und 60g schweren Tieren mit guter Präzision (CV% = 3,5% bzw. 5,6%). Bei Mäusen mit geringem Körpergewicht (10g und 20g) war die Präzision ausreichend, um Unterschiede zwischen Gruppen zu ermitteln. Bei schwereren Mäusen (40g und 60g) war darüber hinaus eine präzise Differenzierung zwischen Tieren mit höherem und niedrigerem Knochenmineralgehalt innerhalb einer Gruppe möglich (Lochmüller et al. 2001).

Die Aufnahmegeschwindigkeit von 20mm/s in der vorliegenden Studie hat möglicherweise einen Einfluss auf die Präzision der Messung (Lochmüller et al. 2001). Da jedoch der Einsatz am narkotisierten Tier anvisiert wurde und die Dauer der intraperitonealen Anästhesie den limitierenden Faktor darstellte, entschieden wir uns gegen eine niedrigere Messgeschwindigkeit. Die gesamte Messung, einschliesslich Erstellung des Übersichtsbildes sowie die Positionierung des Tieres auf der Messfläche musste in 20 Minuten durchführbar sein.

Die Präzision der Knochendichtemessung (BMD) war durchweg höher als die Präzision der Messung des BMC. Während bei den 10g und 20g Mäusen der CV% bei 4,9%

bzw. 4,5% lag (BMD), betrug er bei den 40g Mäusen 1,7% und bei den 60g Tieren 3,1%. Die BMC Werte waren bei den 60g Mäusen ca. zwanzig Mal höher als bei den 10g Mäusen, die BMD jedoch nur doppelt so hoch. Es muss darauf hingewiesen werden, dass die mittels DXA bestimmte BMD keine tatsächliche volumetrische Dichte ( $\text{g/cm}^3$ ) darstellt, sondern eine Flächen-korrigierte Knochenmasse ( $\text{g/cm}^2$ ). Da die Zweienergie-Röntgen-Absorptiometrie ein zweidimensionales Projektionsverfahren ist, wird neben der Knochenmasse (BMC) auch die Flächengröße des Knochens angegeben und daraus die „flächenhafte Knochendichte“ (BMD) errechnet. Die BMD ist aber abhängig von der Knochentiefe. Es ist demnach sinnvoll, die BMD bei Studien zu bestimmen, bei denen die Knochengröße gleich ist, nicht jedoch bei Versuchstieren mit unterschiedlichen Körperdimensionen.

Die technische Reproduzierbarkeit in den Studien von Jilka et al. (1996), Klein et al. (1998), Nagy und Clair (2000), und unserer Studie ist geringer im Vergleich zur Reproduzierbarkeit, die in der Osteoporosediagnostik mittels DXA beim Menschen erzielt wird. Bei Messung der lumbalen Wirbelsäule beim Menschen wurden Werte (CV%) von 0,5-1,5% angegeben (Genant et al. 1996). Am proximalen Femur wurde die Präzision mit 1-5% beschrieben (Adams 1997). In Anbetracht der viel geringeren Knochendimensionen sowie den höheren technischen Anforderungen hinsichtlich der Auflösung sind die Präzisionsfehler bei der Maus jedoch erstaunlich gering.

Zusammenfassend können wir feststellen, dass die vorliegende Präzisionsanalyse unter sehr „konservativen“ Bedingungen durchgeführt wurde. Die Wiederholungsmessungen wurden nicht am gleichen Tag vorgenommen, es erfolgte eine erneute Kalibrierung der Messapparatur und neue Positionierung der Versuchstiere.

Aus den in der vorliegenden Studie erhaltenen Werten wurde die Reproduzierbarkeit in der von Glüer et al. (1995) angegebenen Weise als „Root Mean Square“ (RMS) errechnet, nicht als Mittelwert oder Median. Aus der Arbeit von Glüer kann abgeleitet werden, dass bei 4 Wiederholungsmessungen die Freiheitsgrade für Präzisionsanalysen bei Gruppen von 10 bis 14 Tieren zwischen 30 und 42 variieren. Dabei liegt der CV% im Bereich von  $\pm 30\%$  der tatsächlichen Standardabweichung in der Grundgesamtheit (95% Konfidenzintervall). Daher kann die Reproduzierbarkeit dieser Studie als repräsentativ für Messungen auch bei grösseren Zahlen an Versuchstieren gelten. Voraussetzung dafür ist lediglich die Anwendung der gleichen Rahmenbedingungen, wie z.B. dieselbe Hard- und Software, Messgeschwindigkeit, Auflösung sowie die gleiche Positionierung der Versuchstiere. In der Vergleichsliteratur (Jilka et al. 1996, Makan et al. 1997, Klein et al. 1998, Rose et al. 1998, Feely et al. 2000,

Nagy und Clair 2000) wurde die Reproduzierbarkeit dagegen als arithmetischer Mittelwert der einzelnen Variationskoeffizienten angegeben, welcher niedrigere Werte erzeugt.

## **6.2. Diskussion der Befunde**

### **6.2.1. Diskussion der Querschnittstudie**

Weibliche und männliche nicht-transgene NMRI-Mäuse wiesen nach unseren Messungen eine sehr ähnliche Gesamtknochenmasse auf, jedoch fanden wir bei den weiblichen Tieren aufgrund des niedrigeren Körpergewichtes einen höheren relativen Anteil Knochenmasse am Körpergewicht als bei den männlichen Tieren. Schiessl et al. (1998) beobachteten, dass nach Einsatz der Geschlechtsreife und vor Erreichen der Menopause beim weiblichen Geschlecht ein höherer relativer Anteil an Knochen am Gesamtgewicht zu beobachten ist. Dies wurde auf eine Östrogen-bedingte Verschiebung der Empfindlichkeitsschwelle des Knochens gegenüber mechanischen Reizen zurückgeführt. In der vorliegenden Studie war dieser höhere relative Anteil an Knochen am Gesamtgewicht auch bei den transgenen Weibchen nachweisbar. Es lässt sich also ableiten, dass der mögliche modulierende Effekt von Östrogen auf GH (Sandstedt et al. 1994, 1996; Ohlsson et al. 1998) keine Verschiebung des Verhältnisses von Knochenmasse zu Körpergewicht zwischen den Geschlechtern hervorruft.

Obwohl bei GH-transgenen Mäusen ein unterschiedlicher Effekt von GH auf die Dickenzunahme und das Längenwachstum der Knochen von weiblichen und männlichen Versuchstieren beschrieben wurde (Wolf et al. 1991 a,b), hat dies offensichtlich keinen Einfluss auf das Geschlechts-spezifische Verhältnis der Knochenmasse (BMC) zum Gesamtgewicht der Tiere. Wolf und Mitautoren (1991) stellten bei transgenen Männchen eine Zunahme des appositionellen Wachstums, also der Knochendicke fest, bei den Weibchen vor allem eine Längenzunahme. Interessanterweise wiesen die transgenen Tiere in unserer Studie zwar einen signifikant höheren absoluten BMC und eine höhere BMD auf, jedoch ist der prozentuale Anteil des BMC am Körpergewicht bei den weiblichen Transgenen ähnlich, bei den Männchen sogar signifikant niedriger als bei den Kontrolltieren. Diese Befunde stehen in prinzipieller Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Wolf et al. (1991 a,b), dass die äusseren Dimensionen der Knochen in der Regel bei den transgenen Tieren nicht grösser sind, wenn sie auf das Körpergewicht bezogen werden.

Sandstedt et al. (1996) konnten zeigen, dass die anabole Wirkung des GHs bei ovariectomierten bGH-transgenen Mäusen ausbleibt. Es wurde vermutet, dass Östrogen die GH-Rezeptoren der Osteoblasten moduliert. Demnach lässt sich spekulieren, dass die

Abnahme der relativen Knochenmasse bei den bGH transgenen Männchen durch das Fehlen des Östrogens bedingt ist, welches bei den Weibchen für eine stärkere Wirkung der hohen GH-Spiegel am Knochen sorgt. Es kann jedoch anhand der vorliegenden Befunde festgestellt werden, dass durch supraphysiologische GH-Spiegel beim wachsenden Tier nur die absolute Knochenmasse, nicht hingegen der relative Knochenanteil am Körpergewicht gesteigert werden kann. Ein überproportionaler Profit des Skelettsystems vom Hormonüberschuss kann nicht verzeichnet werden.

### 6.2.2. Diskussion der Befunde am Femur

Männliche und weibliche GH-transgene Mäuse zeigen nicht nur einen deutlichen Anstieg der Knochengrösse des Femurs, sondern auch einen proportionalen Anstieg der femoralen Knochenmasse. Wir konnten daher weder bei männlichen noch bei weiblichen transgenen Tieren eine GH-induzierte Erhöhung der apparenten volumetrischen Knochendichte am Femur feststellen. Hinsichtlich der Femurgrösse scheinen männliche Versuchstiere stärker von den erhöhten GH-spiegeln zu profitieren als weibliche; sie wiesen einen grösseren Zuwachs an Femurlänge, -durchmesser und -volumen auf. Die weiblichen Mäuse wiesen hingegen eine höhere volumetrische Knochendichte auf als die Männchen.

Bei den Kontrollmäusen ermittelten wir Mittelwerte von etwa 30mg für den femoralen Knochenmineralgehalt. Beamer et al. (1996) verglichen die Femora von 11 verschiedenen Inzuchtstämmen bei 12 Monate alten Mäusen mittels pQCT und fanden Mittelwerte von 15,3 bis 27,4mg. Unsere Werte für den Knochenmineralgehalt lagen etwas höher als bei diesen Autoren, allerdings war auch das femorale Volumen mit  $56\text{mm}^3$  bei unseren Kontrollmäusen ebenfalls höher, im Vergleich zu  $30 - 45\text{mm}^3$  bei Beamer und Mitautoren (1996). Die volumetrische Knochendichte unserer weiblichen Kontrollmäuse lag mit  $0,55\text{g/ml}$  genau im Bereich der von Beamer et al. (1996) ermittelten Werte ( $0,45 - 0,69\text{g/ml}$ ). In einer ergänzenden Untersuchung konnte eine befriedigende Präzision von Wiederholungsmessungen an Mäusefemora mit dem in unserer Studie verwendeten Gerät ermittelt und deren hohes lineares Verhältnis zu Veraschungsanalysen gesichert werden (Eckstein et al. 2002).

Hohe Serumspiegel an GH bewirken bei beiden Geschlechtern einen proportionalen Anstieg des Körpergewichtes und femoralen Knochenmineralgehaltes. Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass die Relation der mechanischen Kraft, welche auf das Femur wirkt und der femoralen Knochenmasse nicht durch hohe Serumspiegel an GH verändert wird. Obwohl männliche Tiere ein signifikant höheres Körpergewicht aufwiesen, war bei

weiblichen Mäusen der femorale Knochenmineralgehalt etwas höher. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit der Theorie von Schiessl et al. (1998), dass ein höherer Anteil an Knochenmasse beim weiblichen Geschlecht auf eine durch Östrogen bedingte höhere Sensitivität des Knochens gegenüber mechanischen Reizen zurückzuführen sein könnte. Dieser Östrogen-bedingte Effekt scheint transgene Weibchen in gleichem Ausmass zu betreffen wie Kontrollweibchen. Die von Sandstedt et al. (1994; 1996) und Ohlsson et al. (1998) beschriebene Modulation des GHs durch Östrogen und Testosteron scheint also auch keinen Einfluss auf das Verhältnis von femoraler Knochenmasse zu Körpergewicht bei beiden Geschlechtern zu haben.

Die Beobachtung einer unveränderten apparenten volumetrischen Knochendichte des Femur bei transgenen Tieren steht im Widerspruch zu Befunden von Saban et al. (1996), welche eine erhöhte Knochendichte der Wirbelkörper bei GH-transgenen Mäusen mit  $\beta$ -Globinpromotor berichteten. Diese Autoren benutzten jedoch eine zweidimensionale Röntgentechnik und ermittelten daher eine flächenprojizierte Knochendichte anstatt einer volumetrische Knochendichte, wobei der Effekt unterschiedlicher Knochendimensionen nicht vollständig eliminiert werden kann. Unsere Ergebnisse stehen jedoch im Einklang mit denjenigen von Sandstedt et al. (1996), die bei MT-bGH-transgenen Mäusen in 6mm Schnitten der Tibia und Wirbelkörper eine unveränderte Knochendichte feststellten. Rosen et al. (1995) fanden eine Zunahme der Knochengrösse und des Mineralgehaltes, aber eine Abnahme der volumetrischen Knochendichte bei Ratten nach Applikation von GH und IGF-I.

Unsere Befunde schliessen jedoch nicht mögliche Unterschiede in der Knochenstruktur, der trabekulären Mikroarchitektur und der mechanischen Eigenschaften der Knochen bei transgenen Tieren aus. Tseng et al. (1996) konnten an kortikalen Knochenzylindern von hGH-transgenen Mäusen eine signifikant verminderte biomechanische Festigkeit nachweisen. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen beobachteten die Autoren mit der Micro-CT signifikant grössere Knochendimensionen bei den transgenen Tieren, bei der histomorphometrischen Analyse der Humeri jedoch grössere Inseln von Knorpelzellen und Geflechtknochen in der Kortikalis. Der Zuwachs an kortikaler Fläche in Schaftmitte war nicht mit einem proportionalem Zuwachs an Biegesteifigkeit verbunden. Diese Befunde konnten Tseng und Mitautoren auch in einer nachfolgenden Studie über verschiedene Lebensalter bestätigen (Tseng et al. 1998).

Die vorliegende Analyse des Knochenmineralgehaltes mittels DXA wurde durch eine nachfolgenden Studie mit der Mikro-CT ergänzt (Eckstein et al. 2002). Es zeigte sich dabei in Analogie zur vorliegenden Studie, dass der Zuwachs an kortikalem Knochen nicht grösser

war als der Zuwachs der Gesamtknochengrösse. Es konnte eine substantielle Zunahme an trabekulärer Knochendichte bei den transgenen Weibchen verzeichnet werden, nicht aber bei den transgenen Männchen. Bei beiden Geschlechtern fand sich eine Abnahme der Knochengewebedichte bei ausschliesslicher Betrachtung der mineralisierten Matrix.

Eine unterschiedliche, dysproportionale Ausprägung des anabolen Effektes auf verschiedene Knochen der transgenen Tiere wurde von Wolf et al. (1991a,b) beschrieben. Dabei profitierten bei bGH-transgenen Mäusen manche Knochen (z.B. Radius) wesentlich stärker als andere vom anabolen Effekt. In unserer Studie hingegen war der Zuwachs an femoralem Knochenmineralgehalt proportional zum gesamten Zuwachs an Knochenmasse.

### 6.2.3. Diskussion der longitudinalen Studie

Männliche transgene Mäuse wiesen ab der 9. Woche ein signifikant höheres Körpergewicht auf als die gleichgeschlechtlichen Kontrolltiere, die transgenen Weibchen schon ab der 6. Woche. Die transgenen Männchen erreichen ein durchschnittliches Maximalgewicht von  $66,05 \pm 8,5\text{g}$  in der 38. Woche, die transgenen Weibchen von  $55,19 \pm 3,9\text{g}$  in der 26. Woche. Diese Befunde stehen in Einklang mit Wolff et al. (1991), die ein Anwachsen von transgenen Mäusen auf das 1,5 bis 2-fache des normalen Körpergewichtes unter supraphysiologischen GH-Spiegeln beschrieben hatten. Im Vergleich zur Querschnittstudie lagen die Kontrollmäuse der longitudinalen Studie im Alter von 12 Wochen mit ihrem Körpergewicht etwa im gleichen Bereich, die transgenen Mäuse aus der longitudinalen Studie wiesen jedoch ein etwas geringeres Körpergewicht auf als in der Querschnittstudie. Bei den Kontrolltieren verzeichneten wir im Zeitraum von 26 bis 38 Wochen noch einen signifikanten Zuwachs an Körpermasse, nicht jedoch bei den transgenen Tieren. Bemerkenswerterweise fallen die transgenen Weibchen von der 26.-38. Lebenswoche mit dem Körpergewicht sogar signifikant ab. Auch der durchschnittliche skelettale Mineralgehalt fällt in dieser Zeit von 1,73g auf 1,71g ab. Der prozentuale Knochenmineralgehalt (%BMC) steigt von der 26. bis zur 38. Woche bei den transgenen Weibchen sogar signifikant an, während er bei den Männchen abnimmt. Dieser Anstieg des prozentualen Knochenmineralgehaltes ist unserer Auffassung nach darauf zurückzuführen, dass die Abnahme an Körpergewicht deutlich grösser war als die Abnahme an mineralisiertem Gewebe. Die signifikante Abnahme an Körpergewicht ist am ehesten auf die Kachexie zurückzuführen, die bei transgenen Tieren bereits als Folge der hohen Serumspiegel an GH beschrieben wurde (Brem et al. 1989; Wolff et al. 1991;1993) sowie auf die Leber- und Niereninsuffizienz der Tiere.

Die präfinale Kachexie und reduzierte Lebenserwartung von männlichen und weiblichen GH-transgenen Tieren in unserer Studie steht im Einklang mit Befunden von Wolf et al. (1993). Hierbei zeigte sich die Lebenserwartung von GH-transgenen Tieren in Abhängigkeit zur Höhe des GH-Serumspiegels als signifikant reduziert, nur 3% der MThGH transgenen Tiere, d.h. der Versuchstiere mit den höchsten GH-Serumspiegeln, erreichten eine Lebenszeit von einem Jahr. Mehrere Autoren wiesen auf die ausgeprägten Organveränderungen durch supraphysiologische GH-Spiegel hin, wie z.B. Viszeromegalie, zystische Erweiterung der Nierentubuli, interstitielle Fibrose, Glomerulohyalinose und Glomerulosklerose (Brem et al. 1989), Hypertrophie des Nephrons mit progressiver glomerulärer Sklerose (Feld und Hirschberg 1996), sowie zentrolobuläre hepatozelluläre Hypertrophie mit Nekrose einzelner Hepatozyten (Brem et al. 1989). Eine geschlechtsspezifische Ausprägung der pathologischen Veränderungen wurde hingegen nicht beschrieben. Es ist daher unklar warum transgene Weibchen in unserer Studie präfinal stärker von Kachexie betroffen waren als die transgenen Männchen.

Auch Tseng et al. (1998) beobachteten einen starken Anstieg des Körpergewichtes bei transgenen Mäusen mit supraphysiologischen GH-Spiegeln. Im Unterschied zu unseren Befunden war der Gewichtsanstieg zwischen 4 und 9 Lebenswochen sogar exponentiell, bei 6 Wochen lagen sowohl männliche als auch weibliche Transgene signifikant über den Kontrollen. Tseng und Mitautoren verwendeten jedoch Mäuse mit dem humanen Somatokrinin-transgen (GHRH, Growth Hormone Releasing Hormone) unter der Kontrolle eines MT-Promotors. Die transgenen Tiere erreichten hierbei GH-Serumspiegel von 6229 ng/ml im Vergleich zu 10 ng/ml bei normalen nicht-transgenen Mäusen und 100-200 ng/ml bei bGH-transgenen Mäusen, die in unserer Studie verwendet wurden (Wolff et al. 1993; Eckstein et al. 2004). Interessanterweise erreichte die Gewichtszunahme in der Studie von Tseng et al. (1998) nach 10 Lebenswochen ein Plateau, sowohl bei den transgenen Mäusen als auch bei den Kontrolltieren. Während das Gewichtsplateau bei den transgenen Tieren mit einem schnelleren Erreichen des Maximalgewichtes durch die höheren GH-Serumspiegel im Vergleich zu unseren Versuchstieren gedeutet werden kann, steht eine Erklärung für das Gewichtsplateau der Kontrolltiere aus.

Der skeletale Mineralgehalt nahm bei den weiblichen und männlichen Kontrolltieren in unserer Studie bis zur 38. Woche kontinuierlich zu, die transgenen Mäuse hingegen erreichten im Alter von 26 Wochen eine „Peak Bone Mass“ bzw. ein Plateau ohne weitere signifikante Zunahme. Nachdem die männlichen Kontrolltiere bis zur 12. Lebenswoche einen konstant höheren Knochenmineralgehalt aufwiesen als die Weibchen, überholten die

transgenen Weibchen die transgenen Männchen in diesem Lebensalter. Während die transgenen Männchen von der 6. bis zur 26. Woche stets signifikant höhere Knochenmassenwerte auswiesen als die Kontrollen, ergab sich bei 38 Wochen durch die weitere Zunahme des BMC bei den Kontrolltieren und die leichte Abnahme bei den transgenen Tieren kein signifikanter Unterschied mehr. Wie bereits oben besprochen ist dies vermutlich auf die beginnende Kachexie zurückzuführen, sowie die Veränderungen von Nieren und Leber (Brem et al. 1989; Wolff et al. 1991;1993).

Betrachtet man den prozentualen Anteil des Knochenmineralgehaltes am Körpergewicht, so zeigt sich dass dieser von ca. 1% in der 3. Lebenswoche auf Werte zwischen 2,5% und 4% im höheren Lebensalter zunahm. Ab der 6. Lebenswoche wiesen die transgenen Weibchen gegenüber den gleichgeschlechtlichen Kontrollen signifikant höhere Werte auf. Dies galt jedoch nicht für die Männchen, die tendenziell sogar eher niedrigere Werte aufwiesen als die Kontrolltiere. Die Befunde der longitudinalen Studie stehen damit nur in teilweiser Übereinstimmung mit den Befunden der Querschnittstudie. Auch in der Querschnittstudie fand sich bei den transgenen Weibchen eine höhere relative Knochenmasse am Körpergewicht als bei den männlichen Tieren, vermutlich bedingt durch den modulierenden Effekt des Östrogens auf GH (Sandstedt et al. 1994; Schiessl et al. 1998). Ebenso könnten die Ergebnisse der Querschnittstudie insofern reduziert werden, als die transgenen Männchen keine signifikanten Unterschiede im prozentualen Mineralgehalt zu den Kontrollen aufwiesen. Die transgenen Weibchen zeigten jedoch ab der 9. Woche einen gegenüber Kontrollen signifikant erhöhten prozentualen BMC, während sich in der Querschnittstudie hierbei keine signifikanten Unterschiede ergeben hatten. Ein Grund für diesen Unterschied ist uns nicht bekannt; dieser könnte aber auf die relativ geringe Zahl an Tieren und damit auf das relativ geringe Signifikanzniveau des Unterschiedes zurückzuführen sein.

### 6.3. Wachstumshormon und Osteoporose beim Menschen

Es ist bekannt, dass GH eine Schlüsselrolle in der postnatalen Entwicklung des Skelettsystems spielt. Neben einem entscheidenden Einfluss auf das Längenwachstum der Knochen und der Skelettreifung (Isaksson et al. 1982; Johannsson und Bengtsson 1997; Marcus 1997) ist es auch von grosser Bedeutung für den Erhalt der Knochenmasse (Inzucchi und Robbins 1994). Im Säuglingsalter und während der Pubertät ist sowohl die Amplitude als auch die Gesamtsekretion an GH deutlich höher und nimmt beim Erwachsenen bis zum Senium kontinuierlich ab (Rudman et al. 1981). Daher wird auch ein Zusammenhang zwischen einem Mangel an GH-Sekretion und seniler Osteoporose diskutiert. Die Gabe von GH stellt daher einen möglicher Therapieansatz bei Osteoporose dar (Marcus 2000; Rosen and Bilezikian 2001; Landin-Wilhelmsen et al. 2003).

Im Gegensatz zu den meisten derzeit verfügbaren Medikamenten gegen Osteoporose welche antiresorptive Wirkung haben, weist GH die Eigenschaft auf, die Knochenformation zu erhöhen (Marcus 2000; Rosen and Bilezikian 2001). Sugimoto et al. (1999) untersuchten den Effekt einer einjährigen Therapie mit GH bei älteren Frauen mit Osteoporose. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Muskelkraft und ein Anstieg der Marker des Knochenstoffwechsels im Sinne einer Stimulation der Osteoblasten und Osteoklasten, jedoch keine signifikante Veränderung der mittels DXA bestimmten BMD. Erst im therapiefreien Folgejahr konnte ein signifikanter Anstieg der BMD an Radius und Lendenwirbelsäule bei den therapierten Personen festgestellt werden.

Saaf et al. (1999) führten ebenfalls eine Studie unter Verwendung der DXA mit einjähriger Gabe von GH bei 16 postmenopausalen Frauen durch. Aufgrund der Nebenwirkungen wie z.B. Gelenkschmerzen sowie schwieriger Compliance, verblieben jedoch nur 12 Individuen nach einem Jahr in dieser Doppelblind-Studie unter GH-Einnahme, und nur 4 Patienten nach 2 Jahren. Neben der erwartungsgemässen Stimulation des Knochenstoffwechsels (Osteocalcin) konnten aufgrund der beschränkten Grösse des Kollektivs und der kurzen Studiendauer keine statistisch signifikanten Daten erzielt werden. Während in der Placebogruppe keine Änderung der BMD an Oberschenkelhals, lumbaler Wirbelsäule und bei der Ganzkörpermessung ermittelt werden konnte, lag der BMD nach einjähriger GH-Einnahme am Oberschenkelhals sogar deutlich unter den Werten der Kontrollgruppe, obwohl die Osteocalcin Marker um bis zu 88% erhöht waren, (Saaf et al 1999).

Es ist zu vermuten, dass die von Saaf und Mitautoren (1999) verzeichnete Osteopenie beim Menschen darauf beruht, dass ähnlich wie bei Sugimoto et al. (1999) ein signifikanter

Anstieg der BMD erst im therapiefreien Folgejahr bzw. mit deutlicher Zeitverzögerung sichtbar wird. Eine Osteopenie wurde allerdings auch gelegentlich bei der Akromegalie beobachtet (Kayath und Vieira 1997; Lesse et al. 1998). Es ist anzunehmen, dass die beobachtete Osteopenie auf einer Interaktion mit den Geschlechts-, Schilddrüsen-, und Nebennierenrindenhormonen beruht, bzw. auf anderen Effekten eines Hypophysentumors oder dessen Therapie (z.B. Bestrahlung, Chemotherapie, postoperativ) oder auf unterschiedliche Messtechniken zu verschiedenen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufes zurückzuführen ist.

Landin-Wilhelmsen et al (2003) führten bei 80 postmenopausalen Frauen mit Osteoporose eine placebo-kontrollierte Doppelblind-Studie mit rekombinantem GH über 5 Jahre durch. Alle Frauen erhielten Kalzium und Vitamin D sowie Östrogene, der Knochenmineralgehalt wurde mittels DXA bestimmt. Die Analyse erfolgte in drei Gruppen, zwei Therapiegruppen mit Gabe von GH (1,0 U/Tag oder 2,5 U/Tag subcutan) sowie eine Placebo-Gruppe. Nach Ablauf von 18 Monaten endete die Placebo-Gabe, die zwei Therapiegruppen wurden für weitere 18 Monate fortgesetzt (insgesamt 3 Jahre) und über insgesamt 5 Jahre weiterverfolgt. Nach 18 Monaten war der Knochenmineralgehalt bei der Therapiegruppe mit 2,5 U/Tag GH-Gabe am höchsten. Nach 3 Jahren zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Therapiegruppen (1,0 U/Tag bzw. 2,5 U/Tag), jedoch ein signifikanter Unterschied der Knochendichte gegenüber der Placebo-Gruppe. Nach 5 Jahren zeigte sich nach wie vor ein signifikanter Unterschied der Therapiegruppen gegenüber der Placebo-Gruppe (+16%,  $p < 0,01$ ). Die Autoren schlossen aus ihren Befunden, dass eine Applikation von GH eine zeitverzögerte Wirkung auf den Knochen ausübt und den Knochenmineralgehalt signifikant bei Osteoporose anheben kann. Landin-Wilhelmsen et al. (2003) konnten also einen anabolen Effekt von GH auf den Knochen aufzeigen. Ihre Studie weist jedoch auch Limitationen auf, wie Rosen und Wüster (2003) in einem Editorial feststellen. Die doppelblinde Behandlung der Patientinnen erfolgte nur über einen Zeitraum von 18 Monaten, d.h. die Patientinnen der zwei anderen Gruppen wussten über Ihre Behandlung mit GH in den letzten eineinhalb Jahren Bescheid. Unklar ist ebenfalls, ob die Versuchspersonen hinsichtlich der Ergebnisse der BMD-Messung „verblindet“ waren. Beides könnte Ihre Lebensführung beeinflussen hin zu Verhaltensweisen, welche die Knochendichte ebenfalls erhöhen. Langfristige Nebenwirkungen, wie etwa eine erhöhte Tumorneigung sind nicht innerhalb von 5 Jahren absehbar. Außerdem befanden sich alle Patientinnen unter Hormonersatztherapie mit Östrogen, so dass bestenfalls der Erfolg einer Kombinationstherapie dokumentiert werden kann, nicht jedoch die alleinige Wirkung des

GHs. Rosen und Wüster (2003) kritisierten ausserdem, dass die Zahl der untersuchten Frauen ( $n = 80$ ) für eine Osteoporose-Studie verhältnismässig gering sei.

Es lässt sich zusammenfassend feststellen, dass derzeit noch keine konklusiven Befunde zur Therapie der Osteoporose mit GH vorliegen, ein langfristiger Nutzen der GH-Gabe bei Osteoporose kann derzeit weder bewiesen noch widerlegt werden. Zukünftige Studien werden allerdings nur valide Ergebnisse erbringen können, wenn ausreichend grosse Kollektive über einen Zeitraum von mehreren Jahren beobachtet werden.

#### **6.4. Schlussfolgerungen**

1. Es konnte gezeigt werden, dass die hochauflösende Zweienergie-Röntgen-Absorptiometrie (DXA) für die präzise nicht-invasive Charakterisierung des Knochenmineralgehaltes der Maus geeignet ist. Mit dieser Technik ist insbesondere die longitudinale Messung unter In-vivo-Bedingungen möglich.
2. Im GH-transgenen Tiermodell war eine anabole Reaktion auf den Knochen im Sinne eines absoluten Zuwachs an Knochenmasse nachweisbar. Die transgenen Tiere wiesen einen signifikant höheren absoluten Knochenmineralgehalt (BMC) auf als die Kontrolltiere. Der anabole Effekt von GH blieb insgesamt proportional zur Gesamtzunahme des Körpergewichtes. Auch die Analyse der Femora zeigte einen signifikanten Zuwachs der absoluten Knochenmasse, jedoch nur proportional zum gesamten Zuwachs an Knochenmineralgehalt und zum Zuwachs an femoralem Knochenvolumen.
3. Die Ergebnisse unserer Querschnittstudie zeigten bei weiblichen und männlichen transgenen Mäusen eine vergleichbare Gesamtknochenmasse. In der longitudinalen Studie wiesen die transgenen Versuchstiere ab der 9. Lebenswoche signifikant höhere Werte an Körpergewicht und Knochenmineralgehalt auf als die Kontrolltiere. Der prozentuale Anteil der Knochenmasse am Körpergewicht war bei den transgenen Weibchen geringfügig höher, bei den transgenen Männchen aber signifikant niedriger als bei den Kontrolltieren. Im Unterschied zur Querschnittstudie profitieren die weiblichen Versuchstiere in der longitudinalen Studie überproportional vom GH-Überschuss, ihr relativer Knochenmineralgehalt am Körpergewicht war signifikant erhöht, bei den transgenen Männchen hingegen blieb er unverändert.
4. In der longitudinalen Studie konnte gezeigt werden, dass transgene Mäuse

in der 26. Lebenswoche eine „Peak Bone Mass“, d.h. einen Zeitpunkt der höchsten Knochenmasse erreichen. Bei den nicht-transgenen Kontrolltieren hingegen verzeichneten wir eine kontinuierliche Zunahme an Knochenmineralgehalt bis zur 38. Woche. Der Unterschied ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die pathologischen Veränderungen bei transgenen Mäusen zurückzuführen, die im Alter eine Kachexie und Knochenresorption zur Folge haben, bei gleichem Knochenvolumen und gleicher volumetrischer apparenter Knochendichte.

## 7. Zusammenfassung

Das von der Hypophyse sezernierte GH spielt eine Schlüsselrolle beim Längenwachstum der Knochen, bei der Skelettreifung und für den Erhalt der Knochenmasse beim Erwachsenen. Erkrankungen wie Akromegalie oder Osteoporose verdeutlichen die Notwendigkeit, die Wirkung des GHs am Knochen zu identifizieren, um Erkenntnisse für die Entwicklung neuer Therapieoptionen als auch für die klinische Diagnostik zu gewinnen. Am Modell der GH-transgenen Maus untersuchten wir den Einfluss von supraphysiologischen GH-Spiegeln auf den Knochenmineralgehalt.

Wir verwendeten ein speziell adaptiertes Zweienergie-Röntgen-Absorptiometrie Gerät (DXA, Sabre, Stratec) zur quantitativen Bestimmung des Knochenmineralgehaltes. In einer Querschnittstudie an 28 Mäusen im Alter von 12 Wochen (14 transgen, 14 Kontrollen, je 7 weiblich und 7 männlich) ermittelten wir bei insgesamt 4 Messungen die Reproduzierbarkeit, d.h. technische Präzision.

Im Anschluss an die Querschnittstudie wurden die rechten Femora aller Versuchstiere explantiert und gesondert mit der DXA gemessen sowie das Volumen der Knochen nach dem Archimedes Prinzip bestimmt. In einer longitudinalen Studie wurden 42 Mäuse unter Injektionsnarkose im Alter von 3, 6, 9, 12, 26 und 38 Lebenswochen mittels DXA untersucht (10 weibliche Kontrolltiere, 10 weibliche transgene Mäuse, 7 männliche Kontrolltiere, 11 männliche transgene Mäuse).

Im Rahmen der Querschnittstudie konnten wir eine technische Präzision von 4,4% für die Knochenmasse (BMC), 2,5% für die flächen-korrigierte Knochenmasse (BMD), 0,86% für das Körpergewicht und 4,5% für den prozentualen Anteil des Knochenmineralgehaltes am Gesamtgewicht nachweisen. Die absolute Knochenmasse war bei den transgenen Versuchstieren gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht, bei den Weibchen um 71% ( $p < 0,01$ ), bei den transgenen Männchen um 62% ( $p < 0,01$ ). Der prozentuale

Knochenmineralgehalt am Körpergewicht war bei den transgenen Weibchen etwa identisch, bei den transgenen Männchen jedoch niedriger als bei den Kontrollen (-7,2% ;  $p < 0,05$ ). Auf das Gewicht bezogen ergab sich für weibliche Mäuse eine höhere prozentuale Knochenmasse als bei den männlichen (+21% bei Kontrollen und +31% bei transgenen [ $p < 0,01$ ] Versuchstieren). Die isolierte Analyse der explantierten Femora ergab eine signifikante Erhöhung der Knochenmasse und des Knochenvolumens, jedoch nicht der volumetrischen apparenten Knochendichte bei den transgenen Versuchstieren. Die volumetrische Knochendichte war bei weiblichen Tieren tendenziell höher als bei den Männchen.

Im Rahmen der longitudinalen Studie wiesen die transgenen Tiere ab der 9. Lebenswoche ein signifikant höheres Körpergewicht auf sowie einen höheren Knochenmineralgehalt mit einem Gipfel in der 26. Lebenswoche („Peak Bone Mass“), gefolgt von deutlichem Verlust an Gewicht und Mineralgehalt. Die Kontrolltiere verzeichneten einen kontinuierlichen Zuwachs an Körpergewicht und skelettalem Mineralgehalt bis zur 38. Lebenswoche. Der prozentuale Anteil der Knochenmasse am Körpergewicht war bei den weiblichen Transgenen signifikant höher als bei den Kontrolltieren. Im Unterschied zur Querschnittstudie profitierten die weiblichen Versuchstiere überproportional vom GH-Überschuss.

Die Zweienergie-Röntgen-Absorptiometrie (DXA) ist in der Lage, den Gehalt an mineralisiertem Knochengewebe bei der Maus mit hoher Präzision zu bestimmen. Diese Methode kann dabei in zukünftigen longitudinalen Studien zur In-vivo-Analyse transgener Versuchstiere verwendet werden.

Im GH-transgenen Tiermodell ist eine anabole Reaktion auf den Knochen nachweisbar, transgene Tiere haben einen signifikant höheren absoluten Knochenmineralgehalt. Weibliche Mäuse profitierten überproportional vom GH-Überschuss, transgene Männchen hingegen erfahren einen Zuwachs an Knochenmineralgehalt der etwa proportional zum Körpergewicht ist. Dies ist u.a. auf den modulierenden Effekt des Östrogens zurückzuführen.

## 8. Literaturverzeichnis

**Adams, JE.** Single and dual energy X-ray absorptiometry. *Eur Radiol* 1997; 7 Suppl 2:S20-31.

**Amato, G, Carella, C, Fazio, S, La Montagna, G, Cittadini, A, Sabatini, D, Marciano-Mone, C, Sacca, L, Bellastella, A.** Body composition, bone metabolism, and heart structure and function in growth hormone (GH)-deficient adults before and after GH replacement therapy at low doses. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77:1671-6.

**Ammann, P, Rizzoli, R, Bonjour, JP, Bourrin, S, Meyer, JM, Vassalli, P, Garcia, I.** Transgenic mice expressing soluble tumor necrosis factor-receptor are protected against bone loss caused by estrogen deficiency. *J Clin Invest* 1997; 99:1699-703.

**Antonacci, MD, Hanson, DS, Heggeness, MH.** Pitfalls in the measurement of bone mineral density by dual energy x-ray absorptiometry. *Spine* 1996; 21:87-91.

**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* 2000; 54:203-7.

**Balducci, R, Toscano, V, Pasquino, AM, Mangiantini, A, Municchi, G, Armenise, P, Terracina, S, Prossomariti, G, Boscherini, B.** Bone turnover and bone mineral density in young adult patients with panhypopituitarism before and after long-term growth hormone therapy. *Eur J Endocrinol* 1995; 132:42-6.

**Baum, HB, Biller, BM, Finkelstein, JS, Cannistraro, KB, Oppenheim, DS, Schoenfeld, DA, Michel, TH, Wittink, H, Klibanski, A.** Effects of physiologic growth hormone therapy on bone density and body composition in patients with adult-onset growth hormone deficiency. A randomized, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1996; 125:883-90.

**Beamer, WG, Donahue, LR, Rosen, CJ, Baylink, DJ.** Genetic variability in adult bone density among inbred strains of mice. *Bone* 1996; 18:397-403.

**Beamer, WG, Donahue, LR, Rosen, CJ.** Insulin-like growth factor I and bone: from mouse to man. *Growth Horm IGF Res* 2000; 10 Suppl B:S103-5.

**Behringer, RR, Lewin, TM, Quaife, CJ, Palmiter, RD, Brinster, RL, D'Ercole, AJ.** Expression of insulin-like growth factor I stimulates normal somatic growth in growth hormone-deficient transgenic mice. *Endocrinology* 1990; 127:1033-40.

**Bengtsson, BA, Johannsson, G.** The use of growth hormone in adults: a review of the last 10 years, the present and a perspective for the future. *Growth Horm IGF Res* 1998; 8 Suppl B:27-35.

**Bolanowski, M, Wielgus, W, Milewicz, A, Marciniak, R.** Axial bone mineral density in patients with acromegaly. *Acad Radiol* 2000; 7:592-4.

**Brem, G, Wanke, R, Wolf, E, Buchmüller, T, Müller, M, Brenig, B, Hermanns, W.** Multiple consequences of human growth hormone expression in transgenic mice. *Mol Biol Med* 1989; 6:531-47.

**Brunton, JA, Bayley, HS, Atkinson, SA.** Body composition analysis by dual energy X-ray absorptiometry compared to chemical analysis of fat, lean and bone mass in small piglets. *Basic Life Sci* 1993; 60:157-60.

**Carrel, AL, Allen, DB.** Effects of growth hormone on body composition and bone metabolism. *Endocrine* 2000; 12:163-72.

**Casez, JP, Muehlbauer, RC, Lippuner, K, Kelly, T, Fleisch, H, Jaeger, P.** Dual-energy X-ray absorptiometry for measuring total bone mineral content in the rat: study of accuracy and precision. *Bone Miner* 1994; 26:61-8.

**Clark, R, Carlsson, L, Mortensen, D, Cronin, M.** Additive effects on body growth of insulin-like growth factor-1 and growth hormone in hypophysectomized rats. *Endocrinol Metab* 1994; 1:49-54.

**Cowell, CT, Wuster, C.** The effects of growth hormone deficiency and growth hormone replacement therapy on

bone. A meeting report. *Horm Res* 2000; 54 Suppl 1:68-74.

**Daughaday, WH, Hall, K, Raben, MS, Salmon, WDJ, van den Brande, JL, van Wyk, JJ.** Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature* 1972; 235:107.

**Daughaday, WH, Trivedi, B, Kapadia, M.** Measurement of insulin-like growth factor II by a specific radioreceptor assay in serum of normal individuals, patients with abnormal growth hormone secretion, and patients with tumor-associated hypoglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 53:289-94.

**Daughaday, WH, Rotwein, P.** Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev* 1989; 10:68-91.

**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* 1995; 133:180-8.

**Eckstein, F, Lochmüller, EM, 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* 2002; 12:116-25.

**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 (Berl)* 2002; 206:139-48.

**Eckstein, F, Weusten, A, Schmidt, C, Wehr, U, Wanke, R, Rambeck, W, Wolf, E, Mohan, S.** Longitudinal in vivo effects of growth hormone overexpression on bone in transgenic mice. *J Bone Miner Res* 2004; 19:802-10.

**Ernst, M, Froesch, ER.** Growth hormone dependent stimulation of osteoblast-like cells in serum-free cultures via local synthesis of insulin-like growth factor I. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 29:142-7.

**Feely, RS, Larkin, LM, Halter, JB, Dengel, DR.** Chemical versus dual energy x-ray absorptiometry for detecting age-associated body compositional changes in male rats. *Exp Gerontol* 2000; 35:417-27.

**Feld, S, Hirschberg, R.** Growth hormone, the insulin-like growth factor system, and the kidney. *Endocr Rev* 1996; 17:423-80.

**Felig, P, Frohmann, LA.** *Endocrinology and Metabolism*. Verlag McGraw-Hill, 4<sup>th</sup> Edition 2001:1266-76.

**Fielder, PJ, Mortensen, DL, Mallet, P, Carlsson, B, Baxter, RC, Clark, RG.** Differential long-term effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) growth hormone (GH), and IGF-I plus GH on body growth and IGF binding proteins in hypophysectomized rats. *Endocrinology* 1996; 137:1913-20.

**Florini, JR, Ewton, DZ, Coolican, SA.** Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev* 1996; 17:481-517.

**Genant, HK, Engelke, K, Fuerst, T, Glüer, CC, Grampp, S, Harris, ST, Jergas, M, Lang, T, Lu, Y, Majumdar, S, Mathur, A, Takada, M.** Noninvasive assessment of bone mineral and structure: state of the art. *J Bone Miner Res* 1996; 11:707-30.

**Geusens, PP, Boonen, S.** Osteoporosis and the growth hormone-insulin-like growth factor axis. *Horm Res* 2002; 58 Suppl 3:49-55.

**Gillberg, P, Mallmin, H, Petren-Mallmin, M, Ljunghall, S, Nilsson, AG.** Two years of treatment with recombinant human growth hormone increases bone mineral density in men with idiopathic osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:4900-6.

**Glüer, CC, Blake, G, Lu, Y, Blunt, BA, Jergas, M, Genant, HK.** Accurate assessment of precision errors: how to measure the reproducibility of bone densitometry techniques. *Osteoporos Int* 1995; 5:262-70.

**Goodman, HM.** Multiple effects of growth hormone on lipolysis. *Endocrinology* 1968; 83:300-8.

- Gordon, JW, Ruddle, FH.** Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* 1981; 214:1244-6.
- Green, H, Morikawa, M, Nixon, T.** A dual effector theory of growth-hormone action. *Differentiation* 1985; 29:195-8.
- Grier, SJ, Turner, AS, Alvis, MR.** The use of dual-energy x-ray absorptiometry in animals. *Invest Radiol* 1996; 31:50-62.
- Hagiwara, S, Lane, N, Engelke, K, Sebastian, A, Kimmel, DB, Genant, HK.** Precision and accuracy for rat whole body and femur bone mineral determination with dual X-ray absorptiometry. *Bone Miner* 1993; 22:57-68.
- Halse, J, Melsen, F, Mosekilde, L.** Iliac crest bone mass and remodelling in acromegaly. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1981; 97:18-22.
- Harris, WH, Heaney, RP.** Effect of growth hormone on skeletal mass in adult dogs. *Nature* 1969; 223:403-4.
- Hayden, JM, Mohan, S, Baylink, DJ.** The insulin-like growth factor system and the coupling of formation to resorption. *Bone* 1995; 17:93S-8S.
- Hazel, SJ, Gillespie, CM, Moore, RJ, Clark, RG, Jureidini, KF, Martin, AA.** Enhanced body growth in uremic rats treated with IGF-I and growth hormone in combination. *Kidney Int* 1994; 46:58-68.
- Hennessey, JV, Chromiak, JA, DellaVentura, S, Reinert, SE, Puhl, J, Kiel, DP, Rosen, CJ, Vandeburgh, H, MacLean, DB.** Growth hormone administration and exercise effects on muscle fiber type and diameter in moderately frail older people. *J Am Geriatr Soc* 2001; 49:852-8.
- Ho, PJ, Fig, LM, Barkan, AL, Shapiro, B.** Bone mineral density of the axial skeleton in acromegaly. *J Nucl Med* 1992; 33:1608-12.
- Hübsch, P, Kotzmann, H, Svoboda, T, Kainberger, FM, Bankier, A, Seidl, G.** [Bone density of the lumbar spine and femur in acromegaly]. *Radiologe* 1993; 33:457-61.
- Hyer, SL, Rodin, DA, Tobias, JH, Leiper, A, Nussey, SS.** Growth hormone deficiency during puberty reduces adult bone mineral density. *Arch Dis Child* 1992; 67:1472-4.
- Inzucchi, SE, Robbins, RJ.** Clinical review 61: Effects of growth hormone on human bone biology. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:691-4.
- Isaksson, OG, Jansson, JO, Gause, IA.** Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science* 1982; 216:1237-9.
- Isaksson, OG, Lindahl, A, Nilsson, A, Isgaard, J.** Mechanism of the stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone growth. *Endocr Rev* 1987; 8:426-38.
- Jansson, JO, Albertsson-Wikland, K, Eden, S, Thorngren, KG, Isaksson, O.** Effect of frequency of growth hormone administration on longitudinal bone growth and body weight in hypophysectomized rats. *Acta Physiol Scand* 1982; 114:261-5.
- 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* 1996; 97:1732-40.
- Jockenhövel, F, Rohrbach, S, Deggerich, S, Reinwein, D, Reiners, C.** Differential presentation of cortical and trabecular peripheral bone mineral density in acromegaly. *Eur J Med Res* 1996; 1:377-82.
- Johannsson, G, Bjarnason, R, Brammert, M, Carlsson, LM, Degerblad, M, Manhem, P, Rosen, T, Thoren, M, Bengtsson, BA.** The individual responsiveness to growth hormone (GH) treatment in GH-deficient adults is dependent on the level of GH-binding protein, body mass index, age, and gender. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:1575-81.

- Johannsson, G, Rosen, T, Bosaeus, I, Sjoström, L, Bengtsson, BA.** Two years of growth hormone (GH) treatment increases bone mineral content and density in hypopituitary patients with adult-onset GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:2865-73.
- Johannsson, G, Bengtsson, BA.** Growth hormone and the acquisition of bone mass. *Horm Res* 1997; 48 Suppl 5:72-7.
- Kaji, H, Sugimoto, T, Kanatani, M, Nishiyama, K, Nasu, M, Chihara, K.** Insulin-like growth factor-I mediates osteoclast-like cell formation stimulated by parathyroid hormone. *J Cell Physiol* 1997; 172:55-62.
- Kayath, MJ, Vieira, JG.** Osteopenia occurs in a minority of patients with acromegaly and is predominant in the spine. *Osteoporos Int* 1997; 7:226-30.
- Kember, NF.** Cell kinetics and the control of growth in long bones. *Cell Tissue Kinet* 1978; 11:477-85.
- Klein, RF, Mitchell, SR, Phillips, TJ, Belknap, JK, Orwoll, ES.** Quantitative trait loci affecting peak bone mineral density in mice. *J Bone Miner Res* 1998; 13:1648-56.
- Kotzmann, H, Bernecker, P, Hubsch, P, Pietschmann, P, Woloszczuk, W, Svoboda, T, Geyer, G, Luger, A.** Bone mineral density and parameters of bone metabolism in patients with acromegaly. *J Bone Miner Res* 1993; 8:459-65.
- Landin-Wilhelmsen, K, Nilsson, A, Bosaeus, I, Bengtsson, BA.** Growth hormone increases bone mineral content in postmenopausal osteoporosis: a randomized placebo-controlled trial. *J Bone Miner Res* 2003; 18:393-405.
- Lesse, GP, Fraser, WD, Farquharson, R, Hipkin, L, Vora, JP.** Gonadal status is an important determinant of bone density in acromegaly. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998; 48:59-65.
- 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* 1998; 23: 59-66
- Li, CH, Dixon, JS.** Human pituitary growth hormone. 32. The primary structure of the hormone: revision. *Arch Biochem Biophys* 1971;146:233-6.
- Lisett CA, Shalet SM:** Effects of growth hormone on bone and muscle - *Growth Horm - IGF Res* 2000; 10 Suppl B: 95-101
- Lochmüller, EM, Jung, V, Weusten, A, Wehr, U, Wolf, E, Eckstein, F.** Precision of high-resolution dual energy X-ray absorptiometry of bone mineral status and body composition in small animal models. *Eur Cell Mater* 2001; 1:43-51.
- Lochmüller, EM, Weusten, A, Wolf, E, Cindik, E, Renner-Müller, I, Eikmeier, T, Eckstein, F.** [Sex-specific analysis of bone mass in normal and growth hormone transgenic mice using dual energy x-ray absorptiometry (DXA)]. *Ann Anat* 1999; 181:191-8.
- Makan S, Bayley HS, Webber CE:** Precision and accuracy of total body bone mass and body composition measurements in the rat using x ray based dual photon absorptiometry. *Can J Physiol Pharmacol* 1997; 75:1257-61.
- Maor, G, Hochberg, Z, von der Mark, K, Heinegard, D, Silbermann, M.** Human growth hormone enhances chondrogenesis and osteogenesis in a tissue culture system of chondroprogenitor cells. *Endocrinology* 1989; 125:1239-45.
- Marcus, R.** Skeletal effects of growth hormone and IGF-I in adults. *Endocrine* 1997; 7:53-5.
- Marcus, R.** Anabolic therapies. *Clin Lab Med* 2000; 20:623-37, viii.
- McCauley, LK.** Transgenic mouse models of metabolic bone disease. *Curr Opin Rheumatol* 2001; 13:316-25.
- Morel, G, Chavassieux, P, Barenton, B, Dubois, PM, Meunier, PJ, Boivin, G.** Evidence for a direct effect of growth hormone on osteoblasts. *Cell Tissue Res* 1993; 273:279-86.

- Murray, RD, Shalet, SM.** Growth hormone: current and future therapeutic applications. *Expert Opin Pharmacother* 2000; 1:975-90.
- Nagy, TR, Clair, AL.** Precision and accuracy of dual-energy X-ray absorptiometry for determining in vivo body composition of mice. *Obes Res* 2000; 8:392-8.
- Nishiyama, K, Sugimoto, T, Kaji, H, Kanatani, M, Kobayashi, T, Chihara, K.** Stimulatory effect of growth hormone on bone resorption and osteoclast differentiation. *Endocrinology* 1996; 137:35-41.
- Ohlsson, C, Isaksson, O, Lindahl, A.** Clonal analysis of rat tibia growth plate chondrocytes in suspension culture-differential effects of growth hormone and insulin-like growth factor I. *Growth Regul* 1994; 4:1-7.
- Ohlsson C, Bengtsson BA, Isaksson OG, Andreassen TT, Słotweg MC.** Growth hormone and bone. *Endocr Rev* 1998; 19:55-79
- Ohlsson C, Jansson JO, Isaksson OG.** Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on body growth and adult bone metabolism. *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12:346-48
- Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE:** Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein growth hormone fusion genes - *Nature* 1982; 300: 611-615
- Palmiter, RD, Wilkie, TM, Chen, HY, Brinster, RL.** Transmission distortion and mosaicism in an unusual transgenic mouse pedigree. *Cell* 1984; 36:869-77.
- Priemel, M, Schilling, AF, Haberland, M, Pogoda, P, Rueger, JM, Amling, M.** Osteopenic mice: animal models of the aging skeleton. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2002; 2:212-8.
- Raben, MS, Hollenberg, CH.** Effect of growth hormone on plasma fatty acids. *J Clin Invest* 1959; 38:484-8.
- Ransjo, M, Lerner, U, Ohlsson, C.** Growth hormone inhibits formation of osteoclast-like cells in mouse bone marrow cultures. *J Bone Miner Res* 1996; 11 Suppl:T394.
- Richelsen, B, Pedersen, SB, Borglum, JD, Moller-Pedersen, T, Jorgensen, J, Jorgensen, JO.** Growth hormone treatment of obese women for 5 wk: effect on body composition and adipose tissue LPL activity. *Am J Physiol* 1994; 266:E211-6.
- Richelsen, B.** Action of growth hormone in adipose tissue. *Horm Res* 1997; 48 Suppl 5:105-10.
- Rose, BS, Flatt, WP, Martin, RJ, Lewis, RD.** Whole body composition of rats determined by dual energy X-ray absorptiometry is correlated with chemical analysis. *J Nutr* 1998; 128:246-50.
- Rosen, CJ, Dimai, HP, Vereault, D, Donahue, LR, Beamer, WG, Farley, J, Linkhart, S, Linkhart, T, Mohan, S, Baylink, DJ.** Circulating and skeletal insulin-like growth factor-I (IGF-I) concentrations in two inbred strains of mice with different bone mineral densities. *Bone* 1997; 21:217-23.
- Rosen, CJ.** Pathophysiology of osteoporosis. *Clin Lab Med* 2000; 20:455-68.
- Rosen, CJ, Bilezikian, JP.** Clinical review 123: Anabolic therapy for osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:957-64.
- Rosen, CJ, Wüster, C.** Growth hormone rising: did we quit too quickly? *J Bone Miner Res* 2003; 18:406-9.
- Rosen HN, Chen V, Citadini A, Greenspan SL, Douglas PS, Moses AC, Beamer WG.** Treatment with growth hormone and IGF-1 in growing rats increase bone mineral content but not bone mineral density. *J Bone Miner Res* 1995; 10:1352-1358.
- Rossant, J, Nagy, A.** Genome engineering: the new mouse genetics. *Nat Med* 1995; 1:592-4.
- Rozenberg, S, Vandromme, J, Kroll, M, Pastijn, A, Degueldre, M.** Osteoporosis prevention with sex hormone replacement therapy. *Int J Fertil Menopausal Stud* 1994; 39:262-71.

- Rozenberg, S, Vandromme, J, Neve, J, Aguilera, A, Muregancuro, A, Peretz, A, Kinthaert, J, Ham, H.** Precision and accuracy of in vivo bone mineral measurement in rats using dual-energy X-ray absorptiometry. *Osteoporos Int* 1995; 5:47-53.
- Rudman, D, Kutner, MH, Rogers, CM, Lubin, MF, Fleming, GA, Bain, RP.** Impaired growth hormone secretion in the adult population: relation to age and adiposity. *J Clin Invest* 1981; 67:1361-9.
- Saaf, M, Hilding, A, Thoren, M, Troell, S, Hall, K.** Growth hormone treatment of osteoporotic postmenopausal women - a one-year placebo-controlled study. *Eur J Endocrinol* 1999; 140:390-9.
- Saban, J, Schneider, GB, Bolt, D, King, D.** Erythroid-specific expression of human growth hormone affects bone morphology in transgenic mice. *Bone* 1996; 18:47-52.
- 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* 1994; 135:2574-80.
- Sandstedt, J, Tornell, J, Norjavaara, E, Isaksson, OG, Ohlsson, C.** Elevated levels of growth hormone increase bone mineral content in normal young mice, but not in ovariectomized mice. *Endocrinology* 1996; 137:3368-74.
- Sartorio, A, Ortolani, S, Conti, A, Cherubini, R, Galbiati, E, Faglia, G.** Effects of recombinant growth hormone (GH) treatment on bone mineral density and body composition in adults with childhood onset growth hormone deficiency. *J Endocrinol Invest* 1996; 19:524-9.
- Schiessl, H, Frost, HM, Jee, WS.** Estrogen and bone-muscle strength and mass relationships. *Bone* 1998; 22:1-6.
- 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* 2003; 18:1486-96.
- Scillitani, A, Chiodini I, Carnevale V, Giannatempo GM, Frusciante V, Vilella M, Pileri M, Guglielmi G, Di Giorgio A, Modoni A, Fusilli S, Di Cerbo A, Liuzzi A:** Skeletal involvement in female acromegalic subjects; the effects of growth hormone excess in amenorrheal and menstruating patients -*J Bone Miner Res* 1997; 12: 1729-1736
- Scillitani, A, Battista, C, Chiodini, I, Carnevale, V, Fusilli, S, Ciccarelli, E, Terzolo, M, Oppizzi, G, Arosio, M, Gasperi, M, Arnaldi, G, Colao, A, Baldelli, R, Ghiggi, MR, Gaia, D, Di Somma, C, Trischitta, V, Liuzzi, A.** Bone mineral density in acromegaly: the effect of gender, disease activity and gonadal status. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003; 58:725-31.
- Spinas, GA, Fischli, F.** *Endokrinologie und Stoffwechsel*. Thieme-Verlag Stuttgart, 1. Auflage 2001: 23-28
- Sugimoto, T, Nakaoka, D, Nasu, M, Kanzawa, M, Sugishita, T, Chihara, K.** Effect of recombinant human growth hormone in elderly osteoporotic women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999; 51:715-24.
- Thoren, M, Soop, M, Degerblad, M, Saaf, M.** Preliminary study of the effects of growth hormone substitution therapy on bone mineral density and serum osteocalcin levels in adults with growth hormone deficiency. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1993; 128 Suppl 2:41-3.
- Thoren, M, Wivall-Helleryd, IL, Hall, K.** Effects of recombinant human insulin-like growth factor I administration in adults with growth hormone deficiency. *Acta Paediatr Suppl* 1993; 388:45-8.
- 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* 1996; 14:598-604.
- Tseng, KF, Goldstein, SA.** Systemic over-secretion of growth hormone in transgenic mice results in a specific pattern of skeletal modeling and adaptation. *J Bone Miner Res* 1998; 13:706-15.
- Turner, RT.** Effects of short-term spaceflight and recombinant human growth hormone (rhGH) on bone growth in young rats. *Aviat Space Environ Med* 1995; 66:763-9.

- Ueland, T, Bollerslev, J, Flyvbjerg, A, Hansen, TB, Vahl, N, Mosekilde, L.** Effects of 12 months of GH treatment on cortical and trabecular bone content of IGFs and OPG in adults with acquired GH deficiency: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:2760-3.
- Vandeweghe, M, Taelman, P, Kaufman, JM.** Short and long-term effects of growth hormone treatment on bone turnover and bone mineral content in adult growth hormone-deficient males. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1993; 39:409-15.
- Wolf, E, Kahnt, E, Ehrlein, J, Hermanns, W, Brem, G, 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* 1993; 68:71-87.
- 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* 1991; 55:117-27.
- Wolf, E, Wanke, R, Hermanns, W, Brem, G, Pirchner, F, von Butler-Wemken, I.** Growth characteristics of metallothionein-human growth hormone transgenic mice as compared to mice selected for high eight-week body weight and unselected controls. I. Body weight gain and external body dimensions. *Growth Dev Aging* 1991(a); 55:225-35.
- 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* 1991(b); 55:237-48.
- Wüster, C, Harle, U, Rehn, U, Müller, C, Knauf, K, Koppler, D, Schwabe, C, Ziegler, R.** Benefits of growth hormone treatment on bone metabolism, bone density and bone strength in growth hormone deficiency and osteoporosis. *Growth Horm IGF Res* 1998; 8 Suppl A:87-94.
- Wüster, C.** Fracture rates in patients with growth hormone deficiency. *Horm Res* 2000; 54 Suppl 1:31-5.
- Wüster, C, Abs, R, Bengtsson, BA, Bennmarker, H, Feldt-Rasmussen, U, Hernberg-Stahl, E, Monson, JP, Westberg, B, Wilton, P.** The influence of growth hormone deficiency, growth hormone replacement therapy, and other aspects of hypopituitarism on fracture rate and bone mineral density. *J Bone Miner Res* 2001; 16:398-405.
- Wüster C.** Wachstumshormon (hGH) – Pathophysiologie und therapeutisches Potenzial. UNI-MED Verlag AG, 1. Auflage 2001:15–26.
- Wynshaw-Boris, A.** Model mice and human disease. *Nat Genet* 1996; 13:259-60.

## 9. Danksagung

Mein Dank richtet sich in erster Linie an Herrn Professor Dr. Felix Eckstein für die Überlassung des interessanten Themas und die Einführung in den wissenschaftlichen Denkprozess sowie die lückenlose Unterstützung auf dem Wege der Fertigstellung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. Reinhard Putz danke ich für die vielen Anregungen sowohl wissenschaftlicher als auch menschlicher Natur, die mir auf meinem weiteren Weg als Arzt unvergesslich bleiben werden. Meine Zeit als Arzt an der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians Universität wird mir stets als besonders wertvolle Bereicherung meiner Laufbahn in Erinnerung verbleiben. In diesem Zusammenhang möchte ich auch allen weiteren Mitarbeitern der Anatomie danken, insbesondere Frau Mayer für die Hilfe bei der Akquisition der Literatur und Frau Sabine Mühlhimer für Ihre Unterstützung im Labor.

Besonderer Dank gilt den Mitarbeitern des Lehrstuhles für Molekulare Tierzucht und Haustiergenetik der LMU-München, Herrn Professor Dr. Eckhard Wolff, Herrn PD Dr. Ulrich Wehr und Herrn PD Dr. Andreas Höflich. Frau Dr. Ingrid Renner-Müller danke ich herzlich für die geduldige Einarbeitung im Umgang mit den Mäusen und deren Narkose sowie Petra Renner-Müller für die exzellente Tierpflege.

Ich möchte mich auch ganz besonders bedanken bei Herrn Dipl.-Ing. Hans Schiessl und bei der Firma Stratec Medizintechnik für die Zurverfügungstellung des DXA-Gerätes sowie Herrn Dipl.-Ing. T. Eikmeier und Herrn Dipl.-Ing. G. Tysarczyk-Niemeyer für Ihre technische Hilfe während dieser Studie, ausserdem Herrn Klaus Kreuzer für die wertvollen Ratschläge am Computer.

Schliesslich danke ich meiner Mutter, Sylvia Weusten, für Ihre stete und unermüdliche Unterstützung.

## 10. Lebenslauf

<b>Name</b>	<b>Axel Julius Weusten</b>
<b>Geburtsdatum</b>	27. Oktober 1970
<b>Geburtsort</b>	München
<b>Familienstand</b>	Ledig
<b>Nationalität</b>	Deutsch

### Schulbildung

09/1977 - 07/1981	Grundschule Berg-am-Laim und Am Strehleranger, München
09/1981 - 07/1991	Wilhelm-Hausenstein-Gymnasium München, Abitur

### Zivildienst

05/1992 - 05/1993	Malteser Hilfsdienst	Rettungsdienst
05/1993 - 09/1993	Bezirkskrankenhaus Haar	Pflegepraktikum

### Hochschulbildung

11/1993 - 06/2001	Ludwig-Maximilians-Universität München, Humanmedizin	
08/1996	Physikum	
08/1997	Erstes Staatsexamen	
03/2000	Zweites Staatsexamen	
05/2001	Drittes Staatsexamen	

### Famulaturen

03/1997 - 05/1997	Anästhesiologie	Ambulantes OP-Zentrum	München
08/1997 - 10/1997	Innere Medizin	The Aga Khan Hospital	Nairobi/ Kenia
08/1998 - 09/1998	Chirurgie	Kreiskrankenhaus	Ebersberg
09/1997 - 10/1998	Pathologie	Landeskrankenanstalt	Salzburg

### Praktisches Jahr

04/2000 – 07/2000	Orthopädie	Klinikum Grosshadern	München
08/2000 – 09/2000	Chirurgie	Klinikum Innenstadt	München
10/2000 – 11/2000	Chirurgie	KCMC, Moshi	Tansania
12/2000 – 04/2001	Innere Medizin	DMC, Detroit	USA

**Ärztliche Tätigkeiten**

08/2001 – 05/2002	Anatomie	Anatomische Anstalt München Lehrstuhl I Ludwig-Maximilians-Universität
05/2002 – 05/2003	Chirurgie	Universitätskliniken Bergmannsheil Bochum Traumatologie/ Intensivmedizin
08/2003 – 02/2004	Chirurgie	Princess Royal Hospital, Telford, Great Britain Allgemein – und Gefäßchirurgie
02/2004 – 08/2004	Orthopädie	Princess Royal Hospital, Telford, Great Britain Orthopädie und Traumatologie
08/2004 – 02/2005	Orthopädie	Royal Shrewsbury Hospital, Shrewsbury, Great Britain Orthopädie und Traumatologie
02/2005 – 2006	Plastische Chirurgie	South Manchester University Hospitals, Manchester, Great Britain Plastische Chirurgie und Handchirurgie

**Veröffentlichungen**

**Lochmüller E.-M., Weusten A., Wolf E., Cindik E., Renner-Müller I., Eikmeier T.,  
Eckstein F.:**

Geschlechtsspezifische Analyse der Knochenmasse normaler und Wachstumshormon  
transgener Mäuse mittels Zweiennergie-Röntgen-Absorptiometrie (DXA).

Sex-specific analysis of Bone Mass in normal and growth hormone transgenic mice with  
DXA

**Annals of Anatomy 181: 191 - 198 (1999)**

**Weusten A., Lochmüller E.-M., Cindik E., Renner-Müller I., Tysarczyk - Niemeyer G.,  
Wolf E., Eckstein F.:**

Femoral bone mass, size, and density in male and female growth hormone transgenic mice.

**Transgenics 3: 43 - 50 (1999)**

**Lochmüller E.-M., 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)**

**Eckstein F., Wehr U., Lochmüller E.-M., Weusten A., Renner-Müller I., Rambeck W., Wolf E.:**

Accuracy of non-invasive body composition and bone mineral analysis with high-resolution dual energy X-ray absorptiometry (DXA) in normal and “giant” mice.

**Growth Hormone and IGF Research 12 (2): 116 - 25 (2002)**

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

Precision and accuracy of peripheral quantitative computed tomography in the mouse skeleton as compared to histology and micro computed tomography.

**Journal of Bone and Mineral Research 18 (8): 1486 - 96 (2003)**

**Eckstein F., Weusten A., Schmid C., Wehr U., Wanke R., Rambeck W., Wolf E., Subburaman M.:**

Longitudinal in vivo effects of growth hormone overexpression on bone in transgenic mice.

**Journal of Bone and Mineral Research 19 (5): 802 - 10 (2004)**

### **Kongressbeiträge**

**F. Eckstein, A. Weusten, H. Graichen, E - M. Lochmüller, E. Cindik, E. Wolf:**

Analyse von Knochenmasse und -mikrostruktur bei der Wachstumshormon-transgenen Maus.

**15. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft; Würzburg, 30. September - 2. Oktober, 1998; (Poster);**

**Abstract in Annals of Anatomy 181 (Suppl.): p. 253**

**A. Weusten, E.-M. Lochmüller, H. Graichen, E. Cindik, E. Wolf, F. Eckstein:**

Knochenmasse, -dichte und -struktur bei der Wachstumshormon-transgenen Maus.

**13. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Osteologie;** Göttingen, 27. Februar - 1. März 1999; (Poster);

**Abstract in Osteologie 8 (Suppl. 1): p. 139**

**E.-M. Lochmüller, F. Eckstein, A. Weusten, H. Graichen, I. Renner-Müller, E. Wolf:**  
Bone mass and microstructure in growth hormone transgenic mice.

**Versammlung der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie;** Kiel, 10. - 15. März 1999; (Poster);

**Abstract in Exp Clin Endocrinol Diabetes 107 (Suppl. 1): p. 113**

**F. Eckstein, A. Weusten, E.-M. Lochmüller, E. Cindik, I. Renner-Müller, E. Wolf:**  
Longitudinale in vivo Messung der Zunahme des Knochenmineralgehaltes bei normalen und bei Wachstumshormon - transgenen (MT - bGH) Mäusen.

**Versammlung der Anatomischen Gesellschaft;** Hamburg, 26. - 29 März 1999; (Vortrag);

**Abstract in Annals of Anatomy 181 (Suppl.): p. 24**

**A. Weusten, E.-M. Lochmüller, E. Wolf, F. Eckstein:**

Geschlechtsspezifische in vivo Analyse der postnatalen Knochenentwicklung bei der normalen und bei der Wachstumshormon-transgenen Maus.

**Anatomentreffen "Konzepte in der Anatomischen Forschung":** München, 13. - 14 Mai 1999; (Vortrag);

**Abstract in Annals of Anatomy 182: 89 - 90 (2000)**

**F. Eckstein, H. Graichen, E.-M. Lochmüller, A. Weusten, E. Wolf:**

Bone mass and microstructure in growth hormone transgenic mice.

**European Orthopaedic Research Society:** Brussels, 3. - 4. June, 1999; (Poster)

**Abstract in Transactions of the European Orthopaedic Research Society 9: p. 75**

**E.-M. Lochmüller, U. Wehr, A. Weusten, W. Rambeck, E. Wolf, F. Eckstein:**

Validierung und longitudinale Messung des Knochenmineralgehaltes im Wachstumshormon-transgenen Mausmodell mittels Zweienergie-Röntgenabsorptiometrie (DXA).

**Osteologiekongress 2000;** Würzburg, 1. - 4 März, 2000;

**Abstract in Osteologie 9 (Suppl. 1): p. 141**

---

**E.-M. Lochmüller, U. Wehr, A. Weusten, W. Rambeck, E. Wolf, F. Eckstein:**

Bone mass in growth hormone transgenic mice - validation and longitudinal study with DXA.

**World Congress on Osteoporosis 2000;** Chicago, 15.-18. June, 2000;

**Abstract in Osteoporosis International 11 (Suppl. 2): p. 75**