



Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN) Dummerstorf

Neue Ansätze für die funktionale Analyse von IGF-Effekten *in vivo* und *in vitro*

Kumulative Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum humanum (Dr. rer. hum.)

der medizinischen Fakultät der Universität Rostock



vorgelegt von

Michael Walz

Geb. am 18. Juni 1986 in Güstrow

Rostock, 8. Juni 2021



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung - Nicht kommerziell - Keine Bearbeitungen
4.0 International Lizenz.

**Universität
Rostock**



Traditio et Innovatio



**LEIBNIZ-INSTITUT
FÜR NUTZTIERBIOLOGIE**



**Universitätsmedizin
Rostock**

H. WILHELM SCHAUMANN STIFTUNG

Tag der Einreichung: 9. Juni 2021

Tag der Verteidigung 7. Juni 2022

Gutachter:

Prof. Dr. med. Holger S. Willenberg

Sektion Endokrinologie und Stoffwechselkrankheiten
im Zentrum für Innere Medizin

Universitätsmedizin Rostock

Universität Rostock

Prof. Dr. rer. nat. Michael Lalk

Arbeitskreis Stoffwechselbiochemie/Metabolomics

Institut für Biochemie

Universität Greifswald

PD. Dr. rer. nat. Andreas Höflich

Abteilung Signaltransduktion

Institut für Genombiologie

Forschungsinstitut für Nutztierbiologie (FBN)

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGEN	I
<i>Einheiten</i>	<i>III</i>
<i>Zelllinien</i>	<i>IV</i>
ZUSAMMENFASSUNG	1
ABSTRACT	3
SYNOPSIS	5
1.1 Einleitung.....	5
<i>Die GH-IGF-Wachstumsachse</i>	5
<i>Das Insulin-like growth factor System (IGF-System)</i>	6
<i>IGF-unabhängige Effekte von IGFBPs</i>	9
<i>Signalweg zur Aktivierung von AKT</i>	10
<i>Kooperative Aktivierung von AKT durch IGF1 und IGFBP2</i>	11
<i>Funktionale Analyse des IGF-Systems in vitro</i>	12
<i>IGF1 in biologischen Matrices</i>	13
<i>Funktionale Analyse des IGF-Systems in vivo</i>	14
1.2 Fragestellung	16
<i>Publikation 1</i>	16
<i>Publikation 2</i>	16
<i>Publikation 3</i>	16
1.3 Methoden.....	17
<i>Zellkulturen</i>	17
<i>Mauslinien</i>	17
<i>Nacktmull</i>	18
<i>Humanes Serum und Cerebrospinalflüssigkeit</i>	18
<i>Milchproben</i>	19
<i>BIRA-Assay</i>	19
<i>Bestimmung der IGF1 Konzentration mittels ELISA</i>	20
<i>Proteinanalyse</i>	20
<i>Western Liganden Blot</i>	21
<i>Western Immuno Blot</i>	21

<i>Kapillarelektrophorese (WES)</i>	22
<i>Protease Assay</i>	22
<i>Genexpression von PAPP-As und STCs in Gewebe</i>	22
<i>Statistik</i>	23
1.4 Ergebnisse.....	24
<i>Publikation 1: Overlap of Peak Growth Activity and Peak IGF1 to IGFBP Ratio: Delayed Increase of IGFBPs versus IGF1 in Serum as a Mechanism to Speed up and down Postnatal Weight Gain in Mice</i>	24
<i>Publikation 2: Sex-Specific Control of Muscle Mass: Elevated IGFBP Proteolysis and Reductions of IGF1 Levels Are Associated with Substantial Loss of Carcass Weight in Male DU6PxIGFBP-2 transgenic Mice</i>	26
<i>Publikation 3: Development of a sensitive bioassay for the analysis of IGF-related activation of AKT/mTOR signalling by biological matrices</i>	27
1.5 Diskussion.....	29
<i>Zusammenspiel von IGF1, IGFBPs und Wachstum in Mauselektionslinien</i>	29
<i>Geschlechtsabhängige Effekte von IGFBP2 auf das Muskelwachstum</i>	31
<i>Untersuchung der biologischen Aktivität von IGF1</i>	33
<i>Zusammenfassung und Ausblick</i>	36
2. PUBLIKATIONEN	38
2.1. Overlap of Peak Growth Activity and Peak IGF1 to IGFBP Ratio: Delayed Increase of IGFBPs versus IGF1 in Serum as a Mechanism to Speed up and down Postnatal Weight Gain in Mice	38
2.2. Sex-Specific Control of Muscle Mass: Elevated IGFBP Proteolysis and Reductions of IGF1 Levels Are Associated with Substantial Loss of Carcass Weight in Male DU6PxIGFBP-2 transgenic Mice.....	51
2.3. Development of a sensitive bioassay for the analysis of IGF-related activation of AKT/mTOR signalling by biological matrices.....	69
3. REFERENZEN	90
4. DANKSAGUNG.....	98
5. LEBENS LAUF.....	100
6. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	103

Abkürzungen

AKT	Protein Kinase B
ALS	Säure-empfindliche Untereinheit bzw. Acid-labile Subunit
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BIRA	BP2 Enhanced IGF-Related AKT phosphorylation
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
DMEM	Dulbeco's Modified Essential Medium
DU6	Dummerstorfer Mauslinie selektiert auf hohe Körpermasse
DU6P	Dummerstorfer Mauslinie selektiert auf hohe Proteinmasse
DUC	Dummerstorfer Inzucht-Mauslinie
EGF	Epidermal Growth Factor
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
FCS	Fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FGF	Fibroblast Growth Factor
GH	Somatropin bzw. Growth Hormone
GHBP	GH-Bindungsproteine
GHRH	GH-freisetzende Hormone
GHRs	Growth Hormone Rezeptoren
HBD	Heparin Bindungsdomänen
IGF1	Insulin-like Growth Factor 1
IGF1R	IGF1/2 Rezeptor Typ 1 Tyrosin Kinase
IGF2	Insulin-like Growth Factor 2
IGF2R	IGF2/Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
IGFBP1-6	IGF-Bindungsprotein 1 bis 6
IGFBP-rPs	IGF-Bindungsprotein zugehörige (related) Proteine

IGFBPs	IGF-Bindungsproteine
IGFs	Insulin-like Growth Factors
Iip45	IGFBP2 binding protein
IR	Insulin Rezeptor
IRS	Insulin Rezeptor Substrat
IRR	Insulinrezeptor-zugehörige Rezeptoren
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumbihydrogenphosphat
KIRA	Kinase Rezeptor Aktivierung
LAMB1	Laminin, Beta 1
M6P	Mannose-6-Phosphat
MAPK	Mitogen-activated Protein-Kinase
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin, auch bekannt als mechanistic TOR
Na_2HPO_4	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NF κ B	Nuclear Factor κ B
PAPP-A	Pregnancy-associated plasma protein-A
PAPP-A2	Pregnancy-associated plasma protein-A2
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
Phos-AKT	AKT phosphoryliert an Serin 473
PI3K	Phosphoinositide-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKC ζ	Protein Kinase C zeta type
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog

RPTPβ	Receptor Protein Tyrosin Phosphatase β
STC1	Stanniocalcin 1
STC2	Stanniocalcin 2
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
TGFβ	Zytokin Transforming Growth Factor Beta
WIB	Western Immuno Blot
WLB	Western Liganden Blot

Einheiten

Symbol	Einheit	Umrechnung in SI-Einheit
min	Minuten	1 min = 60 s
h	Stunden	1 h = 60 min = 3600 s
d	Tage	1 d = 24 h = 86400 s
Wo	Wochen	1 Wo = 7 d = 604.800 s
ng	Nanogramm	1 ng = 10^{-3} μg = 10^{-12} kg
μg	Mikrogramm	1 μg = 10^{-3} mg = 10^{-9} kg
mg	Milligramm	1 mg = 10^{-3} g = 10^{-6} kg
g	Gramm	1 g = 10^{-3} kg
kDa	Kilo-Dalton	1 kDa ≈ $1,661 \cdot 10^{-24}$ kg
μl	Mikroliter	1 μl = 10^{-3} ml = 10^{-9} m ³
ml	Milliliter	1 ml = 10^{-6} m ³
°C	Grad Celsius	0 °C = 273,15 K; 100 °C = 373,15 K
RCF	Relative Zentrifugalbeschleunigung	1 RCF ≈ 9,81 m/s ²
μM	Mikromolar	1 μM = 10^{-3} mol/m ³
mM	Millimolar	1 mM = 1000 μM = 1 mol/m ³

Zelllinien

Bezeichnung	Primärzelle/Zelllinie	Beschreibung
HEK293	transformierte Zelllinie	Embryonale Nierenzellen aus dem Menschen
HEK293-2	transfizierter HEK293 Kontroll-Zellklon	HEK293, transfiziert mit EcoRI verdautem Neomycin Resistenz Plasmid pSV2neo (Clontech, Heidelberg, Deutschland) und mit Expressionvektor pCMV-int-mIGFBP2 (XhoI Verdau)
HEK293-10	transfizierter HEK293 Zellklon mit hoher Expression von IGFBP2	HEK293, transfiziert mit EcoRI verdautem Neomycin Resistenz Plasmid pSV2neo (Clontech, Heidelberg, Deutschland) und mit Expressionvektor pCMV-int-mIGFBP2 (XhoI Verdau)
C2C12	Spontan immortalisierte Zelllinie	Myoblasten von der Maus
HuH7	Krebs-Zelllinie	Leberzellkarzinom von einem 57-jährigem Mann
3T3-L1	Spontan immortalisierte Zelllinie	Fettgewebe von der Maus

Zusammenfassung

Die Mitglieder des Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor-System (Insulin-like Growth Factor-System; IGF-System) regulieren das Wachstum auf unterschiedlichen Ebenen. Zu diesen Regulatoren gehören neben den zwei Peptidhormonen (IGF1 und IGF2), den Rezeptoren (IGF1-Rezeptor und IGF2-Mannose-6-Phosphat-Rezeptor) und den sechs IGF-Bindungsproteinen (IGFBP1 bis -6) auch Proteasen (PAPP-A und PAPP-A2) sowie Protease-Inhibitoren (Stanniocalcin 1 und 2). In der Vergangenheit zog man zur Beschreibung des IGF-Systems überwiegend absolute Konzentrationen einzelner Hormone heran. Nach aktuellem Verständnis rückt für die adäquate Beschreibung des komplexen IGF-Systems jedoch die Analyse der biologischen Aktivität des Gesamtsystems in den Vordergrund. In der vorliegenden Arbeit wird die Interaktion mehrerer Faktoren zur Beschreibung der Wachstumsregulation in auf das Wachstum selektierten und in transgenen Mauslinien (*in vivo*) stärker berücksichtigt. Mittels eines neuartig entwickelten *in-vitro*-Testsystems wird zudem die biologische Aktivität des IGF-Systems auf die intrazelluläre Signaltransduktion bestimmt.

Um zu verstehen, wie IGFBPs das IGF-abhängige Wachstum steuern, wurden die longitudinale Wachstumsaktivität, sowie die Konzentration von IGF1 und IGFBPs in unterschiedlichen Mausmodellen, selektiert auf hohe Proteinmasse (DU6P) und auf hohe Körpermasse (DU6), vergleichend zu ihrer unselektierten Kontrolle (DUC) zwischen 2. und 54. Wochen untersucht. Die wachstumsselektierten Mäuse charakterisieren sich durch eine höhere tägliche Gewichtszunahme sowie eine längere Wachstumsphase im Vergleich zu den unselektierten Mäusen in den Kontrollgruppen. Im Serum beider Geschlechter dieser Linien wurden die IGF1-Konzentration und die IGFBP2- bis IGFBP4-Konzentrationen innerhalb der Lebensspanne von 2 bis 54 Wochen quantifiziert. Das molare Verhältnis aus IGF1 und der im Serum quantifizierbaren IGFBPs (IGFBP2, -3 und -4), das als Biomarker für die Aktivität des IGF-Systems fungiert, korreliert deutlich mit der täglichen Körpergewichtszunahme. Die auf Wachstum selektierten Tiere wiesen während der Wachstumsphase einen höheren Quotienten im Vergleich zu den Kontrolltieren auf, der ebenfalls mit der höheren Wachstumsaktivität in direktem Zusammenhang steht. Konkret kann postuliert werden, dass die Steuerung der hohen Wachstumsaktivität während der Pubertät in der Maus nicht nur auf Ebene von IGF1, sondern auch auf Ebene der IGFBPs erfolgt.

Die Untersuchung der Regulation des Muskelwachstums durch einen ausgewählten Vertreter der IGFBPs erfolgte in einem Kreuzungsmodell. Hierbei wurden männliche Mäuse mit erhöhter Proteinmasse (DU6P) mit weiblichen IGFBP2-transgenen Mäusen gekreuzt. Es zeigten sich geschlechtsspezifische Wirkungen von IGFBP2 auf Wachstum und Muskelansatz der Tiere. So war das Karkassengewicht der männlichen transgenen Mäuse nicht nur um 20 % geringer als bei nicht-transgenen Männchen, Bei den transgenen Weibchen reduzierte sich das Karkassengewicht am 49.

Lebenszeit im Vergleich zu den nicht-transgenen Weibchen um 10 %. Obwohl sich die lokale Expression von IGFBP2 im Muskel von transgenen Tieren beider Geschlechter erhöhte, konnten im Serum der transgenen Mäuse keine erhöhten Konzentrationen an intaktem IGFBP2 nachgewiesen werden. Bei den männlichen Mäusen zeigten sich stattdessen große Mengen an IGFBP2-Fragmenten. Die proteolytische Aktivität im Serum männlicher IGFBP2 transgener Mäuse stieg so hoch an, dass sich im Serum auch die Konzentrationen von intaktem IGFBP3 und IGFBP4 im Vergleich zu nicht-transgenen Wurfgeschwistern verminderten. Die Ergebnisse legen nahe, dass DU6P Mäuse durch eine Erhöhung der proteolytischen Degradation von IGFBPs die Aktivität des IGF-Systems erhöhen können und dass dieser Effekt vor allem in männlichen Mäusen besonders deutlich ist. Aufgrund des Mangels an IGFBPs im Serum männlicher IGFBP2/DU6P Mäuse und dem damit einhergehenden Verlust der Stabilisierung von IGF1 im Serum verminderte sich auch die IGF1-Konzentration im Serum deutlich.

Für die Beschreibung der biologischen Aktivität des IGF-Systems auf die Aktivierung der Proteinkinase B (AKT) wurde ein neuartiges *in-vitro*-Testsystem entwickelt. In diesem Bioassay erhöht membrangebundenes IGFBP2 die Sensitivität der Zellen gegenüber IGF1, welches nach Transfektion von der Zelle selbst gebildet oder von außen supplementiert werden kann. Die Spezifität des Nachweissystems wurde durch intra- und extrazelluläre Inhibitoren der IGF1-Rezeptor-Aktivierung charakterisiert. Die maximale Antwort auf Ebene der AKT-Aktivierung wurde nach Exposition der Zellen mit der Testmatrix (rekombinantem IGF1) für 15 min erreicht und dauerte weitere 45 min an. Nach der Etablierung und Charakterisierung des neuartigen Bioassays wurden biologische Matrices eingesetzt (Serum von Maus, Nacktmull und Mensch, Liquor vom Mensch und bovine Kolostrum- und Milchproben). Der etablierte und neue Bioassay zeigte sich als sehr sensitiv und robust, und liefert sehr effizient und kostengünstig Aussagen über bioaktives IGF.

In dieser Arbeit sollten die Möglichkeit und Notwendigkeit herausgearbeitet werden, das IGF-System in seiner Komplexität zu untersuchen. Das aktuelle Konzept der komplexen Regulation des IGF-Systems durch IGFBPs, Proteasen und Inhibitoren wurde berücksichtigt, wobei ein neues Verständnis der physiologischen Regulation von Wachstum und Differenzierung durch das IGF-System entstand.

Abstract

The members of the insulin-like growth factor system (IGF system) regulate growth at different levels. In addition to the two peptide hormones (IGF1 and IGF2), the receptors (IGF1 receptor and IGF2 mannose-6-phosphate receptor) and the six IGF binding proteins (IGFBP1 to -6), these regulators also include proteases (PAPP-A and PAPP-A2) and protease inhibitors (stanniocalcin 1 and 2). In the past, absolute concentrations of individual hormones were mainly used to describe the IGF system. According to current understanding, however, the analysis of the biological activity of the entire system comes to the fore for an adequate description of the complex IGF system. In the present study, the interaction of several factors is given greater consideration for the description of growth regulation in mouse lines selected for growth and in transgenic mouse lines (in vivo). Using a newly developed in vitro assay system, the biological activity of the IGF system on intracellular signal transduction is also determined.

To understand how IGFBPs control IGF-dependent growth, the longitudinal growth activity, as well as the concentration of IGF1 and IGFBPs in different mouse models, selected for high protein mass (DU6P) and for high body mass (DU6), were compared to their unselected control (DUC) between weeks 2 and 54. The growth-selected mice were characterised by a higher daily weight gain and a longer growth phase compared to the unselected mice in the control groups. In the serum of both sexes of these lines, IGF1 concentration and IGFBP2 to IGFBP4 concentrations were quantified within the life span of 2 to 54 weeks. The molar ratio of IGF1 and serum quantifiable IGFBPs (IGFBP2, -3 and -4), which acts as a biomarker for IGF system activity, correlates significantly with daily body weight gain. Animals selected for growth showed a higher quotient during the growth phase compared to control animals, which is also directly related to higher growth activity. Specifically, it can be postulated that the control of high growth activity during puberty in mice occurs not only at the level of IGF1, but also at the level of IGFBPs.

The regulation of muscle growth by a selected representative of the IGFBPs was investigated in a crossbreeding model. Male mice with increased protein mass (DU6P) were crossed with female IGFBP2 transgenic mice. Sex-specific effects of IGFBP2 on growth and muscle development of the animals were found. Not only was the carcass weight of the male transgenic mice 20 % lower than that of non-transgenic males, but the carcass weight of the transgenic females was reduced by 10 % on the 49th day of life compared to the non-transgenic females. Although local expression of IGFBP2 increased in the muscle of transgenic animals of both sexes, no increased levels of intact IGFBP2 were detected in the serum of the transgenic mice. Instead, the male mice showed large amounts of IGFBP2 fragments. The proteolytic activity in the serum of male IGFBP2 transgenic mice increased to such an extent that the concentrations of intact IGFBP3 and IGFBP4 also decreased in the serum compared to

non-transgenic littermates. The results suggest that DU6P mice can increase the activity of the IGF system by increasing proteolytic degradation of IGFbps and that this effect is particularly evident in male mice. Due to the lack of IGFbps in the serum of male IGFBP2/DU6P mice and the concomitant loss of stabilisation of IGF1 in the serum, the serum IGF1 concentration also decreased significantly.

A novel in vitro assay system was developed to describe the biological activity of the IGF system on protein kinase B (AKT) activation. In this bioassay, membrane-bound IGFBP2 increases the sensitivity of the cells to IGF1, which can be produced by the cell itself after transfection or supplemented from outside. The specificity of the detection system was characterised by intra- and extracellular inhibitors of IGF1 receptor activation. The maximal response at the level of AKT activation was achieved after exposure of the cells to the test matrix (recombinant IGF1) for 15 min and continued for another 45 min. After establishing and characterising the novel bioassay, biological matrices were used (mouse, naked mole rat and human serum, human CSF and bovine colostrum and milk samples). The established and new bioassay was shown to be very sensitive and robust, providing information on bioactive IGF in a very efficient and cost-effective manner.

The aim of this work was to work out the possibility and necessity of investigating the IGF system in its complexity. The current concept of the complex regulation of the IGF system by IGFbps, proteases and inhibitors was taken into account, whereby a new understanding of the physiological regulation of growth and differentiation by the IGF system emerged.

Synopsis

1.1 Einleitung

Die ersten Studien über Wachstum von Harvey Cushing in 1912 ergaben, dass Patienten mit Gigantismus oder Akromegalie eine erhöhte Produktion von Somatotropin oder Wachstumshormon (GH - Growth Hormon) durch die Hypophyse aufweisen [1]. In den 50er Jahren entdeckte Daughaday, dass eine Injektion mit GH in Ratten die Produktion eines weiteren Wachstumshormons erzeugen kann, welches eine Insulin-ähnliche Wirkung aufwies, und darauf basierend Insulin-like Growth Factor (IGF) genannt wurde [1].

Heutzutage ist bekannt, dass die GH-IGF-Wachstumsachse nicht nur das Wachstum beeinflusst, sondern auch weitere physiologische Prozesse reguliert. GH und IGF1 beeinflussen den Metabolismus, Übergewicht und Essstörungen, Entwicklung bestimmter neurosensorischer Systeme, neurodegenerative Erkrankungen, Langlebigkeit und Krebs [2-8]. Da die Wechselwirkungen der GH-IGF-Achse für das Verständnis von vielen Zivilisationskrankheiten von Bedeutung ist, ermöglicht dessen Erforschung und das Verständnis der GH-IGF-Achse Therapien, die ein längeres und gesundes Leben, sogenanntes Healthy Aging, auf zellulärer, organischer und gesamtkörperlicher Ebene ermöglichen [9].

Die GH-IGF-Wachstumsachse

GH wird in der Hypophyse exprimiert und wirkt als Polypeptid zirkulierend auf verschiedenste Zelltypen und Gewebe im Zusammenspiel mit seinem Rezeptor (GHR - Growth Hormone Receptor). Die Freisetzung wird über Anregung, z.B. durch GH-freisetzende Hormone (GHRH), und Hemmung, z.B. durch Somatostatin bzw. freie Fettsäuren, reguliert [10]. GH-Wirkungen können direkt auf Gewebe im gesamten Organismus vermittelt werden. Sie entfalten darüber hinaus auch eine indirekte Wirkung, indem sie z.B. in der Leber die Produktion von IGF1 und die von bestimmten IGF-Bindungsproteinen induzieren [11].

Wenn GH an Zellen über GHR bindet, initiiert dies eine intrazelluläre Signalkaskade durch die erhöhte Genexpression von Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1), IGF Bindungsproteinen 3 und 5 (IGFBP3 bzw. IGFBP5) sowie einer Säure-empfindlichen Untereinheit (ALS - Acid-labile Subunit). Durch die Interaktion von IGF1 mit IGFBP3 oder -5 bzw. zusätzlich mit der ALS entstehen stabile dimere bzw. trimere Proteinkomplexe. Neben IGFBP3 und -5 kommen in Körperflüssigkeiten und Geweben außerdem IGFBP1, -2, -4, und -6 vor, welche mit IGF1 oder -2 ausschließlich dimere Komplexe bilden [11]. Dimere Komplexe oder freie IGFs können den Zellzwischenraum passieren und in

unterschiedlichen Zelltypen Wachstum, metabolische Funktionen und weitere IGF abhängige Prozesse kontrollieren. IGF1 inhibiert zudem die GH-Freisetzung in der Hypophyse, wodurch es als negativer Feedback-Loop fungiert [12].

Das Insulin-like growth factor System (IGF-System)

Das IGF-System umfasst eine Hormonfamilie mit Einfluss auf Wachstum, Entwicklung und Stoffwechsel sowie auf zelluläre oder metabolische Prozesse wie Differenzierung, Proliferation, Überleben und Migration. Als Peptidhormone dieser Familie fungieren die Wachstumsfaktoren IGF1 und IGF2. Die Rezeptoren für IGF1 bzw. IGF2 sind der IGF1-Rezeptor (IGF1R), IGF2/Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (IGF2R), Insulinrezeptor (IR), Insulinrezeptor-Related Rezeptor (IRR) und Hybridrezeptoren. Des Weiteren existieren in dem IGF-System neben den genannten Bindungsproteinen, Proteasen und Protease-Inhibitoren auch Rezeptoren für die Bindungsproteine (**Abbildung 1**; [13]). Damit die physiologische Wirkung von IGFs vermittelt wird ist eine Vielzahl an Proteinen nötig, welche intrazellulär an der Signalübertragung vom IGF1R sowie am AKT/mTOR oder Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) Signalweg beteiligt sind.

Das Insulin-like Growth Factor (IGF) System

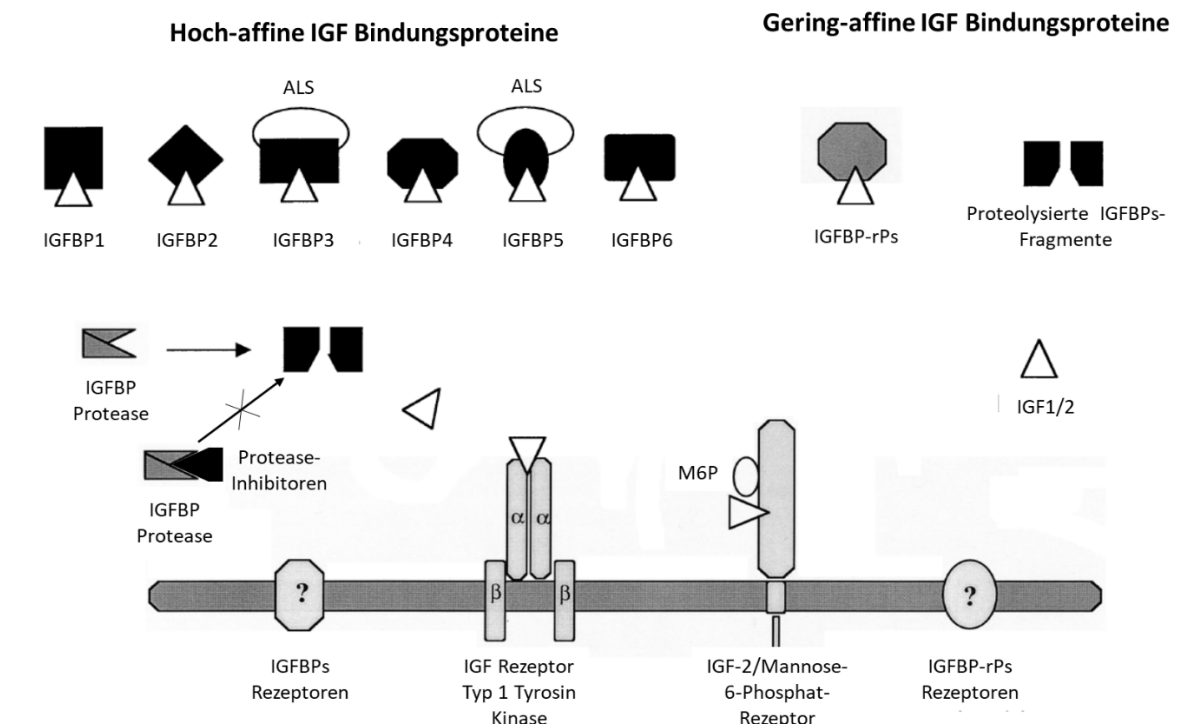


Abbildung 1 Das IGF System nach Hwa et al. 1999 [13]. IGF1/2: Insulin-like Growth Factor 1/2, IGFBP1-6: IGF-Bindungsprotein 1 bis 6, ALS: Säure-empfindliche Untereinheit, IGFBP-rPs: IGF-Bindungsproteine zugehörige Proteine, M6P: Mannose 6 Phosphat

Der IGF1R gehört als Mitglied der Insulin Rezeptor Familie zur Gruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren. Die inaktiven Monomere des IGF1R bestehen aus einer extrazellulären α-Untereinheit

und der β -Untereinheit, welche in der Zellmembran verankert sind und intrazellulär eine Tyrosinkinaseaktivität aufweisen. Die Monomere können miteinander aktive IGF1R-Dimere bilden aber auch Hybriddimere mit Monomeren des IR bzw. IRR. Sowohl IGF1 als auch IGF2 besitzen eine hohe Affinität zum IGF1R. Der IGF1R weist zudem eine geringere Affinität zu Insulin auf [13].

Der IGF2R hat eine hoch affine Bindungsstelle für IGF2, die auch eine schwächere Affinität zu IGF1 (20 % im Vergleich zu IGF2) besitzt. Der IGF2R hat hingegen keine Affinität zu Insulin [14]. Zusätzlich zur Bindungsstelle für IGF2 besitzt der IGF2R auch zwei Bindungsstellen für Mannose-6-Phosphat. Der IGF2R kann durch die Membran translozieren und auf diese Weise insbesondere IGF2 und Mannose-6-Phosphat der Zelle der lysosomalen Degradation zuführen [15].

Freies IGF1 bindet recht schnell an die zugehörigen Rezeptoren. Dadurch ist freies IGF1 in biologischen Matrices wie Seren selten zu finden und zirkuliert überwiegend im Verbund mit den Bindungsproteinen. Die IGF-Bindungsprotein-Superfamilie teilt sich ein in IGF-Bindungsproteine (IGFBPs), von denen sechs beschrieben sind [16], und IGF-Bindungsprotein zugehörige (related) Proteine (IGFBP-rPs), von denen derzeit zehn näher charakterisiert wurden [13, 17]. IGFBPs haben eine 100-fach höhere Affinität zu IGFs im Vergleich zu IGFBP-rPs [13]. Die Nomenklatur von IGFs, IGF-Rezeptoren, IGFBPs und IGFBP-rPs wurde 1998 festgelegt [13, 16]. In manchen Quellen bezeichnen die Autoren aber IGFBP-rP1 als IGFBP7 (525 Einträge bei Pubmed über IGFBP7 ab 2000). Die hohe und reversible Affinität von IGFBPs zu IGFs ist etwa 10-mal höher als die von IGFs zu den Rezeptoren, wodurch die Bindungsproteine auch regulatorisch auf die Funktion von IGFs wirken und ihre Halbwertszeit in biologischen Fluiden und Matrices erhöhen. Die hohe Affinität von IGFBPs ermöglicht es, IGFBPs analytisch, IGFBPs durch markierte IGF-Liganden nachzuweisen [18].

Für seine zelluläre Wirksamkeit ist die Freisetzung des gebundenen IGF von seinen Bindungsproteinen unerlässlich. Die hohe Affinität der IGFBPs zu IGFs wird über Wasserstoffbrückenbindungen durch zwei Cystein-reiche IGF-Bindungsdomänen jeweils N-terminal und C-terminal ermöglicht. Aus der kooperativen Bindungsaktivität in beiden Hälften der IGFBPs resultiert eine höhere Affinität der IGFs zu den IGFBPs im Vergleich zu den IGF-Rezeptoren. Für den analytischen Nachweis von IGF1 und -2 kann durch eine Reduzierung des pH-Wertes diese Bindung aufgehoben werden. In biologischen Systemen wird die hohe Affinität durch eine proteolytische Abbauregion zwischen beiden Bindungsdomänen kontrolliert und durch deren Degradation gebundenes IGF freigesetzt (**Abbildung 2**: Beispiel von IGFBP2) [19].

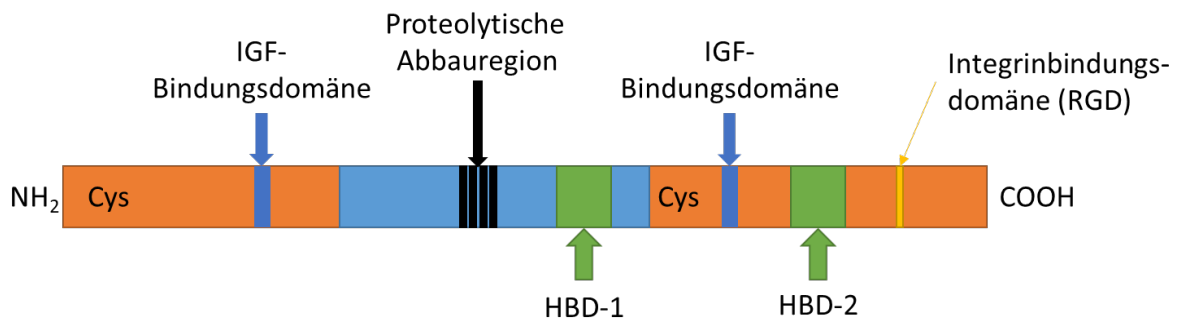


Abbildung 2 Schematische Darstellung unterschiedlicher Proteindomänen von Insulin-like Growth Factor Binding Protein 2 (IGFBP2) adaptiert nach Yau et al. 2015 [19]; NH₂: N-terminales Ende, COOH: C-terminales Ende, HBD-1/2: Heparin Bindungsdomäne, Cys: Cystein-reiche IGF-Bindungsdomänen.

Auf dem klassischen Konzept [13] (**Abbildung 1**) beruht die immer noch weit verbreitete Auffassung, dass über Hormonmessungen von IGFs und den Bindungsproteinen mittels ELISA das IGF-System adäquat beschrieben werden kann. In dem neueren Konzept [11] (**Abbildung 3**) spielt die funktionelle Betrachtung der IGFs bzw. Bindungsproteine eine stärkere Rolle. Dies führt zu der Erkenntnis, dass die Proteasen und Protease-Inhibitoren für die funktionelle Wirkung von Bedeutung sind. Die Metalloproteasen PAPP-A und PAPP-A2 (Pregnancy-associated plasma protein-A/A2) katalysieren den proteolytischen Abbau von IGFBPs. PAPP-A ist membrangebunden und spaltet IGFBP2 [20], 4 und 5 [21]. IGFBP4 kann nur durch PAPP-A gespalten werden, wenn es an IGFs gebunden vorliegt [22]. PAPP-A2 ist nicht membrangebunden und spaltet spezifisch IGFBP3 und 5 [23, 24]. Für IGFBP1 und 6 sind nach derzeitigem Wissensstand keine Proteasen bekannt.

Die Proteasen PAPP-As werden durch Stanniocalcin 1 und 2 (STC1 bzw. STC2) inhibiert, was wiederum die Freisetzung von IGFs hemmt [25]. Während STC1 reversibel effizient an PAPP-A/A2 bindet [25], bindet STC2 kovalent und irreversibel an PAPP-A/A2 [26] und fungiert somit als Bremse für Wachstumsprozesse [27]. In dem aktuellen Verständnis des IGF-Systems spielt die proteolytische Aktivität der Proteasen eine bedeutende Rolle, da jene erst die Funktion von gebundenen IGF1-IGFBPs ermöglicht und damit die biologische Aktivität bestimmt. So ist die biologische Aktivität komplex reguliert und es ist für die Beschreibung der Wirkung ist es notwendig, nicht nur die Konzentration der einzelnen Hormone zu messen, sondern auch von Bedeutung der Proteasen mit in die biologische Aktivität einzubeziehen.

Medizinisch relevant sind Beobachtungen des IGF-Systems, bei welchen Korrelationen zwischen erhöhten Konzentrationen von IGF1, IGF2 und einigen IGFBPs und diversen Tumoren nachgewiesen wurden [28-31]. Weiterhin zeigte sich im zentralen Nervensystem in Verbindung mit Alzheimer Erkrankungen, Depressionen, Demenz und anderen kognitiven Erkrankungen ein Verlust des IGF1- und Insulinsignals [28, 32-34]. Es konnte bis jetzt aber noch nicht abschließend geklärt

werden, inwieweit IGF1 und Insulin auf Erkrankungen des zentralen Nervensystems wirken. Aufgrund der Beobachtung, dass in Tumorpatienten ein geringes Alzheimer-Risiko sowie bei älteren Krebspatienten ein besseres Erinnerungsvermögen und geringerer Erinnerungsverlust bestehen [35], gibt es die Hypothese, unter anderem auch von Stephan A. Rosenzweig [28], dass es einen inversen Faktor zwischen diesen Erkrankungen gibt. Rosenzweig vermutet, dass dieses das IGF1 oder der IGF1/Insulin Signalweg sein könnte [28].

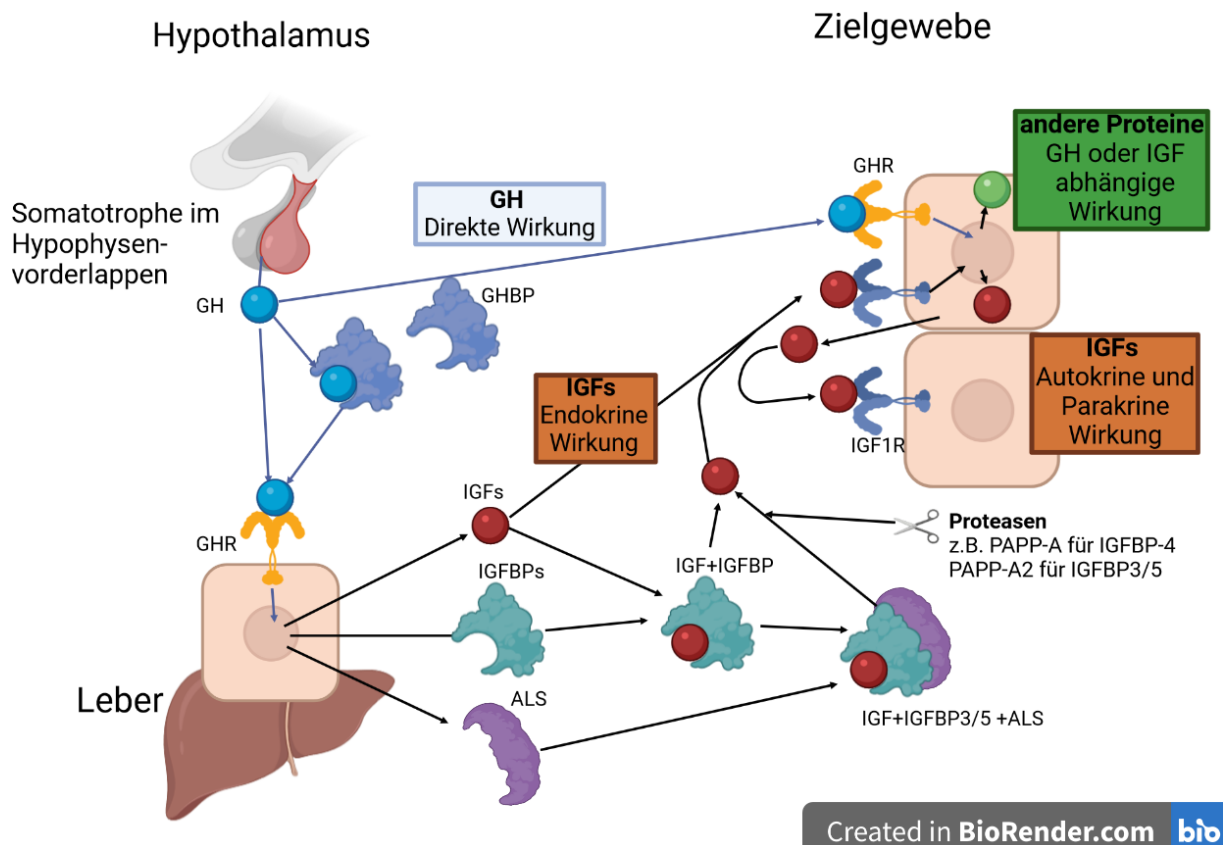


Abbildung 3 Aktuelles Verständnis der physiologischen Kontrolle der Aktivität der GH-IGF Wachstumsachse adaptiert nach Argente et al. 2017 [11]; GH: Somatotropin, GHRH: GH- freisetzende Hormone, GHBP: GH-Bindungsproteine, GHR: GH-Rezeptoren, IGFs: Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktors, IGFBPs: IGF-Bindungsproteine, ALS: Säureempfindliche Untereinheit, PAPP-A/-A2: Pregnancy-associated plasma protein A1/A2, IGF1R: IGF1/2 Rezeptor Typ 1 Tyrosin Kinase

IGF-unabhängige Effekte von IGFBPs

Für IGFBPs wurden IGF-abhängige und unabhängige Effekte beschrieben. An dieser Stelle sollen die Einflüsse von IGFBPs nur anhand einzelner Beispiele erwähnt werden. Eine aktuelle Übersicht über die IGF-abhängigen und -unabhängigen Wirkungen der IGFBPs findet sich in der Literatur [36]. So konnte etwa für IGFBP1 in Osteoblasten gezeigt werden, dass es die Knochendichte verringert, was zu einer erhöhten Anfälligkeit für Frakturen führt [37]. Ein erhöhter Spiegel von IGFBP1 erwies sich als möglicher Marker für sich im Frühstadium befindliche obere gastrointestinale Tumore [38].

IGFBP2 kann über eine Integrin-Bindungsstelle (RGD) oder Heparin-Bindungsstellen (**Abbildung 2**) an unterschiedliche Rezeptoren der Zellmembran binden und dadurch unabhängig von

IGFs beispielsweise in Brustkrebszellen die Konzentration von NFκB (Nuclear factor κB), p53 und TGFβ1 (transforming growth factor β1) erhöhen sowie die Expression der mRNA für p53, NFκB, TGFB1, Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), LAMB1 (Laminin, Beta 1) und Iip45 (IGFBP2 binding protein) hoch regulieren [39]. Durch die erhöhte Expression von Genen ausgelöst durch IGFBP2, konnte in Brustkrebszelllinien verstärkt Apoptose-Prozesse ausgelöst werden [39]. Während erhöhtes IGFBP2 als Marker für Demenz und Alzheimer diskutiert wird [40], wurde eine Reduktion von IGFBP2 im Zusammenhang mit Typ 2 Diabetes beobachtet [41]. Bei Menschen ist IGFBP2 zudem negativ mit dem Aufbau von Skelettmuskulatur assoziiert, und kann als möglicher Marker für muskuläre Erkrankungen oder Muskelleistungsfähigkeit angesehen werden [42, 43].

IGFBP3 kann unabhängig von IGFs an TGFβ-Rezeptoren binden [44]. Bei der Regulation von Apoptose ist neben IGFBP3 auch IGFBP5 beteiligt, wobei IGFBP3 nur die Apoptose-Signalwege beeinflusst, welche über Mitochondrien reguliert werden. IGFBP5 inhibiert im Gegensatz zu IGFBP3 auch Mitochondrien-unabhängige Signalwege der Apoptose [45]. Für IGFBP3 konnte nachgewiesen werden, dass es die Migration von Tumorzellen stimuliert [46]. Eine andere Studie beobachtete, dass bei übermäßigem Training der IGFBP3-Spiegel reduziert wird, wodurch es als Marker für Überbelastung dienen kann [47].

Ein IGF-unabhängiger Effekt von IGFBP4 ist die anti-gonadotrope Wirkung auf menschliche Granulosazellen [48]. Des Weiteren wird erforscht, ob IGFBP4 als Marker für kardiovaskuläre Krankheiten und deren Mortalität dienen kann [49-51].

Signalweg zur Aktivierung von AKT

Für die intrazelluläre Regulation des Zellwachstums während der Entwicklung spielt der PI3K/AKT/mTOR Signalweg (PI3K - Phosphoinositid-3-Kinase, AKT - Protein Kinase B, mTOR - mammalian Target Of Rapamycin) eine entscheidende Rolle. Der IGF1R stellt ein Weg zur Regulation dieses Signalweges dar. Verschiedene Rezeptortyrosinkinasen, wie der IGF1R, phosphorylieren PI3K, welches wiederum Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) phosphoryliert. Am Ende kann PIP₃ über eine weitere Signalkaskade AKT phosphorylieren. Als Antagonist für die Phosphorylierung von AKT (phospho-AKT) durch PIP₃ fungiert das multifunktionale Enzym Phosphatase und Tensin Homolog (PTEN). PTEN ist inaktiv, sobald es phosphoryliert vorliegt, und wird durch Dephosphorylierung aktiviert. Phospho-AKT kann mehrere weitere Zielproteine phosphorylieren, bei denen die wichtigsten Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3), Tuberous Sclerosis 2 (TSC2), Caspase 9 und PRAS40 sind [52]. Diese Proteine sind unter anderem für Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose, Angiogenese und den Metabolismus verantwortlich.

Zu den Rezeptortyrosinkinasen, welche den PI3K/AKT/mTOR Signalweg beeinflussen, gehören neben IGF1R, Insulin und Insulin-IGF1-Hybridrezeptoren auch weitere Rezeptoren von

Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel die Rezeptoren von FGF (Fibroblast Growth Factor) und EGF (Epidermal Growth Factor) oder die Rezeptoren für TGF β und Activin. Das Zusammenspiel dieser einzelnen Wachstumsfaktoren ist entscheidend für die Differenzierung der Zellen von pluripotenten Stammzellen zu entwickelten Zellen. So kann aus pluripotenten Stammzellen *in vitro* durch Entzug von TGF β und Activin eine neuronale Differenzierung/Neurodifferenzierung initiiert werden. Im Gegensatz dazu führt eine Erhöhung der Wachstumsfaktoren TGF β und Activin zu einer mesendodermen Differenzierung [52].

Kooperative Aktivierung von AKT durch IGF1 und IGFBP2

Neben der Bindung von IGFs beschreiben Shen et al. [53] 2015 eine weitere Signalfunktion von IGFBP2 (**Abbildung 4**). Wenn IGF1 an den IGF1R bindet, folgt eine Kaskade, die zuerst die Phosphorylierung von dem Insulin Rezeptor Substrat (IRS) phosphoryliert. IRS phosphoryliert und dann von der Phosphoinositide-3-Kinase (PI3K) und so die Induktion des PI3K/AKT/mTOR Signalwegs bewirkt.

Neben der IGF1R-bedingten Phosphorylierung von IRS phosphoryliert der IGF1R ebenfalls die Protein Kinase C zeta (PKC ζ). PKC ζ phosphoryliert Vimentin, welches dadurch an den Rezeptor Protein Tyrosin Phosphatase β (RPTP β) bindet. RPTP β ist eine Membran Tyrosin Phosphatase, die als Monomer die Dephosphorylierung von PTEN, dem Antagonisten zu PI3K, durchführt. Sobald phosphoryliertes Vimentin an RPTP β bindet, kann extrazelluläres IGFBP2 durch die beiden Heparin Bindungsdomänen (HBD) an zwei RPTP β Monomere binden und sie somit als Dimer inaktivieren. Durch diese Inhibierung von PTEN durch membrangebundenes IGFBP2 wirkt PTEN nicht mehr inhibierend auf PIP $_3$. Auf diesem Weg fällt der Antagonist in der Signalkaskade für die, durch IGF1 induzierte, AKT-Phosphorylierung weg und es kann durch die Messung von Phospho-AKT extrazelluläres bioaktives IGF1 quantifiziert werden.

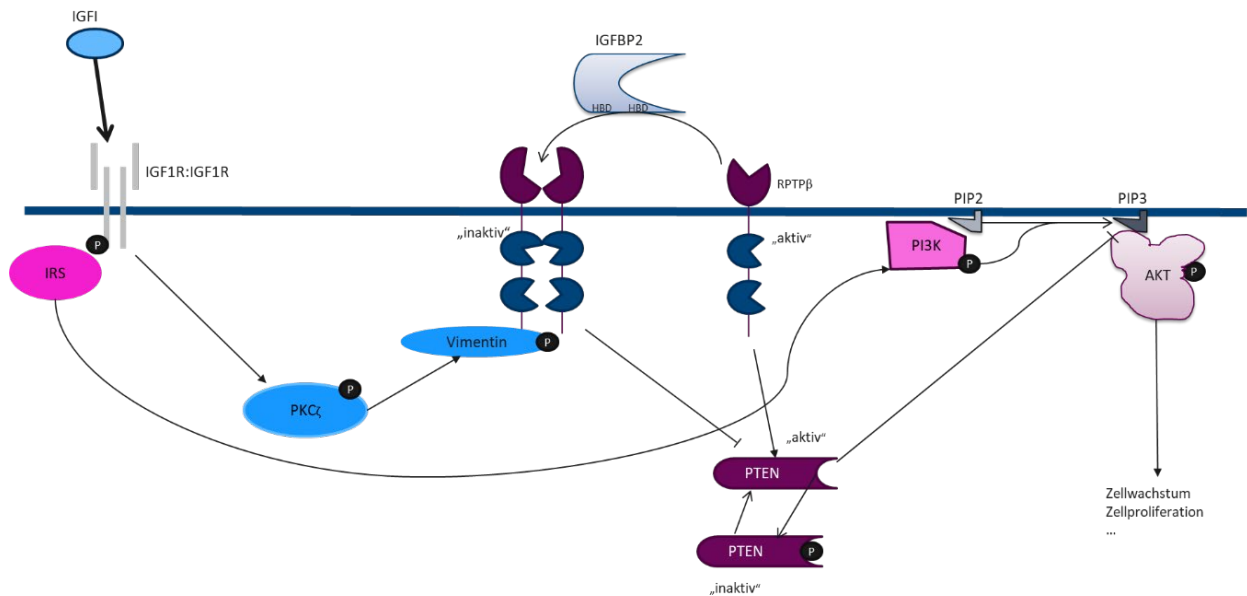


Abbildung 4 Koordinierte Aktivierung des AKT Signalwegs durch IGF1 und IGFBP2 nach Shen et al. [53] Pfeile stehen für aktivierende Wirkungen, stumpfe Pfeile für inhibierende Wirkungen, nähere Erläuterung siehe Text. IGF1: Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1; IGFBP2: IGF Bindungsprotein 2; RPTPβ: Rezeptor Protein Tyrosin Phosphatase β; IGF1R: IGF1/2 Rezeptor Typ 1 Tyrosin Kinase; IRS: Insulin Rezeptor Substrat; PKCζ: Protein Kinase C Typ ζ; PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase; PIP: Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat; PIP3: Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat; PTEN: Phosphatase und Tensin Homolog; AKT: Protein Kinase B.

Funktionale Analyse des IGF-Systems *in vitro*

Zellkulturmodelle werden für viele grundlegende biologische Fragestellungen herangezogen. Sie beschreiben die Komplexität eines Organismus zwar nur unvollständig, bieten jedoch den Vorteil definierter Rahmenbedingungen und sind durch die Reduzierung von Variablen eine einfache Möglichkeit der Untersuchung und Darstellung vieler Prozesse. So können durch Nutzung zellulärer Systeme z. B. Bioassays entwickelt werden.

Ein Bioassay ist eine Technik, bei der eine bestimmte biologische Aktivität eines Wirkstoffs in einem definierten zellulären Kontext untersucht wird. Biologische Antworten können hierbei Zellproliferation, Zelldifferenzierung, erhöhtes Überleben, Zellsekretion, Zytotoxizität oder auch Apoptose sein. Zelluläre Wirkungen von IGF1 auf die Zell-Teilungsrate [54], Formierung von Zellkolonien [55] und Chemotaxis [56] sind vielfach beschrieben.

Daneben existieren auch Bioassays, um biologische Wirkungen von IGF1 auf die intrazelluläre Signaltransduktion wie zum Beispiel den Kinase Rezeptor Aktivierung (KIRA) Assay, darzustellen [57]. Der KIRA Assay wurde 1999 entwickelt und beurteilt die Aktivität von biologischen Matrices bzw. IGF1 auf die Phosphorylierung des IGF1R in der humanen Brust-Adenokarzinom Zelllinie MCF-7. Zur Verstärkung des Signals bilden die Zellen nach Transfektion mit einem Expressionsvektor vermehrt IGF1R. Die Zellen werden in einer Multiwell-Platte ausgesät und, nach entsprechendem Wachstum, mit IGF1-haltigen biologischen Matrices für 15 min inkubiert. Nach Zellyse analysiert man die Lysate mit einem ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) für phosphorylierte Rezeptor Tyrosin Kinasen

wie IGF1R. Der KIRA-Assay liefert auf diesem Weg eine quantitative und über mehrere Assays vergleichbare Aussage über die biologische Aktivität der Peptidhormone IGF1 bzw. IGF2, die sich aus der Gesamtheit aller Peptidhormone, aller löslichen IGFBPs und der Aktivität der IGFBP-Proteasen ergibt. Bislang ist nicht geklärt, ob IGF1 und IGF2 äquipotent bei der Aktivität im KIRA Assay sind. Der KIRA Assay ist leider nicht informativ über membranständige IGFBPs, welche, wie oben diskutiert, die biologische IGF-abhängige Aktivität co-regulieren.

IGF1 in biologischen Matrices

Für die Analyse der Wirkung des IGF-Systems auf Entwicklungs- und Wachstumsprozesse bieten Blutseren oder Blutplasma eine ansprechende Möglichkeit, die Konzentration von IGFs und IGFBPs zu bestimmen, womit man Rückschlüsse auf den Organismus ziehen kann. In erwachsenen Menschen ist die Konzentration von IGFBP3 mit 3 µg/ml am höchsten, während die der anderen IGFBPs im Bereich von 20 bis 500 ng/ml liegt [58]. Unter dem Einfluss von GH und Steroidhormonen unterliegen die Serumkonzentrationen von IGFBPs deutlichen Schwankungen. So gibt es im Laufe der Entwicklung während der Pubertät eine Reduktion von IGFBP1 und einen Anstieg von IGFBP3 und 5, während sich im alternden Organismus IGFBP1, 2 und 4 erhöhen und IGFBP3 und 5 reduzieren [58, 59]. Es wurden ebenfalls geschlechtsabhängige Effekte beobachtet. So sind bei Mädchen die IGFBP3 Level während der Pubertät höher und das Maximum wird ein Jahr früher erreicht als bei Jungen [59].

Für Säugetiere ist Muttermilch essentiell für die Entwicklung und das Wachstum der Nachkommen. In dieser biologischen Matrix sind entsprechend, neben Caseinen und Molkeproteinen, auch Proteine des IGF-Systems nachweisbar [60, 61]. Besonders im Kolostrum, der ersten Milch nach der Geburt, wurde eine weit höhere Konzentration von IGF1 im Vergleich zu späterer Milch detektiert [62]. Ebenfalls konnten IGFBP2 bis 5 in Milch nachgewiesen werden, wobei sich eine starke regulatorische Wirkung in Abhängigkeit vom Laktationszeitpunkt zeigte [63]. IGFBP3 bindet bis zu 90 % des verfügbaren IGF1 am Tag der Geburt, IGFBP2 etwas unter 10 % und IGFBP4 und 5 binden das restliche IGF1. Im Verlaufe der Laktation sinkt die IGF1-Bindung durch IGFBP3 auf einen Tiefstand von 30 % an Tag 6 und 7 und steigt anschließend wieder. Im Vergleich dazu steigt der Anteil der IGF1-Bindung an andere Bindungsproteine um bis zu 50 % für IGFBP2, 15 % für IGFBP4 und 5 % für IGFBP5 bis zu Tag 6 und 7 und sinkt danach wieder anteilig [63]. In der Milch von Ratten wurde gezeigt, dass IGFBP3 das dominante IGF Bindungsprotein in Milch ist, aber keine trimeren Komplexe mit ALS bildet, sondern nur als Dimer vorliegt [64]. Des Weiteren wurde in früher Milch eine Serin-Protease entdeckt, welche IGFBP2 abbaut. Dies deutet auf einen maternalen Einfluss auf die Entwicklung des Verdauungstraktes des Säuglings über die Milch hin [65].

Auch in anderen Körperflüssigkeiten wie Urin [66], Fruchtwasser [67], Lymphe [68, 69], Follikelflüssigkeit [22, 66, 70-73] oder auch Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) konnten IGFs und IGFBPs

nachgewiesen werden. In CSF ist die Konzentration von IGF2 bei unter 100 ng/ml, verglichen mit einer Serum Konzentration von 400 bis 600 ng/ml [74]. In CSF wurde aber auch eine 50 % höhere Konzentration von PAPP-A gemessen (Serum 0,94 µg/ml vs. CSF 1,5 µg/ml). Durch diesen höheren Anteil an der Protease PAPP-A liegt, obwohl das Verhältnis der IGF2-Konzentration CSF zu Serum bei 0,15 liegt, die biologische Aktivität von IGF im Vergleich CSF zu Serum bei 0,25 [74]. Diese Beobachtung unterstreicht die Bedeutung der Proteasen für die Bioaktivität von IGFs. Bei den Bindungsproteinen wurden in CSF IGFBP2, 4 und 6 sowie in geringeren Konzentrationen IGFBP3 und 5 nachgewiesen [74, 75]. Die Präsenz von IGFs und IGFBPs im CSF dient der Steuerung der Entwicklung und Differenzierung des zentralen Nervensystems. Daher kann die Analyse der Bioaktivität in der Diagnostik und Behandlung von neuronalen Krankheiten von Nutzen sein.

Funktionale Analyse des IGF-Systems *in vivo*

Zur Untersuchung von biologischen und biomedizinischen Fragestellungen bieten Tiermodelle eine gute Möglichkeit zur Beantwortung von Hypothesen. Labormäuse bieten den Vorteil einer kosteneffizienten Haltung und Züchtung, kurzer Generationsintervalle und gut etablierter Untersuchungsmethoden [76].

In transgenen Mausmodellen erfolgt eine gezielte Manipulation des Genoms, um Gene für bestimmte Eigenschaften verstärkt zu exprimieren (additiver Gentransfer) oder bestimmte Gene zu inaktivieren (Knock-out). IGFBP2-transgene Mäuse wurden über den additiven Gentransfer erstellt, bei welchem ein heterologes Genkonstrukt, bestehend u.a. aus einem viralen Promoter (Cytomegalovirus-Promotor) und einer IGFBP2 cDNA, in männliche Vorkerne von befruchteten Eizellen injiziert wurde. Die transgenen Nachkommen bilden in fast allen untersuchten Geweben außer der Leber verstärkt IGFBP2 [77]. Die so erhöht vorliegende Verfügbarkeit von löslichem IGFBP2 induzierte eine Reduktion der Muskelmasse, der Körper- und Organmasse, zusätzlich eine Reduktion der Organmassen, der Knochenvolumina und -querschnittsfläche sowie eine proportional der Knochenlänge [78]. Entgegengesetzte phänotypische Eigenschaften wurden bei IGF1-transgenen Mäusen beobachtet [79, 80]. Dieses unterstützt die Hypothese, dass IGFBP2 IGF1 hemmt. Im IGFBP2-Knockout Modell wurde lediglich eine Reduktion der Milzmasse und Erhöhung der Lebermasse beobachtet [81-83]. Mögliche Ursache für den schwachen Phänotyp von IGFBP2 Knockout-Mäusen war die Kompensation fehlendes IGFBP2 durch die verbliebenen IGFBPs, welche zum Teil in deutlich erhöhten Konzentrationen vorlagen. Ein erheblicher Nachteil von transgenen oder Knockout-Mäusen ist der Inzucht-Hintergrund. Es zeigte sich, dass Genwirkungen abhängig vom genetischen Hintergrund verschieden ausfallen können. Daher sind Ergebnisse aus Inzucht-Modellen nicht allgemeingültig [84, 85]. Gen-basierte Tiermodelle können zwar den untersuchten Genen eindeutige Funktionen zuweisen, sie können jedoch nicht beurteilen, ob diese Funktionen tatsächlich *in vivo* relevant sind.

Daher sind Phänotyp-basierte Tiermodelle eine zweite Säule der funktionalen Genomanalyse *in vivo*. Phänotyp-basierte Selektion wird häufig im Auszucht-Modus initiiert. Im Verlauf der Langzeit-Selektion geht der ursprüngliche Auszucht-Hintergrund in seiner vollen Ausprägung verloren, dennoch kann man nicht von einem Inzucht-Hintergrund ausgehen. So werden langzeitselektierte nicht-angezüchtete Mauslinien seit den späten 70er Jahren am Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN) etabliert. Sie bieten aufgrund ihres komplexeren genetischen Hintergrundes eine gute Basis für die funktionale Analyse u.a. durch Untersuchungen des IGF-Systems im Kontext mit Körpergewicht und Wachstum. Konkret wurden zwei Mauslinien erstellt, welche paternal am 42. Lebensstag auf hohes Körpergewicht (DU6 [86]) bzw. auf hohe Proteinmasse (DU6P [87]) gezüchtet wurden und vergleichend mit der zugehörigen unselektierten Kontrolle DUC betrachtet werden [88]. Alle drei Linien entstammen der Ausgangslinie Fzt:DU, die in den 70er Jahren durch Kreuzung aus vier Auszucht- und vier Inzuchtlinien erzeugt wurde [88, 89]. Für die Linie DU6 hat sich nach 180 Generationen die Körpermasse von männlichen Tieren von 29,8 g auf durchschnittlich 93,6 g bei 42 d alten Tieren mehr als verdreifacht. Bei DU6P stieg durch die Selektion die Proteinmasse der untersuchten bei 42 d alten Männchen von anfänglich 3 g je Tier auf 6,93 g je Tier[89].

Ein sehr interessantes Tiermodell zur Untersuchung des IGF-Systems ist der Nacktmull, welcher aufgrund seiner hohen Lebensdauer [90] als Modelltier für verzögerte Seneszenz [91-96] und Krebsresistenz [92, 97, 98] verwendet wird. Da in Mausmodellen eine Lebensverlängerung durch Störung der GH/IGF-Achse beobachtet wurde [99], vermutet man, dass sich die Langlebigkeit bei Nacktmullen auf ein verändertes GH/IGF-System zurückzuführen lässt [100]. Es wurde in Fibroblasten von Nacktmullen *in vitro* zwar PAPP-A zur Spaltung von IGFBP4 und 5 nachgewiesen, aber gleichzeitig eine geringere Menge an Proteasen für IGFBP3 wie PAPP-A2 [100]. Auch sind die Genexpressionen für IGF2 und IGF1R erhöht, im Gegensatz dazu ist die Expression von IGF1 und Insulin vergleichend zu anderen Nagern reduziert [101]. Daher ist die Untersuchung der biologischen Aktivität von IGFs und den Bindungsproteinen im Nacktmull von großem Interesse.

1.2 Fragestellung

Das gegenwärtige Verständnis des IGF-Systems, in dem die Wirkungen durch IGFBPs, IGFBP-Proteasen und IGFBP-Proteaseinhibitoren gesteuert werden, hat unmittelbare Relevanz für die Untersuchung und Bewertung der IGF-abhängigen Aktivität in biologischen Matrices. Um die Aktivität des IGF-Systems zu beurteilen, reicht daher die alleinige Messung von Hormonspiegeln nicht aus. In der vorgestellten Arbeit wird die Herausforderung angenommen und dem neuen Verständnis Rechnung getragen. Die Publikationen dieser Arbeit beschäftigten sich mit der Untersuchung der IGF-abhängigen Aktivität in biologischen Matrices aus unterschiedlichen Tiermodellen wie folgt:

Publikation 1

Wie erfolgt die Kontrolle der IGF-abhängigen Aktivität in Phänotyp-basierten Tiermodellen? Als Tiermodelle ausgewählt wurden Mauslinien, welche auf hohe Körpermasse (DU6) bzw. hohe Proteinmasse (DU6P) selektiert wurden. Wie ist das IGF-System während der Wachstumsphase reguliert? Gibt es eine Regulation des IGF-Systems von IGF1 im Serum durch IGFBPs im Verlauf der Wachstumsphase?

Publikation 2

Die Kontrolle der IGF-abhängigen Aktivität wurde auch unter Integration des Genotyp-basierten Tiermodelles untersucht. Hierbei wurde ein Kreuzungsmodell (IGFBP2 transgen x Selektionsmodell) erstellt und verwendet. Wie stark blockiert die erzwungene Überexpression von IGFBP2 den Muskelansatz in DU6P Mäusen? Und welche weiteren Auswirkungen hat die Überexpression von IGFBP2 auf das Wachstum von Organen und die Körpermasse? Mittels IGFBP-Protease-Assay soll zudem untersucht werden, inwieweit sich die biologische Aktivität des IGF-Systems verändert.

Publikation 3

In den ersten beiden Studien konnte bestätigt werden, dass die biologische Aktivität von IGF1 komplex gesteuert wird. Um die Hypothese der „Steuerung der IGF-abhängigen Aktivität im Verlauf der Entwicklung“ aus einer der Arbeiten zu überprüfen und um ein neuartiges Instrument für die Analyse der IGF-abhängigen Aktivität in biologischen Matrices zu entwickeln, wurde ein neuer Bioassay etabliert, der die Aktivität des IGF-Systems auf Ebene der AKT-Phosphorylierung untersucht. Es sollte dabei ermittelt werden, wie sensitiv der neue Bioassay ist. Welche Zellmodelle eignen sich für die Verwendung des Bioassays? Und wie weit kann die Sensitivität der Zellmodelle beeinflusst werden? Wie gut eignet sich dieser neue Bioassay für biologische Proben? Hierfür wurden drei unterschiedliche biologische Matrices von vier Vertebraten untersucht.

1.3 Methoden

Zellkulturen

Für die durchgeführten Versuche wurden die in **Tabelle 1** genannten Zelllinien verwendet. Die Wachstumsphase der Zellen fand im zugehörigen Medium (**Tabelle 1**) mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS, 10500-064, Gibco, Fisher Scientific) und 1 % einer 100x Penicillin-Streptomycin-Amphotericin-B-Mixtur (#882087, Lonza, Biozym) in einer 100 mm Zellkulturschale (#83.3902, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Germany) statt. Das Medium wurde alle 2-3 Tage erneuert, und die Zellen erreichten nach etwa einer Woche Konfluenz und wurden regelmäßig passagiert.

Tabelle 1 Übersicht der Zellkulturen nach Linien, entsprechendem Wachstumsmedium sowie Splittverhältnis nach Passage und Anbieter

Zelllinie	Medium	Verdünnung	Anbieter
HEK293	EMEM (#BE12-611F, Lonza)	1:20	ATCC; Rockville, MD, USA
HEK293-10	EMEM (#BE12-611F, Lonza)	1:20	Transfizierte Zellen von HEK293 [102]
HEK293-2	EMEM (#BE12-611F, Lonza)	1:20	
HuH-7	DMEM (#BE12-604F, Lonza)	1:50	ECACC; Salisbury, UK
C2C12	DMEM (#BE12-604F, Lonza)	1:50	ATCC; Rockville, MD, USA
3T3-L1	DMEM/F12 (#BE12-719F, Lonza)	1:50	ATCC; Rockville, MD, USA

Bei Konfluenz wurden die Zellen mit einer Phosphatpufferlösung (PBS, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄) gespült, und zum Ablösen anschließend für 10 min mit 3 ml PBS mit 0,25 % Trypsin und 0,53 mM EDTA (10x Trypsin/EDTA-Mix, BE02-007E, Lonza) behandelt. Zum Stoppen der Reaktion wurden 6 ml Wachstumsmedium zugegeben, das Zellgemisch in ein Falconröhrchen überführt und 10 min bei 800 RCF zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet im angegebenen Verhältnis (**Tabelle 1**) in eine neue Zellkulturschale mit entsprechendem Medium gegeben.

Mauslinien

Alle Versuche mit Mäusen wurden im Rahmen der nationalen und internationalen gesetzlichen Bestimmungen für Tierversuche durchgeführt, und den Versuchen wurde vom Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (LALLF MV; Aktenzeichen LALLF M-V/TSD/7221.3-1.2-037/06) zugestimmt.

Die Haltung der Mäuse erfolgte in Semi-Barrier Käfigen mit freiem Zugang zu Trockenfutter (Altromin, Lage, Deutschland) und Wasser. Für das benötigte Serum der longitudinalen Studien (Walz et al. 2020) wurden Tiere im Alter von 2, 4, 7, 11, 16, 29, 42, und 54 Wochen (Wo) getötet, und deren

Blut gesammelt, dann für 30 min gerinnen lassen, und abschließend bei 5000 rpm für 5 min zweimal zentrifugiert, dekantiert und als Serum bei -20 °C gelagert. Jede Gruppe umfasste acht Tiere, aufgrund der erhöhten Sterblichkeit verblieben in der Gruppe der Männchen der DU6 Linie im Alter von 54 Wochen nur vier Tiere.

Aus der von allen Mäusen täglich erhobenen Körpermasse ließ sich mittels der Gompertz-Wachstumsfunktion $(Y(X) = Y_M \cdot \left[\left(\frac{Y_0}{Y_M} \right) e^{-K \cdot X} \right])$ die tägliche Zunahme interpolieren.

Für die Experimente in Ohde et al. 2020 (Publikation 2) wurden Männchen der Linie DU6P mit hemizygoten Weibchen von IGFBP2-transgenen C57Bl/6 gekreuzt, und die Nachkommen auf 10 d (5 Männchen und 5 Weibchen) standardisiert. Ihr Körpergewicht wurde nach 21, 35 und 49 d bestimmt, bei 49 d erfolgte die Tötung der Tiere, Serum wurde wie oben beschrieben gesammelt, Organe wurden gewogen und bei -80 °C eingefroren.

Zur Analyse der Organe mittels Western Immuno Blots wurden diese in Lysispuffer (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) mit Protease Inhibitoren (cOmplete™ Mini, Roche, Mannheim, Deutschland) mit einer Precellys®24 (PepLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) homogenisiert. Nach Zugabe von Lämmli Puffer (31,25 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 1 % Natriumdodecylsulfat, 5 % Glycerin) wurden die Proben bei 94 °C denaturiert.

Nacktmull

Die Serumproben des Nacktmulls stammen vom Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung (IZW). Sie wurden von vier Tieren im Alter von 0,9; 1,0; 1,6 und 3,5 Jahren entnommen und auf flüssigem Stickstoff gelagert. Die Entnahme erfolgte gemäß nationaler und institutioneller Richtlinien und nach Genehmigung der Ethikkommission des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin (#ZH 156, G02217/12, T 0073/15).

Humanes Serum und Cerebrospinalflüssigkeit

Die humanen Medien wurden von der Sektion Neuroimmunologie der Klinik und Polyklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock zur Verfügung gestellt. Die Proben stammen von Patienten, die zwischen 2009 und 2012 an einer TCA Studie teilnahmen [103, 104]. Ihnen wurde bei jeder Behandlung Cerebrospinalflüssigkeit (hCSF) und Serum entnommen und die Proben bei -80 °C gelagert [103, 104]. Die Patientinnen und Patienten gaben ihre Zustimmung für die Nutzung der Proben zu Forschungszwecken, und zusätzlich hat der Ethikrat der Universitätsmedizin Rostock der Verwendung zugestimmt (Genehmigung A 2016-0088).

Für die Experimente wurde hCSF von 10 Patienten gepoolt und mit den entsprechenden gepoolten Seren analysiert.

Milchproben

Die Milchproben stammen von 10 multiparen Milchkühen der Rasse Holstein-Friesian aus der Experimentieranlage Rind am Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN). Von den insgesamt acht Zeitpunkten der Probennahme fanden drei während der Trächtigkeit (um d 40, d 135 und d 220 *post conceptionem*), drei kurz vor dem Kalben (d 0, d 1 und d 2 *post partum*) und zwei nach dem Kalben (d 7 und d 30 *post partum*) statt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C.

Zur Analyse wurden die Milchproben nativ und angesäuert verwendet. Für die Ansäuerung wurde 1 ml Milch mit 100 µl 1 M HCl gemischt und für 10 min bei 37 °C inkubiert, bei 16800 RCF für 5 min zentrifugiert und der Überstand für die weitere Verwendung in ein neues Gefäß überführt.

BIRA-Assay

Für die Experimente im BIRA Assay (Walz et al. 2021; Abbildung 5) erfolgte die Aussaat der benötigten Zellen in einer 24-Well-Platte mit 10^5 Zellen in 500 µl je Well. Nach Ausbildung eines Zellmonolayers wurden die Zellen für einen Tag (18 - 24 h) mit dem Initialmedium (Medium entsprechend **Tabelle 1** mit 0,5 % FCS) inkubiert. Als Kontrolle des Einflusses der IGF1-Antwort durch extrazelluläres IGFBP2 wurde zu den Zellen HEK293-2 und HuH7 neben einem Blank rekombinantes humanes IGFBP2 (RD172583100, BioVendor GmbH, Kassel, Deutschland) in sieben Konzentrationsabstufungen beginnend mit 33,75 ng/ml und jeweils verdoppelnd bis zur höchsten Konzentration von 2000 ng/ml zugegeben.

Für die Durchführung des Assays wurde das Initialmedium entfernt und die Testsubstanz entsprechend **Tabelle 2** pur oder verdünnt in PBS auf die Zellen gegeben. Nach 20 min Inkubation wurde die Testsubstanz entfernt, einmal mit PBS gespült und dann der Zellmonolayer mit dem Lysispuffer [1,5 Tabletten completeMini Protease Inhibitor (Roche), 31,25 mM Tris-hydroxymethylaminomethan (Carl Roth), 1 % Natriumdodecylsulfat (Carl Roth), 5 % Glycerin (Carl Roth) in 17 ml Wasser und 1,5 ml 10x Cell Lysis Buffer (CST)] lysiert. Das Zelllysate wurde mit einer Precellys (PeqLab, Erlangen, Deutschland) homogenisiert und anschließend 5 min bei 95 °C denaturiert.

Tabelle 2 Übersicht der Testsubstanzen, mit welchen die Zellen inkubiert wurden, um die Bioaktivität zu bestimmen

Testsubstanz	Verdünnung/Konzentration
Rekombinant humaner IGF1 Standard	10 ng/ml – 300 ng/ml
Seren von Maus, Nacktmull, Mensch	20 %
Humane Cerebrospinalflüssigkeit (hCSF)	100 %

Milch (bovine) (nativ oder angesäuert)	100 %
--	-------

Die Proteinkonzentration in den Zelllysaten wurde mittels BCA-Test (BCA-Kit BCA1-1KT, Merck, Herstellerprotokoll für Mikrotiter-Ansatz) ermittelt. Die Verdünnung der Proben für die Analyse erfolgte mit Lämmli-Puffer [31,25 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Carl Roth), 1 % Natriumdodecylsulfat (Carl Roth), 5 % Glycerin (Carl Roth)] mit 0,4 % β -Mercaptoethanol auf eine Proteinkonzentration zwischen 800 – 1000 $\mu\text{g/ml}$. Über Proteinanalyse wird das Signal für die Phosphorylierung von AKT an Serin 473 (Phos-AKT) ausgelesen und mit Standards verglichen.

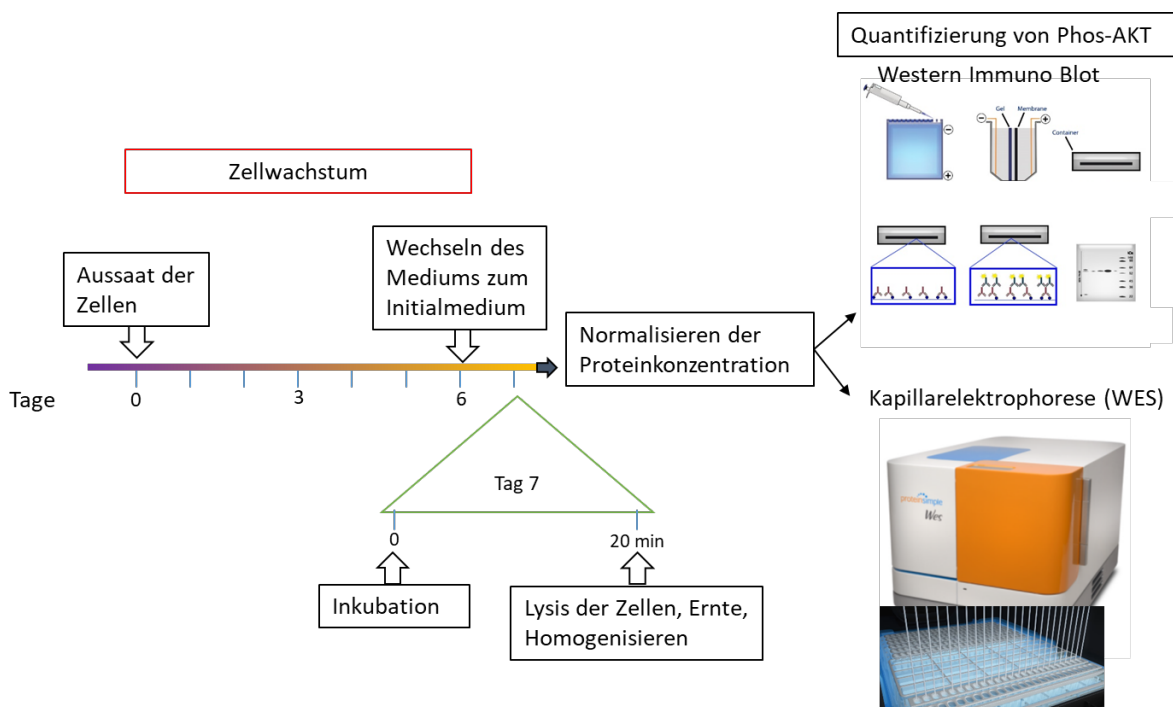


Abbildung 5 Schematische Darstellung des Ablaufs des BIRA-Assays, Western Immuno Blot Darstellung von Biologend [105], Darstellung der WES von Simple Protein [106]

Bestimmung der IGF1 Konzentration mittels ELISA

Die IGF1 Konzentration in den Seren von Mäusen wurde mittels kommerzieller ELISA-Kits von Mediagnost (Reutlingen, Deutschland) für murines IGF1 entsprechend den Herstellerangaben bestimmt.

Proteinanalyse

Für die Proteinanalyse wurden die Proben (20 – 40 μg Gesamtprotein) zunächst im Proteingel anhand ihrer Größe getrennt. Dieses erfolgte für WIB und WLB mittels Gelelektrophorese (Feldstärke $\approx 20 \text{ V/cm}$) aus Bio-Rad TGX Stain-Free FastCast Acrylamid-Kit (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Nach der Elektrophorese wurden die Proteine per Semi-dry Blot (60 min, Stromstärke 80 mA je Gel) auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran übertragen. Anschließend erfolgte mittels Blot-Analyse die weitere Quantifizierung der Bindungsproteine IGFBP 2-4 mittels Western Liganden

Blot (WLB), sowie der Proteine AKT, p44/p42 MAPK, IGFBP2, Phos-AKT und Phos-p44/p42 MAPK mittels Western Immuno Blot (WIB).

Western Liganden Blot

Für den WLB in der Publikation Walz et al. 2020 wurden die Membranen mit Jod-125 radiomarkiertem humanem rekombinatem IGF2 über Nacht inkubiert, und nach fünfmaligem Waschen in PBS für 15 min wurden die Membranen für 8 h im Phosphor-Imager Storm (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) ionisierender Strahlung ausgesetzt und die Signale wurden mittels Phosphor-Imager quantifiziert.

Bei den Proben in Ohde et al. 2020 wurden für den WLB die Proteine nach der Übertragung auf die PVDF Membranen zuerst 2 h mit dem Liganden (biotin markiertes humanes IGF2, IBT-Systems, Binzwangen, Deutschland) inkubiert und nach dem Waschen für 1 h mit Streptavidin-konjugiertem Sekundärantikörper (IBT-Systems, Binzwangen, Deutschland) inkubiert. Die Visualisierung erfolgte dann mit einem Chemilumineszenz-Verstärker (Luminata Forte, Millipore, Bedford, USA) in einer BIORAD Station (BIORAD Chemi-Doc MP System, Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, USA)

Zur absoluten Quantifizierung mittels Rekalkulation wurden in jedem Gel bekannte Konzentrationen von rekombinatem IGFBP 2 bis 4 zwischen 0,03 und 4 ng/µl mit analysiert.

Western Immuno Blot

Für WIB wurden die Membranen zuerst mit 3 % Trockenmilch in TBST (Tris-buffered saline with Tween20) für 1 h inkubiert um freie Bindungsstellen der Membran zu blockieren. Nach dreimaligem Waschen der Membran wurde sie über Nacht bei 4 °C mit entsprechendem Primärantikörper (Tabelle 3) inkubiert, und nach fünfmaligem Waschen mit TBST für 2 h mit dem Sekundärantikörper (AntiRabbit IgG HRP, CST #7074, Verdünnung 1:2000) inkubiert. Die Banden konnten mit Lumigen ECL Ultra (Lumigen Inc., USA) unter einer BIORAD Station (BIORAD Chemi-Doc MP System, Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, USA) mit UV-Licht und entsprechender Gerätesoftware Image Lab Ver. 6.0.1 sichtbar gemacht werden. Bei der relativen Kalkulation wurde die Proteinquantität der Proben auf die Gesamtproteinmenge normalisiert.

Tabelle 3 Übersicht der verwendeten Primärantikörper für Western Liganden und Immuno Blot

Antikörper	Hersteller
AKT	Santa Cruz Biotech (#sc-8312)
Phospho-AKT (Ser473)	Cell Signaling (#9271 oder #4060)
p44/p42 MAPK (ERK1/2)	Cell Signaling (#4695)
Phospho-p44/p42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling (#4377 oder #4370)
IGFBP-2	Santa Cruz Biotech (#sc-6002)

Kapillarelektrophorese (WES)

Phospho-AKT wurde mittels Immuno-Kapillarelektrophorese durch die WES (Protein Simple, San Jose, USA) quantifiziert. Hierfür wurde für die Separation ein 25er Modul für die Proteinmassen 12 – 230 kDa (#SM-W004-1) verwendet, kombiniert mit dem zugehörigen Kit für die Standards (#PS-ST05-8) und einem Anti-Rabbit Detektions Modul (#DM-001). Als Primärantikörper wurde wie für den WIB ein Antikörper für Phos-AKT (CST #9271, Verdünnung 1:50) verwendet. Für die Durchführung wurden Proben, Blockierlösung, Antikörperlösungen, Luminol-Peroxid und Waschpuffer des Moduls der Herstelleranleitung entsprechend in die vorgefertigten Platten gegeben und analysiert.

Die Steuerung und Analyse der Ergebnisse erfolgte mit der Software Compass for SW (Version 4.1.0; Protein Simple, San Jose, USA). Genauere Einstellungen für den Lauf und die Analyse sind im Anhang zusammengefasst.

Protease Assay

Die Serumproben wurden auf ihre Fähigkeit getestet rekombinantes Maus-IGFBP2 (rmIGFBP-2) zu spalten. Dazu wurde eine 10 % Serumlösung in sterilem PBS bei 39 °C in einem Thermoshaker (40 rpm) mit 1 ng/µl rekombinatem murinen IGFBP2 inkubiert. Die Probennahme erfolgte zu fünf Zeitpunkten (T = 0, 30, 90, 180 und 360 min) und die Proben wurden entnommen und mit dem gleichen Volumen an 2-fach konzentriertem Laemmli-Puffer gemischt. Die Konzentrationen von IGFBPs wurden mittels WLB wie oben beschrieben, bestimmt. Die Signalintensitäten (AU) wurden mit der Software ImageLab® (BioRad, Deutschland) gemessen und relativ zum Signal bei T = 0 dargestellt.

Genexpression von PAPP-As und STCs in Gewebe

Die Gesamt-RNA aus Lebergewebe wurde nach Homogenisierung mit dem Precellys-Keramik-Kit (1,4 mm; Peqlab, Erlangen, Deutschland) und TRIzol (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Nach DNase-Behandlung wurde die RNA mit dem NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer (NanoDrop, Peqlab, Erlangen, Deutschland) quantifiziert. Die reverse Transkription wurde in 100 ng/µl der Gesamtleber-RNA unter Verwendung von Random-Hexamer- und Oligo(dT)-Primern und Superscript II Reverse Transkriptase (Promega, Madison, Deutschland) durchgeführt. Die Menge der mRNA Transkripte wurde mittels realtime-PCR unter Verwendung des LightCycler® 480-Geräts (Roche Diagnostics, Mannheim) bestimmt. Für die genspezifische Amplifikation wurden 50 ng cDNA in Reaktionsansätzen verwendet, die jeweils 20 µM Forward- und Reverseprimer und den GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, USA), gemäß den Anweisungen des Herstellers, enthielten. Die verwendeten Primerpaare, inklusiver der internen Standards für Ribosomales Protein L19 und Phosphoglykeratkinase 1 sind in **Tabelle 4** Primer zur Analyse mRNA Expression von PAPP-As und STCs zusammengefasst.

Tabelle 4 Primer zur Analyse mRNA Expression von PAPP-As und STCs

Genname	Forward-Primer	Reverse-Primer
Pappalysin-1 [107]	5'-CCGCTCTTTCGACAACCTTT-3'	5'-CATGGTAGTGGTGGTTGCTGG-3'
Pappalysin-2 [108]	5'-ATTAATAACCGGGCCTACTGCAAC-3'	5'-GTCACAATCAGC AGCAAATGGAA-3'
Stanniocalcin-1 [107]	5'-CCCAATCACTTCTCCAACAGA-3'	5'-GAAGAGGCTGGCCATGTTG-3'
Stanniocalcin-2 [109]	5'-GAAATCCAGGGTTACAT GG-3'	5'-TCCTTGATGAATGACTTTCC-3'
Ribosomales Protein L19	5'-CAATGCCAA CTCCCGTCAGC-3'	5'-TCTTGGATTCCCGGTATCTC-3'
Phosphoglyceratkinase 1	5'-CAGTCTAGAG CTCCTGGAAGGT-3'	5'-GCCACTAGCTGAATCTTGCG-3'

Statistik

Alle statistischen Auswertungen wurden entweder mit dem Programm GraphPad Prism (Version 8.4.2 bzw. 9.0) oder SAS (Version 9.4) durchgeführt. Für den Signifikanztest wurde ANOVA für gemischte Modelle verwendet, paarweise Vergleiche wurden mit der Tuckey-Kramer Methode durchgeführt. Ein p -Wert kleiner oder gleich 0,05 wurde als signifikant angesehen.

Die Berechnung der gemessenen Proteinkonzentrationen erfolgte über eine lineare Ausgleichsgerade von bekannten Proteinstandardkonzentrationen.

Die Graphen und Regressionskurven wurden in GraphPad Prism erstellt. Zur Approximation der Sättigungskurve für die Konzentrationsabhängigkeit wurde die Funktion „spezifische Bindung mit Hill-Steigung“ verwendet. Sie hat die Form $y(c) = B_{max} \cdot \frac{c^h}{ec_{50}^h + c^h}$ (c IGF1 Konzentration, B_{max} maximale Ligandenbindung in den Einheiten von y , h Hill-Steigung, ec_{50} Wert für die Hälfte der maximalen Ligandenbindung).

Für die zeitabhängige Reaktion der AKT-Phosphorylierung auf eine konstante IGF1-Zugabe wurde die Funktion „Assoziation-dann-Dissoziation“ (**Formel 1**) verwendet. Für die Regression ist der höchste Mittelwert des phospho-AKT-Signals und der zugehörige Zeitpunkt des stärksten Signals als t_0 festgelegt (t Zeit nach Zugabe von IGF1 zu den Zellen, B_{max} maximale Ligandenbindung in Einheiten von y , K_{on} Assoziationskonstante in min^{-1} , K_{off} Dissoziationskonstante in min^{-1} , t_0 Zeit, Einleitung der Dissoziation, HoTNM Bindung des Liganden in nM).

$$y(t) = \begin{cases} Eq \cdot (1 - \exp(-K_{ob} \cdot t) + 1, & t < t_0 \\ Eq \cdot (1 - \exp(-K_{ob} \cdot t_0) \cdot \exp(K_{off}(t - t_0) + 1, & t \geq t_0 \end{cases} \quad (1)$$

$$\text{mit } Eq = B_{max} \cdot \frac{\text{ligand}}{\text{ligand} + \frac{K_{on}}{K_{off}}} \text{ und } K_{ob} = \text{ligand} \cdot \frac{K_{on}}{K_{off}}$$

$$\text{mit } \text{ligand} = \text{HoTNM} \cdot 10^{-9}$$

1.4 Ergebnisse

Eine detaillierte Beschreibung der Ergebnisse befindet sich in den englischsprachigen Originalarbeiten im Anhang der vorliegenden Arbeit. An dieser Stelle folgt eine kurze Zusammenfassung der Ergebnisse.

[Publikation 1: Overlap of Peak Growth Activity and Peak IGF1 to IGFBP Ratio: Delayed Increase of IGFBPs versus IGF1 in Serum as a Mechanism to Speed up and down Postnatal Weight Gain in Mice](#)

Michael Walz, Luong Chau, Christina Walz, Mandy Sawitzky, Daniela Ohde, Julia Brenmoehl, Armin Tuchscherer, Martina Langhammer, Friedrich Metzger, Christine Höflich, Andreas Hoeflich

Cells, 2020 Jun 22;9(6):1516. doi: 10.3390/cells9061516.

Um die Wachstumsaktivität in Abhängigkeit der IGF1 Level zu ihren Bindungsproteinen zu betrachten, wurden in einer longitudinalen Studie die täglichen Zunahmen der Körpermassen von langzeitselektierten Mäusen, welche auf hohe Körpermasse (DU6) oder auf hohe Proteinmasse (DU6P) gezüchtet wurden, vergleichend zur unselektierten Kontrolle (DUC) erfasst. Der Höchstwert für die tägliche Gewichtszunahme ergab sich bei DUC zwischen Tag 20 und 21 (Männchen) bzw. Tag 17 und 18 (Weibchen) und in DU6P etwa fünf Tage sowie in DU6 etwa sieben Tage später. Der mittlere Wert der täglichen Gewichtszunahme betrug jeweils bei den männlichen und weiblichen Tieren der DUC 0,93 g/d und 0,80 g/d, sowie entsprechend bei der DU6P 1,70 g/d und 1,28 g/d und für Tiere der DU6 1,71 g/d und 2,02 g/d.

Während DU6- und DU6P-Mäuse geschlechtsspezifische, signifikante Anstiege der IGF1-Konzentration im Serum zwischen zwei und sieben Lebenswochen (Wo) aufweisen, waren die signifikanten IGF1-Anstiege der DUC geschlechterunspezifisch. Im Linienvergleich zeigte sich in der DU6 und DU6P ein höheres Level an IGF1 im Serum im Alter von vier Wo im Vergleich zur DUC. Einheitlich über alle genetischen Gruppen sank in den Männchen die IGF1-Konzentration zwischen den Wochen 7 und 29. Bei den Weibchen der Linien DU6 und DU6P gab es einen signifikanten Anstieg der IGF1 Konzentration zwischen der 2. und 7. Woche, und nur bei der Linie DU6P sank dieser auch wieder signifikant im Vergleich von 7 und 54 Wo alten Tieren. In weiblichen DU6P waren das zirkulierende IGF1 zwischen 7 und 54 Wo vergleichend zur DUC erhöht. Ein interessanter Gegensatz zu den anderen Linien manifestierte sich in männlichen 54 Wo alten DU6P Mäusen, in welchen signifikant mehr IGF1 im Serum gemessen wurde.

Während des gesamten Lebens wurden die höchsten IGFBP2-Konzentrationen im Serum von weiblichen Mäusen aller Linien mit 11 Wo beobachtet, mit signifikanten Reduktionen nach 16 und 54

Wo. Männliche Tiere hatten bereits nach zwei Wo signifikant höhere IGFBP2-Level im Vergleich zu späteren Zeitpunkten.

Das zirkulierende IGFBP3 alternierte in den untersuchten Tieren stark über das Alter. In weiblichen Mäusen aller drei Linien wurde ein deutlicher Anstieg von IGFBP3 im Serum zwischen zwei und 16 Wo beobachtet. Die weiblichen Kontrollen und DU6 zeigten eine Reduktion zwischen 16. und 42. Wo, während IGFBP3 in weiblichen DU6P vergleichend zur Kontrolle und DU6 mit 42 Wo weiter erhöhte Konzentrationen von IGFBP3 zeigten. Das zirkulierende IGFBP3 alternierte in männlichen DUC Mäusen über die Zeit. In männlichen Tieren erreichte die IGFBP3 Konzentration einen vorläufigen Peak bei 11 Wo und sank bei älteren Tieren. Dabei hatten DU6 und DU6P eine 50 % höhere IGFBP3 Konzentration im Serum als DUC Tiere. Bei 42 Wo alten DUC Tieren gab es einen zweiten Peak in der IGFBP3 Konzentration, welcher höher war als in DU6 und DU6P Tieren.

Das Serum-IGFBP4 stieg in weiblichen Tieren der drei Linien bei 16 Wo alten Tieren, und sank danach auf einen Tiefstwert bei 29 Wo alten DU6P bzw. 42 Wo alten DU6 und DUC Tieren. Nach dem Minimum stieg die IGFBP4 Konzentration wieder auf ein weiteres Maximum bei 54 Wochen alten Tieren an. Gegensätzlich dazu zeigten männliche DUC von 54 Wo verglichen zu 11 Wo niedrigere Werte von IGFBP4. Bei männlichen DU6P-Mäusen zwischen sieben und 16 Wo blieb IGFBP4 erhöht, mit signifikanten Unterschieden im Vergleich zu unselektierten Kontrollen im Alter von 16 Wo.

Die Regulation des IGF1 durch IGFBPs konnte aus dem IGF1/IGFBP-Verhältniss ermittelt werden. Dieses Verhältnis wurde vergleichend zur täglichen Gewichtszunahme betrachtet. Dies zeigte in allen genetischen Gruppen eine einheitliche Kinetik der Wachstumsaktivität zwischen zwei und elf Wo alten Tieren. Das molekulare Verhältnis von IGF1 zu IGFBP2-4 war in allen Geschlechtern und Linien kleiner als 1, was eine kleinere IGF1 Konzentration als IGFBPs Konzentration anzeigte. Zwischen den Wo zwei und vier gab es einen signifikanten Anstieg in allen Gruppen und Geschlechtern mit Ausnahme der weiblichen Kontrollen. Im Alter von vier Wochen stieg das Verhältnis von IGF1 zu seinen IGFBPs in männlichen und weiblichen adipösen Mäusen (DU6) vergleichend zu Kontrolltieren an.

Die Wachstumsdynamik demonstrierte einen Zusammenhang zwischen der täglichen Gewichtszunahme und den Serumkonzentrationen von IGF1/IGFBP-Verhältnissen. Zudem wurden starke geschlechtsspezifische und Phänotyp-abhängige Effekte auf das Wachstum und die Entwicklung, reguliert von IGF1 und IGFBPs, präsentiert.

Publikation 2: Sex-Specific Control of Muscle Mass: Elevated IGFBP Proteolysis and Reductions of IGF1 Levels Are Associated with Substantial Loss of Carcass Weight in Male DU6PxIGFBP-2 transgenic Mice

Daniela Ohde, Michael Walz, Christina Walz, Antonia Noce, Julia Brenmoehl, Martina Langhammer, Andreas Hoeflich

Cells 2020, 9, 2174; doi:10.3390/cells9102174

Um den Einfluss von IGFBP2 auf das Wachstum, hohe Muskelmasse und den maternalen Einfluss von höheren IGFBP2-Spiegeln zu untersuchen, wurden Männchen der Dummerstorfer Langzeitselektionslinie DU6P mit weiblichen hemizygoten IGFBP2 transgenen Mäusen gekreuzt. Die Nachkommen der DU6PxIGFBP2 transgenen Mäuse wurden im Alter von sieben Wochen auf verschiedene Wachstumsparameter untersucht. Es zeigte sich eine signifikant stärkere Reduktion der Körper- und Schlachtkörpermasse bei männlichen im Vergleich zu weiblichen Mäusen. Zudem waren DU6PxIGFBP2-Mäuse durch signifikant reduzierte Muskelmassen im Gegensatz zu nicht-transgenen Kontrollen beider Geschlechter gekennzeichnet. Die hemmenden Effekte der IGFBP2-Überexpression auf die Körper-, Schlachtkörper- und Muskelmasse waren in männlichen deutlicher ausgeprägt als in weiblichen Mäusen. Inhibitorische Effekte auf die Gehirnmasse der IGFBP2-Überexpression konnten für beide Geschlechter beobachtet werden. Interessanterweise führte die Expression des IGFBP2-Transgens bei den Weibchen zu einer signifikant erhöhten epididymalen und perirenenalen Fettmasse. Insbesondere die epididymale Fettmasse war bei weiblichen Kreuzungen um mehr als 40 % vergleichend zur nicht-transgenen Kontrolle erhöht.

Die muskulären IGF1- und IGF2-Konzentrationen waren unabhängig vom Genotyp und Geschlecht ähnlich. Auf Ebene der Signaltransduktion zeigten sich geschlechtsspezifische, muskuläre Effekte. Während in den Weibchen reduzierte Gesamt-AKT, aber erhöhte phosphorylierte, also aktivierte, AKT Level beobachtet wurden, konnte in Männchen ein reduziertes Verhältnis zwischen phospho-AKT zu Gesamt-AKT detektiert werden.

Da keine unterschiedliche Regulation des IGF-Systems innerhalb des Muskels identifiziert werden konnte, wurden mögliche zirkulierende Effekte der IGFBP2-Überexpression untersucht. Im Gegensatz zu männlichen nicht-transgenen Kontrollen war zirkulierendes IGF1 in männlichen transgenen IGFBP2-Mäusen um 85 % reduziert. Dies korreliert mit einem signifikant reduziertem hepatischem IGF1-Level der transgenen Männchen im Vergleich zu männlichen nicht-transgenen oder weiblichen IGFBP2-transgenen Wurfgeschwistern.

Die Kreuzung von IGFBP2 transgenen Mäusen und auf hohe Proteinlevel selektierte Nicht-Inzuchtlinien zeigte, dass eine erhöhte Gewebeexpression von IGFBP-2 ein wesentlicher Faktor für den Muskelaufbau ist und mehr als 20 % des Karkassengewichtes blockieren kann.

Publikation 3: Development of a sensitive bioassay for the analysis of IGF-related activation of AKT/mTOR signalling by biological matrices

Michael Walz, Christine Höflich, Christina Walz, Daniela Ohde, Julia Brenmoehl, Mandy Sawitzky, Andreas Vernunft, Uwe K. Zettl, Susanne Holtze, Thomas B. Hildebrandt, Eckhard Wolf, Andreas Hoeflich

Cells 2021, 10, 482. <https://doi.org/10.3390/cells10030482>

Die beobachtete IGF1 abhängige Aktivierung von AKT diene als Grundlage zur Entwicklung eines funktionellen zellbasierten Bioassays, mit dessen Hilfe die Bioaktivität von IGF1 quantifiziert werden kann. Bevor verschiedene biologische Matrices auf HEK293-10 Zellmonolayern getestet wurden, wurde der BIRA-Assay definiert und hinsichtlich Dosisabhängigkeit, Spezifität und zeitlicher Reaktion der IGF-abhängigen Phosphorylierung von AKT charakterisiert.

Ausgehend von den Experimenten von Shen et al. 2015 [53] stellte sich die Frage, ob die Präinkubation von IGFBP2 in HEK293-2-Zellen, humane Kolonkarzinomzellen mit einer normalen IGFBP2 Expression, oder anderen Zelltypen ebenfalls zu einer IGF1-Dosis abhängigen AKT-Phosphorylierung führt und ob die Phosphorylierung von der Konzentration von IGFBP2 abhängig ist. Die Vorinkubation mit IGFBP2 bewirkte eine massive Induktion der AKT-Phosphorylierung in HEK293-2-Zellen. Bemerkenswert ist, dass IGFBP2 einen dosisabhängigen Effekt auf die IGF1-abhängige AKT-Phosphorylierung in HEK293-2-Zellen zeigte. Eine signifikante Erhöhung der IGF1-abhängigen AKT-Phosphorylierung wurde bei Konzentrationen bis zu 500 ng/ml beobachtet. HuH-7-Zellen waren bei IGFBP2 Konzentrationen von 250 ng/ml oder darüber empfindlich gegenüber IGF1. Im Vergleich zu HEK293-2-Zellen verzögerte sich die Reaktion in den HuH-7-Zellen mit höher werdender Dosis der IGFBP2-Vorinkubation, wodurch die Sättigung der IGF1-abhängigen AKT-Phosphorylierung mit der Endkonzentration von 2 µg/ml in HuH-7-Zellen noch nicht erreicht war. Ein verstärkender Effekt von IGFBP2 konnte in beiden Zelllinien nur bei höheren IGF1-Dosen (100 ng/ml) beobachtet werden.

Im zweiten Teil der Bioassayentwicklung wurden verschiedene Matrices (Serum, Liquor, Milch und Kolostrum) mit HEK293-10-Zellen, welche eine IGFBP2-Überexpression aufweisen, für 20 min inkubiert und phosphoryliertes AKT bestimmt.

Mäuseseren von 28 d alten männlichen, wachstumsselektierten Mäusen (DU6) stimulierten die AKT-Phosphorylierung in einem höheren Maß als das Serum von Kontrolltieren. Das Ausmaß der Induktion der AKT-Phosphorylierung des DU6-Serums entsprach einer Aktivität von 100 bis 300 ng/ml reinem rhIGF1. Im Gegensatz dazu stimulierte das Serum von gleichaltrigen, unselektierten Kontrollen die Phosphorylierung von AKT nur entsprechend einer Konzentration von 10 ng/ml rhIGF1. Serum zwischen dem 28. und 112. Lebensstag zeigte eine kontinuierliche Abnahme der AKT-Phosphorylierung bei männlichen DU6-Mäusen.

Der BIRA-Assay konnte auch für erste Studien der AKT-Bioaktivität in Seren von Nacktmullen verwendet werden. Außerdem konnten vergleichende Analysen von humanen Seren mit Liquor zeigen, dass der BIRA-Assay analytische Aussagen treffen kann.

Um die Potenz der Milch zur AKT Aktivierung zu untersuchen, wurde eine Längsschnittstudie mit Kolostrum oder Milch von Kühen zu acht verschiedenen Laktationszeitpunkten durchgeführt. Im Gegensatz zu nativer Milch, induzierten native Kolostrumproben eine AKT-Phosphorylierung in HEK293-10-Zellen, welche der von IGF1 in einer Konzentration ≤ 10 ng/ml entspricht. Die Ansäuerung der Milch führte zu einer signifikanten Erhöhung der AKT-Aktivierung in allen Laktationsstufen. Die Aktivität der angesäuerten Milch bzw. des späten Kolostrums (Laktationsalter: 2 Tage postpartum) war gleichzusetzen mit IGF1-Konzentrationen von über 300 ng/ml. Bemerkenswert ist, dass die Ansäuerung einen stärkeren Effekt in der Milch als natives Kolostrum zeigte. Äquimolare Zugabe von Natriumhydroxid zu der sauren Milch negierte die erhöhte Bioaktivität. Dies zeigt, dass die Aktivierung der Bioaktivität in Milch durch Ansäuerung reversibel ist und durch den pH-Wert gesteuert werden kann.

Mit dem BIRA Assay wurde ein neuer Bioassay entwickelt, welcher in unterschiedlichen Zellkulturlinien die biologische Aktivität von IGF1 in diversen biologischen Matrices bestimmen kann. Für die Quantifizierung wurde die Phosphorylierung von AKT in IGFBP2-überexprimierenden Zellen untersucht, bei denen die Phosphorylierung von AKT abhängig von der IGF1-Konzentration ist.

1.5 Diskussion

Für die Untersuchung der Wirkung des IGF-Systems stellen wachstumsselektierte Mauslinien stellen geeignete Modelle dar, um die longitudinale Wirkung des IGF-Systems zu untersuchen. Aufgrund der komplexen Regulation des IGF-Systems durch verschiedene Rezeptoren (IGF1R, IGF2R), Bindungsproteine (IGFBP1-6), die zugehörigen Proteasen für die Bindungsproteine (PAPPA-1, PAPPA-2) und die Inhibitoren für die Proteasen (Staniocalcin 1 und 2), bieten Bioassays eine Möglichkeit zur Beschreibung der Wirkung des IGF-Systems.

Zusammenspiel von IGF1, IGFBPs und Wachstum in Mausselektionslinien

Die unterschiedlichen Wirkungen von Mitgliedern des IGF-Systems hinsichtlich des Wachstums, können ideal an wachstumsselektierten Mauslinien sowie den dazugehörigen unselektierten Mauslinie dargestellt werden. Die Selektion der Linien begann 1976 mit der Generierung einer Mauslinie Fzt:DU mit einem vielfältig gemischten genetischen Hintergrund aus vier verschiedenen Inzucht- und vier Auszuchtmodellen [88], die bis heute durch Vermeidung der Inzucht als unselektierte Kontrolllinie DUC aufrechterhalten wird. Ausgehend von der ursprünglichen polygenen Linie Fzt:DU wurden für die Etablierung des Mausmodells DU6 in jeder Generation Männchen mit erhöhtem Körpergewicht am 42. Lebensstag für die Verpaarung der nächsten Generation ausgewählt. Dies führte nach 180 Generationen zu einer Linie, die sich durch ein extrem erhöhtes Körpergewicht, um mehr als 300 % im Vergleich zum Startgewicht, und Adipositas auszeichnet [89, 110]. Durch die Selektion auf hohe Ganzkörperproteinmasse, welche in Männchen bei 42 d ermittelt wurde, ergab sich die Line DU6P, in der sich extremes Muskelwachstum manifestierte. Dies entspricht einem Selektionserfolg von über 230 % [89, 111].

Beide Selektionslinien kennzeichnen sich durch ein größeres Körpergewicht und –wachstum im Vergleich zur unselektierten Kontrolllinie, sodass sie als ideale Modelle zur Beschreibung des IGF-bezogenen Wachstums dienen. Dabei beschränkten wir uns auf die Analyse von IGF1 (mittels ELISA) und intakten IGFBPs (IGFBP2 bis 4, mittels Western Liganden Blot) in Serum.

Dieses hohe Wachstum der DU6- und DU6P-Mäuse konnte mit einer erhöhten IGF1-Konzentration im Serum in Zusammenhang gebracht werden und bestätigte damit auch frühere Studien [111].

Die Konzentration von IGF1 blieb bis zu einem Alter von sieben Wochen erhöht, während die tägliche Gewichtszunahme bei allen drei Linien DU6, DU6P und DUC in der 2. Lebenswoche ein Maximum erreichte und danach bis zum Ende des Wachstums bei etwa 20 Wochen abnahm. Folglich kann der IGF1-Spiegel zumindest nicht allein die massiven Reduzierungen der Wachstumsaktivität zwischen vier und sieben Lebenswochen in den untersuchten Linien erklären. Die IGF1

Serumkonzentrationen beim Menschen folgen einem Peak-ähnlicher Verlauf mit der höchsten Konzentration im Alter von 14,6 Jahren, unabhängig vom Geschlecht [112] und geringeren Konzentrationen bei älteren Probanden [113]. Der IGF1 Peak korreliert dabei mit dem Peak für das spätkindliche Wachstum, welches bei Mädchen in einem Alter von etwa 12 Jahren und bei Jungen erst mit 14 Jahren am höchsten ist [114]. Männliche Mäusen zeigen ebenfalls IGF1 Serumkonzentrationen mit einem Peak-ähnlichen Verlauf. Bei den Weibchen konnte dies nur in den Wachstumslinien DU6 und DU6P beobachtet werden. Dennoch korreliert das Wachstum der Mauslinien nicht mit den IGF1-Konzentration, was auf die Serum IGFBP-Konzentrationen zurückzuführen ist. Die IGFBP2 Konzentration sank in allen Linien nach vier Wochen verglichen mit zwei Wochen alten Tieren. Auch für IGFBP4 war dies in männlichen Mäusen aller Linien zu beobachten. Für IGFBP2 und 4 stieg die Konzentration danach auf ein Maximum bei 11 Wochen alten Weibchen bzw. 16 Wochen alten Männchen. Im humanen System ist IGFBP2 kurz nach der Geburt am höchsten und sinkt dann während der Entwicklung, bevor es zwischen 9 bis 11 Jahren nochmal ansteigt [115]. Ebenfalls konnte mit steigendem Alter ein Anstieg des Serum-IGFBP2 in über 50-jährigen Probanden gemessen werden. Die IGFBP4 Konzentration ist im Menschen übers Alter konstant [116].

IGFBP3 ist in allen Selektionslinien und Geschlechtern durch einen starken Anstieg zwischen vier Wochen und 11 bis 16 Wo alten Tieren gekennzeichnet. In den Weibchen verdreifacht sich die IGFBP3-Konzentration zwischen der 4. und 11. Lebenswoche in der DU6P, sowie zwischen 4 und 16 Wo alten Tieren der Linien DU6 bzw. in der Kontrolllinie. Im Menschen steigt das Serum-IGFBP3 nach der Geburt bis zum Höchstwert, welcher bei Mädchen mit 14,5 -15 Jahren etwas früher als bei Jungen mit 15-15,5 Jahren liegt, und sinkt nach der Pubertät um etwa 13 % in beiden Geschlechtern bis zu einem Alter von 30 Jahren. Der Abfall der Serum-IGFBP3-Konzentration geht bei Männern mit steigendem Alter weiter [112, 117].

Das molare Verhältnis von IGF1 zur molaren Summe aller IGFBPs steigt in allen Gruppen zwischen 2 und 4 Wo signifikant an. Die IGF/IGFBP-Verhältnisse korrelieren mit der Wachstumsaktivität und haben ihre Maxima zum gleichen Lebenszeitpunkt der Mäuse. In DU6 Mäusen konnte zusätzlich im Alter von vier Wochen ein signifikant höheres Niveau des IGF1/IGFBP-Verhältnisses vergleichend zur unselektierten Kontrolle bestimmt werden. Dies könnte partiell eine Erklärung der höheren Wachstumsaktivität unter den Bedingungen der Wachstumsselektion sein. Die Überlagerung der IGF1/IGFBP-Verhältnisse mit den täglichen Gewichtszunahmen ist bei den unselektierten Kontrollen beider Geschlechter nur teilweise vorhanden. Die verlängerten Wachstumsperioden der DU6 und DU6P Mäusen könnten mit erhöhtem IGF1 und/oder erhöhter IGF1-Bioaktivität zusammenhängen. Diese Hypothese konnten wir unter der Verwendung des BIRA Assays bestätigen. Das Serum von DU6 und DU6P Mäusen zeigte, dass die biologische Aktivität zwischen vier und 16 Wochen in DU6 und DU6P Mäusen drastisch reduziert wird. In den unselektierten

Kontrollmäusen konnte keine Abnahme der IGF-bezogenen Bioaktivität im diesem Alter gefunden werden. Arbeiten an Knockout Mausmodellen zeigten, dass IGF2 und GH oder andere Hormone wie Insulin einen Einfluss auf embryonales und frühes postnatales Wachstum und Entwicklung haben [118]. Dieses bietet eine gute Grundlage für zukünftige, ergänzende Studien. In allen Gruppen und Geschlechtern zeigte sich, dass sich die Kinetik der Serum-IGFBP3-Konzentrationen sich, verglichen mit IGF1, verzögert. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen Mechanismus, welcher durch die akut hohen Verhältnisse von IGF1 zu den IGFBPs entsteht. Im Menschen konnte bisher kein verzögerter Anstieg von IGFBP3 beschrieben werden [112, 113], was entweder auf Speziesunterschiede oder unterschiedliche Analyseverfahren zurückzuführen ist.

Die Ursache für die Verschiebung der IGFBP3 Konzentration in Mäusen ist noch nicht weiter bekannt. Grundlegend kann eine veränderte Expression oder Stabilität dieses Bindungsproteins Einfluss auf die gesamte Konzentration von IGFBPs und somit auf die Bioaktivität von IGF1 nehmen. Eine These von Marouli et al. [27] geht davon aus, dass STC2 weniger effektiv die proteolytische Aktivität von PAPP-A blockiert. Auch kann PAPP-A2 [24] eine Regulation von IGFBP3 in Mäusen übernehmen. In Menschen wurde gezeigt, dass bei Kindern die Konzentration von PAPP-A2 mit steigendem Alter abnimmt und im Gegenzug die Konzentration von IGFBP3 zunimmt [119].

Geschlechtsabhängige Effekte von IGFBP2 auf das Muskelwachstum

Aus früheren Studien mit C57BL/6-Inzuchtmäusen ist die inhibitorische Langzeit-Wirkung von IGFBP2 auf das Muskel- und Körperwachstum bekannt [77, 79]. Um die Langzeitwirkungen von IGFBP2 in Selektionslinien mit erhöhtem Muskelwachstum zu untersuchen, wurden transgene Weibchen mit Männchen der auf Muskelwachstum selektierten nicht-Inzuchtlinie DU6P gekreuzt. Die Ergebnisse aus diesen Versuchen sind unter anderem von Bedeutung in der Haltung und Zucht von Nutztieren, z.B. für die Fleischproduktion von Bedeutung. Auch bei Menschen ist IGFBP2 negativ mit dem Aufbau von Skelettmuskulatur assoziiert und kann daher als möglicher Marker für muskuläre Erkrankungen oder eingeschränkte Muskelleistungsfähigkeit angesehen werden [42, 43].

Durch die Kreuzung der Linien konnte gezeigt werden, dass überexprimiertes IGFBP2 geschlechtsspezifisch bis zu 20 % der Muskelmasse blockiert. Insbesondere männliche Mäuse reagieren sehr sensitiv auf die hemmenden Effekte von IGFBP2. Neben der Masse der isolierten Muskeln waren auch die Hirnmassen beider Geschlechter signifikant reduziert.

In transgenen IGFBP2-Inzuchtmäusen bestand eine signifikante Erhöhung von IGFBP2 im Serum [79], welche in den DU6PxIGFBP2-Kreuzungen nicht beobachtet werden konnte. Dies lässt zu dem Schluss kommen, dass IGFBP2 einen negativen Effekt auf das Wachstum aufzeigt. Aus der Literatur ist bekannt, dass in unterschiedlichen auf geringes Körpergewicht selektierten Mauslinien

teilweise höhere, gleiche oder auch geringere IGFBP2-Konzentrationen im Serum verglichen mit unselektierten Kontrollen detektiert wurden [120].

Im Serum der männlichen DU6PxIGFBP2-Tiere waren nicht nur die Konzentration von IGFBP2, sondern auch von IGFBP3 und -4 reduziert, was sich durch eine hohe proteolytische Aktivität zeigte. Da in DU6P das maximale Wachstum nur mit den IGFBPs, aber nicht mit einer Reduktion von IGF1 korrelierte, spricht vieles für eine Regulation durch die Proteolyse. Nach derzeitigem Kenntnisstand werden IGFBP2 [20], -4 und -5 [22] von PAPP-A abgebaut, während durch PAPP-A2 IGFBP3 und -5 [23] proteolysiert. Unsere Ergebnisse zeigten eine höhere proteolytische Aktivität in Männchen verglichen mit Weibchen, obwohl in Weibchen eine höhere Expression von PAPP-A/A2 zu sehen war. Allerdings ist die Regulation von Inhibitoren für PAPP-A/A2, STC1 und 2 in Weibchen im Vergleich zu der Expression in Männchen stark erhöht. Damit zeigt sich eindeutig eine geschlechterabhängige Regulation des IGF-Systems in Muskeln. Für weiterführende Studien wäre es von Bedeutung, die Expression von PAPP-As und STCs in Abhängigkeit vom Alter und Geschlecht in Muskeln und anderen Organen zu untersuchen.

In kolorektalen Krebszellen wurde nachgewiesen, dass auch STC2 die Signaltransduktion von AKT und ERK1/2 MAPK regulieren kann [121]. Dies würde die höhere AKT-Phosphorylierung in Muskel und Gehirn in DU6PxIGFBP2-Weibchen erklären, welche eine erhöhte Expression von STCs aufwiesen. Das Zusammenspiel aus IGFBP2, der zugehörigen Protease PAPP-A und den Proteaseinhibitoren sowie der Phosphorylierung von AKT unterstützt die Beobachtung einer IGFBP2 abhängigen AKT-Phosphorylierung nach Shen et al. [53]. Ergänzend dazu konnte eine geschlechterabhängige Regulation gezeigt werden.

Die in den DU6PxIGFBP2-Männchen beobachteten hohen Level an IGFBPs-Fragmenten, sowie die vermehrte Expression von PAPP-As können als Reaktion auf die erhöhte IGFBP2 Expression angesehen werden. PAPP-As spalten aber nicht nur IGFBP2, sondern bauen auch effektiv IGFBP3 und -4 ab [21]. IGFBPs ermöglichen die Bindung von IGFs und somit den Schutz vor Abbau. Ein großer Anteil der Serum IGFs wird in der Leber exprimiert und sekretiert. Dadurch können IGFs zirkulierend ohne vorherigen Verlust an Zielorgane transportiert werden, ohne vorherigen Verlust [122]. Durch den erhöhten Abbau der IGFBPs fällt die Stabilisierung weg, was folglich zu einem funktionellen Verlust von IGFs führt. Das verminderte Muskelwachstum und Karkassengewicht das niedrigere Schlachtkörpergewicht in DU6PxIGFBP2-Mäusen kann möglicherweise auf die systemisch reduzierte Konzentration von IGF1 im Serum zurückzuführen sein. Alternativ wird im Muskel aber auch mehr IGFBP2 exprimiert, welches IGF1 binden kann und somit lokal zu einem geringeren Wachstum im Muskel sein und damit ein geringeres Karkassengewicht begründen könnte.

Untersuchung der biologischen Aktivität von IGF1

Durch die Untersuchungen der Auswirkungen des IGF-Systems auf die funktionalen Eigenschaften in speziellen Mausmodellen wird erkennbar, dass das komplexe IGF-System von mehreren, teilweise unbekanntem Faktoren abhängt. Zur Beschreibung des biologischen Systems ist es sinnvoll, das Zusammenspiel aus Hormon (IGF1, IGF2), Rezeptor (IGF1R), Bindungsproteinen (IGFBPs) sowie den Proteasen (PAPP-As) und deren Inhibitoren (STCs) in einer biologischen Matrix zu untersuchen.

Zur Beschreibung der IGF-abhängigen biologischen Wirkung können diverse Analysen erfolgen, in denen das IGF1-abhängige Wachstum wie Zellproliferation oder Zellmigration bestimmt wird [54-56]. Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der Bioaktivität von IGF1 stellt der KIRA Assay dar. In diesem wird die Tyrosin-Phosphorylierung des IGF1R in der humanen Brust-Adenokarzinom Zelllinie MCF-7 nach Zugabe von IGF1 haltigen Fluiden untersucht [57].

Der neu entwickelte BIRA Assay nutzt die weiterführende Signalkaskade nach dem IGF1R, um die Wirkungsweise von IGF1 im Zusammenspiel von MAPK und PI3K einzubeziehen. Zur Bestimmung der Bioaktivität von IGF1 wird die Phosphorylierung von AKT durch diese Signalkaskade genutzt.

Das Zellmodell HEK293-10, beschrieben durch eine erhöhte Expression von IGFBP2, zeigt eine deutliche konzentrationsabhängige Antwort von AKT auf IGF1, was in dem Zellmodell HEK293-2 ohne IGFBP2-Überexpression nicht zu beobachten ist. Diese Beobachtung passt zu Studien der Forschungsgruppe um Clemmons [53, 123, 124]. Sie beschreiben in vaskulären glatten Muskelzellen, dass membrangebundenes IGFBP2 die Inhibierung von PTEN ermöglicht, wodurch PI3K nicht dephosphoryliert und so die MAPK Signalkaskade nicht inhibiert wird [53]. Diese Effekte können nach Vorinkubation mit IGFBP2 ebenfalls in der Hepatocarcinomzelllinie HuH7 und HEK293-2 ohne IGFBP2-Überexpression bewirkt werden.

Die Spezifität des BIRA-Assays konnte mit zwei verschiedenen Inhibitoren für den IGF1R nachgewiesen werden. Während der monoklonale Antikörper (α IR3) die extrazellulären Bindungsstellen des IGF1R blockiert [125], passiert das kleine Molekül BMS-754807 die Membran und bindet an der β -Untereinheit des IGF1R und inhibiert so die Phosphorylierung des IGF1R [126, 127]. Die Experimente zeigten, dass die Antikörper die Signalstärke um fast die Hälfte reduzieren. Der Inhibitor BMS-754807 zeigte sogar eine deutliche Reduktion der AKT-Phosphorylierung um 75 %.

Für die Untersuchung der Kinetik in dem BIRA-Assay wurden HEK293-10 Zellen mit 100 ng/ml IGF1 für 2 bis 120 min inkubiert, um einen zeitlichen Verlauf der Phosphorylierung von AKT zu beobachten. Die Untersuchung der zeitlichen Abhängigkeit der Bioaktivität nach IGF1-Inkubation ergab ein stabiles Signal nach 15 min mit 100 ng/ml IGF1, welches bis zu 60 min stabil blieb. Die

Abschwächung des Signals nach 120 min kann entweder auf eine Ausschüttung von IGF-BPs oder andere Adaptionsprozesse der Zelle hindeuten. In Maus-Fibroblasten NIH3T3 zeigte sich, dass die Phosphorylierung des IGF1R nach 13 – 25 sec sowie die Phosphorylierung von AKT nach 25 - 200 sec erfolgt [128]. Ursächlich für die lange Inkubationsdauer von 15 min und mehr ist wahrscheinlich ein verstärkender Effekt von membrangebundenen IGF-BP2 [53, 123, 124]. Somit ist die Phosphorylierung von AKT nicht nur von dem kanonischen Kinase-Weg abhängig, sondern auch von weiteren Kinasen, Phosphatasen und Rezeptoren. Damit ist die Inhibition der PIP3-Dephosphorylierung wichtig für die Phosphorylierung von AKT durch PIP3.

Da auch Insulin einen Einfluss auf den IGF1R hat, wurden ebenfalls Lösungen mit unterschiedlichen Insulin-Konzentrationen mit dem Bioassay untersucht. Allerdings zeigte in unseren ersten Studien Insulin erst bei superphysiologischen Konzentrationen (mM-Bereich) eine erhöhte Phosphorylierung von AKT in den IGF-BP2-transgenen HEK293-10 Zellen. Da der IGF1R, welcher eine 1000-fach höhere Affinität zu IGF1 als zu Insulin hat, aber nur die Phosphorylierung von Vimentin in Gang setzt und damit die IGF-BP2-Bindung an RPTP β initiiert [53], vermag eine Kombination von IGF1 und Insulin bereits in physiologischen Insulin-Konzentrationen eine Phosphorylierung von AKT zu erzeugen.

Ein wichtiger Anwendungstest war die Untersuchung der biologischen Wirkung von IGF1 in Serum von Nagetieren. Wir konnten mit dem BIRA-Assay die Hypothese bestätigen, dass im Serum von wachstumsselektierten Mäusen die biologische Aktivität von IGF1 höher ist als im Serum von unselektierten Kontrollen, wie bereits oben beschrieben. IGF1 im Nacktmull hat eine 90% Übereinstimmung zur murinen und humanen Sequenz und es konnte gezeigt werden, dass im Nacktmull IGF-BPs und PAPP-A exprimiert werden [100]. Zuvor sind keine Untersuchungen von IGF1 in Nacktmullen durchgeführt worden, allerdings ist, aufgrund der Langlebigkeit und Tumoresistenz in Nacktmullen, die biologische Aktivität von IGF1 von starkem Interesse [90]. In der vorliegenden Studie wurden Serumproben von einzelnen Tieren verwendet und die IGF-bezogene Bioaktivität von verschiedenen Arbeiterinnen sowie einer älteren Königin detektiert. Während wir keinen generellen Unterschied zwischen den Serumproben von Arbeiterinnen und der Königin feststellen konnten, zeigt sich, dass der Bioassay die IGF-bezogene Bioaktivität in einzelnen Tieren charakterisieren kann. In Zukunft sollen umfangreiche Analysen dazu beitragen, dieses Tiermodell näher zu charakterisieren. Eine spezievergleichende Analyse der IGF-bezogenen Bioaktivität von Nacktmullen mit anderen Wirbeltierarten könnte auch Aufschluss über die relativen Aktivitätsniveaus des IGF-Systems in verschiedenen Matrices und in verschiedenen Altersgruppen liefern.

Wachstum, Entwicklung und Funktion des Gehirns werden durch die koordinierte Regulation lokaler und systemischer Effekte des IGF-Systems beschrieben [129]. Studien im Liquor deuteten auf

IGF2 als Marker für leichte kognitive Beeinträchtigung bei Alzheimer-Patienten [32, 33, 130] und als Biomarker für das Fortschreiten der amyotrophen Lateralsklerose hin [131]. Mit Hilfe des KIRA-Assays konnte gezeigt werden, dass das bioaktive IGF im Liquor von Patienten mit diabetischer Neuropathie ungefähr 28 % des bioaktiven IGF im Serum entspricht, der IGF-Spiegel im Liquor jedoch nur 14 % von dem im Serum [74]. Für die Etablierung unseres Assays konnten wir die biologische Aktivität in Serum- und Liquorproben von Patienten mit Multipler Sklerose charakterisieren. Es wurden aufeinander abgestimmte Serum- und Liquorproben verwendet [103, 104], von denen bekannt war, dass die IGF-Konzentrationen im Liquor bei weniger als 5 % der IGF-Konzentrationen im Serum liegen [104]. Mit Hilfe des neuartigen BIRA-Assays konnte eine IGF-bezogene Bioaktivität bei 20 % des Serumspiegels identifiziert werden. Dies bestätigte publizierte Hinweise [74] auf die Regulation der IGF-bezogenen Bioaktivität im Liquor und zeigte, dass der neue Bioassay vergleichend zum etablierten KIRA-Assay ähnliche Ergebnisse erzielt, aber auch weiterführend ermittelt, ob die erhöhte Bioaktivität von IGFs auch eine AKT-Phosphorylierung initiiert.

Milch und Kolostrum sind ebenfalls reich an IGFs und IGF-BPs [60-62]. Aufgrund der Identifikation einer Serin-Protease in früher Milch, welche für den Abbau von IGF-BP2 verantwortlich ist, wird über eine Regulation der Entwicklung des Magen-Darm-Traktes des Säuglings über die Muttermilch diskutiert [65]. Zudem zeigten Sejrson et al. [63] eine hohe Konzentration von IGF1 nach Kalbung mit anschließender Abnahme in Kühen. Sie führten daraufhin eine Untersuchung der biologischen Aktivität in der Milch aus verschiedenen Laktationsstadien durch. In dieser Studie stellten sie eine höhere mitogene Aktivität in Kolostrumproben im Vergleich zu Milch aus fortgeschrittenen Laktationsstadien fest [63]. Eine Beeinflussung der biologischen Aktivität durch IGF-BPs ist naheliegend, da auch diese über den Verlauf der Laktation variieren [63]. Um auszuschließen, dass Ansäuern auch das Zytokin Transforming growth factor beta (TGF β) aktivieren kann und somit die biologische Aktivität beeinflusst, untersuchten Sejrson et al. das mitogene Potential von angesäuerten bzw. neutralisierten bovinen Milchproben [132]. In unserer Studie wurden angesäuerte bovine Milchproben direkt auf das Zellkulturmodell HEK393-10 angewandt, da nach der Neutralisierung freie IGFs in ihre inaktive, an IGF-BP gebundene Form zurückkehren können. Ganz eindeutig korrelierte Ansäuern in der vorliegenden Studie mit einer erhöhten biologischen Aktivität in Form von AKT-Ser473-Phosphorylierung. Wir haben bisher keine direkten Beweise dafür, dass diese Aktivität auf die Aktivierung von TGF β zurückzuführen ist. Ein möglicher indirekter Gegenbeweis ist die Blockade des IGF1R mit BMS. Bei dieser sank die AKT-Phosphorylierung um bis zu 75 %. Da BMS aber nur auf den IGF1R und nicht auf die Rezeptoren für TGF β wirkt, ist dies ein Grund, warum TGF β nicht Ursache für AKT-Phosphorylierung ist [126]. Ein weiteres Gegenargument ist, dass durch Neutralisierung von angesäuerter Milch das Potenzial der Milch zur Induktion der AKT-Phosphorylierung wieder sinkt, was gegen eine Freisetzung von TGF β spricht, da im Gegensatz zu IGF1 die Aktivierung von TGF β nicht

reversibel ist [133]. Daher argumentieren wir, dass die IGF-BPs während des Ansäuerns IGFs freisetzen, was die biologische Aktivität der IGFs akut induzieren kann. Dieser Mechanismus könnte während der Entwicklung des Gastrointestinaltraktes beim heranwachsenden Säugling auch beim Menschen, eine Rolle spielen. Zumindest solange die gastrische Proteolyse nicht für den vollständigen Abbau von Peptiden und Proteinen ausreicht und intakte oder fragmentierte Peptide in akuter Form in den Darm gelangen können. Elmlinger et al. diskutierten die Rolle der IGF-BP-Proteasen für das Wachstum und die Entwicklung des Intestinaltrakts im Menschen, und vermuteten, dass die IGF-BP2-Bioaktivität von einer zweiwertigen-Metallionen-abhängigen Serinprotease mit einem optimalen pH-Wert von 7 - 8 kontrolliert wird [65]. Das Ansäuern könnte einen zweiten Mechanismus darstellen, welcher die IGF-bezogene Bioaktivität in der Milch kontrollieren kann.

Da auch IGF-ELISAs Ansäuern nutzen, um IGFs von den IGF-BPs zu lösen, bietet der BIRA-Assay die Möglichkeit, neben der Bioaktivität von IGFs auch das Gesamt IGF zu bestimmen. Dies könnte besonders für Spezies ohne spezifisch erhältliche IGF-ELISAs eine interessante Alternative bieten.

Der BIRA-Assay hat sich als eine herausragend effiziente Methode für die Untersuchung der IGF1-Bioaktivität herausgestellt, da für. Für die Durchführung ist nur ein Zellkulturlabor nötig ist, in dem entweder etablierte IGF-BP2-überexprimierende Zelllinien (HEK293-10) oder Zelllinien, welche mit rekombinanter IGF-BP2-Inkubation sensitiviert werden (z.B. HuH-7, HEK293-2), kultiviert werden können. Die Durchführung des Assays ist einfach und kosteneffizient. Die Auswertung mittels Proteinanalyse kann auch nach Etablierung sehr einfach mit unterschiedlichen Methoden (z.B. WLB, WES) reproduziert werden. Da auch Zelllinien begrenzt variiert werden können, ist der BIRA-Assay universell einsetzbar.

Zusammenfassung und Ausblick

Die longitudinale Darstellung der IGF1 und IGF-BPs Konzentrationen zeigt auf beeindruckende Weise, wie IGF-BPs die Steuerung von IGF1 übernehmen. Die Studien hatten derzeit deutliche Einschränkungen. Zum einen war aufgrund des longitudinalen und zunächst deskriptiven Ansatzes die Anzahl in jeder einzelnen Altersgruppe vergleichsweise klein und zusätzlich durch eine höhere Mortalität in DU6 Männchen mit fortgeschrittenen Alter reduziert. In zukünftigen Studien muss daher die Anzahl der Tiere in einzelnen Gruppen erhöht werden.

Da IGF-BP3 in einem ternären und IGF-BP2 und 4 in binären Komplexen vorliegt, sind unterschiedliche pharmakokinetische Eigenschaften für die verschiedenen Arten von Komplexen zu erwarten. In der vorliegenden Studie wurde ein vereinfachter Ansatz verfolgt, in welchem IGF-BP2 bis 4 für die Schätzung des Verhältnisses von IGF1 zu IGF-BPs kombiniert wurden. Zukünftige Studien müssten auch die Konzentrationen von IGF-BP1, 5 und 6 berücksichtigen, welche aufgrund der

geringeren Sensitivität im Vergleich z.B. zu ELISA nicht durch Western Ligand Blot detektiert werden können.

Darüber hinaus stehen die verschiedenen Verbindungen aus dem GH/IGF-System in einer Wechselbeziehung zueinander, da insbesondere GH und IGF1 die IGFBP-Konzentrationen determinieren, was ebenfalls Potential für weitere Forschung bietet.

Arbeiten an transgenen Knockout-Mausmodellen zeigten, dass IGF2 und GH oder andere Hormone wie Insulin einen Einfluss auf das embryonale und frühe postnatale Wachstum und die Entwicklung haben [118], was ebenfalls zukünftig weiter beleuchtet werden sollte. Für das sehr frühe postnatale Wachstum wurde IGF2 als embryonaler Wachstumsfaktor nachgewiesen [118, 134, 135].

Mit der Kreuzung von DU6P und IGFBP2-transgenen Mäusen wiesen wir eine Hemmung des Muskelaufbaus durch höhere IGFBP2-Expression nach. Die hemmenden Effekte von IGFBP2 auf das Muskel- oder Karkassengewicht spiegelten sich jedoch nicht in erhöhten Konzentrationen von intaktem IGFBP2 in der Zirkulation beider Geschlechter wider. Bei männlichen Tieren korrelierte die Gewichtsreduktion mit einer erheblichen Reduktion von IGFBP2 zusammen mit IGF1, IGFBP3 und IGFBP4 im Serum und mit einer signifikanten IGFBP-Proteolyse. Aus unserer Studie ergibt sich ein Potential für IGFBP-Fragmente als Biomarker für das Karkassengewicht, welcher sich zur Aufnahme in Biomarker-Panels von Zuchtprogrammen zur Selektion von Nutztieren eignet. Bei der Überwachung der Muskelmasse in menschlichen Probanden kann die Proteolyse von IGFBPs ebenfalls Informationen als Biomarker liefern.

Beim BIRA-Assay konnten wir zeigen, dass er nicht von IGFBP2-transfizierten HEK293-Zellen abhängig ist, da eine Vorinkubation von HEK293-Zellen oder HuH-7-Zellen für 12 h mit IGFBP2 für eine erhöhte Sensitivität gegenüber IGF-abhängiger AKT-Aktivierung ausreichend ist. Damit ist der neuartige Assay nicht auf einen bestimmten Zelltyp beschränkt. Allerdings wurde auch klar, dass nicht alle Zellen mittels IGFBP2 die Effekte von IGFs verstärken. Dementsprechend muss in zukünftigen Studien die zelluläre Antwort in anderen zellulären Systemen ermittelt werden.

Um die Spezifität der AKT-Phosphorylierung als Reaktion auf eine bestimmte Matrix zu bestimmen, kann der niedermolekulare Inhibitor BMS eingesetzt werden. In Bezug auf verschiedene Zelltypen müssen so auch die effektiven Dosen von IGFBP2 definiert werden, welche während der Vorinkubation verwendet werden, um die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber den Auswirkungen von IGFs zu erhöhen. Bisherige Analysen testeten noch nicht die Auswirkungen von IGF1 gegenüber IGF2, was ein interessantes Thema für Folgestudien ist.

2. Publikationen

2.1. Overlap of Peak Growth Activity and Peak IGF1 to IGFBP Ratio: Delayed Increase of IGFBPs versus IGF1 in Serum as a Mechanism to Speed up and down Postnatal Weight Gain in Mice




Michael Walz, Luong Chau, Christina Walz, Mandy Sawitzky, Daniela Ohde, Julia Brenmoehl, Armin Tuchscherer, Martina Langhammer, Friedrich Metzger, Christine Höflich, Andreas Hoeflich

Cells, 2020 Jun 22;9(6):1516. doi: 10.3390/cells9061516.

Michael Walz war in der Methodik, Durchführung und Auswertung der Experimente beteiligt und im Review und der Editierung der Publikation.

Article

Overlap of Peak Growth Activity and Peak IGF-1 to IGFBP Ratio: Delayed Increase of IGFBPs Versus IGF-1 in Serum as a Mechanism to Speed up and down Postnatal Weight Gain in Mice

Michael Walz ¹, Luong Chau ¹, Christina Walz ¹, Mandy Sawitzky ¹, Daniela Ohde ¹ , Julia Brenmoehl ¹ , Armin Tuchscherer ², Martina Langhammer ², Friedrich Metzger ³, Christine Höflich ⁴ and Andreas Hoeflich ^{1,*} 

¹ Institute of Genome Biology, Leibniz-Institute for Farm Animal Biology (FBN), 18196 Dummerstorf, Germany; walz.michael@fbn-dummerstorf.de (M.W.); chau@fbn-dummerstorf.de (L.C.); walz@fbn-dummerstorf.de (C.W.); mandysawitzky@gmx.de (M.S.); ohde@fbn-dummerstorf.de (D.O.); brenmoehl@fbn-dummerstorf.de (J.B.)

² Institute of Genetics and Biometry, Leibniz-Institute for Farm Animal Biology (FBN), 18197 Dummerstorf, Germany; atuschsch@fbn-dummerstorf.de (A.T.); martina.langhammer@fbn-dummerstorf.de (M.L.)

³ Versameb AG, 4057 Basel, Switzerland; friedrich.metzger@versameb.com

⁴ Ligandis UG, 18276 Gülzow-Prüzen, Germany; christine.hoeflich@ligandis.de

* Correspondence: hoeflich@fbn-dummerstorf.de; Tel.: +49-(0)38208-68744; Fax: +49-(0)38208-68-702

Received: 14 April 2020; Accepted: 17 June 2020; Published: 22 June 2020



Abstract: Forced expression of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) in transgenic mice has clearly revealed inhibitory effects on somatic growth. However, by this approach, it cannot be solved if or how IGFBPs rule insulin-like growth factor (IGF)-dependent growth under normal conditions. In order to address this question, we have used growth-selected mouse models (obese and lean) and studied IGF-1 and IGFBPs in serum with respect to longitudinal growth activity in males and females compared with unselected controls. In mice of both genders, body weights were recorded and daily weight gains were calculated. Between 2 and 54 weeks of age, serum IGF-1 was determined by ELISA and intact IGFBP-2, -3 and -4 were quantified by Western ligand blotting. The molar ratio of IGF-1 to the sum of IGFBP-2 to -4 was calculated for all groups and plotted against the daily weight gain curve. Growth-selected mice are characterized by higher daily weight gains and extended periods of elevated growth activity if compared to matched unselected controls. Therefore, adult mice from the obese and lean groups can achieve more than twofold increased body weight in both genders ($p < 0.001$). Between 2 and 11 weeks of age, in obese and lean mice of both genders, serum IGF-1 concentrations are increased more prominently if compared to unselected controls ($p < 0.001$). Instead, substantial decreases of IGFBPs, particularly of IGFBP-2, are observed in males and females of all groups at the age of 2 to 4 weeks ($p < 0.001$). Due to the strong increase of IGF-1 but not of IGFBPs between two and four weeks of age, the ratio of IGF-1 to IGFBP-2 to -4 in serum significantly increased in all groups and genders ($p < 0.05$). Notably, the IGF-1 to IGFBP ratio was higher in male and female obese mice if compared to unselected controls ($p < 0.05$).

Keywords: longitudinal study; IGFBP; mouse models

1. Introduction

Long-term selection for high body weight goes back to 1930, when Goodale initiated an experiment to explore the boundaries of growth in mice [1]. After 35 generations of selection, the mice had increased

their body weight from ≈ 25 g to ≈ 43 g (+72%). Most probably due to inbreeding effects, additional selection for 49 generations did not further increase body weight to a significant extent [2]. Starting from an outbred background and under avoidance of inbreeding in the present selection experiment, substantial increases (+144%) of male body weight at the age of six weeks were achieved after 146 generations of selection in the obese mouse line (DU6) [3]. This finding not only underlines the potential of non-inbred backgrounds for functional genome analysis but even more importantly proves the idea that growth is a complex trait regulated by a multitude of effectors [4]. Here we have used two separate growth selected mouse models for the study of longitudinal regulation of the IGF-system. Accordingly, mice long-term selected for high body mass [3,5,6] (obese model; DU6), and a second mouse model selected for high protein mass [7,8] (lean model; DU6P) were compared to unselected controls [9,10].

Clearly, the GH-IGF system is highly responsive to growth selection; specific effects have been described on the level of DNA, mRNA, and protein with respect to the GH-IGF system in model animals or farm animals [11–15], and many of these studies have particularly addressed the biomarker potential of IGF-1 or assessed single time points. In human subjects, longitudinal concentrations have been provided both for IGF-1 [16] and for IGFBP-3 [17]. In order to estimate the bioactivity of IGF-1, reference levels for the ratio of IGF-1 to IGFBP-3 were also calculated for male and female subjects from a larger population longitudinally [17]. In biological matrices and in the circulation, IGF-1 bioactivity is not only regulated by IGFBP-3, and therefore the inclusion of additional IGFBPs enables a more comprehensive view e.g., on the control of IGF-1 dependent growth. For the hypothesis-free assessment of IGFBPs in a given matrix, Western ligand blotting (WLB) technique can be applied [18]. By this method, it is possible to include all IGFBPs present and detectable in a given sample. Perhaps even more important is the fact that WLB delivers structural information of a given IGFBP [19]. Thereby the information provided by WLB is related to a specific molecular weight (e.g., intact IGFBP-3), whereas other methods do not have this power. This fundamental feature of WLB is getting more and more important, as we understand that IGFBP-proteolysis represents a fundamental process of physiological growth control related to IGFs [20,21] or in cancer [22]. Just recently, an IGFBP-3 protease has been described as an effector of free IGF-1 in children and adolescents [23]. Accordingly, the inclusion of structural information could tremendously improve the biomarker value of IGFBPs [19]. Here we compared intact IGFBPs quantified by WLB with longitudinal concentrations of IGF-1 and, for the first time, discuss IGF-1 to IGFBP ratio based on structurally validated biomarker information of IGFB-2, -3 and -4 in serum.

2. Materials and Methods

2.1. Animals, Husbandry, and Study Design

In the present study, long-term selected non-inbred mouse lines established at the Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN) were used. Two lines were selected for high male body mass at the age of 42 days (DU6: obese model) or high protein amount (DU6P: lean model) at the same age of 42 days after birth. These long-term selected mouse lines were originally based on the genetic background of the unselected control line Fzt:DU [9,10]. The control mouse line (Fzt:DU) was developed by random mating procedures during the experiment. Husbandry, mode of selection, and phenotypical features of the three mouse lines have been described in detail before [3,8]. In brief, all mice were maintained under semi-barrier conditions with free access to chow (breeding diet 1314, Altromin, Lage, Germany) and water. In order to assess longitudinal levels of IGFBPs in serum from male and female mice, we used serum produced by Sawitzky et al. [8]. In the course of this study, male and female mice from all three lines were dissected at the age of 2, 4, 7, 11, 16, 29, 42, and 54 weeks after birth, and serum was frozen until further use. The experiment was designed with 8 animals per group. Due to elevated mortality, only 4 male obese mice reached an age of 54 weeks, resulting in a total sample number of $N = 380$. In addition, body weights were recorded from all mice included in this

study. Daily weight gain was calculated from intrapolated daily weights extracted from the Gompertz growth curve ($Y = YM*(Y0/YM)^{(exp(-K*X))}$). The experiments were performed in adherence to national and international laws and were further approved by the National Animal Protection Board Mecklenburg-Vorpommern (file number: LALLF M-V/TSD/7221.3-1.2-037/06).

2.2. Longitudinal Analysis of IGFs and IGFBPs in Mouse Serum

In serum from male (N = 188) and female (N = 192) mice between 2 and 54 weeks of age, IGF-1 was quantified by ELISA as described before [24]. In all samples, IGFBPs were quantified by Western ligand blotting as already described [25] with exceptions as described here. Serum was denatured for 5 min at 95 °C in sample buffer containing 10% sucrose, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), and 62.5 mM Tris (pH 6.8) and loaded on 12%-SDS/polyacrylamide gels. For quantification of IGFBP-2, -3, and -4, dilution series of human recombinant IGFBP-2, -3, and -4 were included with each run. After electrophoresis, proteins were blotted from the gel to solid carrier membranes (polyvinyl fluoride, Millipore, Schwalbach, Germany). The membranes were incubated using human recombinant IGF-2 radiolabeled with iodine-125 overnight at 4 °C. After five consecutive repetitions of washing in phosphate-buffered saline (pH 7.4) for 15 min, membranes were exposed to Storage Phosphorimager screens mounted on plates for 8 h. The signals were quantified using the Phosphor-Imager Storm (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). Quantification was achieved using ImageQuant software (GE Healthcare, Marlborough, MA, USA). Regression coefficients from standard dilutions were higher than 0.99 (<http://www.ligandis.de/index.php?id=20&L=1>). Intraassay and interassay variations were <15% and <20% for all IGFBPs, as published before [25]. Lower limits of quantification also as published before [25] were 0.25 ng for IGFBP-2 and 1 ng for IGFBP-3 and IGFBP-4. Using the software GraphPad Prism version 8.4.2, three samples were identified as outliers (GraphPad Prism) and therefore excluded from further analysis. Accordingly, in male controls at an age of 2 weeks, in obese males at an age of 42 weeks, and in female controls at an age of 42, only 7 samples per group were included (N = 377).

2.3. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using the SAS software for Windows, version 9.4 (Copyright, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). IGF-1 and IGFBP and growth data were analyzed by analyses of variance (ANOVA) using the MIXED procedure in SAS/STAT software. The ANOVA model contained the fixed factors group (levels: obese, lean, control), gender (levels: female, male), age (levels: weeks 2, 4, 7, 11, 16, 29, 42, 54), and their interactions.

Least square means (LS means) and their standard errors (SE) were computed for each fixed effect in the models described above, and all pairwise differences between LS means were tested using the Tukey–Kramer procedure. The SLICE Statement of the MIXED procedure was used to perform partitioned analyses of the LSM for all interactions. Effects and differences with *p*-values < 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Longitudinal Growth in Non-Inbred Mouse Models

Body weight was recorded in mice selected for high body mass at the age of 42 days (obese mouse model), in mice selected for high protein amount (lean mouse model), and in unselected controls (Figure 1). At an age of 11 weeks in females and 16 weeks in males, body weights were significantly different between obese, lean, and control mice. Within groups, daily weight gains were highest in male or female controls at the age of 24.9 days or 20.9 days after birth. Lean mice elevated daily weight increases until an age of 26.3 days in males and 24.5 days in females. In obese mice, the daily weight gains peaked at the age of 26.7 days in male and 24.2 days in female mice. The absolute amount of daily weight increase amounted to 0.635 g/d and 0.59 g/d in male and female unselected controls, 1.99 g/d and 1.52 g/d in lean male and female mice, but 2.2 g/d and 1.7 g/d in obese male and female mice.

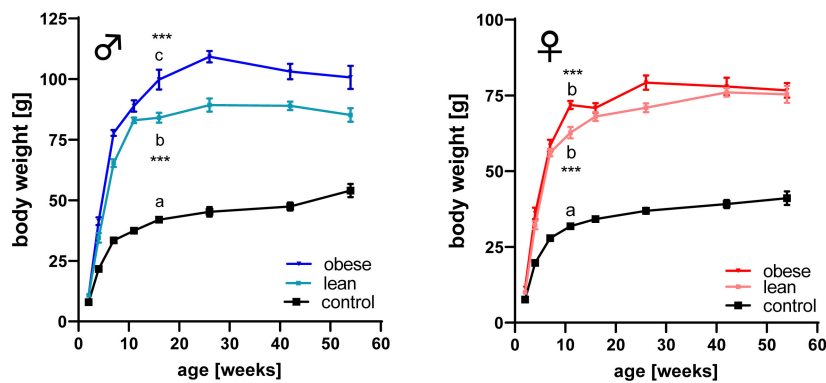


Figure 1. Body weight in male (left panel) and female (right panel) mice selected for high body weight (obese), for high protein amount (lean), and in unselected controls at an age of 2, 4, 7, 11, 16, 29, 42, and 54 weeks. (mean ± SEM; $n = 8$; due to high mortality, sample number was reduced to $n = 4$ at an age of 54 weeks in male obese mice; different letters (a, b, and c) indicate significant differences also in different genetic groups per gender, ***: $p < 0.001$; identical letters indicate no statistically significant difference).

3.2. Effects of Age and Growth Selection on the Concentrations of IGF-1

As a main effect of growth selection independent of age, IGF-1 was significantly increased in lean mice ($p < 0.001$) of both genders but only in obese male mice ($p < 0.01$) if compared to sex-matched unselected controls (Figure 2). As an effect of age and genetic group, in male obese mice, a significant ($p < 0.001$) increase of IGF-1 concentrations in serum was present between 2 and 4 weeks of age. In male lean mice, a similar increase was found between 2 and 7 weeks of age ($p < 0.001$). In males from both growth-selected mouse lines, IGF-1 concentrations decreased between 4 or 7 and 29 weeks of age ($p < 0.01$). Moreover, as an interaction of age and genetic group, in female obese and lean mice, increases of IGF-1 concentrations were found between 2 and 7 weeks of age ($p < 0.001$). However, a significant decrease of IGF-1 concentrations over time was only found in obese female mice between 7 and 54 weeks of age ($p < 0.001$).

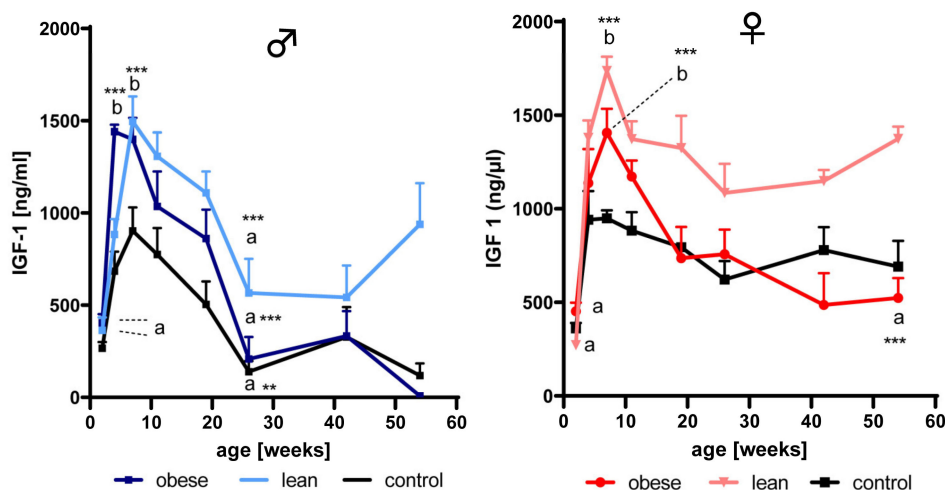


Figure 2. Concentrations of insulin-like growth factor (IGF)-1 in serum from mice selected for high body weight (obese), for high protein amount (lean), and in unselected controls of both genders at an age of 2, 4, 7, 11, 16, 29, 42, and 54 weeks. Different letters (a and b) indicate significant differences also with respect to different genetic groups in each gender; identical letters indicate no statistically significant difference. Sample information is provided by Figure 1 (mean ± SEM; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

3.3. Effects of Age and Gender on Levels of IGFBP2- to 4

By direct comparison of longitudinal IGFBP profiles in serum from male and female unselected non-inbred mice (data not shown), IGFBP-2, -3, and -4 exhibited gender-related features: if compared to age-matched females, male mice had higher concentrations of IGFBP-2 ($p < 0.01$) and -3 ($p < 0.001$) at an age of 16 and 42 weeks, respectively, but lower concentrations of IGFBP-4 in serum ($p < 0.001$) at the age of 54 weeks.

3.3.1. IGFBP-2

As a main effect of age in all female mice, IGFBP-2 was reduced between weeks 2 and 4 ($p < 0.01$), increased between weeks 4 and 11 ($p < 0.001$), and reduced between weeks 11 and 16 ($p < 0.001$; Figure 3). As an effect of age in all male mice, IGFBP-2 also was reduced between weeks 2 and 4 ($p < 0.001$), increased from week 4 until week 16 ($p < 0.001$), and then decreased from week 16 to week 26 ($p < 0.001$). The effects of age in selected mouse lines are depicted in Figures 3 and 4 (interactions of age and genetic group).

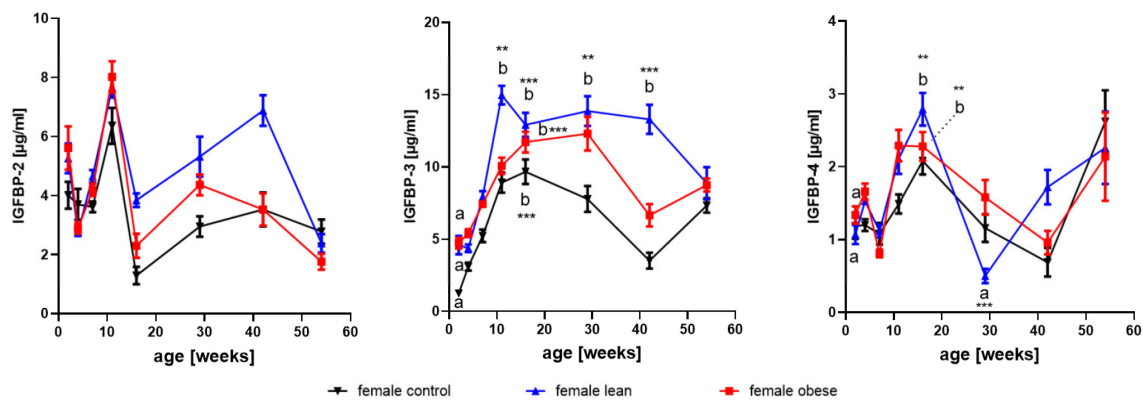


Figure 3. Concentrations of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) -2, -3, and -4 in serum from female mice selected for high body weight (obese), for high protein amount (lean), and in unselected controls at an age of 2, 4, 7, 11, 16, 29, 42, and 54 weeks (mean ± SEM; $n \geq 7$; different letters (a and b) indicate significant effects also if different genetic groups were compared; identical letters indicate no statistically significant difference; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

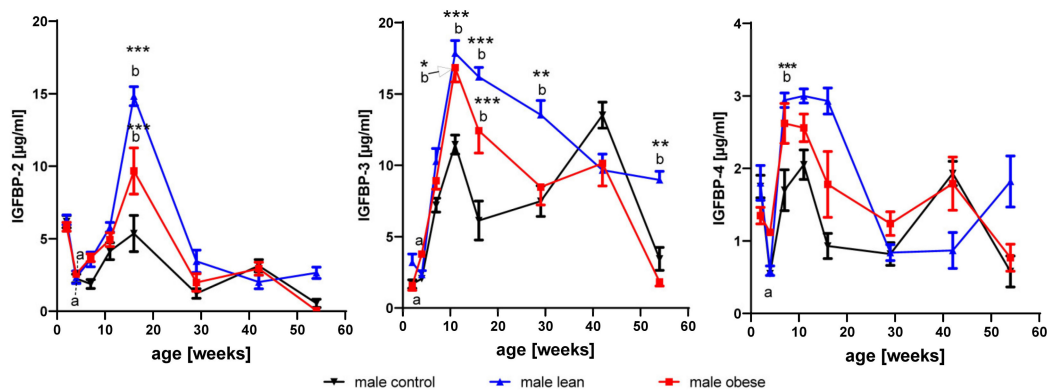


Figure 4. Concentrations of IGFBP-2, -3, and -4 in serum from male mice selected for high body weight (obese), for high protein amount (lean), and in unselected controls at an age of 2, 4, 7, 11, 16, 29, 42, and 54 weeks (mean ± SEM; $n = 8$ with the exception of obese male at an of 42 weeks and 54 weeks with $n = 7$ and $n = 4$, respectively; different letters (a and b) indicate significant effects of age; identical letters indicate no statistically significant difference also if different genetic groups were compared; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

3.3.2. IGFBP-3

As an effect of age in all female mice, a substantial increase of IGFBP-3 (Figure 4) in serum was observed between 2 and 16 weeks of age ($p < 0.001$). In addition, a reduction was observed in all female mice between week 16 and week 54 ($p < 0.001$). Similarly in all male mice, an increase of IGFBP-3 in serum between weeks 2 and 11 ($p < 0.001$) and a decrease between weeks 11 and 54 ($p < 0.001$) was observed. Significant effects of age are presented for separate mouse lines in Figures 3 and 4 (interactions of age, gender, and mouse line).

3.3.3. IGFBP-4

As an effect of age, IGFBP-4 was significantly decreased between weeks 2 and 7 ($p < 0.05$), increased between week 7 and 11 ($p < 0.05$) and decreased between week 11 and 42 ($p < 0.001$). In all male mice, IGFBP-4 was increased between weeks 4 and 11 ($p < 0.01$) and decreased between weeks 11 and 29 ($p < 0.001$). Again, significant differences present in isolated mouse lines are depicted in Figures 3 and 4.

3.4. Effects of Growth Selection on the Concentrations of IGFBP-2 to -4

As a main effect of growth selection and irrespective of age, obese female mice had significantly higher levels of IGFBP-3 in serum ($p < 0.001$). Independent of age, selection for high protein accretion increased IGFBP-3 and IGFBP-2 ($p < 0.001$). In males, selection for high body mass and selection for high protein mass had an effect on the concentrations of IGFBP-2 and IGFBP-3 in serum ($p < 0.05$) over all age groups.

As an interaction of genetic group and age, in growth-selected obese and lean male mice (Figure 4), levels of IGFBP-3 at the age of 11 and 16 weeks were increased if compared to age-matched unselected controls ($p < 0.05$). In lean male mice, IGFBP-3 remained on a higher level also at later time points, with significant differences if compared to obese male mice and unselected controls at the age of 29 and 54 weeks ($p < 0.05$). Growth selection further stimulated the increase of IGFBP-2 from younger ages to week 16, observed in unselected controls, resulting in about 3-fold increased levels of IGFBP-2 in serum from lean male mice ($p < 0.001$). Between 4 and 11 weeks of age, a significant increase of IGFBP-4 was observed ($p < 0.01$) in all males independent of line. In all genetic groups and in both genders, the postnatal increase of IGFBP-3 in serum is lagging behind the increases of IGF-1.

3.5. Longitudinal Molar Ratio of IGF-1 and IGFBP Concentrations in Serum

In order to estimate the longitudinal molar ratio of IGF-1 with respect to the IGFBPs detected in serum by Western ligand blotting, the concentrations of IGF-1 and IGFBP-2 to -4 were corrected for their respective molecular weights (IGF-1: 7.5 kDa, IGFBP-2: 32 kDa, IGFBP-3: 41 kDa, IGFBP-4: 24 kDa). The longitudinal molar ratio of IGF-1 versus the sum of IGFBP-2, IGFBP-3, and IGFBP-4 is presented in Figure 5. Neither in female nor in male mice of all genetic groups, IGF-1 was in molar excess over the sum of IGFBP-2 to -4. As an effect of age and genetic group, between weeks 2 and 4, there was a significant increase in all groups and genders ($p < 0.001$) with the exception of female controls ($p < 0.05$). At the age of 4 weeks, obese male and female mice have higher ratios of IGF-1/IGFBPs if compared to unselected controls ($p < 0.05$).

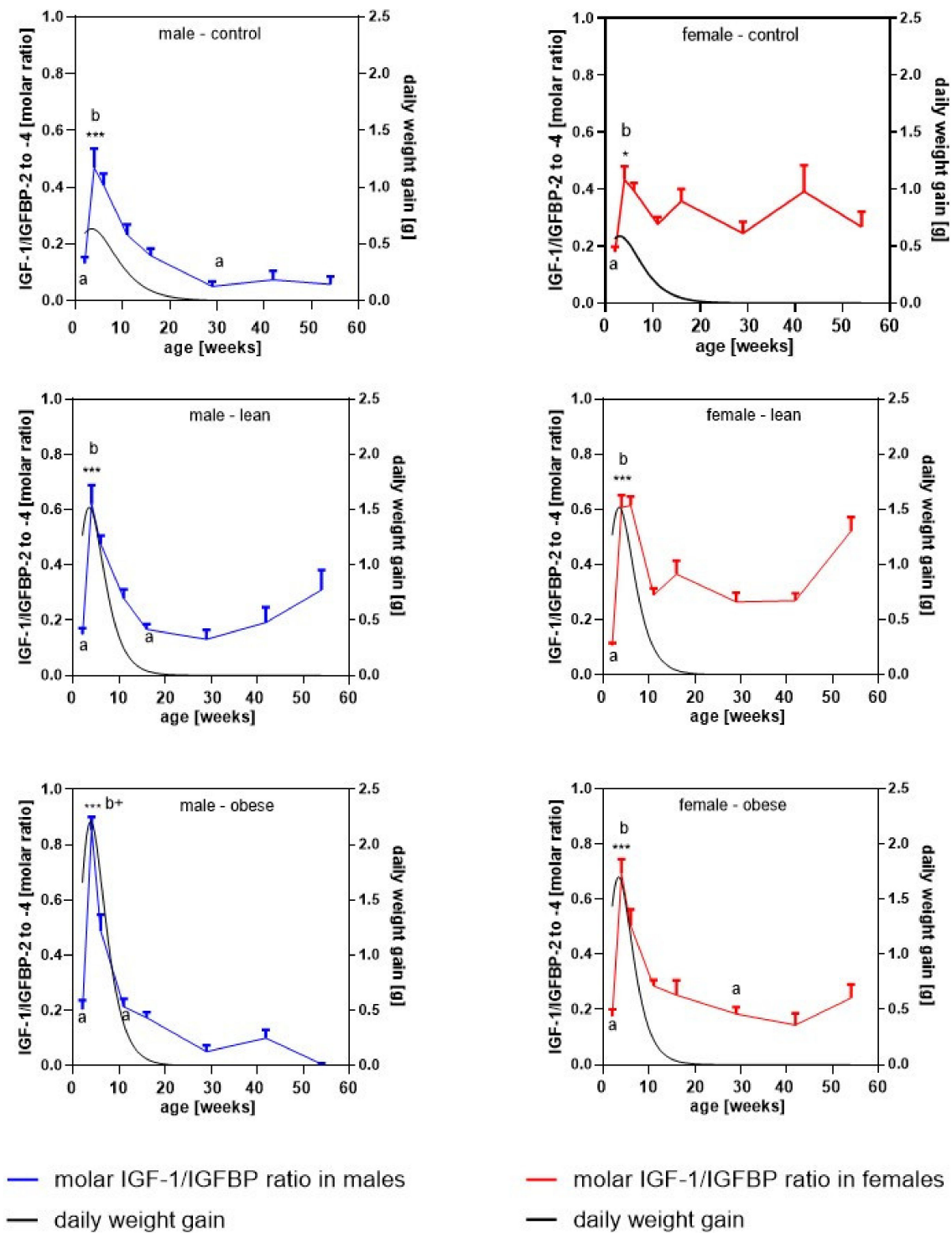


Figure 5. Molar ratio of IGF-1 to the sum of IGFBP-2, -3, and -4 (left Y-axis) present in serum from mice selected for high body weight (obese), for high protein amount (lean), and in unselected controls at an age of 2, 4, 7, 11, 16, 29, 42, and 54 weeks ($n \geq 7$ with the exception of obese male at 54 weeks with $n = 4$; different letters indicate significant effects of age; identical letters indicate no statistically significant difference; *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; b+: significantly different if compared to unselected controls, with $p < 0.001$ for males and $p < 0.05$ for females). On the right Y-axis, daily weight increases, intrapolated from the body weight data in Figure 1 by the Gompertz function, were included.

4. Discussion

Functional genome analysis in genotype-based (transgenic or knockout) mouse models has identified multiple functions of the IGF system for somatic growth [26–28]. By contrast, descriptive studies using phenotype-derived mouse models have been used to a much lesser extent. Nevertheless, phenotype-derived models can provide important information on growth regulation under physiological conditions and may also be useful for the identification and validation of biomarkers.

For the establishment of those models, phenotype selection in mice was initiated in 1976 in Dummerstorf (Germany) based on a mixed genetic background comprising four different inbred and four different outbred mouse models [10]. Growth selection has been performed with respect to male body weight at the age of 42 days, resulting in an obese model characterized by extreme body weight and marked obesity resulting in the DU6 mouse model [5]. In addition, a lean mouse model (DU6P) has been developed from the identical genetic background by selection for high protein amount in the whole body [29]. Line-specific accumulation of body fat and the accretion of muscle mass over time is described elsewhere [3,8]. Here we describe endocrine parameters of IGF-related growth in male and female mice from obese and lean mice, compared to unselected controls, in a longitudinal setting. For the analysis, we included exclusively intact IGFBPs (IGFBP-2 to -4) detectable in serum by Western ligand blotting.

Line-, gender- and age-specific growth characteristics were identified by the statistical model with significantly higher body mass in obese versus lean mice. Higher body mass in growth-selected mice is reflected by higher daily weight gains and prolonged pubertal growth if compared to unselected controls.

As published before [29] and confirmed here, after birth, obese and lean mice are characterized by substantial increases of serum IGF-1 concentrations if compared to controls, which might nicely explain higher growth activity in both mouse models. However, IGF-1 and GH have common and independent effects during early postnatal growth [30]. Therefore, we have to consider the IGF-independent effects of growth hormone during the earlier postnatal growth period but also the effects of IGF-2. The potential effects of the embryonal growth factor IGF-2 [31], which also can have positive effects on body weight after birth [32], need to be studied in a separate study. Although daily weight gain declined between 17 and 27.5 days of age in all mice included in that study, the concentrations of IGF-1 in the circulation remained elevated until an age of at least 7 weeks. The elevated levels of IGF-1 therefore cannot explain the massive reductions of growth activity in mice between 4 and 7 weeks of age. In female but not male human subjects, IGF-1 concentrations also lag behind the peak weight gain in males and females [16,33]. Accordingly, highest IGF-1 serum concentrations were found at the age of about 14.6 years in male and female human subjects [17], whereas peak weight gain was referred to an age of 12 years in females and 14 years in males [34]. The clear decrease of serum IGF-1 concentrations, at least in male mice between week four and week 26 of age, identifies peak-like kinetic for serum IGF-1 concentrations as also found in human subjects [16]. In female mice, a decrease of serum IGF-1 concentrations is less clear and was only found in obese mice. In unselected controls, a peak-like pattern is virtually absent. This is a clear difference if compared to human subjects, where serum IGF-1 concentrations were clearly lower in adults compared to younger subjects [16].

In order to understand why daily weight gain was reversed in the presence of high or elevated IGF-1 serum concentrations, we studied serum IGFBP concentrations in all samples. In all male genetic groups, IGFBP-2 concentrations were reduced directly after birth between two and four weeks of age (effect of age by gender for males: $p < 0.001$). The reductions in male mice between two and four weeks were characterized by utmost uniformity as the curves were overlaying each other, and the standard deviations were comparably low. Another clear feature of longitudinal IGFBP-expression was seen in strong increases of IGFBP-3 in male and female mice between four and 11 weeks of age. In human subjects of both genders, IGFBP-3 increased during the growth period until the age of 20 years [17,35].

In lean and obese male mice, serum IGFBP-2 concentrations were elevated at week 16 after birth compared to earlier time points. In female mice, a postnatal increase occurred one month earlier at

week 11 and was significant compared to two, four, and seven weeks of age, independent of the genetic group (data not shown). Due to gender-specific patterns of longitudinal IGFBP-2 concentrations in serum, females from all genetic groups had significantly lower levels of IGFBP-2 compared with their male littermates at the age of 16 weeks. In human serum, concentrations of IGFBP-2 are one order of magnitude lower compared to IGFBP-3 and decrease from childhood to adolescence [36], similar to mice. With advanced age in humans, concentrations of IGFBP-2 in serum increase, with the highest levels found during senescence [37,38]. Accordingly, we may have similarities between mice and humans only during the initial postnatal growth period.

Similar to IGFBP-2, serum levels of IGFBP-4 were reduced between weeks 2 and 4 in male mice but significantly increased in both genders between week 4 and 16 independent of group ($p < 0.001$). In healthy human subjects, serum IGFBP-4 concentrations did not change with age [39].

The molar ratio of IGF-1 to the molar sum of all IGFBPs identified in serum by Western ligand blotting was characterized by significant increases between week 2 and week 4 in all groups. Thereby, the IGF/IGFBP ratios reached their lifetime maxima when growth activity was also high in mice. In obese mice, at the age of four weeks, the IGF-1/IGFBP ratio was also significantly increased compared to unselected controls, which may explain at least part of the higher growth activity under conditions of growth selection. The overlay of IGF-1/IGFBP ratios with the daily weight increases are only partial in unselected controls of both genders. This may indicate that the extended periods of growth activity in growth-selected mice may be related to elevated IGF-1 and/or elevated IGF-1 bioactivity. As provided by data from larger groups of mice (data not shown), growth-selected mice are heavier already at the time of birth, where we could not identify higher IGF-1 or IGF-1/IGFBP ratios. From work in genotype-derived mouse models, we know that in particular, IGF-II and GH or other hormones like insulin have an effect on early growth and development [30]. As also mentioned earlier, the potential roles of these hormones have to be addressed in future studies. In all groups and genders, the kinetics of serum IGFBP-3 concentrations are lagging behind those of serum IGF-1 concentrations. Thereby, a mechanism may be generated for the establishment of acutely high IGF-1/IGFBP ratios. By contrast, a delayed increase of IGFBP-3 versus IGF-1 was definitely not described in humans. According to published reference levels [17], male and female children at the age of about five years already had an increase of 75% of their maximal IGFBP-3 during adulthood. Thus, a delayed increase of IGFBP-3 versus IGF-1 was definitely not described in humans [16,17], which could be due to species differences or the different analytical systems used.

To date, it is unclear how such a shift is established in mice. In general, the altered expression of IGFBPs on the level of RNA and/or protein or altered stability of IGFBPs in biological matrices may be causative of altered concentrations of IGFBPs and thus altered bioactivity of IGF-1. An involvement of IGFBP-proteolysis for the control of height attainment has been suggested by Marouli et al. [4]. In this study, an allele of stanniocalcin 2 was characterized, which was less efficient in blocking proteolytic activity of PAPP-A. Just recently, it was demonstrated that PAPP-2, which represents a candidate gene for growth regulation in mice as well [40], is significantly decreased during childhood and negatively correlated with intact IGFBP-3 in humans [23].

However, this study has distinct limitations. First of all, due to the longitudinal and initially descriptive approach, the number in every single age group was comparably small and further reduced by higher mortality with age, particularly in male obese mice. Accordingly, the highest age group with 4 replicates in obese males can be considered less reliable. In the future, higher sample numbers should be chosen in selected groups also for confirmatory studies. Furthermore, IGFBP-3 is present in a ternary complex, whereas IGFBP-2 and IGFBP-4 are present in binary complexes only. Therefore, differential pharmacokinetic properties can be expected for the different types of complexes. Therefore, the present study followed a simplistic approach by combining IGFBP-2 to -4 for the estimation of IGF-1 to IGFBP ratios. Future studies also would have to consider the concentrations of IGFBP-1, -5, and -6, which were not detected by Western ligand blotting due to lower sensitivity compared e.g., to ELISA. Furthermore, the different compounds from the GH/IGF-system are inter-related, as GH

and IGF-1 are particular determinants of IGFBP concentrations. Finally, the physiological relevance of IGF to IGFBP ratios less than 1 needs to be addressed in future studies. This could be achieved by the analysis of free IGF-1 or IGF-related bioactivity in animals characterized by different IGF to IGFBP ratios.

To summarize, we have characterized longitudinal concentrations of IGF-1 and intact IGFBP-2 to -4 in serum from two different mouse lines selected for high growth and unselected controls in both genders. We compared the IGF-1/IGFBP ratios with daily weight gain and were able to provide evidence that part of the elevated growth activity during prepubertal growth in normal and growth-selected mice could be related to elevated bioactivity of IGF-1. Elevated ratios of IGF-1/IGFBPs are established by a delayed increase of IGFBPs compared to strong increases of IGF-1 between 2 and 4 weeks of age.

We therefore may be in a position to distinguish two phases of IGF-1 related growth during early postnatal development: acceleration of postnatal growth by elevated serum IGF-1 concentrations followed by a phase of deceleration due to the delayed increase of IGFBPs in serum.

Author Contributions: Conceptualization, A.H.; methodology, M.W., L.C., and C.H.; software, A.T. and A.H.; validation, A.T. and A.H.; formal analysis, M.W., L.C., A.T., and C.H.; investigation, M.W., L.C., C.H.; resources, M.S. and M.L.; data curation, A.H. and M.L.; writing—original draft preparation, A.H.; writing—review and editing, M.W., C.W., D.O., J.B., A.T., M.L., F.M., C.H., and A.H.; visualization, A.H.; supervision, C.W. and A.H.; project administration, A.H.; funding acquisition, A.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: M.W. is financially supported by the H. Wilhelm Schaumann Stiftung.

Acknowledgments: The publication of this article was funded by the Open Access Fund of the Leibniz Association and the Open Access Fund of the Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN). The authors thank the staff of the mouse facility for excellent animal care and excellent technical assistance, respectively. We further thank S.Sänger (F. Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland) for excellent support in the IGF-I analysis.

Conflicts of Interest: C.H. and A.H. are related to Ligandis UG. The other authors do not have any potential conflicts of interest to declare. Friedrich Metzger declares relations to Versameb AG.

References

1. Goodale, H.D. A Study of the Inheritance of Body Weight in the Albino Mouse by Selection. *J. Hered.* **1938**, *29*, 101–112. [[CrossRef](#)]
2. Wilson, S.P.; Goodale, H.D.; Kyle, W.H.; Godfrey, E.F. Long term selection for bodyweight in mice. *J. Hered.* **1971**, *62*, 228–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Renne, U.; Langhammer, M.; Brenmoehl, J.; Walz, C.; Zeissler, A.; Tuchscherer, A.; Piechotta, M.; Wiesner, R.J.; Bielohuby, M.; Hoeflich, A. Lifelong Obesity in a Polygenic Mouse Model Prevents Age- and Diet-Induced Glucose Intolerance—Obesity Is No Road to Late-Onset Diabetes in Mice. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e79788. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Marouli, E.; The EPIC-InterAct Consortium; Graff, M.; Medina-Gomez, C.; Lo, K.S.; Wood, A.R.; Kjaer, T.R.; Fine, R.; Lu, Y.; Schurmann, C. Rare and low-frequency coding variants alter human adult height. *Nature* **2017**, *542*, 186–190. [[CrossRef](#)]
5. Brockmann, A.G.; Haley, C.S.; Renne, U.; Knott, A.S.; Schwerin, M. Quantitative trait loci affecting body weight and fatness from a mouse line selected for extreme high growth. *Genetics* **1998**, *150*, 369–381.
6. Bunger, L.; Laidlaw, A.; Bulfield, G.; Eisen, E.J.; Medrano, J.F.; Bradford, G.E.; Pirchner, F.; Renne, U.; Schlote, W.; Hill, W.G. Inbred lines of mice derived from long-term growth selected lines: Unique resources for mapping growth genes. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* **2001**, *12*, 678–686. [[CrossRef](#)]
7. Bunger, L.; Renne, U.; Diel, G.; Kuhla, S. Long-term selection for protein amount over 70 generations in mice. *Genet. Res.* **1998**, *72*, 93–109. [[CrossRef](#)]
8. Sawitzky, M.; Zeissler, A.; Langhammer, M.; Bielohuby, M.; Stock, P.; Hammon, H.M.; Görs, S.; Metges, C.C.; Stoehr, B.J.M.; Bidlingmaier, M.; et al. Phenotype Selection Reveals Coevolution of Muscle Glycogen and Protein and PTEN as a Gate Keeper for the Accretion of Muscle Mass in Adult Female Mice. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e39711. [[CrossRef](#)]
9. Schüler, L. Der Mäuseauszuchtstamm Fzt:DU und seine Anwendung als Modell in der Tierzuchtforchung. *Arch. Tierz.* **1985**, *28*, 357–363.

10. Dieltz, G.; Langhammer, M.; Renne, U. Model simulations for genetic random drift in the outbred strain Fzt: DU. *Arch. Tierz.* **2004**, *47*, 595–604. [[CrossRef](#)]
11. Hoeflich, A.; Bunker, L.; Nedbal, S.; Renne, U.; Elmlinger, M.W.; Blum, W.F.; Bruley, C.; Kolb, H.J.; Wolf, E. Growth selection in mice reveals conserved and redundant expression patterns of the insulin-like growth factor system. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2004**, *136*, 248–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Jia, J.; Ahmed, I.; Liu, L.; Liu, Y.; Xu, Z.; Duan, X.; Li, Q.; Dou, T.; Gu, D.; Rong, H.; et al. Selection for growth rate and body size have altered the expression profiles of somatotrophic axis genes in chickens. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0195378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Pas, M.T.; Freriksen, J.; Van Bijnen, A.; Gerritsen, C.; Bosch, T.V.D.; Harders, F.; Verburg, F.; Visscher, A.; De Greef, K. Selection for growth rate or against back fat thickness in pigs is associated with changes in growth hormone axis plasma protein concentration and mRNA level. *Domest. Anim. Endocrinol.* **2001**, *20*, 165–184. [[CrossRef](#)]
14. Anh, N.T.L.; Kunhareang, S.; Duangjinda, M. Association of Chicken Growth Hormones and Insulin-like Growth Factor Gene Polymorphisms with Growth Performance and Carcass Traits in Thai Broilers. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* **2015**, *28*, 1686–1695. [[CrossRef](#)]
15. El-Magd, M.A.; Saleh, A.A.; Nafeaa, A.A.; El-Komy, S.M.; Afifi, M. Polymorphisms of the IGF1 gene and their association with growth traits, serum concentration and expression rate of IGF1 and IGF1R in buffalo. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **2017**, *18*, 1064–1074. [[CrossRef](#)]
16. Bidlingmaier, M.; Friedrich, N.; Emeny, R.T.; Spranger, J.; Wolthers, O.D.; Roswall, J.; Körner, A.; Obermayer-Pietsch, B.; Hübener, C.; Dahlgren, J.; et al. Reference Intervals for Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-I) From Birth to Senescence: Results From a Multicenter Study Using a New Automated Chemiluminescence IGF-I Immunoassay Conforming to Recent International Recommendations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2014**, *99*, 1712–1721. [[CrossRef](#)]
17. Friedrich, N.; Wolthers, O.D.; Ararat, A.; Emeny, R.T.; Spranger, J.; Roswall, J.; Kratzsch, J.; Grabe, H.J.; Hübener, C.; Pfeiffer, A.F.; et al. Age- and Sex-Specific Reference Intervals Across Life Span for Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 3 (IGFBP-3) and the IGF-I to IGFBP-3 Ratio Measured by New Automated Chemiluminescence Assays. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2014**, *99*, 1675–1686. [[CrossRef](#)]
18. Hossenlopp, P.; Segovia, B.; Lassarre, C.; Roghani, M.; Bredon, M.; Binoux, M. Evidence of Enzymatic Degradation of Insulin-Like Growth Factor-Binding Proteins in the 150K Complex during Pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1990**, *71*, 797–805. [[CrossRef](#)]
19. Hoeflich, A.; David, R.; Hjortebjerg, R. Current IGFBP-Related Biomarker Research in Cardiovascular Disease—We Need More Structural and Functional Information in Clinical Studies. *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*, 388. [[CrossRef](#)]
20. Lawrence, J.B.; Oxvig, C.; Overgaard, M.T.; Sottrup-Jensen, L.; Gleich, G.J.; Hays, L.G.; Yates, J.R.; Conover, C.A. The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 3149–3153. [[CrossRef](#)]
21. Botkjaer, J.A.; Noer, P.R.; Oxvig, C.; Yding Andersen, C. A common variant of the pregnancy-associated plasma protein-a (pappa) gene encodes a protein with reduced proteolytic activity towards igf-binding proteins. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 13231. [[CrossRef](#)]
22. Conover, C.A.; Oxvig, C. 40 YEARS OF IGF1: PAPP-A and cancer. *J. Mol. Endocrinol.* **2018**, *61*, T1–T10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Fujimoto, M.; Khoury, J.C.; Khoury, P.R.; Kalra, B.; Kumar, A.; Sluss, P.; Oxvig, C.; Hwa, V.; Dauber, A. Anthropometric and biochemical correlates of PAPP-A2, free IGF-I, and IGFBP-3 in childhood. *Eur. J. Endocrinol.* **2020**, *182*, 363–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Saenger, S.; Goeldner, C.; Frey, J.; Ozmen, L.; Ostrowitzki, S.; Spooren, W.; Ballard, T.; Prinssen, E.; Borroni, E.; Metzger, F. PEGylation enhances the therapeutic potential for insulin-like growth factor I in central nervous system disorders. *Growth Horm. IGF Res.* **2011**, *21*, 292–303. [[CrossRef](#)]
25. Wirthgen, E.; Höflich, C.; Spitschak, M.; Helmer, C.; Brand, B.; Langbein, J.; Metzger, F.; Hoeflich, A. Quantitative Western ligand blotting reveals common patterns and differential features of IGFBP-fingerprints in domestic ruminant breeds and species. *Growth Horm. IGF Res.* **2016**, *26*, 42–49. [[CrossRef](#)]
26. Efstratiadis, A. Genetics of mouse growth. *Int. J. Dev. Biol.* **1998**, *42*, 955–976.
27. Pintar, J.E.; Cerro, J.A.; Wood, T.L. Genetic Approaches to the Function of Insulin-Like Growth Factor-Binding Proteins during Rodent Development. *Horm. Res.* **1996**, *45*, 172–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

28. Leroith, D.; Roberts, J.C.T. Insulin-like Growth Factors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1993**, *692*, 1–9. [[CrossRef](#)]
29. Timtchenko, D.; Kratzsch, J.; Sauerwein, H.; Wegner, J.; Souffrant, W.; Schwerin, M.; Brockmann, G. Fat storage capacity in growth-selected and control mouse lines is associated with line-specific gene expression and plasma hormone levels. *Int. J. Obes.* **1999**, *23*, 586–594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Lupu, F.; Terwilliger, J.D.; Lee, K.; Segre, G.V.; Efstratiadis, A. Roles of Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor 1 in Mouse Postnatal Growth. *Dev. Biol.* **2001**, *229*, 141–162. [[CrossRef](#)]
31. Baker, J.; Liu, J.P.; Robertson, E.J.; Efstratiadis, A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* **1993**, *75*, 73–82. [[CrossRef](#)]
32. Moerth, C.; Schneider, M.R.; Renner-Mueller, I.; Blutke, A.; Elmlinger, M.W.; Erben, R.G.; Camacho-Hübner, C.; Hoeflich, A.; Wolf, E. Postnatally Elevated Levels of Insulin-Like Growth Factor (IGF)-II Fail to Rescue the Dwarfism of IGF-I-Deficient Mice except Kidney Weight. *Endocrinology* **2007**, *148*, 441–451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Rogol, A.D.; Clark, P.; Roemmich, J.N. Growth and pubertal development in children and adolescents: Effects of diet and physical activity. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *72*, S521–S528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Tanner, J.M. *Fetus into Man: Physical Growth from Conception to Maturity*; Harvard University Press: Cambridge, MA, USA, 1989.
35. Bereket, A.; Turan, S.; Omar, A.; Berber, M.; Ozen, A.; Akbenlioglu, C.; Haklar, G. Serum IGF-I and IGFBP-3 Levels of Turkish Children during Childhood and Adolescence: Establishment of Reference Ranges with Emphasis on Puberty. *Horm. Res. Paediatr.* **2006**, *65*, 96–105. [[CrossRef](#)]
36. Smith, W.J.; Nam, T.J.; Underwood, L.E.; Busby, W.H.; Celnicker, A.; Clemmons, D.R. Use of insulin-like growth factor-binding protein-2 (igfbp-2), igfbp-3, and igf-i for assessing growth hormone status in short children. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1993**, *77*, 1294–1299.
37. Mattsson, A.; Svensson, D.; Schuett, B.; Osterziel, K.J.; Ranke, M.B. Multidimensional reference regions for IGF-I, IGFBP-2 and IGFBP-3 concentrations in serum of healthy adults. *Growth Horm. IGF Res.* **2008**, *18*, 506–516. [[CrossRef](#)]
38. Beld, A.W.V.D.; Carlson, O.D.; Doyle, M.E.; Rizopoulos, D.; Ferrucci, L.; Van Der Lely, A.J.; Egan, J.M. IGFBP-2 and aging: A 20-year longitudinal study on IGFBP-2, IGF-I, BMI, insulin sensitivity and mortality in an aging population. *Eur. J. Endocrinol.* **2019**, *180*, 109–116. [[CrossRef](#)]
39. Van Doorn, J.; Cornelissen, A.J.F.H.; Van Buul-Offers, S.C. Plasma levels of insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) under normal and pathological conditions. *Clin. Endocrinol.* **2001**, *54*, 655–664. [[CrossRef](#)]
40. Christians, J.K.; Hoeflich, A.; Keightley, P.D. PAPP2, an Enzyme That Cleaves an Insulin-Like Growth-Factor-Binding Protein, Is a Candidate Gene for a Quantitative Trait Locus Affecting Body Size in Mice. *Genetics* **2006**, *173*, 1547–1553. [[CrossRef](#)]



2.2. Sex-Specific Control of Muscle Mass: Elevated IGFBP Proteolysis and Reductions of IGF1 Levels Are Associated with Substantial Loss of Carcass Weight in Male DU6PxIGFBP-2 transgenic Mice



Daniela Ohde, Michael Walz, Christina Walz, Antonia Noce, Julia Brenmoehl, Martina Langhammer, Andreas Hoeflich

Cells 2020, 9, 2174; doi:10.3390/cells9102174

Michael Walz war in der Methodik, Durchführung und Auswertung der Experimente beteiligt.

Article

Sex-Specific Control of Muscle Mass: Elevated IGFBP Proteolysis and Reductions of IGF-1 Levels Are Associated with Substantial Loss of Carcass Weight in Male DU6PxIGFBP-2 Transgenic Mice

Daniela Ohde ¹, Michael Walz ¹, Christina Walz ¹, Antonia Noce ¹, Julia Brenmoehl ¹,
Martina Langhammer ² and Andreas Hoeflich ^{1,*}

¹ Institute of Genome Biology, Leibniz-Institute for Farm Animal Biology (FBN), 18196 Dummerstorf, Germany; ohde@fhn-dummerstorf.de (D.O.); walz.michael@fhn-dummerstorf.de (M.W.); walz@fhn-dummerstorf.de (C.W.); noce@fhn-dummerstorf.de (A.N.); brenmoehl@fhn-dummerstorf.de (J.B.)

² Institute of Genetics and Biometry, Leibniz-Institute for Farm Animal Biology (FBN), 18196 Dummerstorf, Germany; martina.langhammer@fhn-dummerstorf.de

* Correspondence: hoeflich@fhn-dummerstorf.de; Tel.: +49-38208-68744

Received: 28 August 2020; Accepted: 25 September 2020; Published: 26 September 2020



Abstract: In farmed animals, carcass weight represents an important economic trait. Since we had demonstrated that IGFBP-2 represents a potent inhibitor of muscle accretion in inbred mice, we wanted to quantify the inhibitory effects of IGFBP-2 under conditions of elevated protein mass in growth selected non-inbred mice (DU6P). Therefore, we crossed male DU6P mice with female IGFBP-2 transgenic mice. Male IGFBP-2 transgenic offspring (DU6P/IGFBP-2) were characterized by more than 20% reductions of carcass mass compared to male non-transgenic littermates. The carcass mass in males was also significantly lower ($p < 0.001$) than in transgenic female DU6P/IGFBP-2 mice, which showed a reduction of less than 10% ($p < 0.05$) compared to non-transgenic female DU6P/IGFBP-2 mice. Although transgene expression was elevated in the muscle of both sexes ($p < 0.001$), serum levels were normal in female, but significantly reduced in male transgenic DU6P/IGFBP-2 mice ($p < 0.001$). In this group, also IGFBP-3 and IGFBP-4 were significantly reduced in the circulation ($p < 0.01$). Particularly in male transgenic mice, we were able to identify proteolytic activity against recombinant IGFBP-2 included in diluted serum. IGFBP-proteolysis in males correlated with massive reductions of IGF-1 in serum samples and the presence of elevated levels of IGFBP-2 fragments. From our data, we conclude that elevated tissue expression of IGFBP-2 is an essential effector of muscle accretion and may block more than 20% of carcass mass. However, in the circulation, intact IGFBP-2 contained no reliable biomarker content. Notably, for the estimation of breeding values in meat-producing animal species, monitoring of IGFBP-2 expression in muscle appears to be supported by the present study in a model system.

Keywords: IGFBP-2; sex; transgenic mouse; phenotype selection; muscle accretion; carcass weight; IGF-1; proteolytic activity

1. Introduction

IGFBP-2 was identified as a candidate gene for negative growth regulation under conditions of growth selection [1]. In fact, forced expression of IGFBP-2 in transgenic mice confirmed IGFBP-2 as an inhibitor of somatic growth but further identified muscle as a particularly sensitive tissue for the negative effects of IGFBP-2 [2,3]. On a mixed inbred and outbred background (50% C57BL/6 and 50%

NMRI), overexpression of IGFBP-2 under control of the cytomegalovirus promoter correlated with altered muscle metabolism defined by an increased number of glycolytic fibers and elevated activity of lactate dehydrogenase in male IGFBP-2 transgenic mice [4]. In *Musculus rectus femoris* from this model, it was further demonstrated that IGFBP-2 decreased myogenic proliferation and thus blocks muscle accretion [4]. In the same muscle from male IGFBP-2 transgenic mice, the weight reductions were further characterized by reduced cross-sectional area, whereas the number of myofibers was not affected by the genotype [4]. Notably, this effect was not identified in female IGFBP-2 transgenic mice. Additionally, local injection of adeno-associated viral vectors containing a CMV-IGFBP-2 expression construct in the anterior tibialis muscle reduced muscle mass and further reduced muscle force at the site of administration [5]. Accordingly, based on mouse models, it is evident that IGFBP-2 controls growth, metabolism, and function of the muscle.

Several studies addressed the biomarker potential of IGFBP-2 for muscle accretion in vertebrates. Accordingly, in Angus bulls and in conjunction with parameters of growth hormone secretion, concentrations of circulating intact IGFBP-2 were informative for the prediction of average daily weight gain [6]. On the genomic level, studies in pigs [7,8] and chicken [9–11] have identified single nucleotide polymorphisms of the gene encoding IGFBP-2 associated with altered growth and carcass weight, and the inclusion of the IGFBP-2 locus in selection programs has been discussed. The negative effect of IGFBP-2 on somatic growth seems evolutionary conserved and was provided in zebrafish characterized by a duplicated *IGFBP-2* gene [12]. Just recently, a negative correlation between hepatic IGFBP-2 expression and growth rates was also described in fish breeds [13]. Finally, in humans, higher concentrations of IGFBP-2 in serum were correlated with reduced muscle strength and reduced physical performance and overall with a higher degree of disability in elderly male subjects [14]. Due to markedly different IGFBP-2 effects [15] or concentrations [16] in males and females, IGFBP-2 was discussed as a mediator of sex differences [17]. In fact, IGFBP-2 is regulated not only by growth hormone [18] but to a significant extent also by sex steroids [19]. Under conditions of malignant growth, IGFBP-2 can increase estrogen receptor expression and the activity of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) as provided by Foulstone et al. [20], suggesting an intricate relationship between sex steroid effects and IGFBP-2. In the brain of IGFBP-2 transgenic female but not in male mice, protein kinase B (AKT) phosphorylation was elevated if compared to controls [21], suggesting sex-specific regulation of PI3K also *in vivo*. Therefore, the study of sex differences for the pleiotropic effects of IGFBP-2 [21] and as performed here for the IGFBP-2 effect on the level of muscle accretion is mandatory.

As a model for elevated muscle accretion in farm animals, we used the non-inbred DU6P mice, long-term selected for high protein amount [22,23]. We asked to which extent IGFBP-2 could block muscle accretion under conditions of high protein mass. Therefore, we crossed male DU6P mice with female IGFBP-2 transgenic mice [2].

2. Materials and Methods

2.1. Animal Production, Husbandry, and Tissue Sampling

Male mice from the non-inbred DU6P long-term selected mouse line were mated with female hemizygous IGFBP-2 transgenic mice [2] (C57BL/6; Figure 1). In IGFBP-2 transgenic mice, mouse IGFBP-2 is expressed under control of the cytomegalovirus (CMV) promoter in multiple tissues [2].

The study was approved by the National Animal Protection Board Mecklenburg-Vorpommern (file number: LALLF M-V/TSD/7221.3-1.2-037/06) and fully adhered to national and international laws. Offspring was standardized to ten animals (five male, five female) per litter immediately after birth and genotyped for the presence of the IGFBP-2 transgene in genomic DNA as described before [2]. Animals were kept at 12 h dark/12 h light cycles under conventional conditions and were fed with standard chow (Altromin 1314: protein, 22.5%; fat, 5%; raw fiber, 4.5%; ash, 6.5%; Altromin GmbH, Lage, Germany) and water *ad libitum*. Bodyweights were recorded at days 21, 35, and 49. At day 49,

animals were sacrificed, serum was collected, and tissues were weighed, frozen in liquid nitrogen, and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

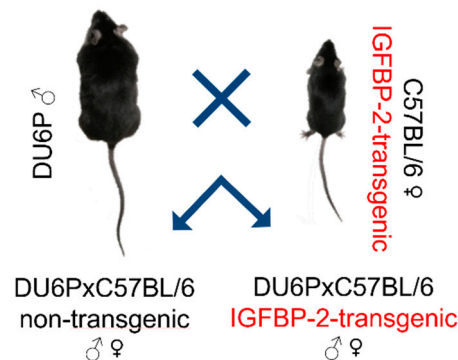


Figure 1. Breeding scheme: male mice selected for high protein mass (DU6P) were crossed with female hemizygous insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) transgenic mice (C57BL/6). Accordingly, the autosomal genetic background in the offspring was equally contributed by non-inbred DU6P mice and inbred C57BL/6 mice. Due to hemizyosity, the litters were composed of IGFBP-2 transgenic mice and non-transgenic controls.

2.2. Protein Analysis by Western Blot

Tissue samples were homogenized as described before [24] in lysis buffer (New England Biolabs, Frankfurt, Germany) supplemented with protease inhibitors (cOmplete™ Mini; Roche, Mannheim, Germany) using the Precellys®24 (Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Germany). Laemmli sample buffer containing beta-Mercaptoethanol was included, and samples were denatured at $94\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cell debris was separated by centrifugation ($10,000\times g$, 2 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) and 20–40 μg of protein from the samples were separated on 12% SDS-PAGE gels and transferred to carrier membranes (PVDF membrane, Millipore, Eschborn, Germany). Protein abundance and protein phosphorylation was investigated using specific antibodies also as described before (Table 1) [4].

Table 1. Antibodies used for the analysis of signal transduction in muscle tissue.

Antibody	Source
AKT	Cell Signaling (#9272)
Phospho-AKT (Ser473)	Cell Signaling (#4060)
p44/p42 MAPK (ERK1/2)	Cell Signaling (#4695)
Phospho-p44/p42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling (#4377)
IGFBP-2	Santa Cruz Biotech (#sc-6002)

2.3. Expression of Functional IGFBPs in Serum by Western Ligand Blotting

IGFBP-2, -3, and -4 were identified and quantitated by Western ligand blot (WLB) analysis using recombinant IGFBP standards as described previously [25]. In brief, all samples were denatured in sample buffer for 5 min. After gel separation (12% SDS-PAGE) and transfer to membranes (PVDF, Millipore, Bedford, MA, USA), all blots were incubated with the ligand (biotin-labeled human IGF-2, IBT-Systems, Binzwangen, Germany) and streptavidin-conjugated secondary antibodies (IBT-Systems, Binzwangen, Germany). Detection was achieved using enhanced chemiluminescence (Luminata™ Forte, Millipore, Bedford, MA, USA).

2.4. Measurement of IGF-1 and -2 in Tissue and Serum

Levels of IGF-1 and IGF-2 were assessed in muscle, liver, and serum by using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, Mediagnost, Germany) according to the manufacturer's instructions. Tissues were homogenized in buffer with Precellys Ceramics Kit (PepLab Biotechnologie, Erlangen, Germany), and calculated as ng IGF per mg protein.

2.5. Proteolytic Assay

Proteolytic activity against recombinant mouse IGFBP-2 (rmIGFBP-2) was assayed in serum samples derived from all experimental groups. Therefore, serum was dissolved in sterile PBS (1/10) and incubated at 39 °C in a thermoshaker (40 rpm) in the presence of 5 ng/μL rmIGFBP-2. As a control, proteolytic activity was assessed in artificial serum matrix (Biopanda, County Down, UK). Samples were taken at five consecutive time points (T = 0, 30, 90, 180, and 360 min) and mixed with an equal volume of 2-fold concentrated Laemmli buffer. IGFBP-2 was detected by WLB, as described above, but the signal intensities (AU) were expressed relative to the original signal intensity (relative quantification) at the start of the experiment (T0).

2.6. mRNA Expression of PAPP-As and STCs in Tissue

Total RNA from the liver was isolated and processed essentially as described before [24] with modifications as described here. The following primers were used: PAPP-A (pappalysin-1; [26]) forward 5'-TCCGCTCTTTCGACAACCTT-3', reverse 5'-CATGGTAGTGGTGGTTGCTGG-3'; PAPP-A2 (pappalysin-2; [27]) forward 5'-ATTAATAACCGGGCCTACTGCAAC-3', reverse 5'-GTCACAATCAGCAGCAAATGGAA-3'; STC1 (stanniocalcin 1; [26]) forward 5'-CCCAATCACTTC TCCAACAGA-3', reverse 5'-GAAGAGGCTGGCCATGTTG-3'; STC2 (stanniocalcin 2; [28]) forward 5'-GAAATCCAGGGTTTACATGG-3', reverse 5'-TCCTTGATGAATGACTTTCC-3'; housekeeping: Rpl19 (ribosomal protein L19) forward 5'-CAATGCCAACTCCCGTCAGC-3', reverse 5'-TCTTGGATTCCCGGTATCTC-3'; Pgk1 (phosphoglycerate kinase 1) forward 5'-CAGTCTAGAGCT CCTGGAAGGT-3', reverse 5'-GCCACTAGCTGAATCTTGCG-3'. The method of normalization was also described before [29].

2.7. Statistics

Analysis of body composition was achieved by the use of the SAS software package (version 9.3). For descriptive statistics and tests for normality, the procedure UNIVARIATE was applied. If the data were considered being normally distributed, the MIXED procedure (ANOVA) from the software package was applied. The analysis of variance considered sex (male and female) and genotype (non-transgenic, transgenic) as fixed factors. All other data were analyzed by one-way ANOVA (GraphPad Prism).

3. Results

3.1. Effect of IGFBP-2 Overexpression on Growth Parameters and Body Composition

At the age of 7 weeks, in male transgenic mice, a significant reduction of body weight by almost 12% ($p < 0.001$) was observed if compared to male non-transgenic littermates (Figure 2). In females, transgene expression resulted in no significant reduction of body weight compared to controls. The carcass weights were reduced by more than 20% in transgenic males ($p < 0.001$) and by almost 8% in transgenic females ($p < 0.05$).

The reductions of body and carcass weight were significantly stronger in male ($p < 0.001$) than in female transgenic mice. In isolated muscles, significant weight reductions were also present if transgenic mice were compared with sex-matched non-transgenic controls ($p < 0.01$). The inhibitory effects of transgene expression on body, carcass, and muscle weight were evident more clearly in

male than in female mice. Inhibitory effects of IGFBP-2 overexpression were further present on brain weight in both sexes ($p < 0.001$). Interestingly, in females, the expression of the IGFBP-2 transgene led to significantly elevated epididymal and perirenal fat mass ($p < 0.05$). Particularly, epididymal fat mass was increased by more than 40% in female transgenic mice ($p < 0.001$) when compared to non-transgenic controls.

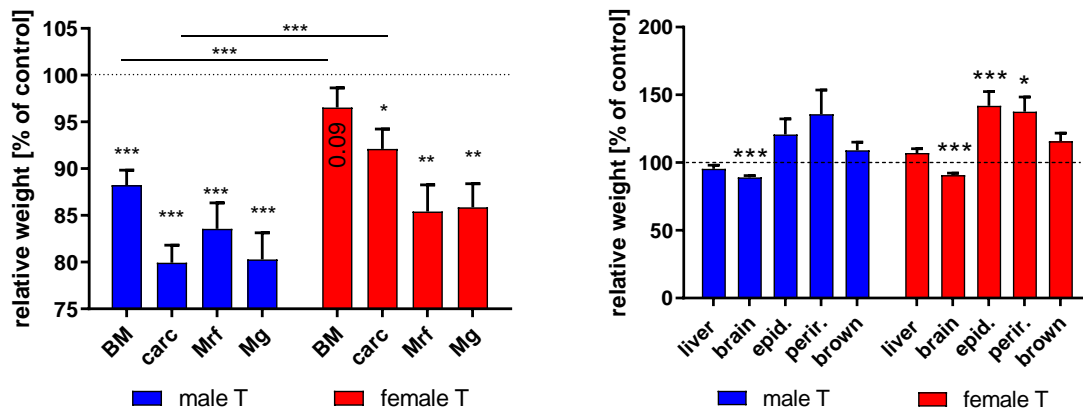


Figure 2. Body and organ weights in male and female IGFBP-2 transgenic mice (DU6P/C57BL/6) in percent of non-transgenic littermates at the age of 7 weeks (mean \pm SEM; $n = 14$ for each group; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; BM: body mass; carc: carcass mass; Mrf: mass of Musculus rectus femoris; Mg: mass of Musculus gastrocnemius; epid.: epididymal fat mass; perir.: perirenal fat mass; brown: brown fat mass).

3.2. Effects of IGFBP-2 Overexpression in Isolated Muscle

Since we had observed sex effects on the body and carcass weight of IGFBP-2 overexpression, we asked if the tissue levels of IGFBP-2 are different in males and females, or could be responsible for the specific weight reductions in male and female mice. However, as demonstrated by Western immunoblotting, intact IGFBP-2 was present in tissue extracts from both sexes (Figure 3).

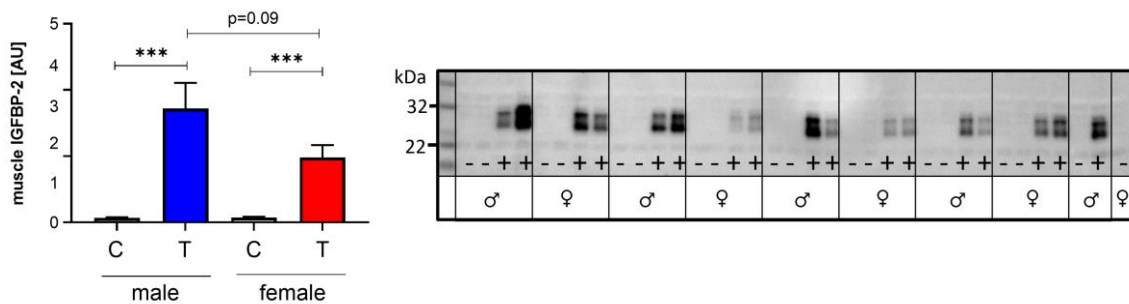


Figure 3. Expression of IGFBP-2 in muscle extracts from male (blue) and female (red) IGFBP-2 (T) and non-transgenic (C) littermates (DU6P/C57BL/6). Western immunoblotting was performed under reducing conditions. Immunoreactivity was present at two different molecular weights, which may represent IGFBP-2 with and without the C-terminal secretory signal peptide (mean \pm SEM; age: 7 weeks; $n = 9$ for each group; +: IGFBP-2 transgenic; -: non-transgenic control; ***: $p < 0.001$).

In samples from transgenic animals, an additional molecular weight form was present, characterized by higher molecular weight, which might be due to IGFBP-2 before cleavage of the leader sequence and thus intracellular IGFBP-2. The tissue levels of IGF-1 or IGF-2 were unaffected by the genotype and similar in muscle lysates from both sexes (Figure 4).

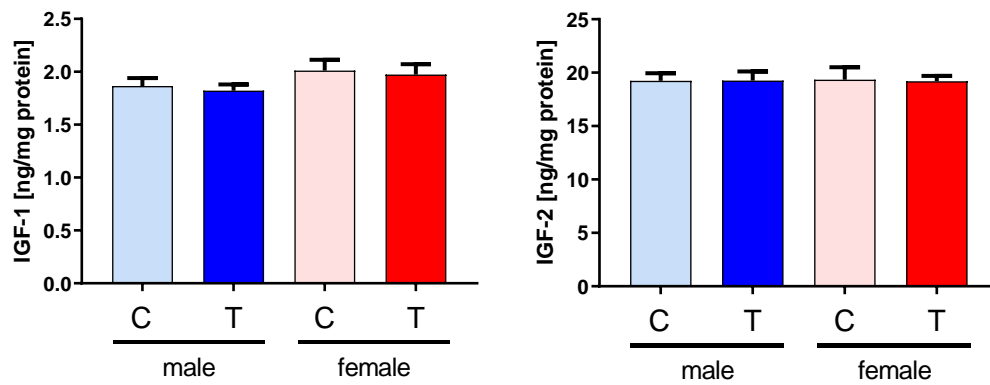


Figure 4. Concentrations of IGF-1 (left panel) and IGF-2 (right panel) in muscle extracts from male (blue) and female (red) IGFBP-2 transgenic (T) mice and non-transgenic (C) littermates (DU6P/C57BL/6). The concentrations of both peptide hormones were quantified by ELISAs as described in Section 2 (mean ± SEM; age: 7 weeks; $n = 10$).

However, analysis of signal transduction revealed sex effects in muscle lysates (Figure 5) since reduced levels of total AKT, but elevated levels of phospho-AKT were found in transgenic females ($p < 0.05$). By contrast, the ratio of phosphorylated versus total AKT was reduced in male transgenic mice ($p < 0.05$). In addition, the levels of total ERK1/2 were reduced in female transgenic mice only ($p < 0.01$).

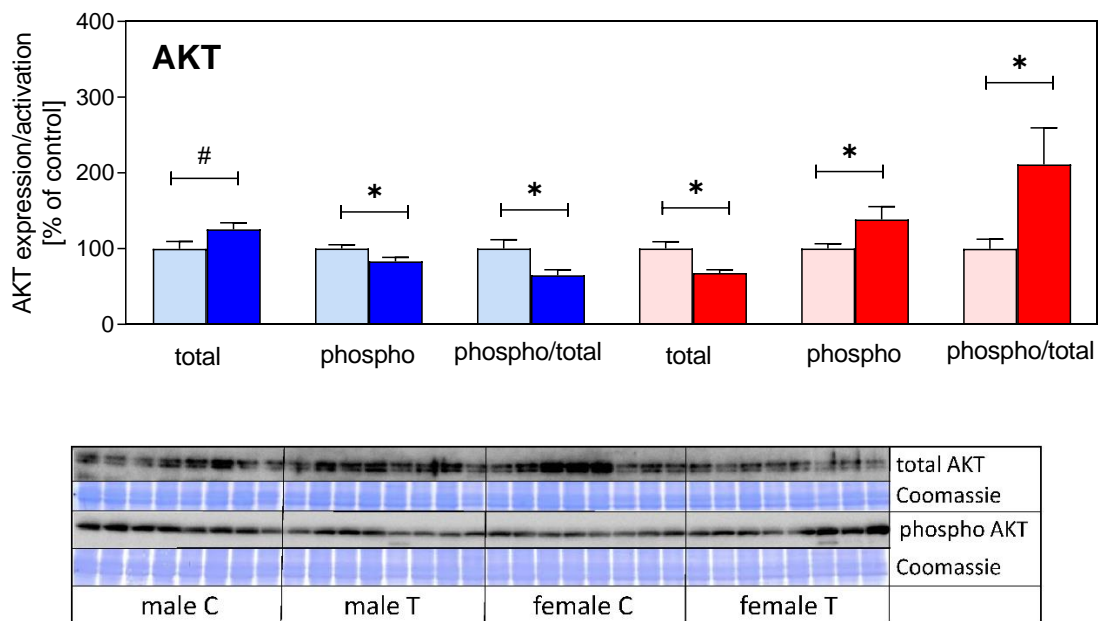


Figure 5. Cont.

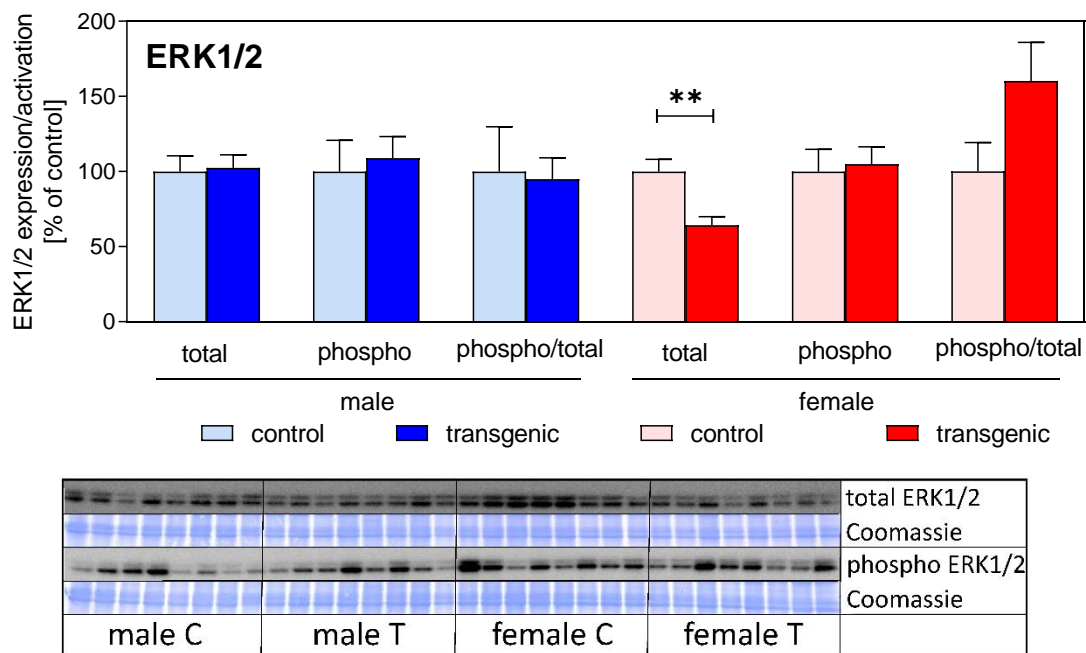


Figure 5. Protein expression (total), phosphorylation (phospho), and specific activity (phospho/total) of protein kinase B (AKT; upper panel) and extracellular regulated kinase (ERK1/2, lower panel) in muscle extracts from male (blue) and female (red) IGFBP-2 transgenic mice and non-transgenic littermates (DU6P/C57BL/6). Analysis of signal transduction was performed by Western immunoblotting as described in Section 2 (mean \pm SEM; age: 7 weeks; $n = 8$; #: $p < 0.1$; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$). The results from Western immunoblotting are provided both for AKT and ERK1/2. Coomassie blue staining was performed in order to demonstrate equal loading and protein transfer to the carrier membranes, respectively.

3.3. Effects of IGFBP-2 Transgene Expression in the Circulation

Since we could not identify different regulation of the IGF-system within the muscle, we assessed potential effects of IGFBP-2 transgene expression in the circulation. Surprisingly, IGFBP-2 was not elevated in male or female IGFBP-2 transgenic mice when compared to non-transgenic littermates (Figure 6). Instead, IGFBP-2 was reduced in male IGFBP-2 transgenic mice if compared to both male non-transgenic controls and female IGFBP-2 transgenic mice ($p < 0.01$). In addition, serum concentrations of IGFBP-3 and IGFBP-4 were lower in male IGFBP-2 transgenic mice than in non-transgenic or female transgenic littermates ($p < 0.05$). The reductions of IGFBP-2 in serum from female IGFBP-2 transgenic mice were not statistically significant ($p = 0.16$). However, increased amounts of IGFBP-2 fragments were observed in both transgenic IGFBP-2 groups with respect to non-transgenic littermates ($p < 0.05$; Figure 7). The levels of IGFBP-2 fragments in male IGFBP-2 transgenic mice were higher compared to female IGFBP-2 transgenic mice ($p < 0.05$). The severe reductions of IGFBPs in serum from male IGFBP-2 transgenic mice further correlated with substantial reductions of IGF-1 in the circulation if compared to non-transgenic male or female IGFBP-2 transgenic littermates ($p < 0.001$; Figure 8).

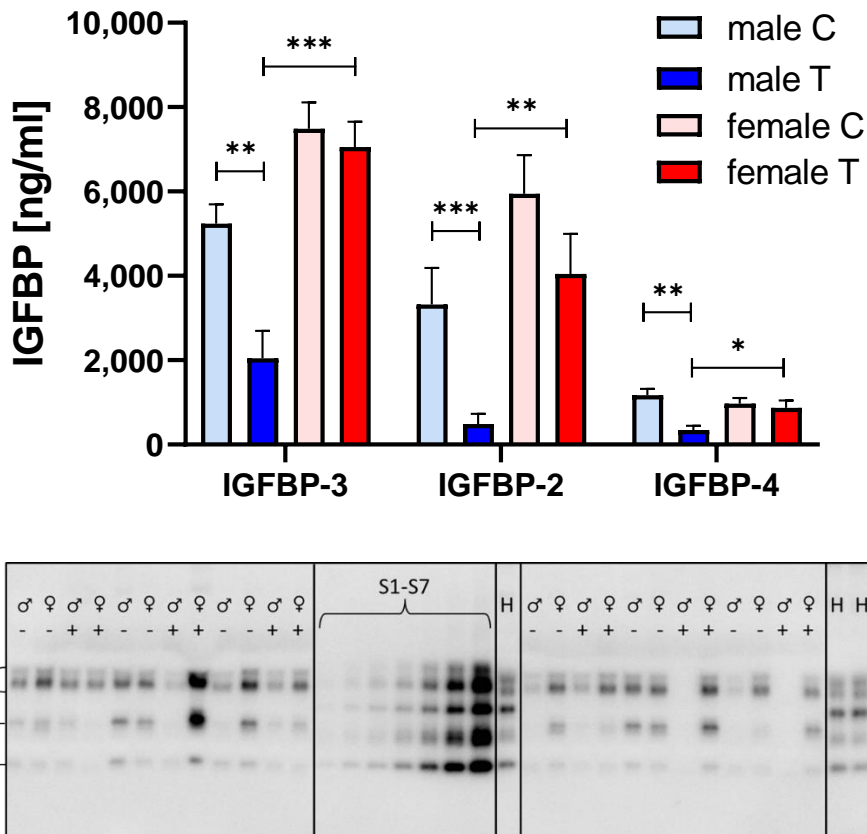


Figure 6. Concentrations of IGFBPs in serum from male (blue) and female (red) IGFBP-2 transgenic mice (T) and non-transgenic (C) littermates (DU6P/C57BL/6). Analysis was performed by quantitative Western ligand blotting (lower insert) as described in Section 2 (mean ± SEM; age: 7 weeks; $n > 10$; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; H: human control serum containing IGFBP-2 to -5; S1–S7: serial dilutions of human recombinant IGFBP-2 to -5 standards used for the quantification of IGFBPs on each blot).

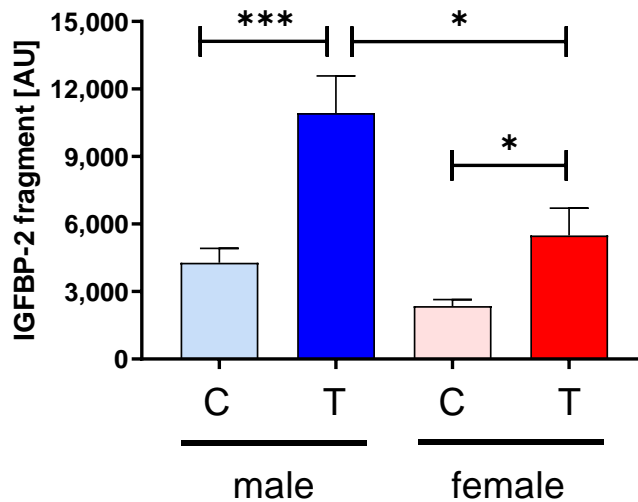


Figure 7. Relative quantification of IGFBP-2 fragments in serum from male (blue) and female (red) IGFBP-2 transgenic mice (T) and non-transgenic (C) littermates (DU6P/C57BL/6). Analysis was performed by Western immunoblotting as described in Section 2 (mean ± SEM; age 7 weeks; $n > 7$; *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$).

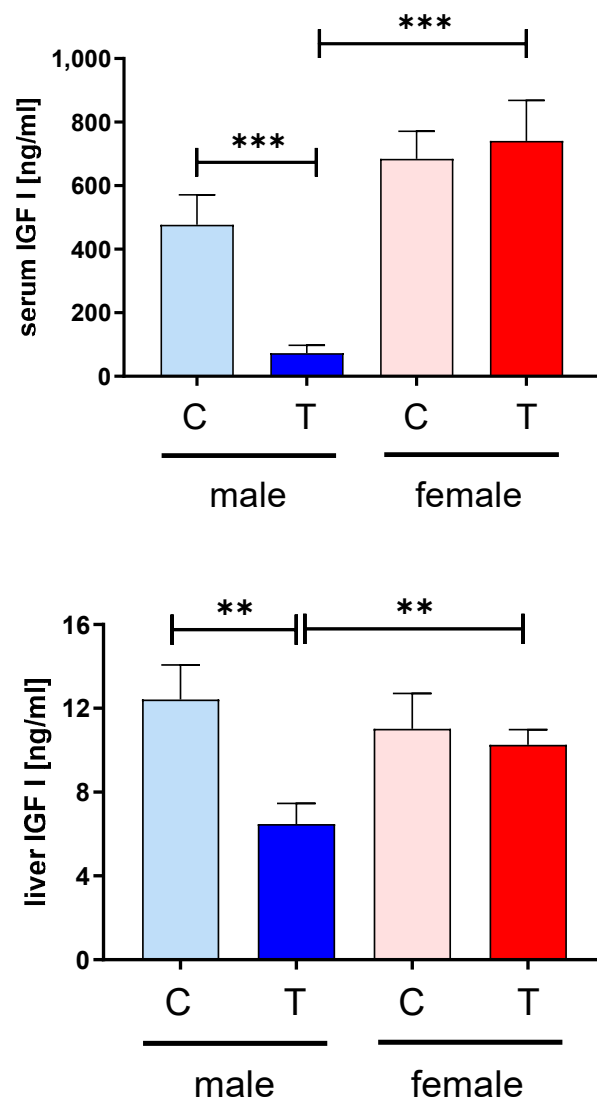


Figure 8. Concentrations of IGF-1 in serum (left panel) and the liver (right panel) from male (blue) and female (red) IGFBP-2 transgenic mice (T) and non-transgenic (C) littermates (DU6P/C57BL/6). Analysis was performed by ELISA as described in Section 2 (mean \pm SEM; age: 7 weeks; $n > 9$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

In contrast to male non-transgenic controls, the concentrations of IGF-1 in male transgenic IGFBP-2 mice were reduced by $\approx 85\%$. The reductions of IGF-1 in serum from male IGFBP-2 transgenic mice were further correlated with significant reductions of IGF-1 concentrations in the liver of the same group compared to male non-transgenic or female IGFBP-2 transgenic littermates (Figure 8; $p < 0.01$).

3.4. Proteolytic Activity in the Circulation

From the reductions of intact IGFFBPs and from the presence of high levels of IGFBP-2 fragments in serum, we had to assume sex-specific control of IGFBP-2 degradation in IGFBP-2 transgenic mice. In fact, if recombinant murine IGFBP-2 was incubated with diluted serum from male IGFBP-2 transgenic mice for 90, 180, or 360 min, intact IGFBP-2 was present at significantly lower levels compared to female IGFBP-2 transgenic or male non-transgenic littermates (Figure 9; $p < 0.05$).

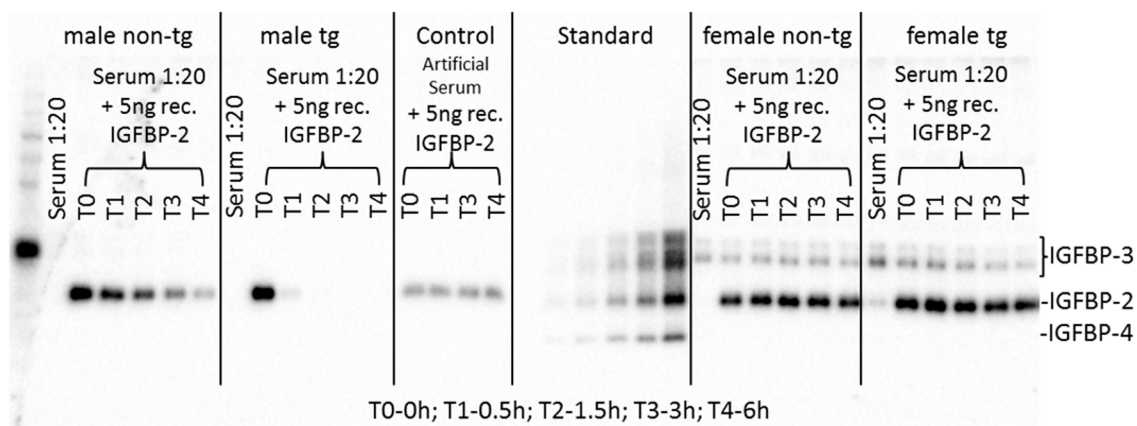
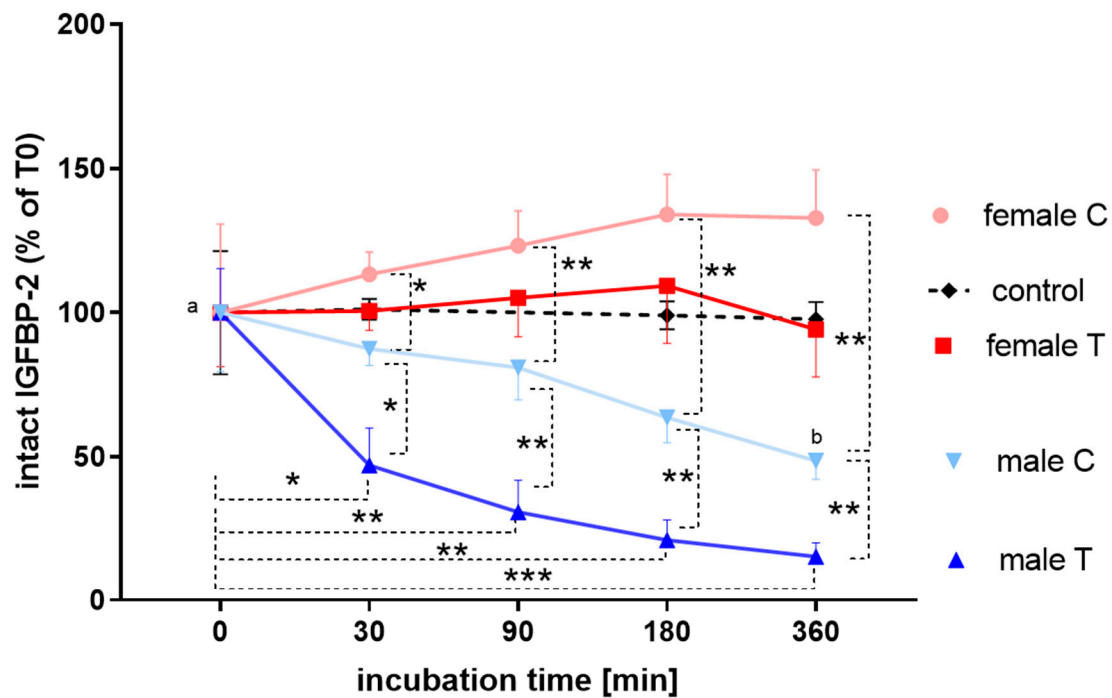


Figure 9. Stability of supplemented intact IGFBP-2 in serum from male (blue) and female (red) IGFBP-2 transgenic mice (T) and non-transgenic (C) littermates (DU6P/C57BL/6) as a function of incubation time at 37 °C. Diluted serum samples were supplemented with 5 ng murine recombinant IGFBP-2 for up to 360 min. The presence of intact IGFBP-2 was assessed by Western ligand blotting as described in Section 2 (mean ± SEM; age: 7 weeks; $n > 5$; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.001$; ***: $p < 0.001$; a versus b: significant reduction of intact IGFBP-2 also in non-transgenic male mice after 360 min). As a negative control, artificial serum matrix was supplemented with 5 ng murine recombinant IGFBP-2 for the indicated durations ($n = 3$).

Proteolytic activity was also observed in non-transgenic male mice, due to reductions of IGFBP-2 after 180 and 360 min of incubation in comparison to 30 min only ($p < 0.05$). In addition, if recombinant IGFBP-3, -4, or -5 was incubated with diluted sera from male IGFBP-2 transgenic mice, almost complete degradation was observed (data not shown).

3.5. Expression of IGFBP-2 Proteases and Stanniocalcins in Muscle

In order to address the expression of the IGFBP-proteolytic system in the muscle, we studied muscular mRNA expression of PAPP-A/A2 and stanniocalcins 1 and 2 (Figure 10). Expression of PAPPAs and STCs clearly followed a sex-specific pattern with elevated levels of PAPP-A, STC1,

and STC2 ($p < 0.001$) but reduced expression of PAPP-A2 in female mice of both genetic groups compared to male controls ($p < 0.05$). This approach could not demonstrate an effect of IGFBP-2 transgene expression on the proteolytic system in the muscle.

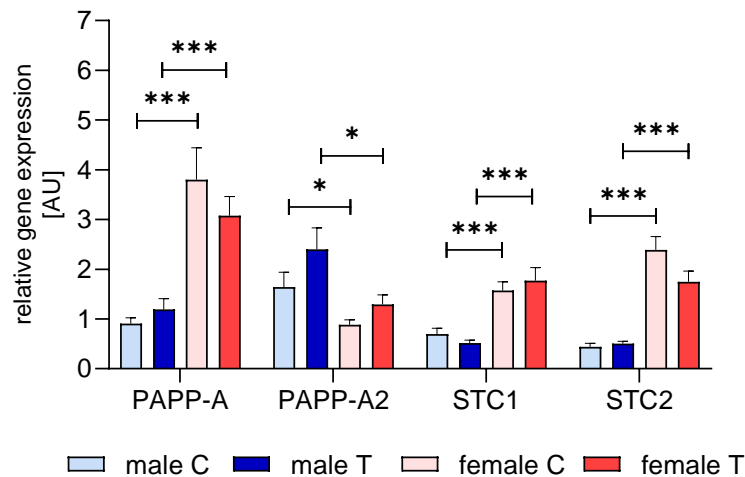


Figure 10. Gene expression of IGFBP-proteases (PAPP-A and PAPP-A2) and stanniocalcins (STC1 and STC2) in muscle from male (blue) and female (red) IGFBP-2 transgenic mice (T) and non-transgenic (C) littermates (DU6P/C57BL/6). The mRNA levels were assessed by quantitative real-time PCR and normalized for the expression of housekeeping genes as described in Section 2 (mean \pm SEM; age: 7 weeks; $n = 10$; *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$).

4. Discussion

In C57BL/6 inbred mice, we have demonstrated that IGFBP-2 is a potent inhibitor of carcass weight and muscle accretion [2,3]. Now we asked to which extent IGFBP-2 blocks muscle accretion under conditions of growth selection in mice. This question is particularly relevant for the estimation of the biomarker value of IGFBP-2 concentrations in serum from farmed animal species selected for meat production. Although, also in human subjects, IGFBP-2 is negatively associated with skeletal muscle mass, and it was speculated that IGFBP-2 might represent an indicator of musculoskeletal health and muscle strength [14,30].

In order to test specifically the effects of elevated IGFBP-2 expression on muscle mass, we crossed IGFBP-2 transgenic mice [2] with a non-inbred mouse model selected for high protein amount at the age of 42 days (DU6P). These animals are characterized by elevated muscle accretion and by a high growth phenotype [23,31]. The strategy to crossbreed a monogenetic inbred mouse model (IGFBP-2 transgenic mouse) with a non-inbred and phenotype-selected mouse model (DU6P) represents the combination of reverse genetics with classical genetics. This can be seen as a novel but certainly as an unusual approach of functional genome analysis in vivo.

The phenotype of the DU6P mouse model is based on multiple genetic events acquired or enriched during more than 135 cycles of selection (= generations) over more than 30 years at this time [32]. In fact, by this approach, we were able to demonstrate that overexpression of IGFBP-2 is capable of blocking up to 20% of carcass weight in a sex-specific manner since particularly male mice were highly sensitive to the inhibitory effects of IGFBP-2. The molecular mechanisms described here, in a functional context with growth inhibition, were, in part, surprisingly distinct from what we described in IGFBP-2 transgenic inbred mice [2].

Before we start with the description of specific differences in inbred mice (C57BL/6) and the model used here (DU6P/C57BL/6), we mention the parameters similarly affected in both models: first of all, overexpression of IGFBP-2 resulted in reduced somatic growth, both in inbred mice and non-inbred DU6P mice. Next, in both mouse models, carcass weight was identified as a sensitive parameter for

the inhibitory effects in response to forced expression of IGFBP-2 [2,33]. Additionally, the brain weight was reduced, whereas fat mass was increased in both models [21].

However, in inbred mice, transgenic expression under control of the CMV promoter resulted in significant increases of IGFBP-2 in the circulation [2]. This finding was not observed in the mouse model used here, in which neither males nor females showed an increase in IGFBP-2 in the circulation. Instead, endogenous IGFBP-2 levels appeared to be suppressed in serum to a substantial extent under conditions of elevated IGFBP-2 expression in male IGFBP-2 transgenic DU6P/C57BL/6 mice. Since this group was characterized by more than 20% reduced carcass mass, we may conclude from this observation that serum IGFBP-2 concentrations have to be interpreted with care. In fact, divergent selection in mice also could come to this conclusion [34] since intact IGFBP-2 was elevated in serum from two mouse lines selected for low body weight (BEL and ROL) but was normal in a third small mouse model (MUL) when compared to their respective groups selected for high weight. In a fourth mouse model also selected for low body weight (EDL), serum concentrations of IGFBP-2 were lower than in the respective divergently selected high weight mouse line (EDH; [34]).

Notably, not only the concentrations of intact IGFBP-2 were reduced, but also the concentrations of IGFBP-3 and -4 in the serum of male IGFBP-2 transgenic DU6P/C57BL/6 mice. The reductions of IGFbps in serum from male IGFBP-2 transgenic mice correlated with high proteolytic activity as provided by the degradation of intact IGFbps over time, on the one hand, and by the presence of IGFBP-2 fragments on the other. Here, we identified proteolytic activity against IGFbps in male DU6P/C57BL/6 mice but not in inbred C57BL/6 mice (data not shown). Although controversially discussed [28,35–39], there is substantial evidence for an effect of growth hormone on the stability of IGFbps in mice and men. Accordingly, in growth-selected mice (DU6P), characterized by elevated IGF-1 [40], elevated GH could impact on IGFBP-stability, whereas in C57BL/6 mice, with normal IGF-1 no such interference could be identified. An inhibitory effect of GH on the serum concentrations particularly of IGFBP-2 [41] is undisputed, and reduced IGFBP-2 concentrations in serum have been discussed even as biomarkers of GH-doping in athletes [18]. In addition to the effect of elevated GH, an effect of sex steroids may be involved on the control of IGFBP-stability, as demonstrated in hormone-replaced Turner patients [42]. Accordingly, future work will have to address the effects of GH and sex steroids on IGFBP-stability. A contribution of IGFBP-proteolysis was discussed [43] and demonstrated [44] for the control of somatic growth in mice and humans [45,46]. Remarkably, in hemofiltrate of human origin, 18 different fragments of IGFBP-2 were identified and characterized [47], revealing IGFBP2 fragmentation as a biologically diverse process with tremendous potential for biomarker research in the future. Additionally, in DU6P mice, we had discussed an active involvement of IGFBP-proteolysis for the acute regulation of somatic growth during the pubertal growth spurt and the regulation of IGF-bioactivity at peak growth periods before [40]. However, during the regulation of peak growth at the age of about four weeks, the reduction of IGFbps in the circulation did not correlate with the suppression of IGF-1, as described here in adult mice. Furthermore, at younger ages, we could not observe any effect of sex [40], which is clearly evident in the present study.

According to the current concept of the IGF-system [48–51], a proteolytic system is involved in the acute control of IGF-related normal and malignant growth. In this system, PAPP-A is the enzyme that cleaves IGFBP-4 and -5 [52] but also IGFBP-2 [50], whereas PAPP-A2 can proteolyze IGFBP-3 and 5 [53], in addition, also other enzymes are known to proteolyze IGFbps [54]. Since the concentrations of PAPP-A are higher in male than in female human subjects, a sex effect can be assumed for the proteolytic control of the IGF-system [55]. Based on the proteolytic degradation of recombinant IGFBP2 over time and the concentration of IGFBP-2 fragments in serum, we postulate higher levels of IGFBP-proteolysis in males if compared to females. As a potential mechanism for sex-related control of IGFBP-proteolysis in mice, we have no direct evidence so far for PAPP-A, which is known to cleave IGFBP-2 [56], because PAPP-A mRNA expression in muscle was higher in females than in males. The activity of PAPP-A and -A2 is regulated by stanniocalcins 1 and 2 (STC1 and STC2; [57,58]). Since in muscle, mRNA expression of both inhibitors was higher in females than in males, the lack of proteolytic

activity in serum from female mice might be related to sex-dependent differences of STC expression in muscle. However, to improve our understanding of the proteolytic degradation of IGFBPs, the role of age, sex, and expression of STCs or PAPP-As in tissues other than muscle must be addressed in future studies. STC2 has been demonstrated to coregulate signaling of AKT and ERK in colorectal cancer cells [59]. This finding also argues for a more detailed analysis of age- and sex-related STC or PAPP-A expression. Nevertheless, this finding adds a novel candidate for the control of signal transduction in our animal model, since phosphorylation of AKT was increased in muscle from female IGFBP-2 transgenic DU6P mice. Interestingly, sex-specific activation of AKT was demonstrated also in brain lysates from female but not from male IGFBP-2 transgenic mice compared to matched controls [21], indicating a more general effect of sex on IGFBP-2 dependent AKT phosphorylation in mice.

In response to forced expression of IGFBP-2 in DU6P mice, not only IGFBP-2 (transgenic and endogenous) but also other IGFBPs were proteolytically digested in male mice. Therefore, we may assume that in male mice, both PAPP-A and PAPP-A2 are active since IGFBP-2, -4, and -5 (cleaved by PAPP-A) and IGFBP-3 and -5 (cleaved by PAPP-A2) are degraded efficiently [56]. The reason for the more general reduction of IGFBPs in serum from male IGFBP-2 transgenic DU6P/C57BL/6 mice is unclear. However, as a consequence of excessive IGFBP-proteolysis and loss of most IGFBPs in the circulation of male IGFBP-2 transgenic mice, the IGF-binding capacity is severely reduced, potentially resulting in the substantial loss of IGF-1. Although at least part of the reductions of IGF-1 in male mice may also be due to reduced hepatic IGF-1 production since hepatic expression and secretion of IGF-1 represents a rich source of serum IGF-1 [60]. Accordingly, the negative effects of IGFBP-2 overexpression on carcass and muscle mass could be related to reduced IGF-1 concentrations in serum (systemic effect) and/or increased levels of intact IGFBP-2 in muscle tissues (local effect). On the tissue level, in muscle from male and female IGFBP-2 transgenic DU6P mice, intact IGFBP-2 was substantially increased compared to non-transgenic littermates. Since the levels of intact IGFBP-2 in muscles of male IGFBP-2-transgenic DU6P mice were higher, although not significant, compared to female IGFBP-2-transgenic littermates, we cannot exclude that the more significant reductions in carcass weights in males might also be related to altered local muscular transgene expression.

From our data, we conclude that elevated expression of IGFBP-2 efficiently impairs muscle accretion also under conditions of elevated protein accretion. In absolute terms, the expression of the transgenic IGFBP-2 in male DU6P/C57BL/6 mice resulted in a reduction of carcass weight as well as isolated muscle by more than 20%. However, the inhibitory effects of IGFBP-2 on muscle or carcass weight were not reflected by elevated concentrations of intact IGFBP-2 in the circulation, neither in males nor females. Only in males, weight reductions correlated with substantial reductions of IGFBP-2 together with IGF-1, IGFBP-3, and IGFBP-4 in serum and with significant IGFBP-proteolysis. Our study reveals biomarker potential of IGFBP-2 fragments for carcass weight in males and may recommend the inclusion of IGFBP-proteolysis in the biomarker panels of breeding programs designed for farm animal selection. If the loss of muscle mass in human subjects is monitored, the proteolysis of IGFBPs can also represent a novel content of biomarker information. Our results may have implications for IGFBP-biomarker research in vertebrates [6–11] since circulating concentrations of IGFBP-2 or other IGFBPs may not as a rule be interpreted in only one direction and clearly have a sex-related physiological background.

Author Contributions: Conceptualization, A.H.; methodology, D.O., M.W., C.W.; software, D.O. and C.W.; validation, A.N., J.B., M.L., and A.H.; formal analysis, D.O., M.W., C.W., and A.H.; investigation, D.O., M.W. and C.W.; resources, M.L. and A.H.; data curation, D.O., C.W., M.L., and A.H.; writing—original draft preparation, D.O. and A.H.; writing—review and editing, all authors; supervision, C.W., M.L. and A.H.; project administration, A.H.; funding acquisition, A.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Wilhelm Schaumann Stiftung.

Acknowledgments: The publication of this article was funded by the Open Access Fund of the Leibniz Association and the Open Access Fund of the Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN). Luong Chau and the staff of the Lab Animal Facility are thanked for excellent technical support and animal care, respectively.

Conflicts of Interest: A.H. declares relations to Ligandis. All other authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Hoeflich, A.; Schmidt, P.; Föll, J.; Rottmann, O.; Weber, M.M.; Kolb, H.J.; Pirchner, F.; Wolf, E. Altered Growth of Mice Divergently Selected for Body Weight Is Associated with Complex Changes in the Growth Hormone/Insulin-Like Growth Factor System. *Growth Horm IGF Res.* **1998**, *8*, 113–123. [[CrossRef](#)]
2. Hoeflich, A.; Wu, M.; Mohan, S.; Föll, J.; Wanke, R.; Froehlich, T.; Arnold, G.J.; Lahm, H.; Kolb, H.J.; Wolf, E. Overexpression of Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-2 in Transgenic Mice Reduces Postnatal Body Weight Gain. *Endocrinology* **1999**, *140*, 5488–5496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Hoeflich, A.; Nedbal, S.; Blum, W.F.; Erhard, M.; Lahm, H.; Brem, G.; Kolb, H.J.; Wanke, R.; Wolf, E. Growth Inhibition in Giant Growth Hormone Transgenic Mice by Overexpression of Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-2. *Endocrinology* **2001**, *142*, 1889–1898. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Rehfeldt, C.; Renne, U.; Sawitzky, M.; Binder, G.; Hoeflich, A. Increased Fat Mass, Decreased Myofiber Size, and a Shift to Glycolytic Muscle Metabolism in Adolescent Male Transgenic Mice Overexpressing Igfbp-2. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2010**, *299*, E287–E298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Swiderski, K.; Martins, K.J.; Chee, A.; Trieu, J.; Naim, T.; Gehrig, S.M.; Baum, D.M.; Brenmoehl, J.; Chau, L.; Koopman, R.; et al. Skeletal Muscle-Specific Overexpression of Igfbp-2 Promotes a Slower Muscle Phenotype in Healthy but Not Dystrophic Mdx Mice and Does Not Affect the Dystrophic Pathology. *Growth Horm IGF Res.* **2016**, *30–31*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Connor, E.E.; Barao, S.M.; Kimrey, A.S.; Parlier, A.B.; Douglass, L.W.; Dahl, G.E. Predicting Growth in Angus Bulls: The Use of Ghrh Challenge, Insulin-Like Growth Factor-I, and Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins. *J. Anim. Sci.* **2000**, *78*, 2913–2918. [[CrossRef](#)]
7. Prasongsook, S.; Choi, I.; Bates, R.O.; Raney, N.E.; Ernst, C.W.; Tumwasorn, S. Association of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 2 Genotypes with Growth, Carcass and Meat Quality Traits in Pigs. *J. Anim. Sci. Technol.* **2015**, *57*, 31. [[CrossRef](#)]
8. Wang, W.; Meng, Q.; Hu, X.; Fei, J.; Feng, J.; Liu, W.; Li, N. Chromosome Location and Association of Haplotypes of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2 with Production Performance in Swine. *Biochem. Genet.* **2008**, *46*, 381–391. [[CrossRef](#)]
9. Lei, M.M.; Nie, Q.H.; Peng, X.; Zhang, D.X.; Zhang, X.Q. Single Nucleotide Polymorphisms of the Chicken Insulin-Like Factor Binding Protein 2 Gene Associated with Chicken Growth and Carcass Traits. *Poult. Sci.* **2005**, *84*, 1191–1198. [[CrossRef](#)]
10. Li, Z.H.; Li, H.; Zhang, H.; Wang, S.Z.; Wang, Q.G.; Wang, Y.X. Identification of a Single Nucleotide Polymorphism of the Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 2 Gene and Its Association with Growth and Body Composition Traits in the Chicken. *J. Anim. Sci.* **2006**, *84*, 2902–2906. [[CrossRef](#)]
11. Szalai, K.; Tempfli, K.; Lencsés-Varga, E.; Bali Papp, Á. Genotyping of Four Loci in Hungarian Yellow and Broiler Chickens. *Acta Vet. Hung.* **2019**, *67*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Zhou, J.; Li, W.; Kamei, H.; Duan, C. Duplication of the Igfbp-2 Gene in Teleost Fish: Protein Structure and Functionality Conservation and Gene Expression Divergence. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3926. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Zhang, X.; Zhang, Z.; Yu, Z.; Li, J.; Chen, S.; Sun, R.; Jia, C.; Zhu, F.; Meng, Q.; Xu, S. Molecular Cloning and Expression Pattern of Igfbp-2a in Black Porgy (*Acanthopagrus Schlegelii*) and Evolutionary Analysis of Igfbp-2s in the Species of Perciformes. *Fish. Physiol. Biochem.* **2019**, *45*, 1731–1745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Van den Beld, A.W.; Blum, W.F.; Pols, H.A.; Grobbee, D.E.; Lamberts, S.W. Serum Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2 Levels as an Indicator of Functional Ability in Elderly Men. *Eur. J. Endocrinol.* **2003**, *148*, 627–634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. DeMambro, V.E.; Clemmons, D.R.; Horton, L.G.; Bouxsein, M.L.; Wood, T.L.; Beamer, W.G.; Canalis, E.; Rosen, C.J. Gender-Specific Changes in Bone Turnover and Skeletal Architecture in Igfbp-2-Null Mice. *Endocrinology* **2008**, *149*, 2051–2061. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Govoni, K.E.; Goodman, D.; Maclure, R.M.; Penfold, L.M.; Zinn, S.A. Serum Concentrations of Insulin-Like Growth Factor-I and Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2 and -3 in Eight Hoofstock Species. *Zoo Biol.* **2011**, *30*, 275–284. [[CrossRef](#)]
17. Khosla, S. Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2: A Novel Regulator of Skeletal Gender Differences? *Endocrinology* **2008**, *149*, 2048–2050. [[CrossRef](#)]
18. Kicman, A.T.; Miell, J.P.; Teale, J.D.; Powrie, J.; Wood, P.J.; Laidler, P.; Milligan, P.J.; Cowan, D.A. Serum Igf-I and Igf Binding Proteins 2 and 3 as Potential Markers of Doping with Human Gh. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **1997**, *47*, 43–50. [[CrossRef](#)]
19. Hoeflich, A.; Wirthgen, E.; David, R.; Classen, C.F.; Spitschak, M.; Brenmoehl, J. Control of Igfbp-2 Expression by Steroids and Peptide Hormones in Vertebrates. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2014**, *5*, 43. [[CrossRef](#)]
20. Foulstone, E.J.; Zeng, L.; Perks, C.M.; Holly, J.M. Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 2 (Igfbp-2) Promotes Growth and Survival of Breast Epithelial Cells: Novel Regulation of the Estrogen Receptor. *Endocrinology* **2013**, *154*, 1780–1793. [[CrossRef](#)]
21. Hoeflich, A.; Reyer, A.; Ohde, D.; Schindler, N.; Brenmoehl, J.; Spitschak, M.; Langhammer, M.; Tuchscherer, A.; Wirthgen, E.; Renner-Müller, I.; et al. Dissociation of Somatic Growth, Time of Sexual Maturity, and Life Expectancy by Overexpression of an Rgd-Deficient Igfbp-2 Variant in Female Transgenic Mice. *Aging Cell* **2016**, *15*, 111–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Bünge, L.; Renne, U.; Diel, G.; Kuhla, S. Long-Term Selection for Protein Amount over 70 Generations in Mice. *Genet. Res.* **1998**, *72*, 93–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Bünge, L.; Laidlaw, A.; Bulfield, G.; Eisen, E.J.; Medrano, J.F.; Bradford, G.E.; Pirchner, F.; Renne, U.; Schlote, W.; Hill, W.G. Inbred Lines of Mice Derived from Long-Term Growth Selected Lines: Unique Resources for Mapping Growth Genes. *Mamm. Genome.* **2001**, *12*, 678–686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ohde, D.; Brenmoehl, J.; Walz, C.; Tuchscherer, A.; Wirthgen, E.; Hoeflich, A. Comparative Analysis of Hepatic Mirna Levels in Male Marathon Mice Reveals a Link between Obesity and Endurance Exercise Capacities. *J. Comp. Physiol. B* **2016**, *186*, 1067–1078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Wirthgen, E.; Höflich, C.; Spitschak, M.; Helmer, C.; Brand, B.; Langbein, J.; Metzger, F.; Hoeflich, A. Quantitative Western Ligand Blotting Reveals Common Patterns and Differential Features of Igfbp-Fingerprints in Domestic Ruminant Breeds and Species. *Growth Horm. IGF Res.* **2016**, *26*, 42–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Takabatake, Y.; Oxvig, C.; Nagi, C.; Adelson, K.; Jaffer, S.; Schmidt, H.; Keely, P.J.; Eliceiri, K.W.; Mandeli, J.; Germain, D. Lactation Opposes Pappalysin-1-Driven Pregnancy-Associated Breast Cancer. *EMBO Mol. Med.* **2016**, *8*, 388–406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Chen, Y.; Li, L.; Wang, E.; Zhang, L.; Zhao, Q. Abnormal Expression of Pappa2 Gene May Indirectly Affect Mouse Hip Development through the Igf Signaling Pathway. *Endocrine* **2019**, *65*, 440–450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Hjortebjerg, R.; Berryman, D.E.; Comisford, R.; List, E.O.; Oxvig, C.; Bjerre, M.; Frystyk, J.; Kopchick, J.J. Depot-Specific and Gh-Dependent Regulation of Igf Binding Protein-4, Pregnancy-Associated Plasma Protein-a, and Stanniocalcin-2 in Murine Adipose Tissue. *Growth Horm. IGF Res.* **2018**, *39*, 54–61. [[CrossRef](#)]
29. Ballester, M.; Cordon, R.; Folch, J.M. Dag Expression: High-Throughput Gene Expression Analysis of Real-Time Pcr Data Using Standard Curves for Relative Quantification. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e80385. [[CrossRef](#)]
30. Lebrasseur, N.K.; Achenbach, S.J.; Melton, L.J., 3rd; Amin, S.; Khosla, S. Skeletal Muscle Mass Is Associated with Bone Geometry and Microstructure and Serum Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2 Levels in Adult Women and Men. *J. Bone Miner. Res.* **2012**, *27*, 2159–2169. [[CrossRef](#)]
31. Bünge, L.; Remus, N.; Roschlau, D. Selection for Different Growth Parameters in Laboratory Mice and Its Correlated Effects on Body Composition and Organ Weights. *Nahrung* **1985**, *29*, 549–560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Sawitzky, M.; Zeissler, A.; Langhammer, M.; Bielohuby, M.; Stock, P.; Hammon, H.M.; Görs, S.; Metges, C.C.; Stoehr, B.J.M.; Bidlingmaier, M.; et al. Phenotype Selection Reveals Coevolution of Muscle Glycogen and Protein and Pten as a Gate Keeper for the Accretion of Muscle Mass in Adult Female Mice. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e39711. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Hoeflich, A.; Reisinger, R.; Vargas, G.A.; Elmlinger, M.W.; Schuett, B.; Jehle, P.M.; Renner-Müller, I.; Lahm, H.; Russo, V.C.; Wolf, E. Mutation of the RGD sequence does not affect plasma membrane association and growth inhibitory effects of elevated IGFBP-2 in vivo. *FEBS Lett.* **2002**, *523*, 63–67. [[CrossRef](#)]

34. Hoeflich, A.; Bünger, L.; Nedbal, S.; Renne, U.; Elmlinger, M.W.; Blum, W.F.; Bruley, C.; Kolb, H.J.; Wolf, E. Growth Selection in Mice Reveals Conserved and Redundant Expression Patterns of the Insulin-Like Growth Factor System. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2004**, *136*, 248–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Rutishauser, J.; Schmid, C.; Hauri, C.; Froesch, E.R.; Zapf, J. Growth Hormone, but Not Insulin-Like Growth Factor I, Induces a Serum Protease Activity for Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 in Hypophysectomized Rats in Vivo. *FEBS Lett.* **1993**, *334*, 23–26. [[CrossRef](#)]
36. Nwosu, B.U.; Soyka, L.A.; Angelescu, A.; Lee, M.M. Evidence of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 Proteolysis During Growth Hormone Stimulation Testing. *J. Pediatr Endocrinol Metab.* **2011**, *24*, 163–167. [[CrossRef](#)]
37. Koedam, J.A.; Hoogerbrugge, C.M.; van Buul-Offers, S.C. Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-3 Protease Activity in Snell Normal and Pit-1 Deficient Dwarf Mice. *J. Endocrinol.* **1998**, *157*, 295–303. [[CrossRef](#)]
38. Yamada, M.; Hasegawa, T.; Hasegawa, Y. Absence of Proteolysis of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 in Serum from Patients with Growth Hormone Deficiency. *Endocr J.* **1999**, *46*, 717–722. [[CrossRef](#)]
39. Skjaerbaek, C.; Kaal, A.; Møller, J.; Vahl, N.; Weeke, J.; Ørskov, H.; Flyvbjerg, A. No Effect of Growth Hormone on Serum Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 Proteolysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1998**, *83*, 1206–1210. [[CrossRef](#)]
40. Walz, M.; Chau, L.; Walz, C.; Sawitzky, M.; Ohde, D.; Brenmoehl, J.; Tuchscherer, A.; Langhammer, M.; Metzger, F.; Höflich, C.; et al. Overlap of Peak Growth Activity and Peak Igf-1 to Igfbp Ratio: Delayed Increase of IGFBPs Versus IGF-1 in Serum as a Mechanism to Speed up and Down Postnatal Weight Gain in Mice. *Cells* **2020**, *9*, 1516. [[CrossRef](#)]
41. Coschigano, K.T.; Holland, A.N.; Riders, M.E.; List, E.O.; Flyvbjerg, A.; Kopchick, J.J. Deletion, but Not Antagonism, of the Mouse Growth Hormone Receptor Results in Severely Decreased Body Weights, Insulin, and Insulin-Like Growth Factor I Levels and Increased Life Span. *Endocrinology* **2003**, *144*, 3799–3810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Gravholt, C.H.; Chen, J.W.; Oxvig, C.; Overgaard, M.T.; Christiansen, J.S.; Frystyk, J.; Flyvbjerg, A. The Gh-Igf-Igfbp Axis Is Changed in Turner Syndrome: Partial Normalization by Hrt. *Growth Horm. IGF Res.* **2006**, *16*, 332–339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Christians, J.K.; Hoeflich, A.; Keightley, P.D. Pappa2, an Enzyme That Cleaves an Insulin-Like Growth-Factor-Binding Protein, Is a Candidate Gene for a Quantitative Trait Locus Affecting Body Size in Mice. *Genetics* **2006**, *173*, 1547–1553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Conover, C.A.; Bale, L.K.; Overgaard, M.T.; Johnstone, E.W.; Laursen, U.H.; Füchtbauer, E.-M.; Oxvig, C.; van Deursen, J. Metalloproteinase Pregnancy-Associated Plasma Protein a Is a Critical Growth Regulatory Factor During Fetal Development. *Development* **2004**, *131*, 1187–1194. [[CrossRef](#)]
45. Marouli, E.; Graff, M.; Medina-Gomez, C.; Lo, K.S.; Wood, A.R.; Kjaer, T.R.; Fine, R.S.; Lu, Y.; Schurmann, C.; Highland, H.M.; et al. Rare and Low-Frequency Coding Variants Alter Human Adult Height. *Nature* **2017**, *542*, 186–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Fujimoto, M.; Khoury, J.C.; Khoury, P.R.; Kalra, B.; Kumar, A.; Sluss, P.; Oxvig, C.; Hwa, V.; Dauber, A. Anthropometric and Biochemical Correlates of Papp-A2, Free Igf-I, and Igfbp-3 in Childhood. *Eur. J. Endocrinol.* **2020**, *182*, 363–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Mark, S.; Kübler, B.; Höning, S.; Oesterreicher, S.; John, H.; Bräulke, T.; Forssmann, W.; Ständker, L. Diversity of Human Insulin-Like Growth Factor (Igf) Binding Protein-2 Fragments in Plasma: Primary Structure, Igf-Binding Properties, and Disulfide Bonding Pattern. *Biochemistry* **2005**, *44*, 3644–3652. [[CrossRef](#)]
48. Argente, J.; Chowen, J.A.; Pérez-Jurado, L.A.; Frystyk, J.; Oxvig, C. One Level Up: Abnormal Proteolytic Regulation of Igf Activity Plays a Role in Human Pathophysiology. *EMBO Mol. Med.* **2017**, *9*, 1338–1345. [[CrossRef](#)]
49. Conover, C.A.; Oxvig, C. Papp-a and Cancer. *J. Mol. Endocrinol.* **2018**, *61*, T1–T10. [[CrossRef](#)]
50. Monget, P.; Mazerbourg, S.; Delpuech, T.; Maurel, M.C.; Manière, S.; Zapf, J.; Lalmanach, G.; Oxvig, C.; Overgaard, M.T. Pregnancy-Associated Plasma Protein-a Is Involved in Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2 (Igfbp-2) Proteolytic Degradation in Bovine and Porcine Preovulatory Follicles: Identification of Cleavage Site and Characterization of Igfbp-2 Degradation. *Biol. Reprod.* **2003**, *68*, 77–86. [[CrossRef](#)]
51. Monget, P.; Oxvig, C. Papp-a and the Igf System. *Ann. Endocrinol. (Paris)* **2016**, *77*, 90–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

52. Laursen, L.S.; Overgaard, M.T.; S e, R.; Boldt, H.B.; Sottrup-Jensen, L.; Giudice, L.C.; Conover, C.A.; Oxvig, C. Pregnancy-Associated Plasma Protein-a (Papp-a) Cleaves Insulin-Like Growth Factor Binding Protein (Igfbp)-5 Independent of Igf: Implications for the Mechanism of Igfbp-4 Proteolysis by Papp-A. *FEBS Lett.* **2001**, *504*, 36–40. [[CrossRef](#)]
53. Overgaard, M.T.; Boldt, H.B.; Laursen, L.S.; Sottrup-Jensen, L.; Conover, C.A.; Oxvig, C. Pregnancy-Associated Plasma Protein-A2 (Papp-A2), a Novel Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-5 Proteinase. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 21849–21853. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Bunn, R.C.; Fowlkes, J.L. Insulin-Like Growth Factor Binding Protein Proteolysis. *Trends Endocrinol. Metab.* **2003**, *14*, 176–181. [[CrossRef](#)]
55. Joaquín, C.; Granada, M.L.; Pastor, C.; Castell, C.; Puig, R.; N ria, A.; Serra, E.; Sanmart , A.; Foz, M.; Puig-Domingo, M. Pregnancy-Associated Plasma Protein-a Is Related to Gender and to Adipocytokine Levels: Results of the Health Survey of Catalonia. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **2013**, *78*, 718–723.
56. Oxvig, C. The Role of Papp-a in the Igf System: Location, Location, Location. *J. Cell Commun. Signal.* **2015**, *9*, 177–187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Jepsen, M.R.; Kløverpris, S.; Mikkelsen, J.H.; Pedersen, J.H.; Füchtbauer, E.-M.; Laursen, L.S.; Oxvig, C. Stanniocalcin-2 Inhibits Mammalian Growth by Proteolytic Inhibition of the Insulin-Like Growth Factor Axis. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 3430–3439. [[CrossRef](#)]
58. Kløverpris, S.; Mikkelsen, J.H.; Pedersen, J.H.; Jepsen, M.R.; Laursen, L.S.; Petersen, S.V.; Oxvig, C. Stanniocalcin-1 Potently Inhibits the Proteolytic Activity of the Metalloproteinase Pregnancy-Associated Plasma Protein-A. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 21915–21924.
59. Chen, B.; Zeng, X.; He, Y.; Wang, X.; Liang, Z.; Liu, J.; Zhang, P.; Zhu, H.; Xu, N.; Liang, S. Stc2 Promotes the Epithelial-Mesenchymal Transition of Colorectal Cancer Cells through Akt-Erk Signaling Pathways. *Oncotarget* **2016**, *7*, 71400–71416. [[CrossRef](#)]
60. Yakar, S.; Liu, J.L.; Fernandez, A.M.; Wu, Y.; Schally, A.V.; Frystyk, J.; Chernausek, S.D.; Mejia, W.; Le Roith, D. Liver-Specific Igf-1 Gene Deletion Leads to Muscle Insulin Insensitivity. *Diabetes* **2001**, *50*, 1110–1118. [[CrossRef](#)]



  2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

2.3. Development of a sensitive bioassay for the analysis of IGF-related activation of AKT/mTOR signalling by biological matrices

Michael Walz, Christine Höflich, Christina Walz, Daniela Ohde, Julia Brenmoehl, Mandy Sawitzky, Andreas Vernunft, Uwe K. Zettl, Susanne Holtze, Thomas B. Hildebrandt, Eckhard Wolf, Andreas Hoeflich

Cells 2021, 10, 482. <https://doi.org/10.3390/cells10030482>

Michael Walz war in der Planung und Vorbereitung der Versuche beteiligt, führte die Experimente durch und die Auswertung der Daten. Michael Walz war zudem an dem Schreiben der Publikation beteiligt.

Article

Development of a Sensitive Bioassay for the Analysis of IGF-Related Activation of AKT/mTOR Signaling in Biological Matrices

Michael Walz ¹, Christine Höflich ², Christina Walz ¹, Daniela Ohde ¹, Julia Brenmoehl ¹, Mandy Sawitzky ¹, Andreas Vernunft ³, Uwe K. Zettl ⁴, Susanne Holtze ⁵, Thomas B. Hildebrandt ⁵, Eckhard Wolf ⁶ and Andreas Hoeflich ^{1,*}

- ¹ Institute of Genome Biology, Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Wilhelm-Stahl Allee 2, 18196 Dummerstorf, Germany; walz.michael@fbn-dummerstorf.de (M.W.); walz@fbn-dummerstorf.de (C.W.); ohde@fbn-dummerstorf.de (D.O.); brenmoehl@fbn-dummerstorf.de (J.B.); mandysawitzky@gmx.de (M.S.)
 - ² Ligandis Biomarker Diagnostics, Dorfstr. 14, 18276 Gülzow-Prüzen, Germany; christine.hoeflich@ligandis.de
 - ³ Institute of Reproductive Biology, Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Wilhelm-Stahl Allee 2, 18196 Dummerstorf, Germany; vernunft@fbn-dummerstorf.de
 - ⁴ Department of Neurology, Neuroimmunological Section, University Medicine Rostock, Gehlsheimer Str. 20, 18147 Rostock, Germany; uwe.zettl@med.uni-rostock.de
 - ⁵ Department of Reproduction Management, Leibniz-Institute for Zoo and Wildlife Research, Alfred-Kowalke-Str. 17, 10315 Berlin, Germany; holtze@izw-berlin.de (S.H.); hildebrandt@izw-berlin.de (T.B.H.)
 - ⁶ Chair of Molecular Animal Breeding and Biotechnology and Laboratory for Functional Genome Analysis (LAFUGA), Gene Center, LMU Munich, Feodor-Lynen-Str. 25, 81377 Munich, Germany; ewolf@genzentrum.lmu.de
- * Correspondence: hoeflich@fbn-dummerstorf.de; Tel.: +49-(0)-38208-68-744; Fax: +49-(0)-38208-68-702

Citation: Walz, M.; Höflich, C.; Walz, C.; Ohde, D.; Brenmoehl, J.; Sawitzky, M.; Vernunft, A.; Zettl, U.K.; Holtze, S.; Hildebrandt, T.B.; et al. Development of a Sensitive Bioassay for the Analysis of IGF-Related Activation of AKT/mTOR Signaling in Biological Matrices. *Cells* **2021**, *10*, 482. <https://doi.org/10.3390/cells10030482>

Academic Editor: Haim Werner

Received: 24 January 2021

Accepted: 21 February 2021

Published: 24 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The bioactivity of the IGF system is not a function of isolated hormone concentrations in a given biological matrix. Instead, the biological activities of IGFs are regulated by IGF-BPs, IGF-BP proteases, and inhibitors of IGF-BP proteases. Therefore, assays based on IGF-related bioactivity may describe functions of the complete IGF system in a given biological matrix. Of particular interest are the IGF system effects on the AKT/mTOR pathway, as a dominant system for controlling growth, metabolism, and aging. In order to improve the sensitivity of IGF-dependent bioactivity, we made use of the known short-term and enhancing effects of IGF-BP2 on the intracellular PI3K pathway. As a specific readout of this pathway, and further as a marker of the mTOR pathway, we assessed the phosphorylation of AKT-Ser473. Preincubation using IGF-BP2 enhanced IGF1-dependent AKT-Ser473 phosphorylation in our experimental system. The assay's specificity was demonstrated by inhibition of IGF1 receptors outside or inside the cell, using antiserum or small molecule inhibitors, which reduced AKT phosphorylation in response to exogenous IGF1 ($p < 0.05$). The maximal response of AKT phosphorylation was recorded 15 to 60 min after the addition of IGF1 to cell monolayers ($p < 0.001$). In our cellular system, insulin induced AKT phosphorylation only at supra-physiological concentrations (μM). Using this novel assay, we identified the differential biological activity of the IGF system in AKT-Ser473 phosphorylation in serum (mouse, naked mole rat, and human), in cerebrospinal fluid (human), and in colostrum or mature milk samples (dairy cow). We have developed a sensitive and robust bioassay to assess the IGF-related activation of the AKT/mTOR pathway. The assay works efficiently and does not require expensive cell culture systems. By using capillary immuno-electrophoresis, the readout of IGF-related bioactivity is substantially accelerated, requiring a minimum of hands-on time. Importantly, the assay system is useful for studying IGF-related activity in the AKT/mTOR pathway in a broad range of biological matrices.

Keywords: IGF; bioactivity; bioassay; mTOR; AKT phosphorylation; serum; cerebrospinal fluid; milk; colostrum; Western immunoblotting; capillary immuno-electrophoresis; BIRA assay

1. Introduction

Knowledge of the insulin-like growth factor (IGF) system has increased recently. It is realized now that control of IGF functions by proteases for IGF binding proteins (IGFBP) and inhibitors of IGFBP proteases is a central part of the physiological regulation of growth and development *in vivo* and *in vitro* [1], rather than being a rare event in certain malignancies or during pregnancy. Under this current concept of the IGF system, it is also clearer now that quantification of total or free IGFs, IGFBPs, IGFBP proteases, or IGFBP inhibitors only represents an assessment of surrogate biomarkers for the description of the function of the IGF system. Instead, functional assays of IGF-related bioactivity are required to integrate the growing number of IGF system effectors. Classically, for the readout of IGF-related bioactivity, assays of cell proliferation [2], colony formation [3], or cell migration [4] have been performed in the past, using formulations of recombinant IGF1 or IGF2. In addition, assays of the analysis of IGF-related bioactivity on the level of IGF1 receptor phosphorylation (kinase receptor activation, KIRA assay) have been developed [5,6]. The KIRA assay has been successfully applied for the study of IGF-related activity in different biological matrices, including serum [7], ascites [8], as well as pleural [9] and cerebrospinal fluids [10]. KIRA assays can provide specific information on the activation of the IGF1 receptor by a given matrix. Specifically, an antiphosphotyrosine antibody is used to detect tyrosine phosphorylation in immobilized IGF1 receptor moieties in response to IGF-related stimulation *in vitro* [6]. In response to IGF binding to IGF1 receptors, tyrosine phosphorylation provides direct information on IGF1 accessibility for the IGF1 receptors. After binding to IGF1 receptors, IGF1 may induce different signaling cascades, including mitogen-activated protein kinases (MAPK) and phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) or protein kinase B (AKT). Accordingly, the KIRA assay represents an elegant method to identify IGF-related activity at the level of the IGF1 receptor (Figure 1), but does not provide information on the translation of IGF-related bioactivity to distinct signaling cascades within the cell. Another deficit of the KIRA assay is that this assay cannot directly be used to study the biological activity of the IGF system in different cell types, because the enhancement of the signal is dependent on IGF1 receptor-transfected cells.

STC1 and -2/PAPPA and -A2/IGFBP1 to -6/IGF1 and -2

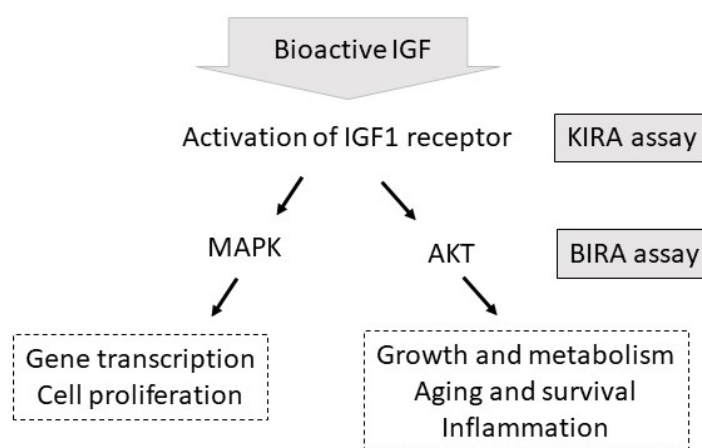


Figure 1. Control of IGF-related bioactivity by inhibitors (STC1 and STC2), proteases (PAPPA and PAPPA2), and IGFBPs (IGFBP1 to –6). IGF-dependent activation of the IGF1 receptor is quantified by the KIRA assay. IGF-related activation of AKT can be assessed by the novel BIRA assay (STC1 and 2: stanniocalcin 1 and 2; PAPPA and A2: pregnancy-associated protein protease A and A2; IGF: insulin-like growth factor; IGFBP: IGF-binding protein; MAPK: mitogen-activated protein kinase; AKT: protein kinase B; KIRA: kinase receptor activation; BIRA: IGFBP2-enhanced IGF-related AKT activation).

To analyze the activation of the mammalian target of Rapamycin (mTOR) and AKT and to establish a more flexible cell culture system in which IGF-related bioactivity can be tested in different cell types without the need of transfection, we developed the *BP2-enhanced IGF-related AKT phosphorylation* (BIRA) assay, using IGFBP2 to enhance IGF-related AKT-Ser473 phosphorylation. The mechanism for increasing phosphorylated AKT at serine 473 (AKT-Ser473) by IGFBP2 was provided by Shen et al. [11,12]. Accordingly, membrane-bound IGFBP2 coordinates with IGF1 to induce intracellular signal transduction [12]. The positive effects of IGFBP2 on AKT phosphorylation include inactivation of receptor tyrosine phosphatase beta (RPTP β) activity by bound IGFBP2, which results in the inhibition of RPTP β -dependent dephosphorylation of phosphatase and tensin homolog (PTEN). Since dephosphorylated PTEN is required for dephosphorylation of phosphatidylinositol (3,4,5)tri-phosphate (PIP3), activation of AKT-Ser473 is increased.

In our study, we characterize the sensitivity, specificity, and kinetics of the novel assay system and provide a detailed protocol for the application of the BIRA assay in different cell types. Finally, we analyze four different matrices from four different species to provide examples of application, thereby demonstrating the flexibility of the novel BIRA assay.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Culture

HEK293-10 and HEK293-2 cells originate from the human embryonic kidney fibroblast cell line HEK293, obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). HEK293 cells were transfected with 8 μ g pCMV-int-mIGFBP2 (XhoI linearized) and 0.8 μ g EcoRI linearized neomycin resistance plasmid pSV2neo (Clontech, Heidelberg, Germany)[13]. While the HEK293-10 cell clone is characterized by high secretion of IGFBP2 in the presence or absence of neomycin, the HEK293-2 cell clone also grows in the presence of neomycin, however without production or secretion of IGFBP2. HuH-7, C2C12, and 3T3-L1 cells were also obtained from ATCC (Rockville, MD, USA). All cell lines were cultured in cell culture dishes measuring 100 mm in diameter (#83.3902, Sarstedt AG and Co. KG, Nümbrecht, Germany) in cell culture media (for specific media see Table 1) with 10% fetal bovine serum (FBS; 10500-064; Gibco, Carlsbad, USA) and 1% 100x penicillin/streptomycin/amphotericin B mixture (882087; Lonza, Gampel, Switzerland)), incubated at 37 °C and 5% CO₂. The media were renewed every 2–3 days.

Table 1. Table of cell lines used and their respective media.

Cell Line	Passage Number	Cell Culture Media (Order Number, Distributor)
HEK293, HEK293-10,	2–30	EMEM (#BE12-611F, Lonza)
HEK293-2	15–25	
HuH-7	15–25	DMEM (#BE12-604F, Lonza)
C2C12	5–15	DMEM (#BE12-604F, Lonza)
3T3-L1	2–10	DMEM/F12 (#BE12-719F, Lonza)

After 6–7 days, the cells were sub-cultivated. Therefore, the cell culture medium was removed, the monolayers were rinsed in phosphate-buffered saline (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄), and 3 mL PBS with 0.25% trypsin and 0.53 mM EDTA (10x Trypsin/EDTA-Mix, BE02-007E, Lonza) was added. After incubation at 37 °C for 10 min, the cells were detached and the reaction was stopped by adding 6 mL cell culture medium. The cells were centrifuged at 800 RCF for 10 min at room temperature, and after aspiration of the supernatant, the pellet was resuspended in fresh cell culture medium. The sub-cultivating ratio was 1:10 for HEK293-2, HEK293-10, and 3T3-L1 cells, and 1:50 for the cell lines HuH-7 and C2C1. For all experiments, the cells were seeded in 24-well-plates with 10⁵ cells per well in 500 μ l cell culture medium, and every two to

three days the medium was renewed (Eagle's minimal essential medium—EMEM; Dulbecco's modified Eagle's medium—DMEM).

2.2. Serum, Cerebrospinal Fluid, and Milk Samples

Serum samples from two different mouse lines (DU6 and DUC) were collected previously [14] at the Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN). DU6 is a mouse line selected for high male body mass at the age of 42 days. This mouse line was developed from the same genetic background, which is also present in the second mouse line used in this study, representing the unselected non-inbred DUC control mouse line. Serum samples were collected from male mice sacrificed at the age of 28, 49, 77, and 112 days [14], which were stored at -20°C . The absolute serum IGF1 concentrations were published in a recent study [15]. The animal experiments were performed according to national and international guidelines and approved by the institutional (Animal Protection Board from the Leibniz Institute for Farm Animal Biology) and national (Animal Protection Board Mecklenburg-Vorpommern) protection boards (file number: LALLF M-V/TSD/7221.3-1.2-037/06). For this study, serum samples from five animals of each age group and a selection line were pooled and diluted to 1:5 in PBS.

Serum samples from naked mole rats were obtained in accordance with national and institutional animal care guidelines and approved by the ethics committee of the State Office for Health and Social Affairs, Berlin, Germany (#ZH 156, G02217/12, T 0073/15) from animals kept at the Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research (IZW). Serum samples were stored in liquid nitrogen until further use in this study and were derived from four female naked mole rats (three workers at ages of 0.9, 1.0, and 1.6 years, and one queen at the age of 3.5 years).

Human serum and human cerebrospinal fluid (hCSF) samples were collected at the Department of Neurology from the University Medical Center in Rostock, Germany. The samples were from multiple sclerosis patients undergoing a triamcinolone therapy between 2009 and 2012 and stored at -80°C before use [16]. Concentrations of IGFs and IGFBPs in serum and CSF were published recently [17]. The use of all samples was approved by the ethics committee of the University Medical Center Rostock (approval A 2016-0088). For the experiment, matched samples of human serum and hCSF were pooled from 10 patients.

The milk samples were collected during regular milking from ten multiparous Holstein-Friesian (HF) dairy cows housed in the Experimental Animal Facility for Cattle of the FBN. The milk samples were collected at eight time points from all animals during pregnancy (around d40, d135, and d220 postconceptional), around calving (colostrum d0, d1, and d2 postpartum), and around day 7 and 30 postpartum of the following lactation period. Sampling was performed by the Institute of Reproductive Biology, FBN, between 2017 and 2018 and samples were stored at -20°C before use. For acidification, 1 mL of each milk sample was supplemented with 100 μl 1M hydrochloric acid, incubated for 10 min at 37°C , and then centrifuged at 16,800 RCF for 5 min. After acidic precipitation of caseins and centrifugation, the supernatants were used for further analysis.

2.3. Preincubation of Cell Monolayers in IGFBP2 Containing Cell Culture Medium

At the point of confluence in 24-well plates, the cells were used for the bioassay (up to 10 days after seeding). Cells were exposed to medium containing only 0.5% FBS in the presence or absence of human recombinant IGFBP2 (RD172583100, BioVendor GmbH, Kassel, Germany) for 24 h. IGFBP2 was tested at different concentrations (33.75, 67.5, 125, 250, 500, 1000, and 2000 ng/mL).

2.4. Preincubation of Cell Monolayers with Inhibitors of IGF1/Insulin Signaling

To study the specific cell response to IGF1, inhibitors of the IGF1 receptor were added to the cells two hours before exposure to the samples. The antibody α IR3 (Cat. No. GTX16890, GeneTex Inc., distributed by Biozol, Eching, Germany) was used at concentrations of 0.1 mg/l and 1 mg/l in EMEM. The small molecule inhibitor BMS-754807 (Cat. No. BM0003-5MG, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) was dissolved in dimethyl sulfoxide—DMSO; D8418, Sigma-Aldrich) to create a 390.65 M stock solution and then dissolved in EMEM for the final test solutions at concentrations of 0.01 μ M and 1 μ M. For the inhibitor experiments with BMS-754807, the control contained 0.1% DMSO in EMEM. The inhibitors and the corresponding controls were incubated for 2 h and subsequently discarded before the cells were exposed to biological matrices or serial hormone dilutions.

2.5. Bioassay and Lysis

The samples were either taken directly (milk samples and CSF) or diluted in PBS (20% serum in PBS). In addition, serial dilutions of human recombinant IGF1 (Cat. #100-11, PeproTech, Inc., Rocky Hill, New Jersey) or insulin (#I3536, Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) in PBS were used.

After discarding the 0.5% FBS cell culture medium or inhibition medium, 200 μ l of test medium was added to each well, which were then incubated for a set time frame (20 min, if not stated otherwise) at 37 °C. The test medium was then discarded and the cells were washed in PBS before cell lysis in 100 μ L lysis buffer (1.5 tablets of complete mini protease inhibitor; Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland), 31.25 mM tris(hydroxymethyl)-aminomethane, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 5% glycerine in 17 mL water, and 1.5 mL 10x lysis buffer (Cell Lysis Buffer, Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA). Five minutes later, the lysates were collected, homogenized, and denatured for 5 min at 95 °C.

2.6. Protein Concentration

The protein concentration was assessed using bicinchoninic acid (BCA1-1KT, Merck, manufacturer's protocol for microtiter assay) and calculated in GraphPad Prism 9. For the final protein concentration of 1 μ g/mL, the samples were diluted to 1x Laemmli (31.25 mM tris(hydroxymethyl)-aminomethane, 1% sodium dodecylsulfate (SDS), 5% glycerine) dyed with 0.01% bromophenol blue. Beta-mercaptoethanol was added to a final concentration of 0.4%.

2.7. Electrophoresis and Western Immunoblotting

For electrophoresis, Bio-Rad TGX Stain-Free FastCast Acrylamide-Kit (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany) gels were used. All gels were blotted on polyvinylidene fluoride membranes (PVDF, pore size 0.45 μ m, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany), blocked for 1 h with 3% powdered milk in PBS and incubated overnight with a primary antibody for AKT phosphorylated at serine 473 (CST #9271, dilution 1:1000, Cell Signaling Technologies). After washing, the membranes were incubated for 2 h with a secondary antibody (antirabbit IgG HRP, CST #7074, dilution 1:2000, Cell Signaling Technologies). Bands were visualized using Lumigen ECL Ultra (Lumigen Inc., Southfield, MI, USA) in a Bio-Rad Chemi-Doc MP system (Bio-Rad Laboratories GmbH). The images were analyzed using Image Lab Ver. 6.0.1 software (Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA) and normalized for total protein concentration. The molecular weight of phosphorylated human AKT is predicted to be 56–57 kDa.

2.8. Capillary Immuno-Electrophoresis (WESTM)

The analysis with the WES device from Protein Simple (San Jose, CA, USA) was performed according to the manufacturer's manual with a WES separation kit for 12–230 kDa with 8 × 25 capillary cartridges (#SM-W004-1), the affiliated standard pack (#PS-ST05-8), an antirabbit detection module (DM-001), and the same primary antibody used for Western immunoblotting (phos-AKT, CST #9271, dilution 1:50). All devices and chemicals, except the primary antibody, were purchased from Protein Simple. The analysis was performed with the software Compass for SW (Protein Simple). The settings for the specific analysis are provided in the supplementary information (Table S1).

2.9. Statistical Analysis and Graphs

The statistical analysis and the graphs were performed using ANOVA in GraphPad Prism 9 (version 9.0.0). For approximation of the saturation curve for the concentration dependency, the function “specific binding with Hill slope” in GraphPad Prism 9 was used. It has the form $y(c) = B_{max} \cdot \frac{c^h}{ec_{50}^h + c^h}$ (c = IGF1 concentration, B_{max} = maximum ligand binding in units of y , h = Hill slope, ec_{50} = approximated IGF1 concentration with 50% ligand binding).

For the time-dependent response of AKT phosphorylation to a constant IGF1 addition, the function “association then dissociation” in GraphPad Prism 9 was used. It has the following form (Equation (1)). For the regression, the highest mean value of the phos-AKT signal was set and the associated time point to the strongest signal was set as t_0 (t = time after IGF1 was added to cells, B_{max} = maximum ligand binding in units of y , K_{on} = association constant in min^{-1} , K_{off} = dissociation constant in min^{-1} , t_0 = time dissociation is initiated, $HoTNM$ = constraint of the ligand in nM).

$$y(t) = \begin{cases} Eq \cdot (1 - \exp(-K_{ob} \cdot t) + 1, & t < t_0 \\ Eq \cdot (1 - \exp(-K_{ob} \cdot t_0) \cdot \exp(K_{off}(t - t_0) + 1, & t \geq t_0 \end{cases}$$

$$\text{with } Eq = B_{max} \cdot \frac{\text{ligand}}{\text{ligand} + \frac{K_{on}}{K_{off}}} \text{ and } K_{ob} = \text{ligand} \cdot \frac{K_{on}}{K_{off}} \quad (1)$$

$$\text{with } \text{ligand} = HoTNM \cdot 10^{-9}$$

3. Results

The aim of this study was to develop a functional bioassay for the study of IGF-dependent activation of the AKT/mTOR pathway.

3.1. A Sensitive Assay System for the Study of IGF-Dependent Activation of AKT

Before different biological matrices were tested on HEK293-10 cell monolayers, the BIRA assay was defined and characterized with respect to dose dependency, specificity, and the temporal response of IGF-dependent phosphorylation of AKT.

3.1.1. Dose-Dependent Increase of AKT Phosphorylation by Human Recombinant IGF1

In the pilot experiment, IGFBP2-transfected HEK293-10 cells secreting high amounts of IGFBP2 and untransfected HEK293 cells were used. Both cell lines were incubated for 20 min in different doses of human recombinant IGF1 before cells were harvested and tested for the levels of phosphorylated AKT (Figure S1). Under the experimental conditions, the addition of IGF1 had a much stronger effect in HEK293-10 cells compared to untransfected HEK293 cells. This effect was assessed by the analysis of AKT phosphorylation using Western immunoblotting or capillary immuno-electrophoresis (WES). The dose dependency of AKT phosphorylation in response to IGF1 supplementation was then

studied in more detail in HEK293-10 cells only (Figure 2). These cells were highly responsive to the effects of IGF1 regarding phosphorylation of AKT. Incubation in 100 ng/mL for 20 min was sufficient for a significant increase in phosphorylated AKT ($p < 0.05$). A further increase of the IGF1 concentration resulted in an additional increase of AKT phosphorylation ($p < 0.01$). Insulin also stimulated phosphorylation of AKT, however only at supraphysiological concentrations (data not shown).

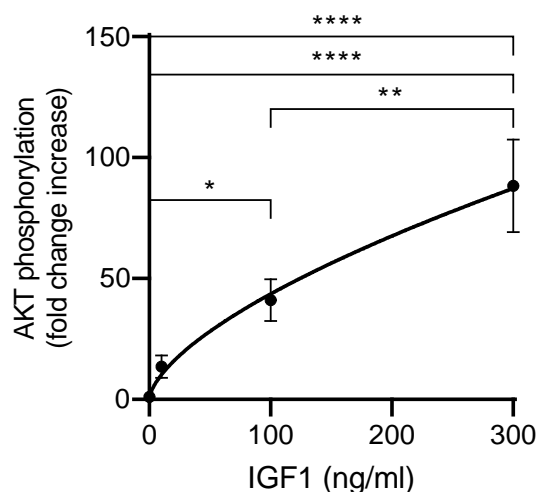


Figure 2. Dose-dependent increase of AKT phosphorylation in IGFBP2-transfected HEK293-10 cells. Cells were incubated in different concentrations of human recombinant IGF1 (0, 10, 100, 300 ng/mL) for 20 min before they were lysed and assayed for phosphorylation of AKT by Western immunoblotting, as described in Materials and Methods (mean \pm SEM; $n = 23$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$; abbreviations are explained in Figure 1).

3.1.2. Inhibition of IGF-Dependent AKT Phosphorylation by Antiserum and Small Molecules

To test the specificity of AKT phosphorylation in response to exogenous IGF1, HEK293-10 cells were treated with established inhibitors of IGF1 receptor signaling before the IGF1 incubation. The small molecule inhibitor BMS-754807 (BMS) disturbs the phosphorylation of IRS, and therefore blocks the IGF1 or insulin receptor signaling cascade. Because BMS has to be solubilized in DMSO, 0.1% DMSO in PBS was used as the BMS solvent control (Figure 3). Preincubation in BMS for 2 h significantly reduced the phosphorylation of AKT at the highest concentration (1 μ M) as compared to the solvent control ($p < 0.0001$.) The inhibitor α IR3 antiserum also blocked the phosphorylation of AKT in response to exogenous IGF1 in our cellular system ($p < 0.0001$). The negative effects of BMS at the highest concentration were more prominent than the negative effect of α IR3 at the lower concentration of 100 ng/mL ($p < 0.05$). The inhibitors had no effect on the expression of total AKT.

3.1.3. Pharmacokinetics of IGF-Dependent AKT Phosphorylation

In order to characterize the kinetics of IGF-dependent AKT phosphorylation in our cellular system, HEK293-10 cells were incubated with 100 ng/mL human recombinant IGF1 and AKT phosphorylation was assayed at eight different time points (Figure 4). A maximal response was detected 15 min after the start of the experiment ($p < 0.0001$). This is also the earliest time point when a significant effect could be fixed. At later time points, a further increase could not be observed, although phosphorylated AKT remained at elevated levels up to 60 min after the start of the experiment ($p < 0.0001$). At the latest time point, the signal intensity of phosphorylated AKT appeared to decline if compared to the previous time point, with the highest signal recorded at 60 min (60 min vs. 120 min: $p <$

0.05). Although the signal from the latest time point was no longer significantly different from the signal at 8 min ($p = 0.0726$), it was still higher than the signals at 2 min or 4 min ($p < 0.05$) and at 0 min ($p < 0.001$). Expression of total AKT was stable within the time frame tested. For the regression curve calculated in GraphPad Prism 9 (results are shown in Figure 4), the value t_0 was set to 60 for the time point with the highest measured signal and the value $HoTNM$ was set to 8.583 as the mean value for the signal at time point 60.

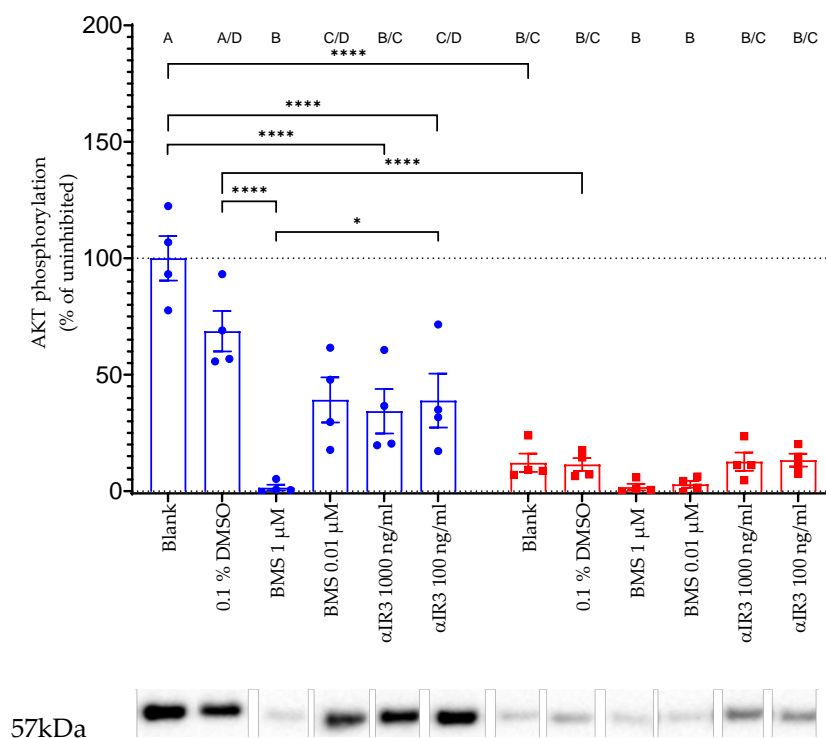


Figure 3. Inhibition of IGF-dependent AKT phosphorylation by IGF1 receptor antiserum (α IR3) and by the small molecule inhibitor BMS-754807 (BMS). HEK293-10 cells were incubated with inhibitors and controls before the addition of exogenous IGF1 at 100 ng/mL. After 20 min in the presence (blue) or absence (red) of IGF1 at 100 ng/mL, the cells were lysed and phosphorylated AKT was measured by Western immunoblotting, as described in Materials and Methods. The insert provides a representative result with a band of the correct size (57 kDa) in each lane, as assessed by Western immunoblotting. All data are expressed relative to the level of AKT phosphorylation in the presence of 100 ng/mL IGF1. Identical letters indicate the absence of a significant effect, whereas different letters depict significant differences (*: $p < 0.05$; ****: $p < 0.0001$; the error bars indicate means \pm SEM; $n = 4$; DMSO: dimethyl sulfoxide; kDa: kilodalton; all other abbreviations are explained in Figure 1).

3.2. Preincubation with IGFBP2 Enhances IGF but not Insulin-Dependent AKT Phosphorylation in a Dose-Dependent Manner

In vascular smooth muscle cells, it was demonstrated that IGFBP2 enhances IGF-related bioactivity [12]. We, therefore, questioned whether preincubation of IGFBP2 with HEK293 cells or other cell types also results in enhanced sensitivity. In addition, we questioned whether enhancement of IGF-dependent activation of AKT is dependent on the concentration of IGFBP2. Preincubation in IGFBP2 also resulted in massive induction of AKT phosphorylation in HEK293-2 cells (Figure 5A). Notably, IGFBP2 had a dose-dependent effect on IGF1-dependent AKT phosphorylation in HEK293-2 cells (Figure 5A). A significant increase of IGF1-dependent AKT phosphorylation was observed at concentrations up to 500 ng/mL. However, an enhancing effect of IGFBP2 was only observed at higher doses of IGF1 (100 ng/mL) in HEK293-2 cells. In contrast, even the highest concentrations of IGFBP2 had no impact on the effects of IGF1 on AKT phosphorylation at a

concentration of 10 ng/mL. This finding is in principal agreement with the results presented in Figure 1, where an enhancing effect of IGFBP2 was observed at concentrations of 100 ng/mL or higher, but not at concentrations of 10 ng/mL or lower. The results further suggest that AKT phosphorylation is not an IGF-independent function of IGFBP2 in our cellular context. Preincubation with IGFBP2 did not enhance insulin-dependent AKT phosphorylation in 293-2 cells or total expression of total AKT.

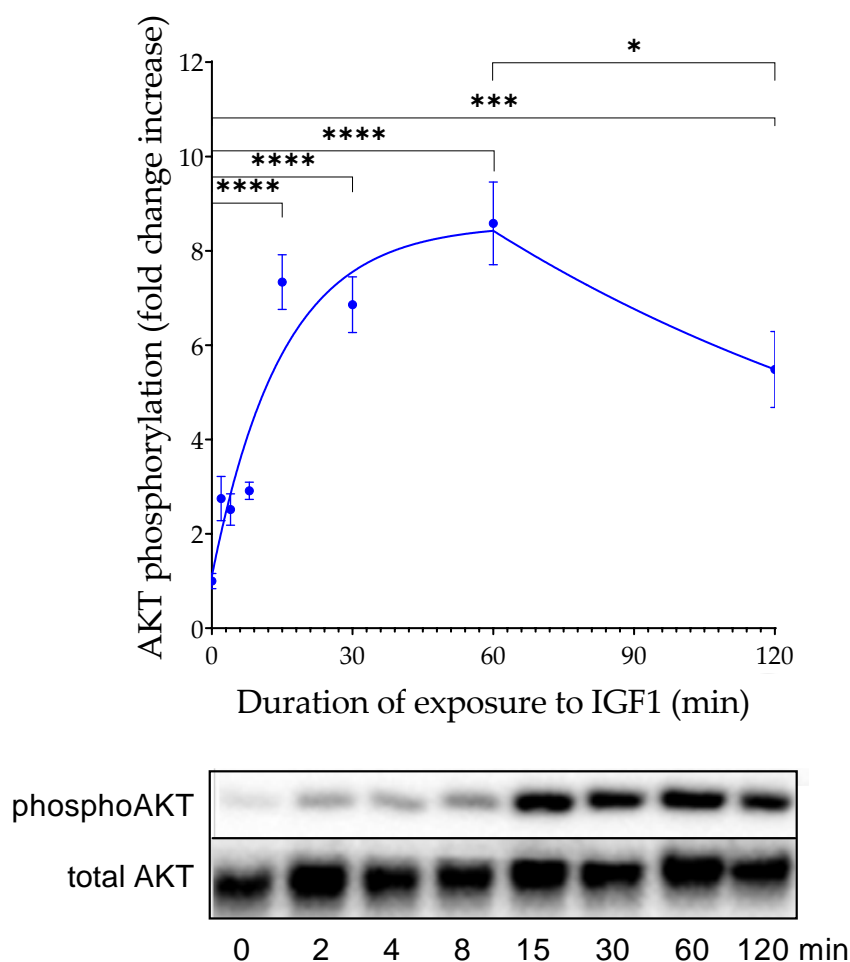


Figure 4. Temporal response of AKT phosphorylation after the addition of exogenous IGF1 at a concentration of 100 ng/mL to HEK293-10 cell monolayers. HEK293-10 cells were incubated for up to 120 min before cells were lysed and assayed for phosphorylated AKT. Only the significance levels of two consecutively time points are displayed ($n = 3$, means \pm SEM, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). The insert provides a representative result with a band of the correct size (57 kDa) in each lane, as assessed by Western immunoblotting for AKT phosphorylated at serine 473 (phosphoAKT) and for total AKT (abbreviations are explained in Figure 1).

We next questioned whether the BIRA assay could also be applied to other cell types. At concentrations of 250 ng/mL or above, HuH-7 cells were sensitive to the enhancing effects of IGFBP2 preincubation (Figure 5B). Compared to HEK293-2 cells, the response after 100 ng/mL IGF1 challenge appeared to persist at a lower level with significant increases, even at the highest dose of IGFBP2 preincubation and with 2000 ng/mL versus 1000 ng/mL IGFBP2 ($p < 0.001$). This indicates that saturation is not achieved by the 2000 ng/mL dose of IGFBP2, or in other words that IGFBP2 concentrations higher than 2 μ g/mL may further increase IGF1-dependent AKT phosphorylation in HuH-7 cells. Again, an effect of IGFBP2 on IGF1-dependent AKT phosphorylation was not observed at

an IGF1 concentration of 10 ng/mL. In our screening protocol for the study of effects of IGFBP2 preincubation, we also tested C2C12 and 3T3-L1 cells. Under the conditions of the present study, an enhancing effect was not observed in these latter two types of cells.

3.3. Induction of IGF-Related AKT Phosphorylation by Biological Matrices

In the second part of the study, different matrices (serum, cerebrospinal fluid, milk, and colostrum) were incubated with HEK293-10 cells for 20 min and phosphorylated AKT was assayed.

3.3.1. Age-Dependent Effects of Mouse Serum to Stimulate AKT Phosphorylation

At an age of 28 days, serum from male growth-selected mice (DU6) stimulated phosphorylation of AKT to a higher extent than serum from unselected controls ($p < 0.001$; Figure 6A). In serum from DU6 mice at this age, the ability of serum to induce AKT phosphorylation was compared to the activity of recombinant human IGF1 at concentrations of 100–300 ng/mL. By contrast, serum from age-matched unselected controls stimulated phosphorylation of AKT only at a level of 10 ng/mL rhIGF1. Between 28 and 112 days of age, a continuous decline of serum activity towards AKT phosphorylation was observed in male DU6 mice, but not in unselected controls. Accordingly, a significant reduction in the activity of male DU6 mouse serum was present at 49 vs. 28 days ($p < 0.001$) and at 112 vs. 49 days of age ($p < 0.05$). Preincubation of HEK293-10 cells with 1 μ M BMS-754807 in EMEM and 0.1% DMSO for 2 h blocked almost 80% of the AKT phosphorylation when compared to preincubation of the cells in solvent control containing only 0.1% DMSO (Figure 6B; $p < 0.0001$).

3.3.2. Activation of AKT Phosphorylation by Serum from Individual Naked Mole Rats

Serum samples from individual female naked mole rats were also diluted in PBS to a final concentration of 20% serum. Significantly higher bioactivity in the youngest worker (age 0.9 years) was found if compared to the older three animals (age 1 years to 3.5 years). Beside the age, there was no different bioactivity measurable, comparing the social status between the queen and the older worker (Figure 7A).

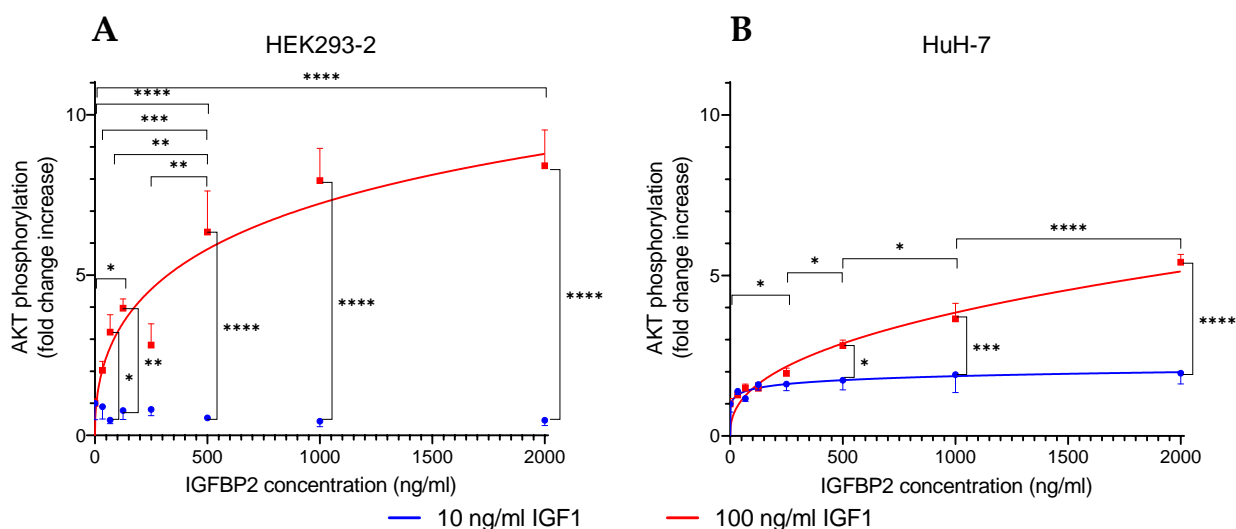


Figure 5. IGFBP2 increases IGF1-dependent phosphorylation of AKT in a dose-dependent manner. Monolayers of HEK293-2 cells (A) or HuH-7 cells (B) were preincubated for 24 h with different concentrations of IGFBP2 (0, 33.75, 67.5, 125, 250, 500, 1000, and 2000 ng/mL) in culture medium with 0.5% serum. For the bioassay, cell monolayers were incubated with 10 ng/mL IGF1 (blue) or 100 ng/mL IGF1 (red) for 20 min then lysed and assayed for phosphorylated AKT. Significance is provided for the comparison of different IGF1 or IGFBP2 concentrations ($n = 3$, means \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). In one case, one outlier was identified by GraphPad Prism and not used for the calculation of

the mean ($n = 2$ for HuH-7 cells preincubated in 2000 ng/mL IGFBP2 and challenged by 100 ng/mL IGF1; for abbreviations please also see Figure 1).

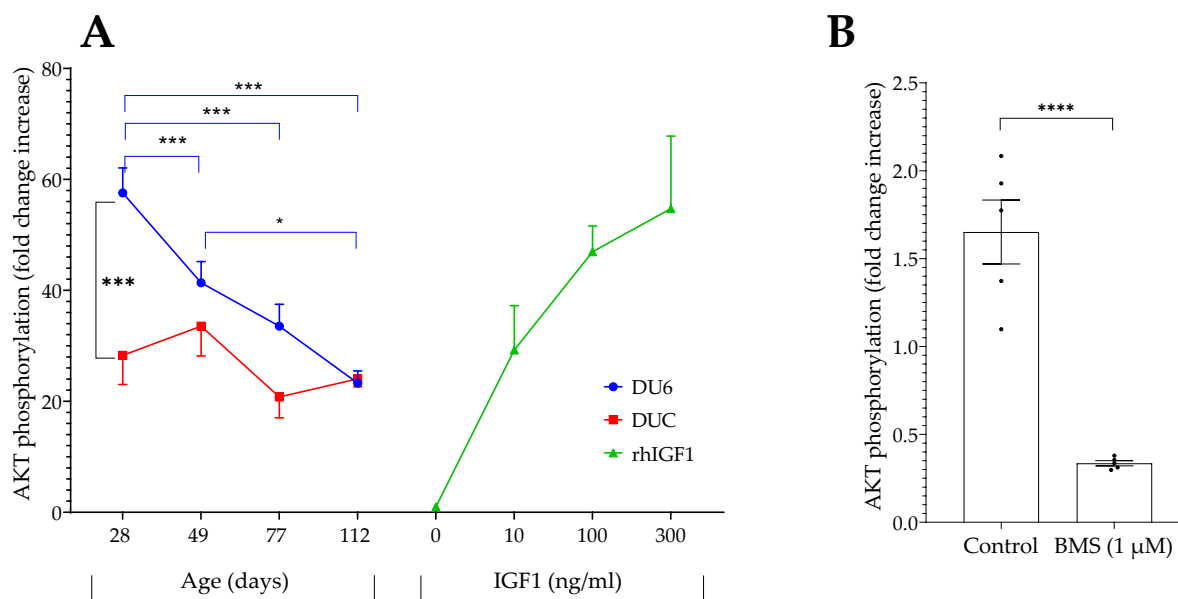


Figure 6. (A) Activation of AKT phosphorylation by diluted serum samples from male growth-selected mice (DU6) and unselected controls (DUC). Serum was prepared from mice between 28 and 112 days of age. Serum pools from five animals were diluted in PBS (1/5) and incubated for 20 min with HEK293-10 cell monolayers before lysis and assessment of AKT activation. Each pool was measured four times. In addition, AKT phosphorylation was assayed in the absence or presence of recombinant human IGF1 (rhIGF1; mean \pm SEM; $n = 4$; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$). (B) The effect of BMS was tested in a diluted serum pool from 112-day-old DU6 animals. Therefore, HEK293-10 cell monolayers were incubated in EMEM containing 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO) as a control and with medium containing 1 μ M BMS-754807 and 0.1% DMSO (BMS) for 2 h before mouse serum was tested (mean \pm SEM; $n = 5$; **** $p < 0.0001$; for abbreviations also see Figure 1).

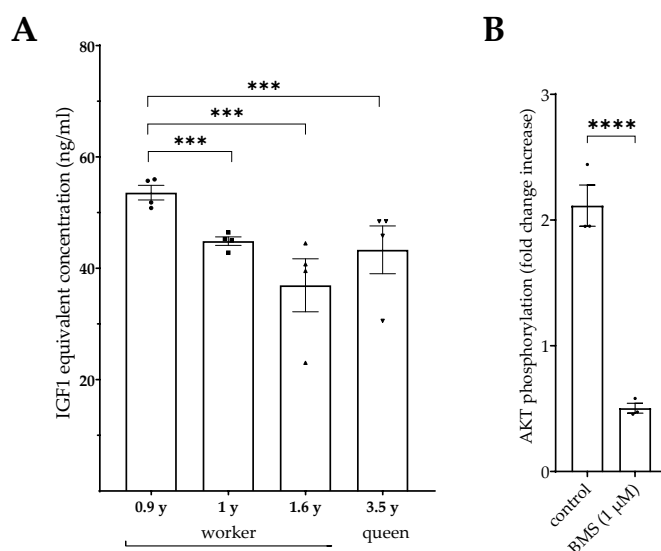


Figure 7. (A) Activation of AKT phosphorylation by diluted serum samples from female naked mole rats between 0.9 and 3.5 years of age, diluted in PBS and incubated for 20 min with HEK293-10 cell monolayers before lysis and assessment of AKT activation. After correction for dilution, IGF1 equivalency was calculated by interpolation using serial dilutions of IGF1. (B) The effect of BMS-754807 was tested in diluted serum pools generated from all naked mole rats. Therefore, HEK293-10 cell monolayers were incubated in medium containing 0.1% dimethyl sulfoxide

(DMSO) as a control and with medium containing 1 μM BMS-754807 and 0.1% DMSO (BMS) for 2 h before the serum pools were applied (mean \pm SEM; $n = 3$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; for abbreviations see Figure 1).

To test assay specificity for serum from naked mole rats, a pool was prepared using serum samples from four animals and added to cells previously incubated either for 2 h with 1 μM BMS-754807 in 0.1% DMSO EMEM or in 0.1% DMSO EMEM only. The results (Figure 7 B) revealed inhibition of AKT phosphorylation by the small molecule inhibitor to $\approx 75\%$ compared to AKT phosphorylation in cells incubated with naked mole rat serum without small molecule inhibitor ($p < 0.0001$).

3.3.3. Activation of AKT Phosphorylation by Matrices of Human Origin

We next tested IGF-related AKT phosphorylation in matrices of human origin in our cellular system. Because the samples were not available at quantities needed to perform multiple tests for technical replicates, pools were generated both for serum and for CSF from a total of ten different samples, respectively.

Human serum had a higher potential than CSF to induce phosphorylation of AKT in HEK293-10 cells (Figure 8). In both matrices, specific inhibition of IGF/insulin receptor signaling resulted in substantial reductions of AKT phosphorylation (serum: $p < 0.05$; CSF: $p < 0.01$). In human serum, BMS-mediated inhibition of AKT phosphorylation was $\approx 75\%$, and thus was similar to serum from naked mole rats. In human CSF, BMS at the same concentration blocked over 90% of AKT phosphorylation in HEK293-10 cells.

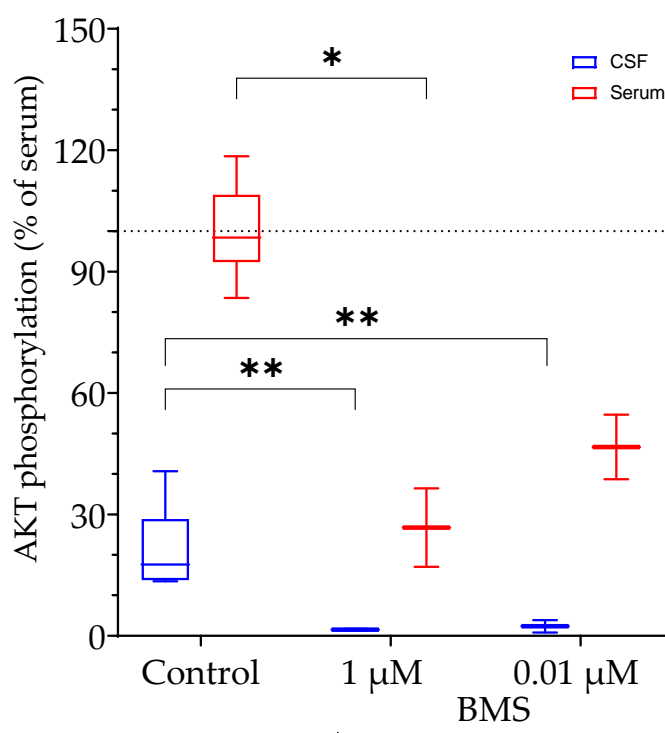


Figure 8. Activation of AKT phosphorylation by serum (red) and CSF (blue) samples of human origin. Diluted serum samples (1/5) pooled from ten human donors, whereas CSF was used without dilution. The pools were incubated for 20 min with HEK293-10 cell monolayers before lysis and assessment of AKT activation. In the graph, all data were corrected for their dilution factor. Each sample was measured six times. The dashed gray line corresponds to the mean of the serum (100%). In order to demonstrate the IGF dependency, BMS-754807 (BMS) was used to inhibit the IGF1 receptor prior to the incubation with human CSF or serum ($n = 2$; means \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; CSF: cerebrospinal fluid; for other abbreviations see Figure 1).

3.3.4. Activation of AKT Phosphorylation by Colostrum or Milk from Dairy Cows

The concentrations of IGFs and IGFBPs in dairy cow milk are highly dependent on the age of lactation. In order to study the potential activity of dairy milk for the activation of AKT, a longitudinal study was performed using colostrum or milk from animals at eight different lactation time points.

In contrast to native milk, native colostrum samples induced AKT phosphorylation in HEK293-10 cells equivalent to IGF1 at a concentration ≤ 10 ng/mL (Figure 9). Acidification resulted in a significant increase of AKT activation in both matrices ($p < 0.001$). The activity of acidified milk or late colostrum (lactation age: 2 days postpartum) was equivalent to IGF1 concentrations > 300 ng/mL. Notably, acidification had a stronger effect in milk than in colostrum at days 0 and 1 postpartum. Preincubation of HEK293-10 monolayers with BMS reduced the activity of acidified milk against AKT phosphorylation by 75% to 60%. Neutralization of acidified milk through the addition of NaOH at equimolar concentrations abolished the elevated potential of acidic milk towards AKT phosphorylation in HEK293-10 cells (Figure S2). Accordingly, activation of bioactivity in milk by acidification is reversible and can be controlled by pH.

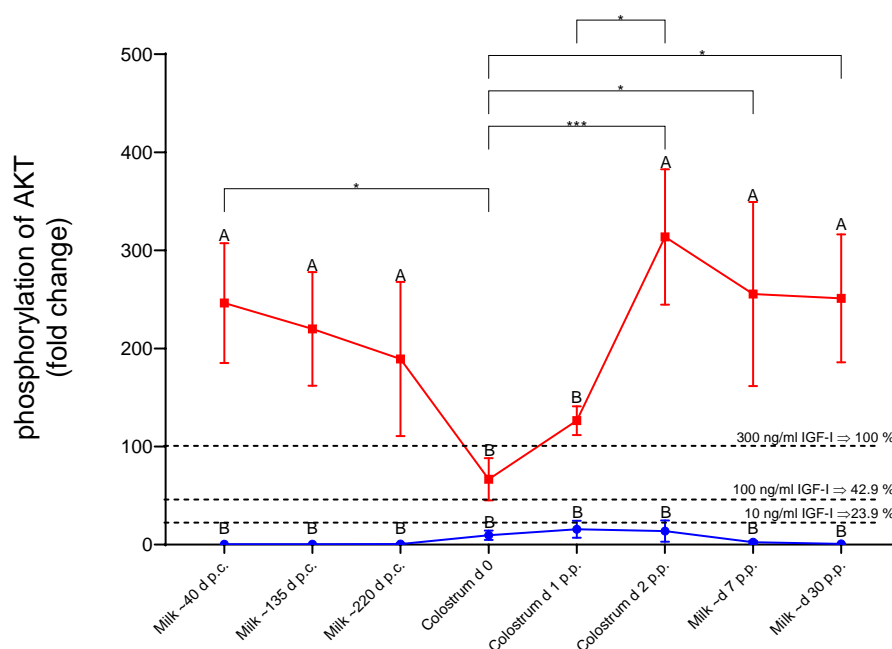


Figure 9. Phosphorylation of AKT-Ser473 in HEK293-10 cells by native (blue line) and acidified (red line) cow milk or colostrum samples during different stages during the lactation cycle. Cell monolayers were exposed to the samples for 20 min before cell lysis and assessment of AKT activation by Western immunoblotting. The dotted lines represent the levels of activation by 10, 100, and 300 ng/mL IGF1, respectively. Different letters indicate significant effects between native and acidified samples at the same time point (means \pm SEM; $n = 8$; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; p.c., post conceptionem; p.p., postpartum; for other abbreviations see Figure 1).

4. Discussion

In biological matrices, the effects of the IGF system are controlled by peptide hormones and receptors, IGFBPs, IGFBP proteases, and inhibitors of IGFBP proteases [1]. In order to cope with the complexity of the IGF system, which has been explicitly discussed by the scientific community [18], and to describe the bioactivity of a given matrix in vitro, bioassays can provide specific information. In order to test the effects of IGF-related bioactivity on the phosphorylation of AKT in different biological matrices, we developed the BIRA assay, a robust and sensitive cell-based bioassay system.

4.1. Short-Term Effects of Membrane-Bound IGFBP2 vs. Longer-Term Effects of Soluble IGFBP2

For decades it was unclear whether IGFBP2 has positive or negative effects on cell proliferation [19]. The molecular basis for IGFBP2 as a positive regulator of IGF1-dependent AKT-Ser473 phosphorylation was provided by the Clemmons lab [11,12]. Accordingly, we can distinguish the short-term effects of IGFBP2, which are related to cell surface interaction and which have positive effects on IGF-dependent signal transduction, from the longer-term effects of soluble IGFBP2, which are thought to block the interaction of IGF1 with IGF1 receptors. We questioned whether the short-term and positive effects of IGFBP2 on IGF-dependent signal transduction could be used to develop an assay to detect IGF-related bioactivity in signal transduction, characterized by improved sensitivity. We addressed this question using IGFBP2-transfected HEK293-10 cells, marked by elevated IGFBP2 secretion [13]. From our previous work we knew that HEK293 cells are sensitive to the effects of IGF1 [13], which was one of the premises for this study. In this cellular system, we studied in detail the longer-term negative effects of IGFBP2 on IGF-dependent cell proliferation. We demonstrated that with increasing concentrations of IGF1 or with LongR3 IGF1, lacking interaction with IGFBPs, cell proliferation can be rescued in IGFBP2-transfected HEK293-10 cells [13]. The duration of cell proliferation assays amounts to three to four days, whereas the effects of IGF-dependent AKT phosphorylation can be studied after a couple of minutes. Since the cells were washed before the assay, this period was not sufficient to establish inhibitory concentrations of soluble IGFBP2 in the extracellular space. First of all, HEK293-10 cells with high expression of IGFBP2 responded to a much stronger extent to exogenous IGF1 addition than transfected HEK293-2 cells, which do not express high amounts of IGFBP2. However, when HEK293-2 cells were incubated with conditioned medium from IGFBP2-transfected HEK293-10 cells or with different concentrations of recombinant IGFBP2, increased sensitivity towards high doses of exogenous IGF1 was established. Finally, the positive effects of recombinant IGFBP2 were not restricted to HEK293-2 cells, but were also identified in hepatic carcinoma cells (HuH-7). We thereby confirmed the mechanism originally described by the Clemmons lab in vascular smooth muscle cells [12]. Accordingly, a positive short-term effect of IGFBP2 on IGF-dependent cell signaling [11,12] was observed also in our cellular system. Notably, preincubation in recombinant human IGFBP2 did not enhance IGF-related AKT phosphorylation in 3T3 or C2C12 cells. At present, we can only speculate that coordinated AKT activation as described [11,12] may not be functional in all cell types as a rule. The longer-term inhibitory effects of soluble IGFBP2 (e.g., on cell proliferation [13]) can be neglected in the new bioassay. IGFBP effects as a function of the duration of IGFBP exposure were also discussed *in vivo* [20]. Notably, insulin-stimulated AKT phosphorylation at supraphysiological concentrations and preincubation with IGFBP2 did not affect insulin sensitivity in our system.

4.2. Specificity

In order to define the specificity of IGF-related AKT phosphorylation, we blocked IGF1 receptors inside and outside the cells. To inhibit IGF1 interaction with the receptor outside the cells, we tested the effects of monoclonal antiserum (alpha IR-3) interacting with extracellular alpha subunits of the IGF1 receptor [21]. This interaction further blocks the binding of IGF1 to its receptor [22], and the antibody, therefore, has neutralizing functions for the IGF-dependent signal transduction through the IGF1 receptor. Incubation of IGFBP2-transfected HEK cells with alpha IR-3 antibody at both tested concentrations significantly inhibited AKT-Ser473 phosphorylation in response to IGF1. Additionally, intracellular inhibition of IGF1/insulin receptor signaling resulted in the substantial suppression of IGF1 I-dependent AKT phosphorylation. Intracellular inhibition of IGF1-dependent signal transduction was achieved using a small molecule (BMS-754807) that binds to the intracellular kinase domains from IGF1 and insulin receptors [23,24].

4.3. Time Dependency

To define the window for the readout of IGF-dependent AKT-Ser473 phosphorylation, we incubated IGFBP2-transfected HEK293-10 cells with 100 ng/mL IGF1 for up to 120 min and tested AKT phosphorylation at different time points. Maximal AKT phosphorylation was recorded 15 min after the addition of IGF1. The signal intensity remained elevated for an additional 45 min. Therefore, we decided to choose 20 min of IGF1 exposure before the readout of IGFBP2-enhanced AKT phosphorylation. Instead, the KIRA assay selected only 15 min of exposure to exogenous IGF1 before cell lysis [5,6]. This period was considered as a period short enough for the cellular system not to secrete IGFBPs, which may interfere with IGF1 in the supernatant [5,6]. From our results in a cellular system with the massive expression of IGFBP2, we had no indication of interference with secreted IGFBPs even until 60 min of exposure to IGF1. The reduction of IGF1-induced AKT phosphorylation 120 min after IGF1 application may be due to secreted IGFBPs or other secondary mechanisms, such as the decay of IGF1 or intracellular compensatory mechanisms to tune down the hormone response at the level of signal transduction. The phosphorylation of AKT in response to IGF1 is a complex event that includes binding of IGF to the IGF1 receptor, autophosphorylation of the IGF1 receptor, transfer of the signal to PI3K and PIP3, recruitment of AKT to the cell surface, and finally AKT phosphorylation at Ser437 by mTOR. In NIH3T3 mouse fibroblasts, phosphorylation of IGF1 receptors occurs within 13 to 25 s, whereas kinases located downstream of the IGF1 receptor are stimulated to their maximum 25–200 s after the addition of IGF1 [25]. This, on the one hand, may explain why the readout of IGF-induced phosphorylation at the level of canonical downstream kinases may require a longer exposure time compared to IGF1 receptor phosphorylation. However, this does not directly explain why a maximal response was achieved only 15 min after the IGF1 addition. Instead, the substantially longer lag time from application of IGF1 to maximal AKT phosphorylation may be related to the mechanisms of potentiation due to cell surface interaction of IGFBP2 [11,12]. According to the mechanism provided by Shen et al. [11,12], the control of AKT phosphorylation in response to IGF1 not only includes the canonical kinases described earlier, but additional kinases, phosphatases, substrates, and receptors [11]. AKT dephosphorylation is thereby inhibited by a mechanism involving IGF1 and IGFBP2, resulting in elevated levels of phosphorylated AKT.

4.4. IGF-Related Bioactivity in Serum from Growth-Selected Mice and Controls and Its Age Dependency

The novel bioassay was used to analyze the biological activity in serum from growth-selected mice (DU6) and unselected controls (DUC) [26]. During the pubertal growth spurt in mice, we recently identified a higher molar ratio of IGF1 to the sum of IGFBPs in serum from DU6 mice compared to DUC mice [15]. Therefore, we postulated higher biological activity in giant DU6 versus control mice at the age of 28 days. In fact, we confirmed higher IGF-related biological activity in serum from DU6 mice at this age compared to controls. During the growth spurt at 28 days of age, the biological activity in serum from DU6 mice corresponded to more than 100 ng/mL of free IGF1 but less than 10 ng/mL in unselected controls. The different biological activities described here furthermore correlate with substantially higher concentrations of IGF1 in DU6 mice (≈ 1500 ng/mL) if compared to unselected controls (<1000 ng/mL) during the pubertal growth peak [15].

In addition, a second existing hypothesis was confirmed by the novel bioassay. In previous work, we described reduced ratios of IGF1 to the sum of IGFBPs in serum with increasing age [15]. Using serum from giant mice aged 28 to 112 days, we confirmed the prediction that biological activity is drastically reduced between the ages of 28 and 49 days in giant DU6 mice. At later time points, the IGF-related bioactivity is further decreased to levels according to <10 ng/mL of free IGF1. Additionally, in accordance with

previous work [15], no decrease in IGF-related bioactivity was found in unselected control mice aged 28 to 112 days.

4.5. IGF-Related Bioactivity in Serum from Naked Mole Rats

The sequence homology of IGFs from naked mole rats amounts to more than 90% compared to their human or mouse orthologue [27]. Naked mole rats also express IGFBPs and PAPP A [27]. However, to the best of our knowledge, in naked mole rats IGF1 concentrations have not yet been tested by using existing diagnostic tools from other vertebrate species. Nevertheless, the IGF system is of great interest in this longest-living, and therefore unique, rodent animal model [28]. We used serum samples from individual animals and compared IGF-related bioactivity in serum samples from different worker animals to a serum sample from a long-lived queen. While we could not identify a general difference between serum samples from workers and the queen, we can use the bioassay to characterize IGF-related bioactivity in individual animals. Although it is difficult to obtain serum samples from naked mole rats, more samples should be used to set up a distinct study in this novel animal model in the future. Notably, the IGF-related bioactivity in samples from naked mole rats could directly be compared to other vertebrate species by using the novel bioassay to study the relative activity levels of the IGF system in different matrices and in different age groups.

4.6. IGF-Related Bioactivity in Serum and Cerebrospinal Fluid from Human Subjects

The growth, development, and functions of the brain are regulated by the coordinated regulation of local and systemic effects of the IGF system [29]. In CSF, IGF2 has been identified as a marker of mild cognitive impairment in Alzheimer's patients [30] and as a biomarker for the progression of amyotrophic lateral sclerosis [31]. In CSF from patients with diabetic neuropathy, the biological activity of the IGF system is regulated by proteolytic degradation and the KIRA assay was used for determination of bioactive IGF in serum and CSF [10]. Interestingly, although IGF levels in CSF are less than 14% if compared to serum, bioactive IGF in CSF was $\approx 28\%$ of bioactive IGF in serum, as determined by the KIRA assay [10]. We have also characterized the IGF system in serum and CSF samples, however from patients with multiple sclerosis [17]. We described the presence of IGFBP fragments in CSF and postulated regulation of IGF bioactivity by IGFBP proteolysis in this matrix. In our study, we used matched serum and CSF samples from patients. In these patients, the IGFs concentrations in CSF were less than 5% of the IGF concentrations in serum [17]. By use of the novel BIRA assay, we were able to identify IGF-related bioactivity at 20% of the level of serum. Accordingly, we confirmed published evidence [10] of the regulation of IGF-related bioactivity in CSF and provided evidence for the production of similar results using the new bioassay as compared to the well-established KIRA assay.

4.7. IGF-Related Bioactivity in Colostrum and Milk Samples from Dairy Cows

Mammary secretions are rich sources of IGFs and IGFBPs [32,33]. In particular, colostrum contains high concentrations of IGF1 [34]. In early breast milk, a serine protease was identified, which is responsible for the degradation of IGFBP2 [35]. Accordingly, in milk, the regulation of IGF-related bioactivity was discussed in the context of the effects on the mammary epithelia from the mother and the gastrointestinal tract from the suckling [35]. Additionally, in milk from dairy cows, the concentrations are high after calving and reduce towards mid and late lactation [36]. Therefore, Sejrsen et al. tested the biological activity of milk samples from different stages of lactation [36]. Similar to the protocol here, they selected mitogenic activity as the parameter for the readout of IGF-related bioactivity. In this study, higher mitogenic activity was identified in colostrum samples compared to milk from advanced lactational ages [36]. In addition, in this study, the interference of IGFBPs was suggested. In a subsequent study, the mitogenic potential of acidified

or neutralized milk samples was also tested [37]. Since acidification may also activate the cytokine transforming growth factor beta (TGFB), the authors concluded that different factors might contribute to the biological activity of milk [37]. Similar to Purup et al., we also tested the effects of neutralization in milk samples after acidification. We directly applied acidic milk samples to our cell culture model, because after neutralization, free IGFs may return to their inactive IGFBP bound form. Very clearly, acidification correlated with enhanced biological activity in the form of AKT-Ser473 phosphorylation in the present study. We have no direct evidence that this activity is due to activation of TGFB for a number of reasons. First, inhibition by preincubation with BMS blocked phosphorylation of AKT by up to 75%. Second, neutralization of acidified milk also abolished the potential of milk to induce AKT phosphorylation. In contrast, activation of TGFB is not reversible. Therefore, we argue that during acidification, IGFs are released from their binding proteins, which may acutely induce the biological activity of IGFs. This mechanism could be involved during the development of the gastrointestinal tract in the growing suckling, at least as long as gastric proteolysis is not sufficient for the complete decomposition of peptides and proteins, and intact or fragmented peptides may arrive in the intestine in an active form. Since Elmlinger et al. have discussed the role of IGFBP proteases for growth and development of the intestinal tract [35], acidification may form a second mechanism controlling IGF-related bioactivity in milk.

Interestingly, IGF-ELISAs also use acidification to release IGFs from their binding proteins before IGF determination. Accordingly, we may use the novel BIRA assay to estimate total IGFs or IGF-related bioactivity in species where no specific ELISA is available so far.

The BIRA assay is not dependent on IGFBP2-transfected HEK293 cells, since preincubation of HEK293 cells or Huh-7 cells for two hours in IGFBP2 is sufficient for increased sensitivity towards IGF-related AKT activation. The novel assay thus is not restricted to a certain cell type, although it is clear that not all cells, as a rule, express the required machinery to enhance the effects of the IGFs. Accordingly, the cellular response needs to be established in other cellular systems. Therefore, it is also required to determine the specificity of AKT phosphorylation in response to a given matrix. To do so, the small molecule inhibitor BMS can be used. With respect to different cell types, the effective doses of IGFBP2 used during preincubation to enhance the cells' sensitivity to the effects of IGFs may be defined. So far, we have not yet tested the effects of IGF1 versus IGF2, which is an interesting issue for follow-up studies.

5. Conclusions

In the present manuscript, we have developed and applied the BIRA assay as a novel bioassay to study IGF-related bioactivity *in vitro*. The assay is characterized by enhanced sensitivity and high specificity for the readout of IGF-related bioactivity. The test system enables the fast determination of IGF-dependent AKT-Ser473 phosphorylation, can partially be automated by the inclusion of the WES-technology, and does not depend on transfected cells or certain cell types, in general. The bioassay can be used to analyze IGF-related activity in different matrices from different species and can be adapted to study bioactive or total IGF. In addition, the BIRA assay can be used to assess the interactions between defined matrices and certain cell types. In particular, the BIRA assay serves as a novel method to study functional interactions between the matrix and cell type in relation to mTOR signaling as the major pathway of aging and survival.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/2073-4409/10/3/482/s1: Figure S1: Dose-dependent increase of AKT phosphorylation in IGFBP2-transfected HEK293-10 cells and untransfected HEK293 cells. Figure S2: Effects of native, acidified, and neutralized milk samples on AKT phosphorylation in HEK293-10 cells. Table S1: Table of settings for WES analysis.

Author Contributions: Conceptualization, M.W., C.H., C.W., D.O., J.B. and A.H.; methodology, M.W., C.H. and A.H.; software, M.W.; validation, M.W.; formal analysis, M.W. and A.H.; investigation, M.W.; resources, M.S., A.V., U.K.Z., S.H., T.B.H. and E.W.; data curation, M.W.; writing—original draft preparation, M.W. and A.H.; writing—review and editing, all authors; project administration, M.W. and A.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: M.W. is financially supported by the H. Wilhelm Schaumann Stiftung.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and the use of mouse samples was approved by the Animal Protection Board Mecklenburg-Vorpommern (LALLF M-V/TSD/7221.3-1.2-037/06). The use of naked mole rat samples was approved by the ethics committee of the State Office for Health and Social Affairs, Berlin, Germany (#ZH 156, G02217/12, T 0073/15). The use of human samples was approved by the ethics committee of the University Medical Center Rostock (approval A 2016-0088).

Informed Consent Statement: Patient consent was waived due to approval A 2016-0088 from the ethics committee of the University Medical Center Rostock.

Data Availability Statement: Data is contained within the article or supplementary material.

Acknowledgments: This article’s publication was funded by the Open Access Fund of the Leibniz Association and the Open Access Fund of the Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN). The authors thank Luong Chau and the staff of the mouse facility for excellent technical assistance and excellent animal care.

Conflicts of Interest: C.H. and A.H. have ties to Ligandis UG. The other authors do not have any potential conflicts of interest to declare. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Argente, J.; A Chowen, J.; A Pérez-Jurado, L.; Frystyk, J.; Oxvig, C. One level up: Abnormal proteolytic regulation of IGF activity plays a role in human pathophysiology. *EMBO Mol. Med.* **2017**, *9*, 1338–1345, doi:10.15252/emmm.201707950.
2. Reddan, J.R.; Dziedzic, D.C. Insulin-like growth factors, IGF-1, IGF-2 and somatomedin C trigger cell proliferation in mammalian epithelial cells cultured in a serum-free medium. *Exp. Cell Res.* **1982**, *142*, 293–300, doi:10.1016/0014-4827(82)90370-6.
3. Kurtz, A.; Jelkmann, W.; Bauer, C. A new candidate for the regulation of erythropoiesis. *FEBS Lett.* **1982**, *149*, 105–108, doi:10.1016/0014-5793(82)81081-8.
4. Stracke, M.L.; Kohn, E.C.; Aznavoorian, S.A.; Wilson, L.L.; Salomon, D.; Krutzsch, H.C.; Liotta, L.A.; Schiffmann, E. Insulin-like growth factors stimulate chemotaxis in human melanoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *153*, 1076–1083, doi:10.1016/s0006-291x(88)81338-x.
5. Sadick, M.D.; Intintoli, A.; Quarmby, V.; McCoy, A.; Canova-Davis, E.; Ling, V. Kinase receptor activation (KIRA): A rapid and accurate alternative to end-point bioassays. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *19*, 883–891, doi:10.1016/s0731-7085(98)00144-7.
6. Chen, J.-W.; Ledet, T.; Ørskov, H.; Jessen, N.; Lund, S.; Whittaker, J.; De Meyts, P.; Larsen, M.B.; Christiansen, J.S.; Frystyk, J. A highly sensitive and specific assay for determination of IGF-I bioactivity in human serum. *Am. J. Physiol. Metab.* **2003**, *284*, E1149–E1155, doi:10.1152/ajpendo.00410.2002.
7. Hedman, C.A.; Frystyk, J.; Lindström, T.; Oskarsson, P.; Arnqvist, H.J. Intraperitoneal insulin delivery to patients with type 1 diabetes results in higher serum IGF-I bioactivity than continuous subcutaneous insulin infusion. *Clin. Endocrinol.* **2013**, *81*, 58–62, doi:10.1111/cen.12296.
8. Thomsen, J.; Hjortebjerg, R.; Espelund, U.; Ørtoft, G.; Vestergaard, P.; Magnusson, N.E.; Conover, C.A.; Tramm, T.; Hager, H.; Høgdall, C.; et al. PAPP-A proteolytic activity enhances IGF bioactivity in ascites from women with ovarian carcinoma. *Oncotarget* **2015**, *6*, 32266–32278, doi:10.18632/oncotarget.5010.
9. Espelund, U.S.; Bjerre, M.; Hjortebjerg, R.; Rasmussen, T.R.; Lundby, A.; Hoeflich, A.; Folkersen, B.H.; Oxvig, C.; Frystyk, J. Insulin-Like Growth Factor Bioactivity, Stanniocalcin-2, Pregnancy-Associated Plasma Protein-A, and IGF-Binding Protein-4 in Pleural Fluid and Serum From Patients With Pulmonary Disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2017**, *102*, 3526–3534, doi:10.1210/jc.2017-00033.
10. Kallestrup, M.; Frystyk, J.; Espelund, U.; Hjortebjerg, R.; Tankisi, H.; Andersen, H. PAPP-A activity is increased in cerebrospinal fluid from patients with diabetic polyneuropathy and correlates with peripheral nerve impairment. *Growth Horm. IGF Res.* **2019**, *53–59*, doi:10.1016/j.gthir.2019.10.001.
11. Shen, X.; Xinchun, S.; Wai, C.; Clemmons, D.R. The Coordinate Cellular Response to Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) and Insulin-like Growth Factor-binding Protein-2 (IGFBP-2) Is Regulated through Vimentin Binding to Receptor Tyrosine Phosphatase β (RPTP β). *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 11578–11590, doi:10.1074/jbc.m114.620237.

12. Shen, X.; Xi, G.; Maile, L.A.; Wai, C.; Rosen, C.J.; Clemmons, D.R. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein 2 functions coordinately with receptor protein tyrosine phosphatase β and the IGF-I receptor to regulate IGF-I-stimulated signaling. *Mol. Cell Biol.* **2012**, *32*, 4116–4130.
13. Höflich, A.; Lahm, H.; Blum, W.; Kolb, H.; Wolf, E. Insulin-like growth factor-binding protein-2 inhibits proliferation of human embryonic kidney fibroblasts and of IGF-responsive colon carcinoma cell lines. *FEBS Lett.* **1998**, *434*, 329–334, doi:10.1016/s0014-5793(98)01011-4.
14. Sawitzky, M.; Zeissler, A.; Langhammer, M.; Bielohuby, M.; Stock, P.; Hammon, H.M.; Görs, S.; Metges, C.C.; Stoehr, B.J.M.; Bidlingmaier, M.; et al. Phenotype Selection Reveals Coevolution of Muscle Glycogen and Protein and PTEN as a Gate Keeper for the Accretion of Muscle Mass in Adult Female Mice. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e39711, doi:10.1371/journal.pone.0039711.
15. Walz, M.; Chau, L.; Walz, C.; Sawitzky, M.; Ohde, D.; Brenmoehl, J.; Tuchscherer, A.; Langhammer, M.; Metzger, F.; Höflich, C.; et al. Overlap of Peak Growth Activity and Peak IGF-1 to IGFBP Ratio: Delayed Increase of IGFBPs Versus IGF-1 in Serum as a Mechanism to Speed up and down Postnatal Weight Gain in Mice. *Cells* **2020**, *9*, 1516, doi:10.3390/cells9061516.
16. Höflich, A.; Fitzner, B.; Walz, C.; Hecker, M.; Tuchscherer, A.; Bastian, M.; Brenmoehl, J.; Schröder, I.; Willenberg, H.S.; Reincke, M.; et al. Systemic Effects by Intrathecal Administration of Triamcinolone Acetonide in Patients With Multiple Sclerosis. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2020**, *11*, 574.
17. Höflich, A.; Fitzner, B.; Walz, C.; Hecker, M.; Tuchscherer, A.; Brenmoehl, J.; Zettl, U.K. Reduced Fragmentation of IGFBP-2 and IGFBP-3 as a Potential Mechanism for Decreased Ratio of IGF-II to IGFBPs in Cerebrospinal Fluid in Response to Repeated Intrathecal Administration of Triamcinolone Acetonide in Patients With Multiple Sclerosis. *Front. Endocrinol.* **2021**, *11*, doi:10.3389/fendo.2020.565557.
18. Frystyk, J. Quantification of the GH/IGF-axis components: Lessons from human studies. *Domest. Anim. Endocrinol.* **2012**, *43*, 186–197, doi:10.1016/j.domaniend.2011.11.005.
19. Höflich, A.; Reisinger, R.; Lahm, H.; Kiess, W.; Blum, W.F.; Kolb, H.J.; Weber, M.M.; Wolf, E. Insulin-like growth factor-binding protein 2 in tumorigenesis: Protector or promoter? *Cancer Res.* **2001**, *61*, 8601–8610.
20. Höflich, A. Contrasting bone effects of temporary versus permanent IGFBP administration in rodents. *Growth Horm. IGF Res.* **2008**, *18*, 181–187, doi:10.1016/j.ghir.2008.01.003.
21. Kull, F.C.; Jacobs, S.; Su, Y.F.; E Svoboda, M.; Van Wyk, J.J.; Cuatrecasas, P. Monoclonal antibodies to receptors for insulin and somatomedin-C. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 6561–6566.
22. Duronio, V.; Jacobs, S.; A Romero, P.; Herscovics, A. Effects of inhibitors of N-linked oligosaccharide processing on the biosynthesis and function of insulin and insulin-like growth factor-I receptors. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 5436–5445.
23. Wittman, M.D.; Carboni, J.M.; Yang, Z.; Lee, F.Y.; Antman, M.; Attar, R.; Balimane, P.; Chang, C.; Chen, C.; Discenza, L.; et al. Discovery of a 2,4-Disubstituted Pyrrolo[1,2-f][1,2,4]triazine Inhibitor (BMS-754807) of Insulin-like Growth Factor Receptor (IGF-1R) Kinase in Clinical Development. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7360–7363, doi:10.1021/jm900786r.
24. Carboni, J.M.; Wittman, M.; Yang, Z.; Lee, F.; Greer, A.; Hurlburt, W.; Hillerman, S.; Cao, C.; Cantor, G.H.; Dell-John, J.; et al. BMS-754807, a small molecule inhibitor of insulin-like growth factor-1R/IR. *Mol. Cancer Ther.* **2009**, *8*, 3341–3349, doi:10.1158/1535-7163.mct-09-0499.
25. Blazek, M.; Santisteban, T.S.; Zengerle, R.; Meier, M. Analysis of fast protein phosphorylation kinetics in single cells on a microfluidic chip. *Lab Chip* **2015**, *15*, 726–734, doi:10.1039/c4lc00797b.
26. A Brockmann, G.; Haley, C.S.; Renne, U.; A Knott, S.; Schwerin, M. Quantitative trait loci affecting body weight and fatness from a mouse line selected for extreme high growth. *Genetics* **1998**, *150*, 369–381.
27. Brohus, M.; Gorbunova, V.; Faulkes, C.G.; Overgaard, M.T.; Conover, C.A. The Insulin-Like Growth Factor System in the Long-Lived Naked Mole-Rat. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0145587, doi:10.1371/journal.pone.0145587.
28. Braude, S.; Holtze, S.; Begall, S.; Brenmoehl, J.; Burda, H.; Dammann, P.; Del Marmol, D.; Gorshkova, E.; Henning, Y.; Höflich, A.; et al. Surprisingly long survival of premature conclusions about naked mole-rat biology. *Biol. Rev.* **2020**, doi:10.1111/brv.12660.
29. Liu, J.; Spéder, P.; Brand, A.H. Control of brain development and homeostasis by local and systemic insulin signalling. *Diabetes Obes. Metab.* **2014**, *16*, 16–20, doi:10.1111/dom.12337.
30. Åberg, D.; Johansson, P.; Isgaard, J.; Wallin, A.; Johansson, J.-O.; Andreasson, U.; Blennow, K.; Zetterberg, H.; Åberg, N.D.; Svensson, J. Increased Cerebrospinal Fluid Level of Insulin-like Growth Factor-II in Male Patients with Alzheimer’s Disease. *J. Alzheimer’s Dis.* **2015**, *48*, 637–646, doi:10.3233/jad-150351.
31. Chen, Y.; Liu, X.-H.; Wu, J.-J.; Ren, H.-M.; Wang, J.; Ding, Z.-T.; Jiang, Y.-P. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Ther. Med.* **2016**, *11*, 2095–2106, doi:10.3892/etm.2016.3210.
32. Meyer, Z.; Höflich, C.; Wirthgen, E.; Olm, S.; Hammon, H.M.; Höflich, A. Analysis of the IGF-system in milk from farm animals—Occurrence, regulation, and biomarker potential. *Growth Horm. IGF Res.* **2017**, *35*, 1–7, doi:10.1016/j.ghir.2017.05.004.
33. Höflich, A.; Meyer, Z. Functional analysis of the IGF-system in milk. *Best Pr. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2017**, *31*, 409–418, doi:10.1016/j.beem.2017.10.002.
34. Suikkari, A.-M. Insulin-like growth factor (IGF-I) and its low molecular weight binding protein in human milk. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **1989**, *30*, 19–25, doi:10.1016/0028-2243(89)90089-0.
35. Elmlinger, M.W.; Grund, R.; Buck, M.; A Wollmann, H.; Feist, N.; Weber, M.M.; Speer, C.P.; Ranke, M.B. Limited Proteolysis of the IGF Binding Protein-2 (IGFBP-2) by a Specific Serine Protease Activity in Early Breast Milk. *Pediatr. Res.* **1999**, *46*, 76–81, doi:10.1203/00006450-199907000-00013.

-
36. Sejrsen, K.; Pedersen, L.O.; Vestergaard, M.; Purup, S. Biological activity of bovine milk: Contribution of IGF-I and IGF binding proteins. *Livest. Prod. Sci.* **2001**, *70*, 79–85.
 37. Purup, S.; Vestergaard, M.; O Pedersen, L.; Sejrsen, K. Biological activity of bovine milk on proliferation of human intestinal cells. *J. Dairy Res.* **2006**, *74*, 58–65, doi:10.1017/s0022029906002093.

3. Referenzen

Publikationen

1. Daughaday, W. H. "A Personal History of the Origin of the Somatomedin Hypothesis and Recent Challenges to Its Validity." *Perspect Biol Med* 32, no. 2 (1989): 194-211.
2. Argente, J., N. Caballo, V. Barrios, M. T. Muñoz, J. Pozo, J. A. Chowen, G. Morandé, and M. Hernández. "Multiple Endocrine Abnormalities of the Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor Axis in Patients with Anorexia Nervosa: Effect of Short- and Long-Term Weight Recuperation." *J Clin Endocrinol Metab* 82, no. 7 (1997): 2084-92.
3. Argente, J., N. Caballo, V. Barrios, J. Pozo, M. T. Muñoz, J. A. Chowen, and M. Hernández. "Multiple Endocrine Abnormalities of the Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor Axis in Prepubertal Children with Exogenous Obesity: Effect of Short- and Long-Term Weight Reduction." *J Clin Endocrinol Metab* 82, no. 7 (1997): 2076-83.
4. Katic, M., and C. R. Kahn. "The Role of Insulin and Igf-1 Signaling in Longevity." *Cell Mol Life Sci* 62, no. 3 (2005): 320-43.
5. Yakar, S., H. Werner, and C. J. Rosen. "Insulin-Like Growth Factors: Actions on the Skeleton." *J Mol Endocrinol* 61, no. 1 (2018): T115-t37.
6. Fernandez, A. M., and I. Torres-Alemán. "The Many Faces of Insulin-Like Peptide Signalling in the Brain." *Nat Rev Neurosci* 13, no. 4 (2012): 225-39.
7. Muller, A. P., A. M. Fernandez, C. Haas, E. Zimmer, L. V. Portela, and I. Torres-Aleman. "Reduced Brain Insulin-Like Growth Factor I Function During Aging." *Mol Cell Neurosci* 49, no. 1 (2012): 9-12.
8. Torres Aleman, I. "Insulin-Like Growth Factor-1 and Central Neurodegenerative Diseases." *Endocrinol Metab Clin North Am* 41, no. 2 (2012): 395-408, vii.
9. Berryman, D. E., J. S. Christiansen, G. Johannsson, M. O. Thorner, and J. J. Kopchick. "Role of the Gh/Igf-1 Axis in Lifespan and Healthspan: Lessons from Animal Models." *Growth Horm IGF Res* 18, no. 6 (2008): 455-71.
10. Feifel, D., and F. J. Vaccarino. "Growth Hormone-Regulatory Peptides (Ghrh and Somatostatin) and Feeding: A Model for the Integration of Central and Peripheral Function." *Neurosci Biobehav Rev* 18, no. 3 (1994): 421-33.
11. Argente, J., J. A. Chowen, L. A. Perez-Jurado, J. Frystyk, and C. Oxvig. "One Level Up: Abnormal Proteolytic Regulation of Igf Activity Plays a Role in Human Pathophysiology." *Embo Molecular Medicine* 9, no. 10 (2017): 1338-45.
12. Ranke, M. B., and J. M. Wit. "Growth Hormone - Past, Present and Future." *Nature Reviews Endocrinology* 14, no. 5 (2018): 285-300.
13. Hwa, V., Y. Oh, and R. G. Rosenfeld. "The Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein (Igfbp) Superfamily." *Endocr Rev* 20, no. 6 (1999): 761-87.
14. Nissley, P., and W. Lopaczynski. "Insulin-Like Growth Factor Receptors." *Growth Factors* 5, no. 1 (1991): 29-43.
15. Dahms, N. M., P. Lobel, and S. Kornfeld. "Mannose 6-Phosphate Receptors and Lysosomal Enzyme Targeting." *J Biol Chem* 264, no. 21 (1989): 12115-8.
16. Baxter, R. C., M. Binoux, D. R. Clemmons, C. Conover, S. L. S. Drop, J. M. P. Holly, S. Mohan, Y. Oh, and R. G. Rosenfeld. "Recommendations for Nomenclature of the Insulin-Like Growth Factor Binding Protein (Igfbp) Superfamily." *Growth Hormone & IGF Research* 8, no. 3 (1998): 273-74.
17. Shibata, Y., T. Tsukazaki, K. Hirata, C. Xin, and A. Yamaguchi. "Role of a New Member of Igfbp Superfamily, Igfbp-Rp10, in Proliferation and Differentiation of Osteoblastic Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 325, no. 4 (2004): 1194-200.
18. King, J. L., and C. Guidry. "Müller Cell Production of Insulin-Like Growth Factor-Binding Proteins in Vitro: Modulation with Phenotype and Growth Factor Stimulation." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, no. 12 (2004): 4535-42.

19. Yau, S. W., W. J. Azar, M. A. Sabin, G. A. Werther, and V. C. Russo. "Igfbp-2-Taking the Lead in Growth, Metabolism and Cancer." *Journal of Cell Communication and Signaling* 9, no. 2 (2015): 125-42.
20. Monget, P., S. Mazerbourg, T. Delpuech, M. C. Maurel, S. Manière, J. Zapf, G. Lalmanach, C. Oxvig, and M. T. Overgaard. "Pregnancy-Associated Plasma Protein-a Is Involved in Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2 (Igfbp-2) Proteolytic Degradation in Bovine and Porcine Preovulatory Follicles: Identification of Cleavage Site and Characterization of Igfbp-2 Degradation." *Biol Reprod* 68, no. 1 (2003): 77-86.
21. Oxvig, C. "The Role of Papp-a in the Igf System: Location, Location, Location." *Journal of Cell Communication and Signaling* 9, no. 2 (2015): 177-87.
22. Laursen, L. S., M. T. Overgaard, R. Sjøe, H. B. Boldt, L. Sottrup-Jensen, L. C. Giudice, C. A. Conover, and C. Oxvig. "Pregnancy-Associated Plasma Protein-a (Papp-a) Cleaves Insulin-Like Growth Factor Binding Protein (Igfbp)-5 Independent of Igf: Implications for the Mechanism of Igfbp-4 Proteolysis by Papp-A." *FEBS Lett* 504, no. 1-2 (2001): 36-40.
23. Overgaard, M. T., H. B. Boldt, L. S. Laursen, L. Sottrup-Jensen, C. A. Conover, and C. Oxvig. "Pregnancy-Associated Plasma Protein-A2 (Papp-A2), a Novel Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-5 Proteinase." *J Biol Chem* 276, no. 24 (2001): 21849-53.
24. Christians, J. K., A. Hoeflich, and P. D. Keightley. "Pappa2, an Enzyme That Cleaves an Insulin-Like Growth-Factor-Binding Protein, Is a Candidate Gene for a Quantitative Trait Locus Affecting Body Size in Mice." *Genetics* 173, no. 3 (2006): 1547-53.
25. Kløverpris, S., J. H. Mikkelsen, J. H. Pedersen, M. R. Jepsen, L. S. Laursen, S. V. Petersen, and C. Oxvig. "Stanniocalcin-1 Potently Inhibits the Proteolytic Activity of the Metalloproteinase Pregnancy-Associated Plasma Protein-A." *J Biol Chem* 290, no. 36 (2015): 21915-24.
26. Jepsen, M. R., S. Kløverpris, J. H. Mikkelsen, J. H. Pedersen, E. M. Füchtbauer, L. S. Laursen, and C. Oxvig. "Stanniocalcin-2 Inhibits Mammalian Growth by Proteolytic Inhibition of the Insulin-Like Growth Factor Axis." *J Biol Chem* 290, no. 6 (2015): 3430-9.
27. Marouli, E., M. Graff, C. Medina-Gomez, K. S. Lo, A. R. Wood, T. R. Kjaer, R. S. Fine, Y. Lu, C. Schurmann, H. M. Highland, S. Rieger, G. Thorleifsson, A. E. Justice, D. Lamparter, K. E. Stirrups, V. Turcot, K. L. Young, T. W. Winkler, T. Esko, T. Karaderi, et al. "Rare and Low-Frequency Coding Variants Alter Human Adult Height." *Nature* 542, no. 7640 (2017): 186-90.
28. Rosenzweig, S. A. "The Continuing Evolution of Insulin-Like Growth Factor Signaling." *F1000Res* 9 (2020).
29. Chan, J. M., M. J. Stampfer, E. Giovannucci, P. H. Gann, J. Ma, P. Wilkinson, C. H. Hennekens, and M. Pollak. "Plasma Insulin-Like Growth Factor-I and Prostate Cancer Risk: A Prospective Study." *Science* 279, no. 5350 (1998): 563-6.
30. Pollak, M. N., E. S. Schernhammer, and S. E. Hankinson. "Insulin-Like Growth Factors and Neoplasia." *Nat Rev Cancer* 4, no. 7 (2004): 505-18.
31. Cao, Y., K. Nimptsch, I. M. Shui, E. A. Platz, K. Wu, M. N. Pollak, S. A. Kenfield, M. J. Stampfer, and E. L. Giovannucci. "Prediagnostic Plasma Igfbp-1, Igf-1 and Risk of Prostate Cancer." *Int J Cancer* 136, no. 10 (2015): 2418-26.
32. Trejo, J. L., J. Piriz, M. V. Llorens-Martin, A. M. Fernandez, M. Bolós, D. LeRoith, A. Nuñez, and I. Torres-Aleman. "Central Actions of Liver-Derived Insulin-Like Growth Factor I Underlying Its Pro-Cognitive Effects." *Mol Psychiatry* 12, no. 12 (2007): 1118-28.
33. Kopf, D., and L. Frölich. "Risk of Incident Alzheimer's Disease in Diabetic Patients: A Systematic Review of Prospective Trials." *J Alzheimers Dis* 16, no. 4 (2009): 677-85.
34. Eaton, W. W., H. Armenian, J. Gallo, L. Pratt, and D. E. Ford. "Depression and Risk for Onset of Type II Diabetes. A Prospective Population-Based Study." *Diabetes Care* 19, no. 10 (1996): 1097-102.
35. Ospina-Romero, M., E. Abdiwahab, L. Kobayashi, T. Filshtein, W. D. Brenowitz, E. R. Mayeda, and M. M. Glymour. "Rate of Memory Change before and after Cancer Diagnosis." *JAMA Netw Open* 2, no. 6 (2019): e196160.

36. Song, Fei, Xiao-Xia Zhou, Yu Hu, Gang Li, and Yan Wang. "The Roles of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein Family in Development and Diseases." *Advances in Therapy* 38, no. 2 (2021): 885-903.
37. Lundin, H., M. Sääf, L. E. Strender, S. Nyren, S. E. Johansson, and H. Salminen. "High Serum Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 1 (Igfbp-1) Is Associated with High Fracture Risk Independent of Insulin-Like Growth Factor 1 (Igf-I)." *Calcif Tissue Int* 99, no. 4 (2016): 333-9.
38. Xu, Yi-Wei, Hao Chen, Chao-Qun Hong, Ling-Yu Chu, Shi-Han Yang, Li-Sheng Huang, Hong Guo, Liu-Yi Chen, Can-Tong Liu, Xin-Yi Huang, Lie-Hao Lin, Shu-Lin Chen, Zhi-Yong Wu, Yu-Hui Peng, Li-Yan Xu, and En-Min Li. "Serum Igfbp-1 as a Potential Biomarker for Diagnosis of Early-Stage Upper Gastrointestinal Tumour." *EBioMedicine* 51 (2020): 102566.
39. Frommer, K. W., K. Reichenmiller, B. S. Schutt, A. Hoeflich, M. B. Ranke, G. Dodt, and M. W. Elmlinger. "Igf-Independent Effects of Igfbp-2 on the Human Breast Cancer Cell Line Hs578t." *J Mol Endocrinol* 37, no. 1 (2006): 13-23.
40. McGrath, E. R., J. J. Himali, D. Levy, S. C. Conner, C. S. DeCarli, M. P. Pase, P. Courchesne, C. L. Satizabal, R. S. Vasani, A. S. Beiser, and S. Seshadri. "Circulating Igfbp-2: A Novel Biomarker for Incident Dementia." *Ann Clin Transl Neurol* 6, no. 9 (2019): 1659-70.
41. Wittenbecher, C., M. Ouni, O. Kuxhaus, M. Jähnert, P. Gottmann, A. Teichmann, K. Meidtner, J. Kriebel, H. Grallert, T. Pischon, H. Boeing, M. B. Schulze, and A. Schürmann. "Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 2 (Igfbp-2) and the Risk of Developing Type 2 Diabetes." *Diabetes* 68, no. 1 (2019): 188-97.
42. van den Beld, A. W., O. D. Carlson, M. E. Doyle, D. Rizopoulos, L. Ferrucci, A. J. van der Lely, and J. M. Egan. "Igfbp-2 and Aging: A 20-Year Longitudinal Study on Igfbp-2, Igf-I, Bmi, Insulin Sensitivity and Mortality in an Aging Population." *Eur J Endocrinol* 180, no. 2 (2019): 109-16.
43. Wirthgen, E., C. Höflich, M. Spitschak, C. Helmer, B. Brand, J. Langbein, F. Metzger, and A. Hoeflich. "Quantitative Western Ligand Blotting Reveals Common Patterns and Differential Features of Igfbp-Fingerprints in Domestic Ruminant Breeds and Species." *Growth Horm IGF Res* 26 (2016): 42-9.
44. Varma Shrivastav, S., A. Bhardwaj, K. A. Pathak, and A. Shrivastav. "Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 (Igfbp-3): Unraveling the Role in Mediating Igf-Independent Effects within the Cell." *Front Cell Dev Biol* 8 (2020): 286.
45. Perks, C. M., C. McCaig, and J. M. Holly. "Differential Insulin-Like Growth Factor (Igf)-Independent Interactions of Igf Binding Protein-3 and Igf Binding Protein-5 on Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. Involvement of the Mitochondria." *J Cell Biochem* 80, no. 2 (2000): 248-58.
46. Fu, P., J. A. Thompson, and L. A. Bach. "Promotion of Cancer Cell Migration: An Insulin-Like Growth Factor (Igf)-Independent Action of Igf-Binding Protein-6." *J Biol Chem* 282, no. 31 (2007): 22298-306.
47. Elloumi, M., N. El Elj, M. Zaouali, F. Maso, E. Filaire, Z. Tabka, and G. Lac. "Igfbp-3, a Sensitive Marker of Physical Training and Overtraining." *Br J Sports Med* 39, no. 9 (2005): 604-10.
48. Wright, R. J., J. M. Holly, R. Galea, M. Brincat, and H. D. Mason. "Insulin-Like Growth Factor (Igf)-Independent Effects of Igf Binding Protein-4 on Human Granulosa Cell Steroidogenesis." *Biol Reprod* 67, no. 3 (2002): 776-81.
49. Konev, A. A., A. V. Kharitonov, F. N. Rozov, E. P. Altshuler, D. V. Serebryanaya, J. Lassus, V. P. Harjola, A. G. Katrukha, and A. B. Postnikov. "Ct-Igfbp-4 as a Novel Prognostic Biomarker in Acute Heart Failure." *ESC Heart Fail* 7, no. 2 (2020): 434-44.
50. Cediël, G., F. Rueda, C. Oxvig, T. Oliveras, C. Labata, O. de Diego, M. Ferrer, M. C. Aranda-Nevado, J. Serra-Gregori, J. Núñez, C. García, and A. Bayes-Genis. "Prognostic Value of the Stanniocalcin-2/Papp-a/Igfbp-4 Axis in ST-Segment Elevation Myocardial Infarction." *Cardiovasc Diabetol* 17, no. 1 (2018): 63.
51. Hjortebjerg, R., L. Tarnow, A. Jorsal, H. H. Parving, P. Rossing, M. Bjerre, and J. Frystyk. "Igfbp-4 Fragments as Markers of Cardiovascular Mortality in Type 1 Diabetes Patients with and without Nephropathy." *J Clin Endocrinol Metab* 100, no. 8 (2015): 3032-40.

52. Yu, J. S., and W. Cui. "Proliferation, Survival and Metabolism: The Role of Pi3k/Akt/Mtor Signalling in Pluripotency and Cell Fate Determination." *Development* 143, no. 17 (2016): 3050-60.
53. Shen, X., G. Xi, C. Wai, and D. R. Clemmons. "The Coordinate Cellular Response to Insulin-Like Growth Factor-I (Igf-I) and Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-2 (Igfbp-2) Is Regulated through Vimentin Binding to Receptor Tyrosine Phosphatase Beta (Rptpbeta)." *J Biol Chem* 290, no. 18 (2015): 11578-90.
54. Reddan, J. R., and D. C. Dziedzic. "Insulin-Like Growth Factors, Igf-1, Igf-2 and Somatomedin C Trigger Cell Proliferation in Mammalian Epithelial Cells Cultured in a Serum-Free Medium." *Exp Cell Res* 142, no. 2 (1982): 293-300.
55. Kurtz, A., W. Jelkmann, and C. Bauer. "A New Candidate for the Regulation of Erythropoiesis. Insulin-Like Growth Factor I." *FEBS Lett* 149, no. 1 (1982): 105-8.
56. Stracke, M. L., E. C. Kohn, S. A. Aznavoorian, L. L. Wilson, D. Salomon, H. C. Krutzsch, L. A. Liotta, and E. Schiffmann. "Insulin-Like Growth Factors Stimulate Chemotaxis in Human Melanoma Cells." *Biochem Biophys Res Commun* 153, no. 3 (1988): 1076-83.
57. Sadick, M. D., A. Intintoli, V. Quarmby, A. McCoy, E. Canova-Davis, and V. Ling. "Kinase Receptor Activation (Kira): A Rapid and Accurate Alternative to End-Point Bioassays." *J Pharm Biomed Anal* 19, no. 6 (1999): 883-91.
58. Rajaram, S., D. J. Baylink, and S. Mohan. "Insulin-Like Growth Factor-Binding Proteins in Serum and Other Biological Fluids: Regulation and Functions." *Endocr Rev* 18, no. 6 (1997): 801-31.
59. Juul, A., P. Dalgaard, W. F. Blum, P. Bang, K. Hall, K. F. Michaelsen, J. Müller, and N. E. Skakkebaek. "Serum Levels of Insulin-Like Growth Factor (Igf)-Binding Protein-3 (Igfbp-3) in Healthy Infants, Children, and Adolescents: The Relation to Igf-I, Igf-II, Igfbp-1, Igfbp-2, Age, Sex, Body Mass Index, and Pubertal Maturation." *J Clin Endocrinol Metab* 80, no. 8 (1995): 2534-42.
60. Meyer, Z., C. Höflich, E. Wirthgen, S. Olm, H. M. Hammon, and A. Hoeflich. "Analysis of the Igf-System in Milk from Farm Animals - Occurrence, Regulation, and Biomarker Potential." *Growth Horm IGF Res* 35 (2017): 1-7.
61. Hoeflich, A., and Z. Meyer. "Functional Analysis of the Igf-System in Milk." *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 31, no. 4 (2017): 409-18.
62. Suikkari, A. M. "Insulin-Like Growth Factor (Igf-I) and Its Low Molecular Weight Binding Protein in Human Milk." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 30, no. 1 (1989): 19-25.
63. Sejrsen, K., L. O. Pedersen, M. Vestergaard, and S. Purup. "Biological Activity of Bovine Milk: Contribution of Igf-I and Igf Binding Proteins." *Livestock Production Science* 70, no. 1 (2001): 79-85.
64. Donovan, S. M., R. L. Hintz, and R. G. Rosenfeld. "Investigation into the Potential Physiological Sources of Rat Milk Igf-I and Igf-Binding Proteins." *J Endocrinol* 145, no. 3 (1995): 569-78.
65. Elmlinger, M. W., R. Grund, M. Buck, H. A. Wollmann, N. Feist, M. M. Weber, C. P. Speer, and M. B. Ranke. "Limited Proteolysis of the Igf Binding Protein-2 (Igfbp-2) by a Specific Serine Protease Activity in Early Breast Milk." *Pediatr Res* 46, no. 1 (1999): 76-81.
66. Gargosky, S. E., H. M. Pham, K. F. Wilson, F. Liu, L. C. Giudice, and R. G. Rosenfeld. "Measurement and Characterization of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 in Human Biological Fluids: Discrepancies between Radioimmunoassay and Ligand Blotting." *Endocrinology* 131, no. 6 (1992): 3051-60.
67. Drop, S. L., D. J. Kortleve, and H. J. Guyda. "Isolation of a Somatomedin-Binding Protein from Preterm Amniotic Fluid. Development of a Radioimmunoassay." *J Clin Endocrinol Metab* 59, no. 5 (1984): 899-907.
68. Binoux, M., and P. Hossenlopp. "Insulin-Like Growth Factor (Igf) and Igf-Binding Proteins: Comparison of Human Serum and Lymph." *J Clin Endocrinol Metab* 67, no. 3 (1988): 509-14.
69. Binoux, M., M. Roghani, P. Hossenlopp, S. Hardouin, and M. Gourmelen. "Molecular Forms of Human Igf Binding Proteins: Physiological Implications." *Acta Endocrinol (Copenh)* 124 Suppl 2 (1991): 41-7.

70. Cataldo, N. A., and L. C. Giudice. "Insulin-Like Growth Factor Binding Protein Profiles in Human Ovarian Follicular Fluid Correlate with Follicular Functional Status." *J Clin Endocrinol Metab* 74, no. 4 (1992): 821-9.
71. Chandrasekher, Y. A., H. J. Van Dessel, B. C. Fauser, and L. C. Giudice. "Estrogen- but Not Androgen-Dominant Human Ovarian Follicular Fluid Contains an Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-4 Protease." *J Clin Endocrinol Metab* 80, no. 9 (1995): 2734-9.
72. Giudice, L. C. "Insulin-Like Growth Factors and Ovarian Follicular Development." *Endocr Rev* 13, no. 4 (1992): 641-69.
73. Giudice, L. C., E. M. Farrell, H. Pham, and R. G. Rosenfeld. "Identification of Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-3 (Igfbp-3) and Igfbp-2 in Human Follicular Fluid." *J Clin Endocrinol Metab* 71, no. 5 (1990): 1330-8.
74. Kallestrup, M., J. Frystyk, U. Espelund, R. Hjortebjerg, H. Tankisi, and H. Andersen. "Papp-a Activity Is Increased in Cerebrospinal Fluid from Patients with Diabetic Polyneuropathy and Correlates with Peripheral Nerve Impairment." *Growth Horm IGF Res* 48-49 (2019): 53-59.
75. Rosenfeld, R. G., H. Pham, C. A. Conover, R. L. Hintz, and R. C. Baxter. "Structural and Immunological Comparison of Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins of Cerebrospinal and Amniotic Fluids." *J Clin Endocrinol Metab* 68, no. 3 (1989): 638-46.
76. Strehle, M., and S. Britisch. "Tiermodelle in Der Biomedizinischen Forschung." 2008.
77. Hoeflich, A., S. Nedbal, W. F. Blum, M. Erhard, H. Lahm, G. Brem, H. J. Kolb, R. Wanke, and E. Wolf. "Growth Inhibition in Giant Growth Hormone Transgenic Mice by Overexpression of Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-2." *Endocrinology* 142, no. 5 (2001): 1889-98.
78. Rehfeldt, C., U. Renne, M. Sawitzky, G. Binder, and A. Hoeflich. "Increased Fat Mass, Decreased Myofiber Size, and a Shift to Glycolytic Muscle Metabolism in Adolescent Male Transgenic Mice Overexpressing Igfbp-2." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299, no. 2 (2010): E287-98.
79. Hoeflich, A., M. Wu, S. Mohan, J. Föll, R. Wanke, T. Froehlich, G. J. Arnold, H. Lahm, H. J. Kolb, and E. Wolf. "Overexpression of Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-2 in Transgenic Mice Reduces Postnatal Body Weight Gain." *Endocrinology* 140, no. 12 (1999): 5488-96.
80. Eckstein, F., T. Pavicic, S. Nedbal, C. Schmidt, U. Wehr, W. Rambeck, E. Wolf, and A. Hoeflich. "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)* 206, no. 1-2 (2002): 139-48.
81. Wood, T. L., L. Rogler, R. D. Streck, J. Cerro, B. Green, A. Grewal, and J. E. Pintar. "Targeted Disruption of Igfbp-2 Gene." *Growth Regul* 3, no. 1 (1993): 5-8.
82. Wood, T. L., L. E. Rogler, M. E. Czick, A. G. Schuller, and J. E. Pintar. "Selective Alterations in Organ Sizes in Mice with a Targeted Disruption of the Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2 Gene." *Mol Endocrinol* 14, no. 9 (2000): 1472-82.
83. Sabin, M. A., V. C. Russo, W. J. Azar, S. W. Yau, W. Kiess, and G. A. Werther. "Igfbp-2 at the Interface of Growth and Metabolism--Implications for Childhood Obesity." *Pediatr Endocrinol Rev* 8, no. 4 (2011): 382-93.
84. Jensen, V. S., T. Porsgaard, J. Lykkesfeldt, and H. Hvid. "Rodent Model Choice Has Major Impact on Variability of Standard Preclinical Readouts Associated with Diabetes and Obesity Research." *Am J Transl Res* 8, no. 8 (2016): 3574-84.
85. Tuttle, A. H., V. M. Philip, E. J. Chesler, and J. S. Mogil. "Comparing Phenotypic Variation between Inbred and Outbred Mice." *Nat Methods* 15, no. 12 (2018): 994-96.
86. Bevova, M. R., Y. S. Aulchenko, S. Aksu, U. Renne, and G. A. Brockmann. "Chromosome-Wise Dissection of the Genome of the Extremely Big Mouse Line Du6i." *Genetics* 172, no. 1 (2006): 401-10.
87. Bünger, L., U. Renne, G. Dietl, and S. Kuhla. "Long-Term Selection for Protein Amount over 70 Generations in Mice." *Genet Res* 72, no. 2 (1998): 93-109.
88. Dietl, G., M. Langhammer, and U. Renne. "Model Simulations for Genetic Random Drift in the Outbred Strain Fzt:Du." *Arch. Anim. Breed.* 47, no. 6 (2004): 595-604.
90. Braude, S., S. Holtze, S. Begall, J. Brenmoehl, H. Burda, P. Dammann, D. Del Marmol, E. Gorshkova, Y. Henning, A. Hoeflich, A. Höhn, T. Jung, D. Hamo, A. Sahm, Y. Shebzukhov, R.

- Šumbera, S. Miwa, M. Y. Vyssokikh, T. von Zglinicki, O. Averina, et al. "Surprisingly Long Survival of Premature Conclusions About Naked Mole-Rat Biology." *Biol Rev Camb Philos Soc* (2020).
91. Buffenstein, R. "The Naked Mole-Rat: A New Long-Living Model for Human Aging Research." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 60, no. 11 (2005): 1369-77.
 92. Buffenstein, R. "Negligible Senescence in the Longest Living Rodent, the Naked Mole-Rat: Insights from a Successfully Aging Species." *J Comp Physiol B* 178, no. 4 (2008): 439-45.
 93. Buffenstein, R., and J. U. Jarvis. "The Naked Mole Rat--a New Record for the Oldest Living Rodent." *Sci Aging Knowledge Environ* 2002, no. 21 (2002): pe7.
 94. Edrey, Y. H., M. Hanes, M. Pinto, J. Mele, and R. Buffenstein. "Successful Aging and Sustained Good Health in the Naked Mole Rat: A Long-Lived Mammalian Model for Biogerontology and Biomedical Research." *Ilar j* 52, no. 1 (2011): 41-53.
 95. Ruby, J. G., M. Smith, and R. Buffenstein. "Naked Mole-Rat Mortality Rates Defy Gompertzian Laws by Not Increasing with Age." *Elife* 7 (2018).
 96. Valenzano, D. R., A. Aboobaker, A. Seluanov, and V. Gorbunova. "Non-Canonical Aging Model Systems and Why We Need Them." *EMBO J* 36, no. 8 (2017): 959-63.
 97. Delaney, M. A., L. Nagy, M. J. Kinsel, and P. M. Treuting. "Spontaneous Histologic Lesions of the Adult Naked Mole Rat (*Heterocephalus Glaber*): A Retrospective Survey of Lesions in a Zoo Population." *Vet Pathol* 50, no. 4 (2013): 607-21.
 98. Shepard, A., and J. L. Kissil. "The Use of Non-Traditional Models in the Study of Cancer Resistance-the Case of the Naked Mole Rat." *Oncogene* 39, no. 28 (2020): 5083-97.
 99. Junnila, R. K., E. O. List, D. E. Berryman, J. W. Murrey, and J. J. Kopchick. "The Gh/Igf-1 Axis in Ageing and Longevity." *Nature Reviews Endocrinology* 9, no. 6 (2013): 366-76.
 100. Brohus, M., V. Gorbunova, C. G. Faulkes, M. T. Overgaard, and C. A. Conover. "The Insulin-Like Growth Factor System in the Long-Lived Naked Mole-Rat." *PLoS One* 10, no. 12 (2015): e0145587.
 101. Fang, X., I. Seim, Z. Huang, M. V. Gerashchenko, Z. Xiong, A. A. Turanov, Y. Zhu, A. V. Lobanov, D. Fan, S. H. Yim, X. Yao, S. Ma, L. Yang, S. G. Lee, E. B. Kim, R. T. Bronson, R. Šumbera, R. Buffenstein, X. Zhou, A. Krogh, et al. "Adaptations to a Subterranean Environment and Longevity Revealed by the Analysis of Mole Rat Genomes." *Cell Rep* 8, no. 5 (2014): 1354-64.
 102. Höflich, A., H. Lahm, W. Blum, H. Kolb, and E. Wolf. "Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-2 Inhibits Proliferation of Human Embryonic Kidney Fibroblasts and of Igf-Responsive Colon Carcinoma Cell Lines." *FEBS Lett* 434, no. 3 (1998): 329-34.
 103. Hoeflich, A., B. Fitzner, C. Walz, M. Hecker, A. Tuchscherer, M. Bastian, J. Brenmoehl, I. Schröder, H. S. Willenberg, M. Reincke, and U. K. Zettl. "Systemic Effects by Intrathecal Administration of Triamcinolone Acetonide in Patients with Multiple Sclerosis." *Front Endocrinol (Lausanne)* 11 (2020): 574.
 104. Hoeflich, A., B. Fitzner, C. Walz, M. Hecker, A. Tuchscherer, J. Brenmoehl, and U. K. Zettl. "Reduced Fragmentation of Igfbp-2 and Igfbp-3 as a Potential Mechanism for Decreased Ratio of Igf-ii to Igfbps in Cerebrospinal Fluid in Response to Repeated Intrathecal Administration of Triamcinolone Acetonide in Patients with Multiple Sclerosis." *Frontiers in Endocrinology* 11, no. 978 (2021).
 107. Takabatake, Y., C. Oxvig, C. Nagi, K. Adelson, S. Jaffer, H. Schmidt, P. J. Keely, K. W. Eliceiri, J. Mandeli, and D. Germain. "Lactation Opposes Pappalysin-1-Driven Pregnancy-Associated Breast Cancer." *Embo Molecular Medicine* 8, no. 4 (2016): 388-406.
 108. Chen, Y., L. Li, E. Wang, L. Zhang, and Q. Zhao. "Abnormal Expression of Pappa2 Gene May Indirectly Affect Mouse Hip Development through the Igf Signaling Pathway." *Endocrine* 65, no. 2 (2019): 440-50.
 109. Hjortebjerg, R., D. E. Berryman, R. Comisford, E. O. List, C. Oxvig, M. Bjerre, J. Frystyk, and J. J. Kopchick. "Depot-Specific and Gh-Dependent Regulation of Igf Binding Protein-4, Pregnancy-Associated Plasma Protein-a, and Stanniocalcin-2 in Murine Adipose Tissue." *Growth Horm IGF Res* 39 (2018): 54-61.

110. Brockmann, G. A., C. S. Haley, U. Renne, S. A. Knott, and M. Schwerin. "Quantitative Trait Loci Affecting Body Weight and Fatness from a Mouse Line Selected for Extreme High Growth." *Genetics* 150, no. 1 (1998): 369-81.
111. Timtchenko, D., J. Kratzsch, H. Sauerwein, J. Wegner, W. B. Souffrant, M. Schwerin, and G. A. Brockmann. "Fat Storage Capacity in Growth-Selected and Control Mouse Lines Is Associated with Line-Specific Gene Expression and Plasma Hormone Levels." *Int J Obes Relat Metab Disord* 23, no. 6 (1999): 586-94.
112. Friedrich, N., O. D. Wolthers, A. M. Arafat, R. T. Emeny, J. Spranger, J. Roswall, J. Kratzsch, H. J. Grabe, C. Hübener, A. F. Pfeiffer, A. Döring, M. Bielohuby, J. Dahlgren, J. Frystyk, H. Wallaschofski, and M. Bidlingmaier. "Age- and Sex-Specific Reference Intervals across Life Span for Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 3 (Igfbp-3) and the Igf-I to Igfbp-3 Ratio Measured by New Automated Chemiluminescence Assays." *J Clin Endocrinol Metab* 99, no. 5 (2014): 1675-86.
113. Bidlingmaier, M., N. Friedrich, R. T. Emeny, J. Spranger, O. D. Wolthers, J. Roswall, A. Körner, B. Obermayer-Pietsch, C. Hübener, J. Dahlgren, J. Frystyk, A. F. Pfeiffer, A. Doering, M. Bielohuby, H. Wallaschofski, and A. M. Arafat. "Reference Intervals for Insulin-Like Growth Factor-1 (Igf-I) from Birth to Senescence: Results from a Multicenter Study Using a New Automated Chemiluminescence Igf-I Immunoassay Conforming to Recent International Recommendations." *J Clin Endocrinol Metab* 99, no. 5 (2014): 1712-21.
114. Tanner, J.M., and J.M. Tanner. *Foetus into Man: Physical Growth from Conception to Maturity*: Harvard University Press, 1978.
115. Smith, W. J., T. J. Nam, L. E. Underwood, W. H. Busby, A. Celnicker, and D. R. Clemmons. "Use of Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-2 (Igfbp-2), Igfbp-3, and Igf-I for Assessing Growth Hormone Status in Short Children." *J Clin Endocrinol Metab* 77, no. 5 (1993): 1294-9.
116. Van Doorn, J., A. J. Cornelissen, and S. C. Van Buul-Offers. "Plasma Levels of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-4 (Igfbp-4) under Normal and Pathological Conditions." *Clin Endocrinol (Oxf)* 54, no. 5 (2001): 655-64.
117. Bereket, A., S. Turan, A. Omar, M. Berber, A. Ozen, C. Akbenlioglu, and G. Haklar. "Serum Igf-I and Igfbp-3 Levels of Turkish Children During Childhood and Adolescence: Establishment of Reference Ranges with Emphasis on Puberty." *Horm Res* 65, no. 2 (2006): 96-105.
118. Lupu, F., J. D. Terwilliger, K. Lee, G. V. Segre, and A. Efstratiadis. "Roles of Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor 1 in Mouse Postnatal Growth." *Dev Biol* 229, no. 1 (2001): 141-62.
119. Fujimoto, M., J. C. Khoury, P. R. Khoury, B. Kalra, A. Kumar, P. Sluss, C. Oxvig, V. Hwa, and A. Dauber. "Anthropometric and Biochemical Correlates of Papp-A2, Free Igf-I, and Igfbp-3 in Childhood." *Eur J Endocrinol* 182, no. 3 (2020): 363-74.
120. Hoefflich, A., L. Bünger, S. Nedbal, U. Renne, M. W. Elmlinger, W. F. Blum, C. Bruley, H. J. Kolb, and E. Wolf. "Growth Selection in Mice Reveals Conserved and Redundant Expression Patterns of the Insulin-Like Growth Factor System." *Gen Comp Endocrinol* 136, no. 2 (2004): 248-59.
121. Chen, B., X. Zeng, Y. He, X. Wang, Z. Liang, J. Liu, P. Zhang, H. Zhu, N. Xu, and S. Liang. "Stc2 Promotes the Epithelial-Mesenchymal Transition of Colorectal Cancer Cells through Akt-Erk Signaling Pathways." *Oncotarget* 7, no. 44 (2016): 71400-16.
122. Yakar, S., J. L. Liu, A. M. Fernandez, Y. Wu, A. V. Schally, J. Frystyk, S. D. Chernašek, W. Mejia, and D. Le Roith. "Liver-Specific Igf-1 Gene Deletion Leads to Muscle Insulin Insensitivity." *Diabetes* 50, no. 5 (2001): 1110-8.
123. Xi, G., X. Shen, L. A. Maile, C. Wai, K. Gollahon, and D. R. Clemmons. "Hyperglycemia Enhances Igf-I-Stimulated Src Activation Via Increasing Nox4-Derived Reactive Oxygen Species in a Pkc ζ -Dependent Manner in Vascular Smooth Muscle Cells." *Diabetes* 61, no. 1 (2012): 104-13.
124. Xi, G., X. Shen, C. Wai, C. K. Vilas, and D. R. Clemmons. "Hyperglycemia Stimulates P62/Pkc ζ Interaction, Which Mediates Nf-Kappab Activation, Increased Nox4 Expression, and Inflammatory Cytokine Activation in Vascular Smooth Muscle." *FASEB J* 29, no. 12 (2015): 4772-82.

125. Kull, F. C., Jr., S. Jacobs, Y. F. Su, and P. Cuatrecasas. "A Monoclonal Antibody to Human Insulin Receptor." *Biochem Biophys Res Commun* 106, no. 3 (1982): 1019-26.
126. Carboni, J. M., M. Wittman, Z. Yang, F. Lee, A. Greer, W. Hurlburt, S. Hillerman, C. Cao, G. H. Cantor, J. Dell-John, C. Chen, L. Discenza, K. Menard, A. Li, G. Trainor, D. Vyas, R. Kramer, R. M. Attar, and M. M. Gottardis. "Bms-754807, a Small Molecule Inhibitor of Insulin-Like Growth Factor-1r/Ir." *Mol Cancer Ther* 8, no. 12 (2009): 3341-9.
127. Wittman, M. D., J. M. Carboni, Z. Yang, F. Y. Lee, M. Antman, R. Attar, P. Balimane, C. Chang, C. Chen, L. Discenza, D. Frennesson, M. M. Gottardis, A. Greer, W. Hurlburt, W. Johnson, D. R. Langley, A. Li, J. Li, P. Liu, H. Mastalerz, et al. "Discovery of a 2,4-Disubstituted Pyrrolo[1,2-F][1,2,4]Triazine Inhibitor (Bms-754807) of Insulin-Like Growth Factor Receptor (Igf-1r) Kinase in Clinical Development." *J Med Chem* 52, no. 23 (2009): 7360-3.
128. Blazek, M., T. S. Santisteban, R. Zengerle, and M. Meier. "Analysis of Fast Protein Phosphorylation Kinetics in Single Cells on a Microfluidic Chip." *Lab Chip* 15, no. 3 (2015): 726-34.
129. Liu, J., P. Spéder, and A. H. Brand. "Control of Brain Development and Homeostasis by Local and Systemic Insulin Signalling." *Diabetes Obes Metab* 16 Suppl 1 (2014): 16-20.
130. Åberg, D., P. Johansson, J. Isgaard, A. Wallin, J. O. Johansson, U. Andreasson, K. Blennow, H. Zetterberg, N. D. Åberg, and J. Svensson. "Increased Cerebrospinal Fluid Level of Insulin-Like Growth Factor-Ii in Male Patients with Alzheimer's Disease." *J Alzheimers Dis* 48, no. 3 (2015): 637-46.
131. Chen, Y., X. H. Liu, J. J. Wu, H. M. Ren, J. Wang, Z. T. Ding, and Y. P. Jiang. "Proteomic Analysis of Cerebrospinal Fluid in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Exp Ther Med* 11, no. 6 (2016): 2095-106.
132. Purup, S., M. Vestergaard, O. Pedersen L, and K. Sejrsen. "Biological Activity of Bovine Milk on Proliferation of Human Intestinal Cells." *J Dairy Res* 74, no. 1 (2007): 58-65.
133. Morikawa, M., R. Derynck, and K. Miyazono. "Tgf-B and the Tgf-B Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8, no. 5 (2016).
134. Baker, J., J. P. Liu, E. J. Robertson, and A. Efstratiadis. "Role of Insulin-Like Growth Factors in Embryonic and Postnatal Growth." *Cell* 75, no. 1 (1993): 73-82.
135. Moerth, C., M. R. Schneider, I. Renner-Mueller, A. Blutke, M. W. Elmlinger, R. G. Erben, C. Camacho-Hübner, A. Hoeflich, and E. Wolf. "Postnatally Elevated Levels of Insulin-Like Growth Factor (Igf)-Ii Fail to Rescue the Dwarfism of Igf-I-Deficient Mice except Kidney Weight." *Endocrinology* 148, no. 1 (2007): 441-51.

Weblinks

89. Langhammer, M.; Wyrwat, E. "Webseite Servicegruppe Modelltierlaboratorium Des Leibniz-Institutes Für Nutztierforschung (Fbn)." <https://www.fbn-dummerstorf.de/institute/institut-fuer-genetik-und-biometrie/abteilungen-und-gruppen/servicegruppe-modelltierlaboratorium/> (accessed 12.03.2021).
105. Biolegend. <https://www.biolegend.com/fr-ch/western-blot> (accessed 26.03.2021).
106. Protein, WES Simple. <https://www.proteinsimple.com/wes.html> (accessed 26.03.2021).

4. Danksagung

Abschließen möchte ich mit einem großen Dank an alle Personen, welche mich beim Anfertigen und Verfassen dieser Arbeit unterstützt haben.

Um dieses Vorhaben realisieren zu können, danke ich der H.-Wilhelm-Schaumann-Stiftung für das Promotionsstipendium und dem Leibniz-Institut für Nutztierbiologie Dummerstorf (FBN). PD Dr. Andreas Höflich danke ich für die Bereitstellung des Themas, für die Unterstützung bei der Antragstellung für das Schaumann-Stipendium und die umfangreiche Betreuung während meiner Doktorarbeit.

Prof. Dr. Holger S. Willenberg von der Universitätsmedizin Rostock danke ich für die Betreuung und Übernahme der Begutachtung der Arbeit.

Durch die Beteiligung und Unterstützung großartiger Wissenschaftler konnten innerhalb dieser Promotion mehrere Publikationen hervorgehen. Darum bedanke ich mich bei PD Dr. Andreas Höflich, Prof. Dr. Friedrich Metzger, Prof. Dr. Eckhardt Wolf, Prof. Dr. Uwe K. Zettl und Prof. Dr. Thomas B. Hildebrandt. Es geht auch ein Dank an Dr. Mandy Sawitzky für Vorarbeiten und das Sammeln und Bereitstellen der Mäuseseren, an Dr. Christine Höflich für analytische Unterstützung, an Prof. Dr. Thomas B. Hildebrandt und Dr. Susanne Holtze für das Bereitstellen der Seren für Nacktmulle, und an Prof. Dr. Uwe K. Zettl für die Bereitstellung der humanen Serum- und CSF-Proben.

Da ein sehr großer Teil der Arbeit an Zelllinien erfolgt ist, die von PD Dr. Andreas Höflich und Prof. Dr. Eckhardt Wolf geschaffen wurden, geht auch noch einmal ein Dank an beide für das Bereitstellen der Zelllinien.

Es ist mir ein Anliegen, mich bei folgenden Personen vom Leibniz-Institut für Nutztierbiologie zu bedanken: Dr. Armin Tuchscherer danke ich für die Statistik-Auswertungen; Dr. Martina Langhammer und der gesamten Servicegruppe „Lab Animal Facility“ danke ich für die Anzucht, Pflege und Bereitstellung der Mäuse; und Dr. Andreas Vernunft und den Leuten an der Experimentieranlage Rind danke ich für die Beprobung der Rinder und Unterstützung bei der Methodenbeschreibung. Dr. Sebastian Galuska und Gesine Krüger danke ich für die Zusammenarbeit und Bereitstellung der Milchproben; Frieder Hadlich danke ich für die Schulung und Unterstützung bei Anwendung der Programmiersprache „R“; Dr. Gunther Viereck danke ich für die Unterstützung bei der Anwendung des Referenzmanagers und der Beschaffung von Literatur; der IT- Gruppe, insbesondere Lutz Hasselmann und Christian Nagel, danke ich für die Wartung der Netzstruktur und der schnellen Hilfe bei all den Katastrophen rund um den Computer.

Bei allen Mitarbeitern des Institutes für Genombiologie, besonders bei Frau Prof. Christa Kühn, möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken. Ein besonderer Dank geht an Jana Masermann für die stille Durchführung des Organisatorischen im Hintergrund und dem Verwalten und Durchführen von Bestellungen.

Es geht auch ein Dank an die weiteren Doktoranden und an die Organisation durch die Doktorandensprecher am FBN für die allgemeinen Gespräche, Grillabende und Weihnachtsfeiern abseits der Arbeit.

Mein größter Dank geht an PD Dr. Andreas Höflich: Vielen Dank, dass du mir zuerst vertretungsweise die Techniker-Stelle am FBN angeboten hast und an mich geglaubt hast, dass ich die Promotion angehen konnte. Vielen Dank für deine Anleitung zur Arbeit, die Planung und große Unterstützung beim Schreiben der Publikationen, die vielen hilfreichen Gespräche, deine Ideen und deine Betreuung dieser Dissertation.

Ich möchte mich bei Vanessa Caton und Julia Ballentin bedanken, die ich während meiner Promotion bei ihren Bachelor- und Masterarbeiten betreuen durfte.

Des Weiteren geht auch ein großer Dank an meine Kolleginnen der Abteilung Signaltransduktion: Dr. Julia Brenmoehl, Dr. Antonia Noce, Dr. Anne-Marie Galow, Dr. Christina Walz und Dr. Daniela Ohde danke ich für die zahlreichen Diskussionen, aber auch für die Hilfe bei einfachen und komplexeren labortechnischen Problemen. Ein sehr großer Dank geht an Luong Chau, für die Hilfe im Labor und die Unterstützung bei Experimenten.

Auch geht mein Dank an die Studenten*innen Zianka Meyer, Julia Ballentin, Vanessa Caton, Caroline Caffier, Elli Brosig und Christian Zettl, mit denen ich partiell das Büro teilen durfte, für die Gespräche abseits der Arbeit.

Auch danke ich Solveig Haugwitz für das Korrekturlesen der Arbeit und den vielen sprachlichen Anmerkungen.

Ebenfalls wichtig für mich zu erwähnen ist meine Schwester Christina, die mir aus einer schweren Phase geholfen hat.

Ich möchte auch meinen Eltern, meinen Geschwistern Astrid und Steffen, meiner Nichte Elisabeth und meinem Neffen Carl-Friedrich für die persönliche Zuneigung und Unterstützung danken.

Natürlich bin ich auch meinen Freunden dankbar, für die Ablenkung in der Freizeit und den Gesprächen und den gemeinsamen Abenden. Die sozialen persönlichen Kontakte sind zwar über das letzte Jahr selten geworden, aber zumindest konnten wir uns über digitale Medien schreiben und online treffen.

5. Lebenslauf

Michael Walz



Bisherige Arbeitsplätze

Seit Juli 2020	Doktorand am Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN), Institut für Genombiologie, Abteilung Signaltransduktion
Jan. 2018 – Juni 2020	Doktorandenstipendium der H.-Wilhelm-Schaumann-Stiftung Thema: „Effekte von Verdauungsenzymen und Mikroorganismen auf die biologische Wirkung von Milch“
Feb. 2017 – Dec. 2017	Technische Assistenz am Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN), Institut für Genombiologie, Abteilung Signaltransduktion
Juli 2016 – Dec. 2016	Tutor für Schülerexperimente bei “Gläsernes Labor” Berlin Buch
Sep. 2010 – Sep. 2014	Studentischen Hilfskraft an der Universität Potsdam, Institut für Physik und Astronomie, Arbeitsgruppe Biologische Physik

Geburtstag: 18. Juni 1986

Heinrich-Schütz-Str. 18
18069 Rostock

Telefon: +49 172 1556358
walz1986@googlemail.com

Software Kenntnisse

R	●●●●●●
MS Office	●●●●●●
GraphPad Prism	●●●●●●
AutoCAD 2015	●●●●●●
IPA	●●●○○○
MS Visual C#	●●○○○○
SAS	●●○○○○

Sprachkenntnisse

German	●●●●●●
English	●●●●●●
Latein	●●○○○○

Akademische Ausbildung

Okt. 2005 – Sep. 2014	Universität Potsdam Studiengang: Diplom Physik Focus: Festkörperphysik (biologische Physik) Thema der Diplomarbeit: „Raumzeitliche Dynamik rezeptorinduzierter Signalreaktionen nach lokalisierter cAMP-Stimulation in <i>Dictyostelium discoideum</i> “
Juni 2005	Abitur am John-Brinckman-Gymnasium Güstrow

Interessen

Debattierclub
Historisches Fechten

Qualifikation

2018	Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN) Statistikkurs und SAS
2018	Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN) R-Kurs
2016	Future Training & Consulting AutoDESK AutoCAD 2015 2-D/3-D Certified Professional

Praktische Fähigkeiten

Zellkulturen	Zelllinien	HEK293, CaCo-2, HuH-7, 3T3-L1, C2C12, HIEC6
	Primärkulturen	Humane Skelettmuskelzellen
	Schüttelkulturen	<i>Dictyostelium discoideum</i>
Proteinanalyse	ELISA (IGF I & II, Estradiol, ACTH) Western Immunoblot Western ligand blot SDS Blot WES Capillary Immuno Assay 2-D-Electrophoresis	
Zellkultur Assays	MTT Test Zell Proliferations Assay KIRA Assay	
Genomanalyse	DNA Isolation Genotypisierung via PCR, RT-qPCR RNA Isolation	
Quantifizierungsassay	Triglyceride, Cholesterin, Glucose, Iron-II/Iron-III-Ion-Concentration	
Analyse und Separation von Milchproben (Rind, Büffel, Schwein)		
Verarbeitung und Analyse von Molekularbiologischen Proben		
Technische Assistenz für Massenspektroskopie LC-MS/MS Orbitrap (Thermo Fisher)		

Universitäre Kurse

Feb. 2010 – Juli 2010	Praktikum in biologischer Physik
Okt. 2007 – Sep. 2009	Physikalisches fortgeschrittenes Praktikum
Okt. 2005 – Sep. 2007	Physikalisches Grundpraktikum
Feb. 2005	Chemisches Grundpraktikum

Publikationen

Development of a sensitive bioassay for the analysis of IGF-related activation of AKT/mTOR signalling by biological matrices. Walz M, Höflich C, Walz C, Ohde D, Brenmoehl J, Sawitzky M, Vernunft A, Zettl UK, Holtze S, Hildebrandt TB, Wolf E, Hoeflich A. Cells. 2021 Feb, DOI: [10.3390/cells10030482](https://doi.org/10.3390/cells10030482)

Gender-specific control of muscle mass: elevated IGFBP proteolysis and reductions of IGF-1 levels are associated with substantial loss of carcass weight in male DU6PxIGFBP-2 transgenic mice. Ohde D, Walz M, Walz C, Noce A, Brenmoehl J, Langhammer M, Hoeflich A. Cells. 2020 Sep, 2174. DOI: [10.3390/cells9102174](https://doi.org/10.3390/cells9102174)

Overlap of peak growth activity and peak IGF-1 to IGFBP ratio: delayed increase of IGFbps versus IGF-1 in serum as a mechanism to speed up and down postnatal weight gain in mice. Walz M, Chau L, Walz C, Sawitzky M, Ohde D, Brenmoehl J, Tuchscherer A, Langhammer M, Metzger F, Höflich C, Hoeflich A. Cells. 2020 Jun 22;9(6):1516. DOI: [10.3390/cells9061516](https://doi.org/10.3390/cells9061516)

Partial Phenotype Conversion and Differential Trait Response to Conditions of Husbandry in Mice. Brenmoehl J, Walz C, Spitschak M, Wirthgen E, Walz M, Langhammer M, Tuchscherer A, Naumann R, Hoeflich A. J Comp Physiol B, 2018 May;188(3):527-539. DOI: [10.1007/s00360-017-1138-x](https://doi.org/10.1007/s00360-017-1138-x)

Fluorescence Readout of a Patch Clamped Membrane by Laser Scanning Microscopy. Gerhardt M, Walz M, Beta C; Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2016 June, DOI: [10.1007/978-1-4939-3480-5_23](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3480-5_23)

Signalling in chemotactic amoebae remains spatially confined to stimulated membrane regions. Gerhardt M, Walz M, Beta C; J Cell Sci. 2014 Oct, DOI: [10.1242/jcs.161133](https://doi.org/10.1242/jcs.161133)

Actin and PIP3 waves in giant cells reveal the inherent length scale of an excited state. Gerhardt M, Ecke M, Walz M, Stengl A, Beta C, Gerisch G; J Cell Sci. 2014 Aug, DOI: [10.1242/jcs.156000](https://doi.org/10.1242/jcs.156000)

Konferenzen

Dynamics of wave patterns in giant Dictyostelium cells. Gerhardt M, Ecke M, Walz M, Stengl A, Gerisch G, Beta C, Annual International Dictyostelium Conference, Potsdam 2014

Spatio-temporal dynamics of self-organized waves in electro-fused amoeboid cells. Gerhardt M, Walz M, Beta C, DPG-Session "cell migration", Regensburg 2013

Mixing dynamics of the actin cytoskeleton in motile cells. Gerhardt M, Walz M, Beta C, DPG-Session Physics of Cells, Berlin 2012

6. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die eingereichte Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die benutzten Werke wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, 8. Juni 2021

Michael Walz