

Aus dem Institut für Osteologie und Biomechanik
Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
Universität Hamburg

Direktor: Prof. Dr. med. M. Amling

**Einfluss von Transthyretin auf den Knochenstoffwechsel im
Mausmodell**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Stefanie Ganswindt
aus Brandenburg

Hamburg, 2011

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 27. Juli 2011**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Michael Amling

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Priv.-Doz. Dr. Florian Barvencik

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Priv.-Doz. Dr. Frank Timo Beil

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	6
<hr/>	
1.1 Das Skelettsystem	6
1.2 Knochenzellen	7
1.3 Knochenwachstum und Knochenremodeling	8
1.4 Regulation des Knochenremodeling	10
1.5 Klinische Bedeutung der Knochenformation	10
1.6 Therapieansätze zur Beeinflussung der Knochenresorption	12
1.7 Zentrale Regulation des Knochenstoffwechsel über das Hormon Leptin	13
1.8 Das Hormon Leptin im Stoffwechsel	14
1.8.1 Gen-Chip-Hybridisierung (Mikroarray) von Hypothalami aus <i>ob/ob</i> -Mäusen	18
1.9 Das Hormon Transthyretin als potentieller Knochenmodulator?	19
2. Arbeitshypothese und Fragestellung	21
<hr/>	
3. Material und Methoden	22
<hr/>	
3.1 Tierversuchsantrag	22
3.2 Versuchstiere	22
3.3 Material	
3.3.1 Geräte und Laborbedarf	23
3.3.2 Chemikalien	24

3.4 Methoden	24
3.4.1 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien zur Genotypisierung	24
3.4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	24
3.4.3 DNA-Gelelektrophorese	27
3.4.4 Tötung der Mäuse	28
3.4.5 Charakterisierung des Körpergewichts und des Organgewichts	28
3.4.6 Serumanalysen	28
3.4.7 Kontaktradiographie	28
3.4.8 Histologie	29
3.4.8.1 Skeletthistologie mittels Acrylat-Einbettung	29
3.4.8.2 Toluidinblau-Färbung	30
3.4.8.3 Modifizierte von Kossa/van Gieson Färbung	31
3.4.8.4 Organhistologie mittels Paraffin-Einbettung	32
3.4.8.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	32
3.4.8.6 Histomorphometrie	33
3.5 Statistische Analysen	33
4. Ergebnisse	34
4.1 Körpergewichtsanalyse Ttr ^{-/-} -Mäuse	34
4.2 Kontaktradiographien	36
4.3 Skelettale Histologie	37
4.4 Serum-Analysen	45

4.5 Organhistologie	46
4.5.1 Histologische Analysen der Leber	46
4.5.2 Histologie des Fettgewebes	49
5. Diskussion	50
<hr/>	
5.1 Ttr ^{-/-} -Mäuse weisen eine hohe Knochendichte auf	50
5.2 Transthyretin-Interaktionen mit Leptin:	
Ttr ^{-/-} -Mäuse zeigen keine Merkmale eines Metabolischen Syndroms	54
5.3 Ttr ^{-/-} -Mäuse sind normgewichtig	58
5.4 Ausblick	61
6. Zusammenfassung	63
<hr/>	
7. Abkürzungsverzeichnis	64
<hr/>	
8. Literaturverzeichnis	66
<hr/>	
9. Danksagung	79
<hr/>	
10. Lebenslauf	80
<hr/>	
11. Eidesstattliche Erklärung	81
<hr/>	

1. Einleitung

1.1 Das Skelettsystem

Knochen beziehungsweise Knochengewebe ist ein hochspezialisiertes Bindegewebe, welches gemeinsam mit Knorpel als Skelettsystem bezeichnet wird. Knorpel befindet sich an Stellen im Körper, die einer besonderen Druckbelastung ausgesetzt sind und nimmt dort die Aufgabe einer Pufferfunktion wahr. Des Weiteren findet man Knorpel als Vorstufe jener Knochen, welche durch *enchondrale Ossifikation* entstehen. Das Knochengewebe ist ein hoch differenziertes, festes Stützgewebe, das im Gegensatz zum Knorpel gut durchblutet und innerviert ist. Neben der wichtigen Stützfunktion des Knochens, welche dem Körper die nötige Stabilität verleiht und darüber hinaus auch zum Schutz von inneren Organen (zum Beispiel des Gehirns) essentiell ist, nimmt der Knochen verschiedene weitere Aufgaben im Organismus wahr. Er stellt für den Körper ein wichtiges metabolisches Speicherreservoir besonders für die natürlichen Mineralstoffe Calcium und Phosphat dar, welche zur Aufrechterhaltung des Elektrolythaushaltes und somit der körpereigenen Ionenhomöostase fundamentale Bedeutung haben. Das mit der Nahrung zugeführte Calcium wird zu über 99 % im Knochen abgelagert und kann wiederum bei Bedarf aus dem Knochen mobilisiert werden. Darüber hinaus beherbergt der Knochen das Knochenmark, das postnatal der Hauptbildungsort der Blutbildung ist (Löffler et al. 2007).

Der Knochenstoffwechsel ist ein komplexer Umbauvorgang der einem ständigen, lebenslangen Wandel unterworfen ist. Gründe für den dauernden Umbau sind einerseits notwendige Anpassungen des Knochens an veränderte Belastungen bestimmter Körperregionen. Andererseits bedarf es einer ständigen Reparatur von defekten Stellen am Skelett, die durch kleinste Fissuren (zum Beispiel bedingt durch Mikrotraumen) auch ohne Krankheitswert zustande kommen. Dieser Prozess wird als *skelettales Remodeling* (Ralston 1997) bezeichnet und hält die Knochenmasse zwischen dem Ende der Pubertät und dem Ausfall der Gonadenfunktion annähernd konstant. Verantwortlich für diesen Umbau sind zwei hochspezialisierte Zelltypen: Die Osteoblasten und die Osteoklasten.

Insgesamt ist das Skelett somit kein starres Organ, welches augenscheinlich keinen Veränderungen unterliegt, sondern ein fein abgestimmtes Kommunikationssystem zwischen Auf- und Abbau ("*coupling*"). Jährlich werden ungefähr 10% der Knochenmasse umgebaut, folglich wird in zehn Jahren das gesamte Knochengerüst einmal vollständig erneuert (Cohen 2006).

1.2 Knochenzellen

Osteoklasten und Osteoblasten haben im ausgewachsenen Skelett im Wesentlichen die Aufgabe als Antagonisten die Knochenbildung, beziehungsweise die Knochenresorption, zu bewerkstelligen und nehmen damit eine regulatorische Funktion ein.

Osteoblasten sind spezialisierte, aber nicht terminal differenzierte Zellen, die für die Knochenbildung verantwortlich sind. Sie stammen von mesenchymalen Vorläuferzellen ab, ebenso wie Chondrozyten und Adipozyten. Präosteoblasten werden durch Transkriptions- und Wachstumsfaktoren wie RUNX-2 (*runx related transcription factor-2*), FGFs (*fibroblast growth factors*) und BMPs (*bone morphogenetic proteins*) aktiviert. Präosteoblasten reifen in Gegenwart von Zytokinen, Parathormon, Vitamin D und Östrogenen zu aktiven Osteoblasten heran. Die aktiven Osteoblasten sezernieren die extrazelluläre Knochenmatrix, welche ab diesem Zeitpunkt als Osteoid bezeichnet wird. Osteoid besteht zum größten Teil aus Kollagen-Typ-I und zu einem bedeutend geringeren Anteil aus knocheneigenen Glykoproteinen (Osteocalcin, Osteopontin, *bone sialoprotein*). An diese extrazelluläre Matrix lagern sich im weiteren Verlauf Hydroxyapatitkristalle an. Erst dann wird mineralisierte Knochensubstanz gebildet.

Osteozyten hingegen sind terminal differenzierte Osteoblasten, die durch ihre eigene mineralisierte Knochenmatrix eingeschlossen sind, aber über Zellfortsätze (sogenannte *Canaliculi*) miteinander in Kontakt stehen. Allerdings sind Osteozyten im Gegensatz zu Osteoblasten kaum noch in der Lage Osteoid zu synthetisieren.

Osteoklasten sind große (50 bis 100 μm), multinukleäre Zellen, die im Knochenmark aus hämatopoetischen Vorläuferzellen (Monozyten-Makrophagen-System) entstehen

und als einzige Zellen die Fähigkeit zur Knocheresorption besitzen und dementsprechend als Gegenspieler der Osteoblasten fungieren. Osteoklasten treten charakteristischerweise vereinzelt auf, das heißt sie befinden sich nicht in Zellverbänden, wie es typischerweise bei Osteoblasten beobachtet wird. Osteoklasten haben, funktionell bedingt, verschiedene Zellpole: knochenangrenzend findet sich der apikale Anteil, markraumnah befindet sich der basolaterale Teil. Die Differenzierung von der Vorläuferzelle zum Osteoklasten kann durch eine Reihe von Zytokinen ausgelöst werden. M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) und RANKL (*receptor-activator of NFkappaB-Ligand*) zum Beispiel werden von Osteoblasten exprimiert und stimulieren anschließend die Osteoklastogenese. Die Zytokine IL-1 (*Interleukin-1*), IL-6 (*Interleukin-6*), TNF-alpha (*Tumornekrosefaktor alpha*) und Prostaglandin-E werden vor allem im Rahmen von Entzündungsreaktionen von Makrophagen gebildet und können ebenfalls die Vorläuferzelle eines Osteoklasten stimulieren (Lacey et al. 1998). Nach der Aktivierung der Osteoklasten durch die Zytokine, die ab diesem Zeitpunkt als reife Osteoklasten bezeichnet werden, heften sich diese an die Knochenoberfläche und bilden die sogenannte *sealing zone*, die durch stark gefaltete Filamente des Adhäsionsapparates entsteht und einen Bürstensaum (auch *ruffled border* genannt) bilden. In Zusammenarbeit mit Integrinen schafft der Osteoklast eine isolierte, undurchlässige Verankerung am Knochen. In diesem Bereich entsteht ein Mikromilieu, welches für die meisten Proteine und Ionen nicht mehr permeabel ist. Die Protonen⁺-ATPase in der apikalen Zytoplasmamembran des Osteoklasten bewirkt die Ansäuerung des extrazellulären Kompartiments und führt so zur Aktivierung lysosomaler Enzyme mit anschließender Knochenresorption (David et al. 2002).

1.3 Knochenwachstum und Knochenremodeling

Die Knochenentwicklung (*skelettale Ossifikation*), beziehungsweise das Knochenwachstum, kann im Organismus über zwei verschiedene Wege erfolgen: einerseits über die *desmale*, andererseits durch die *enchondrale* Knochenbildung. Bei der *desmalen Ossifikation* differenzieren mesenchymale Stammzellen direkt zu Osteoblasten, welche aus diesem Grund auch als *direkte Ossifikation* bezeichnet wird. Die Osteoblasten bilden Osteoid, eine organische Matrix aus Kollagen Typ I,

Proteoglykanen, Mucinen und nichtkollagenenen Proteinen (Osteocalcin und Osteopontin), welches im Verlauf mineralisiert wird. Die Osteoblasten werden anschließend in diese verkalkte Substanz eingemauert. Diese Art der Knochenbildung findet allerdings nur in wenigen Bereichen des Organismus statt (vor allem im Schädel).

Bei der *enchondralen* oder *indirekten Ossifikation*, welche die häufigste Art der Knochenbildung darstellt und bei Röhrenknochen Anwendung findet, wird die Knochenbildung zunächst über eine Vorstufe aus Knorpelzellen eingeleitet. Zellen im Zentrum des Perichondrium differenzieren sich zu Knorpelzellen, die über verschiedene Zwischenstadien zu hypertrophen Zellen kondensieren. Diese hypertrophierten Zellen sezernieren VEGF (*vascular endothelial growth factor*), welches für die Vaskularisierung der mineralisierten Knorpelmatrix notwendig ist und dazu führt, dass Chondroklasten eindringen können und Knorpelreste abbauen und schließlich Osteoblasten-Progenitorzellen die endgültige Ossifikation einleiten.

Im Anschluss an das Knochenwachstum findet physiologisch das *skelettale Remodeling* statt, welches auf zellulärer Ebene den balancierten Auf- und Abbau des Knochens durch Osteoblasten und Osteoklasten beschreibt. Dieser Prozess verläuft asynchron an vielen verschiedenen Stellen des Skeletts gleichzeitig. Verantwortlich für den Umbau des Knochens sind sogenannte BMUs (*basic multicellular units*), welche entsprechend aus Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten sowie Immunzellen bestehen und für die Resorptionsphase des Knochens 2-3 Wochen benötigen, während die anschließende komplette Neubildung des Knochens bis zu drei Monaten dauert (Martin et al. 2008).

Die Osteozyten scheinen eine entscheidende Rolle bei der Knochenbildung und dem *Remodeling* zu spielen (Marotti et al. 1990). Kommt es zu Mikroschädigungen im Knochen, die die kleinsten Canaliculi miteinbeziehen, hat das die Apoptose der Osteozyten zur Folge (Hazenberg et al. 2006). Diese apoptotischen Osteozyten senden anschließend ein wichtiges Signal an die so genannten Knochenbelegzellen (*lining cells*), welche über die Größe und den Ort der Schädigung Auskunft geben und ist vermutlich der erste Hinweis für den Körper, dass ein *skelettales Remodeling* notwendig wird (Taylor 1997). Die Knochenbelegzellen sind langgestreckte, flache, metabolisch inaktive Zellen, die die gesamte Knochenoberfläche besiedeln. Allerdings ist über diesen Zelltyp zum jetzigen Zeitpunkt erst wenig bekannt. Möglicherweise handelt es sich bei den Knochenbelegzellen um

Osteoblastenvorläufer, beziehungsweise um ruhende Osteoblasten (Aubin 1995). Im Folgenden werden Präosteoklasten angelockt, die sich zu Osteoklasten differenzieren und anschließend mit der Resorption des Knochendefektes beginnen. Zeitgleich werden zusätzlich Präosteoblasten angelockt, die sich zu Osteoblasten differenzieren und durch Osteoidbildung den Defekt auffüllen und damit den Prozess des *Remodelings* abschließen.

1.4 Regulation des Knochenremodelings

Beim *Knochenremodeling* handelt es sich um einen komplexen Vorgang, der sowohl einer lokalen, also einer autokrinen (erfolgt primär über den *Wnt*- und den *Rank-Rank-Opg-Signalweg*) und parakrinen Regulation unterliegt als auch von zentralen und endokrinen Mechanismen gesteuert wird.

Eine wichtige Rolle zur systemischen Regulation des Knochenstoffwechsels spielen die folgenden Hormone: Calcitonin, Parathormon (PTH) sowie die aktive Form des Vitamin D₃ (1,25-Dihydroxy-Calciferol), welche in die Regulation der Kalziumhomöostase eingreifen, sowie Östrogene, die ihre Wirkung am Knochen über α - und β -Östrogen-Rezeptoren vermitteln.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass der Knochenstoffwechsel auch unter dem Einfluss von zentralen und peripher neuronalen Kontrollmechanismen steht (Chenu und Marenzana 2005, Baldock et al. 2007, Baldock et al. 2002). Die entscheidende Schlüsselrolle des zentralen Regulationsmechanismus spielt das aus Adipozyten sezernierte Hormon Leptin (Ducy et al. 2000). Einige histologische Untersuchungen deckten die Existenz von Neuropeptiden (im Zusammenhang mit dem Knochen vorrangig das Neuropeptid Y) und entsprechenden Neuropeptidrezeptoren im Knochen auf (Elefteriou 2005).

1.5 Klinische Bedeutung der Knochenformation

Die skelettale Aktivität ist den verschiedenen Lebensabschnitten des Menschen angepasst. In den ersten beiden Lebensdekaden überwiegt die Knochenformation um entsprechend das Wachstum des Skeletts zu bewirken, während im folgenden Lebensabschnitt ein balanciertes Gleichgewicht zwischen Knochenresorption und Knochenformation nötig ist, um die Knochenmasse konstant zu halten.

Das persönliche Maximum der Knochenmasse, die sogenannte *peak bone mass*, ist zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr erreicht und interindividuell sehr unterschiedlich. Die Knochenmasse ist außerdem von vielen Faktoren abhängig. Teilweise spielen genetisch bedingte Faktoren eine Rolle, zusätzlich können aber auch Umweltfaktoren wie Ernährung, Bewegung, Medikamente (Glucocorticoide, Antiepileptika, Aromatasehemmer, Antidiabetika etc.), Alkohol- und/oder Nikotinabusus die Knochenmasse beeinflussen (Ralston 1997).

Mit steigendem Lebensalter nimmt das Risiko zu, dass die Balance zwischen Knochenformation und Knochenresorption nicht mehr ausgeglichen ist. Beim Überwiegen der Knochenresorption durch die vermehrte Aktivität der Osteoklasten kommt es zu einem Knochenmasseverlustsyndrom mit einem verstärktem Risiko eine Fraktur zu erleiden, zumindest aber kommt es dann zu einer Störung der skelettalen Integrität (Melton 1997). Die DVO (Dachverband Osteologie) definiert in ihrer Leitlinie die Osteoporose als eine systemische Skeletterkrankung die mit einer niedrigen Knochenmasse und damit mit einer Verschlechterung der Mikroarchitektur einhergeht (DVO Osteoporose-Leitlinie, 2009). Diagnostische Bedeutung hat hier vorrangig die Knochendichtemessung mittels DXA (Dual-Energy-X-Ray-Absorptiometrie), die an der Lendenwirbelsäule sowie am Gesamtfemur und am Femurhals gemessen wird. Von einer Osteopenie, also der beginnenden Minderung der Knochendichte als Vorstufe der Osteoporose, spricht man bei einem T-Score bei der DXA von kleiner 1 Standardabweichung unter der Altersnorm des Patienten. Eine manifeste Osteoporose liegt dann vor, wenn durch die Osteoporose bedingte Frakturen beim Patienten aufgetreten sind.

Die Osteoporose ist die häufigste Störung der Knochenformation in der westlichen Welt und ist am häufigsten mit Frakturen der Wirbelkörper, des Schenkelhalses und des Radius assoziiert (sogenannte Osteoporose-assoziierte Frakturen), bedingt durch den Struktur-, Masse-, und Funktionsverlust des Knochengewebes. Der Osteoporose kommt darüber hinaus eine besondere sozioökonomische Bedeutung zu. Da bedingt durch die steigende Lebenserwartung der Bevölkerung in der westlichen Welt mit erhöhtem Frakturrisiko und Folgekrankheiten gerechnet werden muss und diagnostische und therapeutische Interventionen dann nötig werden, stellt die Osteoporose eine nicht zu unterschätzende finanzielle Belastung aktuell und in Zukunft dar (Bartl 2004). Aber nicht nur die gesundheitsökonomischen Aspekte sind von Bedeutung. Gleichzeitig sollte die teilweise erhebliche Beeinträchtigung der

Lebensqualität der Patienten nach Osteoporose-assoziierten Frakturen aus medizinisch-ethischen Gesichtspunkten nicht vernachlässigt werden (Götte und Dittmar 2001).

Diese Problematiken machen deutlich, dass es in Zukunft von großer Bedeutung sein wird, eine suffiziente Prävention der Osteoporose zu etablieren und optimale, patientenadaptierte Therapieverfahren bei bereits eingetretenen Osteoporose-assoziierten Frakturen zu verbessern und anzuwenden.

1.6 Therapieansätze zur Beeinflussung der Knochenresorption

Da die Osteoporose mit einer Überfunktion von Osteoklasten einhergeht und damit zur verstärkten Knochenresorption führt und dementsprechend im Verlauf der Zeit das Frakturrisiko steigt, ist therapeutisch die Hemmung der Osteoklasten durch die pharmakologische Wirkung von Bisphosphonaten als Resorptionshemmer entscheidend. Bisphosphonate sind gut wirksam gegen pathologische hochaktive Knochenresorptionsprozesse, sowohl bei osteolytischen Prozessen bei Knochenmetastasen und Knochenschmerzen, als auch bei der *High-Turnover-Osteoporose* (Miller 2001, Coleman 2001). Ein wichtiger Schwerpunkt der Osteoporose-Therapie wird einerseits bei der Fraktur-Prophylaxe gesetzt, andererseits soll eine frühzeitige Osteoporoseprophylaxe stattfinden, beziehungsweise das Fortschreiten des *Knochenmasseverlustsyndroms* verhindert werden. Dies kann durch Allgemeinmaßnahmen wie gesunde Ernährung mit ausreichender Vitamin-D3-Versorgung und Calcium-Zufuhr und gegebenenfalls Substitution dieser Mineralstoffe, regelmäßiger körperlicher Bewegung und Lebensstil-Verbesserung (zum Beispiel Nikotinkarenz und ausreichende Sonnenlichtexposition) erreicht werden. Bei entsprechend fortgeschrittener Osteoporose und einem erhöhtem Frakturrisiko empfiehlt die DVO seit 2009 eine Vitamin-D3-Substitution in Kombination mit Calcium und bei entsprechender Indikation (zum Beispiel postmenopausaler Osteoporose) Bisphosphonate und regelmäßige Kontrollevaluation mit Erfassung der Risikofaktoren mindestens im 2-jährigen Intervall.

1.7 Zentrale Regulation des Knochenstoffwechsels über das Hormon Leptin

Am Beispiel des Hormons Leptin konnte im Jahre 2000 erstmals gezeigt werden, dass nicht nur autokrine, beziehungsweise parakrine sondern gleichermaßen neuroendokrine (systemische) Regulationsmechanismen Einflüsse auf den Knochenstoffwechsel haben (Ducy et al. 2000). Die Arbeitsgruppe um Karsenty zeigte im Mausmodell, dass ein Fehlen von Leptin oder dessen Rezeptor zur Adipositas, zu einem Hypogonadismus und bei skelettaler Analyse zu einem erhöhten Knochenvolumen führt. Letzteres ist auf eine erhöhte Knochenformationsrate, bei gleich bleibender Osteoblastenzahl zurückzuführen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine intracerebroventrikuläre Infusion von Leptin in den dritten Ventrikel der Mäuse eine ausgeprägte Abnahme der Knochenmasse zufolge hat. In einem Großtier-Modell mit Schafen, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der Knochenmasseverlust, der durch eine intracerebroventrikuläre Infusion (ICV) von Leptin verursacht wird, wie auch im Mausmodell auf eine erniedrigte Osteoblastenaktivität zurückzuführen ist (Pogoda et al. 2006). Leptin ist folglich ein wichtiger Regulator des Knochenremodelings.

Da der Leptinrezeptor jedoch nicht im Osteoblasten, sondern im Hypothalamus exprimiert wird, reguliert Leptin das Knochenremodeling über das sympathische Nervensystem (Takeda et al. 2002). Hierbei wird die Signaltransduktionskaskade des Leptins über den Hypothalamus an die Osteoblasten vermittelt. Es wird vermutet, dass das Signal über Norepinephrin und Epinephrin vermittelt wird, die dabei an die adrenergen Rezeptoren im Osteoblasten binden. Notwendig für die Bildung von Epinephrin und Norepinephrin ist die Dopamin- β -Hydroxylase (Dbh). Die Untersuchung an Dbh-defizienten Mäusen zeigte, dass sie ein erhöhtes Knochenvolumen aufweisen, eine intracerebroventriculäre Infusion von Leptin jedoch nicht zu einer Erniedrigung des Knochenvolumens in Dbh-defizienten Mäusen führt. Folglich ist für die antiosteogene Wirkung des Leptins ein funktionierendes sympathisches Nervensystem notwendig. Dies konnte auch in Versuchen mit β -Blockern gezeigt werden. β -Blocker verhindern die Ausschüttung endogener oder exogener adrenerger Substanzen (Adrenalin, Noradrenalin), beziehungsweise deren Vorstufen (Norepinephrin und Epinephrin) durch kompetitive Hemmung an β -Rezeptoren. So führt in der Maus, wie bei Menschen, die Einnahme von β -Blockern zu einer erhöhten Knochendichte, da die Knochenformationsrate erhöht ist

(Schwartzman 2002). Es gibt Hinweise, dass die Einnahme von β -Blockern mit einer höheren Knochendichte assoziiert ist und somit das Risiko eine Fraktur zu erleiden verringert ist (Pasco et al. 2004). Dies könnte in Zukunft, vielleicht in Form von selektiven β -Blockern, ein interessantes Medikament zur Osteoporose-Therapie sein.

1.8 Das Hormon Leptin im Stoffwechsel

Leptin wurde erstmals im Jahre 1994 von der Arbeitsgruppe um Friedman beschrieben (Zhang et al. 1994). Sie konnten nachweisen, dass die bei *ob/ob*-Mäusen bestehende Adipositas auf einer spontanen Punktmutation im *obese*-Gen (Adipositas-Gen) beruht, das sie daraufhin als Leptin (griechisch: λεπτός (leptos) bedeutet dünn, klein) bezeichneten (Spiegelman und Flier 2001). Der Name soll auf die zuerst entdeckte Funktion des Hormons hinweisen: Die Hemmung der Nahrungssappetenz (Vock 2003). Leptin ist ein 16-kDa großes Peptid und wird zum größten Teil von Adipozyten sezerniert, kann aber auch in geringen Mengen von Plazenta, Ovarien, Magenmukosa, Knochenmark, Brustepithel, Skelettmuskel, Hypophyse und Hypothalamus abgegeben werden (Bado et al. 1998, Masuzaki et al. 1997, Morash et al. 1999).

Biochemisch betrachtet besteht Leptin aus 167 Aminosäuren und ist ein hydrophiles globulär strukturiertes Polypeptidhormon, das Homologien zur Klasse-I-Zytokinfamilie aufweist (Zhang et al. 1994, Tartaglia 1997). In verschiedenen Geweben konnten gegenwärtig Leptin-Rezeptoren lokalisiert werden (Hypothalamus, Plexus choroideus, Leber, Lunge, Herz, Niere, Testes und Fettgewebe). Im Mausmodell gibt es zwei natürlich auftretende Mutationen, mit daraus resultierender fehlender Signalübertragung: *ob/ob*-Mäuse mit einer Mutation im Leptin-Gen und *db/db*-Mäuse, die eine Mutation im Leptinrezeptor (ObRb) aufweisen. Beide Mutationen bedingen die oben beschriebenen gleichen phänotypischen Merkmale: Eine stark ausgeprägte Adipositas, einen Hypogonadismus sowie eine erhöhte Knochenmasse bei erhöhter Knochenformation durch die zentrale Steuerung des *Knochenremodelings*. Leptin nimmt, neben der Funktion bei der Knochenbildung, eine zentrale Rolle bei der Steuerung des Appetitverhaltens ein. Im Hypothalamus reguliert Leptin durch Interaktion verschiedener „*orexigene*“ (die Nahrungsaufnahme stimulierende) und „*anorexigene*“ (die Nahrungsaufnahme hemmende) Neuropeptide, die entsprechend

der vorliegenden Stoffwechsellage sezerniert werden, die Nahrungsaufnahme und den Energieumsatz.

Leptin wird bei anaboler Stoffwechsellage, das heißt während aktiver Lipogenese und Zunahme der Fettmasse aus dem Fettgewebe von Adipozyten sezerniert. Im Blut ist Leptin überwiegend an eine lösliche Form des Rezeptors gebunden. Mit Hilfe eines spezifischen Transportsystems kann Leptin im folgenden die Blut-Hirn-Schranke überwinden und trifft dort auf Neurone, welche sich besonders im Hypothalamus befinden. Diese Neurone exprimieren auf ihrer Oberfläche den Leptinrezeptor und können entsprechend Leptin binden. Rezeptoren für Leptin konnten in zwei unterschiedlichen Populationen von Neuronen in Kerngebieten des *Nucleus arcuatus* und des *Nucleus paraventricularis* des Hypothalamus identifiziert werden (Elmqvist et al. 1999).

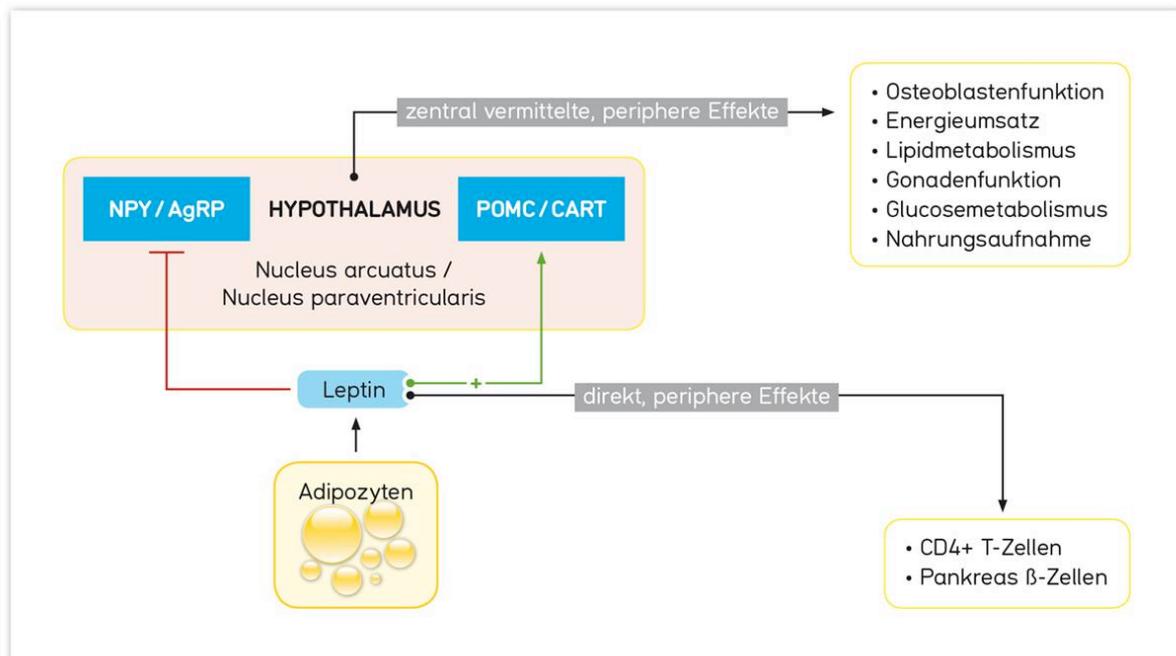


Abbildung 1: Auswirkungen des Hormons Leptin auf den Stoffwechsel.

Die zentrale Regulation des Leptins wird über den Nucleus arcuatus und paraventricularis des Hypothalamus vermittelt und hat Einfluss auf verschiedenste Funktionen im Organismus. Die peripheren Wirkungen erfolgen entsprechend ohne Beteiligung des Hypothalamus und wirken also direkt auf die Zielzellen im Organismus.

NPY: Neuropeptid Y, AgRP: Agouti-related protein, POMC: Proopiomelanocortin, CART: cocain- and amphetamine-regulated transcript.

Modifiziert nach: Vock L, *Journal für den Mineralstoffwechsel* 2003, 10(1): 22-27

Folglich führt bei Nahrungsaufnahme die nachfolgende Signaltransduktion (durch vorherige Hemmung von Leptin) zu einer verminderten Produktion von Proteohormonen, wie zum Beispiel das NPY (*Neuropeptid Y*) und AgRP (*Agouti-related protein*), welche dann die weitere Nahrungsaufnahme verhindern sollen (orexigen). Leptin-defiziente *ob-ob*-Mäuse weisen dementsprechend eine erhöhte Anzahl der Gen-Transkripte dieser beiden Peptide auf (Shutter et al. 1997). Die zweite Gruppe der Neuronen im Hypothalamus produziert POMC (*Proopiomelanocortin*) und CART (*cocain- and amphetamine-regulated transcript*), welches beides Transmitterstoffe sind, die entsprechend appetitzügelnd wirken und durch Leptin aktiviert werden (anorexigen).

Gleichzeitig wird über Leptinrezeptoren in anderen Geweben, besonders dem Fettgewebe, der Energieverbrauch (über noch nicht endgültig geklärte Mechanismen) gesteigert. Über diese beiden Mechanismen hemmt Leptin somit das Auftreten von Hungergefühlen und spielt damit eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Fettstoffwechsels. In dem Maße wie Fettdepots des Körpers reduziert werden, nimmt auch die Menge an im Körper zirkulierenden Leptin proportional ab, was wiederum eine Zunahme des Appetits bewirkt (Friedman und Halaas 1998). Die bisher vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass Leptinspiegel im Plasma, auch bei adipösen Patienten, deutlich mit der Körperfettmasse korrelieren und somit ein Defekt der Leptinexpression unwahrscheinlich erscheint und es sich folglich beim Menschen um eine Resistenz des Leptinrezeptors handelt und damit die Ursache der Adipositas beim Menschen ist (Maffei et al. 1996).

In der Literatur wird die systemische pleiotropische Wirksamkeit bei verschiedenen Körperfunktionen ausgiebig beschrieben, dementsprechend ist ebenfalls die Liste der murinen Funktionen des Leptins lang. Unter anderem werden auch folgende Funktionen über das Hormon Leptin reguliert: Körpertemperatur, Geschlechtsreifung, Fettstoffwechsel, Blut- und Gefäßbildung sowie die Funktion von Pankreas und Immunsystem. Infolge dessen erkranken Leptin-defiziente *ob/ob*-Mäuse zum Beispiel am *Metabolischen Syndrom*, einem Hyperkortisolismus oder leiden an einer Immunsuppression. Wie oben beschrieben ist die Wirkung des Leptins vielfältig, wobei die klinische Bedeutung für den Menschen noch nicht völlig geklärt ist. Leptin wird zum Beispiel ebenfalls benötigt für die Pubertätsentwicklung von Jungen und Mädchen. Bei geringem Fett- und Leptingehalt (Anorexie) erlischt der ovarielle Zyklus und führt zur Amenorrhoe. Die Immunsuppression findet man beim Vorliegen eines

Leptin-Mangels mit dem erhöhten Risiko von opportunistischen Infektionen durch eine verminderte T-Zellproliferation und verminderter Aktivierung von CD4+Helferzellen. Des Weiteren wird beim Menschen eine Verstärkung der Angiogenese, bedingt durch verstärkte Produktion vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktoren, beschrieben.

Darüber hinaus induziert Leptin die Expression von Surfactant in der fetalen Lunge, welches wichtig zur Entfaltung der Alveolen ist. Reduzierte Leptin-Werte findet man im Serum bei Patienten mit einer Anorexia nervosa und bei einer Bulimie. In der Literatur wurden Fälle einer äußerst seltenen hereditären Leptin-Insuffizienz beschrieben, die schon im Frühkindesalter eine exzessive Adipositas und Fresssucht entwickeln, die durch die Gabe von rekombinantem Leptin gebessert wird. Die Leptin-Adiponectin-Ratio (L/A) scheint ein atherosklerotischer Prädiktor zu sein und korreliert mit Blutdruck, Body-Mass-Index (BMI), HDL-Cholesterin (*high-density-lipoprotein*), Insulinresistenz, Glukose und der Intima-Media-Dicke der Arterien.

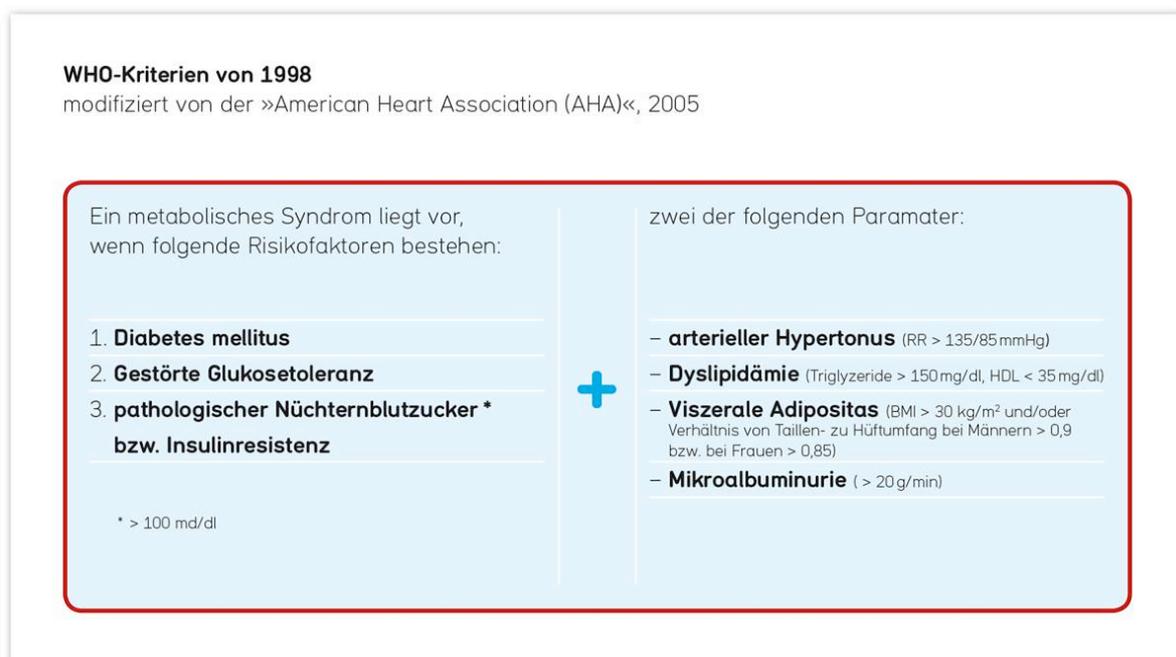


Abbildung 2: Das Metabolische Syndrom

nach der WHO (World Health Organisation) sowie der AHA (American Heart Association) 2005.

Dargestellt sind die Faktoren, die in den Symptomkomplex des Metabolischen Syndroms Einfluss finden und vor allem kardiovaskuläre Risikofaktoren für den Organismus darstellen.

Zusammenfassend ist Leptin offensichtlich in ein äußerst komplexes Netzwerk neuroendokriner Interaktionen eingebunden, die derzeit noch äußerst unvollständig aufgeklärt sind. In Zukunft wird die Identifizierung dieser komplexen Regelkreise wichtig sein, um therapeutisch die Leptin-Regelkreise nachhaltig zu beeinflussen, zum Beispiel mittels selektiver Analoga im Rahmen einer Pharmakotherapie.

1.8.1 Gen-Chip-Hybridisierung (Mikroarray) von Hypothalami aus *ob/ob*-Mäusen

Leptin wirkt als Inhibitor der Knochenformation über Bindung an Rezeptoren im Hypothalamus. Auf der Suche nach Leptin-responsiven-Genen führte die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Amling und PD Dr. Thorsten Schinke am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf eine vergleichende Gen-Chip-Analyse der Hypothalamus-RNA von Wildtyp und *ob/ob*-Mäusen durch. Die Micro-Array-Genchip-Analyse ermöglicht eine vergleichende Expressionsanalyse aller 30.000 auf den Gen-Chips verwendeten Gene. Die repräsentierten Gene wurden im Anschluss nach dem logarithmischen Signalverhältnis (*ob/ob* zu WT) sortiert, beginnend mit dem im Hypothalamus der *ob/ob*-Mäuse am stärksten induzierten Gen. Das Ergebnis der Gen-Chip-Hybridisierung zeigte, dass sich Transthyretin (Ttr) sowohl an erster, als auch an dritter Stelle der Liste befindet und sich folglich als das am stärksten induzierte Gen präsentiert. Als Erfolg dieser Methode und damit Positiv-Kontrolle sind hier das *Agrp* (*Agouti-related-protein*) an Position 2, sowie das *Npy* (*Neuropeptid Y*) an Position 27 zu nennen, da bekannt ist, dass ihre Transkriptzahl im Hypothalamus bei *ob/ob*-Mäusen erhöht ist und es sich damit um bereits bekannte *Leptin-responsive Gene* handelt. Transthyretin, als das am stärksten induzierte Gen in der Gen-Chip-Analyse, schien ein mögliches Kandidaten-Gen mit potentieller Funktion im Knochenstoffwechsel zu sein und bildete so die Grundlage für unsere weiterführenden Untersuchungen.

Rang	Gen	wt	ob/ob	SLR
1	<i>Ttr</i>	4.6	65.6	4.4
2	<i>Agrp</i>	72.5	597.3	2.9
3	<i>Ttr</i>	48.1	184	1.7
4	<i>Erdr1</i>	734.6	2177.2	1.7
5	<i>Sult1a1</i>	95.5	180.1	1.6
27	<i>Npy</i>	416.4	844.4	1

Abbildung 3: Rangliste der in ob/ob-Hypothalami am stärksten induzierten Gene.

In der Tabelle sind die am stärksten induzierten Gene im Hypothalamus von *ob/ob*-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen dargestellt. Die Reihenfolge der Gene ergibt sich durch die sogenannte „signal log ratio“ (SLR), die bei Auswertung mit Hilfe einer speziellen Software berechnet wurde. Als das am stärksten induzierten Gen präsentiert sich hier Transthyretin. Bei *Agrp* und *Npy* handelt es sich um bereits bekannte Leptin-responsive. *Ttr*: Transthyretin, *Agrp*: Agouti-regulated-Protein, *Erdr1*: erythroid differentiation regulator 1, *Sult1a1*: sulfotransferase family 1A, phenol-preferring, member 1, *Npy*: Neuropeptid Y

1.9 Das Hormon Transthyretin als potentieller Knochenmodulator?

Transthyretin (*Ttr*) ist ein Plasmaprotein, welches aus 127 Aminosäuren besteht und hauptsächlich von der Leber und dem Plexus choroideus des Ventrikelsystems des Gehirns in die Zirkulation synthetisiert wird (Palha 2002). In geringen Mengen kann *Ttr* zusätzlich in Inselzellen des Pankreas, Skelettmuskel, Milz, Magen und Herz synthetisiert werden. Transthyretin wurde anfänglich als Component X, später auch als Präalbumin bezeichnet, da es in der Gel-Elektrophorese vor dem Albumin läuft (Gravrilesco et al. 1955, Ingbar 1958). Transthyretin stellt im Serum ein wichtiges Transporthormon für den Organismus dar. Es transportiert im Serum das *RBP-4* (Retinol-bindendes-Protein-4) und ist damit indirekt der Transporter für das Retinol (Vitamin A₁ oder Axerophthol). Darüber hinaus hat *Ttr* eine hohe Affinität zu den Schilddrüsenhormonen, vorrangig zum Thyroxin (T₄), welches angelehnt an dieses, namensgebend für das Protein Transthyretin war. Es stellt bei Mäusen physiologisch den Haupttransporter für die Schilddrüsenhormone im Blutkreislauf dar, wobei *Ttr*^{-/-}-Mäuse kein Retinol, aber T₄ im Serum aufweisen (Vranckx et al. 1990). Sowohl das *RBP-4*, als auch die Schilddrüsenhormone spielen eine entscheidende Rolle für die Zellentwicklung und Zellhomöostase im Organismus und besitzen die Fähigkeit, direkt die Transkription von Zielgenen, die in Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Überleben involviert sind, einzugreifen (Yen 2001).

Eine Verbindung zwischen den Proteinen Transthyretin und Leptin wurde erstmals im Jahre 2008 von der Arbeitsgruppe Kahn beschrieben. Die Arbeitsgruppe fand heraus, dass Leptin-defiziente *ob/ob*-Mäuse eine verminderte renale Clearance des RBP-4 aufweisen und sich somit erhöhte RBP-4-Spiegel im Serum der Mäuse messen lassen. Darüber hinaus fanden sie ein vierfach erhöhtes Transthyretin im Plasma der *ob/ob*-Mäuse (Mody et al. 2008).

Eine weitere Veröffentlichung aus dem Jahre 2010 stellt erstmals eine Verbindung des Knochenstoffwechsels mit dem Energiestoffwechsel (und Neuropeptid Y) her (Nunes et al. 2010). Transthyretin-defiziente Mäuse weisen erhöhte Neuropeptid Y-Spiegel und eine erhöhte Knochendichte auf.

Eine Verbindung zwischen Transthyretin und Leptin, beziehungsweise zwischen dem Energie- und Fettstoffwechsel sowie dem Knochenstoffwechsel ist durch die oben beschriebenen Untersuchungen sehr wahrscheinlich geworden.

2. Arbeitshypothese und Fragestellung

Da Transthyretin in vorangegangenen Untersuchungen als potentieller Modulator im Knochenstoffwechsel auffiel, sollte es Ziel dieser Arbeit sein, den grundlegenden Einfluss von Transthyretin auf den Knochenstoffwechsel zu klären. Dabei sollten die Auswirkungen von Transthyretin auf den Knochen im Mausmodell histologisch und histomorphometrisch ausgewertet werden. Darüber hinaus sollten weitere für den Knochenstoffwechsel relevante Veränderungen im Organismus Transthyretin-defizienter Mäuse ($Ttr^{-/-}$) charakterisiert werden. Anschließend sollten Leptin- und Transthyretin-defiziente sowie Leptin-Transthyretin-defiziente Mäuse im Hinblick auf Körpergewicht, Energie-Stoffwechsel und Knochenstoffwechsel untersucht werden, um mögliche Interaktionen zu charakterisieren.

Es sollten im Rahmen dieser Arbeit die folgenden zentralen Fragestellungen bearbeitet werden:

- 1. Welchen Einfluss hat Transthyretin auf den murinen Knochenstoffwechsel?**
- 2. Welche Veränderungen ergeben sich für den Knochenstoffwechsel bei einer Transthyretin-defizitären Situation beziehungsweise einer Transthyretin-Leptin-defizitären Situation im Mausmodell?**
- 3. Gibt es weitere für den Knochenstoffwechsel relevante Veränderungen im Organismus der Transthyretin-defizienten-Mäuse?**
- 4. Führt eine Transthyretin-Leptin-Defizienz zu einer möglichen Korrektur des *ob/ob*-Phänotyps im Mausmodell?**

3 Material und Methoden

3.1 Tierversuchsantrag

Die zur Anfertigung der Dissertation durchgeführten Tierversuche wurden nach Paragraph 8 des Tierschutzgesetzes durch die Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales (BAGS), der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt (Aktenzeichen Org 139). Alle Versuche erfolgten unter Aufsicht des Versuchsleiters Herrn Dr. rer. nat. Thorsten Schinke, Institut für Osteologie und Biomechanik, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf.

3.2 Versuchstiere

Um den Einfluss des Transthyretin auf den Knochenstoffwechsel untersuchen zu können, wurden Transthyretin-defiziente Mäuse mit dem genetischen Hintergrund C57B/6J analysiert. Darüber hinaus dienten als weiteres Kollektiv Leptin-defiziente-*ob/ob* Mäuse männlichen und weiblichen Geschlechts mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6J sowie Doppel-defiziente Mäuse, die folglich eine Leptin-Transthyretin-Defizienz aufweisen. Für die histologischen Untersuchungen wurden aus allen vier Gruppen (männlichen und weiblichen Geschlechts) 5 Tiere analysiert. Alle acht Mausgruppen wurden im Alter von 24 Wochen histologisch und histomorphometrisch analysiert. Die Versuchstiere wurden von den *Jackson Laboratories* geliefert. Während der gesamten Versuchsdauer wurden die Versuchstiere in der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Direktor: Dr. rer. nat. Andreas Haemisch) gehalten und versorgt. Die Mäuse wurden mit einem Standardfutter ernährt, erhielten Wasser ad libitum und wurden in Käfigen mit Kolonien von einer Größe mit bis zu 5 Tieren untergebracht. Die Versuchstiere wurden in der Tierhaltung einem gewöhnlichen Tag-Nacht-Rhythmus ausgesetzt (Lichtzyklus von 14 Stunden Dauer, 10 Stunden anhaltende Dunkelheit).

Tabelle 1: Versuchstiergruppen.

Darstellung des Versuchsaufbaus hinsichtlich der Gruppenverteilung. Um den Einfluss von Transthyretin auf den Knochenstoffwechsel und die Anpassung des *ob/ob*-Phänotyps zu untersuchen, wurden 4 Mausgruppen á 5 Tiere im Alter von 24 Wochen sowohl weiblichen als auch männlichen Geschlechts, histologisch und histomorphometrisch analysiert.

Versuchstiergruppen

Tiermodell	Alter	Geschlecht	Gruppengröße Histologie
Wildtyp	24 Wochen	weiblich	5 Tiere
Transthyretin-Defizienz	24 Wochen	weiblich	5 Tiere
Leptin-Defizienz	24 Wochen	weiblich	5 Tiere
Leptin-Transthyretin-Defizienz	24 Wochen	weiblich	5 Tiere
Tiermodell	Alter	Geschlecht	Gruppengröße Histologie
Wildtyp	24 Wochen	männlich	5 Tiere
Transthyretin-Defizienz	24 Wochen	männlich	5 Tiere
Leptin-Defizienz	24 Wochen	männlich	5 Tiere
Leptin-Transthyretin-Defizienz	24 Wochen	männlich	5 Tiere

3.3 Material

3.3.1 Geräte und Laborbedarf

Autoklav:	Blitz, KSG-Sterilisatoren (Olching)
Brutschrank:	BBD 6220 Heraeus (Hanau)
Gelkammern:	Sub Cell GT mit Powerpack 3000, Biorad (München)
Geldokumentation:	ChemiDoc, Biorad (München)
Kontaktradiograph:	Faxitron Cabinet System Faxitron (Wheeling Illinois, USA)
Kühltruhen:	Economy, Liebherr (Biberach an der Riß) GFL 6648, GFL (Burgwedel)
Mikroskop:	IX50/IX70, Olympus
Mikrotom:	CUT 4060/E Microtec (München)
Schlittenmikrotom:	Jung (Heidelberg)
Thermocycler:	Thermo Statplus, Eppendorf
Zentrifuge:	Biofuge fresco, Heraeus (Hanau)

3.3.2 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben wurden die Chemikalien von den Firmen BIO-RAD (München), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Carl Roth GmbH (Karlsruhe) und SIGMA-ALDRICH (Steinheim) verwendet.

3.4 Methoden

3.4.1 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien zur Genotypisierung

Zur Isolierung genomischer DNA wurde ein circa 1 cm langes Schwanzstück benötigt, welches mit 700 µl Lyse-Puffer und 50 µl Proteinase K über eine Dauer von 12 Stunden bei 55°C im Heizblock inkubiert wurde. Dieser Ansatz wurde dann mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (ROTH, Karlsruhe) versetzt, geschüttelt und zwei Minuten bei 13.000rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde sorgfältig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die untere Phase wurde verworfen. Diese Prozedur wurde im Anschluss wiederholt. Danach wurde zur oberen Phase das gleiche Volumen Isopropanol hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde dann für 5 Minuten bei -20°C inkubiert und erneut bei 13.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und anschließend verworfen. Zum dann übrig gebliebenen, sogenannten Pellet, wurden 500µl 70% Ethanol gegeben. Nach dem Waschen des Pellets wurde der Überstand erneut abgenommen und das Pellet in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und für 12 Stunden bei Raumtemperatur gelöst.

3.4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion dient der enzymatischen Synthese kurzer, genau definierter DNA-Sequenzen in vitro. Zunächst wird die doppelsträngige DNA (Matrize) mittels Hitzeeinwirkung denaturiert, was zum Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen führt. Die so entstandenen komplementären DNA-Einzelstränge werden mit zwei Oligonukleotid-Primern hybridisiert (*primer annealing*), welche die zu amplifizierende Region flankieren beziehungsweise eine spezifische

Anlagerung der Primer an die DNA erlauben. Schließlich werden die jeweiligen komplementären DNA-Stränge mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase synthetisiert. Eine repetitive Folge von Template-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Verlängerung der Primer durch die thermostabile DNA-Polymerase führt zu einer exponentiellen Anreicherung des DNA-Abschnitts, dessen Enden durch die Primer festgelegt sind. Für alle PCR-Anwendungen wurde von uns die thermostabile rekombinante Taq-DNA-Polymerase (ROCHE, Mannheim) verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden in einer PCR-Maschine von BIOMETRA (T3 Thermocycler, Göttingen) bzw. im iCycler von BIO-RAD (München) durchgeführt. Die Genotypisierung der *ob/ob*-Mäuse verläuft anschließend über einen Restriktionsverdau (*Dde 1*, BioLabs, New England) des PCR-Produktes, so dass alle drei möglichen Allelkombinationen (homozygot Wildtyp, heterozygot Wildtyp/Mutante, homozygot Mutante) nach Auftrennung auf einem Agarosegel bestimmt werden konnten.

PCR-Gemisch für *ob/ob*-Mäuse (für ein 2%iges Agarose-Gel)

2,0 µl 10x Taq-Polymerase-Puffer inklusive MgCl₂

3,0 µl Leptin Primer 1 (vorwärts)

3,0 µl Leptin Primer 2 (rückwärts)

0,5 µl dNTPs 10mM

0,3 µl Taq Polymerase (5U/µl)

10 µl Aqua dest.

1,0 µl genomische DNA (DNA-Template 1:10 verdünnt)

Anschließend erfolgt ein zweistündiger Enzymverdau mit Dde1 (2 µl Puffer, 0,5 µl Dde1 und 17,5 µl Aqua dest. pro 1 µl DNA) bei 37 °C im Wärmeschrank.

Tabelle 2: Cycler-Protokoll – *ob/ob*-Primer

Dargestellt sind die einzelnen Cycler-Programm-Einheiten, die für die PCR notwendig sind.

I	94 °C	4 Minuten	→	(Primärdenaturierung)
II	13 × Zyklen	94 °C	30 Sekunden	→ (Denaturierung)
		62 °C	1 Minute	→ (Hybridisierung)
		72 °C	45 Sekunden	→ (Synthese)
III	72 °C	10 Minuten	→	(Endsynthese)
IV	4 °C	unendlich	→	(Aufbewahrung)

Leptin Primer (vorwärts)

5'-TGT CCA AGA TGC ACC AGA CTC-3'

Leptin Primer (rückwärts)

5'-ACT GGT CTG AGG CAG GGA GCA -3'

PCR-Gemisch für Ttr^{-/-}-Mäuse (für ein 1%iges Agarose-Gel)

- 2,0 µl 10x Taq-Polymerase-Puffer inklusive MgCl₂
- 3,0 µl Transthyretin Primer 1 (vorwärts)
- 3,0 µl Transthyretin Primer 2 (rückwärts)
- 0,5 µl dNTPs 10mM
- 0,3 µl Taq Polymerase (5U/µl)
- 8 µl Aqua dest.
- 2 µl DMSO
- 1 µl genomische DNA (DNA-Template 1:10 verdünnt)

Ttr-Wildtyp Primer

5'-ATT TGA TGC CTG CAT GTG AA-3'

Ttr-Knockout Primer

5'-GGG GTT TGC TCG ACA TTG-3'

Tabelle 3: Cyclyer-Protokoll – Transthyretin-defiziente Primer

Dargestellt sind die einzelnen Cyclyer-Programm-Einheiten, die für die PCR notwendig sind.

I	94 °C	4 Minuten	→	(Primärdenaturierung)
II	13 × Zyklen	94 °C	45 Sekunden	→ (Denaturierung)
		58 °C	45 Sekunden	→ (Hybridisierung)
		72 °C	2 Minuten	→ (Synthese)
III	72 °C	10 Minuten	→	(Endsynthese)
IV	4 °C	unendlich	→	(Aufbewahrung)

3.4.3 DNA-Gelelektrophorese

Nach Ablauf der Reaktion im Cycler wurde der PCR-Ansatz mit 5 μ l DNA-Gel-Ladepuffer versetzt, um das PCR-Produkt nach der Fragmentgröße elektrophoretisch aufzutrennen. Das PCR-Produkt wurde über ein Agarosegel (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf) – 1%ig für Ttr, 2%ig für Leptin – mit 0,05 μ l/ml Ethidiumbromid (zur Anfärbung der DNA-Banden) bei ungefähr 80 Volt eine Stunde elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend erfolgte die fotografische Dokumentation des Agarosegels auf einen UV-Transilluminator. Zur genauen Bestimmung der Fragmentgröße der einzelnen Banden wurde als Standardgröße eine 1 kb-Leiter (INVITROGEN,) mit auf das Agarosegel aufgetragen.

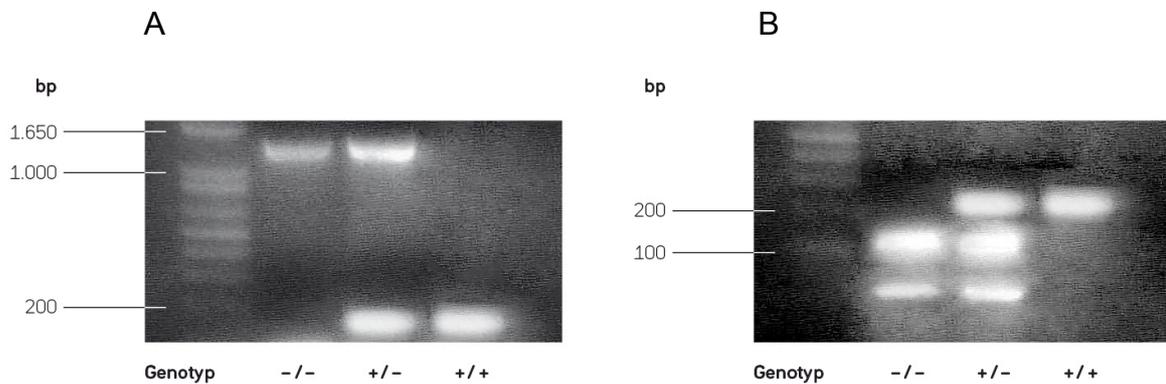


Abbildung 4: PCR-Primer.

A) Ttr-Primer. Die erste Bande läuft bei 1300bp und 50bp und zeigt den Knockout-Genotyp, Transthyretin-defizienter-Mäuse, an (-/-). Heterozygote Mäuse (+/-) erkennt man daran, dass die Bande bei 1300bp und 180bp läuft. Die Ttr- Bande bei unauffälligen, gesunden Mäusen liegt bei 180bp.

B) ob/ob-Primer. Die erste Bande läuft bei 100bp, die zweite Bande läuft bei circa 55bp und zeigt den Knockout-Genotyp, Leptin-Defizienz, an (-/-). Heterozygote Mäuse (+/-) erkennt man daran, dass die Bande bei 155bp, 100bp und 50bp läuft. Während die Bande bei unauffälligen, gesunden Mäusen (+/+) bei läuft 155 bp.

3.4.4 Tötung der Mäuse

Die Mäuse wurden mit einer Diethylether-Inhalationsnarkose getötet. Zunächst wurde das Gewicht der Mäuse bestimmt und dokumentiert. Dann erfolgte die Eröffnung des Thorax, um Blut aus dem Herzen zu entnehmen, im zweiten Schritt erfolgte die Punktion der Blase um Urin zu gewinnen (für eventuelle anschließende Untersuchungen spezieller Urinparameter). Des Weiteren wurden die Leber und

einzelne Fettgewebs-Proben unmittelbar post mortem entnommen und der histologischen Aufarbeitung zugeführt. Das Skelett wurde von Haut befreit, auf Korkplatten fixiert und für 24 Stunden in frischen 3,7% gepufferten Formaldehyd fixiert und anschließend für mindestens weitere 24 Stunden in 80%igem Ethanol gelagert. Danach erfolgte die Präparation der Tibia und der Lendenwirbelsäule, die ebenfalls anschließend der histologischen Aufarbeitung zugeführt wurden.

3.4.5 Charakterisierung des Körpergewichts und des Organgewichts

Zur Charakterisierung des Körpergewichts erfolgte im Alter von 6, 12 und 24 Wochen die Messung und anschließende Dokumentation des Körpergewichts aller Tiere der vier Mausgruppen. Darüber hinaus erfassten wir bei der Präparation der Tiere im Alter von 24 Wochen das Gewicht der Leber sowie des subcutanen Fettgewebes zur späteren Analyse.

3.4.6. Serumanalysen

Zur Analyse der Stoffwechselfparameter führten wir Untersuchungen des Serums von 24 Wochen alter Tiere, aller vier Mausgruppen, durch. Dies erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Zellulärer Lipidstoffwechsel, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf (PD Dr. Jörg Heeren).

3.4.7 Kontaktradiographie

Zur ersten Einschätzung des Knochenstatus und Dokumentation der verschiedenen Mäusegruppen wurde von jeder Maus eine Kontaktradiographie angefertigt (Röntgenfilme 13x18cm: Mamory HDR PQ, Fa. AGFA, Mechelen, Belgien).

Jedes fixierte Mausskelett wurde bei einer Röhrenspannung von 35kV und einer Belichtungszeit von zwei Sekunden geröntgt. Anschließend erfolgte die vergleichende Analyse der einzelnen Kontaktradiographien.

3.4.8 Histologie

3.4.8.1 Skeletthistologie mittels Acrylat-Einbettung

Nach der Präparation der Knochen erfolgte die histologische Aufarbeitung der Lendenwirbelkörper (LWK 1–4) und der proximalen rechten Tibia mit anschließender Einbettung in Acrylat. Die Acrylathistologie hat den Vorteil gegenüber anderen Einbettungsverfahren, dass der Knochen unentkalkt analysiert werden kann und der spätere Nachweis von Mineralisationsdefekten möglich ist. Zunächst wurden die freipräparierten Knochen in 3,7%igem PBS-gepuffertem Formaldehyd für 18 Stunden bei 4°C fixiert. Nach der Entwässerung der Knochen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils für 12 Stunden) mit 80%igem Ethanol, 96%igem Ethanol sowie 100%igem Ethanol im Autotechnikon wurden die Tibiae und die Lendenwirbelsäule nach Infiltration in Methylmetacrylat-Gemisch (Merck, Darmstadt) unentkalkt in ein Nonylphenyl-Polyethyleneglycolacetat-Gemisch (Sigma-Aldrich, USA) entstabilisiert und eingebettet. Nach der 24-stündigen Aushärtung durch Polymerisation bei 4°C und dem sich anschließenden Schleifen der Acrylat-Blöcke wurden 3-4 µm Sagittalschnitte mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (Cut 4060E, MicroTech, München) angefertigt. Die histologischen Präparate wurden im Brutschrank bei 60°C über Nacht getrocknet. Die Sagittalschnitte der Wirbelkörper und Tibiae wurden im Anschluss, nach abgeschlossener Trocknung, mit 1%iger Toluidinblau und der modifizierten von Kossa/van Gieson-Färbung gefärbt.

Die Auswertung der histologischen Schnitte, im letzten Arbeitsschritt, erfolgte mit einem Axioskop II (Carl Zeiss, Jena).

3.4.8.2 Toludinblau-Färbung

Die Toludinblau-Färbung ist eine Färbung die sich besonders zur Darstellung des Bindegewebes und Stützgewebes eignet. Durch metachromatische Farbeffekte bietet sie Differenzierungsmöglichkeiten insbesondere von Schleimdrüsen, Knorpelgrundsubstanz, Becherzellen und Mastzellgranula.

Färbeergebnis:

Mineralisierte Hartgewebe bleiben ungefärbt oder stellen sich blassblau dar. Zellen, Zellkerne, Osteoidsäume und Kollagenfasern lassen sich unterschiedlich blau anfärben. Verkalkte Knorpelmatrix färbt sich dunkelblau. Metachromatisch rot-violett stellen sich Knorpelmatrix, Mastzellgranula, frühe Wundheilungsareale dar.

Färbelösung:

1g Toludinblau O (Merck, Germany) in 100 ml destillierten Wassers gelöst.
Einstellung der Lösung bei pH 4,5.

Durchführung:

Zunächst wurden die Präparate dreimal für jeweils 5 Minuten in 2-(Methoxyethyl)-acetat entplastet. Anschließend wurden die Präparate für jeweils zwei Minuten in die absteigende Alkoholreihe gegeben (100%–50% EtOH) und mit Aqua dest. gespült. Für 30 Minuten erfolgte dann die Toludinblau-Färbung. Nach kurzer Spülung der Präparate wurden diese dann der aufsteigenden Alkoholreihe (50%–100% EtOH) zugeführt und entwässert. Im nächsten Arbeitsschritt wurde der Alkohol durch Xylol (drei Durchgänge für jeweils 5 Minuten) entfernt und die Schnitte eingedeckt (Eindeckmedium: DPX Mountant for histology, Fluka Analytical/Sigma).

3.4.8.3 Modifizierte von Kossa/van Gieson Färbung

Die modifizierte Kossa/van Gieson Färbung dient ebenfalls der Darstellung von Stütz- und Bindegewebe und eignet sich darüber hinaus vor allem zum Kalknachweis an unentkalkten Mikrotomschnitten.

Färbeergebnis:

Mineralisierter Knochen stellt sich schwarz dar, während sich Kollagen und Bindegewebe leuchtend rot anfärbt. Muskulatur und Erythrozyten werden gelb angefärbt. Durch diese Gegenfärbung erhält man eine kontrastreiche Darstellung von Osteoid und den umgebenen Zellen sowie des Weichgewebes.

Färbelösung:

Silbernitrat-Lösung (3%): 3g Silbernitrat (Merck, Germany) in 100 ml Aqua dest.

Natriumkarbonat-Formaldehyd-Lösung: 5g Natriumkarbonat (Merck,Germany) in 25ml 35–40%igem Formaldehyd und 75 ml Aqua dest. gelöst.

Van Gieson Gemisch: 2,5g Säurefuchsin, 900ml gesättigte Pikrinsäure, 100ml Glycerin, 5ml konzentrierte Salpetersäure.

Durchführung:

Die Präparate wurden zunächst dreimal für 5 Minuten in 2-(Methoxyethyl)-acetat entplastet. Es folgte Bewässerung der Schnitte durch Zuführung der Präparate in die absteigende Alkoholreihe (100%–50% EtOH) und die anschließende Spülung mit Aqua dest. Im Anschluss erfolgt die fünfminütige Färbung in der Silbernitrat-Lösung. Nach 10-minütiger Spülung in Aqua dest. wurden die Präparate 5 Minuten in Sodaformol gegeben und erneut 10 Minuten mit Leitungswasser gespült. Anschließend wurden die Schnitte 5 Minuten in Natriumthiosulfat gegeben sowie wiederum für 10 Minuten mit Leitungswasser gespült und zuletzt 20 Minuten mit der van-Gieson-Lösung gefärbt. Schließlich fand eine Entwässerung der Präparate mittels aufsteigender Alkoholreihe (50–100% EtOH) statt. Als letzter Arbeitsschritt erfolgt die Alkoholentfernung mit Xylol (drei Durchgänge, für jeweils 5 Minuten). Um das Austrocknen der Schnitte zu verhindern, wurden diese sofort eingedeckt (Eindeckmedium: DPX Mountant for histology, Fluka Analytical/Sigma).

3.4.8.4 Organhistologie mittels Paraffin-Einbettung

Die Histologie der Leber und des Fettgewebes erfolgte ebenfalls an 24 Wochen alten Versuchstieren mittels HE-Färbung nach Paraffin-Einbettung.

Zunächst erfolgte die Entwässerung der Präparate im Autotechnikon für zwölf Stunden: 60 min. 70%iger Ethanol, 2 x 60 min. 80%iger Ethanol, 2 x 60 min. 96%iger Ethanol, 2 x 60 min. 100%iger Ethanol, 2 x 60 min. Xylol, 3 x 60 min. Paraffin bei 60°Celsius. Anschließend erfolgte die Einbettung der Präparate mittels flüssigem, granuliertem Paraffin (Paraplast, Mc Cornick Scientific, St.Louis, USA) und die Anfertigung 3µm dicker Schnitte am Schlittenmikrotom. Die Präparate wurden im Brutschrank bei 37°C über Nacht getrocknet.

3.4.8.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) stellt eine Übersichtsfärbung dar und ergibt sich durch eine kombinierte, zweifache Färbung (Hämalaun-Lösung und Eosin G-Lösung) der Präparate.

Färbeergebnis:

In verschiedenen Blauabstufungen stellen sich Zellkerne, grampositive Bakterien und Kalk dar. Muskelgewebe und Bindegewebe werden in unterschiedlichen Tonabstufungen rot angefärbt.

Färbelösung:

Mayers Hämalaun (Merck)

HCl Alkohol (5ml 25% HCl mit 96%igem Ethanol auf 100 ml aufgefüllt)

Eosin G Lösung (0,25g Eosin G, 250ml Aqua dest. sowie 5 Tropfen Eisessig)

Durchführung:

Die Paraffin-Schnitte wurden bei 60°C für 15–30 Minuten im Brutschrank getrocknet und fixiert. Anschließend wurden die Schnitte zweimal in Xylol jeweils für 5 Minuten entparaffiniert. Es folgte daraufhin die Bewässerung der Präparate durch die absteigende Alkoholreihe (100–50% EtOH). Nach der Spülung mit Aqua dest. erfolgte dann die Färbung mit Hämatoxylin für zehn Minuten. Nach kurzer Spülung

mit Leitungswasser erfolgte im nächsten Arbeitsschritt das Eintauchen der Schnitte in HCl-Alkohol und die erneute zehnmünütige „Bläuung“ mit Leitungswasser. Für 2 Minuten wurden die Schnitte in Eosin 0,1% gefärbt und danach der aufsteigenden Alkoholreihe zugeführt. Um den Alkohol wieder zu entziehen, wurden die Schnitte für 15 Minuten in Xylol gegeben und anschließend eingedeckt, um das Austrocknen der Präparate zu verhindern (Eindeckmedium: DPX Mountant for histology, Fluka Analytical/Sigma).

3.4.8.6 Histomorphometrie

Die quantitativen histomorphometrischen Untersuchungen sind an unentkalkten, Toluidinblau- und von Kossa/van Gieson-gefärbten Schnitten der Lendenwirbelkörper und der proximalen Tibia durchgeführt worden. Die Analyse wurde unter Verwendung des Osteomeasure Histomorphometrie Systems (Osteometrix, Atlanta, GA) durchgeführt. Mittels Osteomeasure wurde das trabekuläre Knochenvolumen (bone volume per tissue volume, BV/TV in %), die Anzahl der Trabekel (TbN, trabecular number), der Abstand der Trabekel (TbSp, trabecular spacing) und die Trabekeldicke (TbTh, trabecular thickness) bestimmt. Darüber hinaus bestimmten wir die Anzahl der Adipozyten im metaphysären Bereich der Tibia.

3.5 Statistische Analysen

Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung des Student t-test.

Als signifikant wurde betrachtet: $p < 0,05$. Die Fehlerbalken repräsentieren die durchschnittliche Standardabweichungen (SD).

4. Ergebnisse

4.1 Körpergewichtsanalyse $Ttr^{-/-}$ -Mäuse

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Adipositas in der Kindheit mit einem erhöhten Frakturrisiko assoziiert ist, obgleich ein erhöhter Body-Mass-Index (BMI) direkt mit einer erhöhten Knochenmasse (BV/TV) korreliert. Da Leptin-defiziente *ob/ob*-Mäuse eine ausgeprägte Adipositas aufweisen und bekanntermaßen zusätzlich eine erhöhte Knochendichte vorhanden ist, sollte mittels Gewichtsdokumentation im Alter von 6, 12 und 24 Wochen untersucht werden, in welchem Ausmaß eine Veränderung des Körpergewichtes bei Transthyretin-defizienten ($Ttr^{-/-}$) Mäusen vorliegt und damit die Frage beantwortet werden, ob eine Transthyretin-Defizienz ebenfalls zu einer Adipositas führt und dies sekundär ein erhöhtes Knochenvolumen bedingt. Da Transthyretin das Gen ist, das in *ob/ob*-Mäusen überproduziert wird, stellte sich darüber hinaus die Frage, ob eine Deletion von *Ttr* in *ob/ob*-Mäusen zu einer Veränderung des Körpergewichtes dieser Mäuse führt und damit möglicherweise eine Verbesserung des *ob/ob*-Phänotyps zur Folge hat.

Bei Leptin-Transthyretin-defizienten Mäusen (*ob/ob;Ttr^{-/-}*) wurde das höchste Körpergewicht, zu den drei definierten Zeitpunkten, gemessen. Die Leptin-defizienten *ob/ob*-Mäuse wiesen vergleichbar hohe Werte auf. Bei beiden Mausgruppen liegt somit eine signifikante Erhöhung des Körpergewichtes vor, das ungefähr dreifach höher war, als das der Kontrolltiere. Im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren wiesen die $Ttr^{-/-}$ -Mäuse kein erhöhtes Körpergewicht auf. Diese Beobachtungen zeigten sich sowohl bei weiblichen, als auch bei männlichen Mäusen. Somit scheint eine isolierte Transthyretin-Defizienz keinen Einfluss auf das Körpergewicht im Mausmodell zu haben.

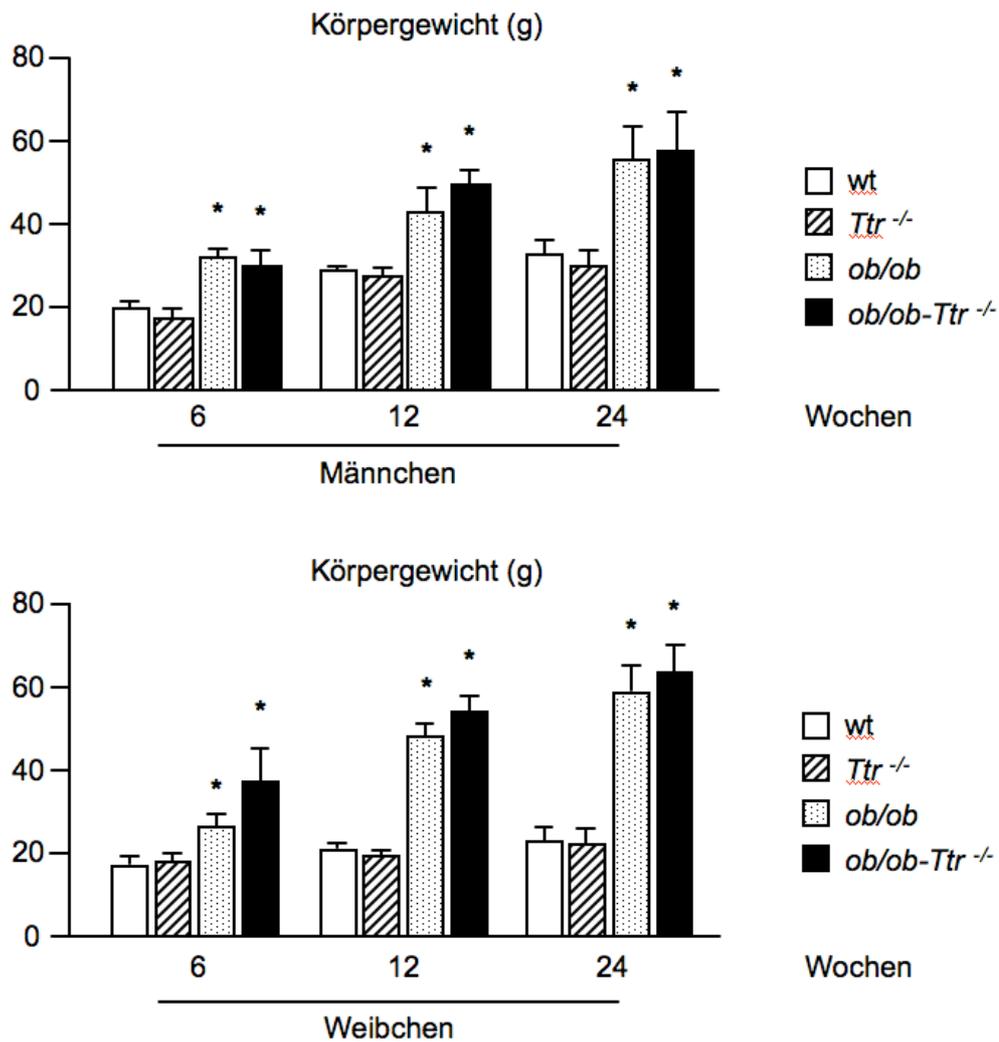


Abbildung 5: Körpergewicht (in Gramm) zu verschiedenen Zeitpunkten:

Körpergewicht der Männchen (oben), Körpergewicht der Weibchen (unten).

An den drei definierten Zeitpunkten (6, 12 und 24 Wochen) wurde das Körpergewicht der Mäuse in Gramm gemessen und dokumentiert. Das Gewicht der *Ttr*^{-/-}-Mäuse entspricht zu allen gemessenen Zeitpunkten annähernd denen der Wildtyp-Kontrolltieren, während das höchste Körpergewicht (bei beiden Geschlechtern) die Leptin-Transthyretin (*ob/ob;Ttr*^{-/-}) defizienten Tiere aufweisen.

Wt: Wildtyp, *Ttr*^{-/-}: Transthyretin-Defizienz, *Ob/ob*: Leptin-Defizienz, *ob/ob;Ttr*^{-/-}: Leptin-Transthyretin-Defizienz.

4.2 Kontaktradiographien

Die angefertigten Kontaktradiographien der einzelnen Mäuse zeigen einen ersten Überblick über die gesamte Knochensituation im Mausorganismus. Die Auswertung erfolgte einerseits durch morphologische Analyse der Knochenstruktur und -anatomie, andererseits durch die Bestimmung der Länge des rechten Femur und der Lendenwirbelsäule (anhand der Röntgenaufnahmen durch Messung des Abstandes der Lendenwirbelkörper 1–5). Beide Parameter (Femur- und Wirbelsäulen-Länge) können unter anderem Hinweise auf ein verändertes Längenwachstum bei den einzelnen Mausgruppen geben und lassen darüber hinaus Rückschlüsse auf die Körpergröße zu. Die genauere Analyse der Kontaktradiographien der 24 Wochen alten, weiblichen und männlichen Tiere zeigte, dass die $Ttr^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren skelettale Veränderungen im Sinne einer erhöhten Röntgendichte der einzelnen Knochen aufweisen. Die vermehrte Röntgendichte lässt am ehesten auf eine erhöhte Knochendichte schließen. Bei den ob/ob - und $ob/ob;Ttr^{-/-}$ -Mäusen wurde ebenfalls eine gesteigerte Röntgendichte beobachtet. Andere radiologisch morphologische Auffälligkeiten der einzelnen Knochen im Mausskelett der vier Mausgruppen konnten nicht aufgezeigt werden. Eine Veränderung des Längenwachstums und damit der Körpergröße der Tiere lag ebenfalls nicht vor.

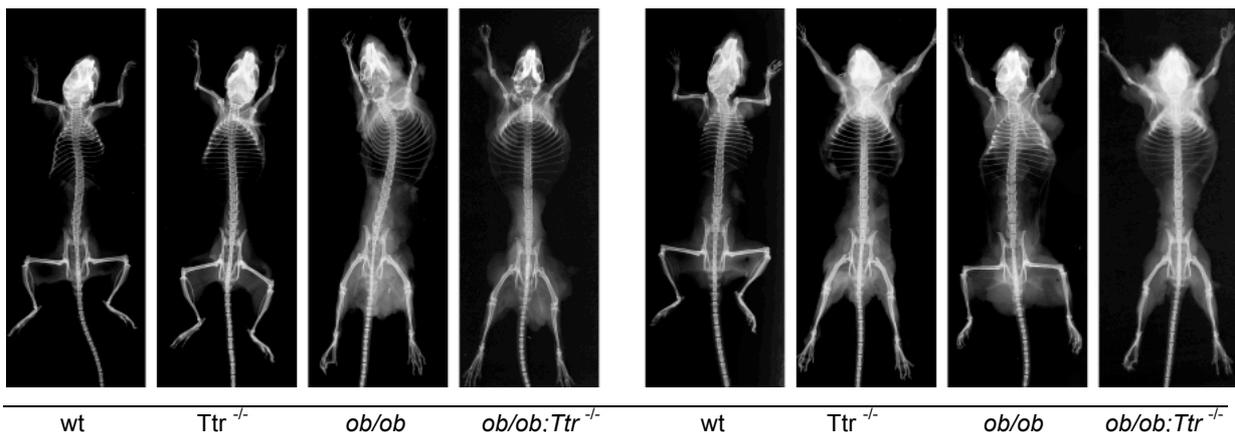


Abbildung 6: Kontaktradiographien der Mausskelette (links: Männchen, rechts: Weibchen).

Von Wildtyp (wt), Transthyretin- ($Ttr^{-/-}$), Leptin- (ob/ob) und Leptin-Transthyretin-defizienten Mäusen ($ob/ob;Ttr^{-/-}$) wurden Kontaktradiographien angefertigt. Bei den drei Mausmodellen lässt sich eine höhere Röntgendichte der Knochen erkennen, als bei den Kontrolltieren. Die erhöhte Röntgendichte lässt auf eine erhöhte Knochenmasse bei allen drei Mausmodellen schließen. Morphologischen Veränderungen des Mausskeletts sind bei allen vier Mausgruppen nicht erkennbar.

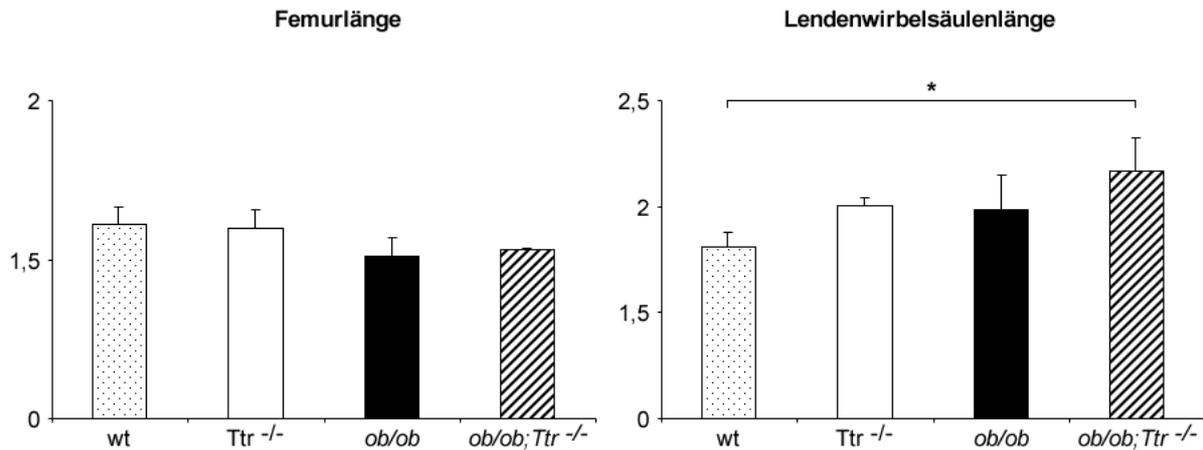


Abbildung 7: Femurlänge in cm (links) n=40, Lendenwirbelsäulen-Länge in cm (rechts) n=40.

Die Körpergröße der Tiere wurde ermittelt durch Messung der Länge des Femur und der Lendenwirbelkörper (LWK1–LWK5). Sie stellte sich bei allen drei Mausmodellen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren unauffällig dar. Geschlechtsspezifische Unterschiede wurden ebenfalls nicht beobachtet.

4.3 Skelettale Histologie

Der Verlust beider Allele des Transthyretin-Gens (Ttr ^{-/-}) und die daraus resultierende Abwesenheit von Transthyretin führt zu einem veränderten Knochenphänotyp in der Maus. Die Lendenwirbelkörper der drei Mausmodelle und der Wildtyp-Kontrollgruppe wurden im Alter von 24 Wochen histomorphometrisch vermessen und die strukturellen Knochenparameter mittels Osteomeasure quantifiziert. Bei den Mäusen weiblichen und männlichen Geschlechts zeigte sich, dass alle drei Mausmodelle ein signifikant erhöhtes trabekuläres Knochenvolumen (BV/TV), im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren, aufwiesen. Darüber hinaus zeigten die histologischen Schnitte der nicht-dekalzifizierten Lendenwirbelkörper (LWK-1 bis LWK-4) in der von-Kossa-Färbung, sowohl bei weiblichen, als auch männlichen Ttr ^{-/-}-Mäuse im Alter von 24 Wochen eine erhöhte Trabekeldicke (TbTh; *trabecular thickness*), im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren (siehe Abbildung 10 und 11). Zusätzlich konnte bei Ttr ^{-/-}-Mäusen eine signifikant erhöhte Trabekelanzahl (TbN; *trabecular number*) sowie ein signifikant verringerter Abstand der Trabekel (TbSp; *trabecular spacing*) aufgezeigt werden. Sehr ähnliche Ergebnisse erbrachte ebenfalls die histologische Analyse der ob/ob-Mäuse und ob/ob; Ttr ^{-/-}-Mäuse im Alter von 24 Wochen.

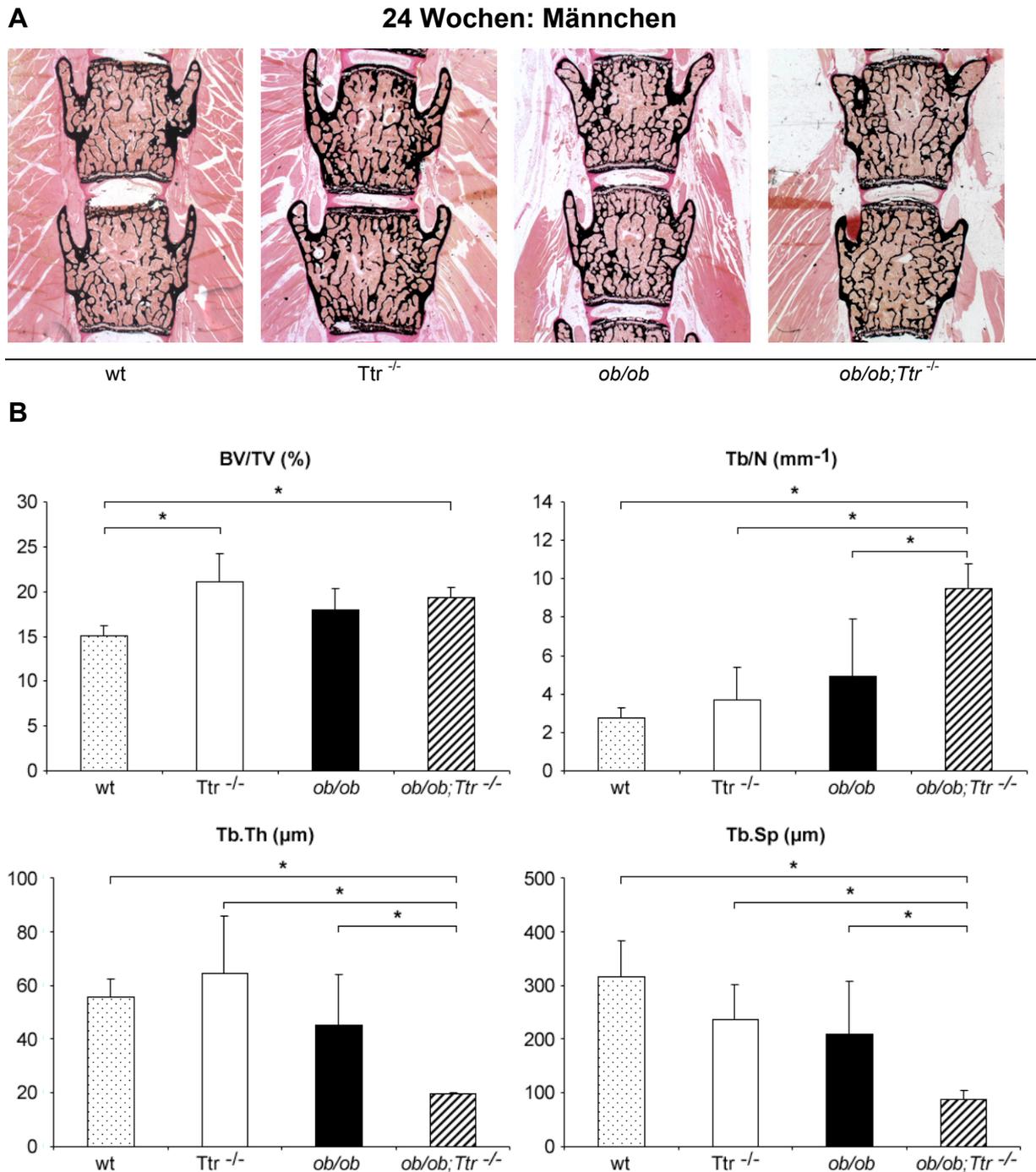


Abbildung 8: Histologische und Histomorphometrische Analysen (Männchen) der Lendenwirbelsäule.

A) Histologische Analyse der Knochenstruktur (oben): Von Kossa/van Gieson gefärbte histologische Schnitte (Frontalebene) von Mauslendenwirbelkörpern (L2-L3) im Alter von 24-Wochen.

Mineralisierter Knochen ist schwarz dargestellt. Ttr^{-/-} männliche Mäuse zeigen ein erhöhtes trabekuläres Knochenvolumen, im Vergleich zu den Wildtyp-Kontroll-Mäusen (wt). Ebenso ist bei den ob/ob-Mäusen und den ob/ob-Ttr^{-/-}-Mäusen ein im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren erhöhtes Knochenvolumen festzustellen.

B) Histomorphometrische Analyse der Knochenstruktur der Lendenwirbelsäule der männlichen Mäuse im Alter von 24 Wochen (unten).

BV/TV (*bone volume/tissue volume*): Knochenvolumen pro Gewebvolumen in %; TbN (*trabecular number*): Anzahl der Trabekel in mm⁻¹; TbTh (*trabecular thickness*): Trabekeldicke in μm; TbSp (*trabecular spacing*): Abstand der Trabekel in μm. (* bedeutet p < 0,05 in t-Test; n > 5)

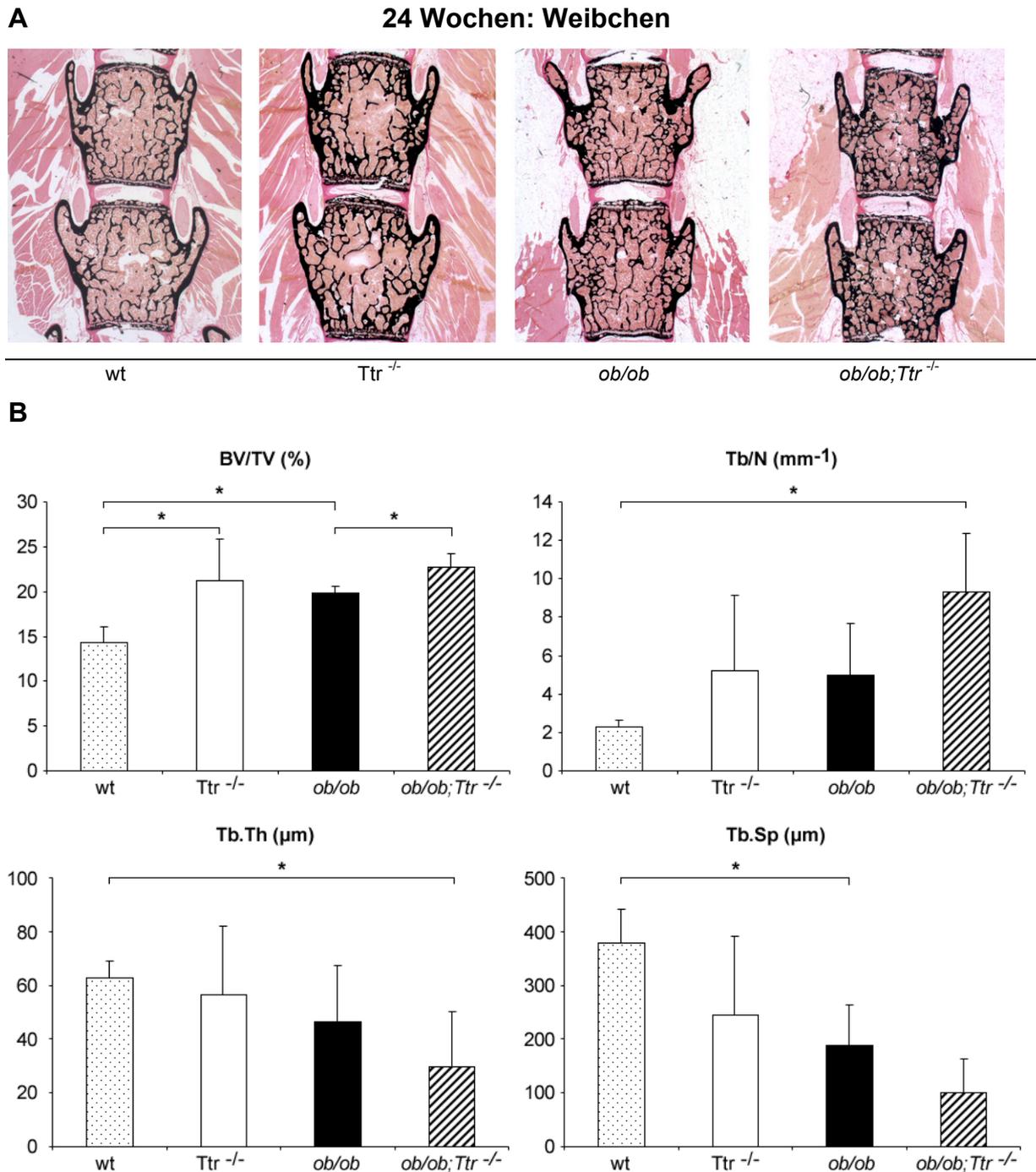


Abbildung 9: Histologische und Histomorphometrische Analysen der Lendenwirbelsäule (Weibchen).

A) Histologische Analyse der Knochenstruktur (oben). Von Kossa/van Gieson-gefärbte histologische Schnitte (Frontalebene) von Mauslendenwirbelkörpern (L2-L3) im Alter von 24-Wochen .

Mineralisierter Knochen ist schwarz dargestellt. Ttr^{-/-}-Mäuse zeigen ein erhöhtes trabekuläres Knochenvolumen, im Vergleich zu den Wildtyp-Mäuse (wt). Ebenso ist bei den ob/ob-Mäusen und den ob/ob/Ttr^{-/-}-Mäusen ein im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren erhöhtes Knochenvolumen festzustellen.

B) Histomorphometrische Analyse der Knochenstruktur der Lendenwirbelsäule in 24 Wochen alten weiblichen Mäusen (unten).

BV/TV (*bone volume/tissue volume*): Knochenvolumen pro Gewebvolumen in %; TbN (*trabecular number*): Anzahl der Trabekel in mm⁻¹; TbTh (*trabecular thickness*): Trabekeldicke in µm; TbSp (*trabecular spacing*): Abstand der Trabekel in µm. (* bedeutet p < 0,05 im t-Test; n > 5)

Die Untersuchungen konnten zeigen, dass sowohl *ob/ob*-Mäuse, als auch *ob/ob;Ttr^{-/-}*-Mäuse eine signifikant erhöhte Knochenmasse im Vergleich zu den Wildtypkontrollen aufweisen. Darüber hinaus ist bei *Ttr^{-/-}*-Mäusen die Trabekeldicke (TbTh) noch stärker ausgeprägt als die Trabekeldicke bei *ob/ob*-Mäusen und die der als zusätzliches Mausmodell untersuchten Leptin-Transthyretin-defizienten-Doppelknockout-Mäusen.

Zusammenfassend ist die erhöhte Knochenmasse (BV/TV) bei *ob/ob*-Mäusen und *Ttr^{-/-}*-Mäusen sowie bei Leptin-Transthyretin-defizienten-Mäusen durch einen signifikanten Anstieg der Trabekelanzahl (TbN) bei gleichzeitig verringertem Trabekelabstand (TbSp) zu erklären.

Ferner wurde eine histologische Analyse der Tibiae aller vier Mausgruppen durchgeführt um nähere Informationen über Epiphysenfuge und Längenwachstum zu erhalten. Die genauere Analyse der Epiphysenfuge der Tibia zeigte einen physiologischen Aufbau, so dass ein gestörtes Längenwachstum ausgeschlossen werden konnte. Allerdings fiel in der von-Kossa-Färbung beim Leptin-Transthyretin-defizienten-Mausmodell ein mit reichlich Adipozyten durchsetzter Markraum der Tibia auf.

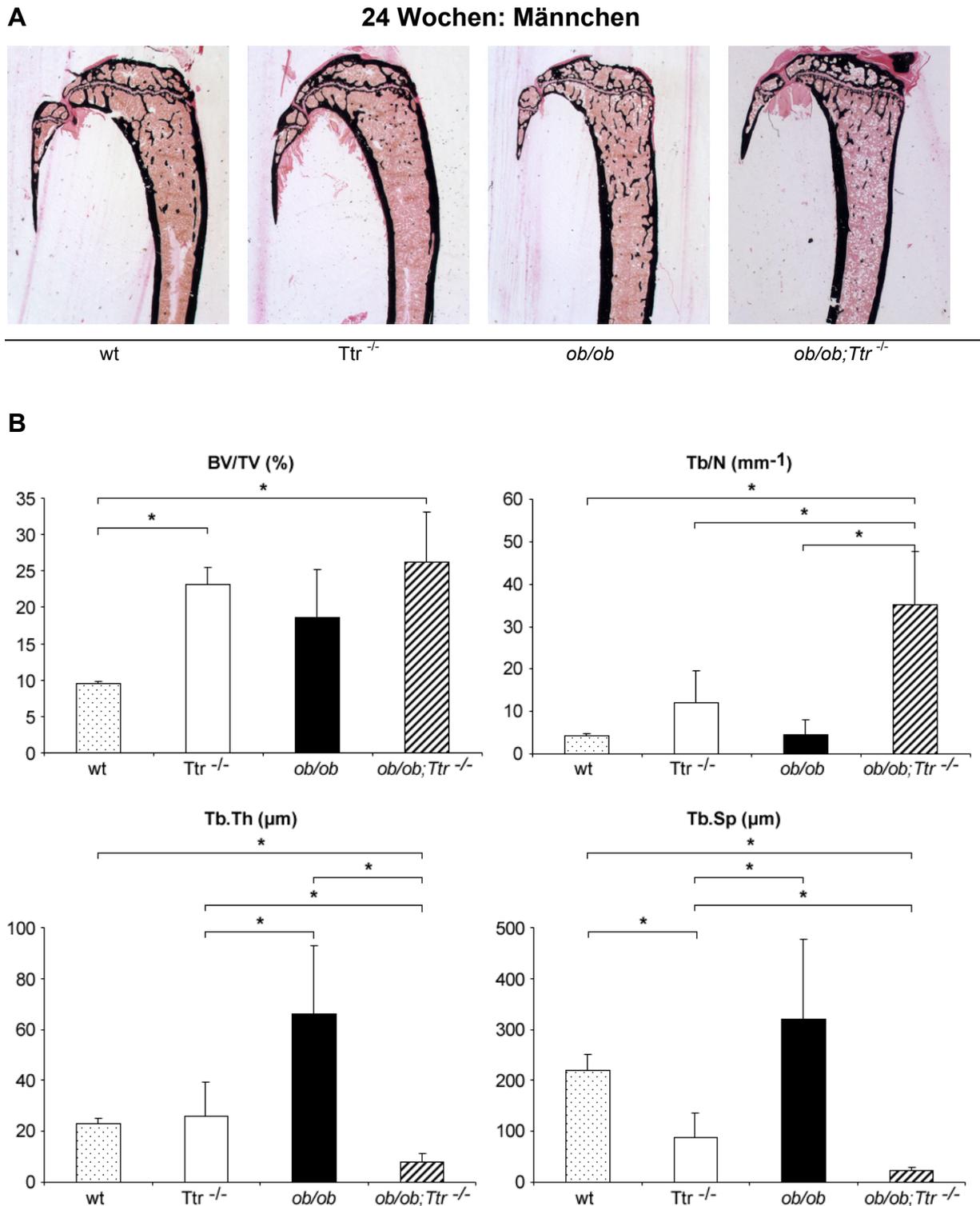


Abbildung 10: Histologische und Histomorphometrische Analysen der Tibia (Weibchen).

A) Histologische Analyse der Knochenstruktur (oben):

Von Kossa/van Gieson gefärbte histologische Schnitte (Frontalebene) von der proximalen Tibia der vier Mausmodelle: Wildtyp-, $Ttr^{-/-}$ -, *ob/ob*- und Leptin-Transthyretin-defiziente Mäuse im Alter von 24-Wochen.

B) Histomorphometrische Analyse der Knochenstruktur der Tibia 24 Wochen alten Mäusen männlichen Geschlechts (unten).

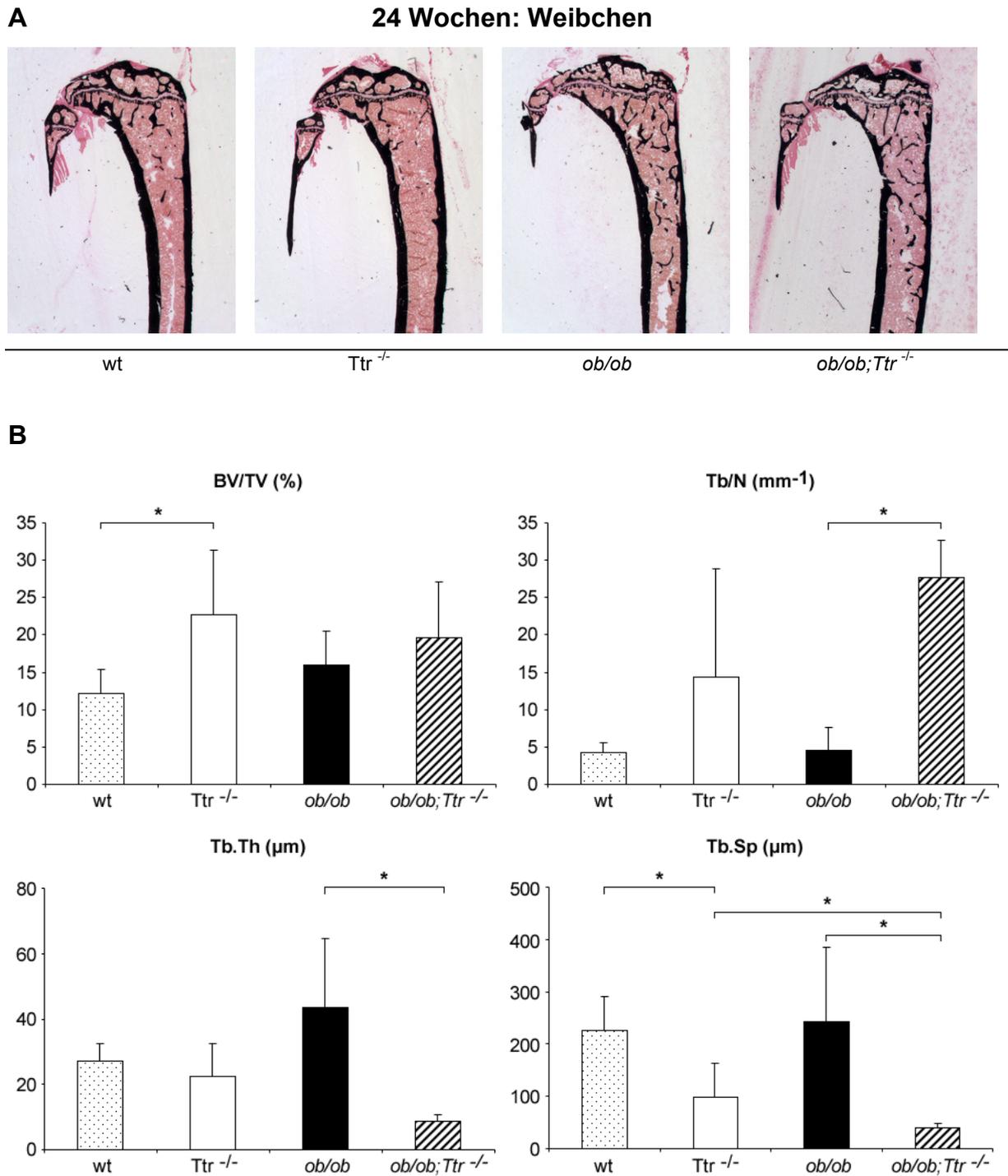


Abbildung 11: Histologische und Histomorphometrische Analysen der Tibia (Weibchen).

A) Histologische Analyse der Knochenstruktur (oben):

Von Kossa/van Gieson gefärbte histologische Schnitte (Frontalebene) von der proximalen Tibia der vier Mausmodelle: Wildtyp-, *Ttr*^{-/-}-, *ob/ob*- und Leptin-Transferrin-defiziente Mäuse im Alter von 24-Wochen.

B) Histomorphometrische Analyse der Knochenstruktur der Tibia 24 Wochen alten Mäusen weiblichen Geschlechts (unten).

24 Wochen: Männchen

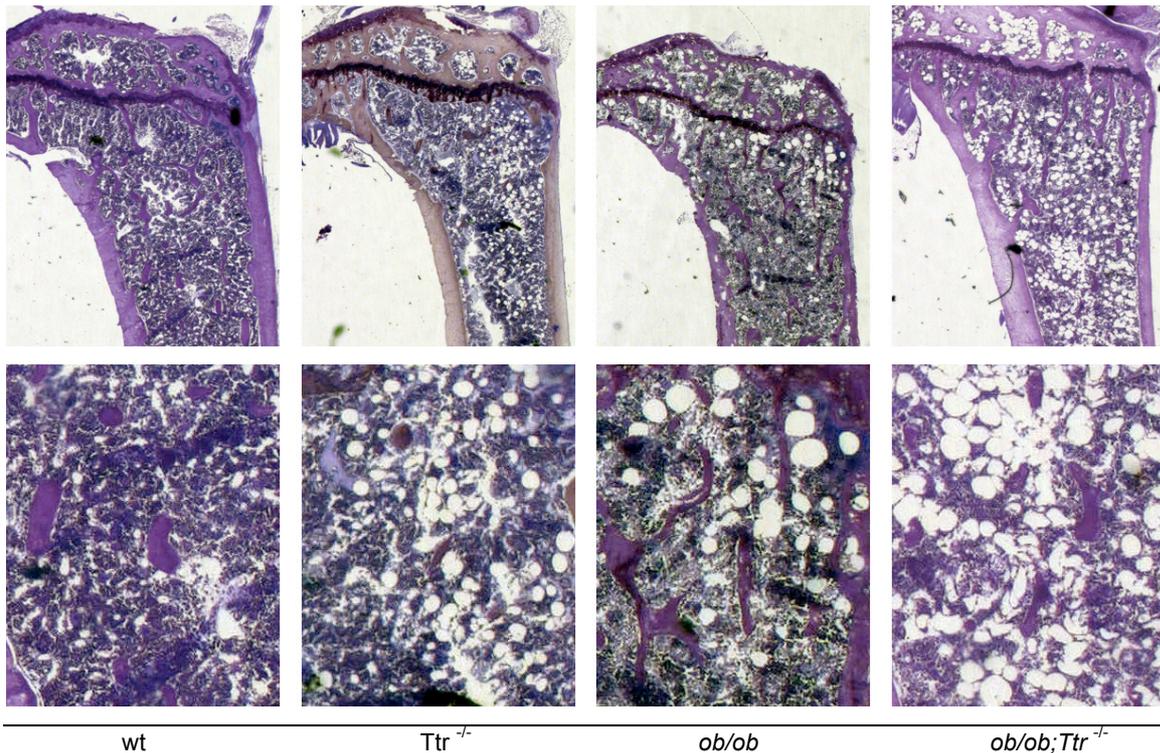


Abbildung 12: Toludinblau-gefärbte Tibia-Schnitte aus Wildtyp-, $Ttr^{-/-}$, ob/ob - und Leptin-Transthyretin-defizienten Mäusen im Alter von 24-Wochen.

Mineralisierter Knochen stellt sich blass blau beziehungsweise ungefärbt dar. Der Markraum der Tibia ist bei $Ttr^{-/-}$, ob/ob - und $ob/ob;Ttr^{-/-}$ -Mäusen mit Adipozyten durchsetzt.

Zur besseren Beurteilung des Markraumes sind in Abbildung 12 und 13 die Tibiae der einzelnen Mausgruppen mittels Toludinblau-Färbung dargestellt. Die Histologie macht deutlich, dass bei $ob/ob;Ttr^{-/-}$ -Tieren und in geringerem Ausmaß bei ob/ob -Mäusen ein Fettmark zu beobachten ist. $Ttr^{-/-}$ -Mäuse weisen histologisch auf den ersten Blick eine ebenfalls erhöhte Anzahl von Adipozyten im Fettmark, im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren, auf.

Zur Quantifizierung der Adipozyten im Fettmark der einzelnen Mausgruppen führten wir eine Analyse mittels Auszählung der Adipozyten im Knochenmark durch, um vergleichende Beobachtungen zwischen den einzelnen Mausgruppen anstellen zu können. Die Adipozyten-Anzahl im Bereich der Metaphyse der Tibia war sowohl bei weiblichen, als auch bei männlichen $ob/ob;Ttr^{-/-}$ -Mäusen deutlich erhöht. Allerdings findet man auch bei ob/ob - und $Ttr^{-/-}$ -Mäusen eine erhöhte Anzahl von Adipozyten im Knochenmark, die im Vergleich zu den Leptin-Transthyretin-defizienten Mausmodell allerdings deutlich weniger ausgeprägt waren. Bei den Wildtyp-Kontrolltieren lassen sich nur wenige Adipozyten nachweisen.

24 Wochen: Weibchen

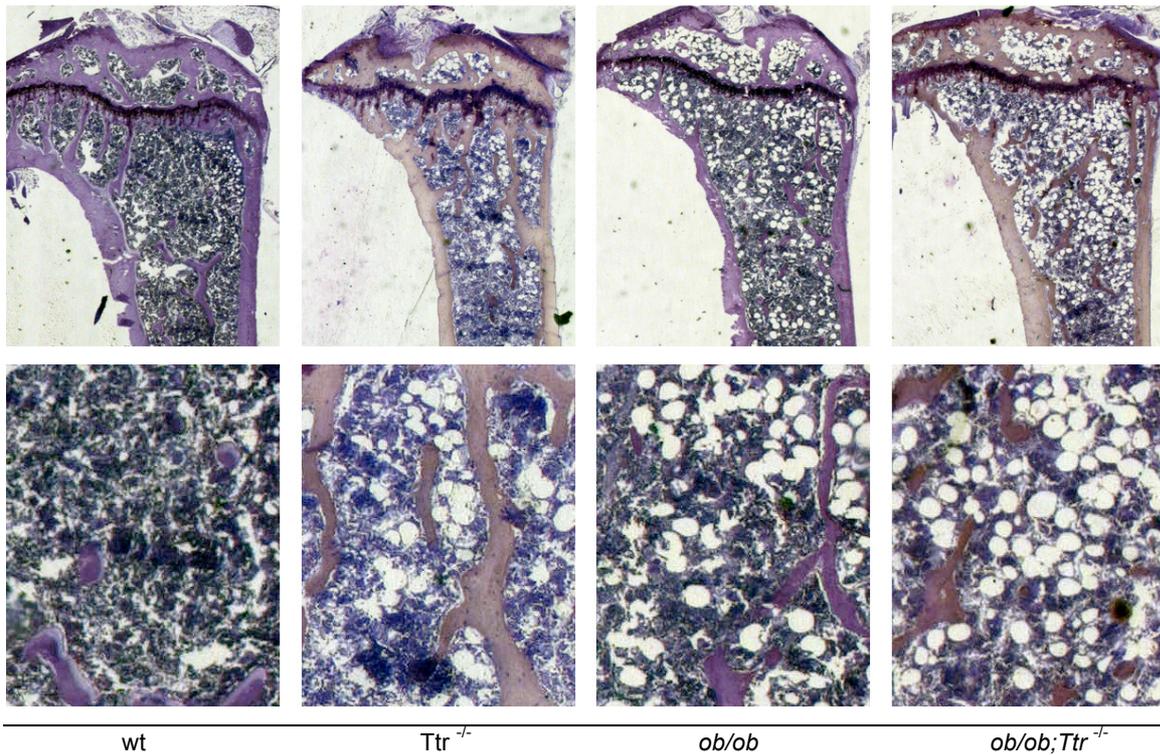


Abbildung 13: Toluidinblau-gefärbte Tibia-Schnitte der Mäuse weiblichen Geschlechts im Alter von 24-Wochen.

Mineralisierter Knochen stellt sich blass blau beziehungsweise ungefärbt dar. Der Markraum der Tibia der drei Mausmodelle ist ebenfalls mit Adipozyten durchsetzt.

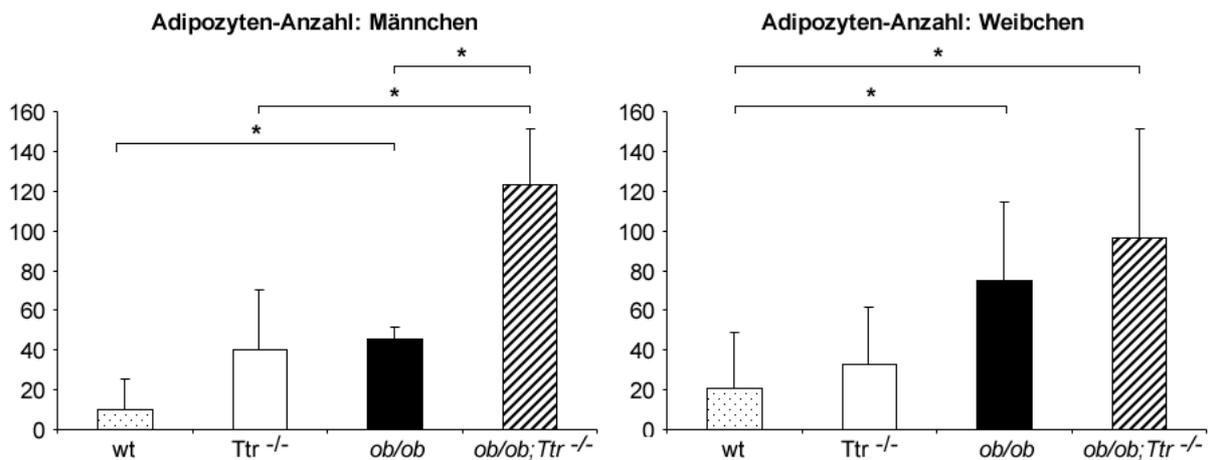


Abbildung 14: Adipozyten-Anzahl im metaphysären Bereich der Tibia von männlichen (links) und weiblichen (rechts) Mäusen im Alter von 24 Wochen.

Die Abbildung macht deutlich, dass sich im Leptin-Transsthyretin-defizienten Mausmodell eine erhöhte Anzahl von Adipozyten in der Tibia zeigt. Im Vergleich zum Wildtyp finden sich darüber hinaus vergleichbar erhöhte Adipozyten-Werte für Leptin-defiziente-ob/ob-Mäuse sowie für die Ttr^{-/-}-Mäuse.

4.4 Serum-Analysen

Die Konzentrationsmessungen bestimmter Hormon- und Stoffwechsel-Parameter aus *ob/ob*- und *Ttr*^{-/-}-Mäusen sollten Hinweise auf eine mögliche Beeinflussung durch diese Produkte im murinen Stoffwechsel geben. Zunächst führten wir bei *ob/ob*-Mäusen eine Bestimmung des Retinols (Vitamin A₁) im Serum durch. Hierbei zeigte sich, dass 24 Wochen alte *ob/ob*-Mäuse eine Erhöhung des Serum-Retinols aufweisen. Somit ist bei einer vorhandenen Leptin-Defizienz eine vermehrte Anreicherung des Retinols im Serum messbar, was eine Beeinflussung des Vitamin-A-Stoffwechsel im diesem Mausmodell wahrscheinlich macht und möglicherweise auch über diesen Mechanismus zu einem veränderten Knochenphänotyp führt.

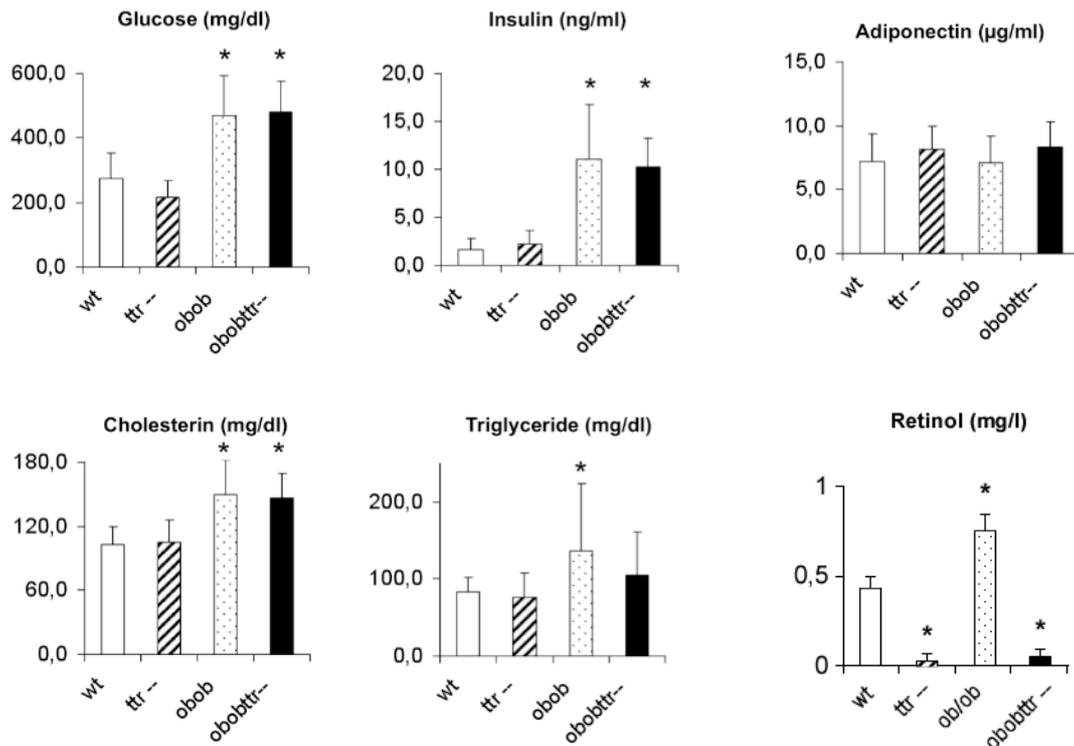


Abbildung 15: Bestimmung der Serumspiegel von Glucose, Insulin, Adiponectin, Cholesterin, Triglyceride und Retinol im Serum von Wildtyp-Mäusen, *Ttr*^{-/-}, *ob/ob*-, *ob/ob-Ttr*^{-/-}-Mäusen im Alter von 24 Wochen.

Die Serumspiegel für Adiponectin entsprechen in allen drei veränderten Mausmodellen denen der Wildtyp-Kontrollen, während Glucose und Insulin erwartungsgemäß in Leptin-defizienten *ob/ob*-Mäusen und im Doppelkockout-Mäusen (*ob/ob;Ttr*^{-/-}) signifikant erhöht sind. *Ttr*^{-/-}-Mäuse weisen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen erniedrigte Plasmaglukose-Spiegel auf. Triglyceride und Cholesterin sind in Leptin-defizienten und in Leptin-Transthyretin-defizienten Mäusen erhöht, während Wildtyp-Mäuse (wt) und die *Ttr*^{-/-}-Mäuse annähernd gleiche Werte aufweisen.

Darüber hinaus wirken sich Modifikationen im Glukose- und Fettstoffwechsel unter bestimmten Bedingungen, wie zum Beispiel bei Vorliegen eines Diabetes mellitus, Cushing-Syndrom oder Anorexia nervosa, auf die skelettale Gesundheit im Organismus aus. Zur Einschätzung einer möglichen, veränderten Stoffwechsellage vor allem im Transthyretin-defizienten Mausmodell, führten wir eine Konzentrationsbestimmung der wichtigsten Stoffwechsel- und Lipidparameter durch. Desweiteren stellte sich an dieser Stelle die Frage, ob eine kombinierte Leptin-Transthyretin-Defizienz im Mausmodell zu einer möglichen Korrektur des *ob/ob*-Phänotyps führt.

Die Serum-Analyse zeigte dabei, dass *ob/ob*- sowie *ob/ob;Ttr*^{-/-}-Mäuse laborchemisch signifikant erhöhte Insulin- und Glukose-Parameter aufweisen und damit das Vorliegen eines Diabetes mellitus unterstützen. Das Adiponectin wird als Fettstoffwechsel-Parameter angesehen und kann Hinweise auf das Vorliegen eines Metabolischen Syndroms geben. Bei allen drei Mausgruppen wurden Adiponectin-Konzentrationen gemessen, die annähernd den Werten der Kontrolltiere entsprachen. Cholesterin und Triglyceride dienten als Parameter für eine mögliche Lipidstoffwechsellage, wobei erhöhte Konzentrationen im Serum der *ob/ob*- und *ob/ob;Ttr*^{-/-}-Mäuse gemessen werden konnten.

4.5 Organhistologie

4.5.1 Histologische Analyse der Leber

Um mögliche morphologische Veränderungen des Lebergewebes aufzuzeigen führten wir zunächst eine histologische Aufarbeitung der Leber, mittels Paraffin-Einbettung und HE-Färbung bei allen vier Mausmodellen durch. Da Leptin-defiziente *ob/ob*-Mäuse eine diabetische Stoffwechsellage, welche häufig mit einer Fettleber (Steatosis hepatis) einhergeht, aufweisen, stellte sich die Frage, ob *Ttr*^{-/-}-Mäuse ebenfalls mikroskopische Veränderungen in der Leber zeigen oder im Doppel-Defizienz-Mausmodell eine Veränderung des histologischen Befundes beobachtet werden kann. Aufgrund der zum Teil massiv ausgeprägten Fetteinlagerung, sowohl bei den *ob/ob*- als auch den *Ttr*^{-/-}-Mäusen und dem Doppel-Knockout, stellt sich die Leber histologisch als Steatosis hepatis dar und ist auch makroskopisch durch eine

gelblich-weißliche Verfärbung des Gewebes zuerkennen. Die Prävalenz der Fettleber war bei unseren Untersuchungen der Mausmodelle sehr unterschiedlich. Bei $Ttr^{-/-}$ -Mäusen konnte eine Steatosis bei zwei von elf Tieren nachgewiesen werden, während bei den ob/ob -Mäusen drei von fünf Tiere von einer Fettleber betroffen waren. Bei dem kombinierten Mausmodell mit Vorliegen einer Leptin-Transthyretin-Defizienz manifestierte sich die Steatosis bei allen acht Tieren. Einige Untersuchungen legen außerdem den Verdacht nahe, dass bei $Ttr^{-/-}$ -Mäusen von einem erhöhten Risiko an einem hepatozellulären Carcinom (HCC) zu erkranken, auszugehen ist. Beim Vorliegen eines HCC ist die Protein-Struktur des Transthyretin abnorm verändert, beziehungsweise kann die Ttr -Genexpression nachhaltig unterdrückt oder ganz aufgehoben sein (Jian-Ren et al. 1991). Dem zu Folge könnte Ttr auch als Marker für hepatische Karzinome in Betracht gezogen werden.

Die genaue Analyse der Leberhistologien zeigte in keinem einzigen Fall das Vorliegen eines Hepatozellulären Karzinoms. Lediglich die beschriebene Veränderung im Sinne einer Steatosis hepatis war in den histologischen Präparaten der Leptin- und Transthyretin-Leptin-defizienten Mausmodellen erkennbar. Morphologisch in situ erschien die Leber bei unseren Untersuchungen, sowohl bei den Leptin-defizienten als auch bei den Doppel-Knockout Mäusen, zweifellos vergrößert, während bei $Ttr^{-/-}$ -Mäusen eine unveränderte Lebergröße zu erkennen ist.

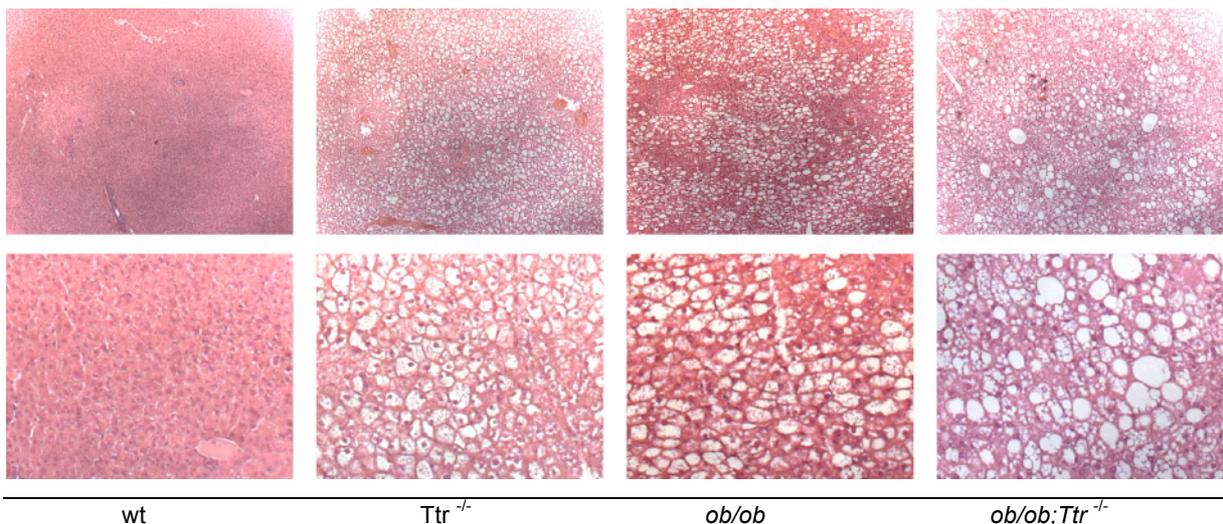


Abbildung 16: Leberhistologie im Alter von 24 Wochen, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (untere Zeile: doppelte Vergrößerung).

Die Histologie der Leber mittels HE-Färbung zeigt bei $Ttr^{-/-}$), ob/ob sowie $ob/ob;Ttr^{-/-}$ -Mäusen eine Fettleber (Steatosis hepatis) durch zum Teil massive Einlagerung von Adipozyten.

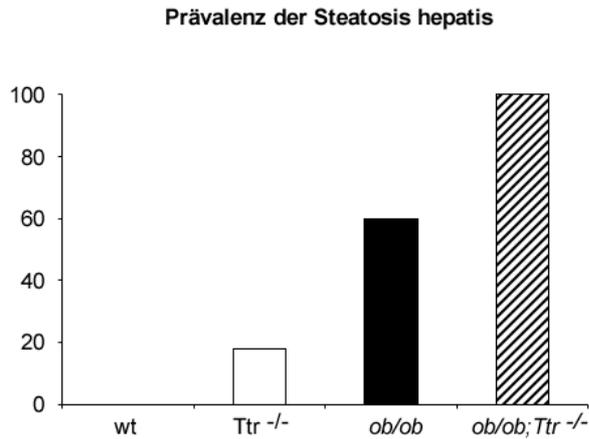


Abbildung 17: Prävalenz der Steatosis hepatis (Fettleber) in Prozent.

Die Leptin-Transthyretin-Defizienz führte bei unseren Untersuchungen zu 100% zu einer Fettleber, während bei *ob/ob*-Mäusen eine Fettleber bei 60% der Tiere gesehen wurde. Deutlich seltener (18%) kommt es bei einer Transthyretin-Defizienz zu einer Fettleber. Bei den Wildtyp-Kontrolltieren zeigte sich histologisch in keinem einzigen Fall eine Fettleber.

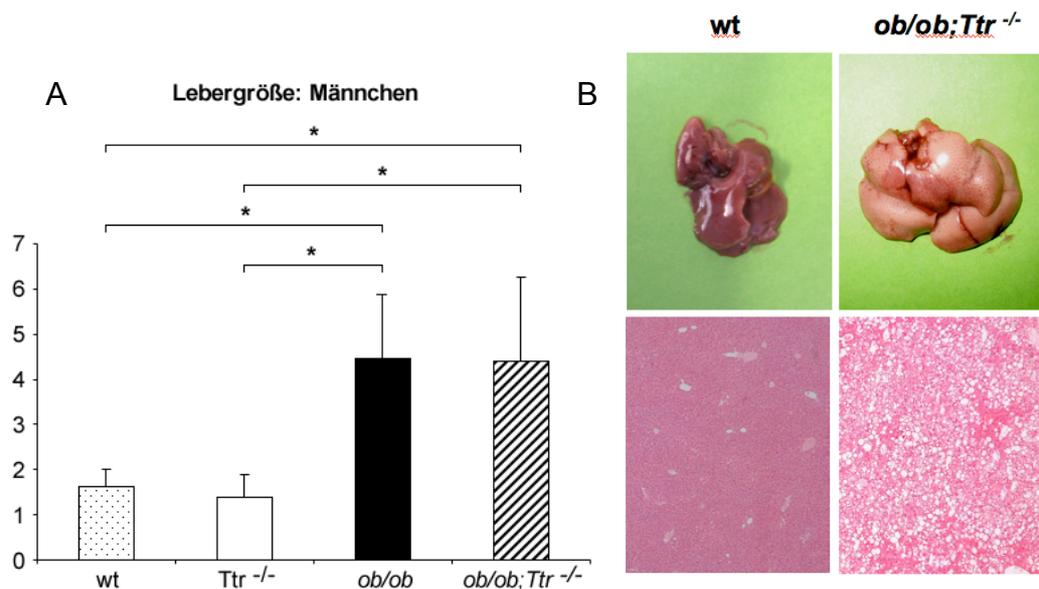


Abbildung 18:

A) Analyse der Lebergröße (in Gramm) im Alter von 24 Wochen.

Die Lebergröße Ttr^{-/-}-Mäuse entspricht bei beiden Geschlechtern den Werten der Kontrolltiere (wt). Leptindefiziente *ob/ob*- sowie *ob/ob;Ttr^{-/-}*-Mäuse weisen ein deutlich erhöhtes Gewicht der Leber auf.

B) Makroskopische und histologische Darstellung der Leber 24 Wochen alter Mäuse.

Die Leber der *ob/ob;Ttr^{-/-}*-Mäuse erscheint makroskopisch deutlich vergrößert. Durch die ausgeprägte Einlagerung von Adipozyten ins Lebergewebe kommt die hellere, gelblich erscheinende Färbung der Leber zustande.

4.5.2 Histologie des Fettgewebes

Bei *ob/ob*-Mäusen liegt eine Veränderung der Fettzellen, in Form einer Adipozyten-Hypertrophie und erhöhten Anzahl von Fettzellen, vor. Es stellte sich die Frage, welchen Einfluss eine isolierte Transthyretin-Defizienz auf das Fettgewebe der Mäuse hat und ob eine kombinierte Leptin-Transthyretin-Defizienz zu einer Verbesserung des *ob/ob*-Phänotyps in diesen Mäusen führt. Zur Beantwortung dieser Fragestellung führten wir ebenfalls eine histologische Analyse mittels Paraffineinbettung und anschließender Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Fettgewebes durch. Es konnte dabei gezeigt werden, dass in der Histologie des Fettgewebes im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren bei allen drei Mausmodellen hypertrophierte (und in Anzahl vermehrte) Adipozyten vorliegen. Zur Verifizierung der Fettgewebs-Histologien führten wir darüber hinaus eine Quantifizierung durch. Hierbei ermittelten wir die Oberflächen-Größe der Adipozyten (in mm^2) und konnten für alle drei Mausmodelle signifikant vergrößerte Werte messen (siehe Abbildung 21). Die höchsten Oberflächen-Werte der Adipozyten wiederum konnten bei *ob/ob;Ttr^{-/-}*-Mäusen gemessen werden. Die *Ttr^{-/-}*-Mäuse weisen ebenfalls eine vergrößerte Oberfläche der Adipozyten auf, allerdings ist diese im Vergleich zu den *ob/ob*- und *ob/ob;Ttr^{-/-}*-Mäusen nicht so ausgeprägt.

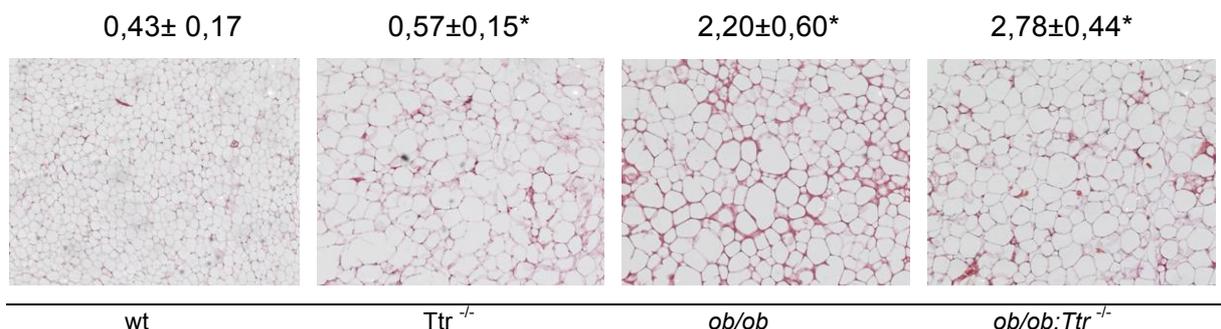


Abbildung 19: Histologie des Fettgewebe im Alter von 24 Wochen, Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Die Werte oberhalb der Histologien geben die Größe der Adipozyten in mm^2 an (cell surface area).

Im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren erkennt man deutlich bei *Ttr^{-/-}*, *ob/ob* sowie *ob/ob;Ttr^{-/-}*-Mäusen hypertrophierte Adipozyten in der HE-Histologie. Die mikroskopischen Veränderungen der Adipozyten-Oberfläche wurden mittels Quantifizierung durch die Messung der Zelloberflächen-Größe bestätigt.

5. Diskussion

5.1 $Ttr^{-/-}$ -Mäuse weisen eine hohe Knochendichte auf

Das Hormon Transthyretin (Ttr) ist das Produkt des *Ttr*-Gens und wird im Organismus hauptsächlich von der Leber und dem Plexus choroideus des Ventrikelsystems gebildet (Palha 2002). Ttr nimmt bekanntermaßen eine wichtige Rolle beim Transport des Retinols (Vitamin A₁ oder Axerophthol) durch den Blutkreislauf ein. Die nähere Betrachtung des Proteins zeigt, dass Transthyretin mit dem kleineren, eigentlichen Transporthormon des Vitamin A, dem RBP-4 (*Retinol-bindendes Protein 4*) einen Protein-Komplex bildet. Die renale Filtration des Retinols kann durch die Komplexbildung verhindert werden, so dass eine ausreichende Menge an Vitamin A₁, dem Körper zur Verfügung gestellt werden kann. Über diesen Mechanismus hat Transthyretin folglich einen indirekten Einfluss auf den Vitamin A-Stoffwechsel im Organismus.

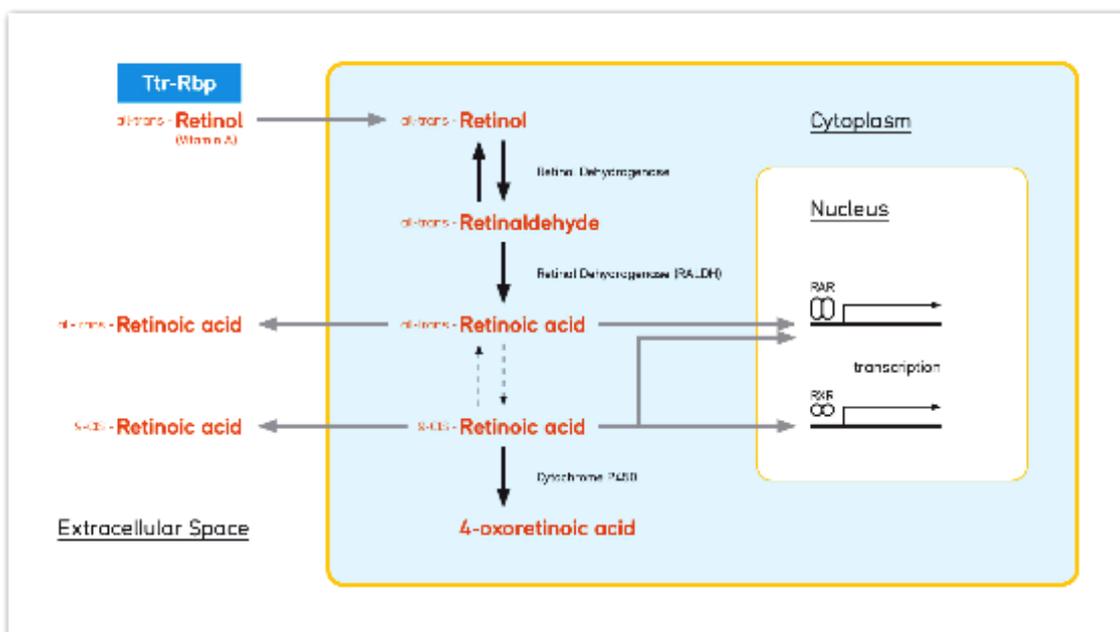


Abbildung 20: Der Vitamin-A-Stoffwechsel im Zusammenspiel mit dem Transthyretin-RBP-4-Komplex.

Der Transport des Retinols im Blut erfolgt über 90% mit Hilfe von RBPs (Retinol-Bindeproteine). Durch Dehydrogenasen kann Retinol in Zellen aufgenommen werden und anschließend über verschiedene Metabolite dem Organismus bereitgestellt werden. Sowohl der Mangel an RBP-4 als auch an Retinol selbst können zu einer Hypovitaminose führen.

Ttr-Rbp: Transthyretin-Retinol-bindenes-Protein-4-Komplex

Modifiziert nach Paik, J et al. *Journal of Nutrition* (2004).

Über die genauere Wirkung und Funktion des Transthyretin und vor allem über dessen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel war Jahrzehnte lang nur sehr wenig bekannt. Klinisch wurde Transthyretin vor allem mit systemischen Amyloidosen (β -Fibrillosen) in Verbindung gebracht. Durch einen Punktmutations-bedingten Austausch einer einzelnen Aminosäure im Transthyretin kommt es zur Ablagerung von β -Fibrillen (Amyloid) in verschiedensten Geweben des Körpers, die dann als ATTR-Amyloid bezeichnet werden. Diese Amyloidfibrillen stellen sich als Doppelhelix dar, die ihrerseits aus pathologisch veränderten β -Faltblattstrukturen aufgebaut sind. Die häufigste Erkrankung, die mit einer vererbten Form der Amyloidose einhergeht (Mutation: TTR Val122Ile), ist die familiäre (transthyretin-assoziierte) Amyloid-Kardiomyopathie, die im Erwachsenenalter manifest wird und lediglich durch ein Herz- und Lebertransplantation kurativ therapierbar ist. Bei der familiären Amyloidpolyneuropathie (FAP) findet man typischerweise das ATTR-Amyloid, dass sich in diesem Fall im distalen peripheren Nerven ablagert und autosomal dominant vererbt wird. Im Verlauf kommt es dann durch Schädigung des Nervens zur distalen Polyneuropathie und Sensibilitätsstörungen (Riede et al. 2004, Saraiva 2002). Darüber hinaus können veränderte Transthyretin-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis zu neuronalen Dysfunktionen bis hin zur Alzheimerschen Krankheit führen (Serot et al. 1997).

Eine Verbindung des Transthyretin zum Knochenstoffwechsel fand man letztlich über das Neuropeptid Y. Bei Transthyretin-defizienten Mäusen zeigt sich eine Überexpression des Enzyms PAM (Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase), welches das Neuropeptid Y (NPY) synthetisiert und zusätzlich limitierend für den Bildungsprozess des Neuropeptids Y ist (Prigge et al. 2000, Nunes et al. 2006). Damit führten die Autoren Nunes et al. Transthyretin-defiziente Mäuse erstmals als Mausmodell für erhöhte NPY-Spiegel an. Das NPY findet sich hauptsächlich in Blutgefäßen und konnte außerdem im Periost des Knochen gefunden werden (Bjurholm et al. 1988, Hill und Elde 1991). Kürzlich konnte eine weitere Veröffentlichung zeigen, dass ausschließlich der Neuropeptid Y-Rezeptor Y1 in gezüchteten Knochenmarks-Stromazellen (BMSCs) sowie in Osteoblasten und Chondrozyten exprimiert wird (Lundberg et al. 2007, Nunes et al. 2010). Die daraufhin durchgeführten histologischen Analysen der Npy-defizienten Mäusen zeigten überraschenderweise eine normale Knochenmasse (Elefteriou et al. 2003).

Im Gegensatz dazu gibt es verschiedene Mausmodelle, bei denen es zu einer Erhöhung des Npy kommt, wie die Y2-Rezeptor-defizienten Mäuse und die *ob/ob*-Leptin-defizienten Mäuse beziehungsweise die *db/db*-Rezeptor-defizienten Mäuse, die alle als Gemeinsamkeit eine hohe Knochendichte aufweisen und entsprechend mit einer erhöhten Osteoblasten-Aktivität assoziiert sind (Baldock et al. 2002, Stephens et al. 1995).

Die von der Arbeitsgruppe Nunes et al. kürzlich veröffentlichten histologischen Untersuchungen an Transthyretin-defizienten Mäuse zeigten, dass *Ttr*^{-/-}-Mäuse eine erhöhte Knochendichte und eine ausgeprägte Volumenzunahme des Trabekulären Knochens aufweisen (Nunes et al. 2010). Die Resultate dieser Arbeitsgruppe stimmen mit den Ergebnissen unserer histologischen Analysen überein: Sowohl die Trabekuläre Knochenmasse (BV/TV) der Tibiae, als auch die BV/TV der Wirbelkörper ist im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren signifikant erhöht und weist sogar höhere Werte auf, als die schon als Hoch-Knochenmasse-Phänotyp bekannten Leptin-defizienten *ob/ob*-Mäuse. Folglich führen sowohl der Verlust des Transthyretin-Gens als auch der Verlust des Leptin-*obese*-Gens zu einem hohen trabekulären Knochenvolumen (BV/TV). Diese Beobachtung unterstreicht den Verdacht, dass *Ttr* einen entscheidenden Einfluss auf den Knochenstoffwechsel im Mausmodell haben könnte. Verantwortlich für diesen auffälligen Knochenphänotyp in Transthyretin-defizienten Mäusen könnten vorrangig drei verschiedene Mechanismen sein. Da Retinol (Vitamin A) und Thyroxin (T₄) physiologisch durch Transthyretin im Blutkreislauf transportiert werden, könnte der veränderte Knochenmassephänotyp über diesen Mechanismus erklärbar sein. Darüber hinaus könnte auch die Überexpression des Enzyms PAM bei Transthyretin-defizienten Mäusen eine mögliche Ursache für den beobachteten Knochenphänotyp sein.

Untersuchungen die sich vorrangig mit dem Retinol befassen konnten zeigen, dass eine vorhandene Retinol-Defizienz indessen ebenfalls zu einer erhöhten Knochenmasse führt (Navia und Harris 1980). Zusätzlich inhibiert Retinsäure die osteogene Differenzierung der Stammzelle im Knochenmark (Wang et al. 2008). Demgegenüber stehen die Ergebnisse einer klinischen Studie, die gezeigt haben, dass erhöhte Serum-Retinol-Spiegel (subklinische Hypervitaminose A) wahrscheinlich das Frakturrisiko erhöhen (Michaelsson et al. 2003). Unterstützt wurden diese Resultate durch Analysen an Ratten, die ebenfalls eine

Hypervitaminose A aufwiesen und entsprechend ein erhöhtes Frakturrisiko im Mausmodell zeigten (Johansson et al. 2002). Bei $Ttr^{-/-}$ -Mäusen zeigt sich laborchemisch ein stark erniedrigtes, kaum messbares Plasma-Retinol und ein ebenfalls ausgeprägt reduziertes RBP-4 im Serum der Nager (Episkopou et al. 1993, Bennekum et al. 2000). Die Tiere weisen allerdings keine offensichtlichen Symptome einer Vitamin-A-Defizienz auf, wie zum Beispiel starken Gewichtsverlust, Infektanfälligkeit und dadurch bedingte Komplikationen oder Augenabnormalitäten, die ebenfalls nicht selten bei einer Vitamin-A-Defizienz vorhanden sind. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen findet man bei $Ttr^{-/-}$ -Mäusen keine signifikanten Abweichungen der gesamten Retinol-Konzentrationen im Gewebe im Vergleich zu den Kontrolltieren (Wei et al. 1995). Ferner weisen Transthyretin-defiziente Mäuse einen zwei- bis dreifach erhöhten Plasma-Retinolsäure-Spiegel auf, welcher möglicherweise bedingt als kompensatorischer Mechanismus, den niedrigen Retinol-Spiegel ausgleichen soll (Wei et al. 1995). Unter Berücksichtigung der normalen Retinol-Spiegel im Gewebe und erhöhten Retinsäure-Parameter im Plasma von $Ttr^{-/-}$ -Mäusen scheint eine hohe Knochenmasse in diesem Mausmodell bedingt durch Beeinträchtigung der Retinol-Homöostase eher unwahrscheinlich.

Ferner könnten Schilddrüsenhormone für den auffälligen Knochenphänotyp mitverantwortlich sein. Eine Hyperthyreose bei Erwachsenen Patienten führt zu einer abnehmenden Knochenmasse und damit zu einem erhöhten Frakturrisiko (Karga et al. 2004). Bei Vorliegen einer Hypothyreose hingegen ist der Stoffwechsel im Allgemeinen reduziert, wobei die Knochendichte im Erwachsenenalter meist erhalten bleibt und sich klinisch somit keine Folgen ergeben. Erwartungsgemäß sind beide, Thyroxin (T_4) und Trijodthyronin (T_3), im Serum $Ttr^{-/-}$ -Mäuse erniedrigt (Karga et al. 2004, Episkopou et al. 1993). Allerdings geht auch in diesem Fall das Vorliegen erniedrigter Schilddrüsenhormone ohne Symptome einer Hypothyreose einher (Palha et al. 1994). Möglicherweise kann infolge kompensatorischer, noch nicht hinreichend bekannter Mechanismen, eine verbesserte Produktion und Wirkung der Schilddrüsenhormonen im peripheren Gewebe erzielt werden und damit die niedrigen Schilddrüsenhormon-Parameter im Plasma ausgleichen werden (Palha et al. 1994). Transthyretin-defiziente Mäuse weisen also keine Unterschiede der Thyroxin-Spiegel im Gewebe, im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren, auf (Palha et al. 1997 und 2000). Die euthyreote Stoffwechsellaage ist eine bedeutende

Grundvoraussetzung für eine normale skelettale Entwicklung und Aufrechterhaltung des Knochenstatus im Organismus (Palha et al. 1994). Dementsprechend ist es wenig wahrscheinlich, dass der beobachtete Knochenphänotyp $Ttr^{-/-}$ -Mäuse durch die Schilddrüsenhormone bedingt ist. Entsprechend vorherigen Untersuchungen wäre eine abnehmende Knochendichte in diesem Mausmodell zu erwarten.

Ferner ist es denkbar, dass die hohe Knochenmasse bei $Ttr^{-/-}$ -Mäusen als Konsequenz der Überexpression des Enzyms PAM (Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase), welches das Npy (Neuropeptid Y) synthetisiert, zu Stande kommt, wie es auch bei anderen Mausmodellen beobachtet wurde. Untersuchungen zu Folge hat das Npy höchstwahrscheinlich einen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel über direkte Wirkung am Osteoblasten (Teixeira et al. 2009).

Ein Erklärungsversuch für den beobachteten Knochenphänotyp ist ebenfalls über das sympathische Nervensystem denkbar. Transthyretin bindet Produkte der Norepinephrine beziehungsweise Pterine, welche Co-Faktoren für die Synthese der Katecholamine darstellen (Ernstrom et al. 1995, de Vera et al. 1988). Damit hat Ttr indirekt Einfluss auf das sympathische Nervensystem sowie deren Regulation, wobei die physiologische Relevanz derzeit noch unklar ist. Somit haben sowohl Transthyretin, als auch Leptin, wenn auch nur indirekt, einen Einfluss auf das sympathische Nervensystem und könnten beide über einen ähnlichen Mechanismus (zum Beispiel direkt über Rezeptoren an Osteoblasten) den gemeinsamen Knochenphänotyp erklären.

5.2 Transthyretin-Interaktionen mit Leptin:

$Ttr^{-/-}$ -Mäuse zeigen keine Merkmale des Metabolischen Syndroms

Um weitere für den Knochenstoffwechsel relevante Veränderungen im Organismus Transthyretin-defizienter Mäuse aufzuzeigen führten wir verschiedene Untersuchungen durch, die Hinweise auf einen sekundären Mechanismus als Erklärung für den Knochenphänotyp aufzeigen sollten und gleichzeitig einen möglichen Einfluss von Transthyretin auf den *ob/ob*-Phänotyp nachweisen sollten.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen Leptin und Transthyretin wird durch verschiedene Beobachtungen wahrscheinlich. Bei Insulinresistenz im Mausmodell (zum Beispiel Leptin-defiziente *ob/ob*-Mäuse) lassen sich im Serum erhöhte

Transthyretin-Spiegel messen. Darüber hinaus finden sich erhöhte Transthyretin- und Retinol-bindendes-Protein-4 (RBP-4)-Spiegel im humanen Serum von Patienten mit Lipidstoffwechselstörungen im Vergleich zu dem Kontrollkollektiv. Insulin-Resistenz, Lipidstoffwechselstörungen und das Metabolische Syndrom als Symptomkomplex sind entsprechend mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko und damit erhöhter Mortalität für betroffene Patienten assoziiert. Die Autoren dieser Studie (Yoshida et al. 2006) kamen zu dem Schluss, dass Transthyretin und RBP-4 als Marker für eine Dyslipidämie, Fehl- und Überernährung und möglicherweise sogar für das Metabolische Syndrom beim Menschen fungieren könnten. Ob Transthyretin überhaupt metabolische Effekte auf den Organismus hat, welche dann eine Insulin-Resistenz in Abhängigkeit des RBP-4 zur Folge hat, ist bisher unbekannt. Einige Studien lassen vermuten, dass Ttr einen Einfluss auf die Triacylglycerol-Synthese und den Glucose-Transport ausübt (Scantlebury et al. 1998).

Die Serum-Analyse zeigte dabei, dass bei *ob/ob*-Leptin-defizienten Mäusen und bei Leptin-Transthyretin-defizienten-Mäusen eine signifikante Erhöhung des Insulin vorliegt, welche allerdings laborchemisch bei den *Ttr*^{-/-}-Mäusen nicht gezeigt werden konnte. Die vorliegende Hyperinsulinämie sowohl bei *ob/ob*-Mäusen, als auch bei den Leptin-Transthyretin-defizienten Mäusen zeigt die Insulin-Resistenz an. Erhöhte Glucose-Konzentrationen, als Parameter für den Blutzuckerspiegel, die nüchtern bestimmt wurden, unterstreichen das Vorliegen eines Diabetes mellitus bei beiden Mausgruppen. Bei einem Diabetes mellitus kommt es durch verminderte Insulinsekretion aus den β -Zellen des Pankreas zur Hyperglykämie. Im Gegensatz dazu wiesen *Ttr*^{-/-}-Mäuse laborchemisch keine Hyperinsulinämie oder Hyperglykämie auf und sind somit nicht an einem Diabetes mellitus erkrankt.

Als Fettstoffwechsel-Parameter haben wir das Adiponectin bestimmt, ein Gewebshormon, welches von Adipozyten sezerniert wird. Es hat vielfältige Wirkungen auf den Lipid- und Glucosstoffwechsel - es erhöht insbesondere die Empfindlichkeit der Zielgewebe auf Insulin. Eine Dysregulation dieses Hormons scheint beim Metabolischen Syndrom eine entscheidende Rolle zu spielen. Adiponectin weist bei allen drei Mausgruppen vergleichbare Werte auf, die den Konzentrationen der Wildtyp-Kontrollgruppe annähernd entsprachen. Als weitere Parameter für eine mögliche Lipidstoffwechselstörung dienten uns Cholesterin und Triglyceride. Sowohl das Cholesterin, als auch die Triglyceride waren bei *ob/ob*-Mäusen und Leptin-Transthyretin-defizienten Mäusen pathologisch erhöht, wobei die

Kontrolltiere und die Transthyretin-defizienten Mäuse keine erhöhte Konzentrationen dieser Parameter zeigten. Das Vorliegen einer Fettstoffwechselstörung bei Transthyretin-defizienten Mäusen kann anhand der durchgeführten Untersuchungen ausgeschlossen werden. Außerdem gibt es keinen Einfluss von Transthyretin auf die Ausprägung des Diabetes mellitus bei Leptin-Defizienz.

Das Retinol-bindene Plasmaprotein (RBP-4) wurde erst kürzlich beschrieben und scheint ein sehr interessantes Adipozytokin zu sein, welches im engen Zusammenhang mit einer Insulin-Resistenz steht und somit zu veränderten Serumparameter führen kann (Graham et al. 2006, Yang et al. 2005, Klötting et al. 2007). Das RBP-4 ist ein kleines, kompaktes globuläres Protein, welches frei über die glomeruläre Membran der Niere filtriert wird. Normalerweise geht das RBP-4 eine Komplexbildung mit dem mehr als doppelt so großen Transthyretin ein und entgeht damit als neu gebildeter Proteinkomplex der renalen glomerulären Filtration. Dementsprechend reduziert sich die renale Clearance des RBP-4 und steht als Transporthormon für Retinoide (vor allem dem Vitamin A) dem Organismus zur Verfügung (Kanai et al. 1968). Es wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert und zu einem bedeutend geringeren Anteil zusätzlich aus dem Fettgewebe in die Zirkulation freigesetzt. Die Synthese des RBP-4 findet vor allem aus dem viszeralen Fettgewebe statt und wird zu einem bedeutend kleineren Teil zusätzlich aus dem subkutanen Fettgewebe freigesetzt (Tamori et al. 2006). Zusammenfassend hat das RBP-4 vermutlich eine maßgebende klinische Bedeutung bei Insulin-Resistenz und Diabetes mellitus Typ 2, da bei Vorliegen dieser Erkrankungen erhöhte RBP-4-Spiegel im Plasma der Patienten gemessen werden konnten (Stefan et al. 2007, Gavi et al. 2007). Darüber hinaus konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass Ttr wahrscheinlich direkt die Insulin-Sekretion beeinflusst (Refai et al. 2005). Die Tatsache, dass die Abwesenheit von Leptin zur Dyslipidämie und zum Metabolischen Syndrom führt, warf die Frage auf, wie sich eine Transthyretin-Defizienz auf den Organismus des Mausmodelles auswirkt. Die genauere Analyse der Serumparameter in unseren Untersuchungen der Transthyretin-defizienten Mäuse ergab keine wegweisenden Hinweise auf das Bestehen einer Insulin-Resistenz oder Glucose-Intoleranz im Mausmodell.

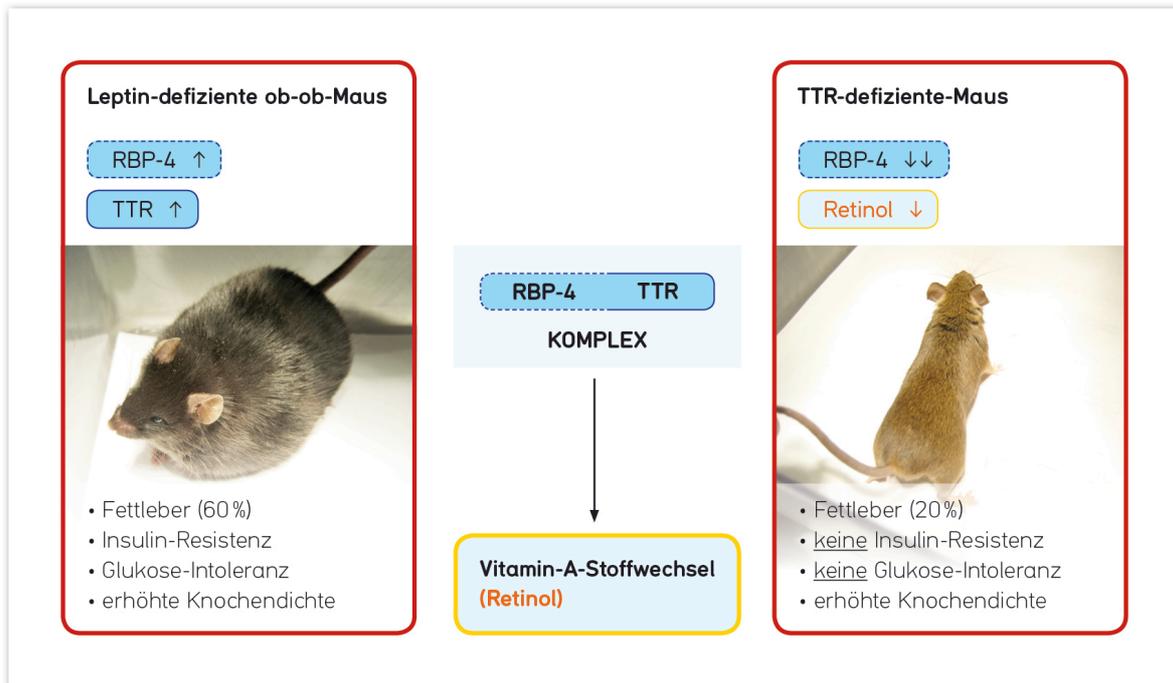


Abbildung 21: Zusammenfassung – Leptin-Defizienz versus Transthyretin-Defizienz.

Die *ob/ob*-Maus (links dargestellt) weist im Serum erhöhte RBP-4 und Transthyretin-Spiegel auf und zeigt phänotypisch eine Fettleber, Insulin-Resistenz, Glukose-Intoleranz und eine erhöhte Knochendichte. Bei der *Ttr*^{-/-}-Maus (im Bild rechts dargestellt) lassen sich im Serum stark erniedrigte RBP-4 und ein vermindertes Retinol messen. Es lässt sich keine Insulin-Resistenz oder Glukose-Intoleranz feststellen und es zeigt sich in fast 20 % der Fälle eine Steatosis hepatis (Fettleber). Die *Ttr*^{-/-}-Mäuse weisen ebenfalls wie die *ob/ob*-Mäuse eine erhöhte Knochendichte auf.

Die Serum-Parameter entsprachen dementsprechend in allen untersuchten Fällen, annähernd denen der Kontrolltiere. Die Leptin-defizienten *ob/ob*-Mäuse im Gegensatz dazu zeigen bei unseren Untersuchungen die bekannten, deutlichen Zeichen einer Insulin-Resistenz und Glucose-Intoleranz auf. Im Doppelknockoutmodell konnten allerdings keine Veränderungen der Serum-Parameter beobachtet werden, so dass der Einfluss des Transthyretin an dieser unwahrscheinlich erscheint.

Transthyretin scheint somit im Vergleich der Mausmodelle zumindest keinen direkten Einfluss auf den Lipidstoffwechsel der Mäuse zu haben. Bei histologischen Analysen Leptin-defizienter Mäuse zeigte sich jedoch eine ausgeprägte Steatosis hepatis (Fettleber), die ebenfalls im Zusammenhang zum Metabolischen Syndrom gesehen werden kann und häufig auch in Verbindung mit einem Diabetes mellitus auftritt. Überraschenderweise konnte in einigen Fällen bei Transthyretin-Defizienz ebenfalls

eine Steatosis nachgewiesen werden (mit einer Prävalenz von fast 20%). Ferner entwickeln fast 60% der *ob/ob*-Mäuse im Verlauf eine Fettleber. Erstaunlicherweise kommt es bei der kombinierten Leptin-Transthyretin-Defizienz in allen Fällen zu einer Steatosis hepatis. Somit macht unsere Beobachtung deutlich, dass eine Transthyretin-Defizienz zumindest in einigen Fällen einen Einfluss auf die Leber ausübt.

5.3 *Ttr*^{-/-}-Mäuse sind normgewichtig

Das Körpergewicht hat einen elementaren Einfluss auf den Knochenstoffwechsel und damit die Knochendichte im Organismus. Klinische Beobachtungen zeigten früh, dass adipöse Patienten zwar ein höheres kardiovaskuläres Risiko haben, aber ein deutlich niedrigeres Risiko aufweisen an einer Osteoporose zu erkranken. Im Gegensatz dazu führt ein moderater Gewichtsverlust bis hin zur Diät bei übergewichtigen, postmenopausalen Frauen im Verlauf von einigen Jahren zum Knochenmasseverlust (Ricci et al. 2001). Eine weitere Studie mit 130 jungen Frauen, bei denen eine Anorexia nervosa diagnostiziert wurde, bestätigt eine hohe Fraktur-Prävalenz und niedrige Knochendichte bei diesen Patientinnen (Grinspoon et al. 2000). Die beispielhaft angeführten Studien unterstreichen die Beziehung zwischen Körpergewicht und Knochenformation, wobei verschiedene endokrine und parakrine Faktoren in diese Regulation eingreifen.

Um einen sekundären Einfluss, bedingt durch die Adipositas auf den Knochenphänotyp der *Ttr*^{-/-}-Mäuse auszuschließen, führten wie eine vergleichende Analyse des Körpergewichts der Mäuse im Alter von 6, 12 und 24 Wochen aller vier Mausgruppen durch. Dabei zeigten unsere Ergebnisse, dass *Ttr*^{-/-}-Mäuse normgewichtig sind und somit eine sekundär erhöhte Knochendichte durch eine Adipositas, wie sie bei *ob/ob*-Mäusen beobachtet wird, nicht vorliegt. Ferner konnte keine Veränderung des Gewichts bei *ob/ob, Ttr*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den *ob/ob*-Mäusen gemessen werden.

Verringertes Körpergewicht stellt einen wichtigen Risikofaktor für die Osteoporose dar. Das Vorliegen einer Adipositas wiederum führt unter anderem zur vermehrten Freisetzung von Östrogenen aus den reichlich vorhandenen Adipozyten und außerdem zu einer erhöhten Körperfettmasse, welche wiederum mit hohen

Insulinspiegeln assoziiert ist. Darüber hinaus haben klinische Beobachtungen den Verdacht nahe gelegt, dass der Energiestoffwechsel und skelettales Remodeling physiologisch im engen Zusammenhang zueinander stehen. Patienten mit einer verminderten Glukosetoleranz (zum Beispiel bei Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ II) weisen ein erhöhtes Risiko auf, eine osteoporotische Fraktur zu erleiden, sogar dann wenn eine physiologische Knochenmasse nachweisbar ist (Bonds et al. 2006, Melton et al. 2008). In ähnlicher Weise wirken von Osteoblasten sezernierte knochenspezifische Proteine, die anscheinend den Glucose-Metabolismus regulieren. Die kürzlich veröffentlichte Untersuchung der Arbeitsgruppe um Karsenty konnte zeigen, dass eine Insulin-Signal-Übertragung in Osteoblasten (über Erhöhung der Osteocalcin-Aktivität) für die gesamte Glucose-Homöostase im Körper essentiell ist (Ferron et al. 2010). Ferner konnten Studien belegen, dass eine hohe Fettgewebssmasse mit erhöhten Insulin-Spiegeln im Plasma assoziiert ist (Reid 2002). Das Hormon Insulin scheint folglich eine wichtige Bedeutung einerseits bei der Regulation des Energiestoffwechsels und darüber hinaus möglicherweise beim skelettalen Remodeling einzunehmen.

Des Weiteren sind einige Zytokine, welche ebenfalls aus dem Fettgewebe sezerniert werden, respektiv Leptin, bekanntermaßen für die Knochenformation verantwortlich. Leptin repräsentiert dabei eine der wichtigsten funktionellen Verbindungen zwischen Fettgewebe und Knochen. Die wichtigste Gemeinsamkeit stellt die Tatsache dar, dass Adipozyten und Osteoblasten von einer gemeinsamen Knochenmarksstromazelle abstammen. Der wichtigste Differenzierungsfaktor hierbei ist der Transkriptionsfaktor Cbfa1 (core-binding-factor1), der die Knochenmarksstromazelle zur Osteoblasten-Expression stimuliert (Nuttall und Gimble 2000). Leptin übt seine Wirkung direkt auf die mesenchymale Stammzelle auf: Es inhibiert die Adipozyten-Differenzierung und stimuliert die Differenzierung der Osteoblasten (Thomas et al. 2001).

Um eine Erklärung für den Knochenphänotyp $Ttr^{-/-}$ -Mäuse zu finden führten wir eine genauere Analyse des Knochenmarks durch, da Leptin zu einem hohen Maße von den Adipozyten des Knochenmarks exprimiert wird (Laharrgue et al. 1998). Adipozyten wiederum sezernieren multiple Faktoren, welche bei der systemischen Insulin-Sensitivität, dem Energiestoffwechsel sowie der Energiebalance und der kardiovaskulären Funktion beteiligt sind und darüber hinaus bei der Funktion des Immunsystems mitwirken (Hotamisligil 2006, Rosen und Spiegelman 2006).

Bei der histologischen Auswertung des Knochenmarks der $Ttr^{-/-}$ -Mäuse fiel eine vermehrte Anreicherung von Adipozyten auf. Außerdem kommt es sowohl bei $Ttr^{-/-}$, als auch bei ob/ob -Mäusen zu einer vermehrten Anzahl von Adipozyten im Knochenmark und zu einer erhöhten Knochendichte. Bei dem Leptin-Transsthyretin-defizienten Mausmodell wurde eine fast dreifach erhöhte Adipozyten-Anzahl im Knochenmark, im Vergleich zu den $Ttr^{-/-}$ - und ob/ob -Mäusen, gefunden. Diese Ergebnisse legen den Verdacht nahe, dass die pathologische Lipogenese des Knochenmarks möglicherweise zu einer kompensatorischen Stimulation der Osteoblasten durch die Mesenchymale Stammzelle des Knochenmarks führt und dies eine erhöhte Knochenformation im Transsthyretin-defizienten Mausmodell zur Folge hat. Ferner konnte das skelettale Remodeling, durch Adipozyten-Anreicherung im Knochenmark und infolgedessen vermehrten Sekretion von Adipokinen (vor allem Leptin) und Fettsäuren, verändert sein und zu dem beschriebenen auffälligen Knochenphänotyp führen.

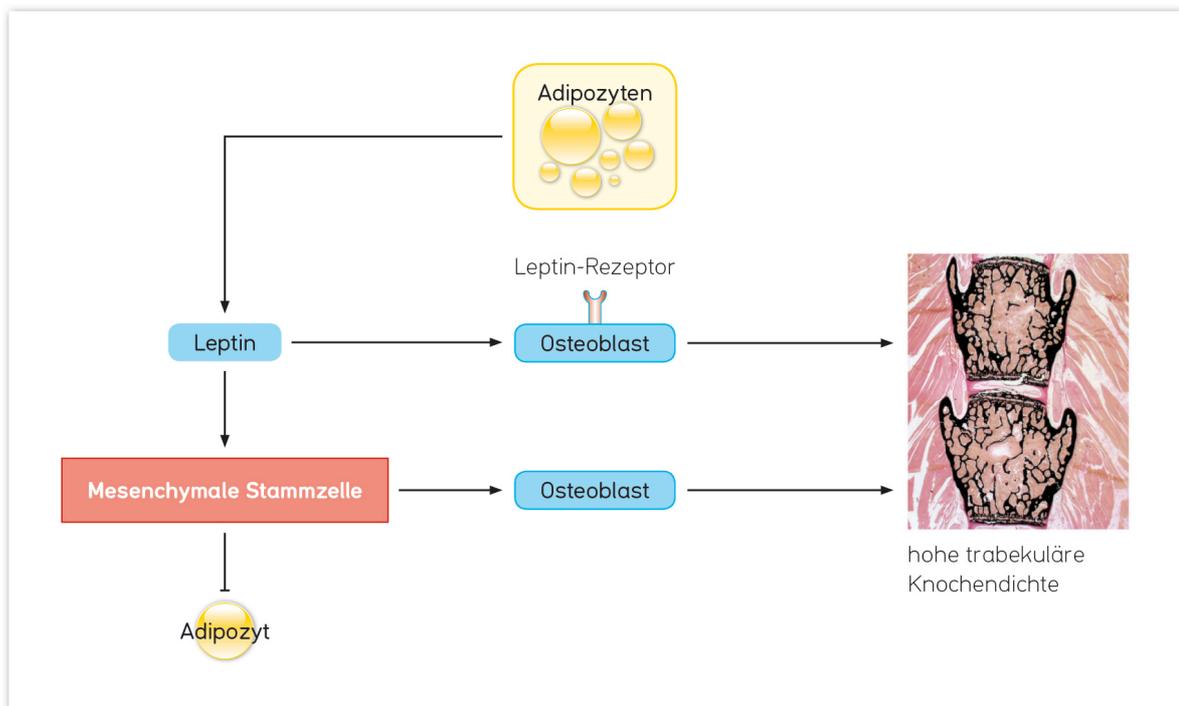


Abbildung 22: Periphere Wirkungen des Leptins im Knochenstoffwechsel

Leptin wirkt direkt auf den Rezeptor des Osteoblasten und führt zu einer erhöhten Knochendichte. Darüber hinaus kann Leptin die pluripotente mesenchymale Stammzelle im Knochenmark zur Differenzierung der Osteoblasten stimulieren und damit gleichzeitig die Adipozyten-Reifung hemmen.

Modifiziert nach: Kawai, M et al. *Nature, Review, Rheumatologie* (2009).

Diese Beobachtung wird unterstützt durch Studien, die zeigen konnten, dass es bei Stadien mit niedriger Knochenmasse wahrscheinlich kompensatorisch zur vermehrten Stimulation der Adipozyten im Knochenmark und anschließender Knochenmarks-Lipogenese kommt (Justesen et al. 2001). Ferner konnten klinische Untersuchungen zeigen, dass die Anzahl der Adipozyten im Knochenmark osteoporotischer Frauen höher ist, als bei Frauen mit einer normalen Knochendichte (Kirkland et al. 2002, Chan und Duque 2002).

Dieser reziproke Zusammenhang wurde durch in vitro- Experimente an Knochenmarks-Stromazellen bestätigt: Faktoren, die die Adipogenese stimulieren hemmen die Osteoblasten-Formation, während Faktoren, die die Osteoblastogenese unterstützen die Adipozyten-Formation im Knochenmark inhibieren (Gimble et al. 1995, Dorheim et al. 1993, Laharrague et al. 1998). Die Anzahl und Größe der Adipozyten des Knochenmarks steigt außerdem mit zunehmenden Alter linear an (Rozman et al. 1989). Möglicherweise kommt es in vivo durch Knochenmarks-Lipogenese zur Hemmung der Osteoblasten, was in der Folge zum Überwiegen der Osteoklasten führt und letztendlich den Knochenabbau bedingt

Eine wichtige Bedeutung bei der Kontrolle der Adipositas und dem Energiestoffwechsel nehmen darüber hinaus die Retinoide und Schilddrüsenhormone ein (Berkenstam et al. 2004, Chidakel et al. 2005, Pucci et al. 2000). Retinoide scheinen bei der Differenzierung und der anschließenden Aktivierung von ungebundenen Proteinen und Enzymen des Fettsäure-Metabolismus beteiligt zu sein (Villarroya et al. 2004). Die vermehrte Anreicherung von Adipozyten im Knochenmark $Ttr^{-/-}$ -Mäuse könnte somit durch eine gesteigerte Adipozyten-Differenzierung der Knochenmarks-Stromazelle bedingt durch veränderte Retinol-Spiegel im Serum erklärt werden.

5.4 Ausblick

Die in dieser Arbeit erzielten histologischen Resultate zeigen, dass die Abwesenheit von Transthyretin in adulten Mäusen ein Schutz vor einem Knochenmasseverlust darstellt. Ttr scheint ein negativer Regulator der Knochenformation im Mausmodell zu sein. Dementsprechend könnte die Herstellung eines Transthyretin-Antagonisten als potentiell osteoanaboles Medikament denkbar sein. Zunächst müssten allerdings

nähere Untersuchungen zeigen, wie genau Ttr auf den Knochen wirkt und über welche Rezeptoren und Signalkaskaden dieser Mechanismus erfolgt. Ein potentieller Rezeptor zur Übermittlung des Transthyretin-Signals könnte im Hypothalamus über direkten Wege die Knochenformation steuern (ähnlich Leptin), scheint aber eher unwahrscheinlich. Ferner könnte ein Ttr-Rezeptor direkt am Osteoblasten, zum Beispiel über das Sympathische Nervensystem, die Knochendichte beeinflussen. Der genaue Wirkmechanismus bleibt zum jetzigen Zeitpunkt unklar und müsste weiterführend untersucht werden, da außer den beschriebenen Konstellationen auch andere potentielle Regulationsmechanismen des Knochens denkbar sind. Ein Erklärungsversuch über Retinol scheint zum jetzigen Zeitpunkt wahrscheinlicher zu sein. Es ist denkbar, dass *ob/ob*-defiziente Mäuse durch die erhöhte Ttr-Expression versuchen ihre Retinolspiegel zu erhöhen, um eine Verschlimmerung ihres Phänotyps (Adipositas, Steatosis hepatis und Knochenmarksverfettung) zu verhindern. Möglicherweise wirkt sich eine gesteigerte exogene Retinolzufuhr positiv auf diesen Phänotyp aus. Weiterführende Untersuchungen sollen diese Hypothese stützen. Durch Fütterung (*ob/ob*-Mäuse) mit einer Retinol-reichen Diät soll gezeigt werden, ob die Leber-Steatosis dadurch verhindert und damit eine Veränderung des Phänotyps erzielt werden kann.

6. Zusammenfassung

Transthyretin (Ttr) ist als Transportprotein, vor allem der Schilddrüsenhormone, über viele Jahre bekannt. Physiologisch verhindert Ttr durch Komplexbildung mit dem Retinol-bindenden Protein 4 (RBP-4) die renale Filtration des Retinols (Vitamin A₁) und nimmt damit indirekt Einfluss auf den Vitamin-A-Stoffwechsel im Organismus. Bei einer vergleichenden Gen-Chip-Hybridisierung der Hypothalamus-RNA von Wildtyp und Leptin-defizienten Mäusen präsentierte sich Transthyretin als das am stärksten induzierte Gen und war damit ein mögliches Kandidaten-Gen mit potentieller Funktion im Knochenstoffwechsel, welches die Grundlage für die vorliegenden Untersuchungen darstellte. Es wurde zunächst die skelettale Situation im Transthyretin-defizienten- und vergleichend im Leptin-defizienten- sowie Leptin-Transthyretin-defizienten Mausmodell, mittels histologischer und histomorphometrischer Techniken, charakterisiert. Hierbei zeigte sich, dass die Abwesenheit von Transthyretin im Alter von 24 Wochen zu erhöhter Knochendichte führt, wobei sich die Organisation der Wachstumsfugen, die Größe und das Körpergewicht der Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe unauffällig darstellte. Anschließend wurden Serum-Analysen der Lipid- und Insulin- sowie Glucose-Parameter durchgeführt. Ttr^{-/-}-Mäuse wiesen laborchemisch im Vergleich zu den Wildtyptieren keine Insulin-Resistenz, keinen Diabetes mellitus oder Störungen im Lipid-Stoffwechsel auf. Im letzten Jahrzehnt hat sich unter anderem das Konzept etabliert, dass Knochenremodeling und Energie- sowie Fettstoffwechsel im engen Zusammenhang zu einander stehen. Unterstützt wird diese Theorie durch die Beobachtung, dass Osteoblasten und Adipozyten von einer gemeinsamen mesenchymalen Stammzelle (BMSC) abstammen. Bei den histologischen Analysen des Knochenmarks Ttr^{-/-}-Mäuse ließ sich eine erhöhte Anzahl von Adipozyten nachweisen. Zusammenfassend konnten unsere Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Transthyretin-Defizienz, als auch die Leptin-Defizienz und die kombinierte Ttr-Leptin-Defizienz zu einer erhöhten Knochendichte und erhöhten Adipozyten-Anzahl im Knochenmark führen und damit die Theorie unterstützen, dass Knochen- und Fettstoffwechsel im engen Zusammenhang zu einander stehen.

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AgRP	Agouti-related protein
BMI	Body-Mass-Index
BMP	bone morphogenetic protein
BMSC	bone marrow stroma cell (mesenchymalen Stammzelle)
BMUs	basic multicellular units
BV/TV	Bone Volume/Tissue Volume (Knochenvolumen-Parameter)
C	Cytosin
CART	cocain- and amphetamine-regulated transcript
CBFA-1	core binding factor-1
db	Diabetes-Gen
DBH	Dopamin-beta-Hydroxylase
DNA	Desoxy-Ribonuklein-Säure
DVO	Dachverband Osteologie
FAP	familiäre Amyloidpolyneuropathie
FGF	fibroblast growth factor
G	Guanin
ICV	intracerebroventrikuläre Infusion
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
KHK	Koronaren-Herz-Krankheit
kV	Kilovolt
L/A	Leptin-Adiponectin-Ratio
M	Molar
m	milli (Tausendstel: 10^{-3})
μ	mikro (Millionstel: 10^{-6})
M-CSF	Makrophage-colony stimulating factor (Wachstumsfaktor für Makrophagen)
NOc/BPM	osteoclast number per bone perimeter (Osteoklastenzahl/Knochenoberfläche)
NPY	Neuropeptid Y
Ob	obesity-Gen (Fettsucht-Gen)

<i>Ob/ob</i>	Leptin-defiziente Mäuse
ObRb	signalübertragender Leptinrezeptor
PAM	Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase
PBM	peak bone mass
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
POMC	Proopiomelanocortin
PTH	Parathormon
RANKL	receptor-activator of NFkappaB
RBP-4	Retinol-bindendes-Protein-4
RUNX-2	runt related transcription factor-2
T	Thymin
T ₃	Trijodthyronin
T ₄	Thyroxin
TbN	trabecular number (Trabekelanzahl)
TbSp	trabecular spacing (Trabekelabstand)
TbTh	trabecular thickness (Trabekeldicke)
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor alpha
Ttr	Transthyretin
Ttr ^{-/-}	Transthyretin-Defizienz
VEGF	vascular endothelial growth factor
wt	Wildtyp

8. Literaturverzeichnis

Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK (1995): Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* 17(2), 77–83.

Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ (1998): The stomach is a source of leptin. *Nature* 394, 790–793.

Baldock PA, Allison SJ, Lundberg P, Lee NJ, Slack K, Lin EJ, Enriquez RF, McDonald MM, Zhang L, During MJ et al. (2007): Novel role of Y1 receptors in the coordinated regulation of bone and energy homeostasis. *J Biol Chem* 282, 19092–19102.

Baldock PA, Sainsbury A, Couzens M, Enriquez RF, Thomas GP, Gardiner EM, Herzog H (2002): Hypothalamic Y2 receptors regulate bone formation. *J Clin Invest* 109, 915–921.

Bartl R: Osteoporose. Prävention, Diagnostik, Therapie, Georg Thieme Verlag, 2004, Seite 143.

Bennekum AM, Wei S, Gamble MV, Vogel S, Piantedosi R, Gottesman M, Episkopou, Blaner WS (2001): Biochemical basis for depressed serum retinol levels in transthyretin-deficient mice. *J Biol Chem* 276 (2), 110–1113.

Berkenstam A, Farnegardh M, Gustafsson JA (2004): Convergence of lipid homeostasis through liver X and thyroid hormone receptors. *Mech Ageing Dev* 125, 707–717.

Bjurholm A, Kreicbergs A, Terenius L, Goldstein M, Schultzberg M (1988): Neuropeptide Y-, tyrosine hydroxylase- and vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive nerves in bone and surrounding tissues. *J Auton Nerv Syst* 25, 119–125.

- Bonds DE, Larson JC, Schwartz AV, Strotmeyer ES, Robbins J, Rodriguez BL, Johnson KC, Margolis KL (2006): Risk of fracture in women with type 2 diabetes: the Women's Health Initiative Observational Study. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 3404–3410.
- Borish L, King MS, Mascali JJ, Johnson S, Coll B, Rosenwasser LJ (1992): Transthyretin is an inhibitor of monocyte and endothelial cell interleukin-1 production (1992). *Inflammation* 16, 471–484.
- Chan GK, Duque G (2002): Age-related bone loss, new facts. *Gerontology* 48, 62–71.
- Chenu C, Marenzana M (2005): Sympathetic nervous system and bone remodeling. *Joint Bone Spine* 72, 482–483.
- Chidakel A, Mentuccia D, Celi FS (2005): Peripheral metabolism of thyroid hormone and glucose homeostasis. *Thyroid* 15, 899–903.
- Cohen JM (2006): The new bone biology: Pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am J Med Genet Part A* 140, 2646–2706.
- Coleman, RE (2001): Should bisphosphonates be the treatment of choice for metastatic bone disease. *Semin Oncol* 28, 35–41.
- Dachverband Osteologie (DVO): Osteoporose–Leitlinie 2009:
http://www.dv-osteologie.org/uploads/leitlinien/DVO-Leitlinie%202009%20Langfassung_Druck.pdf
Stand: 07.11.2010, 20.00 h.
- David JP, Sabapathy K, Hoffmann O, Idarra MH, Wagner EF (2002): JNK1 modulates osteoclastogenesis through both c-Jun phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *Cell* 115, 4317–4325.

- de Vera N, Christofol RM, Rodriguez Farre E (1988): Protein binding and stability of norepinephrine in human blood plasma. Involvement of prealbumin, alpha 1-acid glycoprotein and albumin. *Life Sci* 43, 1277–1286.
- Dorheim MA, Sullivan M, Dandapani V, Wu X, Hudson J, Segarini PR, Rosen DM, Aulthouse AL, Gimble JM (1993): Osteoblastic gene expression during adipogenesis in hematopoietic supporting murine bone marrow stromal cells. *Cell Physiol* 154, 317–328.
- Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G (2000): Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 100, 197–207.
- Elefteriou F (2005): Neuronal signaling and the regulation of bone remodeling. *Cell Mol Life Sci* 62, 2339–2349.
- Elefteriou F, Takeda S, Liu X, Armstrong D, Karsenty G (2003): Monosodium glutamate-sensitive hypothalamic neurons contribute to the control of bone remodeling. *Endocrinology* 144, 3842–3847.
- Elmqvist JK, Elias CF, Saper CB (1999): From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22, 221–232.
- Episkopou V, Maeda S, Nishiguchi S, Shimada K, Gaitanaris GA, Gottesman ME, Robertson EJ (1993): Disruption of the transthyretin gene results in mice with depressed levels of plasma retinol and thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 2375–2379.
- Episkopou V, Shuichiro M, Seiji N, Kazunori S, Gaitanaris GA, Gottesman ME, Robertson E (1993): Disruption of the transthyretin gene result in mice with depressed levels of plasma retinol and thyroid hormone. *Genetics* 90, 2375–2379.

- Ernstrom U, Pettersson T, Jornvall H (1995): A yellow component associated with human transthyretin has properties like a pterin derivate, 7,8-dihydropterin-6-carboxaldehyde. *FEBS Lett* 360, 177–182.
- Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, DePinho RA, Teti A, Ducy P, Karsenty G (2010): Insulin Signaling in Osteoblasts integrates Bone Remodeling and Energy Metabolism. *Cell* 142, 296–308.
- Friedman JM, Halaas JL (1998): Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763–770.
- Gavi S, Stuart LM, Kelly P, Melendez MM, Mynarcik DC, Gelato MC, McNurlan, MA (2007): retinol-binding protein 4 is associated with insulin resistance and body fat distribution in nonobese subjects without type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 1886–1890.
- Gavrilesco K, Courcon J, Hillion P, Uriel J, Lewin J, Grabar P (1955): A study of normal human cerebrospinal fluid by the immunoelectrophoretic method. *Nature* 176, 976.
- Gimble JM, Morgan C, Kelly K, Wu X, Dandapani V, Wang CS, Rosen V (1995): Bone morphogenetic proteins inhibit adipocyte differentiation by bone marrow stroma cells. *Cell Biochem* 58, 393–402.
- Götte S, Dittmar K (2001): Epidemiology and cost of osteoporosis. *Orthopäde* 30, 402–404.
- Graham TE, Yang Q, Bluher M, Hammerstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, Wason CJ, Oberbach A, Jansson PA, Smith U, Kahn BB (2006): Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med* 354, 2552–2563.

- Grinspoon S, Thomas E, Pitts S, Gross E, Mickely D, Miller K, Herzog D, Klibanski A (2000): Prevalence and predictive factors for regional osteopenia in women with anorexia nervosa. *Ann Intern Med* 133, 790–794.
- Hazenberg JG, Freeley M, Foran E, Lee TC, Taylor D (2006): Microdamage: a cell transducing mechanism based on ruptured osteocyte processes. *J Biomech* 39 (II), 2096–2103.
- Hill EL, Elde R (1991): Distribution of CGRP-, VIP-, D beta H-, SP-, and NPY-immunoreactive nerves in the periosteum of the rat. *Cell Tissue Res* 264, 469–480.
- Hotamisligil GS (2006): Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444, 860–867.
- Ingbar SH (1958): Prealbumin: Thyroxine binding protein of human plasma. *Endocrinology* 63, 256–259.
- Jian-Ren G, Hui-Qui J, Li-Ping H, Dai-Zong L, Xiao-Mei Z, Wei-Lie D, et al. (1991): Transthyretin (prealbumin) gene in human primary hepatic cancer. *Sci China* 34B, 1313–1318.
- Johansson S, Lind PM, Hakansson H, Oxlund H, Orberg J, Melhus H (2002): Subclinical hypervitaminosis A causes fragile bone in rats. *Bone* 31(6), 685–689.
- Justesen J, Stenderup K, Ebbesen EN, Mosekilde L, Steiniche T, Kassem M (2001): Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology* 2(3), 165–171.
- Kanai M, Raz A, Goodman DS (1968): Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. *J Clin Invest* 74, 2025–2044.

- Karga H, Papapetrou PD, Korakovouni A, Papandroulaki F, Polymeris A, Pampouras G (2004): Bone mineral density in hyperthyroidism. *Clin Endocrinol* 61, 466–472.
- Kawai M, Maureen JD, Rosen JC (2009): Fat targets for skeletal health. *Nat Rev Rheumatol* 5, 365–372.
- Kirkland JL, Tchkonina T, Pirtskhalava T, Han J, Karagiannides I (2002): Adipogenesis and aging: does aging make fat go MAD? *Exp Gerontol* 37, 757–767.
- Klötting N, Graham TE, Berndt J, Kralisch S, Kovaces P, Wason CJ, Fasshauer M, Schon MR, Sturmvoll M, Bluher M, et al. (2007): Serum retinol-binding protein is more highly expressed in visceral than in subcutaneous adipose tissue and is a marker of intra-abdominal fat mass. *Cell Metab* 6, 79–87.
- Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T (1998): Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93, 165–176.
- Laharrague P, Larrouy D, Fontainilles AM, Campfield A, Tenenbaum R, Galitzky J, Corberand JX, Penicaud L, Casteilla L (1998): High expression of leptin by human bone marrow adipocytes in primary culture. *FASEB J* 12, 747–752.
- Laharrague P, Larrouy D, Fontainilles AM, Truel N, Campfield A, Tenenbaum R, Galitzky J, Corberand JX, Penicaud L, Casteilla L (1998): High expression of leptin by human bone marrow adipocytes in primary culture. *FASEB J* 12, 747–752.
- Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (2007). *Biochemie und Pathobiochemie*. 8. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg, 737–747.
- Löffler G, Petrides P.E, Heinrich P.C (2007). *Biochemie und Pathobiochemie*. 8. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg, 523–525.

- Lundberg P, Allison SJ, Lee NJ, Baldock PA, Brouard N, Rost S, Enriquez RF, Sainsbury A, Lamghari M, Simmons P et al. (2007): Greater bone formation of $\gamma 2$ knockout mice is associated with increased osteoprogenitor numbers and altered $\gamma 1$ receptor expression. *J Biol Chem* 282, 19082–19091.
- Maffei M, Stoffel M, Barone M, Moon B, Dammerman M, Ravussin E, Bogardus C, Ludwig DS, Flier JS, Talley M, et al. (1996): Absence of mutations in the human OB gene in obese/diabetic subjects. *Diabetes* 45, 679–682.
- Marotti G, Cane V, Palazzini S, Palumbo C (1990): Structure-function relationships in the osteocyte. *Ital Journ of Mineral and Electrolyte Metabolism* 4, 93–106.
- Martin TJ, Seeman E (2008): Bone remodeling: Its local regulation and the emergence of bone fragility. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 22, 701–722.
- Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K (1997): Non adipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta derived hormone in humans. *Nat Med* 3 1029–1033.
- Melton, LJ III (1997): The prevalence of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 12, 1769–1771.
- Melton LJ III, Riggs BL, Leibson CL, Achenbach SJ, Camp JJ, Bouxsein ML, Atkinson EJ, Robb RA, Khosla S (2008): A bone structural basis for fracture risk in diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 4804–4809.
- Michaelsson K, Lithell H, Vessby B, Melhus H (2003): Serum Retinol Levels and the risk of fracture. *N Engl J Med* 348, 287–294.
- Miller, PD (2001): New possibilities for diagnosis and treatment of osteoporosis *Int J Fertil Womens Med* 46, 215–221.

- Mody N, Graham TE, Tsuji Y, Yang Q, Kahn BB (2008): Decreased clearance of serum retinol-binding protein and elevated levels of transthyretin in insulin-resistant *ob/ob* mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294, 785–793.
- Morash B, Li A, Murphy PR, Wilkinson M, Ur E (1999): Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology* 140, 5995–5998.
- Navia JM, Harris SS (1980): Vitamin A influence on calcium metabolism and calcification. *Ann NY Acad Sci* 355, 45–57.
- Nunes AF, Liz MA, Franquinho F, Teixeira L, Sousa V, Chenu C, Lamghari M, Sousa M (2010): Neuropeptide Y expression and function during osteoblast differentiation - insights from transthyretin knockout mice. *Eur J Biochem* 277, 263–275.
- Nunes AF, Saraiva MJ, Sousa MM (2006): Transthyretin knockouts are a new mouse model for increased neuropeptide Y. *FASEB J* 20(1), 166–168.
- Nuttall ME, Gimble JM (2000): Is there a therapeutic opportunity to either prevent or treat osteopenic disorders by inhibiting marrow adipogenesis? *Bone* 27(2), 177–184.
- Paik J, Vogel S, Quadro L, Piantedosi R, Gottesman M, Lai K, Hamberger L, Morais Vieira M, Blaner W (2004): Vitamin A: Overlapping Delivery Pathways to Tissues from the Circulation. *J Nutr* 134, 276–280.
- Palha JA (2002): Transthyretin as a thyroid hormone carrier: function revisited *Clin Chem Lab Med* 40, 1292–1300.
- Palha JA, Episkopou V, Maeda S, Shimada K, Gottesman ME, Saraiva MJ (1994): Thyroid hormone metabolism in a transthyretin-null-mouse strain *J Biol Chem* 269, 33135–33139.

Palha JA, Fernandes R, de Escobar GM, Episkopou V, Gottesman M, Saraiva MJ (2000): Transthyretin regulates thyroid hormone levels in the choroids plexus, but not in the brain parenchyma: study in a transthyretin-null mouse model. *Endocrinology* 141, 3267–3272.

Palha JA, Hays MT, Morreale de Escobar G, Episkopou V, Gottesman ME, Saraiva MJ (1997): Transthyretin is not essential for thyroxine to reach the brain and other tissues in transthyretin-null mice. *Am J Physiol* 272, E486–E493.

Pasco JA, Henry MJ, Sanders KM, Kotowicz MA, Seeman E, Nicholson GC (2004): Beta-adrenergic blockers reduce the risk of fracture partly by increasing bone mineral density: Geelong osteoporosis study. *J Bone Miner Res* 19(1), 19–24.

Pogoda P, Egermann M, Schnell, JC, Priemel, Schilling AF, Alini M, Schinke T, Rueger JM, Schneider E, Clarke I, Amling M (2006): Leptin inhibits bone formation not only in rodents, but also in sheep. *Bone* 21(10), 1591–1599.

Prigge ST, Mains RE, Eipper BA, Amzel LM (2000): New insights into copper monooxygenases and peptide amidation: structure, mechanism and function. *Cell Mol Life Sci* 57, 1236–1259.

Pucci E, Chiovato L, Pinchera A (2000): Thyroid and lipid metabolism. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 24(2), 109–112.

Ralston SH (1997): What determines peak bone mass and bone loss? *Baillieres Clin Rheumatol* 11, 479–494.

Refai E, Dekki N, Yang SN, Imreh G, Cabrera O, Yu L, Yang G, Norgren S, Rossner SM, Inverardi L, Ricordi C, Olivecrona G, Andersson M, Jornvall H, Berggren PO, Juntti-Berggren L (2005): Transthyretin constitutes a functional component in pancreatic beta-cell stimulus-secretion coupling. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 17020–17025.

- Reid, IR (2002): Relationships among body mass, its components, and bone. *Bone* 31, 5, 547–555.
- Ricci TA, Heymsfield SB, Pierson RN Jr, Stahl T, Chowdhury HA, Shapses SA (2001): Moderate energy restriction increases bone resorption in obese postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 73, 2, 347–352.
- Riede UN, Werner M, Schaefer, HE: Allgemeine und spezielle Pathologie. 5. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart (2004).
- Rosen ED, Spiegelman BM (2006): Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444, 847–853.
- Rozman C, Feliu E, Berga L, Reverter JC, Climent C, Ferran MJ (1989): Age related variations of fat tissue fraction in normal bone marrow depend both on size and number of adipocytes: a stereological study. *Exp Hematol* 17, 37–43.
- Saraiva MJ (2002): Sporadic cases of hereditary systemic amyloidosis. *N Engl J Med* 346, 1818–1819.
- Scantlebury T, Maslowska M, Cianflone K (1998): Chylomicron-specific enhancement of acylation stimulating protein and precursor protein C3 production in differentiated human adipocytes. *J Biol Chem* 273, 20903–20909.
- Schmidt, RF, Lang, F (2007). Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. 30. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg, 254–257.
- Schwartzman, RJ (2002): New treatments for reflex sympathetic dystrophy. *N Engl J Med* 343, 654–656.
- Serot JM, Christmann D, Dubost T, Couturier M (1997): Cerebrospinal fluid transthyretin: Aging and late onset Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 63, 506–508.

- Shutter JR, Graham M, Kinsey AC, Scully S, Liithy R, Stark KL (1997): Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. *Genes Dev* 11, 593–602.
- Spiegelman BM, Flier JS (2001): Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104, 531–543.
- Stefan N, Hennige AM, Staiger H, Machann J, Schick F, Schleicher E, Fritsche A, Haring HU (2007): High circulating retinol-binding protein 4 is associated with elevated liver fat but not with total, subcutaneous, visceral, or intramyocellular fat in humans. *Diabetes Care* 30, 1173–1178.
- Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, Hoffmann J, Hsiung HM, Kriauciunas A et al. (1995): The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 377, 530–532.
- Takeda S, Eleftheriou F, Levasseur R (2002): Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 111, 305–317.
- Tamori Y, Sakaue H, Kasuga M (2006): RBP4, an unexpected adipokine (2006). *Nat Med* 12, 30–31.
- Tartaglia LA (1997): The leptin receptor. *J Biol Chem* 272, 6093–6096.
- Taylor D (1997): Bone maintenance and remodeling: a control system based on fatigue damage. *J Orthop Res* 15 (4), 601–606.
- Teixeira L, Sousa DM, Nunes AF, Sousa MM, Herzog H, Lamghari M (2009): NPY revealed as a critical modulator of osteoblast function in vitro: new insights into the role of Y1 and Y2 receptors. *Cell Biochem* 107, 908–916.
- Thomas T, Burguera B, Melton LJ III, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Riggs BL, Khosla S (2001): Role of serum leptin, and estrogen levels as potential

mediators of the relationship between fat mass and bone mineral density in men versus women. *Bone* 29, 114–120.

Villarroya F, Iglesias R, Giralt M (2004): Retinoids and retinoid receptors in the control of energy balance: novel pharmacological strategies in obesity and diabetes. *Curr Med Chem.* 11, 795–805.

Vock L: Leptin im Knochenstoffwechsel (2003). *Journal für den Mineralstoffwechsel* 10(1), 22–27.

Vranckx R, Savu L, Maya M, Nunez EA (1990): Characterization of a major development-regulated serum thyroxine-binding globulin in the euthyroid mouse. *Biochem J* 271, 373–379.

Wang A, Ding X, Sheng S, Yao Z (2008): Retinoic acid inhibits osteogenic differentiation of rat bone marrow stroma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 375, 435–439.

Wei S, Episkopou V, Piantedosi R, Maeda S, Shimada K, Gottesman ME, Blaner WS (1995): Studies on the metabolism of retinol and retinol-binding protein in transthyretin-deficient mice produced by homologous recombination. *J Biol Chem* 270, 866–870.

Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, Kahn BB (2005): Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436, 356–362.

Yen PM (2001): Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* 81, 1097–1142.

Yoshida A, Matsutani Y, Fukuchi Y, Saito K, Naito M (2006): Analysis of the factors contributing to serum retinol binding protein and transthyretin levels in Japanese adults. *J Atheroscler Thromb* 13, 209–215.

Zhang Y, Proenca R, Friedman JM (1994): Positional cloning of the mouse obese gen and its human homologue. *Nature* 372, 425–432.

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mit Ihrer Unterstützung in unterschiedlicher Weise zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meinem Doktorvater, dem Leiter des Instituts für Osteologie und Biomechanik, Professor Dr. Michael Amling möchte ich mich ganz besonders für den Zuspruch, die vielfältige Unterstützung und die Vergabe des Dissertationsthemas bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich sehr herzlich bei PD Dr. Thorsten Schinke für die hervorragende Anleitung und Betreuung zur wissenschaftlichen Arbeit bedanken. Thorsten hat mit wertvollen Anregungen und Ratschlägen in der täglichen Laborarbeit zum Fortgang des Projektes maßgeblich beigetragen und mich konstant, unkompliziert und uneingeschränkt unterstützt und hat stets für den nötigen Aufschwung gesorgt.

Ein großer Dank geht auch an Dr. Sebastian Seitz, der als Ansprechpartner in der Einführungsphase in die Laborarbeit stets ein Ohr für mich hatte und mit wertvollen Ratschlägen zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat. Für Ideen, Hinweise, Unterstützung und besonders das Korrekturlesen danke ich PD Dr. Florian Barvencik.

Weiterhin gilt allen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für Osteologie und Biomechanik mein Dank, die mir stets tatkräftig mit Ihrem Fachwissen, Erfahrungen und konstruktiver Kritik zur Seite standen und für eine angenehme Arbeitsatmosphäre gesorgt haben.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie und ganz besonders bei meinen Eltern bedanken, ohne die ein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich geworden wäre und die mir stets erfolgreich den Rücken freigehalten haben.

Daniel danke ich für seine liebevolle Unterstützung und nicht zuletzt für die visuelle sowie technische Unterstützung.

Natürlich möchte ich mich auch bei all meinen Freunden bedanken, die mir tatkräftig beiseite gestanden haben und für die erforderliche Abwechslung gesorgt haben.

Vielen herzlichen Dank!

10. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Stefanie Ganswindt
Geburtstag: 02. August 1983
Geburtsort: Brandenburg
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1990 – 1993 Adolf-Schönfelder-Grundschule, Hamburg
1993 – 1994 Grundschule Moorflagen, Hamburg
1994 – 1996 Gymnasium Ohmoor, Hamburg
1996 – 2000 Schulzentrum Sachsenweg, Hamburg
2000 – 2003 Wirtschaftsgymnasium Weidenstieg, Hamburg
(Allgemeine Hochschulreife)

2003 Studium der Naturwissenschaften, Fachbereich Chemie an der
Leibniz-Universität Hannover

2004 Beginn des Humanmedizinstudiums an der Georg-August-
Universität Göttingen (Frühjahr '04)

2006 Ärztliche Vorprüfung (Frühjahr '06)

2009 Praktisches Jahr:
Hospital Italiano, Buenos Aires, Argentinien
Asklepiosklinik Hamburg-Barmbek
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

2010 Ärztlichen Prüfung (Juni '10)

seit Januar 2011 Assistenzärztin in der Klinik und Poliklinik für Diagnostische und
Interventionelle Radiologie, Universitätsklinikum Hamburg-
Eppendorf (Direktor: Prof. Dr. Adam)

Stefanie Ganswindt,
März 2011

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:

Stefanie Ganswindt