

Aus dem Institut
für Osteologie und Biomechanik
des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. M. Amling

Die Bedeutung der zentralnervösen Expression von FGF2 für den Knochenstoffwechsel

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Kristina Plöger
aus Hamburg
Hamburg 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: 26.08.2013

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Arndt Schilling

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. Uwe Wehrenberg

I Inhaltsverzeichnis

II Verzeichnis der Abbildungen

III Abkürzungen

1 Einleitung.....	1
1.1 Das Skelett.....	1
1.1.1 Osteoblasten.....	2
1.1.2 Osteozyten.....	2
1.1.3 Osteoklasten.....	2
1.2 Sympathikotonus und Knochenmasse.....	4
1.2.1 Leptin.....	4
1.2.2 FGF2.....	4
2 Fragestellung und Zielsetzung.....	6
3 Material und Methoden.....	7
3.1 Material.....	7
3.1.1 Geräte und Laborbedarf.....	7
3.1.2 Chemikalien.....	7
3.1.3 Tiere.....	10
3.2 Methoden.....	11
3.2.1 Calceinlabel.....	11
3.2.2 Kontaktradiographie.....	11
3.2.3 Histologie.....	11
3.2.4 Histomorphometrie	12
3.2.5 Serum- und Urinanalytik.....	13
3.2.5.1 Bestimmung von Deoxypyridinolin Crosslinks im Urin.....	13
3.2.5.2 Bestimmung von TRAP5B im Serum.....	14
3.2.5.3 Bestimmung von Osteocalcin im Serum.....	15
3.2.6 Biomechanik	16
3.2.7 Veraschung	17
3.2.8 Statistik.....	18
3.2.9 Sicherheit und Entsorgung.....	18

4 Resultate.....	19
4.1 Gewicht.....	19
4.2 Kontaktradiographien.....	20
4.3 Histologie.....	24
4.4 Serum- und Urinanalytik.....	29
4.5 Biomechanik.....	31
4.6 Veraschung.....	31
5 Diskussion.....	32
5.1 Zunahme der Knochenmasse bei FGF2 Defizienz.....	32
5.2 Auswirkungen der zentralen FGF2 Substitution bei FGF2 defizienten Tieren.....	34
6 Zusammenfassung.....	36
7 Literaturverzeichnis.....	37
8 Danksagung.....	49
9 Curriculum Vitae.....	50
10 Eidesstattliche Versicherung.....	51

Verzeichnis der Abbildungen

- Abb. 1 Leptin-Sympathikus-Knochenmodell
- Abb. 2 Biomechanik-Testmaschine
- Abb. 3 Körpergewichtsunterschiede in verschiedenen Altersgruppen
- Abb. 4 Kontaktradiographien (Einen Monat)
- Abb. 5 Längendifferenzen von Femur und LWK (Einen Monat)
- Abb. 6 Kontaktradiographien (Drei Monate)
- Abb. 7 Längendifferenzen von Femur und LWK (Drei Monate)
- Abb. 8 Kontaktradiographien (Sechs Monate)
- Abb. 9 Längendifferenzen von Femur und LWK (Sechs Monate)
- Abb. 10 Histologien (Einen Monat)
- Abb. 11 Statistische Histomorphometrie (Einen Monat)
- Abb. 12 Histologien (Drei Monate)
- Abb. 13 Statistische Histomorphometrie (Drei Monate)
- Abb. 14 Histologien (Sechs Monate)
- Abb. 15 Statistische Histomorphometrie (Sechs Monate)
- Abb. 16 Knochenvolumina in verschiedenen Altersgruppen
- Abb. 17 Knochenresorption- und formation (Drei Monate)
- Abb. 18 Dynamische Histomorphometrie (Drei Monate)
- Abb. 19 Knochenresorption- und formation (Sechs Monate)
- Abb. 20 Dynamische Histomorphometrie (Sechs Monate)
- Abb. 21 Bruchkraft und Materialwiderstand (Sechs Monate)
- Abb. 22 Ash Weight (Sechs Monate)

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
BV/TV	Knochen-/Gewebevolumen
°C	Grad Celsius
E _{modul}	Elastizitätsmodul
F _{Bruch}	Bruchkraft in Newton
FGF2	Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (Fibroblast growth factor 2)
FGFR	Fibroblastenwachstumsfaktorrezeptor (Fibroblast growth factor receptor)
g	Gramm
h	Stunde
HCl	Salzsäure
ko	Knockout
kV	Kilovolt
LWK	Lendenwirbelkörper
m	milli (10 ⁻³)
mm	Millimeter
μ	mikro (10 ⁻⁶)
min	Minute
mon	Monate
NaCl	Natriumchlorid
n	nano (10 ⁻⁹)
OPG	Osteoprotegerin
RANK	Rezeptor Activator of Nuclear Factor Kappa B
RANKL	Rezeptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand
SD	Standardabweichung
TbN	Trabekelanzahl
TbSp	Trabekelabstand

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

TbTh	Trabekeldicke
Tg ^C	chicken Transgen
UV	ultraviolett
vs.	versus
WK	Wirbelkörper
wks	weeks; Wochen
wnt	Wg für Wingless und Int-1
wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem
+/+	Homozygoter Wildtyp; Gen ist auf beiden Allelen vorhanden
-/-	Homozygoter Knockout; Gen fehlt auf beiden Allelen

1 Einleitung

1.1 Das Skelett

Das Skelettsystem muss vielen unterschiedlichen Ansprüchen gerecht werden. Es bildet das Stützgerüst unseres Körpers, schützt wichtige Strukturen wie Gehirn, Rückenmark oder Brusteingeweide, stellt zusammen mit Gelenken und Bändern den passiven Bewegungsapparat dar, enthält blutbildendes Knochenmark und dient als größtes Kalziumresevoir der Regulation der Kalziumhomöostase.^{12; 13; 26; 53}

Um diese unterschiedlichen Ansprüche erfüllen zu können, ist ein spezieller Aufbau erforderlich. Mineralisierter Knochen besteht zum größten Teil aus Hydroxylapatit (verleiht dem Knochen die Härte) und zu einem wesentlich geringeren Teil aus organischen Komponenten wie Kollagen Typ 1, die dem Knochen Zugfestigkeit und Elastizität verleihen.¹¹ Außerdem ist der Knochen permanenten Umbauprozessen unterworfen (Remodeling).^{11; 55} Dabei werden stark beanspruchte Areale verstärkt, an unbelasteten Stellen erfolgt eine Knochenresorption und defekte Bereiche werden repariert. Das Knochenremodeling wird zum einen auf zellulärer Ebene (Osteoklasten und Osteoblasten) und zum anderen zentral gesteuert.

Osteoblasten bilden den Rezeptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand (RANKL), der an auf Osteoklasten und deren Verläufern exprimierten Rezeptor RANK bindet. Zudem bilden Osteoblasten Osteoprotegerin (OPG) der als Abfangrezeptor für RANKL dient und bei Bindung an RANKL eine Bindung an die Osteoklasten verhindert, so dass das Verhältnis von RANKL und OPG die Osteoklastenaktivität molekular steuert. Überwiegt RANKL über OPG kommt es zum vermehrten Knochenabbau.^{9; 75} Bei Regulationsstörungen kann ein Verlust an Knochenmasse resultieren, welcher u.a. zu einem erhöhten Frakturrisiko führt.⁸

Durch Resorption kann vermehrt Kalzium aus dem Knochen mobilisiert werden, um einen gesteigerten Kalziumbedarf z.B. während einer Schwangerschaft decken zu können.^{2; 26}

Osteoblasten und Osteoklasten^{11; 12; 66} agieren als Antagonisten der Knochenumbauprozesse.

1.1.1 Osteoblasten

Osteoblasten stammen von mesenchymalen Vorläuferzellen ab. Es handelt sich um einkernige, basophile, plumpe Zellen (15-30µm Durchmesser), die Osteoid synthetisieren. Osteoid ist die unverkalkte Interzellulärsubstanz, aus der durch Einlagerung von Hydroxylapatitkristallen mineralisierte Knochensubstanz entsteht.

Osteoblasten findet man zellrasenartig aufgereiht an der Osteoidgrenze von Knochenneubildungszonen.⁸

1.1.2 Osteozyten

Osteozyten sind terminal differenzierte Osteoblasten, die von verkalkter Knochenmatrix umgeben sind. Sie befinden sich in Hohlräumen, die als Lakunen bezeichnet werden und sind über Zellfortsätze in den Canaliculi miteinander verbunden. Dadurch ist die Fortleitung von Signalen zwischen den einzelnen Osteozyten möglich. Sie dienen der Erhaltung der Knochenmatrix.⁸

1.1.3 Osteoklasten

Osteoklasten sind stark azidophile vielkernige Riesenzellen (bis zu 25 Zellkerne; 30-100µm Durchmesser), die sich wahrscheinlich aus hämatopoetischen Stammzellen entwickeln.³⁴ Ihre besondere Fähigkeit ist die Demineralisierung und der Abbau der Knochenmatrix.⁷⁸ Im kompakten Knochengewebe findet man die Osteoklasten an der Spitze von Erosionstunneln. Im Bereich der Trabekel liegen sie hingegen in den so genannten Howship-Lakunen. Bei den Osteoklasten handelt es sich um polar organisierte Zellen mit einem apikalen (knochennahen) und einem basolateralen (markraumnahen) Pol. Auf der apikalen Seite besitzt der Osteoklast einen Bürstensaum ("ruffled boarder") zur Oberflächenvergrößerung. Es schließt sich Richtung Markraum eine Haftzone an, die den engsten Kontakt zwischen Osteoklast und Knochenmatrix bildet.³⁴ Das Zytoplasma in diesem Bereich ist arm an Organellen ("clear zone") und reich an Actinfilamenten. Im Bereich des Bürstensaumes befindet sich ein gut entwickelter Golgi-Apparat mit vielen Golgi-Stapeln und zahlreichen Vesikeln (vakuoläre Zone) im Zytoplasma. Hier werden Wasserstoff- und Chloridionen in die Lakune sezerniert, so dass Salzsäure entsteht, die zur Auflösung der Knochensalze führt. Freiwerdende Kalziumionen werden aufgenommen und auf der basolateralen Seite wieder abgegeben.^{9; 34; 78} In diesem Bereich ist die Zellmembran glatt begrenzt.

Die Osteoklastenaktivität wird ebenso wie die Neubildung durch Fusion von monozytären Vorläuferzellen indirekt durch PTH stimuliert. Calcitriol hat die gleichen Effekte. Hingegen wirkt Calcitonin hemmend auf die Osteoklasten.⁸

Calcitonin ist ein Peptidhormon, welches in den C-Zellen der Schilddrüse gebildet und bei hohen Calciumkonzentrationen im Blut sezerniert wird. Es senkt den Blutcalciumspiegel, indem es die Freisetzung von Calcium aus dem Knochen (Hemmung der Osteoklastentätigkeit durch Depolymerisation von Actinfilamenten, Lösung der Haftkontakte und zum Verlust des Faltenaumes führt) hemmt, die Calciumresorption im Darm vermindert und die Calciumausscheidung fördert. Dies bezüglich agiert Calcitonin als Antagonist des Parathormons.⁵⁰

Beim Parathormon (PTH) handelt es sich ebenfalls um ein Peptidhormon. Es wird in der Nebenschilddrüse synthetisiert und sezerniert. Die Sekretion ist abhängig von der Calciumionenkonzentration im Serum. Fällt diese ab, wird vermehrt PTH sezerniert. Im Bereich der Knochen kommt es zu einer vermehrten Calciummobilisation sowie zur Umwandlung inaktiver Belegzellen zu Osteoblasten, weshalb PTH bei der Osteoporosetherapie verwendet wird.³³ Zudem stimuliert PTH die Resorption von Calcium und Magnesium im Dünndarm und bewirkt an den Nieren eine verminderte Calciumausscheidung sowie die Stimulation der Hydroxylierung von 25-Hydroxycholecalciferol zu aktivem 1,25-Cholecalciferol (Calcitriol).^{8; 50}

Calcitriol ist ein Secosteroid. Es wird in den Epithelzellen des proximalen Nierentubulus gebildet und erhöht ebenso wie PTH die Serumcalciumkonzentration indem es die intestinale Calciumresorption fördert.⁵⁰ Bei Calciummangel hemmt es zum einen die Osteoblasten durch Stimulierung der Osteocalcinproduktion, welches die Mineralisierung hemmt und zum anderen fördert es konzentrationsabhängig die Osteoklastendifferenzierung und damit die Mobilisierung von Calcium aus dem Knochen.

Für einen gesunden Knochen ist die uneingeschränkte physiologische Funktionsfähigkeit von Osteoblasten und Osteoklasten, sowie der Regulationsmechanismen essentiell. Beeinträchtigungen führen zwingend zu pathologischen Veränderungen der Knochenstruktur.⁵³

1.2. Sympathikotonus und Knochenmasse

Es ist bekannt, dass ein erniedrigter Sympathikotonus zu einer Erhöhung der Knochenmasse führt. Ein Leptinmangel bewirkt wiederum eine Erniedrigung der Sympathikotonus.⁷³

1.2.1. Leptin

Bei Leptin handelt es sich um ein Hormon, welches hauptsächlich von Fettzellen sezerniert wird und eine wichtige Rolle in der Regulation von Körpergewicht und der Fertilität spielt. Zudem scheint Leptin den Knochenstoffwechsel indirekt über den Hypothalamus zu beeinflussen.⁴ Lokal soll es das SNS (Sympathische Nervensystem) sowie andere Neuropeptide, die möglicherweise ebenfalls einen Einfluss auf die Knochenformation haben, aktivieren^{15; 25; 73} und damit Geschwindigkeit der Knochenbildung drosseln. Ausserdem wird vermutet, dass Leptin über beta-adrenerge Rezeptoren einen Einfluss auf Osteoblasten hat.²⁵

1.2.2 FGF2

Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGF) gehören zu der großen Familie strukturell verwandter Wachstumsfaktoren. Es sind momentan die FGF1-23 bekannt. Diese Proteine bestehen aus Ketten von 155-268 Aminosäuren. Sie verfügen über eine „central domain“, die ihnen in der Tertiärstruktur das Binden von Heparin ermöglicht. Sezerniertes FGF bindet an, auf der Zelloberfläche lokalisierte, FGF Rezeptoren (Tyrosinkinase).¹⁶

Die Nucleotidsequenzen, die FGF1 und 2 codieren wurden 1986 entschlüsselt.^{1; 39} Damals wurde FGF2 noch als BFGF (basic fibroblast growth factor) bezeichnet. Codiert wird FGF2 auf dem Chromosom 4q25-27.^{29; 49; 54}

FGF2 wird in den unterschiedlichsten Geweben und Zellen exprimiert (u.a. in Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen, postmitotischen Kardiomyocyten³ und im cerebralen Kortex). Besonders hohe Konzentrationen wurden im Gehirn und in der Hypophyse nachgewiesen.⁶⁰ Im Bereich der Knochen wurde FGF2 in Osteoblasten, Osteocyten und periostealen Zellen nachgewiesen und soll Chondrocyten sowie Osteoblasten regulieren.³⁷

Der Wachstumsfaktor ist an vielen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt. Der mögliche therapeutische Nutzen wird in unterschiedlichen Bereichen untersucht (z.B.: FGF2 Substitutionen bewirkten bei an Diabetes mellitus erkrankten Mäusen zu einer annähernd normalen Frakturheilung ⁶⁹, zur Reduktion des Schädigungsausmaßes und einer verbesserten Erholung der Sensomotorik nach Ischämien ⁵ sowie zur verbesserten Vaskularisation von Implantaten beim tissue engineering). ⁵⁸

FGF2 hat eine große Bedeutung in der Angiogenese, dem Kapillarwachstum sowie der Blutdruckkontrolle. Eine FGF2 Defizienz führt bei Mäusen zu einem Hypotonus. Diese Mäuse reagieren normal auf einen Angiotensin II induzierten Hypertonus, die neuronale Barorezeptor vermittelte Blutdruckregulation ist hingegen beeinträchtigt. Der Hypotonus wird als eine autonome Dysregulation des Blutdruckes erklärt. ^{3; 17}

Neben den bekannten peripheren Wirkungen von FGF2 soll nun die zentrale Wirkung von FGF2 auf den Sympathikotonus und damit auf die Knochenmasse untersucht werden und ob FGF2 möglicherweise ein zentraler Regulator des Sympathikotonus und damit der Knochenmasse ist.

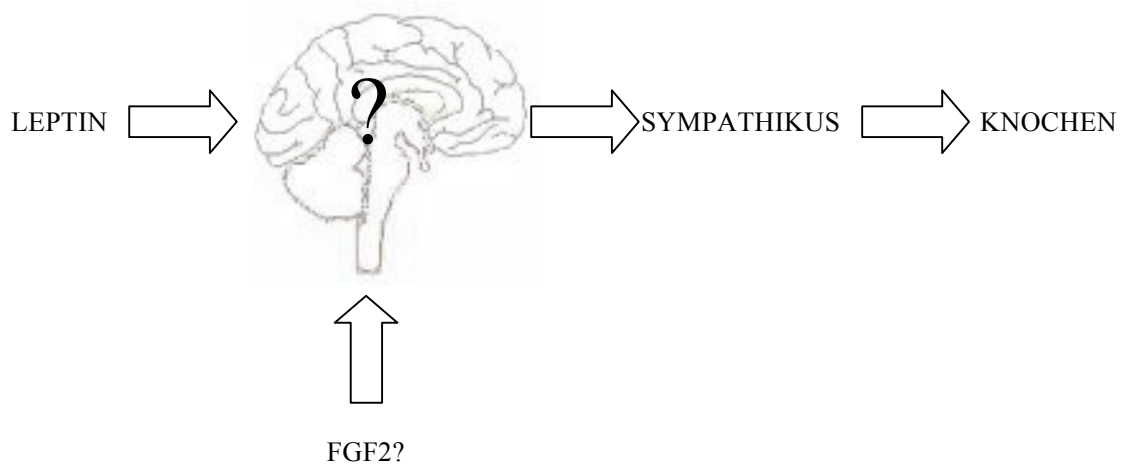


Abb .1: Leptin-Sympathikus-Knochenmodell

2 Fragestellung und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Auswirkungen einer FGF2 Defizienz sowie einer zentralen FGF2 Überexpression auf die Knochenstruktur zu untersuchen. Des Weiteren versuchen wir herauszufinden, ob und wenn ja welchen Zusammenhang zwischen Leptin, FGF2 und der Knochenmasse gibt. Da bei beiden eine zentrale Wirkung auf den Sympathikotonus und das der Knochenformation postuliert wird.

Insbesondere die folgenden Fragestellungen sollen bearbeitet werden:

1. Wie wirkt sich die FGF2 Defizienz auf die Knochenformation der Mäuse aus?
2. Ist ein Rescue des Knochens durch eine vom gehirnspezifischen wnt1 Promoter vermittelte zentrale Überexpression von FGF2 möglich?

Ist eine Normalisierung des möglichen Knochenphänotypes der FGF2 defizienten Mäuse durch eine zentrale Überexpression von FGF2 erreichbar?

Zur Beantwortung der ersten Frage wird ein Mausmodell eingesetzt, bei dem das FGF2 Gen inaktiviert wurde. Im Vergleich zur Kontrollgruppe sollen Auswirkungen dieser Inaktivierung auf den Knochen histomorphometrisch, biomechanisch und mittels Serum- und Urinmarkern in vier verschiedenen Altersgruppen analysiert.

Für die Untersuchung der zweiten Frage findet ein Mausmodell Verwendung, bei dem FGF2 durch den gehirnspezifischen wnt1 Promotor vermittelt lokal überexprimiert wird. Bei wnt 1 handelt es sich um ein Protoonkogen, welches in der Embryogenese für die Entwicklung des Mittelhirns verantwortlich sein soll und bei der Maus lediglich während der Entwicklung des ZNS exprimiert wird ²³. Somit soll eine rein zentral begrenzte Überexpression von FGF2 erzielt werden. Die Folgen der Überexpression auf die Knochenformation werden bezüglich der genannten Parameter im Vergleich mit einer Kontrollgruppe in drei Altersgruppen analysiert.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1 Geräte und Laborbedarf

Autotechnikum: Bavimed (Birkenau, Germany)

Biomechanik Testmaschine: Mini-Zwick Z2.5/TN 1S, Zwick (Ulm, Germany)

Digitalkamera: Canon EOS 10D (Tokyo, Japan)

Durchlichtmikroskop: Axioskop II, Carl Zeiss (Jena, Germany)

Injektionsnadeln: microlance Becton Dickinson S.A. (Madrid, Spain)

Kontaktradiograph: Faxitron Cabinet System, Faxitron (Wheeling, USA)

Kühltruhen: Economy, Liebherr (Biberach an der Riß, Germany);

profi line, Liebherr (Biberach an der Riß, Germany)

Mikrotom: CUT 4060/E Microtec (München, Germany)

MikroCT: Scanco μ CT 40, Medical AG (Bassersdorf, Switzerland)

Pipetten: Eppendorf Research (Hamburg, Germany)

Röntgenfilme: AGFA mamoray HDR PQ medical x-ray film 18×24, AGFA (Gevaert N.V. Belgium)

Schleifgerät: Phoenix Alpha, Grinder/Polischer, Buehler (Illinois, USA)

Schleifscheiben: Hermes (Hamburg, Germany)

Schüttler: IKA[®] KS 260 basic (Staufen, Germany)

Spritzen: Becton Dickinson S.A. (Madrid, Spain)

Tubes: Eppendorf Research (Hamburg, Germany)

Vortex: Heidolph Reax top (Schwabach, Germany)

Zentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5415D (Hamburg, Germany)

3.1.2 Chemikalien

Aqua destillata: Apotheke des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Benzoylperoxid (BPO): Merck 801641 (Darmstadt, Germany)

Calcein: Merck (Darmstadt, Germany)

Chloroform: Merck (Darmstadt, Germany)

Diethylether: Carl Roth (Karlsruhe, Germany)

Eindeckmedium: DPX Mountant for histology, Fluka 44581 (Deisenhofen, Germany)

Entplaster: 2-Methoxyethyl-acetat, Merck (Darmstadt, Germany)

Ethanol: Apotheke des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Formaldehyd: 37%, Merck (Darmstadt, Germany)

Glycerin: Fluka (Deisenhofen, Germany)

Ketamin: Gräub, A. Albrecht (Aulendorf, Germany)

Methylacrylat (MMA): Merck (Darmstadt, Germany)

Natriumchlorid (NaCl): 0,9%, Braun (Melsungen, Germany)

Natriumcarbonat: Merck (Darmstadt, Germany)

Natriumhydrogencarbonat: Merck (Darmstadt, Germany)

Natriumthiosulfat: Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)

N, N Dimethyl-p-Toluidin (DMPT): Merck 822040 (Darmstadt, Germany)

Pikrinsäure: Fluka (Deisenhofen, Germany)

Rompun: 2%, Bayer (Leverkusen, Germany)

Säurefuchsin: Merck (Darmstadt, Germany)

Salpetersäure: Fluka (Deisenhofen, Germany)

Silbernitrat: Merck (Darmstadt, Germany)

Sterillium[®]: Bode Chemie (Hamburg, Germany)

Toluidin-blau O: Sigma T3260-1006, Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)

Xylol: SDS, Val de Reuil (Cedex, France)

Metra[™] Creatinine Assay: Quidel Corporation (San Diego, USA)

Metra[™] DPD EIA Kit: Quidel Corporation (San Diego, USA)

Mouse Osteocalcin IRMA Kit: Immutopics (San Clemente, USA)

MouseTRAP[™] Assay: Immunodiagnostic Systems GmbH (Frankfurt am Main, Germany)

Acrylat:

200ml Gießlösung

1000µl N, N Dimethyl-p-Toluidin

Calceinlabel:

0,438g 0,15M NaCl

1g 2%NaHCO₃

0,5g Calcein

50ml Aqua destillata

Gießlösung.:

1000ml Methylacrylat

100ml LPG

6,6g Benzoylperoxid

Infiltration:

1000ml Methylacrylat

100ml LPG WIV

3,3g Benzoylperoxid

Mausbetäubungsmittel:

8ml NaCl

1,2ml Ketamin

0,8ml Rompun; 0,15ml/Maus

Sodaformol:

12,5g Natriumcarbonat

187ml Aqua dest.

62,5ml 37% Formalin

Toluidinblau O Färbelösung:

1g Toluidinblau O

100ml Aqua destillata

Van Gieson-Färbelösung:

2,5g Säurefuchsin

900ml gesättigte Pikrinsäure

100ml Glycerin

5ml konzentrierte Salpetersäure

Die Chemikalien wurden alle bei der Apotheke des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bestellt.

3.1.3 Tiere

Die Tiere mit folgendem genetischen Hintergrund C57BL/6J*129Sv wurden in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikum Eppendorf (Direktor: Dr. rer. nat. Haemisch) generiert und im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Dr. Ehmke (Direktor des Instituts für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie) zur Verfügung gestellt. Es wurden nur Weibchen untersucht, die folgende standardisierte Diät erhielten (Zuchtfutter: V1126-000, ssniff-M-Z, extrudiert und Haltungsfutter: V1536-000, ssniff R/M-H, extrudiert; ssniff (Soest, Germany). Die Genotypisierung erfolgte durch die Kooperationspartner.

Es wurden in drei verschiedenen Altersgruppen (1 Monat, 3 Monate und 6 Monate) jeweils 5 FGF2^{+/+} (Kontrollgruppe) und FGF2^{-/-} sowie FGF2^{+/+}; Tg^C (Kontrollgruppe) und FGF2^{-/-}; Tg^C untersucht. Um signifikante Ergebnisse erzielen zu können, enthielten alle genannten Gruppen mindestens 5 Tiere.

Die Organentnahme war in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz beim Tierschutzbeauftragten des Universitätsklinikum Eppendorf, Dr. Haemisch, angemeldet.

3.2 Methoden

3.2.1 Calceinlabel

Den 3 und 6 Monate alten Mäusen wurde zur Bestimmung der Knochenformationsrate zweimal im Abstand von 7 Tagen 0,1ml Calceinkonzentration intraperitoneal injiziert (erste Injektion 9 Tage prä mortem).

Die Tiere wurden zu den gegebenen Zeitpunkten mittels Etherinhalationsnarkose oder intraperitoneal injiziertem Betäubungsmittel narkotisiert und getötet.

Danach wurden die Mäuse gewogen. Es wurden Blut und Urin gewonnen. Anschließend wurden die Tiere für 24-48h in 3,7%igem PBS gepuffertem Formaldehyd fixiert. Das Blut wurde zentrifugiert, um das Serum bei -20°C einfrieren zu können.

3.2.2 Kontaktradiographie

Zu Dokumentationszwecken, zur genauen Lokalisierung der benötigten Wirbelkörper sowie zur Messung der Femurlängen und Lendenwirbelkörper 1-4 wurden Kontaktradiographien (X-ray cabinet, Faxitron, USA; 35kVp für 2sec; Film: AGFA mamoray HDR PQ medical x-ray film 18×24; AGFA Gevaert N.V. Belgium) von allen Mäusen erstellt.

Die Röntgenbilder wurden mit einer Digitalkamera Canon EOS 10D auf Carl Zeiss Binokular (Belichtungszeit: 8sec; Vergrößerung Tibia: 0,65x, Einstellungen Licht: 3C; Vergrößerung WK: 1x, Einstellungen Licht: 4C) fotografiert.

3.2.3 Histologie

Für die Histologie wurden die rechte Tibia, sowie die LWK 1-4 präpariert und anschließend für 12h zur Entwässerung der Knochen ins Autotechnikum (aufsteigende Alkoholreihe einmal 70%, dreimal 80%, viermal 96%, viermal 100% Ethanol) gegeben. Zur Infiltration des Gewebes wurden die Knochen danach in Methylacrylat transferiert. Im Anschluss erfolgte die Einbettung in Acrylat.

Nach der Aushärtung für ca. 24 Stunden bei 4°C und dem Anschleifen der Acrylatblöcke wurden mittels Rotationsmikrotom (Cut 4060, MicroTech, München) 4µm und 12µm dicke Sagittalschnitte erstellt.

Die 4µm Sagittalschnitte wurden Toluidinblau O und modifiziert von Kossa/ van Gieson gefärbt und mit DPX eingedeckt.

Die Toluidinblau O Färbung dient der differenzierten Betrachtung von Osteoblasten (die sich blau darstellen), Osteoklasten (türkisblau), Zellkernen (dunkelblau), mineralisiertem Knochen (hellblau) sowie Knorpel (violett).

Zunächst wurden die Präparate für insgesamt 15 Minuten entplastet, es folgte eine absteigende Alkoholreihe (beginnend mit 100% Ethanol, beendet mit 50% Ethanol) und eine kurze Spülung mit Aqua destillata. Anschließend erfolgte eine ca. 30 minütige Färbung in 1% Toluidinblau O bei einem pH von 4,5 (mit 0,1%HCl einstellen) und wiederum eine Spülung mit Aqua destillata. Es schloss sich eine Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%-100% Ethanol) und ein ca. 15 minütiges Bad in Xylol an. Danach erfolgte das Eindecken mit DXP.

Die modifizierte von Kossa/ van Gieson Gegenfärbung erleichtert eine differenzierte Betrachtung von mineralisiertem Knochen (der sich schwarz darstellt), Kollagen und Bindegewebe (rot) und Muskulatur und Erythrocyten (gelb).

Die ersten drei Schritte dieser Färbung entsprechen den der oben beschriebenen Toluidinblau O Färbung. Es schlossen sich eine 5 minütige Silbernitratfärbung (3%), eine 10 minütige Aqua destillata Spülung, eine 5 minütige Sodaformolfärbung mit anschließender 10 minütiger Leitungswasserspülung und eine 5 minütige Natriumthiosulfatfärbung mit abschließender 10 minütiger Leitungswasserspülung an. Danach erfolgte die van Gieson-Gegenfärbung mit kurzer Leitungswasserspülung. Wiederum schloss sich eine Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (80-100% Ethanol) und ein 15 minütiger Aufenthalt in Xylol, sowie das Eindecken mit DPX an.

3.2.4 Histomorphometrie

Die quantitative Histomorphometrie wurde an kossagefärbten Schnitten der Lendenwirbelkörper durchgeführt. Diese wurden fotografiert mit der Zeiss AxioCam bei einer 1,5 fachen Vergrößerung des Zeiss Axioskops (Carl Zeiss, Jena, Germany). Die Analyse von Knochenvolumen [BV/TV (bone volume per tissue volume) in Prozent], Anzahl der Trabekel (TbN pro mm), Trabekelabstand (TbSp in μm) und Trabekeldicke (TbTh in μm) erfolgte mit Bioquant.

Zur dynamischen Histomorphometrie wurden die ungefärbten 12µm Sagittalschnitte unter einem UV Mikroskop analysiert und bei 5 facher Vergrößerung mit einer Belichtungszeit von 23.000 ms fotografiert. Im UV- Licht stellt sich Calcein als grün fluoreszierender, in den Knochen eingelagerter Marker dar. Aufgrund der zweifachen Calceininjektion kommt es zur Doppelbandenbildung, deren Abstand dem sich innerhalb von einer Woche neu formierten Knochen entspricht.

3.2.5 Serum- und Urinanalytik

3.2.5.1 Bestimmung von Deoxypyridinolin Crosslinks im Urin

Zur Bestimmung der Deoxypyridinolin Crosslinks im Urin wurde das MetraTM DPD EIA Kit (Quidel Corporation, San Diego, USA) verwendet. Die Standardisierung erfolgte nach dem Kreatiningehalt, der mit dem MetraTM Creatinine Assay Kit (Quidel Corporation, San Diego, USA) ermittelt wurde.

Deoxypyridinolin Crosslinks wurden bestimmt, da sie ein Indikator für die Knochenresorption sind. Eine erhöhte DPD-Konzentration im Urin weist auf eine vermehrte Knochenresorption hin. DPD wird durch die Lysyloxidase aus der Aminosäure Lysin gebildet und gehört zu den Crosslinks im Typ-1-Kollagen des Knochens.

Durchführung des MetraTM DPD EIA Kit:

Waschpuffer 1:10 mit Aqua destillata verdünnen und bei Raumtemperatur lagern.

2 Stunden vor Gebrauch Enzymkonjugat ansetzen, pro Flasche Enzymkonjugat 7ml Testpufferlösung verwenden, bei 2-8°C aufbewahren.

2 Stunden vor Gebrauch Substratpuffer auf 20-28°C erwärmen, 1 Stunde vor Gebrauch Substratlösung ansetzen, dazu pro Substratpufferflasche eine Substratpuffertablette verwenden.

Standardlösungen, Proben und Kontrollen mit Testpufferlösung 1:10 verdünnen.

Benötigte Anzahl an Teststreifen aus dem Beutel entnehmen und beschriften.

50µl verdünnte Standardlösung, Proben oder Kontrollen in die Wells geben.

100µl des Enzymkonjugats in jedes Well pipettieren, ca. 2 Stunden bei 2-8°C im Dunkeln inkubieren.

Teststreifen manuell entleeren, 250µl Waschpuffer in jedes Well geben, erneut manuelles Entleeren, zweimal wiederholen, nach dem letzten Waschvorgang die Wells durch kräftiges Ausschlagen auf einem Papierhandtuch trocknen.

150µl Substratlösung in jedes Well geben, für 1 Stunde bei 20-28°C inkubieren.

100µl Stopplösung in alle Wells geben und bei 405nm die Absorbtion ablesen.

Durchführung des MetraTM Creatinine Assay Kit:

Vorbereitungen: Urinproben und alle Reagenzien auf 18-28°C erwärmen. Working Color Solution vorbereiten, indem in jede benötigte Flasche 1ml Stopplösung geben wird.

Urinproben für 2 Minuten bei niedriger Geschwindigkeit (200x g) zentrifugieren.

Standards, Kontrollen und Proben 1:40 mit Aqua destillata verdünnen. Aqua destillata als Nullstandard verwenden.

Benötigte Teststreifenanzahl bereitlegen.

50µl verdünnten Standard, Kontrolle oder Urinprobe in die Wells geben.

150µl Working Color Solution in jedes Well pipettieren und für 30 Minuten bei 18-28°C inkubieren.

Absorbtion bei 490nm ablesen.

3.2.5.2 Bestimmung von TRAP5B im Serum

TRAP5B (tartrate-resistant acid phosphatase form 5b) ist eine Isoform von TRAP und wird spezifisch in knochenresorbierenden Osteoklasten exprimiert und ins Blut sezerniert. Daher dient TRAP 5B als Marker für das Ausmaß der Osteoklastenaktivität und wurde mittels MouseTRAPTM Assay (Immunodiagnostic Systems GmbH, Frankfurt am Main, Germany) bestimmt.

Durchführung des MouseTRAPTM Assay:

Vorbereitungen: Alle Reagenzien auf Raumtemperatur erwärmen. Die benötigte Anzahl der Teststreifen aus dem Beutel entnehmen. Calibrator 0-4 und Kontrollen mit 0,5ml Aqua destillata lösen und 10-15 Minuten stehen lassen. Anti-MouseTRAP Antikörper mit 10,5ml Aqua destillata lösen und 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen. 960ml Aqua destillata zum Waschpufferkonzentrat geben. Substratlösung erst kurz vor Gebrauch ansetzen. Dafür pro 5ml Substratpuffer eine Substrattablette verwenden.

100µl Anti-MouseTRAP Antikörper in alle Wells geben, 1 Stunde bei 20-24°C auf dem Schüttler inkubieren.

300µl Waschpuffer in jedes Well geben, manuell Entleeren, Vorgang dreimal wiederholen, nach dem letzten Durchgang die Wells durch Ausklopfen auf Papierhandtüchern gut trocknen.

100µl Calibrator oder Kontrolle in die vorbereiteten Wells geben.

75µl 0,9% NaCl und 25µl Probe in die vorbereiteten Wells geben.

25µl Releasing Reagenz in alle Wells geben, 1 Stunde bei 20-24°C auf dem Schüttler inkubieren

Erneutes Waschen wie oben beschrieben (insgesamt viermal).

100µl frisch zubereitete Substratlösung in alle Wells pipettieren, Wells mit Folie bedecken, 2 Stunden bei 37°C inkubieren.

25µl Stopplösung in alle Wells geben und innerhalb von 30 Minuten die Absorbtion bei 405nm ablesen.

3.2.5.3 Bestimmung von Osteocalcin im Serum

Zur Bestimmung von Osteocalcin wurde ein Mouse Osteocalcin IRMA Kit benutzt. Osteocalcin wird spezifisch von aktiven Osteoblasten sezerniert und ist daher ein geeigneter Marker für die Osteoblastenaktivität. Außerdem dient Osteocalcin der Einschätzung des Knochenmetabolismus.

Durchführung der Osteocalcinbestimmung:

Vor Gebrauch alle Reagenzien auf Raumtemperatur erwärmen. Alle Standards (außer dem Nullstandard) und die Kontrollen mit 1ml Aqua destillata wiederherstellen und ca.15 Minuten leicht schwingen. Das Waschkonzentrat mit 900ml Aqua destillata verdünnen.

Kontrollen und Proben 1:11 verdünnen!

25µl Standard, verdünnte Kontrolle oder verdünnte Probe in die beschrifteten Tubes geben.

200µl I¹²⁵ markierte Mausosteocalcinantikörper in jedes Tube geben und mittels Vortex gut durchmischen.

Eine mit Mausosteocalcinantikörper bedeckte Perle in jedes Tube geben und dieses gut verschließen, bei Raumtemperatur für 18-24 Stunden inkubieren.

Den flüssigen Inhalt aller Tubes verwerfen.

2ml Waschlösung in jedes Tube geben und damit die Perlen waschen, die Flüssigkeit komplett verwerfen und den Vorgang zweimal wiederholen.

Jedes Tube für eine Minute zum Zählen in einen Gammazähler geben

3.2.6 Biomechanik

Für die biomechanische Untersuchung wurden die Femora der 6 Monate alten Mäuse weichteilfrei präpariert und in Agarosegel eingebettet. Um einen dreidimensionalen Überblick über die Bruchregion (Femurmitte) zu erhalten, erfolgte im MikroCT ein 40 slices umfassender Scan dieser Region. Aus den Daten konnte die Bone Mineral Density (BMD) ermittelt werden. Die Scans wurden mittels Amira (Grafikprogramm) am Computer auf Scanfehler (z.B. fehlgedeutete Lufteinschlüsse im Agarosegel) überprüft. Zur biomechanischen Testung wurden die Knochen in die Halterung einer Präzisionstestmaschine eingebracht. Bei dem Versuch handelt es sich um einen 3-Punkt-Biegeversuch, bei dem der Druck axial über einen Stempel in anterior-posteriorer Richtung auf den Femur bis zu dessen Versagen einwirkte. Dabei wurden vom Computer ein Spannungs-Dehnungs-Diagramm und ein Kraft-Weg-Diagramm erstellt. Aus diesen Daten können $F_{\max}$, Steifigkeit, E_{modul} , Zug und Druck berechnet bzw. abgelesen werden.

$F_{\max}$ bezeichnet die geometrieabhängige maximale Kraft, die auf den Femur ausgeübt werden kann, bevor es zum Materialversagen (Bruch des Knochens) kommt. Die Steifigkeit (entspricht der Steigung im Kraft-Weg-Diagramm) beschreibt den Zusammenhang zwischen der, auf den Femur wirkenden, Last und der daraus resultierenden Verformung. Der E_{modul} (Elastizitätsmodul; entspricht der Steigung im Spannungs-Dehnungs-Diagramm) gibt den Zusammenhang zwischen Spannung und Dehnung bei der Verformung des Knochens wieder. Je größer dieser Wert ist, desto höher ist der Widerstand des Materials gegen die Verformung. Ein hoher E_{modul} Wert korrespondiert folglich mit einer hohen Materialsteifigkeit.

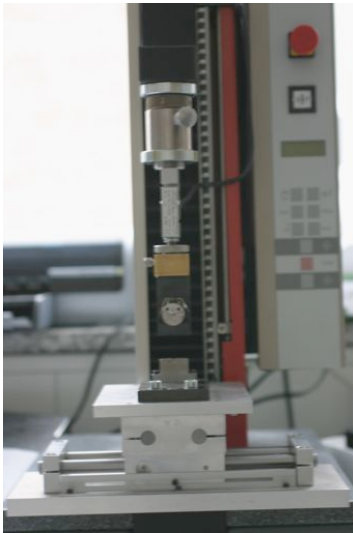


Abbildung 2: Biomechanik Testmaschine Mini-Zwick Z2.5/TN 1S

3.2.7 Veraschung

Durch die Veraschung von Knochen wird das gesamte organische Material (Kollagen und andere Proteine) entfernt ohne dabei den mineralischen Anteil zu beeinflussen. Sie wurde an den für die biomechanischen Untersuchungen bereits präparierten Femora der 6 Monate alten Mäuse durchgeführt.

Die Femora wurden in Tubes überführt und mindestens viermal für je 10min in MilliQ-Wasser gewaschen. Anschließend wurden sie in Schnappgläser gegeben und eine Stunde in Chloroform inkubiert. Danach folgte erneut der oben beschriebene viermalige Waschvorgang.

Die Femora trockneten in Tubes im Thermoblock für ca. 0,5-1 Stunde bei 95°C.

Hinterher wurden die Knochen in den geeigneten Schalen gewogen (dry weight). Die Knochen inkubierten in den Schalen für ca. 12 Stunden bei 600°C.

Es folgte ein erneutes Wiegen (ash weight). Aus der Differenz von dry und ash weight ergibt sich der Mineralisierungsgrad des Knochens.

3.2.8 Statistik

Die Ergebnisse wurden mittels zweiseitigen ungepaarten students's t-Tests (Stat View, Abacus Concepts Inc. 1993) statistisch analysiert. Ein p-Wert von $<0,05$ wurde als Signifikanzniveau akzeptiert. Die Standardabweichungen (SD) werden durch die Fehlerbalken in den Abbildungen repräsentiert.

3.2.9 Sicherheit und Entsorgung

Alle Chemikalien wurden entsprechend ihren R- und S-Sätzen gehandhabt. Auch die Entsorgung erfolgte fachgerecht.

4 Resultate

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse bezüglich Körpergewicht, Länge der Femura sowie der ersten vier Lendenwirbelkörper, der ossären Mikroarchitektur sowie der Knochenresorption und -formation in unterschiedlichen Alters- und Genotypes dargestellt. Zudem werden die Ergebnisse der biomechanischen Untersuchungen und der Veraschung exemplarisch an sechs Monate alten Tieren veranschaulicht.

4.1 Gewicht

Das Körpergewicht der Mäuse wurde dokumentiert, da sich deutliche Differenzen des Körpergewichtes auf die Knochenmasse auswirken können.

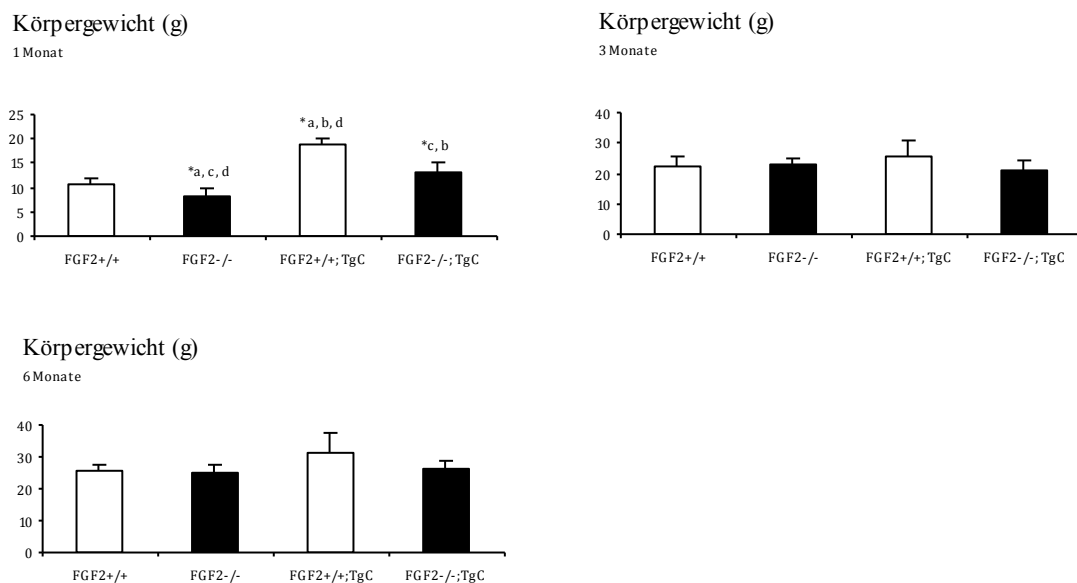


Abb.3: Teilweise signifikante Unterschiede des Körpergewichtes im Vergleich von Mäusen drei verschiedener Altersgruppen. a: gegen FGF2^{+/+}, b: gegen FGF2^{-/-}, c: gegen FGF2^{+/+}; Tg^C, d: gegen FGF2^{-/-}; Tg^C, *: $p < 0,05$.

Bei den einen Monat alten Tieren bestanden signifikante Gewichtsunterschiede im Vergleich der Wildtypen und mit den FGF2 defizienten Tieren sowie mit den FGF2^{+/+}; Tg^C Tieren. Die FGF2 defizienten Tieren waren signifikant leichter als die Tiere der drei anderen Gruppen. Außerdem bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den FGF2^{+/+}; Tg^C Mäusen und den FGF2^{-/-}; Tg^C Mäusen. Dabei waren die FGF2^{+/+}; Tg^C Mäuse deutlich schwerer.

In beiden anderen Altersgruppen (drei Monate, sechs Monate) zeigten sich im Vergleich der verschiedenen Gruppen hingegen keine signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) bezüglich des Körpergewichtes.

4.2 Kontaktradiographie

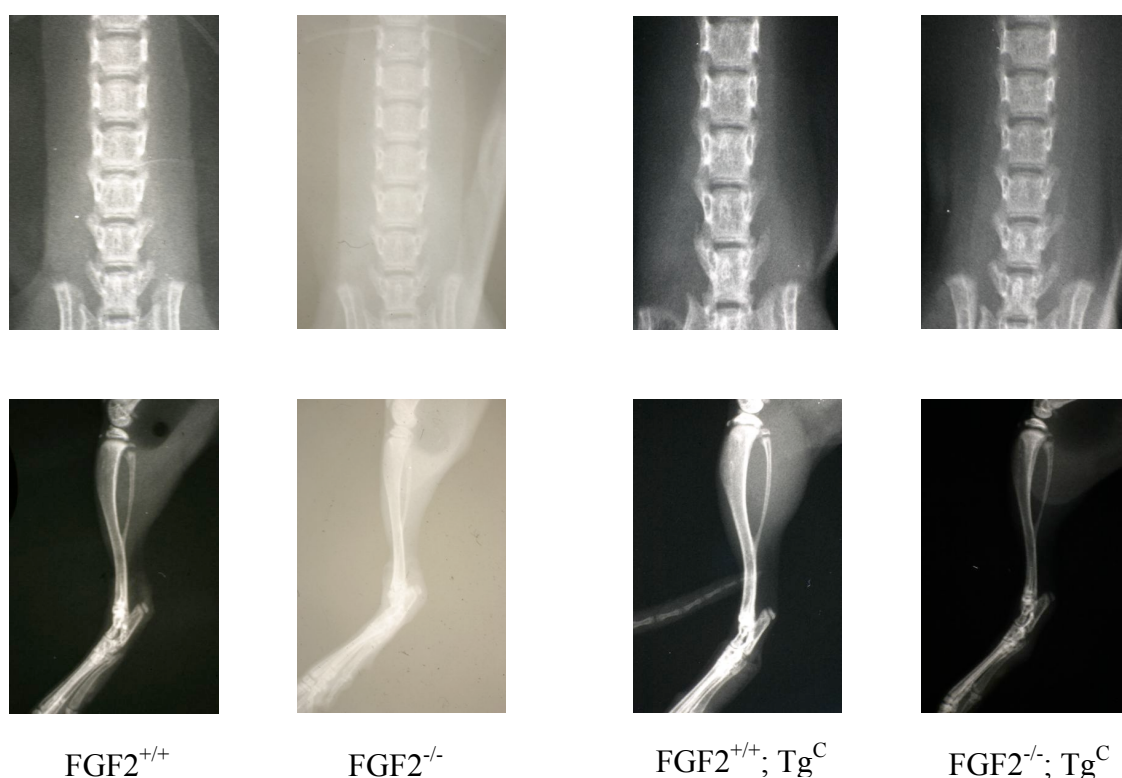


Abb.4: Keine Unterschiede der Röntgendichte. (Kontaktradiographien der Lendenwirbelsäule sowie der Tibiae einen Monat alter weiblicher Mäuse. 35kVp; 2sec Belichtungszeit)

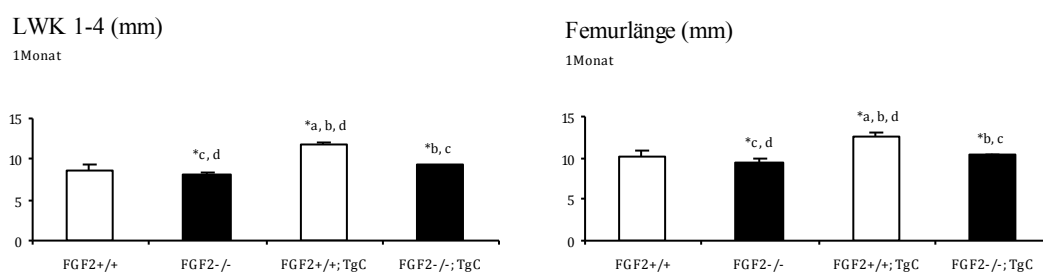


Abb.5: Signifikante Längenunterschiede bei den Lendenwirbelkörpern 1-4 und den Femura im Vergleich der einen Monat alten Tiere. a: gegen $FGF2^{+/+}$, b: gegen $FGF2^{-/-}$, c: gegen $FGF2^{+/+}; Tg^C$, d: gegen $FGF2^{-/-}; Tg^C$, *: $p < 0,05$.

Bei den einen Monat alten Mäusen fanden sich radiologisch keine eindeutigen Unterschiede der Knochendichte im Vergleich der Wirbelsäulen und der Tibiae. Jedoch waren die betreffenden Strukturen bei den Tieren der FGF2 überexprimierenden Kontrollgruppe deutlich größer als allen anderen untersuchten Tieren.

Die ersten vier Lendenwirbelkörper, die zusammen mit der Femurlänge die Körpergröße repräsentieren, waren ebenso wie die Femora bei den Tieren der Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,05$) länger. Außerdem bestanden signifikante Längenunterschiede der untersuchten Knochen im Vergleich beider FGF2 defizienten Gruppen. Diese Strukturen waren bei den $FGF2^{-/-}; Tg^C$ Tieren länger.

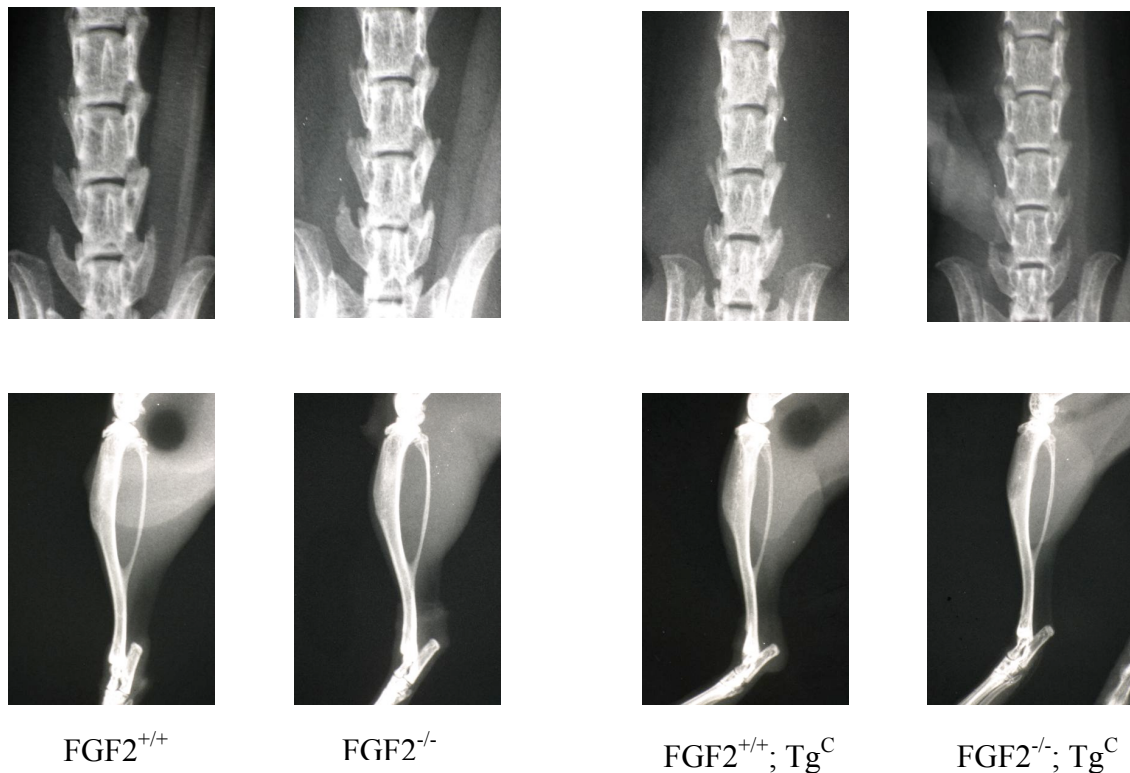


Abb.6: Keine Unterschiede der Röntgendichte in den Wirbelsäulen und Tibiae. Deutlich kleinere Wirbelsäule der $FGF2^{-/-}; Tg^C$ Tiere.

(Kontaktradiographie drei Monate alter weiblicher Mäuse. 35kVp; 2sec Belichtungszeit)

4 Resultate

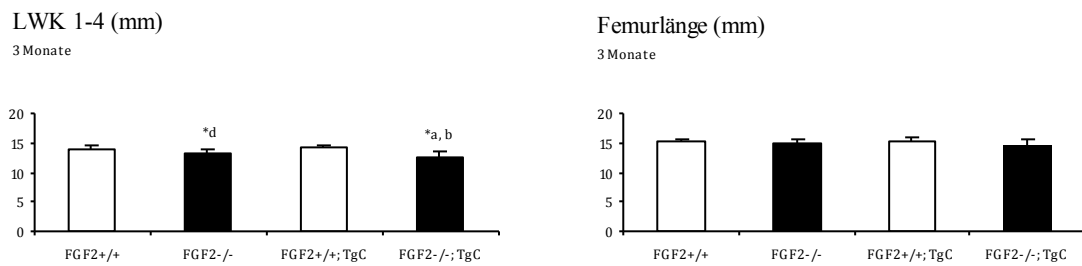


Abb.7: Keine Unterschiede der Femurlängen. Jedoch signifikante Unterschiede im Vergleich Längenvergleich der Lendenwirbelkörper1-4 bei den drei Monate alten Tieren. a: gegen FGF2^{+/+}, b: gegen FGF2^{-/-}, d: gegen FGF2^{-/-}; Tg^C, *: $p < 0,05$.

In der Gruppe der drei Monate alten Tiere fanden sich radiologisch weder in den Tibiae noch in den Wirbelsäulen deutliche Knochendichteunterschiede. Allerdings waren Größenunterschiede erkennbar. Es zeigten sich bezüglich der Lendenwirbelkörperlänge signifikante Unterschiede zwischen Wildtypen und FGF2^{-/-}; Tg^C Tieren sowie zwischen Kontrollgruppe und FGF2^{-/-}; Tg^C Tieren. Im Vergleich der vier Gruppen bestanden hingegen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Femurlängen.

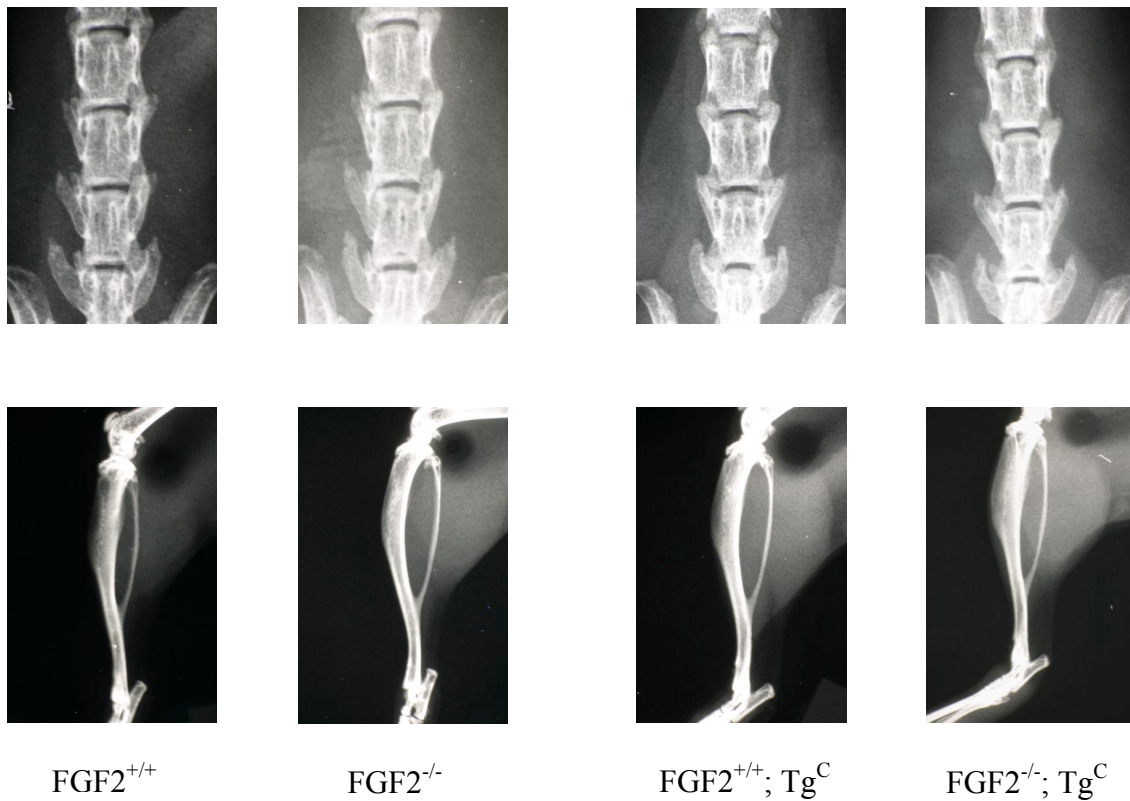


Abb.8: Keine prägnanten Unterschiede der Röntgendichte.
(Kontaktradiographien von sechs Monate alten Mäusen. 35kVp; 2sec Belichtungszeit)

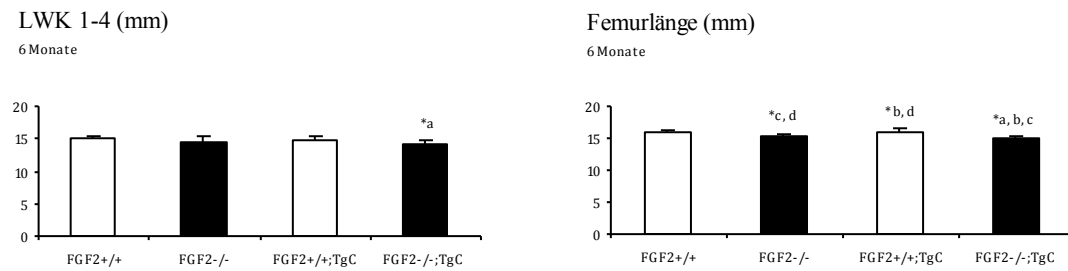


Abb.9: Signifikante Unterschiede im Längenvergleich von Femora und Lendenwirbelkörpern. a: gegen FGF2^{+/+}, b: gegen FGF2^{-/-}, c: gegen FGF2^{+/+}; Tg^C, d: gegen FGF2^{-/-}; Tg^C, *: $p < 0,05$.

Im Vergleich der Kontakt-radiographien zeigten sich weder in den Wirbelsäulen noch in den Tibiae signifikante Unterschiede der Röntgendichte.

Bei den sechs Monate alten Tieren waren signifikante Unterschiede bezüglich der Femurlängen erkennbar. Die Tiere beider Kontrollgruppen besaßen längere Femora als die FGF2^{-/-}; Tg^C Tiere. Zwischen Kontrollgruppen und FGF2 defizienten Mäusen bestanden keine signifikanten Unterschiede.

Zusätzlich waren die gemessenen Lendenwirbelkörper der FGF2^{+/+} Tiere signifikant länger als die der FGF2^{-/-}; Tg^C Tiere. Ansonsten zeigten sich keine weiteren signifikanten Unterschiede bezüglich der Lendenwirbelkörperlänge.

Man kommt zu dem Ergebnis, dass die FGF2 defizienten Mäuse aller untersuchten Altersgruppen kleiner und leichter waren als die entsprechenden Kontrollen. Die transgenen Kontrollen besaßen in jeder Altersgruppe das höchste Gewicht.

Interessanterweise zeigten sich bei den FGF2 defizienten Mäusen trotz zum Teil signifikanter Größenunterschiede im Vergleich zu den Kontrollen bei den drei und sechs Monate alten Tieren keine signifikanten Gewichtsunterschiede.

Bei der vergleichenden Betrachtung von Röntgenbildern muss man berücksichtigen, dass die Sensitivität der Untersuchung bezüglich der Darstellung von Knochenmasseunterschieden sehr gering ist. Faktoren wie Größendifferenzen, unterschiedliche Röntgenbildentwickleraktivitäten sowie die verschiedenen Positionen der Mäuse auf den Röntgenkassetten können das Ergebnis zusätzlich beeinflussen. Um signifikante Unterschiede der ossären Mikroarchitektur zu quantifizieren, folgte die statistische Histomorphometrie unter Verwendung der Histologien von Tibiae und Wirbelkörpern.

4.3 Histologie

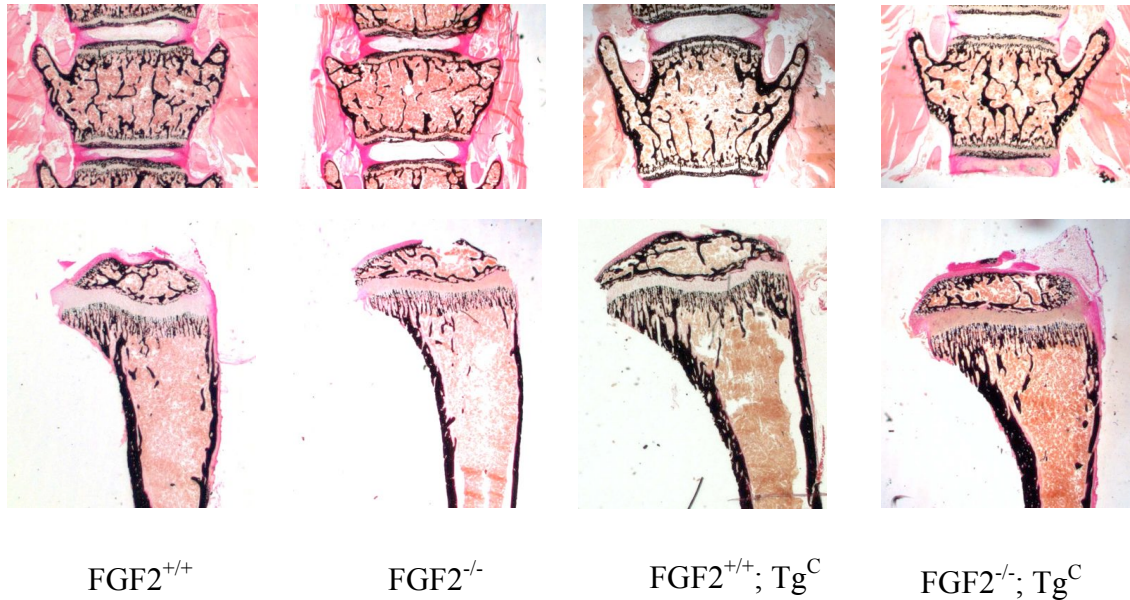


Abb.10: Unterschiede der Knochenmasse in Lendenwirbelkörpern und Tibiae.

(Unentkalkte Histologie, Färbung: Kossa van Gieson, 1,5 fache Vergrößerung, einen Monat alte Mäuse)

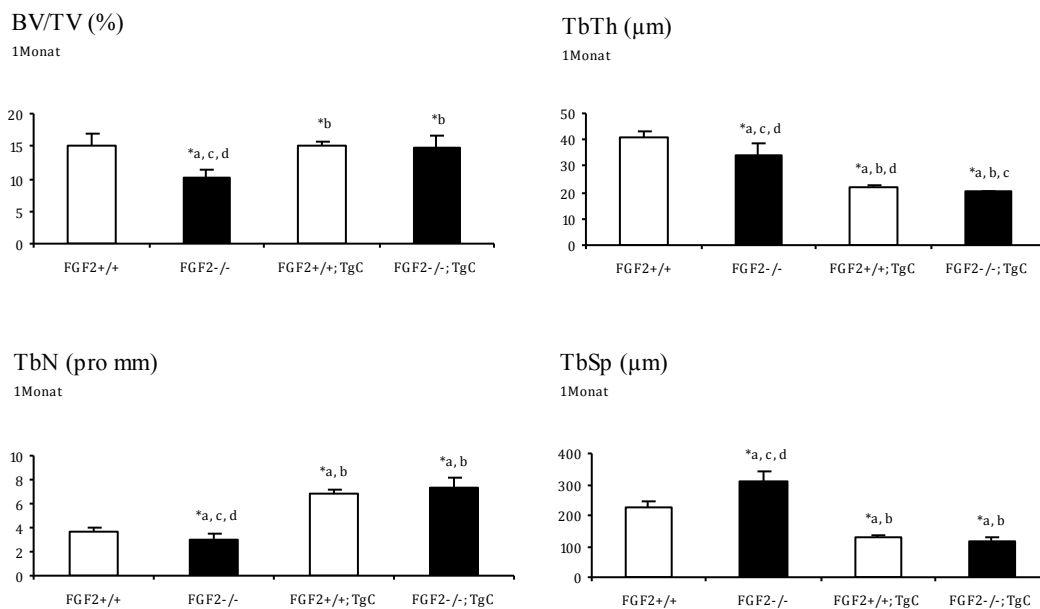


Abb.11: Signifikante Unterschiede aller ermittelten Knochenstrukturparameter.

(Statistische Histomorphometrie der lumbalen Wirbelsäule von einem Monat alten Mäusen. a: gegen $FGF2^{+/+}$, b: gegen $FGF2^{-/-}$, c: gegen $FGF2^{+/+}; Tg^C$, d: gegen $FGF2^{-/-}; Tg^C$, *: $p < 0,05$.)

Die einen Monat alten Mäuse wiesen hinsichtlich ihrer knochenstrukturellen Parameter Knochenvolumen (BV/TV), Anzahl der Trabekel (TbN), Trabekelabstand (TbSp) und Trabekeldicke (TbTh) zahlreiche signifikante Unterschiede auf.

Das Knochenvolumen der FGF2 defizienten Mäuse war im Vergleich mit den anderen drei Gruppen signifikant erniedrigt (BV/TV: FGF2^{+/+}: 15,19%, SD: 1,72; FGF2^{-/-}: 10,12%, SD: 1,12; FGF2^{+/+}; Tg^C: 15%, SD: 0,82; FGF2^{-/-}; Tg^C: 14,83%, SD: 1,85).

Die Trabekel waren bei den Wildtypen signifikant dicker als bei den anderen Gruppen. Allerdings bestanden auch zwischen diesen Gruppen signifikante Unterschiede (TbTh: FGF2^{+/+}: 40,55µm, SD: 2,8; FGF2^{-/-}: 34,44µm, SD: 3,82; FGF2^{+/+}; Tg^C: 22,19µm, SD: 0,37; FGF2^{-/-}; Tg^C: 20,09µm, SD: 0,32). Dafür war die Trabekelanzahl geringer und dementsprechend auch der trabekuläre Abstand größer bei den Wildtypen im Vergleich mit den beiden FGF2 überexprimierenden Gruppen. Die FGF2 defizienten Tiere wiesen analog zu der geringen Knochenmasse eine signifikant erniedrigte Trabekelanzahl und große Abstände auf. Zwischen den FGF2 überexprimierenden Gruppen traten keine Unterschiede dieser Parameter auf.

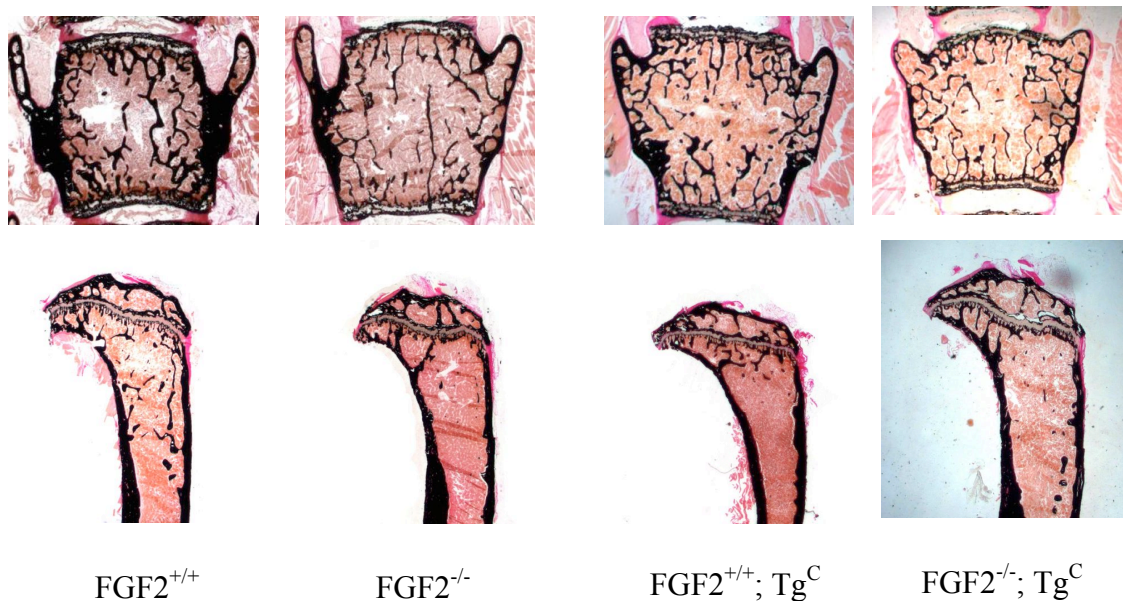
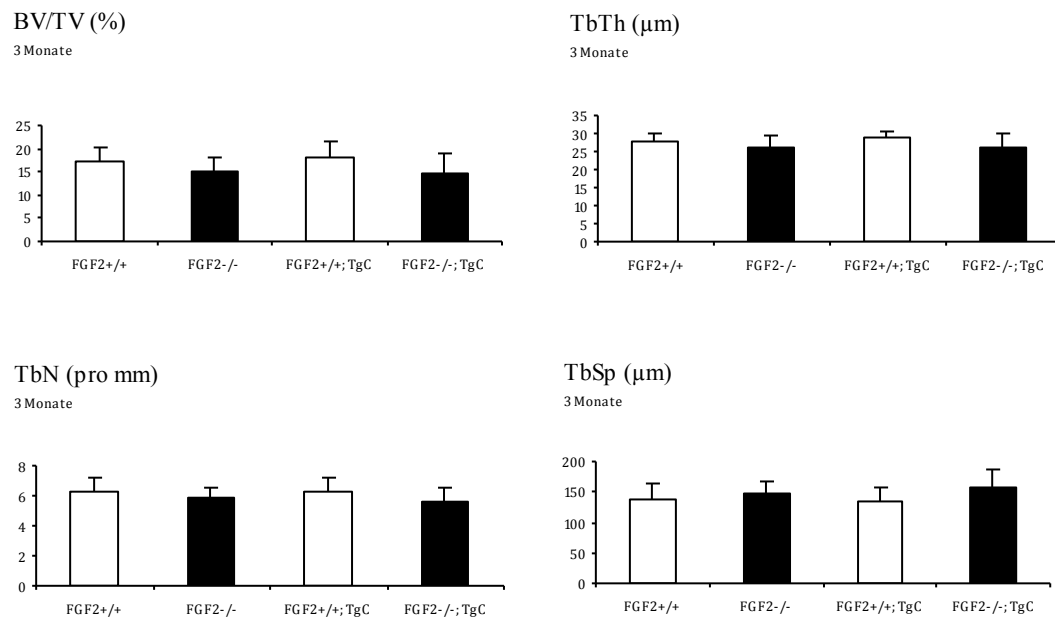


Abb.12: Keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Knochenstruktur.

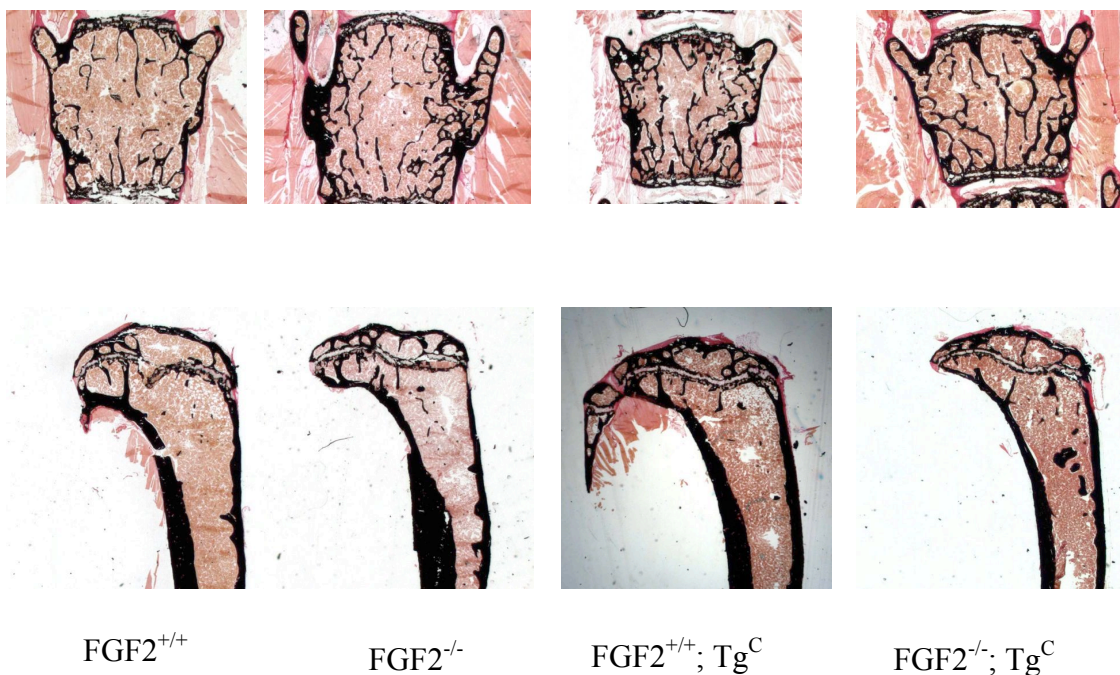
(Unentkalkte Histologie, Färbung: Kossa van Gieson, 1,5 fache Vergrößerung, drei Monate alte Mäuse)

4 Resultate



*Abb.13: Keine signifikante Unterschiede der ossären Mikroarchitektur.
(Statistische Histomorphometrie der lumbalen Wirbelsäule von drei Monate alten Mäusen)*

Die drei Monate alten Tiere wiesen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Knochenstruktur der analysierten Wirbelkörper auf.



*Abb.15: Deutliche Struktur- und Größenunterschiede im Vergleich der Lendenwirbelkörper und Tibiae.
(Unentkalkte Histologie, Färbung: Kossa van Gieson, 1,5 fache Vergrößerung, sechs Monate alte Mäuse)*

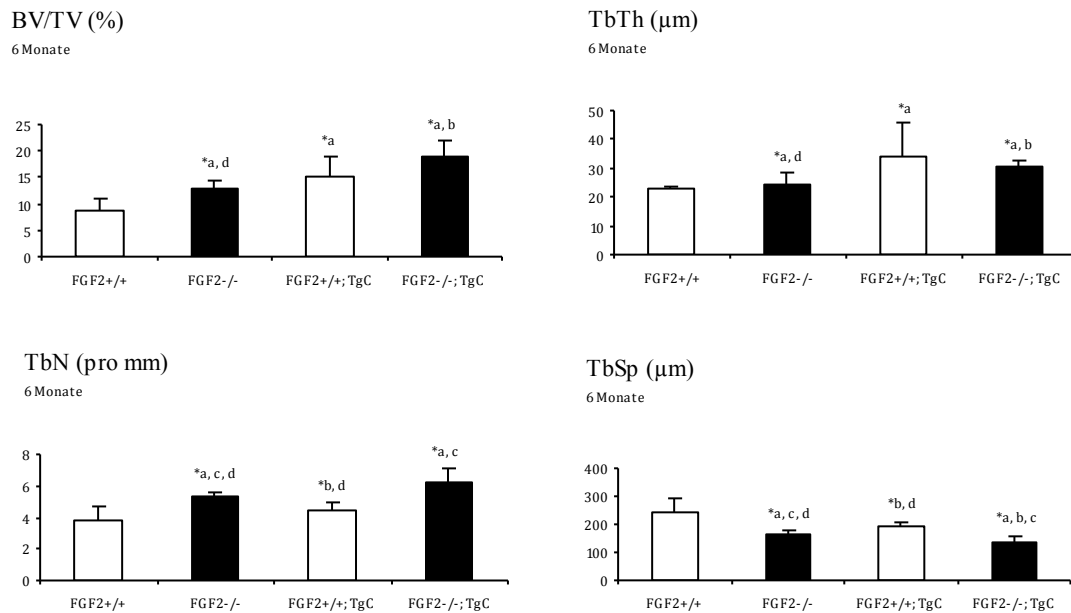


Abb.16: Signifikante Unterschiede aller gemessenen Parameter der ossären Mikroarchitektur.
(Statistische Histomorphometrie der lumbalen Wirbelsäule von sechs Monate alten Mäusen. a: gegen FGF2^{+/+}, b: gegen FGF2^{-/-}, c: gegen FGF2^{+/+}; Tg^C, d: gegen FGF2^{-/-}; Tg^C, *: p<0,05.)

Bei den sechs Monate alten Tieren traten auch bezüglich der einzelnen histomorphologischen Parameter signifikante Unterschiede auf.

Das Knochenvolumen (BV/TV) der Wildtypen war im Vergleich zum Knochenvolumen aller anderen drei Gruppen signifikant geringer. Die FGF2 defizienten Mäuse besaßen im Verhältnis zu den FGF2^{-/-}; Tg^C Tieren ein signifikant niedrigeres Knochenvolumen. Die Trabekel waren bei den Wildtypen signifikant dünner als bei allen anderen Tieren. Auch die FGF2 defizienten Mäuse hatten signifikant dünnere Trabekel als die FGF2^{-/-}; Tg^C Tiere.

Die Wildtypen besaßen die geringste Anzahl an Trabekel und aufgrund der hinzukommenden geringsten Dicken auch den größten trabekulären Abstand. Im Vergleich der Wildtypen mit FGF2^{-/-} und FGF2^{-/-}; Tg^C Tieren zeigten sich bei diesen jeweils eine signifikant erhöhte Anzahl an Trabekeln und ein geringerer trabekulärer Abstand.

Insgesamt zeigten die FGF2^{-/-}; Tg^C Mäuse die meisten Trabekel und besaßen auch den geringsten trabekulären Abstand. Dies spiegelte sich in den Knochenmassewerten deutlich wieder. Im Vergleich von Trabekelanzahl und -abstand zeigten sich auch zwischen den zwei transgenen Gruppen signifikante Unterschiede.

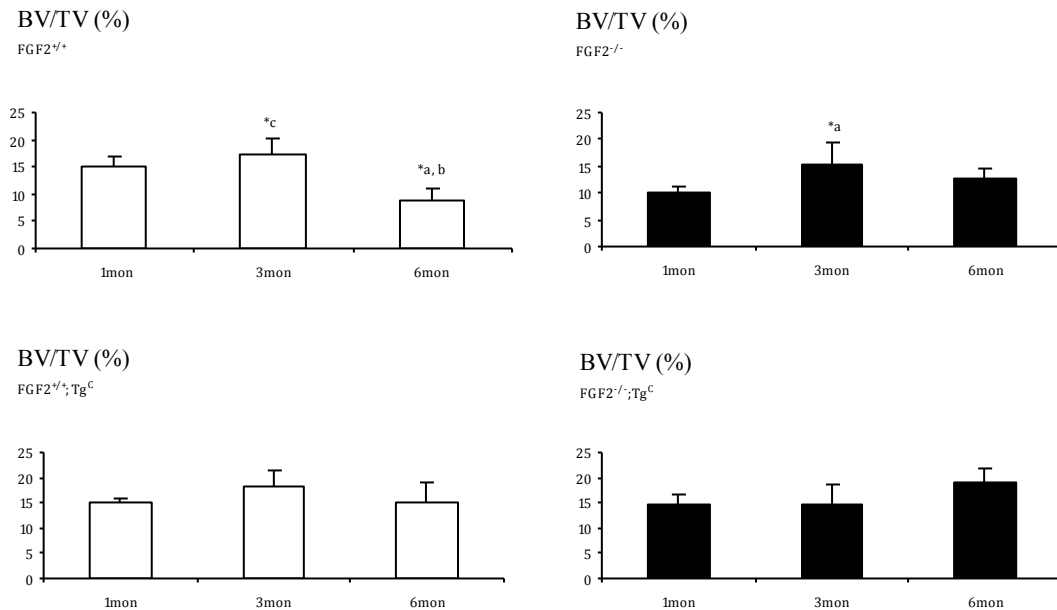


Abb.14: Vergleich der Knochenvolumina gleicher Genotypen unterschiedlichen Alters (einen Monat bis sechs Monate) mit zum Teil signifikanten Unterschieden. a: gegen einen Monat alte Tiere, b: gegen drei Monate alte Tiere, c: gegen sechs Monate alte Tiere, * : $p < 0,05$.

Im zeitlichen Vergleich der unterschiedlichen Genotypen zeigten alle Tiere mit Ausnahme der FGF2^{-/-}; Tg^C Tiere zunächst eine z. T. signifikante Zunahme (FGF2^{-/-}) der Knochenmasse. Im Alter reduzierte sich diese dann teilweise signifikant (FGF2^{+/+}).

Allerdings wiesen nur die FGF2^{+/+} Tiere im Alter von sechs Monaten weniger Knochenmasse als im Alter von einem Monat auf.

Die FGF2^{-/-}; Tg^C Mäuse verloren zunächst sehr gering an Knochenmasse [BV/TV: 14,83% (einen Monat); 14,71% (drei Monate)]. Anschließend zeigte sich jedoch eine ausgeprägte Zunahme der Knochenmasse.

Die zentrale Expression von FGF2 scheint im Alter zumindest einem Knochenmasseverlust vorzubeugen (FGF2^{+/+}; Tg^C) beziehungsweise sogar für eine Erhöhung (FGF2^{-/-}; Tg^C) mitverantwortlich zu sein.

4.4 Serum- und Urinanalytik

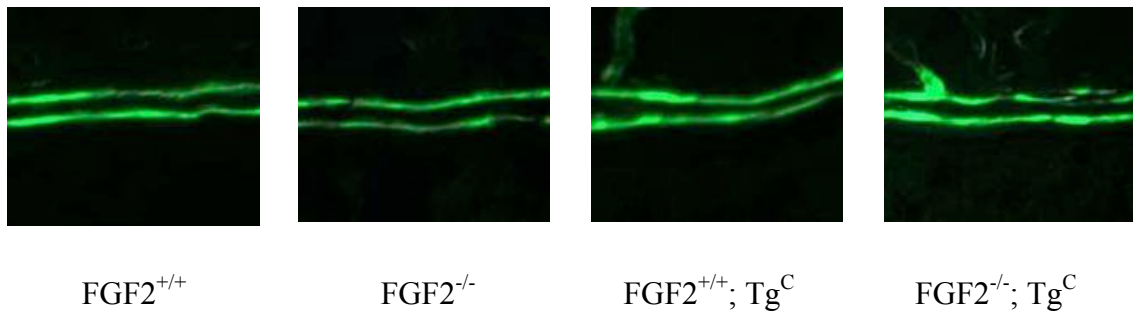


Abb.17: Keine Unterschiede der Knochenformation.

(Dynamische Histomorphometrie an drei Monate alten Mäusen. 12µm Schnitte der Tibiae, fotografiert mit 5 facher Vergrößerung und einer Belichtungszeit von 23.000ms.)

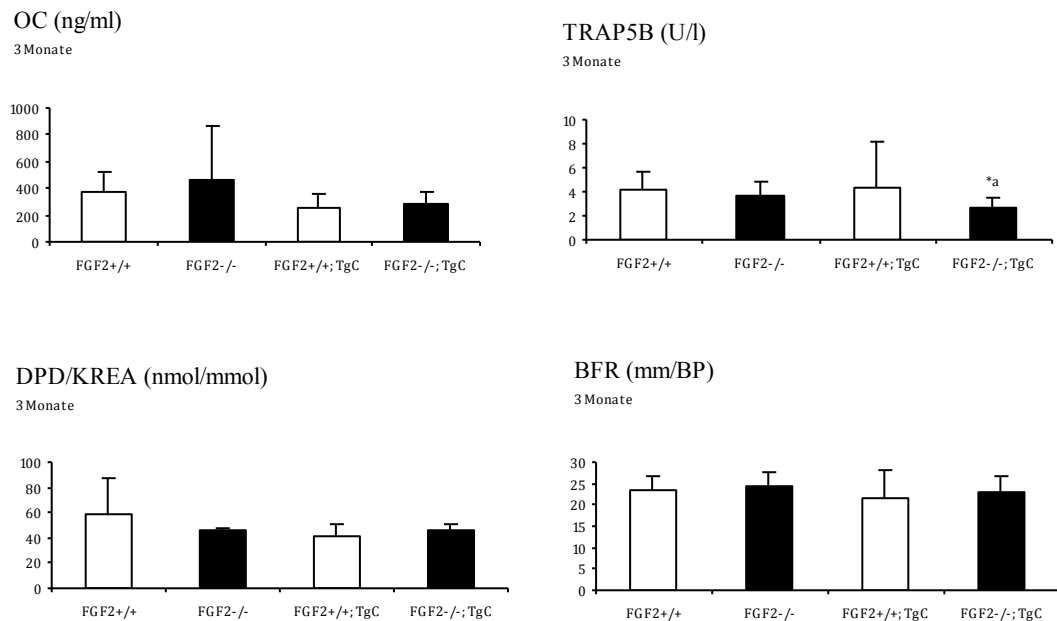


Abb.18: Die Aktivität der resorbierenden Osteoklasten der FGF2^{-/-}; Tg^C Mäuse ist im Vergleich zu der FGF2^{+/+} Kontrolle signifikant erniedrigt. Es gibt keine weiteren signifikanten Aktivitätsunterschiede. a: gegen FGF2^{+/+}, *: $p < 0,05$.

Die Untersuchung der Osteoblasten- und der Osteoklastenaktivität, sowie die indirekte Knochenresorptionsbestimmung und die Knochenformationsrate zeigten bei den drei Monate alten Mäusen insgesamt keine signifikanten Unterschiede. Die Osteoklastenaktivität der Wildtypen war im Vergleich zu den FGF2 defizienten Mäuse signifikant erhöht (FGF2^{+/+}: 4,169, SD: 1,537; FGF2^{-/-}; Tg^C: 2,619, SD: 0,844).

Diese Daten stimmten insgesamt mit der sehr homogenen Knochenvolumenverteilung in dieser Altersgruppe gut überein.

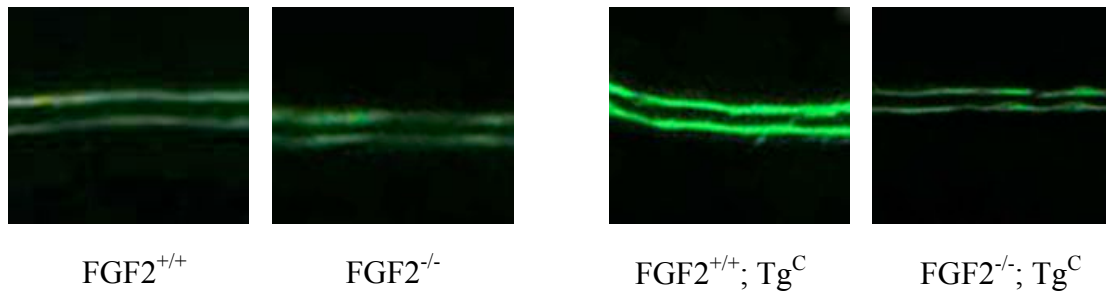


Abb.19: Keine Unterschiede der Knochenformationsrate.

(Dynamische Histomorphometrie an sechs Monate alten Mäusen. 12µm Schnitte der Tibiae, fotografiert mit 5 facher Vergrößerung und einer Belichtungszeit von 23.000ms.)

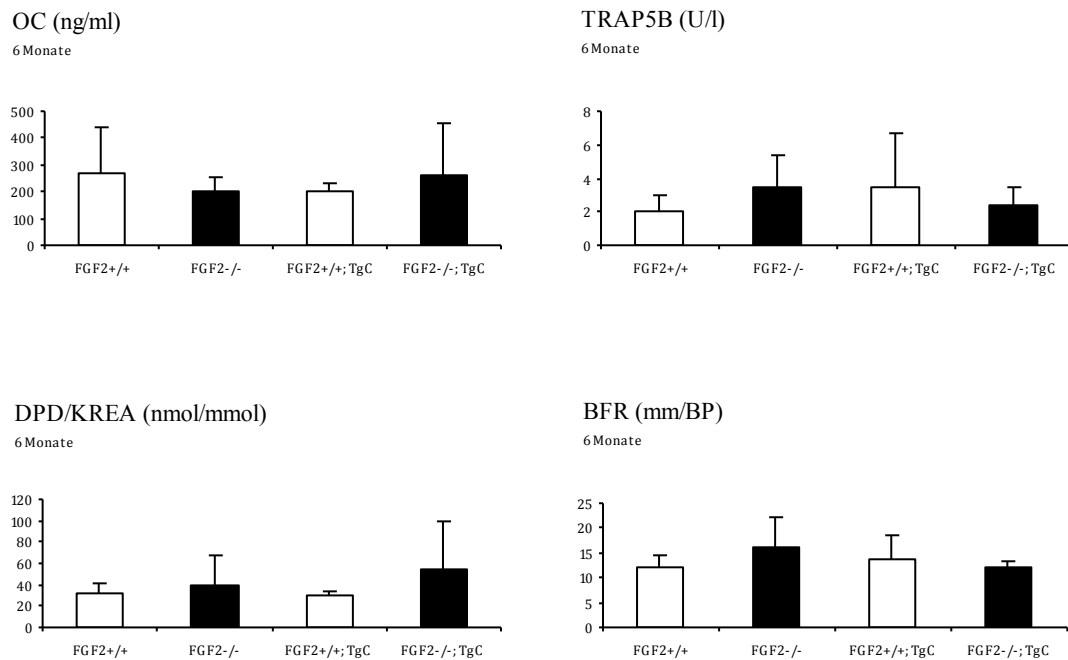


Abb.20: Keine Aktivitätsunterschiede von Osteoblasten und Osteoklasten, sowie der Knochenresorption und -formation.

Auch bei den sechs Monate alten Tieren gab es bezüglich der vier untersuchten Parameter keine signifikanten Unterschiede. Im Gegensatz zu den drei Monate alten Mäusen wiesen die sechs Monate alten Tiere jedoch signifikante Unterschiede bezüglich ihrer Knochenvolumina auf, so dass hier andere nicht erfasste Faktoren einen entscheidenden Einfluss haben müssen.

4.4 Biomechanik

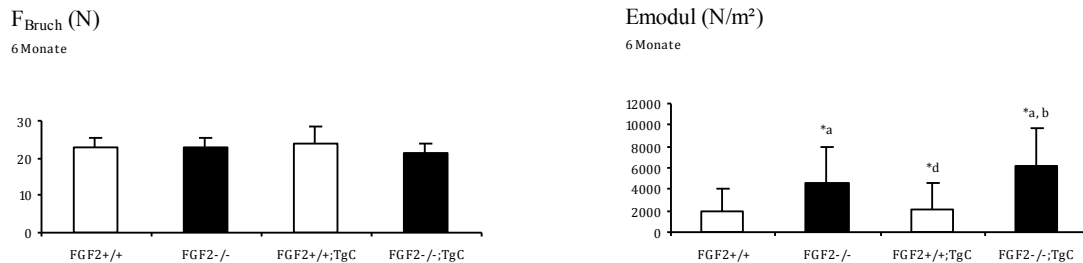


Abb.21: Biomechanische Untersuchungen am Femur. Keine Unterschiede der biomechanischen Kompetenz bezüglich der Bruchkraft. Jedoch signifikante Unterschiede des Materialwiderstandes bei sechs Monate alten Tiere. a: gegen FGF2^{+/+}, b: gegen FGF2^{-/-}, d: gegen FGF2^{-/-}; Tg^C, *: $p < 0,05$.

Die Untersuchung der Femora im 3-Punkt Biegeversuch dient der Darstellung möglicher physiologischer Konsequenzen aufgrund der histomorphometrisch ermittelten gesteigerten Knochenmasse aller Gruppen im Vergleich mit den Wildtypen. Dies spiegelte sich allerdings nicht in den für die Bruchkraft ermittelten Ergebnissen wieder. Dafür zeigten sich signifikante Unterschiede bei der Untersuchung des Materialwiderstandes gegen die provozierte Verformung des Knochens. Die Femora der Wildtypen wiesen signifikant niedrigere Widerstände als bei FGF2 defizienten Gruppen auf. Des Weiteren waren die Knochen der FGF2^{+/+}; Tg^C Mäuse nicht so widerstandsfähig wie die der FGF2^{-/-}; Tg^C Mäuse.

4.5 Veraschung

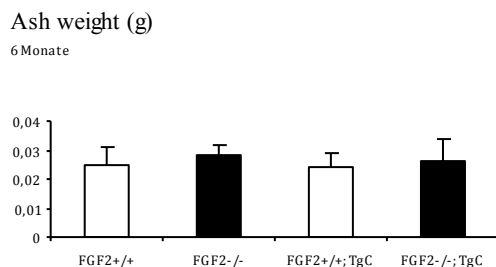


Abb.22: Keine Unterschiede des Ash weights der sechs Monate alten Mäuse.

Bei der Untersuchung des Ash weights ergaben sich keine signifikanten Unterschiede des Knochenmineralisationsgrads zwischen den unterschiedlichen Gruppen.

5 Diskussion

5.1 Zunahme der Knochenmasse bei FGF2 Defizienz

FGF2 defiziente Mäuse wiesen bei den knochenhistomorphometrischen Untersuchungen im Alter von einem Monat und drei Monaten keinen Knochenphänotyp auf. Erst im Alter von sechs Monaten zeigte sich eine signifikante Zunahme der Knochenmasse. Es handelt sich also um einen Remodelingphänotyp. Das physiologisch bestehende Gleichgewicht zwischen Knochenauf- und abbau hat sich dementsprechend verändert, dass es im Phänotyp also dem Erscheinungsbild der Mäuse manifestiert. Diese Ergebnisse bestätigen zumindest teilweise die erste zu überprüfende Hypothese. Im Senium scheint der erniedrigte Sympathikotonus eine Zunahme der Knochenmasse zu bewirken. Allerdings widersprechen diese Ergebnisse den Forschungsergebnissen der Arbeitsgruppe von Hurley ⁵⁵, die 2000 im J Clin Invest publizierten, dass eine FGF2 Defizienz zu einer erniedrigten Knochenmasse mit reduzierter Trabekelstruktur führt. Von dieser Arbeitsgruppe wurden männliche Tiere im Alter von 4,5 und acht Monaten untersucht. Die ermittelten Daten wurden durch einen niedrigen Turnover des Knochenstoffwechsels erklärt, der aus einem Defekt der Osteoblasten resultieren soll.

Jedoch konnten unsere Serum- und Urinanalysen keinen Hinweis für einen niedrigen Turnover bei FGF2 defizienten Mäusen liefern. Dies spiegelt sich erwartungsgemäß auch in den Knochenmassedaten wieder.

Die Frage, ob der erniedrigte Sympathikotonus oder andere Effekte vom FGF2 die Knochenmasse beeinflussen, kann anhand unserer Ergebnisse nicht abschliessend geklärt werden.

Es ist jedoch zumindest diskussionswürdig, ob die erhobenen Daten problemlos vergleichbar sind. Die Arbeitsgruppe um Hurley ⁵⁵ hat im Gegensatz zu uns männliche Tieren in unterschiedlichen Altersgruppen und mit anderem genetischen Background (Black/Swiss/129SV) analysiert. Zudem wurden einige der von uns analysierten Tiere zur Zucht verwendet mit fraglichen Auswirkungen auf die Knochenmasse.

Die Frage, ob FGF2 und Leptin agonistisch den Sympathikotonus und damit u.a. die Knochenmasse regulieren, kann man mit den vorliegenden Daten nicht beantworten.

Trotz der im Senium signifikanten Zunahme der Knochenmasse zeigen sich keine signifikanten Gewichtsunterschiede. Bei einem Leptinmangel und damit einem erhöhten Sympathikotonus sowie daraus resultierender Knochenmassezunahme wäre theoretisch eine Gewichtszunahme zu erwarten. Diese Hypothese wurde jedoch bereits durch die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Karsenty⁷³ widerlegt. Sie zeigten, dass die Veränderungen der Knochenmasse unabhängig von Körpergewicht bzw. Fettmasse reguliert werden.

Andere Aspekte sprechen ebenfalls gegen die alleinige Rolle von FGF2 als zentraler Regulator der Knochenmasse. Eine Gruppe um Behr⁷ zeigte z.B., dass eine lokale FGF2 Applikation in Form eines FGF2 getränkten Kollagenschwammes zu einer signifikant besseren Knochenheilung als bei einer alleinigen Kollagenschwammapplikation führt. Ähnliche Ergebnisse erhielten Santana und Trackman⁶⁹, die durch FGF2 behandelte Membranen eine nahezu identische Frakturheilung bei Mäusen mit Diabetes mellitus wie bei der gesunden Vergleichsgruppe mit erzielen konnten.

Man kann also davon ausgehen, dass wie in vielen anderen biologischen Systemen es sich auch bei der Regulation der Knochenmasse um ein multifaktorielles System handelt mit u.a. unterschiedlichen Regulationsmechanismen von FGF2.

Weitere Studien zeigen, dass ein mittels Isoproterenolsubstitution ($\beta 1/\beta 2$ -Adrenoreceptoragonist) erhöhter Sympathikotonus zu einer Reduktion der Knochenmasse führt.^{47; 58} Allerdings gibt es unterschiedliche Vermutungen wie es zu dieser Abnahme kommt. Analog Karsenty⁷³ wäre eine Inhibierung der Knochenformation durch eine verringerte Osteoblastenaktivität bei konstanter Knochenresorption zu erwarten. Isoproterenol würde erwartungsgemäss zum einen die Expression von Cbfa (ein Transkriptionsfaktor, der die Osteoblastenfunktion kontrolliert) zum anderen die Expression von $\alpha 1$ -Kollagen (ein Gen, welches die Hauptkomponente der extrazellulären Knochenmatrix kodiert) reduzieren.¹⁹ Dadurch wäre mit Isoproterenol eine Regulation der Osteoblasten sowie der Knochenmatrixsynthese also der Knochenformation möglich. Gemäss Kondo wiederum führt Isoproterenol vor allem durch vermehrte Knochenresorption und nur in sehr hohen Dosen auch durch verminderte Knochenformation zu einem Verlust an Knochenmasse.⁴⁷ Nagao postuliert, dass es durch vermehrte Osteopontinexpression (ein Zytokin, welches Bestandteil der extrazellulären Knochenmatrix ist)

zu einer Abnahme der Knochenmasse kommt, da es bei Mäusen, die kein Osteopontin exprimieren können, zu deutlich geringeren Knochenmasseverlusten kommt.⁵⁸ Es wird deutlich, dass auch hier noch viele Unklarheiten über Regulationsmechanismen bestehen.

5.2 Auswirkungen der zentralen FGF2 Substitution bei FGF2 defizienten Tieren

Im Gegensatz zur erwarteten Normalisierung des Knochenphänotypes wiesen die sechs Monate alten FGF2 überexprimierenden Tiere im Vergleich zu den FGF2^{+/+} Tieren eine signifikant erhöhte Knochenmasse auf. Auch die Knochenmasse der FGF2^{+/+}; Tg^C Tiere war im Vergleich mit den Wildtypen und FGF2^{-/-} erhöht. Allerdings war der Unterschied nur zu den Wildtypen signifikant. Dies deutet daraufhin, dass eine Normalisierung des Knochenphänotypes bei FGF2 defizienten Mäusen durch eine zentrale Überexpression nicht erreichbar ist.

Es stellt sich die Frage, wodurch es zu diesem unerwarteten Phänomen kommt. Die Analysen der Knochenformationsparameter dienen kaum zur Beantwortung, da außer bezüglich der verminderten Osteoklastenaktivität bei drei Monate alten FGF2^{-/-}; Tg^C Tieren keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden konnten. Sicherlich wäre auch hier eine Überprüfung des Knochenphänotypes im Alter von zwölf Monaten sinnvoll.

Unklar bleibt jedoch dann weiterhin, warum es erst im Alter zu signifikanten Zunahme der Knochenmasse kommt. Denn im Alter von einem Monat und drei Monaten zeigen sich im Vergleich zu den Wildtypen keinerlei signifikante Unterschiede der Knochenmasse.

Eine weitere Schwierigkeit ist Wertung der gewonnenen Daten aufgrund der Verwendung eines wnt1 Promotor vermittelnden chicken Transgen. Welche Auswirkungen dies auf die Resultate hat, ist nicht suffizient zu beantworten. Jedoch wurde bei einer transgenen Überexpression humaner FGF2 cDNA in einem Mausmodell Zwergwuchs ausgelöst durch verfrühten Schluss der Wachstumsfugen. Die untersuchten Tiere im Alter von einem bis sechs Monaten wiesen im Vergleich mit nicht transgenen Mäusen eine signifikant erniedrigte Knochenmineralisation auf.⁷⁰ Dies wiederum wirft eine weitere Fragen auf: In wieweit sind die gewonnenen Daten auf den Menschen übertrag- und nutzbar?

Sicherlich können die Ergebnisse zu unserem Verständnis der Knochenmasseregulation beitragen, aktuell gibt es jedoch noch viele offene Fragen, die zuvor beantwortet werden müssen. Zum besseren Verständnis wären weitere Experimente z.B. zur Beantwortung der Frage, ob FGF2 Tg nur zentral oder auch in Osteoblasten und Chondrocyten exprimiert wird, denkbar. Mögliche neue Erkenntnisse könnten eventuell auch durch Untersuchungen von Tieren anderer Altersgruppen oder Geschlechtes gewonnen werden.

Die Physiologie der Knochenmasseerhaltung und genaue Kenntnisse über die Signalwege von Gehirn zum Knochen zu erlangen, werden weitere Untersuchungen zeigen müssen. Denn nur dann werden wir in der Lage sein aktuell nicht suffizient therapierbare Knochenstoffwechselkrankheiten durch Beeinflussung der entscheidenden Parameter aktiv zu beeinflussen und damit nicht nur zu verlangsamen, sondern vorzubeugen und auch zu heilen.

6 Zusammenfassung

Remodeling bezeichnet den balancierten Abbau und Wiederaufbau von Knochen durch Osteoklasten und Osteoblasten. Die Balance dieses Systems ist essentiell für die physiologische Funktion des Skelettsystems. Krankheiten wie Osteoporose oder Osteopetrose werden durch Störungen des Systems hervorgerufen.

In dieser Arbeit wurden Auswirkungen der FGF2 Defizienz bzw. Überexpression auf die Knochenstrukturen analysiert.

Dafür wurde im ersten Teil ein Mausmodell eingesetzt bei dem selektiv das FGF 2 Gen inaktiviert wurde. Anhand dieses Modells konnte gezeigt werden, dass ein erniedrigter Sympathikotonus im Senium zu einer Zunahme der Knochenmasse führt. Dieses Ergebnis widersprach den zuvor publizierten Ergebnissen von Hurley.⁵⁵

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Mausmodell verwendet, bei dem FGF2 durch den gehirnspezifischen *wnt1* Promotor vermittelt lokal überexprimiert wurde. Dabei wiesen die FGF2 überexprimierenden sowie die transgenen Tiere im Senium eine deutlich erhöhte Knochenmasse, im Gegensatz zur erwarteten Normalisierung des Knochenphänotypes, auf. Durch die Analyse der Knochenformationsparameter konnte dieses unerwartete Phänomen nicht beantwortet werden. FGF2 scheint nicht nur zentral sondern auch lokal die Knochenmasse zu beeinflussen. Die genauen Regulationsmechanismen sind weiterhin unklar und wie bereits zuvor erwähnt, ergaben sich aus der Analyse der Knochenformationsparameter keine weiteren Antworten, so dass z.B. Zellkulturen zum weiteren Verständnis notwendig sind. Trotzdem können die Ergebnisse im Rahmen mit weiteren Untersuchungen etwas zu unserem Verständnis der Knochenmasseregulation und ihrer Aufrechterhaltung beitragen und sind möglicherweise in Zukunft für den Menschen zur Prävention und Therapie von Knochenstoffwechselerkrankungen nutzbar.

7 Literaturverzeichnis

1. Abraham, J.A., Mergia, A., Whang, J.L., Tumolo, A., Friedman, J., Hjerrild, K.A., Gospodarowicz, D., Fiddes, J.C. (1986) Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science* 233, 545-8.
2. Abrams, S.A. (2001) Calcium turnover and nutrition through the life cycle. *Proc Nutr Soc* 60, 283-9.
3. Amann, K., Faulhaber, J., Campean, V., Balajew, V., Dono, R., Mall, G., Ehmke, H. (2005) Impaired myocardial capillargenesis and increased adaptive capillary growth in FGF2-deficient mice. *Lab Invest* 1-9.
4. Amling, M., Schilling, A.F., Haberland, M., Rueger, J.M. (2001) Leptin: Faktor in der zentralnervösen Regulation der Knochenmasse. *Der Orthopäde* 30, 418-424.
5. Ay, H., Ay, I., Koroshetz, W.J., Finklestein, S.P. (1999) Potential usefulness of basic fibroblast growth factor as a treatment for stroke. *Cerebrovasc Dis* 9, 131-5.
6. Baron, R., Rawadi, G., Roman-Roman, S. (2006) Wnt signaling: a key regulator of bone mass. *Curr Top Dev Biol* 76, 103-27.
7. Behr, B., Panetta, N.J., Longaker, M.T., Quarto, N. (2010) Different endogenous threshold levels of Fibroblast Growth Factor-ligands determine the healing potential of frontal and parietal bones. *Bone* 47, 281-94.
8. Benninghoff, A., Drenckhahn, D., (2003), 16. Auflage, *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. Band 1. Urban & Fischer.
9. Blair, H.C., Zaidi, M. (2006) Osteoclastic differentiation and function regulated by old and new pathways. *Rev Endocr Metab Disord* 18.

10. Bodine, P.V., Komm, B.S. (2006) Wnt signaling and osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord* 8.
11. Buckwalter, J.A., Cooper, R.R. (1987) Bone structure and function. *Instr Course Lect* 36, 27-48.
12. De Baat, P., Heijboer, M.P., de Baat, C. (2005) Development, physiology and cell activity of bone. *Ned Tijdschr Tandheelkd* 112, 258-63.
13. Cashman, K.D. (2002) Calcium intake, calcium bioavailability and bone health. *Br J Nutr* 87, 169-77.
14. Chikazu, D., Katagiri, M., Ogasawara, T., Ogata, N., Shimoaka, T., Takato, T., Nakamura, K., Kawaguchi, H. (2001) Regulation of osteoclast differentiation by fibroblast growth factor 2: simulation of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor expression in osteoblasts and inhibition of macrophage colony-stimulating factor function in osteoclast precursors. *J Bone Miner Res* 16, 2074-81.
15. Cirmanová, V., Bayer, M., Stárka, L., Zajícková, K. (2008) The effect of leptin on bone: an evolving concept of action. *Physiol Res.* 57, 143-151.
16. Dono, R. (2003) Fibroblast growth factors as regulators of central nervous system development and function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284, 867-881.
17. Dono, R., Texido, G., Dussel, R., Ehmke, H., Zeller, R. (1998) Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice. *The EMBO Journal* 17, 4213-4225.
18. Dono, R., Faulhaber, J., Galli, A., Zuniga, A., Volk, T., Texido, G., Zeller, R., Ehmke, H. (2002) FGF2 signaling is required for the development of neuronal

- circuits regulating blood pressure. *Ultra Rapid Communication Circ Res* 90: E5-E10.
19. Ducy, P., Starbuck, M., Priemel, M., Shen, J., Pinero, G., Geoffroy, V., Amling, M., Karsenty, G. (1999) A *Cbfa1*-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev* 13, 1025-1036.
20. Ducy, P., Karsenty, G. (2000) The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int* 57, 2207-14.
21. Ducy, P., Schinke, T., Karsenty, G. (2000) The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 289, 1501-4.
22. Dupree, M.A., Pollack, S.R., Levine, E.M., Laurencin, C.T. (2006) Fibroblast growth factor 2 induced proliferation in osteoblasts and bone marrow stromal cells: a whole cell model. *Biophys J* 15, 3097-112.
23. Echelard, Y., Vassileva, G., McMahon, A.P. (1994) Cis-acting regulatory sequences governing Wnt-1 expression in the developing mouse CNS. *Development* 120, 2213-2224.
24. Eckenstein, F.P. (1994) Fibroblast growth factors in the nervous system. *J Neurobiol* 25, 1467-80.
25. Eleftheriou, F., Ahn, J.D., Takeda, S., Starbuck, M., Yang, X., Liu, X., Kondo, H., Richards, W.G., Bannon, T.W., Noda, M., Clement, K., Vaisse, C., Karsenty, G. (2005) Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature* 434, 514-20.
26. Flynn, A. (2003) The role dietary calcium in bone health. *Proc Nutr Soc* 62, 851-8.
27. Ford-Perriss, M., Abud, H., Murphy, M. (2001) Fibroblast growth factors in the

- developing central nervous system. Clin Exp Pharmacol Physiol 28, 493-503.
28. Fujiwara, Y., Uesugi, M., Saito, T. (2005) Down regulation of basic fibroblast growth factor production from cartilage by excessive mechanical stress. J Orthop Sci 10, 608-13.
29. Fukushima, Y., Byers, M.G., Fiddes, J.C., Shows, T.B. (1990) The human basic fibroblast growth factor gene (FGFB) is assigned to chromosome 4q25. Cytogenet Cell Genet 54, 159-60.
30. Goldfarb, M. (2005) Fibroblast growth factor homologous factors: evolution, structure, and function. Cytokine Growth Factor Rev 16, 215-20.
31. Gomez-Pinilla, F., Cummings, B.J., Cotman, C.W. (1990) Induction of basic fibroblast growth factor in Alzheimer's disease pathology. Neuroreport 1, 211-4.
32. Gritti, A., Parati, E.A., Cova, L., Frolichsthal, P., Galli, R., Wanke, E., Faravelli, L., Morassutti, D.J., Roisen, F., Nickel, D.D., Vescovi, A.L. (1996) Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. J Neurosci 16, 1091-100.
33. Gruber, R. (2010) Osteoporosetherapie und Frakturheilung. J Mineral Stoffwechs 17, 6-10.
34. Hakeda, Y., Kumegawa, M. (1991) Osteoclasts in bone metabolism. Kaibogaku Zasshi 66, 215-25.
35. Hardikar, A.A., Marcus-Samuels, B., Geras-Raaka, E., Raaka, B.M., Gershengorn, M.C. (2003) Human pancreatic precursor cells secrete FGF2 to stimulate clustering into hormone-expressing islet-like cell aggregates. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 7117-22.

36. Hart, A.W., Baeza, N., Apelqvist, A., Edlund, H. (2000) Attenuation of FGF signaling in mouse beta-cells leads to diabetes. *Nature* 408, 864-8.
37. Hurley, M.M., Okada, Y., Xiao, L., Tanaka, Y., Ito, M., Okimoto, N., Nakamura, T., Rosen, C.J., Doetschman, T., Coffin, J.D. (2006) Impaired bone anabolic response to parathyroid hormone in *Fgf2*^{-/-} and *Fgf2*^{+/-} mice. *Biochem Biophys Res Commun* 341, 989-94.
38. Ito T, Sawada R, Fujiwara Y, Tsuchiya T. (2008) FGF-2 increases osteogenic and chondrogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells by inactivation of TGF-beta signaling. *Cytotechnology* 56(1):1-7.
39. Jakob, F., Pendl, G. (2010) Knochenfestigkeit und RANKL-Blockade- Neue Präklinische Daten. *J Miner Stoffwechs* 17, 25-27.
40. Jaye, M., Howk, R., Burgess, W., Ricca, G.A., Chiu, I.M., Ravera, M.W., O'Brien, S.J., Modi, W.S., Maciag, T., Drohan, W.N. (1986) Human endothelial cell growth factor: cloning, nucleotide sequence, and chromosome localization. *Science* 233, 541-5.
41. Jimi, E., Nakamura, I., Amano, H., Taguchi, Y., Tsurukai, T., Tamura, M., Takahashi, N., Suda, T. (1996) Osteoclast function is activated by osteoblastic cells through a mechanism involving cell-to cell contact. *Endocrinology* 137, 2187-90.
42. Jimi, E., Shuto, T., Ikebe, T., Jingushi, S., Hirata, M., Koga, T. (1996) Basic fibroblast growth factor inhibits osteoclast-like cell formation. *J Cell Physiol* 168, 395-402.
43. Jung, J., Zheng, M., Goldfarb, M., Zaret, K.S. (1999) Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* 284, 1998-2003.

44. Karsenty, G. (2000) The central regulation of bone remodeling. *Trends Endocrinol Metab* 11, 437-9.
45. Katagiri, T., Takahashi, N. (2002) Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis* 8, 147-59.
46. Kawaguchi, H., Chikazu, D., Nakamura, K., Kumegawa, M., Hakeda, Y. (2000) Direct and indirect actions of fibroblast growth factor 2 on osteoclastic bone resorption in cultures. *J Bone Miner Res* 15, 466-73.
47. Kondo, H., Togari, A. (2011) Continuous treatment with low-dose β -agonist reduces bone mass by increasing bone resorption without suppressing bone formation. *Calcif Tissue Int* 88, 23-32.
48. Kurokawa, T., Sasada, R., Iwane, M., Igarashi, K. (1987) Cloning and expression of cDNA encoding human basic fibroblast growth factor. *FEBS Lett* 213, 189-94.
49. Lafage-Pochitaloff, M., Galland, F., Simonetti, J., Prats, H., Mattei, M.G., Birnbaum, D. (1990) The human basic fibroblast growth factor gene is located on the long arm of chromosome 4 at bands q26-q27. *Oncogene Res* 5, 241-4.
50. Löffler, G., Petrides, P. E. (2002) *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Verlag.
51. Loveridge, N. (1999) Bone: more than a stick. *J Anim Sci* 77, 190-6.
52. Mattei, M.G., Pebusque, M.J., Birnbaum, D. (1992) Chromosomal localizations of mouse *Fgf2* and *Fgf5* genes. *Mamm Genome* 2, 135-7.
53. Meghji, S. (1992) Bone remodelling. *Br Dent J* 172, 235-42.
54. Mergia, A., Eddy, R., Abraham, J.A., Fiddes, J.C., Shows, T.B. (1986) The genes for basic and acidic fibroblast growth factors are on different human chromosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 138, 644-51.

55. Montero, A., Okada, Y., Tomita, M., Ito, M., Tsurukami, H., Nakamura, T., Doetschman, T., Coffin, J.D., Hurley, M.M. (2000) Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. *J Clin Invest* 105, 1085-93.
56. Mundy, G.R. (1996) Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors. *Clin Orthop* 24-28.
57. Naganawa, T., Xiao, L., Abogunde, E., Sobue, T., Kalajzic, I., Sabbieti, M., Agas, D., Hurley, M.M. (2006) In vivo and in vitro comparison of the effects of FGF-2 null and haplo-insufficiency on the bone formation in mice. *BBRC* 339, 490-498.
58. Nagao, M., Feinstein, T.N., Ezura, Y., Hayata, T., Notomi, T., Saita, Y., Hanyu, R., Hemmi, H., Izu, Y., Takeda, S., Wang, K., Rittling, S., Nakamoto, T., Kaneko, K., Kurosawa, H., Karsenty, G., Denhardt, D.T., Vilaradaga, J.P., Noda, M. (2011) Sympathetic control of bone mass regulated by osteopontin. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 177767-72.
59. Nillesen, S.T., Geutjes, P.J., Wismans, R., Schalkwijk, J., Daamen, W.F., van Kuppevelt, T.H. (2006) Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen-heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF. *Bio-materials* 17.
60. Ortega, S., Ittmann, M., Tsang, S.H., Ehrlich, M., Basilico, C. (1998) Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5672-7.
61. Plotnikov, A.N., Hubbard, S.R., Schlessinger, J., Mohammadi, M. (2000) Crystal structures of two FGF-FGFR complexes reveal the determinants of ligand receptor specificity. *Cell* 101, 413-24.

62. Plotnikov, A.N., Schlessinger, J., Hubbard, S.R., Mohammadi, M. (1999) Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell* 98, 641-50.
63. Pogoda, P., Priemel, M., Schilling, A.F., Gebauer, M., Catala-Lehnen, P., Barvencik, F., Beil, F.T., Munch, C., Rupprecht, M., Muldner, C., Rueger, J.M., Schinke, T., Amling, M. (2005) Mouse models in skeletal physiology and osteoporosis: experiences and data on 14,839 cases from the Hamburg Mouse Archives. *J Bone Miner Metab* 23, 97-102.
64. Priemel, M., Munch, C., Beil, F.T., Ritzel, H., Amling, M. (2006) Pathophysiology and pathomorphology of osteoporosis. *Radiologe* 46, 831-8.
65. Priemel, M., Schilling, A.F., Haberland, M., Pogoda, P., Rueger, J.M., Amling, M. (2002) Osteopenic mice: animal models of the aging skeleton. *J Musculoskeletal Neuronal Interact* 2, 212-8.
66. Ralston, S.H. (1997) What determines peak bone mass and bone loss? *Baillieres Clin Rheumatol* 11, 479-94.
67. Rosenblatt-Velin, N., Lepore, M.G., Cartoni, C., Beermann, F., Pedrazzini, T. (2005) FGF-2 controls the differentiation of resident cardiac precursors into functional cardiomyocytes. *J Clin Invest* 115, 1724-33.
68. Sahni, M., Raz, R., Coffin, J.D., Levy, D., Basilico, C. (2001) STAT1 mediates the increased apoptosis and reduced chondrocyte proliferation in mice overexpressing FGF2. *Development* 128, 2119-29.
69. Santana, R.B., Trackman, P.C. (2006) Controlled release of fibroblast growth factor 2 stimulates bone healing in an animal model of diabetes mellitus. *Int J Oral Maxillofac Implants* 21, 711-8.

70. Sobue, T., Naganawa, T., Xiao, L., Okada, Y., Tanaka, Y., Ito, M., Okimoto, N., Nakamura, T., Coffin, J.D., Hurley, M.M. (2005) Over-expression of fibroblast growth factor-2 causes defective bone mineralization and osteopenia in transgenic mice. *J Cell Biochem* 95, 83-94.
71. Takeda, S. (2005) Central control of bone remodelling. *Biochem Biophys Res Commun* 328, 697-9.
72. Takeda, S. (2005) Central control of bone mechanism. *Clin Calcium*. 5, 797-804.
73. Takeda, S., Elefteriou, F., Levasseur, R., Liu, X., Zhao, L., Parker, K.L., Armstrong, D., Ducy, P., Karsenty, G. (2002) Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 111, 305-317.
74. Tooyama, I., Kawamata, T., Walker, D., Yamada, T., Hanai, K., Kimura, H., Iwane, M., Igarashi, K., McGeer, E.G., McGeer, P.L. (1993) Loss of basic fibroblast growth factor in substantia nigra neurons in Parkinson's disease. *Neurology* 43, 372-6.
75. Vock, L. (2003) Leptin im Knochenstoffwechsel. *J Miner Stoffwechs* 10, 22-27.
76. Quarto, N., Longaker, M.T. (2006) FGF-2 inhibits osteogenesis in mouse adipose tissue-derived stromal cells and sustains their proliferative and osteogenic potential state. *Tissue Eng* 12, 1405-18.
77. Yoshimura, S., Takagi, Y., Harada, J., Teramoto, T., Thomas, S.S., Waeber, C., Bakowska, J.C., Breakefield, X.O., Moskowitz, M.A. (2001) FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5874-9.

78. Zaidi, M., Alam, A.S, Shankar, V.S., Bax, B.E., Bax, C.M., Moonga, B.S., Bevis, P.J., Stevens, C., Blake, D.R., Pazianas, M. (1993) Cellular biology of bone resorption. *Bio Rev Camb Philos Soc* 68, 197-264.
79. Zhou, M., Sutliff, R.L., Paul, R.J., Lorenz, J.N., Hoying, J.B., Haudenschild, C.C., Yin, M., Coffin, J.D., Kong, L., Krnias, E.G., Luo, W., Boivin, G.P., Duffy, J.J., Pawlowski, S.A., Doetschman, T. (1998) Fibroblast growth factor 2 control of vascular tone. *Nat Med* 4, 201-7.
80. Zhu, X., Komiya, H., Chirino, A., Faham, S., Fox, G.M., Arakawa, T., Hsu, B.T., Rees, D.C. (1991) Three-dimensional structures of acidic and basic fibroblast growth factors. *Science* 251, 90-3.

8 Danksagung

Ich danke allen herzlich, die mich auf verschiedenste Weise bei dem „Projekt“ Dissertation unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Michael Amling, Direktor des Instituts für Osteologie und Biomechanik, Universität Hamburg, für die Vergabe des Dissertationsthemas, die konstruktiven Vorschläge und seine klaren Worte für meine wissenschaftliche Arbeit.

Prof. Dr. med. Arndt Schilling danke ich für seine motivierende Unterstützung, die hilfreichen Korrekturen und Denkanstöße, die wissenschaftliche Beratung und seine stets offene „Tür“.

Unseren Kooperationspartnern, insbesondere Prof. Dr. med. Heimo Ehmke und Frau Dr. med. vet. Mareike Budack, die das Tiermodell für unsere Forschung entwickelt und uns zur Verfügung gestellt haben, möchte ich für die verlässliche Zusammenarbeit danken.

Antje Hübner, Tilman Jakob Linn, Dr. rer. nat. Thorsten Schinke und Dr. med. Johannes Keller waren mir immer freundliche und kompetente Ansprechpartner.

Allen Mitarbeitern und Doktoranden, insbesondere Tayfun, Percy, Claudia, Anke, Sandra und Cordula, danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit. Sie haben mir die Erstellung meiner Dissertation erleichtert.

Meinen Eltern, Jutta und Klaus Plöger, danke ich für ihr für die Erziehung zum kritischen Denken und zielführenden Arbeiten. Sie standen mir stets mit liebevoller Unterstützung hilfreich zur Seite.

9 Curriculum Vitae

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

10 Eidesstattliche Versicherung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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: