

# SKELETTALE CHARAKTERISIERUNG LYSOSOMALER SPEICHERERKRANKUNGEN IN MURINEN MODELLEN

## Dissertation

zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften

des Fachbereichs Biologie,

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

der Universität Hamburg

vorgelegt von

**SONJA CHRISTIN KÜHN**  
aus Buchholz in der Nordheide

Hamburg 2014

Tag der Disputation: 30. Januar 2015

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Thorsten Schinke

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Thorsten Burmester

# Inhalt

Abkürzungsverzeichnis .....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Knochen.....	1
1.1.1 Knochenumbau .....	3
1.1.1.1 Knochenresorption durch Osteoklasten .....	3
1.1.1.2 Knochenformation durch Osteoblasten.....	4
1.1.1.3 Knochenremodelling .....	5
1.1.2 Knochenkrankheiten .....	6
1.2 Lysosomen.....	7
1.2.1 Synthese und Transport von lysosomalen Proteinen.....	8
1.2.1.1 Biosynthese löslicher lysosomaler Proteine.....	8
1.2.1.2 Transport von lysosomalen Proteinen .....	9
1.2.2 Funktion lysosomaler Proteine.....	10
1.2.2.1 Degradation von Glykosaminoglykanen.....	10
1.2.3 Lysosomale Speichererkrankungen.....	11
1.2.3.1 Mucopolysaccharidose Typ I (MPSI).....	12
1.2.3.2 Saure Phosphatasen .....	13
1.2.4 Murine Tiermodelle lysosomaler Speichererkrankungen .....	14
1.2.4.1 MPSI.....	14
1.2.4.2 <i>Acp5<sup>-/-</sup></i> .....	15
1.2.4.3 <i>Acp2<sup>-/-</sup></i> .....	16
1.2.4.4 <i>Acp2<sup>-/-</sup>/Acp5<sup>-/-</sup></i> .....	16
1.3 Aufgabenstellung.....	17
2 Material .....	19
2.1.1 Chemikalien .....	20
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	20
2.1.3 Kits und Assays .....	20
2.1.4 Puffer und Lösungen .....	21
2.1.5 Primersequenzen.....	23
2.1.5.1 Primer für Genotypisierung.....	23
2.1.5.2 Primer für Reverse Transkriptase-PCR .....	23
2.1.6 Medium und Zusätze.....	23
3 Methoden.....	25
3.1 Molekularbiologische Methoden .....	25

3.1.1	Präparation genomischer DNA.....	25
3.1.2	Präparation von RNA.....	25
3.1.3	Reverse Transkription (cDNA-Synthese) und quantitative Realtime-PCR.....	26
3.2	Zellbiologische Methoden.....	26
3.2.1	Generierung von Osteoblasten und Osteoklasten aus Knochenmarkzellen.....	26
3.2.2	Primäre Osteoblasten-Kulturen aus Maus-Schädeldächern .....	26
3.2.3	Primäre Adipozyten-Kulturen aus subkutanem Fett.....	27
3.2.4	Dentin-Resorption .....	27
3.2.5	Alizarinrot-Färbung.....	28
3.2.6	TRAP-Färbung von Osteoklasten .....	28
3.3	Biochemische Methoden.....	28
3.3.1	ELISA .....	28
3.3.2	Cathepsin K Activity Assay Kit.....	29
3.4	Histochemische, histologische und histomorphometrische Methoden .....	29
3.4.1	Calceinmarkierung von Mäusen.....	29
3.4.2	Präparation und Fixierung von Mausskeletten sowie Paraffin- und Acrylateinbettung.....	29
3.4.3	Kontaktröntgen und $\mu$ CT-Analyse .....	30
3.4.4	von Kossa/van Gieson-Färbung .....	30
3.4.5	Toluidinblau-Färbung .....	30
3.4.6	Histomorphometrie.....	30
3.5	Sonstige Methoden .....	31
3.5.1	Knochenmarktransplantation von Mäusen.....	31
3.5.2	Enzymersatztherapie.....	31
3.5.3	Tierhaltung .....	31
3.5.4	Statistik.....	31
4	Ergebnisse.....	33
4.1	Histologische Analyse des Knochenphänotyps des <i>Idua</i> -defizienten Mausmodells.....	33
4.2	Zelluläre und molekulare Untersuchung des Phänotyps <i>Idua</i> -defizienter Mäuse.....	40
4.3	Einfluss von Therapieoptionen.....	44
4.3.1	Auswirkungen einer Knochenmarktransplantation auf den <i>Idua</i> -defizienten Knochen.....	44
4.3.2	Auswirkungen einer Enzymersatztherapie auf den <i>Idua</i> -defizienten Knochen.....	46
4.4	Histologische Analyse des Knochenphänotyps des <i>Acp2/Acp5</i> -defizienten Mausmodells ..	49
4.5	Zelluläre und molekulare Untersuchung des skelettalen Phänotyps <i>Acp2/Acp5</i> -defizienter Mäuse	50
4.6	Zelluläre und molekulare Untersuchung des Fettphänotyps in <i>Acp2/Acp5</i> -defizienten Mäusen.....	54
5	Diskussion und Ausblick .....	59

5.1	Pathologischer Knochenphänotyp in MLII-Mäusen .....	60
5.2	Pathologischer Knochenphänotyp im <i>Idua</i> -defizienten Mausmodell .....	61
5.3	Therapiemethoden für das murine MPSI-Modell .....	65
5.4	Pathologischer Knochenphänotyp in einem Acp2/Acp5-defizienten Mausmodell .....	67
5.5	Veränderter Fettphänotyp in einem Acp2/Acp5-defizienten Mausmodell .....	69
5.6	Ausblick.....	72
6	Anhang.....	i
6.1	Zusammenfassung auf Deutsch.....	i
6.2	Summary in English .....	iii
6.3	Vorveröffentlichungen .....	v
6.3.1	Publikationen.....	v
6.3.2	Posterpräsentation.....	v
6.4	Danksagung .....	vi
6.5	Erklärung .....	vii
6.6	Literaturverzeichnis .....	viii

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	Alpha
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gamma
$\mu$	Micro
AP	Adaptorprotein
ATF4	<i>Activating transcription factor 4</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAT	Braunes Fettgewebe ( <i>Brown adipose tissue</i> )
Bglap	Osteocalcin
BMP	Knochenmorphogenetische Protein ( <i>Bone morphogenetic protein</i> )
bp	Basenpaare
Bpm	<i>Bone perimeter</i>
BS	Knochenoberfläche ( <i>Bone surface</i> )
BV/TV	Knochenvolumen ( <i>Bone volume per tissue volume</i> )
Ca.	circa
CAII	Carboanhydrase
Calcr	Calcitonin-Rezeptor
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
Ctsk	Cathepsin K
Ccl2	Chemokine Ligand 2
COPII	<i>Coat protein complex II</i>
Crea	Creatinin
CT	Computertomographie
Cxcl12	<i>stromal cell-derived factor 1</i> auch <i>C-X-C motif chemokine 12</i>
d	Tag ( <i>Day</i> )
Dpd	Desoxypyridinolin
DMP1	<i>Dentin matrix acidic phosphoprotein 1</i>
DS	Dermatansulfat
EET	Enzymersatztherapie
EpiWAT	Epidermales weißes Fettgewebe
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	<i>Endosomal sorting Complex Required for Transport</i>
et al.	Und andere

FasL	Fas Ligand
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (Fibroblast growth factor)
for	Vorwärts ( <i>forward</i> )
g	Gramm
GAG	Glycosaminoglycan
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GGA	<i>Golgi-localized, gamma adaptin ear-containing, ADP-ribosylation factor binding protein</i>
GlcNAc	N-Acetylglucosamine
GNPTAB	N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase, alpha and beta subunits
GNPTG	N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase, gamma subunit
GT	Genotypisierung
H <sup>+</sup> -ATPase	Protonenpumpe
HS	Heparansulfat
lbsp	<i>Bone sialoprotein</i>
IDUA	$\alpha$ -L-Iduronidase
lhh	<i>Indian hedgehog</i>
IL	Interleukin
Incorp.	Einlagerung ( <i>Incorporation</i> )
IngWAT	Inguinales weißes Fettgewebe
kDa	Kilodalton
KMT	Knochenmarktransplantation
KO	<i>Knock-out</i>
l	Liter
LAMP	Lysosomen-assoziiertes Membranprotein
LAP	<i>Lysosomal acid phosphatase, Acp2</i>
LIMP	Lysosomales-integrales Membranprotein
LSD	Lysosomale Speichererkrankungen ( <i>Lysosomal storage disorder</i> )
m	Milli
M	Molar
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MEPE	<i>Matrix extracellular phosphoglycoprotein</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>Major histocompatibility</i>

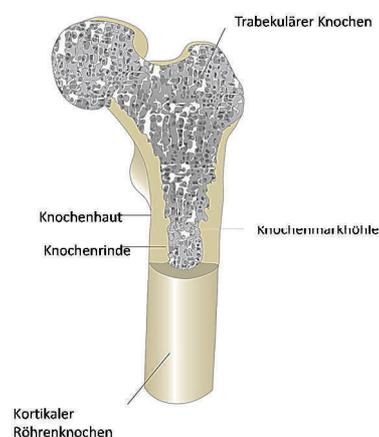
	<i>complex)</i>
ML	Mucolipidose
MNC	Mehrkernige Zelle ( <i>Multinuclear cell</i> )
M6P	Mannose-6-Phosphat
MPR	Mannose-6-Phosphatrezeptoren
MPS	Mucopolysaccharidose
n	Nano
n	Anzahl ( <i>Number</i> )
OcN	Anzahl der Osteoklasten ( <i>Osteoclast number</i> )
OcS	Oberfläche der Osteoklasten ( <i>Osteoclast surface</i> )
OD	Optische Dichte ( <i>optical density</i> )
Opg	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
OSX	Osterix
OtN	Anzahl der Osteozyten ( <i>Osteocyte number</i> )
p	p-Wert
PAP	<i>Acid phosphatase of the prostate</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>Phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion
PHEX	<i>Pi-regulating endopeptidase on chromosome X</i>
Ppar $\gamma$	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PTH	Parathormon
Pthrp	<i>Parathyroid hormone-related protein</i>
RANKL	<i>Receptor for activation of nuclear factor kappa B ligand</i>
rev	Rückwärts ( <i>Revers</i> )
RFU	Relative Fluoreszenzeinheit ( <i>relative fluorescence unit</i> )
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Drehzahl ( <i>revolutions per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RUNX2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
S	Sulfat
S1P	<i>Site-1 protease</i>
SPENCD	Spondyloenchondrodysplasie

SOST	Sclerostin
Sox9	<i>SRY (sex determining region Y)-box 9</i>
t	Zeitpunkt
Tb.N	Trabekelanzahl ( <i>Trabecular number</i> )
Tb.Th	Trabekeldicke ( <i>Trabecular thickness</i> )
Tb.Sp	Trabekulärer Abstand ( <i>Trabecular spacing</i> )
TLR9	<i>Toll-like receptor 9</i>
Tnfsf11	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)</i>
Tgf- $\beta$	Transforming growth factor beta
TGN	Trans-Golgi-Apparat
TLR9	<i>Toll-like receptor 9</i>
TRAP	<i>Tartrate-resistant acid phosphatase type 5, Acp5</i>
u.a.	Unter anderem
Ucp1	<i>Uncoupling protein 1</i>
UDP	<i>Uridine diphosphate</i>
Ü.N.	Über Nacht
VTH	Versuchstierhaltung
WAT	Weißes Fettgewebe ( <i>White adipose tissue</i> )
wks	Wochen ( <i>weeks</i> )
WT	Wildtyp

# 1 Einleitung

## 1.1 Knochen

Der Knochen bezeichnet ein metabolisch aktives, skelettbildendes Stützgewebe von Wirbeltieren, das während des gesamten Lebens einem stetigen Umbau, dem Remodelling, unterliegt. Das menschliche Skelett besteht aus ca. 206 Knochen. Bei einem gesunden, erwachsenen Menschen wird etwa 10 % seines Knochens pro Jahr umgebaut, so dass etwa alle 10 Jahre das gesamte Skelettsystem erneuert wird (Cohen 2006). Das Remodelling dient dem Organismus dazu, ein funktionsfähiges und stabiles Skelett zu erhalten, ohne diesen Reparaturmechanismus würde es schnell zum Verschleiß kommen. Hauptaufgabe ist es, Strukturschäden, so genannte *Microcracks*, die durch alltägliche Bewegung und Beanspruchung entstehen, zu reparieren. Aber auch nach erster Frakturheilung übernimmt der Knochenumbau die Wiederherstellung des vollfunktionsfähigen Knochens, wobei der Kallus nach und nach durch den vollbelasteten Knochen ersetzt wird. Das Skelett stützt den Körper von innen heraus und dient als Bewegungsapparat, doch hat es noch eine weitere Vielzahl von Aufgaben. So schützen die Knochen die inneren Organe, im Knochenmark werden Thrombozyten, Erythrozyten und Leukozyten gebildet, sie dienen auch als Reservoir für Mineralien (Calcium und Phosphat) und als Regulator in der Mineralhomöostase (Zaidi 2007). Die Knochenmatrix setzt sich zu 25 % aus Wasser, zu 30 % aus organischen und zu 45 % aus anorganischen Materialien zusammen (Lees 1981). Ein großer Anteil des anorganischen, mineralisierten Materials bildet Hydroxylapatit, der Hauptbestandteil des organischen Anteils ist Typ1-Collagen, es folgen Proteoglycane und einige andere nicht-collagene Proteine wie beispielsweise Osteonectin, Osteopontin und Osteocalcin. Diese Bestandteile leiten zu einer weiteren wichtigen Funktion des Skelettsystems über, der Regulation des Energiestoffwechsels. Beispielsweise ist Osteocalcin ein wichtiger Regulator im Glukosehaushalt oder die BMPs (Knochenmorphogenetische Proteine; *Bone morphogenetic proteins*) regulieren die Formation und thermogene Aktivität des braunen Fettgewebes.



**Abbildung 1: Schematisch dargestellter Röhrenknochen.** Zu sehen ist trabekulärer Knochen, der das Innere des Knochens auskleidet und kortikaler Knochen, der den Knochen umhüllt, sowie die Knochenhaut, die Rinde und die Markhöhle.

Die poröse Struktur von Knochen setzt sich aus Zellen, Gefäßen, Knochenmatrix und Knochenkristallen zusammen, die sich je nach Knochentyp unterscheiden. Es werden zwei unterschiedliche Knochentypen definiert, der kortikale und der trabekuläre Knochen. Etwa 80 % der Knochenmasse macht aufgrund seiner höheren Dichte kortikaler Knochen aus, jedoch stellt dieser nur 20 % der Knochenoberfläche dar. Die restlichen 80 % der Knochenoberfläche bestehen aus trabekulärem Knochen, der sich hauptsächlich im Inneren von Röhrenknochen und Wirbelkörpern befindet. Dank einer geringeren Dichte des trabekulären Knochens ist dieser in der Lage, eine höhere Elastizität aber auch eine höhere metabolische Aktivität als kortikaler Knochen zu zeigen (Hadjidakis and Androulakis 2006).

Durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Zellen wird Knochen umgebaut und gebildet. Zwei Arten der Knochenbildung, auch als Ossifikation bezeichnet, werden unterschieden.

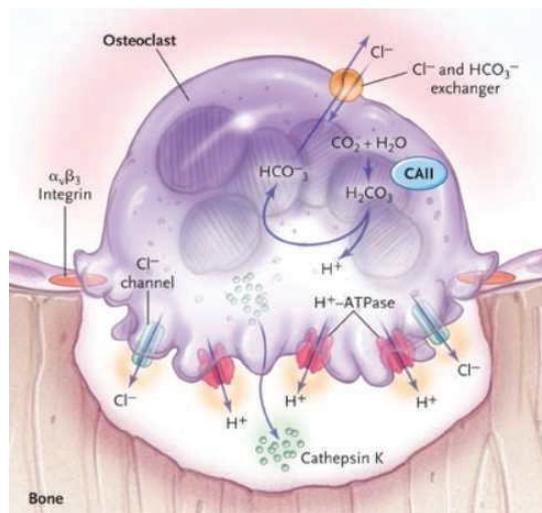
Bei der desmalen Ossifikation, verantwortlich für die Bildung von platten Knochen wie beispielsweise dem Schädeldach oder dem Schlüsselbein, entsteht das Knochengewebe direkt aus dem embryonalen Bindegewebe (Mesenchym). Mesenchymale Zellen verdichten sich hierbei inselartig zu Vorläuferzellen. Diese differenzieren sich zu Osteoblasten und bauen Osteoid auf, das anschließend mineralisiert (Hartmann 2009).

Bei der endochondralen Ossifikation, die unter anderem für die Formation von Röhrenknochen, das Längenwachstum dieser und ebenfalls für die Heilung nach einer Fraktur verantwortlich ist, kondensieren aus dem Mesenchym Vorläuferzellen, die durch den Transkriptionsfaktor Sox9 zu Chondrozyten differenzieren und TypII-Collagen produzieren. Die weitere Osteogenese kann in mehrere Phasen unterteilt werden. Nach einer Phase der Proliferation hypertrophieren die Chondrozyten. Hypertrophe Chondrozyten produzieren nun kein TypII-Collagen mehr sondern TypX-Collagen. Der Übergang von proliferierenden Chondrozyten zu hypertrophen Chondrozyten wird durch die Moleküle *Indian hedgehog* (Ihh) und *Parathyroid hormone-related protein* (Pthrp) reguliert. Zeitgleich zum Auftreten von hypertrophen Chondrozyten exprimieren mesenchymale Zellen im Perichondrium Runx2 (*Runt-related transcription factor 2*). Dieses Protein ist essentiell für die Osteoblastendifferenzierung und Skelettmorphogenese. Diese Zellen im Perichondrium bilden den sogenannten *Bone collar*, der als Vorlage für den kortikalen Knochen fungiert. Die hypertrophen Chondrozyten sterben letztendlich ab und bilden auf diese Weise durch die hinterlassene Matrix aus TypX-Collagen und Aggrecan eine optimale Vorlage für die Mineralisation. Schließlich kommt es zur Einsprossung von Gefäßen, begleitet von einer Einwanderung von Osteoblasten. Diese produzieren eine TypI-Collagen haltige Matrix, wodurch eine Primär-Spongiosa gebildet wird. Bei diesem Gebilde handelt es sich um die Vorlage des zukünftigen trabekulären Knochens (Karsenty, Kronenberg et al. 2009).

## 1.1.1 Knochenumbau

### 1.1.1.1 Knochenresorption durch Osteoklasten

Als einziger Zelltyp ist der Osteoklast verantwortlich für die Resorption von Knochen. Osteoklasten entstammen der hämatopoetischen Stammzelllinie und entstehen durch eine Fusion von Monozyten/Makrophagen-Vorläuferzellen an der Knochenoberfläche, weswegen sie eine Multinuklearität aufweisen. Mit einem Durchmesser von bis zu 100  $\mu\text{m}$  sind sie die größten Knochenzellen. Sie sind für das Enzym *Tartrate-resistant acid phosphatase type 5* (TRAP) positiv, wodurch sie einfach angefärbt werden können. Zwei Faktoren spielen in der Osteoklastogenese eine wichtige Rolle, zum einen ist es M-CSF (*Macrophage colony-stimulating factor*) und zum zweiten RANKL (*Receptor for activation of nuclear factor kappa B ligand*). M-CSF bindet an seinen Rezeptor c-Fms auf Osteoklasten-Vorläuferzellen und treibt somit die Makrophagenreifung voran. RANKL ist der entscheidende Faktor für die Differenzierung zu funktionsfähigen Osteoklasten, welcher nicht nur von Osteoblasten, sondern auch von aktivierten T-Zellen sezerniert wird (Teitelbaum 2000).



**Abbildung 2: Der Osteoklast.** Die Anheftung des Osteoklasten an die Knochenoberfläche wird durch sogenannte Podosomen, die filamentöses Actin und  $\alpha_3\beta_1$  Integrin enthalten, ermöglicht. Zur Ansäuerung und zur Demineralisierung des Knochens generiert die Carboanhydrase (CAII) Protonen und Bikarbonat aus Kohlendioxid und Wasser und transportiert dieses aktiv mittels Protonenpumpe ( $\text{H}^+$ -ATPase) über die Membran (ruffled border) des Osteoklasten. Ein gekoppelter Chloridkanal stellt ein Gleichgewicht ein. Das entstandene Bikarbonat wird zusammen mit Chlorid an der basolateralen Seite der Zelle abgeführt. Die organische Matrix des Knochens wird durch die enzymatische Aktivität von Cathepsin K resorbiert (Abbildung modifiziert nach (Tolar, Teitelbaum et al. 2004)).

Knochenresorption ist ein mehrstufiger Prozess, der initiiert wird durch die Proliferation von unreifen Osteoklasten-Vorläuferzellen, der Fusion dieser Vorläuferzellen und schließlich der Degradation der organischen und anorganischen Knochenmatrix durch den reifen Osteoklasten. Der Osteoklast besitzt die Fähigkeit auf der Knochenoberfläche zu polarisieren und somit ein Resorptionskompartiment, die *ruffled membrane*, zu erzeugen. Zur Resorption adhären Osteoklasten über Integrinrezeptoren an den Knochen und nach einer Umorganisation des Aktin-

Zytoskeletts kommt es zur Ausbildung eines Aktinrings und einer sogenannten *sealing zone*, welche das unter dem Osteoklasten befindliche Knochenareal undurchlässig abschirmt (Teitelbaum 2000). Hier kommt es durch die Aktivität einer Carboanhydrase, einer Protonenpumpe (H<sup>+</sup>-ATPase) und dem Chloridkanal Clc-7 zu einer Ansäuerung des Resorptionskompartiments auf pH 4,5-5. Dieses saure Milieu führt zur Auflösung des mineralisierten Knochens und zur Freisetzung der organischen Matrix, die zum größten Teil aus Typ1-Collagen besteht. Dieses wird durch das lysosomale Enzym Cathepsin K, welches vom Osteoklasten über die *ruffled border* in das Resorptionskompartiment sekretiert wird, abgebaut. Die entstehenden Abbauprodukte wie Calcium, Phosphat und die Collagenfragmente werden schließlich durch den Osteoklasten aufgenommen und auf der anti-resorptiven Seite der Zelle in die Zirkulation zurückgegeben (Nesbitt and Horton 1997). Nach erfolgreicher Resorption wandert der Osteoklast zum nächsten Degradationsort (Vaananen and Horton 1995).

#### 1.1.1.2 Knochenformation durch Osteoblasten

Der Prozess der Knochenformation wird durch Osteoblasten, die sich aus multipotenten mesenchymalen Stammzellen entwickeln, ausgeführt. Zur Abstammungslinie der Osteoblasten gehören ebenfalls die mesenchymalen Vorläuferzellen, die Präosteoblasten, die reifen Osteoblasten, die *bone-lining cells* und die Osteozyten (Long 2012). Im Gegensatz zu Osteoklasten treten Osteoblasten in sogenannten Zellclustern entlang der Knochenoberfläche auf. Dieser Zelltyp weist ein stark basophiles Zytoplasma auf, besitzt reichlich Mitochondrien und einen großen Golgi-Apparat zur Produktion von immensen Mengen an extrazellulären Proteinen (Pritchard 1952). Osteoblasten produzieren eine einzigartige Kombination aus extrazellulären Proteinen wie Osteocalcin, Alkalischer Phosphatase und großen Mengen an Typ1-Collagen. Die extrazelluläre Matrix wird Osteoid genannt und durch die Akkumulation und Einbau von Calciumphosphat in Form von Hydroxylapatit mineralisiert. Eine Subgruppe von Osteoblasten, die sogenannten Osteozyten, lassen sich in die Knochenmatrix einmauern und bilden ein flächendeckendes Netzwerk untereinander im neu mineralisierten Knochen aus. Nach dem Auffüllen der resorbierten Fläche wird die Knochenformation durch noch nicht genau aufgeklärte Mechanismen beendet. Bei diesem Vorgang spielt höchstwahrscheinlich der Osteozyt eine zentrale Rolle. Dieser terminal differenzierte Osteoblast sezerniert SOST (Sclerostin), einen löslichen Inhibitor der Knochenformation. Die hemmende Wirkung von SOST auf die Osteoblastendifferenzierung beruht vermutlich darauf, dass es den kanonischen WNT-Signalweg inhibiert, welcher in der frühen Phase der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Osteoblasten eine kritische Rolle spielt (Karsenty, Kronenberg et al. 2009). Fällt dieser inhibitorische Effekt von SOST aus, kommt es zu einer vermehrten Bildung von

Osteoblasten und einem unkontrollierten Knochenwachstum. Aber auch der BMP-Signalweg scheint einen Einfluss auf die Osteoblastendifferenzierung zu haben (Long 2012). Verschiedene Transkriptionsfaktoren sind für die Differenzierung der Osteoblastenlinie wichtig. So markiert SOX9 beispielsweise nur die osteoblastären Vorläuferzellen, wohingegen RUNX2 (*Runt-related transcription factor 2*), ATF4 (*Activating transcription factor 4*) und OSX (Osterix) unabdingbar für die Differenzierung der reifen Osteoblasten sind.

#### 1.1.1.3 Knochenremodelling

Ein andauernder Knochenumbau ist absolut entscheidend, da ansonsten die Knochenqualität bzw. die mechanische Belastbarkeit durch so genannte *Microcracks* stetig abnehmen würde, was in einer erhöhten Frakturnrate resultieren würde. Der stetige Umbau der Knochenmasse wird durch verschiedenste Mechanismen reguliert. Beispielsweise erfolgt die zentrale Regulation der Knochenmasse über das Hormon Leptin, welches vom weißen Fettgewebe sezerniert wird. Die Wirkung verläuft dabei über den Hypothalamus, wo es den Sympathikus tonus stimuliert, der dann in Osteoblasten über  $\beta$ 2-adrenerge Rezeptoren den Transkriptionsfaktor Atf4 aktiviert und damit die RANKL-Expression induziert. Gleichzeitig wird die Clock-Gen-Expression im Osteoblasten durch die Stimulation der  $\beta$ 2-adrenerge Rezeptoren induziert, was eine Inhibition der Expression von c-myc und die Proliferation der Osteoblasten auslöst, wodurch es zu einer Reduzierung der Knochenformation kommt (Elefteriou, Ahn et al. 2005; Fu, Patel et al. 2005). Die hormonelle Kontrolle des Knochenumbaus erfolgt über Östrogen und PTH. Östrogen wirkt über Kernrezeptoren (über ER $\alpha$ ) auf den Osteoklasten, hier induziert es die Apoptose durch erhöhte Expression von FasL (Nakamura, Nagano et al. 2007). Somit stellt Östrogen einen Knochenresorptionsinhibitor dar, was auch die erhöhte Resorption in postmenopausalen Osteoporose-Patientinnen erklärt. PTH wird in der Nebenschilddrüse produziert und reguliert die Freisetzung von Calcium aus dem Knochen, erhöht indirekt über die Wirkung von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D die Aufnahme von Calcium aus dem Darm und fördert die vermehrte Rückabsorption dieses Minerals in der Niere (Wetmore and Quarles 2009). Neben der zentralen und der endokrinen Kontrolle des Knochenumbaus spielen aber auch lokale Mechanismen eine Rolle, beispielsweise das Osteoprotegerin (OPG)-RANKL-System. RANKL ist der entscheidende Faktor für die Differenzierung zu funktionsfähigen Osteoklasten, welcher nicht nur von Osteoblasten sondern auch von aktivierten T-Zellen sezerniert wird. Die Expression dieses Zytokins ist für die Osteoklastogenese zwingend erforderlich (Takayanagi 2007). Zudem existiert ein wichtiger Rankl-Gegenspieler, das sogenannte Osteoprotegerin (Opg), welches durch das Gen *Tnfrsf11b* kodiert wird. Opg regelt maßgeblich die Osteoklastogenese durch seine Bindung und Inhibition von Rankl (Simonet, Lacey et al. 1997). Außerdem spielen verschiedene Zytokine, wie z.B.

IL-1, IL-18 und Chemokine, wie etwa Ccl2 und Cxcl12, für die Steuerung der Differenzierung bzw. der Aktivität der Osteoblasten und Osteoklasten eine entscheidende Rolle (Harada and Rodan 2003; Takayanagi 2007; Lorenzo, Horowitz et al. 2008; Deschaseaux, Sensebe et al. 2009). Desweiteren können sich Osteoklasten und Osteoblasten wechselseitig über den Prozess der funktionellen Kopplung der Knochenformation, auch *Coupling* genannt, beeinflussen. So sezernieren aktive Osteoklasten Faktoren wie z.B. Tgf- $\beta$  oder Sphingosin-1-Phosphat, welche die spätere Knochenneubildung durch Osteoblasten stimulieren (Pederson, Ruan et al. 2008; Tang, Wu et al. 2009; Keller, Catala-Lehnen et al. 2014). Auch vom Osteoblasten gehen Signale aus wie beispielsweise durch Sezernierung von Rankl oder Opg.

### 1.1.2 Knochenkrankheiten

Knochenformation und Knochenresorption sind im gesunden Organismus genau aufeinander abgestimmt, was für die Funktion des Knochens essentiell ist. Jede Verschiebung der Homöostase der zwei Prozesse kann zu entscheidenden Veränderungen der Stabilität des Knochens aber auch zu einer Störung des Mineralhaushalts führen. Eine Reduktion der Knochenmasse um mehr als 2,5 Standardabweichungen vom Mittelwert des entsprechenden Alters wird als Osteoporose bezeichnet (Rosen, 2005). In diesem Fall ist die Resorption gegenüber der Formation erhöht. Tritt genau der umgekehrte Fall ein, ist die Formation gegenüber der Resorption erhöht und nimmt die Knochenmasse zu, so spricht man von Osteosklerose. Gegenüber einer Osteopetrose, bei der die Osteoklasten nicht mehr adäquat Knochen resorbieren können, ist die Osteosklerose der angestrebte Zustand, da der Knochen hier eine erhöhte biomechanische Belastbarkeit aufweist. So kommt es bei der Osteopetrose neben schwerwiegenden Symptomen, wie z.B. einer Anämie, trotz der erhöhten Knochenmasse zu einem erhöhten Frakturrisiko. Eine weitere Form der Knochenerkrankung, bei der jedoch nicht die Knochenmasse betroffen ist, ist die Osteomalazie, bei der die nicht mineralisierte Knochenmatrix vermehrt angereichert ist.

Einerseits können genetische Veränderungen Ursache dieser Erkrankungen sein, andererseits können aber auch Fehl- und Mangelernährung (Rosen 2005), eine unzureichende Vitamin D-Versorgung (Priemel, von Domarus et al. 2010), eine Absenkung des Östrogenspiegels während der Menopause, Immobilisation, Grunderkrankungen wie lysosomale Speichererkrankungen oder inflammatorische Erkrankungen wie z.B. die rheumatoide Arthritis dazu führen. Das Ziel einer medikamentösen Osteoporosetherapie ist das gezielte Eingreifen in die Regulationsmechanismen des Knochenumbaus, um den Verlust der Knochenmasse aufzuhalten und idealerweise zusätzlich Knochenmasse aufzubauen. Dies sollte im Idealfall durch eine Steigerung der Knochenformation geschehen, ohne dabei die Resorption zu senken, sodass es zu einer Erhöhung der Knochenmasse ohne Abnahme der Knochenqualität kommt. Derzeit wird mit Calcium und Vitamin D supplementiert, es stehen jedoch

auch andere Therapien, wie z.B. die Behandlung mit Bisphosphonaten zur Verfügung, die sich an den Knochen anlagern und nach Resorption durch den Osteoklasten diesen in die Apoptose treiben. Auch ein neutralisierender Antikörper gegen RANKL oder die Gabe von PTH werden als Therapiemöglichkeit verwendet.

## 1.2 Lysosomen

Die intrazelluläre Kompartimentierung ist ein Hauptmerkmal eukaryontischer Zellen und dient der Abtrennung unterschiedlicher Funktionsräume, den sogenannten Organellen. Zu diesen gehören auch die von Christian de Duve 1955 entdeckten Lysosomen, die sich insbesondere durch die terminale Degradation von Makromolekülen wie Polysacchariden, Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden auszeichnen (De Duve, Pressman et al. 1955; Kornfeld and Mellman 1989). Neben der klassischen katabolen Funktion hat das lysosomale Kompartiment weitere spezialisierte zelluläre Funktionen, beispielsweise ist es an der Antigenpräsentation mittels MHCII-Komplexen (Geuze 1998), an der Reparatur der Plasmamembran, an der Zellhomöostase, am Energiemetabolismus (Settembre, Fraldi et al. 2013), an der Regulation von Hormonen und Wachstumsfaktoren (Brix, Linke et al. 2001) oder auch an der Osteoklasten-vermittelten Knochenresorption (Lacombe, Karsenty et al. 2013) und am Knochenumbau (Saftig, Hunziker et al. 2000) beteiligt. Das Lysosom enthält mehr als 50 hydrolytische Enzyme, wie Peptidasen, Lipasen, Nukleasen, Proteasen, Glykosidasen, Sulfatasen, Phosphatasen und Phospholipasen, deren pH-Optimum im sauren Bereich liegt (Ohkuma and Poole 1978). Im Lumen der Lysosomen, das durch eine einfache Lipiddoppelschicht begrenzt ist, wird durch eine membrangebundene, ATP-getriebene Protonenpumpe (V-Typ H<sup>+</sup>-ATPase) ein entsprechender pH von 5 aufrechterhalten (Cuppoletti, Aures-Fischer et al. 1987).

Extrazelluläres, abzubauenendes Material erreicht das Lysosom hauptsächlich über den endozytotischen/phagozytotischen Transport (Luzio, Parkinson et al. 2009), wohingegen intrazelluläre Komponenten mittels Autophagie zum Lysosom transportiert werden (Mijaljica, Prescott et al. 2007; Mizushima, Levine et al. 2008; Kaushik and Cuervo 2012). Bei der Endozytose werden extrazellulär lokalisierte Makromoleküle über Clathrin-umhüllte Vesikel internalisiert (de Duve 1983) und über die frühen und späten Endosomen zu den Lysosomen transportiert (Schmid, Fuchs et al. 1988). Die Phagozytose wird überwiegend durch Zellen des unspezifischen Immunsystems wie Granulozyten und Makrophagen genutzt. Bei der Autophagie wird zytoplasmatisches Material durch die Bildung von Membranen in Vakuolen eingeschlossen (De Duve and Wattiaux 1966; Meijer and Codogno 2004). Diese verschmelzen direkt mit den Lysosomen (Lawrence and Brown 1992) oder reifen schrittweise durch Fusion mit endosomalen Vesikeln zu sogenannten Amphisomen heran (Stromhaug and Seglen 1993; Liou, Geuze et al. 1997).

Die Lipiddoppelschicht des Lysosoms ist durch einen hohen Gehalt an hoch glykosylierten Membranproteinen charakterisiert, die die Lysosomen vor Degradation durch die Organell-eigenen Hydrolasen schützen und somit für deren Integrität wichtig sind. Andere Membranproteine vermitteln die Interaktion der Lysosomen mit sich und anderen Membransystemen wie Endosomen, Autophagosomen und der Plasmamembran (Fukuda 1991; Peters and von Figura 1994; Hunziker and Geuze 1996). Die prominentesten lysosomalen Membranproteine sind LAMP-1 (Lysosomen-assoziiertes Membranprotein 1), LAMP-2 (Lysosomen-assoziiertes Membranprotein 2) und LIMP-2 (Lysosomales-integrales Membranprotein 2). LAMP-2 ist wichtig für die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen und LIMP-2 transportiert das lysosomale Enzym  $\beta$ -Glucocerebrosidase zum Lysosom (Reczek, Schwake et al. 2007; Saftig, Beertsen et al. 2008). Darüber hinaus verlassen monomere Abbauprodukte wie Aminosäuren, Fettsäuren, Kohlenhydrate und Nukleoside das Organell durch spezifische Transportkanäle in der lysosomalen Membran, um im Cytosol zum Aufbau neuer Makromoleküle zur Verfügung zu stehen (von Figura and Hasilik 1986; Kornfeld and Mellman 1989).

### 1.2.1 Synthese und Transport von lysosomalen Proteinen

#### 1.2.1.1 Biosynthese löslicher lysosomaler Proteine

Die Biosynthese von lysosomalen Hydrolasen erfolgt an membranständigen Ribosomen des rauen Endoplasmatischen Retikulums (ER). Durch eine etwa 15 – 30 Aminosäuren lange, N-terminale Signalsequenz des Proteins wird die kotranslationale Translokation der Polypeptidketten in das ER-Lumen signalisiert und initiiert (Walter and Johnson 1994). Nach Abspaltung des Signalpeptids werden vorgefertigte Oligosaccharide (zwei N-Acetylglucosamin-, neun Mannose-, und drei Glucoseresten ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) auf selektive Asparaginreste innerhalb einer Konsensussequenz der Hydrolasen überführt. Die neu synthetisierten Polypeptide binden über ihre monoglycosylierten Glycane an ein Chaperon bis sie vollständig gefaltet und nach Verpackung in COPII (*Coat protein complex II*)-ummantelte Vesikel zum Golgi-Apparat transportiert werden (Trombetta and Helenius 1998). Durch die Übertragung komplexer Zucker (z.B. Fucose, Galactose und GlcNAc) oder Generierung eines Mannose-6-Phosphat (M6P)-Erkennungssignals erfolgen im Golgi-Apparat weitere Modifikationen der Mannose-reichen Oligosaccharide an die lysosomalen Hydrolasen. Durch eine Mannose-6-phosphat (M6P)-abhängige Modifikation der Mannose-reichen Oligosaccharide wird der Transport der neu synthetisierten, löslichen lysosomalen Proteine in das endosomale/lysosomale Kompartiment sichergestellt. Die Synthese dieser Erkennungssequenz erfolgt in einer zweistufigen Reaktion, katalysiert durch die N-Acetylglucosamin-1-Phosphotransferase (GlcNAc-1-Phosphotransferase) und die N-Acetylglucosamin-1-phosphodiester- $\alpha$ -N-Acetylglucosaminidase (GlcNAc-1-Phosphodiesterase, UCE, *uncovering enzyme*) (Lazzarino and Gabel 1988).

### 1.2.1.2 Transport von lysosomalen Proteinen

Es werden zwei Arten des Transports von lysosomalen Proteinen unterschieden, der M6P-abhängige und der M6P-unabhängige Transportweg.

Im M6P-abhängigen Transport werden neu synthetisierte lysosomale Enzyme an Mannose-6-Phosphatrezeptoren (MPRs) im trans-Golgi-Apparat gebunden. Zwei MPRs existieren hier, die sich stark in der Fähigkeit Liganden zu binden, ihrer subzellulären Lokalisation, Quartärstruktur und Halbwertszeit unterscheiden, der 300 kDa Kationen-unabhängige Rezeptor (MPR300) und der 46 kDa Kationen-abhängige Rezeptor (MPR46). In der cytosolischen Domäne beider MPRs befindet sich ein Sequenzmotiv für die Bindung der Adaptorprotein-Komplexe 1 und 2 (AP-1, AP-2). Mit Hilfe dieser Proteine werden die MPRs in Clathrin-umschlossene Vesikel verpackt und zu frühen Endosomen transportiert (Braulke and Bonifacino 2009). Durch die ESCRT (*Endosomal sorting Complex Required for Transport*)-Proteinkomplexe 0, I-III reifen die frühen Endosomen zu späten bzw. multivesikulären Endosomen, was mit der steigenden Aktivität der V-Typ H<sup>+</sup>-ATPase und einem Abfall des pH-Werts auf maximal 4,9 in späten Endosomen einhergeht. Zeitgleich werden endosomale Transmembranproteine, die für die Degradation bestimmt sind, in das Lumen transportiert (Babst 2005; Huotari and Helenius 2011). Aufgrund des niedrigen pH-Werts innerhalb der Endosomen dissoziieren die lysosomalen Enzyme von den MPRs, die zum trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zurückgeführt werden und für einen neuen Transportzyklus zur Verfügung stehen. Durch Fusion der Endosomen mit den Lysosomen und unter Beteiligung der ESCRT-Proteinkomplexe erreichen die lysosomalen Enzyme ihren finalen Bestimmungsort (Metcalf and Isaacs 2010). 5 bis 10 % der neu synthetisierten lysosomalen Enzyme entgehen der Bindung an MPR im trans-Golgi-Apparat und werden dadurch sezerniert. Durch MPR300, die an der Zelloberfläche lokalisiert sind, können diese wieder AP-2-abhängig internalisiert und dem Lysosom zugeführt werden (Braulke and Bonifacino 2009).

Die MPRs sind für den spezifischen Transport lysosomaler Enzyme zu ihrem Bestimmungsort von großer Bedeutung. Studien an Patienten mit Mucopolipidose Typ II und III (MLII und MLIII), einer Krankheit mit genereller lysosomaler Dysfunktion, sowie an MPR-defizienten Mäusen und Zellen zeigten jedoch, dass einige Enzyme MPR-unabhängig zu den Lysosomen gelangen. Lysosomale Membranproteine, die nicht M6P-modifiziert sind, gelangen unabhängig von ihrer N-Glykosylierung in das lysosomale Kompartiment (Saftig and Klumperman 2009). Der Transport der Membranproteine erfolgt hauptsächlich über einen direkten, intrazellulären Weg. Vom TGN werden die Membranproteine getrennt von den MPRs in Clathrin-umhüllten Transportvesikel zu den Endosomen transferiert (Hunziker and Geuze 1996; Honing, Sandoval et al. 1998). Einige

Membranproteine, wie die LAP, werden indirekt zu den Lysosomen transportiert, wobei das Vorläuferprotein vom TGN erst zur Plasmamembran und dann durch AP-2 vermittelte Endozytose über die Endosomen zu den Lysosomen gelangt (Braun, Waheed et al. 1989; Prill, Lehmann et al. 1993).

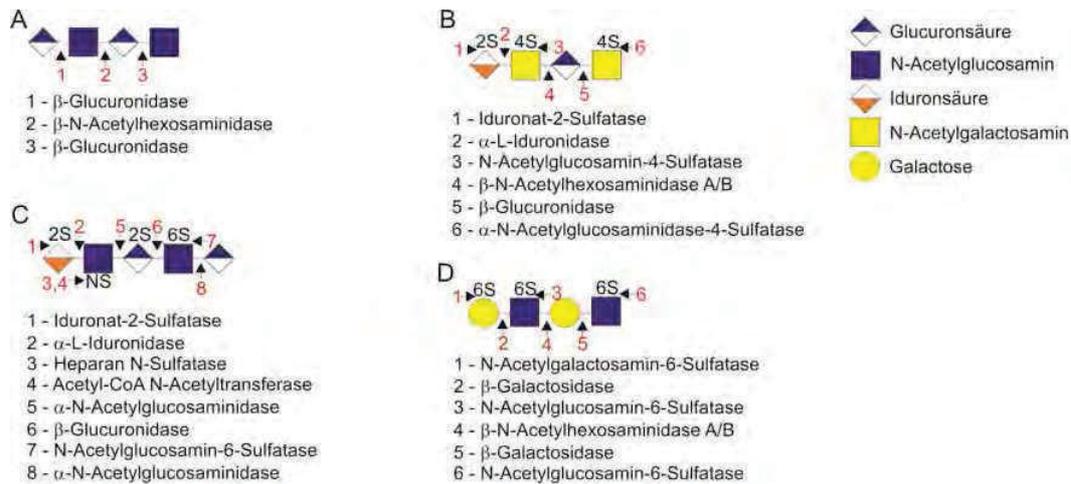
### 1.2.2 Funktion lysosomaler Proteine

In Lysosomen werden unter anderem Zucker durch lysosomale Hydrolasen degradiert. Wie bereits erwähnt, besitzt das Lysosom jedoch auch noch weitere Funktionen, wie die Aktivierung und Stabilisierung lysosomaler Hydrolasen oder den Transport von Metaboliten aus den Lysosomen. Defekte in lysosomalen Enzymen, im Transport der Enzyme, in löslichen, nicht enzymatischen lysosomalen Proteinen oder in Membranproteinen können zu lysosomalen Speichererkrankungen führen (Platt, Boland et al. 2012).

#### 1.2.2.1 Degradation von Glykosaminoglykanen

Proteoglycane befinden sich in sekretorischen Granula, im Zellzwischenraum, an der Zelloberfläche und im extrazellulären Raum und bestehen aus einem Kernprotein, das eine oder bis über hundert Glycosaminoglycan-Ketten (GAGs) kovalent gebundenen hat. Diese GAGs sind lineare Polysaccharide, die aus sich wiederholenden Disacchariden bestehen und an verschiedenen Positionen Sulfatgruppen tragen. Die Disaccharide bestehen aus einem Aminozucker (N-Acetylglucosamin, Glucosamin, N-Acetylgalactosamin) und einer Uronsäure (Glucuronsäure, Iduronsäure) oder Galactose (Afratis, Gialeli et al. 2012). Fünf unterschiedliche Gruppen von GAGs sind bekannt: Dermatansulfate, Heparansulfate, Chondroitinsulfate, Keratansulfate und Hyalurone. Der Abbau der GAGs im lysosomalen Kompartiment erfolgt in aufeinanderfolgenden, enzymatischen Reaktionen vom nicht-reduzierenden Ende der Kette aus, wobei GAG-abhängig 3 bis 8 lysosomale Hydrolasen am Abbau einer Glycankette beteiligt sind (Freeze 2009).

Dermatansulfat und Heparansulfat kommen in freier Form in der extrazellulären Matrix oder als Teil von Proteoglykanen vor, die in der Struktur von Geweben als auch in der interzellulären Kommunikation wichtige Funktionen haben (Campos and Monaga 2012).



**Abbildung 3: Stufenweiser Abbau von Glykosaminoglykanen.** Schematische Darstellung des Abbaus von Tetrasacchariden aus Hyaluron (A), Dermatan- und Chondroitinsulfat (B), Heparansulfat (C) und Keratansulfat (D). GAG-Monosaccharide sind symbolisch dargestellt. Die Nummern an den GAG-Ketten stellen die Reihenfolge des sequentiellen Abbaus dar. Die zugehörigen Enzyme sind jeweils aufgelistet. 2-Sulfat (2S), 4-Sulfat (4S), 6-Sulfat (6S), N-Sulfat (NS) (Abbildung verändert nach (Freeze 2009)).

### 1.2.3 Lysosomale Speichererkrankungen

Viele lysosomale Speichererkrankungen (LSD; *lysosomal storage disorder*) wurden bereits im 19. Jahrhundert erkannt und detaillierter im 20. Jahrhundert beschrieben. Zu dieser Zeit war das Lysosom noch unbekannt, so dass nicht klar war, dass diese Krankheiten ein gemeinsames lysosomales Speichermaterialmerkmal aufweisen (Ballabio and Gieselmann 2009). Die Entdeckung des Lysosoms von Christian de Duve im Jahr 1955 war der erste Schritt, doch die Entwicklung des Konzepts von LSDs wurde erst 10 Jahre später von Hers entwickelt (Hers 1965). Er erkannte, dass jede dieser Erkrankungen einzigartig in ihrem Speichermaterial ist. Strukturanalysen des Speichermaterials erlaubten Hypothesen, welches Enzym für den metabolischen Defekt der Krankheit verantwortlich ist. Mit dieser Methode wurden in den 60ern und 70ern des letzten Jahrhunderts viele enzymatische Defekte in den verschiedenen LSDs identifiziert. Viele LSDs werden durch Defizite in löslichen lysosomalen Enzymen des Lumens, nur eine Minderheit durch Defekte in lysosomalen Membranproteinen verursacht. Bei einigen LSDs ist jedoch auch ein nicht-lysosomales Protein Ursache der Erkrankung, die dann beispielsweise aus dem Endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat oder dem endosomalen Transportweg resultiert (Ballabio and Gieselmann 2009).

Die Gruppe von LSDs umfasst über 40 Erkrankungen, die durch Akkumulation von nicht abgebauten Substraten in den Lysosomen charakterisiert sind (Gieselmann 1995; Futerman and van Meer 2004; Vellodi 2005). Diese Akkumulation der nicht abgebauten Makromoleküle führt zur Bildung von großen Speichervakuolen und letztendlich zu Fehlfunktionen der Zellen und der Gewebe. In Abhängigkeit von der Verteilung und der Menge des gespeicherten Substrates sind meist eine Reihe

unterschiedlicher Organe betroffen. Das klinische Erscheinungsbild der lysosomalen Speichererkrankungen ist aufgrund der unterschiedlichen Ätiologien sehr heterogen und auch bei der einzelnen Erkrankung unterscheidet man verschiedene Schweregrade. Der Verlauf ist jedoch stets fortschreitend. Charakteristische Symptome sind Dysfunktionen des zentralen und peripheren Nervensystems, Skelettdysplasien und die Vergrößerung viszeraler Organe, wie Leber und Milz.

#### 1.2.3.1 Mucopolysaccharidose Typ I (MPSI)

Mucopolysaccharidosen (MPS) sind eine Gruppe von lysosomalen Speichererkrankungen, die durch Defekte im Abbau von Glykosaminoglykanen wie Heparan-, Dermatan- und Chondroitinsulfat verursacht werden. Die meisten Patienten zeigen schwere Beeinträchtigungen des zentralen Nervensystems, Organvergrößerungen, Erkrankungen des Knorpels mit Beeinträchtigungen in Gelenken und einem reduzierten Knochenwachstum. Bislang gibt es 11 nachgewiesene Mucopolysaccharidosen, jede verursacht durch Beeinträchtigung eines lysosomalen Enzyms, das in der Degradation eines Polysaccharids eine Rolle spielt. Diese Erkrankungen sind nummeriert von MPS I bis MPS IX und benannt nach den Entdeckern, die die Symptome zuerst beschrieben oder die zugrunde liegende Enzymdefizienz entdeckt haben.

MPSI ist eine der häufigsten LSDs mit einer Verbreitung von 1:125000 Lebendgeburten und zeigt ein autosomal-rezessives Vererbungsmuster (Wolf, Lenander et al. 2012). Ursache der Krankheit ist ein Defekt im lysosomalen Enzym  $\alpha$ -L-Iduronidase (IDUA) (Kakkis, Muenzer et al. 2001). Das IDUA-Enzym (EC. 3.2.1.76) trägt zum Abbau von Dermatan- und Heparansulfat bei. Intralysosomale Akkumulation dieser Substrate resultiert in pathologischen Prozessen, die zu chronischen und progressiven Fehlfunktionen in Zellen, Geweben und Organen im Körper führen (Clarke 2008). Patienten mit MPSI zeigen eine starke klinische Heterogenität im Schweregrad der Symptome im Skelett, Herz, Verdauungs-, Atmungs- und zentralen Nervensystem. Nach der Synthese im ER wird die Iduronidase posttranslational mittels M6P an einen Asparaginrest gebunden und somit über den M6P-abhängigen Transportweg zum Lysosom gebracht. Ein geringer Anteil des Enzyms gelangt jedoch aus der Zelle in den extrazellulären Raum und kann über M6P-Rezeptoren auf der Oberfläche von Nachbarzellen mittels Endozytose wieder dem Transportzyklus zu den Lysosomen zugeführt werden (Rome, Weissmann et al. 1979; Unger, Durrant et al. 1994; Tsukimura, Tajima et al. 2008). IDUA-defiziente Zellen sind in der Lage über diesen Weg das Enzym aufzunehmen und können somit einen Teil der akkumulierten GAGs verstoffwechseln. Für eine Therapie der Krankheit wurde sich dieser kreuzkorrektive Mechanismus zunutze gemacht. Es werden zwei Subtypen der Krankheit unterschieden, zum einen die schwere Form der MPSI, auch Morbus Hurler genannt, zum anderen die mildere Form, auch als Morbus Scheie bekannt, die keine zerebrale Symptomatik zeigt. Im

Morbus Hurler sind die ersten Anzeichen der Krankheit zwischen dem 6. und dem 24. Monat nach Geburt erkennbar, die in einer signifikanten Entwicklungs- und Wachstumsverzögerung, Makrokephalie, Dysostosis Multiplex, Kontraktur der Gelenke, Hepatosplenomegalie, Hornhauttrübung, Taubheit und intellektueller Beeinträchtigung resultieren. Der Tod des Patienten erfolgt hier meist vor dem Alter von 10 Jahren aufgrund von Atemwegs- oder Herzproblemen (Kakkis, Muenzer et al. 2001; Moore, Connock et al. 2008). Ein erster diagnostischer Schritt ist eine Untersuchung des Sammelurins auf eine pathologische Ausscheidung von GAGs. Die endgültige Diagnose wird dann über eine Enzymuntersuchung in Serum, Fibroblasten und Leukozyten getroffen. Zwei Therapiemöglichkeiten werden derzeit verwendet, um die Symptome zu reduzieren, eine vollständige Heilung ist jedoch nicht möglich. Dabei sollten sich die Behandlungsmöglichkeiten ganz an den Symptomen der Patienten orientieren. Wird eine MPSI frühzeitig diagnostiziert, idealerweise vor dem 18. Lebensmonat, kann eine Knochenmarktransplantation (KMT) dem Patienten positiv helfen, jedoch reduziert diese die skelettalen Defekte nicht übermäßig (Oussoren, Brands et al. 2011). Bei einer zentralnervösen Ausprägung der Erkrankung ist eine KMT nur wenig effektiv (Krivit, Aubourg et al. 1999). Eine weitere Methode ist die wöchentliche Injektion von rekombinanter  $\alpha$ -Iduronidase, die insbesondere für solche Formen der MPSI verwendet wird, die ohne zentralnervöse Manifestation einhergehen. Das Enzympräparat Aldurazyme® wird in den USA und in Europa zur Behandlung von Patienten mit MPSI verwendet (0,58 mg/kg Körpergewicht/Woche).

#### 1.2.3.2 Saure Phosphatasen

Saure Phosphatasen (EC 3.1.3.2) gehören zur Familie der Enzyme, die aufgrund ihrer Struktur, ihrer katalytischen und immunologischen Eigenschaften, der gewebsspezifischen und subzellulären Verteilung unterschieden werden können. Bislang konnten drei Isoformen von extrazytoplasmatischen sauren Phosphatasen identifiziert werden, die zur Gruppe der Orthophosphor-Monoesterasen mit einem sauren pH-Optimum gehören (Drexler and Gignac 1994), die PAP (*Acid phosphatase of the prostate*) (Vihko, Virkkunen et al. 1988), auf die nicht weiter eingegangen wird, die ubiquitär exprimierte, Tartrat-sensitive LAP (*Lysosomal acid phosphatase*, Acp2) (de Araujo, Mies et al. 1976) und die lysosomale, Tartrat-resistente TRAP (*Tartrate-resistant acid phosphatase type 5*, Acp5) (Clark, Ambrose et al. 1989).

Die LAP, auch als biochemischer Marker für Lysosomen verwendet, wird als ein 63 kDa integrales Typl-Membranprotein synthetisiert und zu den Lysosomen über die Plasmamembran transportiert (Braun, Waheed et al. 1989). Die LAP wird in allen Geweben mit Ausnahme der Hoden und des Gehirns exprimiert (Saftig, Hartmann et al. 1997). *In vitro* spaltet LAP eine Reihe von Phosphomonoestern, beispielsweise Adenosinmonophosphat oder Glukose-6-Phosphat (Gieselmann,

Hasilik et al. 1984) bei saurem pH-Wert (3,5 bis 5,0), *in vivo* dephosphoryliert Acp2 zusammen mit Acp5 M6P-haltige lysosomale Proteine (Makrypidi, Damme et al. 2012). Ein Fehlen von Acp2 bewirkt eine autosomal-rezessive Krankheit, die den Metabolismus mit Symptomen wie andauerndem Erbrechen, Hypotonie, Lethargie und Blutungen in früher Kindheit betreffen (Nadler and Egan 1970).

TRAP oder Acp5 ist ein 35 bis 37 kDA Glycoprotein (Hayman, Macary et al. 2001). Acp5 wird als latent-inaktives Proenzym synthetisiert, das über den M6P-anhängigen lysosomalen Transport zum Zielort gebracht wird (Baumbach, Saunders et al. 1984). Im Lysosom wird es durch eine Cysteinprotease in zwei Untereinheiten gespalten und aktiviert (Ljusberg, Ek-Rylander et al. 1999; Lang and Andersson 2005). Acp5 wird in hohem Maße im Knochen, in den Nieren, in der Leber, im Thymus und im Colon exprimiert, weniger stark ist die Expression im Gehirn und im Herzen. Von besonderem Interesse ist die hohe Expressionsrate von TRAP in Makrophagen, dendritischen Zellen und Osteoklasten (Hayman, Bune et al. 2000; Hayman, Bune et al. 2000). Zwei Isoformen von Acp5 sind bekannt, TRAP5b ist im Osteoklasten exprimiert und ein Marker für das Wachstum und Remodelling von Knochen, TRAP5a wird von Zellen der monozytären Linie produziert und ist ein unspezifischer Marker für die Aktivierung von Makrophagen und ein spezifischer Marker für Haarzelleukämie (Hayman 2008; Janckila, Lederer et al. 2009). 2011 publizierten Lausch et al., dass eine Fehlfunktion der TRAP Spondyloenchondrodysplasie (SPENCD) hervorrufen kann, die assoziiert wird mit einer skelettalen Dysplasie, zerebraler Kalzifizierung, neurologischen Symptomen und einer Autoimmunität (Lausch, Janecke et al. 2011). Ein Hauptsubstrat der TRAP ist Osteopontin (OPN), ein multifunktionales Protein, das zwei Isoformen besitzt, eine extrazellulär sezernierte Isoform, die von Thrombin gespalten wird, Zelloberflächenmoleküle und CD44 bindet und Anheftung, Migration und Aktivierung von Osteoklasten und Immunzellen reguliert. Die zweite, nicht sezernierte, intrazelluläre Isoform vermittelt Signaltransduktion über den TLR9 (*Toll-like receptor 9*), der in Endosomen von dendritischen Zellen exprimiert wird (Behrens and Graham 2011). Es ist bekannt, dass TRAP das Knochenmatrixprotein *in vivo* dephosphoryliert (Andersson, Ek-Rylander et al. 2003). Es wird auch angenommen, dass TRAP benötigt wird, um OPN zu prozessieren und/oder zu degradieren (Suter, Everts et al. 2001). Wie bereits erwähnt, ist Acp5 in Kombination mit Acp2 für die Dephosphorylierung von lysosomalen Proteinen verantwortlich (Makrypidi, Damme et al. 2012).

## 1.2.4 Murine Tiermodelle lysosomaler Speichererkrankungen

### 1.2.4.1 MPSI

Die Generierung von *Idua*<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde durch homologe Rekombination mittels eines NeoR-Interruptionskonstrukts in das Exon 6 des *Idua*-Wildtypallels erreicht. Nach Geburt sind die *Idua*-defizienten Tiere lebensfähig, fertil und unterscheiden sich nicht von Wildtypgeschwistern. Nach 4

Wochen verändern sich jedoch, ähnlich wie bei MPSI-Patienten, die Gesichtszüge und auch die Pfoten der defizienten Tiere vergrößern sich. Die *Idua*<sup>-/-</sup>-Tiere zeigen Dysostosis Multiplex, eine 3-fach erhöhte GAG-Ausscheidung im Harn und eine gestörte lysosomale Speicherung in Leber, Milz, Niere, Knochen, Muskel, Luftröhre und Gehirn (Clarke, Russell et al. 1997). 2009 untersuchte die Arbeitsgruppe von Wilson et al. die Akkumulation von GAGs in *Idua*-defizienten Mausknöchel und fand heraus, dass diese einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität von Cathepsin K, einer lysosomalen Protease, die im Osteoklasten hoch exprimiert wird und für die Knochenresorption verantwortlich ist, hat. Dies resultiert in einer gestörten Osteoklastenaktivität und einer verminderten Resorption von Knorpel, was die Knochenpathologie in MPS-Krankheiten erklären könnte (Wilson, Hashamiyan et al. 2009). Sie zeigten auch, dass die Expression von Cathepsin K in den Osteoklasten der *Idua*-defizienten Tiere stark erhöht war, jedoch der Abbau von Knochen während der Ossifikation reduziert war. Dies lässt darauf schließen, dass die erhöhten Mengen an Dermatansulfat und Heparansulfat, wie sie in diesem Krankheitsbild vorliegen, einen inhibitorischen Effekt auf Cathepsin K, nämlich das Potenzial Collagen aus Knorpel und Knochen zu degradieren, haben.

#### 1.2.4.2 *Acp5*<sup>-/-</sup>

Zur Generierung von *Acp5*<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde das ursprüngliche *Acp5*-Gen durch homologe Rekombination mit einer verkürzten Variante des Gens, einem *targeting replacement vector* (*Acp5* (neoR)tk), ersetzt (Lord, Cross et al. 1990; Grimes, Reddy et al. 1993; Hayman, Jones et al. 1996). *Acp5*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen eine normale Lebensdauer und Fertilität (Hayman, Jones et al. 1996), einen milden osteopetrotischen Phänotyp mit einem endochondralen Ossifikationsdefekt, einer Verdickung der Kortikalis, progressiver Verformung und Fehlbildung der Röhrenknochen und des axialen Skeletts, jedoch mit einem scheinbar normalen Zahndurchbruch und einer Schädeldachentwicklung (Hayman, Jones et al. 1996; Suter, Everts et al. 2001). Mikroskopische Untersuchungen von Knochenschnitten zeigen eine Desorganisation von Chondrozyten, einer verdickten trabekulären Metaphyse assoziiert mit einem verminderten Modelling und einer verminderten Mineralisierung der Knorpelmatrix. *Acp5*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen einen qualitativen Defekt in der osteoklastären Aktivität, was zu einem Ungleichgewicht zwischen neugebildetem Knochen und Resorption führt (Hayman, Jones et al. 1996). Zusätzlich ist bekannt, dass diese Mäuse eine nicht funktionierende Entzündungsreaktion und eine verminderte Abwehr gegenüber dem Pathogen *Staphylococcus aureus* aufweisen (Bune, Hayman et al. 2001).

#### 1.2.4.3 *Acp2*<sup>-/-</sup>

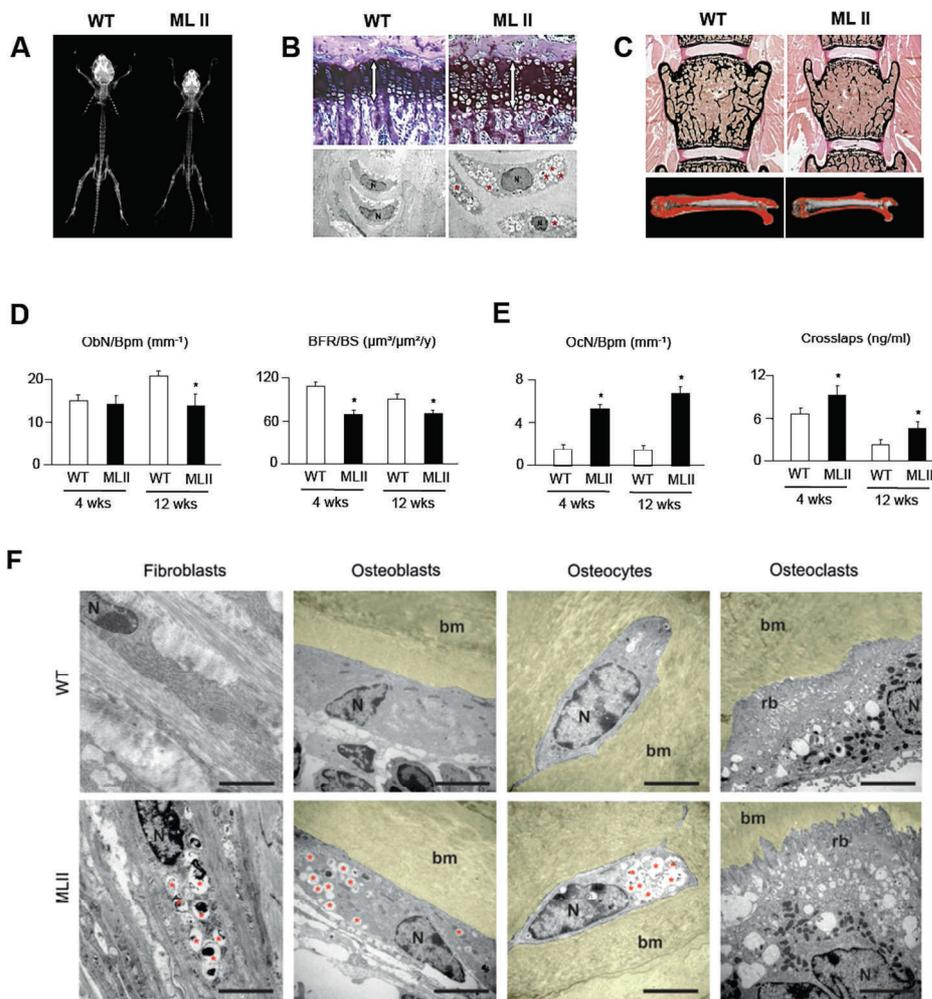
Zur Generierung von *Acp2*<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde durch Insertion einer NeoR-Expressionskassette mittels homologer Rekombination ins Exon 7 des LAP Gens ein Stopcodon in den offenen Leserahmen des Gens eingefügt und somit das funktionsfähige Acp2 vor Translation inhibiert. *Acp2*<sup>-/-</sup>-Mäuse sind fertil und entwickeln sich normal (Saftig, Hartmann et al. 1997). Mikroskopische Untersuchungen zeigen lysosomales Speichermaterial in spezifischen Geweben und einigen Zelltypen wie Podozyten in der Niere oder in einigen Segmenten des Nephrons sowie im Gehirn besonders in astroglialen und microglialen Zellen. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zeigen einige der *Acp2*<sup>-/-</sup>-Mäuse epileptische, tonisch-klonische Krampfanfälle ab einem Alter von acht Wochen, was aufgrund von astroglialer Veränderung ausgelöst werden kann (Saftig, Hartmann et al. 1997). Auch Knochenabnormitäten wie Missbildungen in der Wirbelsäule oder Röhrenknochen der oberen und unteren Extremitäten konnten in Mäusen festgestellt werden, die älter als 15 Monate waren. Einhergehend mit einer Calciumabnahme in der Knochenkompakta konnte eine progressive Veränderung in der Knochenmorphologie beobachtet werden, die besonderes prominent in der Brustwirbelsäule und Lendenwirbelsäule war. Die einzelnen Wirbelkörper zeigten eine Verdickung entlang der dorso-ventralen Achse und eine verminderte cranio-kaudale Höhe.

#### 1.2.4.4 *Acp2*<sup>-/-</sup>/*Acp5*<sup>-/-</sup>

Zur Generierung des Mausmodells für *Acp2/Acp5*-Defizienz wurden jeweils *Acp2*- und *Acp5*-defiziente Tiere miteinander verpaart (Hayman, Jones et al. 1996; Saftig, Hartmann et al. 1997). Die *Acp2*<sup>-/-</sup>/*Acp5*<sup>-/-</sup>-Tiere zeigen einen schwereren Phänotyp als die einzel-defizienten Tiere, sind jedoch lebensfähig und fertil. Diese Mäuse weisen eine progressive Hepatosplenomegalie, eine Gangveränderung aufgrund einer Verkürzung der Röhrenknochen besonders in Femur und Tibia und einer Vergrößerung der Wachstumsfuge auf. Desweiteren zeigen mikroskopische Untersuchungen, dass die *Acp2/Acp5*-defizienten Tiere große Mengen an lysosomalem Speichermaterial in Makrophagen in Leber, Milz, Niere und Knochenmark aufweisen. Suter et al. konnten zeigen, dass *Acp2* und *Acp5* eine überlappende Funktion für einige Substrate haben, jedoch beide benötigt werden, um nicht-collagene Proteine inklusive Osteopontin zu prozessieren (Suter, Everts et al. 2001). 2011 konnten Makrypidi et al. belegen, dass in *Acp2* und *Acp5* vorhanden sein müssen, um M6P-haltige lysosomale Proteine zu dephosphorylieren und um Abbauprodukte zu hydrolysieren und zu entfernen (Makrypidi, Damme et al. 2012).

### 1.3 Aufgabenstellung

In Zusammenarbeit mit der AG Bräulke (Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, UKE, Hamburg) wurde kürzlich der skeletale Phänotyp eines Mausmodells mit Mucopolidose Typ II (MLII-Maus), einer lysosomalen Speichererkrankung mit einer generalisierten lysosomalen Dysfunktion, charakterisiert (Kollmann, Pestka et al. 2013). Es zeigte sich, dass das Längenwachstum aufgrund einer Akkumulation lysosomalen Speichermaterials in Chondrozyten der Wachstumsfuge in den MLII-Mäusen beeinträchtigt war, und dass der osteoporotische Phänotyp dieser Mäuse von reduzierter Knochenbildung durch Osteoblasten begleitet wurde. Unerwartet war jedoch, dass die Osteoklasten der MLII-Mäuse keine pathologischen Veränderungen aufwiesen, aber in ihrer Anzahl deutlich erhöht waren.



**Abbildung 4: Skeletaler Phänotyp eines Mausmodells für MLII.** A: In der Röntgenaufnahme zeigt sich ein vermindertes Längenwachstum der MLII-Mäuse. B: Die histologische Untersuchung der Wachstumsfuge zeigt einen lysosomalen Defekt der Chondrozyten auf. C: Durch von Kossa/van Gieson-Färbung von Wirbelkörper-Schnitten und durch  $\mu$ CT-Analyse der Femora konnte ein osteoporotischer Phänotyp in MLII-Mäusen nachgewiesen werden. D: Die Anzahl an Osteoblasten ist in MLII-Mäusen nicht verändert, die Knochenbildungsrate (BFR/BS) ist jedoch signifikant reduziert. E: Die Anzahl der Osteoklasten (OcN/Bpm) und die Serum-Konzentration Knochen-spezifischer Collagen-Abbauprodukte (Crosslaps) sind in MLII-Mäusen signifikant erhöht. F: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von verschiedenen Zellen. In Fibroblasten, Osteoklasten, Osteoblasten und Osteozyten, jedoch nicht in Osteoklasten, akkumuliert nicht-degradiertes Speichermaterial in den Lysosomen.

Da die oben beschriebenen Ergebnisse aufzeigen, dass eine lysosomale Fehlfunktion zu sehr spezifischen Veränderungen von Differenzierung und Aktivität Knochen-relevanter Zelltypen führt, ist es von entscheidender Bedeutung, die gleiche Art der Analyse auch zur Erforschung anderer lysosomaler Speicherkrankheiten anzuwenden.

In dieser Dissertation sollte zunächst der skelettale Phänotyp *Idua*-defizienter Mäuse auf histologischer, zellulärer und molekularer Ebene charakterisiert werden. In einem weiteren Schritt sollte der Einfluss einer Knochenmarktransplantation (KMT) und einer Enzymersatztherapie (EET) auf den skelettalen Phänotyp *Idua*-defizienter Mäuse untersucht werden. Parallel zu diesen Untersuchungen war ebenso angestrebt, *Idua*-defiziente Mäuse nach einer vorausgegangenen KMT ebenfalls mit einer EET zu behandeln und auch hier die Mäuse auf histologischer Ebene zu charakterisieren.

Ein weiterer Fokus der Arbeit sollte zusätzlich auf dem Vergleich der *Idua*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit weiteren Modellen lysosomaler Speichererkrankungen liegen. Von besonderem Interesse war hierbei ein Mausmodell mit gleichzeitiger Defizienz der Gene *Acp2* und *Acp5*, die eine wichtige Rolle in der Dephosphorylierung von M6P-haltigen Enzymen des Lysosoms spielen und damit direkt für die Hydrolyse und Entfernung von Abbauprodukten der Zelle benötigt werden. Hierdurch verbleiben lysosomale Enzyme innerhalb der Zelle. Dieses Mausmodell steht somit im Gegensatz zum MLII-Modell, in dem lysosomale Enzyme aufgrund einer Fehlfunktion nicht an einen M6P-Rest gebunden und dadurch extrazellulär sezerniert werden.

Da eine Beeinträchtigung des Skelettsystems für mehrere lysosomale Speicherkrankheiten beschrieben wurde, war das übergeordnete Ziel dieser Dissertation somit, die Bedeutung lysosomaler Prozesse im Knochenumbau besser zu charakterisieren.

## 2 Material

Agarose-Gelelektrophorese: BioRad Sub-Cell®	BioRad, München
Analysenwaage BP 221S	Sartorius, Göttingen
Analysenwaage BL 600	Sartorius, Göttingen
Arbeitsbank, steril, Hera Safe	Heraeus, Hanau
Autotechnikon	Bavimed, Birkenau
Brutschrank	Memmert, Schwabach
Dampfsterilisator: Webeco Modell H	Webeco GmbH, Bad Schwartau
Dispergiergerät Ultra Turrax T25	IKA, Staufen
ELISA- Reader, VersaMAX tunable microplate reader	MolecularDevices, Sunnyvale, USA
Inkubator RFI-125	Infors AG, Basel, Schweiz
Kamera, AxioCam	Zeiss, Göttingen
Kamera, EOS 10D	Canon, Krefeld
Magnetrührer	Heidolph, Kelheim
Mikroskop, Olympus BH-2 RFCA	Olympus, Hamburg
Mikroskop, Olympus CHT Olympus	Olympus, Hamburg
NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000	PEQLAB GmbH, Erlangen
Power-Supply, Power Pac 1000	BioRad, München
pH Meter MP 220	Mettler Toledo, Giessen
Photometer, Ultraspec 2100 pro	GE Healthcare, München
<i>Real time</i> -PCR-Cycler, Applied Biosystems StepOnePlus®, 96well format	Applied Biosystems, Foster, USA
Röntgenentwickler, OPTIMAX	Protec, Oberstenfeld
Röntgengerät Faxitron Xray Sterile	Faxitron Xray Corp., Wheeling, USA
Rotationsmikrotom	Enno Vieth, Hamburg
Rührmixer, Minishake MS1	IKA, Staufen
Schleifmaschine, Phoenix Alpha	Buehler, Stuttgart
Schüttler Duomax 1030	Heidolph, Kelheim
Schüttelinkubator, GFL 3031	GFL, Burgwedel
Thermocycler Eppendorf Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
UV-Tisch	BioRad, München

Wasserbad, GFL 1086	GFL, Burgwedel
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5430 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge GS-6	Beckman Coulter, Krefeld

### 2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Fluka (Neu Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Roche (Mannheim), Gibco (Karlsruhe) und Sigma (München) bezogen. Restriktionsendonukleasen, Taq- Polymerase sowie andere Enzyme wurden von Fermentas (St. Leon-Roth), New England Biolabs (Frankfurt am Main) und Roche (Mannheim) rekombinante Proteine von den Firmen PeproTech (Hamburg) und R&D Systems (Minneapolis, USA) bezogen.

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Falcon Reaktionsgefäße, 15 ml und 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Filter, Bottle Top	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Filter, 0,45 µm	VWR, Darmstadt
Gewebekulturplatten	Greiner, Frickenhausen
Gewebekulturschalen	Greiner, Frickenhausen
Kanülen, Gr20, 100 Sterican	Braun, Melsungen
Optische Folien, MicroAmp	Applied Biosystems, Foster City, USA
Optische 96-Kammer-Platten mit Barcode	Applied Biosystems, Foster City, USA
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen mit Filter	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten	BD Falcon, Heidelberg
Spritzen, 1 ml	Braun, Melsungen
Spritzen, 20 ml	BD Falcon, Heidelberg
Zellsieb, 100 µm	BD Falcon, Heidelberg

### 2.1.3 Kits und Assays

TaqMan® Gene Expression Assays

Alle verwendeten Reagenzien wurden bei der Firma Applied Biosystems (Foster, USA) bestellt und nach Angaben des Herstellers verwendet.

TaqMan® Gene Expression Master Mix #4369016

Genspezifische Assays:

Acp5 (TRAP)	Mm00475698_m1
Bglap (Osteocalcin)	Mm03413826_mH
Calcr (Cacitonin-Rezeptor)	Mm00432271_m1
Ctsk (Cathepsin K)	Mm00484039_m1
Fgf21 (Fibroblasten Wachstumsfaktor 21)	Mm00840165_g1
Gapdh (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)	Mm99999915_g1
Ibsp ( <i>Bone sialoprotein</i> )	Mm00492555_m1
Il-6 (Interleukin 6)	Mm00446190_m1
Tnfsf11 ( <i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i> (RANKL))	Mm00441906_m1
Pparγ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma)	Mm01184322_m1
Ucp1 ( <i>Uncoupling protein 1</i> )	Mm01244861_m1

#### 2.1.4 Puffer und Lösungen

Alizarinrot-Färbelösung	40 mM Alizarinrot S, pH 4,2
Calcein-Injektionslösung	0,15 M NaCl, 2 % NaHCO <sub>3</sub> , 1 % Calcein
DEPC-H <sub>2</sub> O	2 ml Diethylpyrokarbonat auf 1000 ml H <sub>2</sub> O, schütteln und ü.N. bei RT inkubieren lassen und anschließend autoklavieren.
EDTA (20 %)	200 g Titriplex III auf 2000 ml H <sub>2</sub> O
Gießlösung (Acrylat-Histologie)	1000 ml Methylnmethacrylat (entstabilisiert), 3,3 g Benzoylperoxid, 100 ml Nonyl-Phenol Vor dem Gießen der Blöcke: 500 µl N,N Dimethyl-p-Toluidin auf 100 ml Gießlösung geben
Van Gieson-Färbelösung	2,5 g Säurefuchsin

	<p>900 ml gesättigte Pikrinsäure</p> <p>100 ml Glycerin</p> <p>5 ml konz. Salpetersäure</p>
Infiltrationslösung I (Acrylat)	<p>1000 ml Methylmetacrylat, entstabilisiert</p> <p>3,3 g Benzoylperoxid, getrocknet</p>
Infiltrationslösung II (Acrylat)	<p>1000 ml Methylmetacrylat, entstabilisiert</p> <p>3,3 g Benzoylperoxid, getrocknet</p> <p>100 ml LPG (Nonyl-Phenol)</p>
Von Kossa-Färbelösung	3 g Silbernitrat auf 100 ml H <sub>2</sub> O
Mausschwanz-Lysis-Puffer	<p>100 mM EDTA, pH 8,0</p> <p>50 mM Tris, pH 8,0</p> <p>100 mM NaCl</p> <p>1 % SDS</p>
1 x PBS Puffer	<p>10 mM Di-Natriumhydrogenphosphat</p> <p>137 mM NaCl</p> <p>2,7 mM KCl</p> <p>2 mM Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7,4</p>
D-PBS 1x für Zellkultur (steril)	fertige Lösung, Gibco (Invitrogen, Karlsruhe)
Proteinase K-Lösung	25 mg Proteinase K in 25 ml H <sub>2</sub> O lösen und bei -20 °C lagern
50 x TAE-Puffer	<p>2 M Trizma-Hydrochlorid</p> <p>50 mM EDTA, pH 7,8</p>
Roti®-P/C/I	Redestilliertes, in TE-Puffer äquilibriertes Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 25: 24:1. (gebrauchsfertige Lösung, Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Soda-Formollösung	12,5 g Natriumkarbonat in 187 ml H <sub>2</sub> O gelöst + 62,5 ml 37 % Formaldehydlösung
TRAP-Färbelösung	<p>5 mg Naphtol ASMX Phosphat in 500 µl DMF lösen und zu 50 mL TRAP-Puffer geben;</p> <p>30 mg Fast Red Violet LB Salz dazugeben, gut mischen und direkt verwenden</p>
TRAP-Puffer	<p>40 mM Natriumacetat</p> <p>10 mM Natriumtartrat, pH 5,0</p>
Toluidin-Färbelösung	1,0 g Toluidinblau O auf 100 ml dest. H <sub>2</sub> O pH

	mit HCl auf 4,5 eingestellt
Verdaupuffer Adipozyten	2 mg/ml Collagenase A 2 % (w/v) Bovines Serumalbumin Faktion V Steril filtrieren

## 2.1.5 Primersequenzen

### 2.1.5.1 Primer für Genotypisierung

PCR	Primer		Größe [bp]
MPS I WT	WT1	5'GGAACCTTGAGACTTGAATGAACCAG3'	550
	WT2	5'CATTGTAAATAGGGGTATCCTTGAACTC3'	
MPS I KO	KO 1	5'GGAACCTTGAGACTTGAATGAACCAG3'	350
	KO 2	5'GGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCT3'	
LAP	Acp2 GT for	5'GCCCCTCTGCCTCACCTCTCTG3'	397 (WT)
	Acp2 GT rev	5'GGCAACTAGCAGGGATGGCCG3'	ca. 1500 (KO)
TRAP	Acp5 GT for 2	5'AGCGCTTCTGACTGAGCTGC3'	997 (WT)
	Acp5 GT rev 2	5'AACCGTGCAGACGATGGGCG3'	ca. 2000

### 2.1.5.2 Primer für Reverse Transkriptase-PCR

PCR		Primer
Idua	for	5'CCACCCACGTGCAGTTGCT3'
	rev	5'TGGCTCTCATGAGGCAGGGACAT3'
Acp2	for	5'CAGCCCTATTTGGGGCCACGG3'
	rev	5'TTGCTCTTCCACCGAGCCTTGC3'
Acp5	for	5'TCCTGGAGGCACCGCCAAGAT3'
	rev	5'CCATGAAGTTGCCGGCCCCA3'

## 2.1.6 Medium und Zusätze

Normalmedium	Minimum Essential Medium (MEM, alpha Modifikation, Sigma # M0894 + 2,2 g Bicarbonat + 1000 ml H <sub>2</sub> O
Osteoklasten-Kulturmedium	Normalmedium + 1 % einer Penicilin/Streptomycin

	Antibiotikallösung (Gibco # 15140) + 10 % hitzeinaktiviertes FBS (# 10270-106)
Osteoklasten-Differenzierungsmedium	Osteoklasten-Kulturmedium + 20 ng/ml M-CSF + 40 ng/ml sRANKL + 10 nM 1,25-Dihydroxy-VitD
Osteoblasten-Kulturmedium	Normalmedium + 1 % einer Penicilin/Streptomycin Antibiotikallösung (Gibco # 15140) + Hyclone # CH30160.03
Osteoblasten-Differenzierungsmedium	Osteoblasten-Kulturmedium + 50 ng/ml Ascorbat + 10 mM $\beta$ -Glycerolphosphat
Adipozyten-Kulturmedium	DMEM-F12 + 10 % hitzeinaktiviertes NCS (Sigma # N4762) + 1 % einer Penicilin/Streptomycin Antibiotikallösung (Gibco # 15140) + 8 mM Biotin in H <sub>2</sub> O (Sigma # B4639) + 18 mM Panthotensäure in H <sub>2</sub> O (Sigma # P5155) + 100 mM Ascorbat (Sigma A4034)
Adipozyten- Differenzierungsmedium	Adipozyten-Kulturmedium + 1 $\mu$ M Dexamethason + 500 $\mu$ M Isobutylmethylxanthin 5 $\mu$ g/ml Insulin

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Präparation genomischer DNA

Zur Genotypisierung von Mäusen wurde genomische DNA mittels der Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert. Neugeborenen Mäusen wurde von hauseigenen Tierpflegern bis zu 5 mm der Schwanzspitze mit einer scharfen Schere abgeschnitten. Die Schwanzspitze wurde mit 700 µl Lysispuffer und 50 µl Proteinase K–Stocklösung (10 mg/ml) versetzt und für 2 Stunden bei 55°C im Schüttelinkubator bei Maximalgeschwindigkeit verdaut. Nach dem Verdau wurde das gleiche Volumen eines Phenol-Chloroform-Gemischs hinzugegeben, kräftig vermischt und für 15 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Es erfolgte eine Phasentrennung in eine wässrige, obere Phase, eine Interphase und eine untere Phase. Die obere, wässrige Phase mit der enthaltenen genomischen DNA wurde nun vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Hierzu wurde anschließend das gleiche Volumen Isopropanol gegeben, kräftig geschüttelt und erneut für 15 Minuten 13.000 rpm zentrifugiert. Durch die Zugabe des Isopropanols wurde der DNA die Hydrathülle entzogen und diese fiel aus. Das Isopropanol wurde dekantiert und das entstandene DNA-Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach einem erneuten 5 minütigem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgenommen, das Pellet bei 30°C für 5 Minuten getrocknet und in 50 µl Wasser resuspendiert. Nach vollständiger Resuspension wurde die aufgereinigte DNA 1:10 mit Wasser verdünnt und war somit gebrauchsfertig für eine Genotypisierung der Maus mittels PCR.

#### 3.1.2 Präparation von RNA

Zur Isolierung von RNA aus primären Zellen wurde das Kit von Macherey Nagel, Nucleo Spin RNA verwendet. Die Präparation erfolgte nach dem Herstellerprotokoll.

Die Isolierung von RNA aus Geweben erfolgte mittels Trizol-Chloroform-Extraktion. Hierfür wurde maximal 100 mg Mausgewebe in 1 ml Trizol-Reagenz überführt und mit Hilfe eines Ultra Turrax homogenisiert. Dieser Mix wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in das bereits 300 µl Chloroform vorgelegt wurde. Nach kräftigem Schütteln erfolgte ein 15 minütiger Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm und 4°C. Dabei bildeten sich drei Phasen, eine oberste, RNA-haltige Phase, die vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Zur Fällung der RNA wurde 500 µl Isopropanol hinzugegeben, vermischt und erneut 15 Minuten zentrifugiert bei 13.000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut wie oben beschrieben zentrifugiert und anschließend getrocknet. Das

Pellet wurde in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen und resuspendiert. Die Qualität und Konzentration wurde mit Hilfe des *NanoDrop* bestimmt. Weitere Arbeitsschritte mit der RNA erfolgten auf Eis.

### 3.1.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese) und quantitative Realtime-PCR

Mit Hilfe des Cloned AMV First-Strand Synthesis Kit von Invitrogen erfolgte die Synthese von cDNA aus RNA nach Angaben des Herstellers. Hierbei wurde 1 µg RNA umgeschrieben. Die 1:5 verdünnte cDNA diente anschließend als Matrize für die quantitative Realtime-PCR.

## 3.2 Zellbiologische Methoden

### 3.2.1 Generierung von Osteoblasten und Osteoklasten aus Knochenmarkzellen

Zur Gewinnung von Osteoblasten und Osteoklasten aus Knochenmarkzellen wurden erwachsene Mäuse im Alter ab 8 Wochen verwendet. Hierzu wurden die Mäuse getötet, mit Ethanol desinfiziert und die Femora und Tibien extrahiert. Weitere Arbeitsschritte erfolgten nun unter der Sterilwerkbank. Die Knochen wurden in 80 % Ethanol desinfiziert und in 1x PBS gespült, im Anschluss an einer Seite mit einer Schere aufgeschnitten und in ein vorbereitetes Auffanggefäß, bestehend aus einem 200 µl Eppendorf Tube mit Loch im Boden in einem 1,5 ml Eppendorf Tube, überführt. Durch Zentrifugation bei 8.000 rpm für 10 Sekunden wurde das Knochenmark aus den Röhrenknochen herausgespült und dieses zügig im jeweiligen Komplettmedium aufgenommen. Die resuspendierten Zellen wurden über ein 100 µm Zellsieb filtriert und bei 1.300 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und das Zellpellet im jeweiligen Komplettmedium aufgenommen. Die Zellen wurden ausgezählt und mit einer Zelldichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml auf Kulturschalen im jeweiligen Komplettmedium ausplattiert. Zum Osteoklasten-Komplettmedium wurde zusätzlich 10 nM 1,25-Dihydroxy-VitD (Stammlösung 10µM, in EtOH, bei -20°C, in Glas, lichtgeschützt gelagert) zugesetzt. Nach 2 Tagen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach Erreichen einer ca. 80 %igen Konfluenz wurde die Differenzierung der beiden Zelltypen eingeleitet: zu den Osteoblasten wurde zusätzlich 50 µg/ml Ascorbat und 10 mM β-Glycerolphosphat in das Komplettmedium gegeben, die Osteoklasten wurden mit 40 ng/ml sRANKL und 20 ng/ml M-CSF induziert. Bis zur Endpunktanalyse wurde das Differenzierungsmedium alle 2 Tage gewechselt.

### 3.2.2 Primäre Osteoblasten-Kulturen aus Maus-Schädeldächern

Zur Gewinnung von primären Osteoblasten wurden Schädeldächer aus 3 bis 5 Tage alten Mäusen herauspräpariert und in sterilem 1x PBS gewaschen. Danach wurden diese für 10 Minuten bei 37 °C

im Schüttelinkubator bei 250 rpm in einer 0,1 % Collagenase/ 0,2 % Dispase- $\alpha$ -Mem-Lösung verdaut. Der Überstand wurde verworfen und die Schädeldächer wurden erneut in der Collagenase/Dispase-Lösung für 45 Minuten bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 250 rpm inkubiert. Der Überstand wurde anschließend über ein 100  $\mu$ M Zellsieb filtriert und gesammelt. Zur Inaktivierung der Enzyme wurde  $\alpha$ -Mem-Medium mit FBS in gleichem Volumen hinzugegeben. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1.300 rpm wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in Osteoblasten-Komplettmedium aufgenommen. Nach Auszählen der Zellen wurden diese mit einer Zelldichte von 50.000 Zellen/ml auf Kulturschalen ausplattiert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit sterilem 1x PBS gewaschen und frisches Komplettmedium zugegeben. Bei einer ca. 80 %igen Konfluenz wurde die Differenzierung der Zellen durch Zugabe von 50  $\mu$ g/ml Ascorbat und 10 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat in das Komplettmedium induziert. Ein Mediumwechsel mit Differenzierungsmedium wurde alle 2 Tage bis zum Zeitpunkt der Analyse durchgeführt.

### 3.2.3 Primäre Adipozyten-Kulturen aus subkutanem Fett

Zur Isolierung von primären Adipozyten aus subkutanem Fett der inguinalen Region wurde dieses aus Mäusen ab dem Alter von 12 Wochen herauspräpariert, der Lymphknoten entfernt und im Anschluss das Fett gewogen. Danach folgte ein Waschschrift in Ethanol/PBS und eine grobe Zerkleinerung des Gewebes mittels steriler Schere. Das zerkleinerte Gewebe wurde in eine Collagenase-Verdauung (3 g Gewebe/10 ml Lösung) gegeben und für 30 min bei 120 rpm und 37 °C inkubiert. Danach wurde der Überstand über ein Zellsieb filtriert und mit Adipozyten-Kultivierungsmedium zur Inaktivierung der Collagenase aufgefüllt. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit Erylysepuffer für 5 Minuten inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in einem definierten Volumen aufgenommen, die Zellen gezählt und in einer Dichte von 25.000 Zellen/ml in eine Kulturschale gegeben. Nach dem Erreichen einer 80 %igen Konfluenz der Zellen wurde diese mit dem Differenzierungsmedium belegt und das Medium alle zwei Tage bis zum Zeitpunkt der Analyse gewechselt.

### 3.2.4 Dentin-Resorption

Mittels Kultivierung von Osteoklasten auf Dentin kann nicht nur die Differenzierung, sondern auch die Funktion der Zellen nachgewiesen werden. Osteoklasten können Dentin partiell resorbieren, durch eine spezifische Färbung ist eine Quantifizierung der Resorptionslakunen möglich. Hierzu wurden Osteoklasten, wie in 3.2.1 beschrieben, gewonnen und auf den sterilen Dentinstücken ausplattiert. Am 10. Tag nach Differenzierung wurde das Medium abgenommen und verworfen. Zu

den Zellen wurde 2 ml Natriumhypochlorid gegeben und mittels eines Zellkratzers die Zellen vom Dentin entfernt. Anschließend wurde das Dentinstück mit einer Pinzette kurz in Aqua dest. gewaschen und danach 3x in 0,2 % Toluidin-blau Lösung getaucht und gefärbt. Nach Färbung wurde das Dentinstück gut in Aqua dest. abgespült, getrocknet, fotografiert und ausgewertet.

### 3.2.5 Alizarinrot-Färbung

Die Alizarinrot-Färbung wurde für den Nachweis eines Mineralisationsprozesses in der Osteoblastenkultur verwendet. Das Calcium in der extrazellulären Matrix bildet dabei einen Chelatkomplex mit dem verwendeten Farbstoff und die Mineralisationskerne erscheinen rot. Dazu wurden die Zellen mit eiskaltem 90 % Ethanol für 45 min bei RT fixiert und anschließend zweimal mit destilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Zellen wurden dann mit der Alizarinrot Färbelösung für 10 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde fünfmal mit H<sub>2</sub>O gewaschen und mit PBS überschichtet.

### 3.2.6 TRAP-Färbung von Osteoklasten

Die Differenzierung von Osteoklasten kann durch einen Aktivitätsnachweis des Osteoklasten-Markers TRAP (*Tartrate-resistant acid phosphatase type 5*) quantitativ verfolgt werden. Hierdurch werden die multinukleären Osteoklasten und auch deren Vorläufer spezifisch angefärbt und können später ausgezählt werden. Zur Färbung wurden die Zellen zunächst mit 1 ml 1x PBS gewaschen und dann 5 Minuten mit kaltem Methanol fixiert. Nach 2 Waschschritten mit Wasser und einer 2 minütigen Trocknung wurden die fixierten Zellen 15 Minuten in 1 ml Substratlösung inkubiert. Danach wurden die Zellen 2x mit Wasser gewaschen, bevor sie im Mikroskop angeschaut und ausgezählt werden konnten.

Substratlösung: 10 mg Naphthol und 60 mg Fast Red Violet in 100 ml TRAP-Puffer (40 mM Natriumacetat und 10 mM Natriumtartrat, pH 5)

## 3.3 Biochemische Methoden

### 3.3.1 ELISA

Verschiedene Hersteller bieten unterschiedliche *Enzyme Linked Immunosorbent Assays* (ELISA)-Kits zum Nachweis von verschiedenen Proteinen an. Die hier verwendeten ELISA wurden laut Herstellerprotokoll mit Mausserum oder Zellkulturüberstand ausgeführt.

### 3.3.2 Cathepsin K Activity Assay Kit

Zur Quantifizierung der intrazellulären Cathepsin K-Aktivität in Osteoklasten wurde das Assay Kit von Abnova verwendet. Wie in 3.2.1 beschrieben, wurden hierfür Osteoklasten aus Knochenmark isoliert und in Kultur genommen und laut Herstellerprotokoll die Aktivität von intrazellulärem Cathepsin K bestimmt.

## 3.4 Histochemische, histologische und histomorphometrische Methoden

### 3.4.1 Calceinmarkierung von Mäusen

Calcein ist ein fluorchromer Farbstoff, der zusammen mit Calcium einen Chelatkomplex bildet und sich in die mineralisierte Matrix während der Knochenneubildung einlagert. Durch eine Doppelmarkierung mit Calcein in einem bestimmten Zeitabstand ist es somit möglich, die Knochenneubildungsrate (BFR, *bone formation rate*) *in vivo* zu bestimmen.

Der Fluoreszenzfarbstoff wurde den Mäusen im Abstand von sieben Tagen jeweils 100 µl Calcein-Lösung intraperitoneal injiziert. Durch eine Bestimmung der Anzahl und des Abstandes der grün-fluoreszierenden Markierungen konnte die BFR quantifiziert werden.

Calcein-Lösung: 0,15 M Natriumchlorid, 2 % Natriumhydrogencarbonat, 1 % Calcein

### 3.4.2 Präparation und Fixierung von Maus skeletten sowie Paraffin- und Acrylateinbettung

Um Auskunft über eine Veränderung in der Knochenmasse und in der Histomorphometrie von verschiedenen Mäusen zu bekommen, wurde eine Tibia sowie die Lendenwirbelkörper L1-L4 histologisch analysiert. Dafür wurde den Mäusen nach Tötung und Häutung der Bauchraum eröffnet und alle inneren Organe entfernt. Auch wurde eine Blutentnahme aus dem Herzen für weitere Serumanalysen durchgeführt. Die Skelette wurden auf einer Korkplatte gestreckt und 48 Stunden in gepuffertem 3,7 % Formaldehyd fixiert anschließend in 80 % Ethanol für weitere Präparationen aufbewahrt. Für entkalkte Paraffinhistologie wurden die Präparate je nach Knochen für mehrere Tage in 20 % EDTA-Lösung bei 37 °C entkalkt. Zur anschließenden Entwässerung wurden die Präparate je nach Art der nachfolgenden Histologie im Autotechnikon nach unterschiedlichem Protokoll behandelt.

Für die entkalkte Paraffineinbettung wurde folgendes Verfahren verwendet: 2x 60 Minuten 70 % Ethanol, 1x 60 Minuten 80 % Ethanol, 2x 60 Minuten Ethanol absolut, 2x 60 Minuten Xylol, 3x 60 Minuten Paraffin 60 °C. Anschließend wurden die Knochen in Paraffin eingebettet und bei 4°C gehärtet.

Für die unentkalkte Acrylateinbettung wurde folgendes Verfahren verwendet: 2x 60 Minuten 70 % Ethanol, 3x 60 Minuten 80 % Ethanol, 3x 60 Minuten 96 % Ethanol, 4x 40 Minuten Ethanol absolut. Die nicht entkalkten Knochen wurden anschließend für jeweils 24 Stunden bei 4 °C in Infiltrationslösung I und II infiltriert und danach mit Gießlösung in Glasgefäße eingebettet. Nach Polymerisation bei 4 °C wurden die Blöcke aus dem Glasgefäß herausgeschlagen, angeschliffen und 4µm bzw. 12 µm dicke Schnitte am Mikrotom erstellt und auf Gelatine-beschichtete Objektträger gezogen. Über Nacht fixierten diese bei 60 °C im Ofen und konnten anschließend gefärbt und eingedeckt werden.

#### 3.4.3 Kontaktröntgen und µCT-Analyse

Fixierte Skelette wurden im Kontakt-Röntgenapparat (Faxitron Xray) für 2 Sekunden bei 35 kV geröntgt. µCT-Aufnahmen wurden mit einem µCT40 (Scanco Medical, Basel) bei einer Auflösung von 12 µm gescannt.

#### 3.4.4 von Kossa/van Gieson-Färbung

Zur Herauslösung des Kunststoffes aus den Acrylathistologien wurden die Schnitte in 2-(Methoxyethyl)-acetat für 3x 10 Minuten entplastiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe bewässert und im Anschluss folgendermaßen gefärbt: 5 Minuten 3 % Silbernitrat, 10 Minuten Aqua dest., 5 Minuten Sodaformollösung, 10 Minuten Leitungswasser, 5 Minuten 5 % Natriumthiosulfatlösung, 10 Minuten Leitungswasser, 20 Minuten van Gieson-Lösung. Zur erneuten Entwässerung wurden die Schnitte in eine aufsteigende Alkoholreihe gegeben und nach 3x 5 minütiger Xylolinfiltration im Anschluss mit DPX eingedeckt.

#### 3.4.5 Toluidinblau-Färbung

Für eine Färbung mit Toluidin wurden die Schnitte für 30 Minuten in einer Toluidinlösung inkubiert. Die Vor- und Nachbehandlung der Histologien ist unter 3.4.4 zu finden.

#### 3.4.6 Histomorphometrie

Die Quantifizierung des Knochenvolumens (BV/TV, *bone volume per tissue volume*), die Trabekelanzahl (Tb.N, *trabecular number*), die Trabekeldicke (Tb.Th, *trabecular thickness*) sowie der trabekuläre Abstand (Tb.Sp, *trabecular spacing*) wurden mit dem BioQuant System (Osteometrics Inc.) nach Vorgaben des Herstellers an 4 µm von Kossa-/van Gieson gefärbten Acrylatschnitten

bestimmt. Die Knochenformationsrate (BFR, *bone formation rate*), sowie die Anzahl von Osteoblasten und Osteoklasten (N.Ob bzw. N.Oc/B.Pm, *number of osteoblasts* bzw. *osteoclasts per bone perimeter*) wurden standardmäßig mit dem OsteoMeasure Histomorphometrie-System an 12 µm ungefärbten Acrylatschnitten bzw. 4 µm Toluidin-gefärbten Acrylatschnitten bestimmt.

### 3.5 Sonstige Methoden

#### 3.5.1 Knochenmarktransplantation von Mäusen

Für eine Knochenmarktransplantation wurde aus 12 Wochen alten, männlichen Wildtyp-Donoren Knochenmark aus Femur und Tibia herausgespült und aufgereinigt. Hierfür wurden die Zellen abzentrifugiert, in PBS gewaschen und einer 5 minütigen Erylyse unterzogen. Die Zelldichte wurde auf  $6,67 - 13,34 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. 8 Wochen alte, weibliche Wildtyp oder *Idua*-defiziente Rezipienten wurden mit 10 Gray (Gy) bestrahlt.  $1 - 2 \times 10^7$  der aufgereinigten Zellen wurden durch intravenöse Injektion in die Schwanzvene der Weibchen transplantiert. In den ersten Wochen nach Transplantation wurde eine tägliche Sicht- und Gewichtskontrolle der Mäuse durchgeführt. Im Alter von 26 Wochen wurden sie, wie in 3.4 beschrieben, histologisch aufgearbeitet und der Knochenphänotyp analysiert.

#### 3.5.2 Enzymersatztherapie

*Idua*-defiziente Mäuse wurden für 12 Wochen wöchentlich mit rekombinant hergestellter Iduronidase (Aldurazyme®; 0,58 mg/kg Körpergewicht/Woche) behandelt. Die Injektion erfolgte dabei intravenös in die Schwanzvene der zu therapierenden Mäuse. Eine histologische Aufarbeitung, beschrieben wie in 3.4, erfolgte im Alter von 26 Wochen.

#### 3.5.3 Tierhaltung

Die Mäuse wurden in der Versuchstierhaltung (VTH) des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter standardisierten Bedingungen in einem 12 Stunden Hell-/Dunkelrhythmus gehalten. Tiertötungen erfolgten durch CO<sub>2</sub>-Inhalation oder zervikale Dislokation.

#### 3.5.4 Statistik

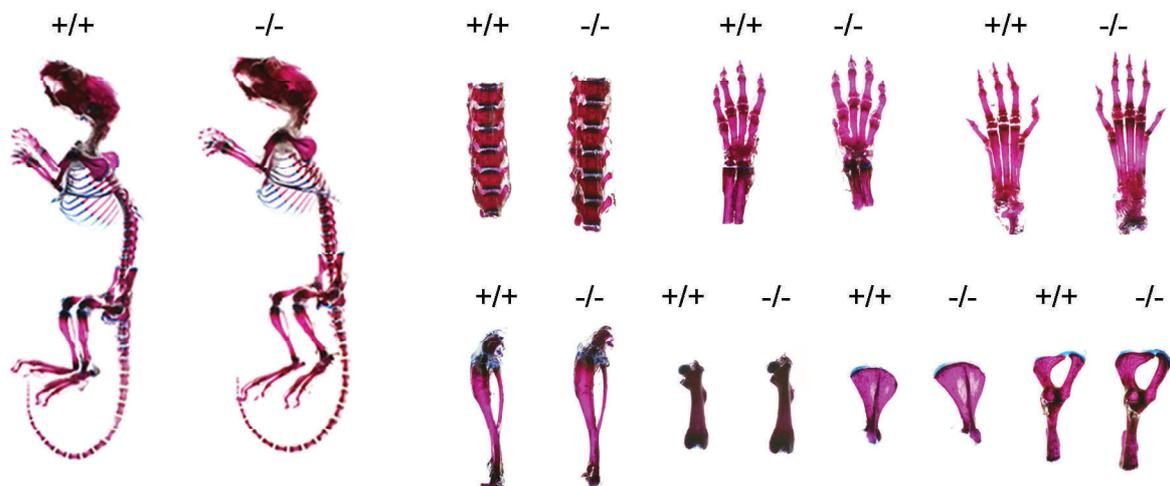
Alle angegebenen Werte sind mit dem Computerprogramm Microsoft Excel berechnete arithmetische Mittelwerte ± Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde mit dem 2-

seitigen Student-t-Test ermittelt. Ein p-Wert niedriger als 0,05 wurde als signifikant angenommen und mit (\*) bezeichnet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Histologische Analyse des Knochenphänotyps des *Idua*-defizienten Mausmodells

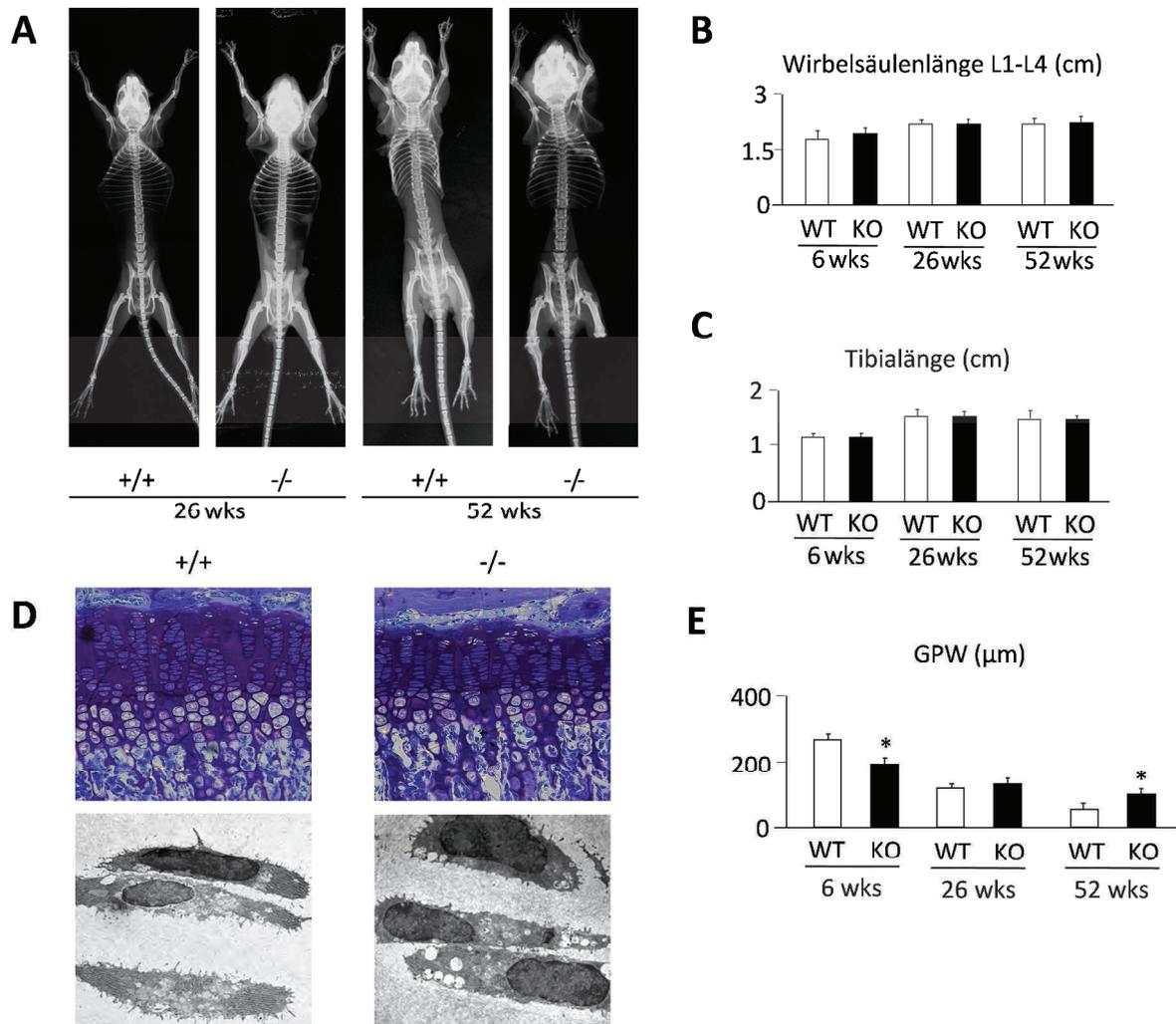
Um zu überprüfen, ob *Idua* für die Knochenbildung *in vivo* eine Rolle spielt, sollte im Folgenden der Knochenphänotyp eines *Idua*-defizienten (*Idua*<sup>-/-</sup>) Mausmodells analysiert werden, welches kommerziell von den Jackson Laboratories angeboten wird. Vor der histologischen Untersuchung wurde das Skelett von 6 Wochen alten Geschwistertieren, jeweils homozygot für das Wildtyp (+/+)- oder defiziente (-/-)-Allel, mittels Alcianblau/Alizarinrot angefärbt und hinsichtlich ihrer Größe, ihres Entwicklungsgrades oder Auffälligkeiten untersucht. Wie in Abbildung 5 zu erkennen ist, waren keine Abnormitäten im Skelett, der Entwicklung oder im Größenvergleich zu sehen, die mit einer *Idua*-Defizienz einhergehen.



**Abbildung 5: Skelettfärbung von Wildtyp- und *Idua*-defizienten Mäusen.** Die Skelette von 6 Wochen alten Wildtyp- und *Idua*-defizienten Mäusen wurden präpariert, mittels einer Kaliumhydroxid-Lösung von Muskeln und Sehnen befreit und schließlich durch Alcianblau/Alizarinrot gefärbt. Zu sehen sind das komplette Skelett von Wildtyp- (+/+) und *Idua*-defizienten (-/-) Tieren, sowie die Lendenwirbelsäule, Vorder- und Hinterpfoten, die Tibien, die Femora, die Schulterblätter und die Beckenkämme im direkten Vergleich.

Im Weiteren wurde eine Röntgenanalyse und eine Längenmessung der Lendenwirbelsäulen und Tibien im Alter von 6, 26 und 52 Wochen alten Mäusen vorgenommen. Dazu wurden jeweils sechs Wildtyp- und sechs *Idua*-defiziente Mäuse untersucht. Es waren keine Genotyp-abhängigen Veränderungen zwischen den Wildtypen und den Vergleichstieren in der Kontaktradiografie und der Längenmessung zu erkennen. Auffällig war jedoch, dass die Knochendichte der *Idua*-defizienten Tieren in der Kontaktradiografie erhöht schien. Des Weiteren wurde die Wachstumsfuge und deren Breite in Toluidinblau-gefärbten Tibien-Schnitten von 6, 26 und 52 Wochen alten Geschwistergruppen untersucht. Hier zeigte sich, dass im Alter von 6 Wochen die *Idua*-defizienten Tiere eine signifikant schmalere Fuge aufwiesen, es im Alter von 26 Wochen in Wildtyp- und *Idua*<sup>-/-</sup>-Tieren keinen Unterschied gab und im Alter von 52 Wochen die Wachstumsfuge der *Idua*-defizienten

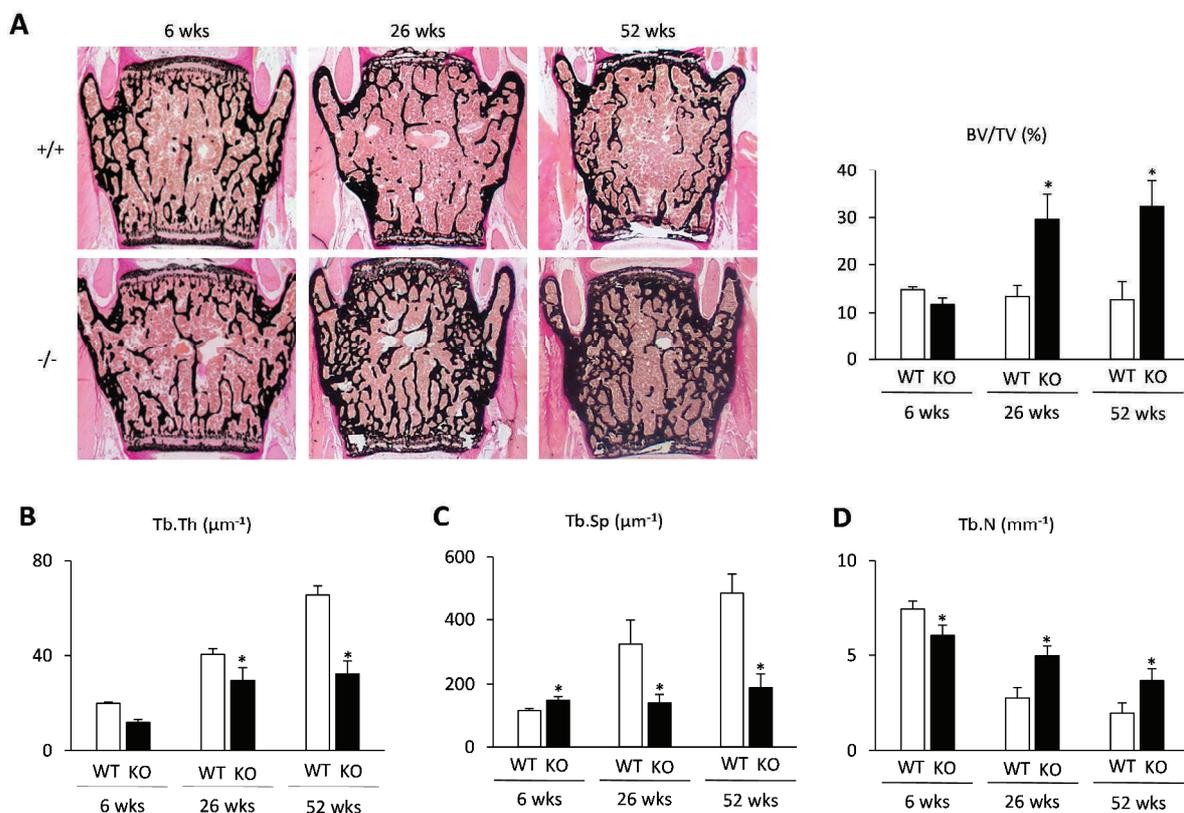
Tiere signifikant verbreitert war. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Chondrozyten aus den 26 Wochen alten Vergleichstieren wiesen geringe Mengen an nicht-degradiertem Speichermaterial in den *Idua*<sup>-/-</sup>-Zellen auf. Trotz Unterschieden in der Länge der Wachstumsfugen zwischen Wildtyp- und *Idua*<sup>-/-</sup>-Mäusen war das Längenwachstum nicht beeinträchtigt.



**Abbildung 6: Kontaktröntgen und Längenvermessung von Wildtyp- und *Idua*-defizienten Mäusen.** A: Kontaktradiografie von 26 und 52 Wochen alten Wildtyp- und *Idua*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die fixierten Skelette wurden im Kontakt-Röntgenapparat für 2 Sekunden bei 35 kV geröntgt, die Filme in einem Röntgenentwicklergerät entwickelt und diese später hochaufgelöst eingescannt. B: Vergleich der Länge von Lendenwirbelsäule in Wildtyp- und *Idua*-defizienten Mäusen im Alter von 6, 26 und 52 Wochen. C: Vergleich der Länge der Tibien in Wildtyp- und *Idua*-defizienten Mäusen im Alter von 6, 26 und 52 Wochen. Zu sehen sind die Maße in cm. D: Repräsentative Aufnahme einer Wachstumsfuge in einer 6 Wochen alten Wildtyp-(+/+) und *Idua*-defizienten (-/-) Maus sowie einer elektronenmikroskopischen Aufnahme eines Chondrozyts. E: Quantifizierung der Wachstumsfugenbreite (Growth plate width (GPW)) in 6, 26 und 52 Wochen alten Wildtyp- und *Idua*<sup>-/-</sup> Mäusen. Zu sehen sind die Maße in µm. n=6 pro Gruppe. \*P<0,05 gegen WT.

Um den ersten Verdacht der Knochenmassenzunahme zu bestätigen, wurden von Wildtyp- und *Idua*-defizienten Mäusen im Alter von 6, 26 und 52 Wochen nicht entkalkte Histologien der Wirbelkörper L1-L4 angefertigt. In Abbildung 7 sind jeweils repräsentative von Kossa/van Gieson gefärbte Histologien der einzelnen Altersgruppen abgebildet. Hier lässt sich erkennen, dass die *Idua*-defizienten Mäuse im Alter von 26 und 52 Wochen ein signifikant erhöhtes trabekuläres

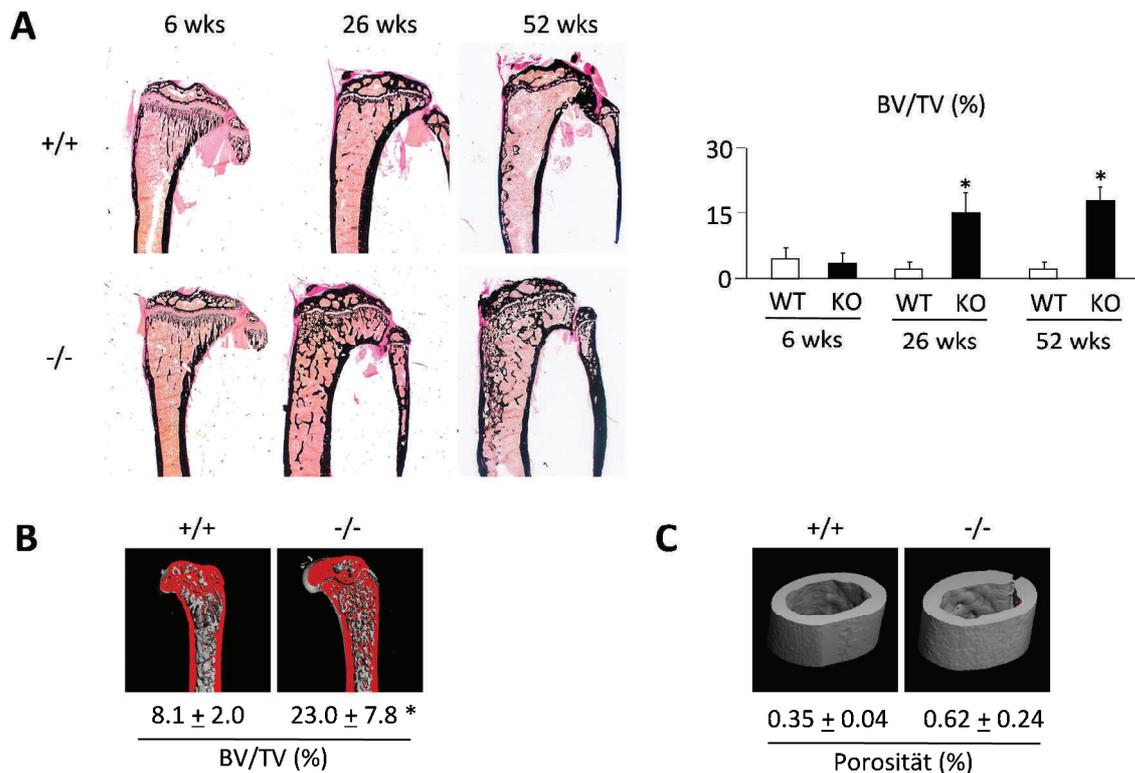
Knochenvolumen im einzelnen Wirbelkörper aufweisen. Diese Unterschiede zwischen den Genotypen konnten durch eine komplette histomorphometrische Auswertung der Wirbelkörper unterstützt werden, die Aufschluss über die strukturellen Gegebenheiten der progressiven Zunahme der Knochenmasse der *Idua*-defizienten Mäuse gab. Alle weiteren bestimmten Knochenparameter der Wildtyp-Mäuse unterschieden sich signifikant von denen der *Idua*-defizienten Tiere. Eine Quantifizierung der Trabekeldicke ergab, dass die *Idua*<sup>-/-</sup>-Mäuse signifikant schmalere Trabekel aufwiesen als gleichaltrige Geschwistertiere. Auch der Abstand der einzelnen Trabekel in den Wirbelkörpern war in den *Idua*-defizienten Tiere signifikant verringert in jeder analysierten Altersgruppe. In den 6 Wochen alten *Idua*-defizienten Mäusen war die Anzahl der Trabekel signifikant kleiner als in gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen, die jedoch im Altersverlauf signifikant zunahm und somit weit über der Trabekelanzahl in den Vergleichstieren lagen.



**Abbildung 7: Erhöhtes trabekuläres Knochenvolumen in Wirbelkörpern *Idua*-defizienter Mäuse.** A: Unentkalkte 4  $\mu\text{m}$  dicke Histologieschnitte einzelner Wirbelkörper im Alter von 6, 26 und 52 Wochen aus Wildtyp- und *Idua*-defizienten Mäusen. Die Präparate wurden nach von Kossa/van Gieson gefärbt und ausgewertet. Hierbei wird die mineralisierte Knochenmasse schwarz gefärbt mit histomorphometrischer Auswertung des Knochenparameters BV/TV (bone volume per tissue volume) in %. B: Quantifizierung der Trabekeldicke (Tb.Th) in Wildtypen und *Idua*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Alter von 6, 26 und 52 Wochen. C: Quantifizierung des trabekulären Abstands (Tb.Sp) in Wildtyp- und *Idua*<sup>-/-</sup>-Mäusen in verschiedenen Altersstufen. D: Quantifizierung der Trabekelanzahl (Tb.N) in Wildtyp- und *Idua*-defizienten Mäusen im angegebenen Alter. n=6 pro Gruppe. \*P<0,05 gegen WT.

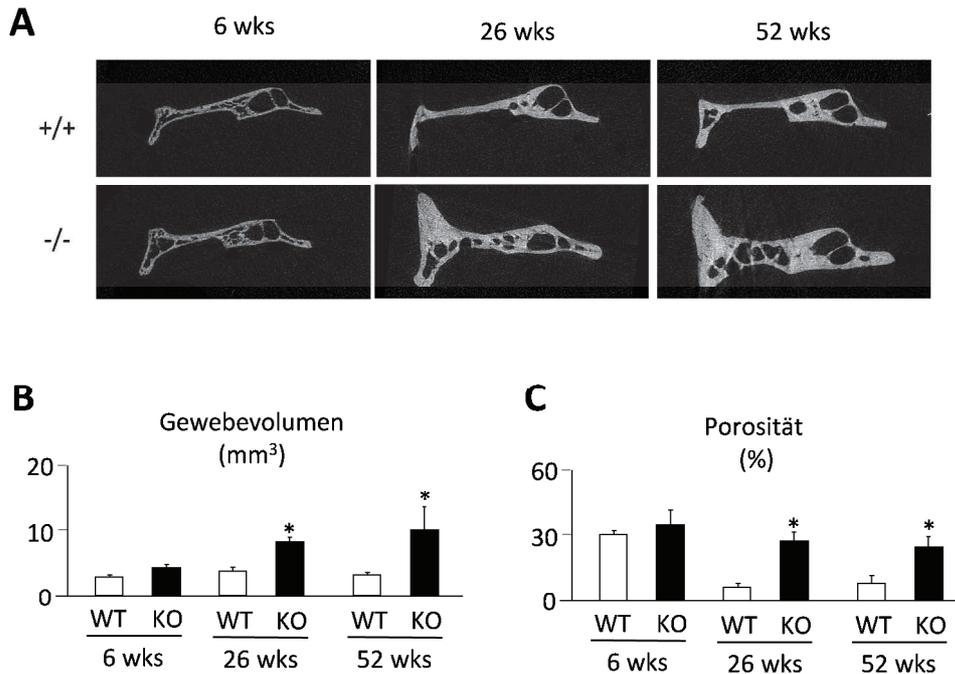
Des Weiteren wurden aus Wildtyp- und *Idua*-defizienten Mäusen im Alter von 6, 26 und 52 Wochen nicht entkalkte Histologien der Tibien analysiert. Auch hier war, wie bereits in den Wirbelkörpern der

*Idua*-defizienten Mäuse gezeigt, eine Zunahme der Knochenmasse erkennbar. Eine weitere Analyse in Form eines  $\mu$ CT-Scans der Femora aus Wildtyp- und *Idua*-defizienten Mäusen zeigte ebenfalls eine erhöhte trabekuläre Knochendichte der *Idua*<sup>-/-</sup>-Mäuse auf. Ebenfalls von Interesse war die kortikale Knochenmasse, wofür Querschnitte von Wildtyp- und *Idua*-defizienten Femora analysiert wurden. Es war zu sehen, dass in den Femora der *Idua*<sup>-/-</sup>-Mäusen keine veränderte kortikale Porosität vorliegt.



**Abbildung 8: Erhöhtes trabekuläres Knochenvolumen in Tibien und Femora *Idua*-defizienter Mäuse** A: Von Kossa/van Gieson gefärbte Histologieschnitte von Tibien aus oben genannten Mäusen mit histomorphometrischer Quantifizierung. B: Eine  $\mu$ CT-Auswertung der Oberschenkelknochen in Wildtyp- und *Idua*<sup>-/-</sup>-Mäusen bestätigt das signifikant erhöhte Knochenvolumen (BV/TV) in den *Idua*-defizienten Tieren. C: Eine Bestimmung der kortikalen Porosität im Knochen der beiden Vergleichsgruppen ergab keinen signifikanten Unterschied. n=6 pro Gruppe. \*P<0,05 gegen WT.

Patienten mit einer MPSI zeigen häufig starke Verformungen im Gesichtsbereich. Aus diesem Grund wurden  $\mu$ CT-Aufnahmen der Schädel von Wildtyp und *Idua*-defizienten Mäusen im Alter von 6, 26 und 52 Wochen angefertigt und analysiert. Eine altersabhängige Zunahme des Gewebavolumens und der Porosität im Kieferknochen war in den *Idua*-defizienten Tiere feststellbar.



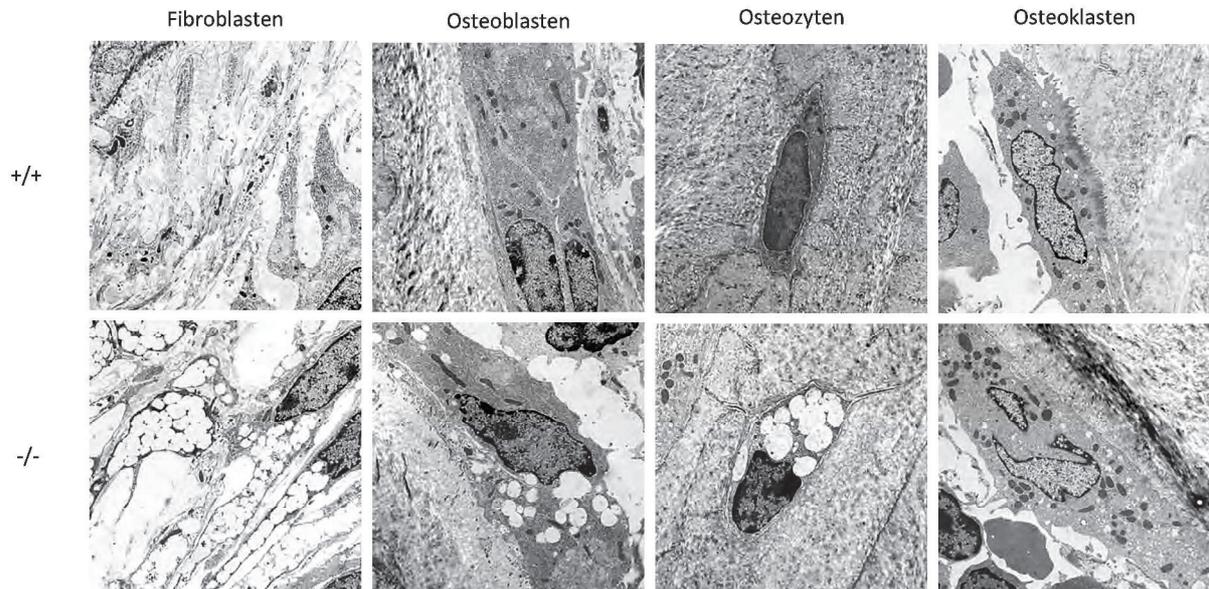
**Abbildung 9: Erhöhtes Gewebevolumen und erhöhte Porosität im Kieferknochen in *Idua*-defizienten Mäusen.** A: Querschnitt eines  $\mu$ CT-Scans durch den Unterkieferknochen einer 6, 26 und 52 Wochen alten Wildtyp- und *Idua*<sup>-/-</sup>-Maus. B: Quantifizierung des Kieferknochengewebevolumens in Wildtypen und *Idua*-defizienten Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten. C Quantifizierung der Porosität des Kieferknochens in Wildtypen und *Idua*-defizienten Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten. n=6 pro Gruppe. \*P<0,05 gegen WT.

Somit war nicht nur eine trabekuläre Erhöhung in den Wirbelkörpern und Tibien der *Idua*-defizienten Mäuse sichtbar, sondern auch im cranio-fazialen Bereich dieser Mäuse eine Zunahme des Gewebevolumens im Kiefer messbar.

Die Ergebnisse in diesen Mäusen waren bereits gegensätzlich zu der Analyse des Mausmodells mit Mucopolidose Typ II (MLII-Maus), in denen das Längenwachstum aufgrund einer Akkumulation lysosomalen Speichermaterials in Chondrozyten der Wachstumsfuge beeinträchtigt war und ein osteoporotischer Phänotyp vorlag. Die *Idua*-defizienten Mäuse zeigten hingegen kein beeinträchtigtes Längenwachstum und eine trabekulär erhöhte Knochendichte.

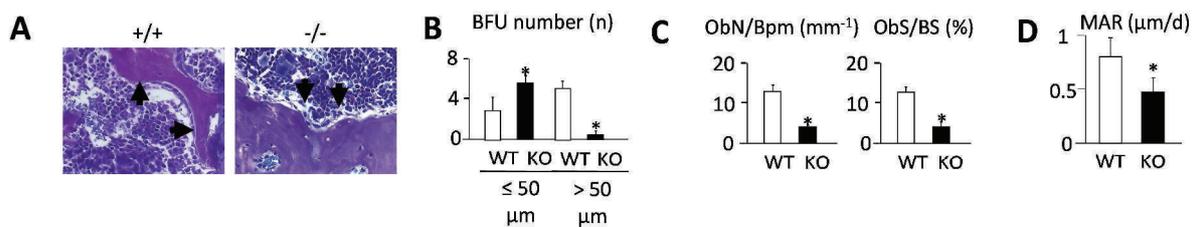
Aus diesem Grund sollte im nächsten Schritt untersucht werden, welche Knochenzelltypen in *Idua*-defizienten Mäusen in welcher Art beeinträchtigt sind. Eine zelluläre *in vivo* Analyse zeigte, dass auch hier starke Pathologien in den *Idua*-defizienten Tieren sichtbar waren. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Knochenschnitten aus Wildtyp- und *Idua*<sup>-/-</sup>-Mäusen gaben deutliche Einblicke in die Veränderung der einzelnen Knochenzellen. Neben den oben gezeigten Chondrozyten wiesen auch Fibroblasten und Osteoblasten aus *Idua*-defizienten Knochenpräparaten geringe Mengen an nicht-degradiertem Speichermaterial auf. In Osteozyten hingegen war eine massive, pathologische Ansammlung von Speichervakuolen sichtbar. Ebenso wie in den Osteoklasten aus MLII-Mäusen

waren auch in den Osteoklasten aus *Idua*-defizienten Mäusen keine Inklusionen an nicht abgebautem Speichermaterial erkennbar.



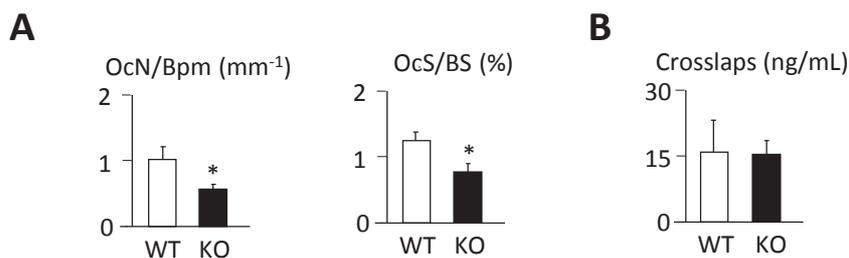
**Abbildung 10: Elektronenmikroskopische Aufnahmen verschiedener Wildtyp- und *Idua*-defizienter Zelltypen.** Zu sehen sind Fibroblasten, Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten aus Wildtyp- und *Idua*-defizienten Tieren. In *Idua*<sup>-/-</sup>-Zellen sind zusätzlich Inklusionen von nicht abgebautem Speichermaterial zu sehen, sehr auffällig ist die vermehrte Ansammlung von Speichermaterial in den Osteozyten. Osteoklasten aus *Idua*-defizienten Mäusen zeigen keine Pathologie.

Eine nähere Betrachtung von Toluidinblau-gefärbten Wirbelsäulenschnitten aus Wildtyp- und *Idua*-defizienten Mäusen zeigte eine signifikante Abnahme der Anzahl der Osteoklasten mit einhergehender Abnahme der mit Osteoblasten besetzten Oberfläche in den *Idua*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu gleichaltrigen Geschwistertieren. Ebenso zeigte sich eine weitere pathologische Auffälligkeit in den *Idua*-defizienten Tieren in der Anordnung der Osteoblasten. Im gesunden Knochen lag dieser Zelltyp in langen Reihen (> 50 µm) auf der Knochenoberfläche. In den *Idua*-defizienten Tieren hingegen waren signifikant kürzere Reihen (≤ 50 µm) in höherer Anzahl zu quantifizieren. Trotz einer vergleichbaren Knochenformationsrate in Wildtyp- und *Idua*-defizienten Mäusen zeigten die *Idua*<sup>-/-</sup>-Tiere eine signifikant verringerte MAR (*Mineral apposition rate*), ein Maß für die Anlagerung des neugeformten Knochens.



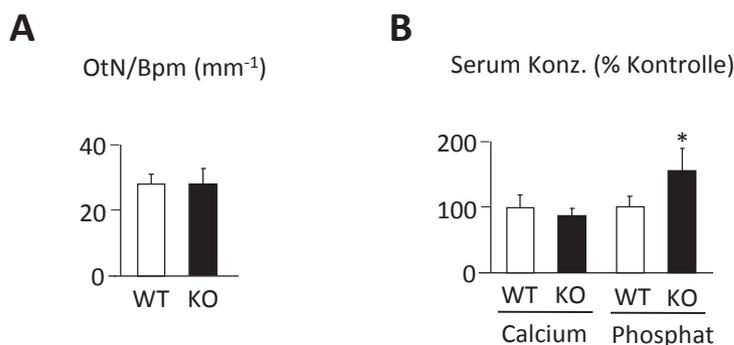
**Abbildung 11: Pathologischer Osteoblasten-Phänotyp in *Idua*-defizienten Mäusen.** A: Umverteilung der Osteoblasten. B: Verschiebung der BFU (Bone forming unit) hin zu kürzeren Osteoblasten-Reihen in Präparaten aus *Idua*<sup>-/-</sup>-Mäusen. C: Signifikant reduzierte Anzahl der Osteoblasten (Ob.N/Bpm, Number of osteoblasts) in *Idua*-defizienten Mäusen mit einhergehender Verminderung der mit Osteoblasten besetzten Knochenoberfläche (Ob.S/BS, Osteoblast surface per bone surface). D: Signifikant reduzierte MAR (*Mineral apposition rate*) in *Idua*-defizienten Mäusen. n=6 pro Gruppe. \*P<0,05 gegen WT.

Die erste elektronenmikroskopische Analyse der *Idua*-defizienten Osteoklasten zeigte keine Auffälligkeiten im Hinblick auf nicht-degradiertes Speichermaterial im Vergleich zu Osteoklasten aus Wildtyp-Mäusen auf. Allerdings konnte bei eingehender histomorphometrischer Betrachtung beobachtet werden, dass die Anzahl der Osteoklasten und auch die mit Osteoklasten besetzte Oberfläche in den *Idua*<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant verringert waren. Eine Quantifizierung der Collagenabbauprodukte (Crosslaps), einem Indikator für die Knochenresorptionsrate, im Serum der Mäuse ließ erkennen, dass die *Idua*<sup>-/-</sup>-Osteoklasten trotz der hohen Knochendichte ein verminderte Resorption aufwiesen.



**Abbildung 12: Osteoklasten-Phänotyp in *Idua*-defizienten Mäusen.** A: Neben der signifikant reduzierten Anzahl der Osteoklasten in den *Idua*-defizienten Mäusen ist auch die mit Osteoklasten besetzte Knochenoberfläche verringert. B: Serum-Konzentration Knochen-spezifischer Collagen-Abbauprodukte (Crosslaps) zeigen keinen Unterschied in Wildtyp- und *Idua*-defizienten Mäusen. *n*=6 pro Gruppe. \**P*<0,05 gegen WT.

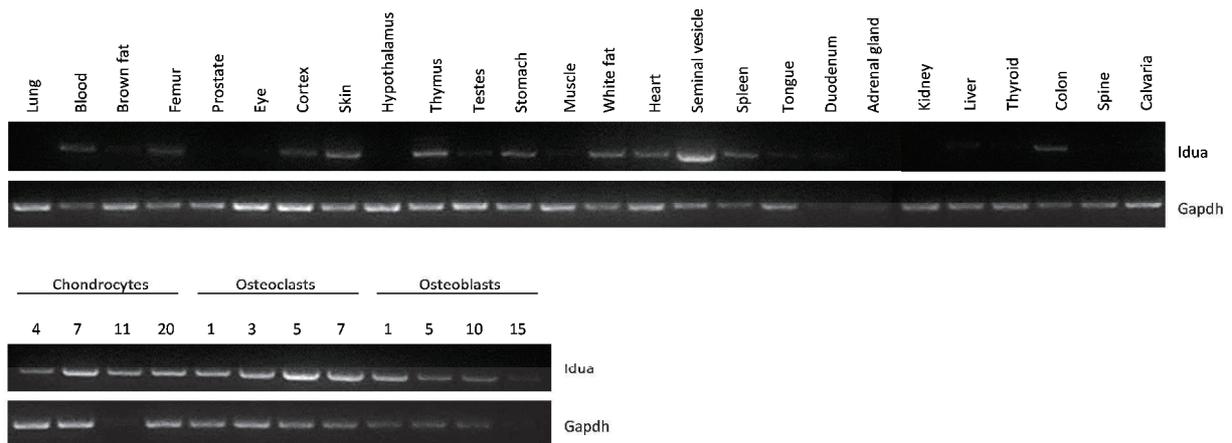
Die Osteozyten aus *Idua*-defizienten Mäusen zeigten große Einlagerungen von Speichermaterial in elektronenmikroskopischen Untersuchungen im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen, jedoch konnten keine anzahlmäßigen Veränderungen zwischen Wildtyp- und *Idua*-defizienten Tieren gemessen werden. Osteozyten regulieren über FGF23 den Phosphathaushalt im Körper. Analysen zur Detektion von Serumphosphat zeigten, dass sich signifikant mehr Phosphat im Serum der *Idua*-defizienten Tiere befindet. Ein Unterschied in der Calciumkonzentration wurde nicht gefunden. Diese Ergebnisse weisen auf einen starken Osteozyten-Defekt in den *Idua*-defizienten Tieren hin.



**Abbildung 13: Pathologischer Osteozyten-Phänotyp in *Idua*-defizienten Mäusen.** A: Anzahl der Osteozyten (Ot.N/Bpm) in Wildtyp- und *Idua*-defizienten Tieren. B: Calcium- und Phosphatbestimmung in Serumproben von Wildtyp- und *Idua*<sup>-/-</sup>-Mäusen. *n*=6 pro Gruppe. \**P*<0,05 gegen WT.

## 4.2 Zelluläre und molekulare Untersuchung des Phänotyps *Idua*-defizienter Mäuse

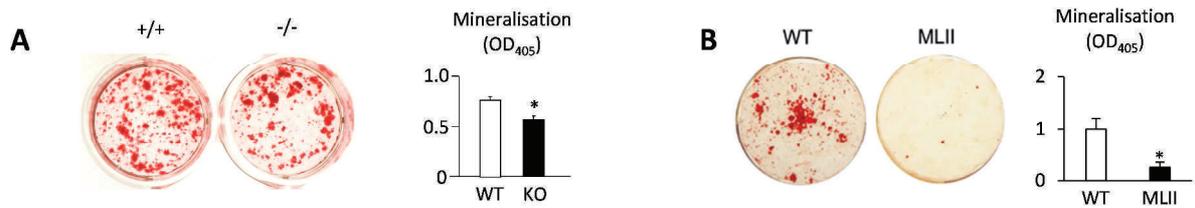
Eine gewebespezifische Untersuchung mittels einer RT-PCR sollte Aufschluss über die generelle *Idua*-Expression in verschiedenen Geweben geben. Dafür wurde gewebespezifisch RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und diese im Anschluss als Matrize für eine PCR mit spezifischen *Idua*-Primern genutzt. Ein gewebespezifisches Expressionsmuster ist in Abbildung 14 zu sehen. Dabei fällt auf, dass die Iduronidase in allen Knochenzellen, Chondrozyten, Osteoklasten und Osteoblasten und vielen Geweben, beispielsweise in der Haut, dem Magen, dem Herz und der Milz exprimiert wird.



**Abbildung 14: *Idua*-Expression in verschiedenen Geweben.** Gelbild der gewebsspezifischen *Idua*-Expression nach einer cDNA-PCR aus den jeweiligen Organen und Geweben. Als Ladekontrolle wurden *Gapdh* verwendet und dieses Gen ebenfalls in denselben Proben nachgewiesen.

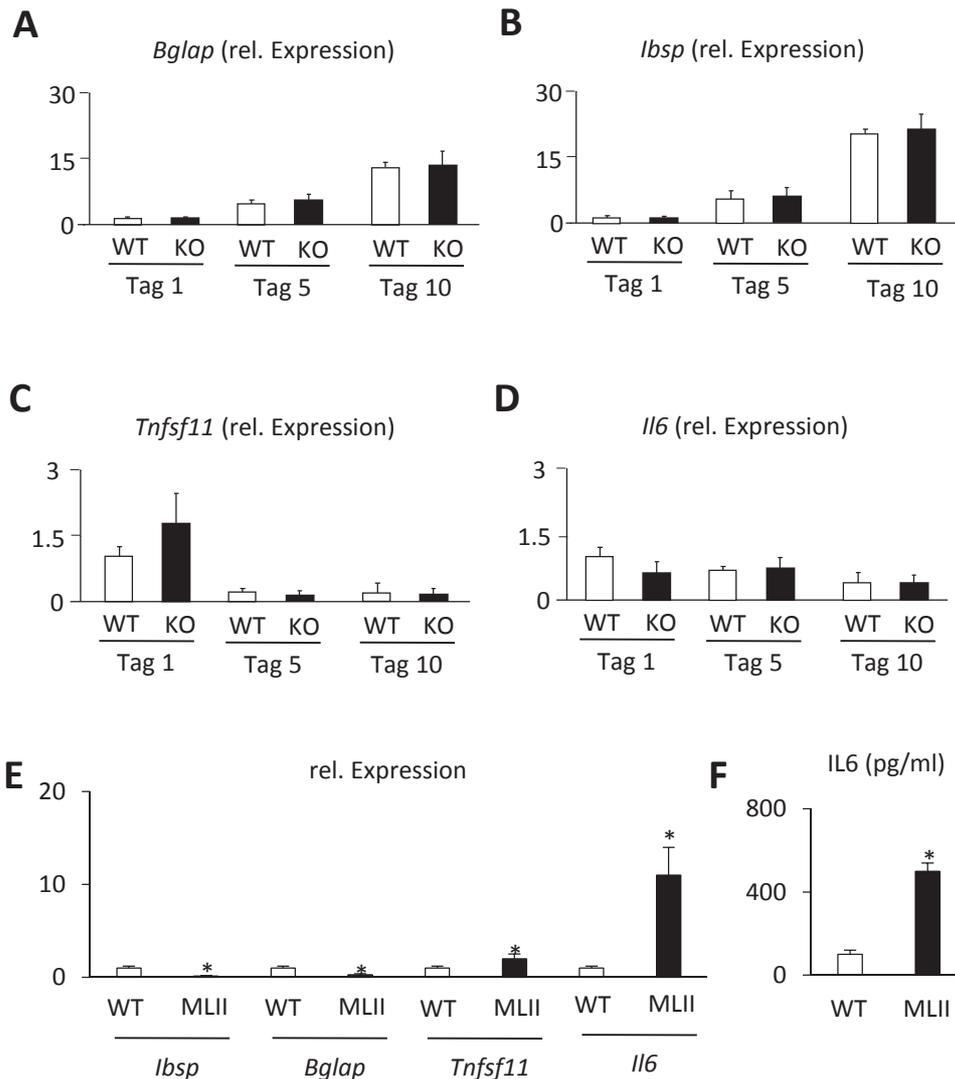
Um zellspezifisch herauszufinden, welchen Einfluss die Iduronidase auf Osteoblasten und Osteoklasten hat, wurden zelluläre *ex vivo* Analyse durchgeführt. Hierfür wurden entweder aus 3 bis 5 Tage alten Mäusen Schädeldachzellen isoliert und zu Osteoblasten differenziert oder es wurde Knochenmark aus Tieren, die älter waren als 12 Wochen, isoliert und in Richtung Osteoblasten oder Osteoklasten differenziert.

Die Osteoblasten wurden für 10 Tage durch Zugabe von Ascorbat und  $\beta$ -Glycerolphosphat differenziert und es erfolgte eine Bestimmung der Mineralisationsfähigkeit der Zellen durch eine Färbung mit Alizarinrot. Hier war auffällig, dass die Mineralisation der *Idua*-defizienten Kulturen nur moderat beeinträchtigt war. Im Gegensatz hierzu zeigte sich in primären Osteoblasten der MLII-Mäuse hingegen ein starker Differenzierungsdefekt.



**Abbildung 15: Moderat beeinträchtiger Mineralisationsdefekt in *Idua*-defizienten Osteoblasten.** A: Anfärbung von mineralisierten Arealen mit Alizarinrot in Wildtyp- und *Idua*-defizienten Osteoblastenkulturen mit Quantifizierung der Mineralisation bei einer photometrischen Messung bei 405 nm. Die Mineralisationsfähigkeit primärer Osteoblasten aus *Idua*-defizienten Mäusen ist moderat beeinträchtigt.  $n=3$  pro Gruppe.  $*P<0,05$  gegen WT. B: Anfärbung von mineralisierten Arealen mit Alizarinrot in Wildtyp- und MLII-Osteoblastenkulturen mit Quantifizierung der Mineralisation, die in MLII-Osteoblasten deutlich reduziert ist.

Rückschlüsse auf die relative Expression von spezifischen Osteoblastendifferenzierungsgenen konnten durch die Isolierung der RNA aus den differenzierten Kulturen von Wildtypen und *Idua*<sup>-/-</sup> getätigt werden. Die isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR die relative Expression von *Bglap*, *Ibsp*, *Tnfsf11* und *Il6* detektiert. Die qRT-PCR Expressionsanalysen unterstützen die vorausgegangenen Ergebnisse des moderat-beeinträchtigten Mineralisationsphänotyps. Es zeigten sich keine Unterschiede im Expressionsverhalten der zwei Osteoblasten-spezifischen Differenzierungsmarker *Bglap* und *Ibsp*, so wie in den MLII-Osteoblastenkulturen, aber vor allem nicht, wie in den Osteoblastenkulturen aus MLII-Mäusen, in einer dramatisch erhöhten Überexpression des pro-osteoklastogenen Zytokins *Il6*.

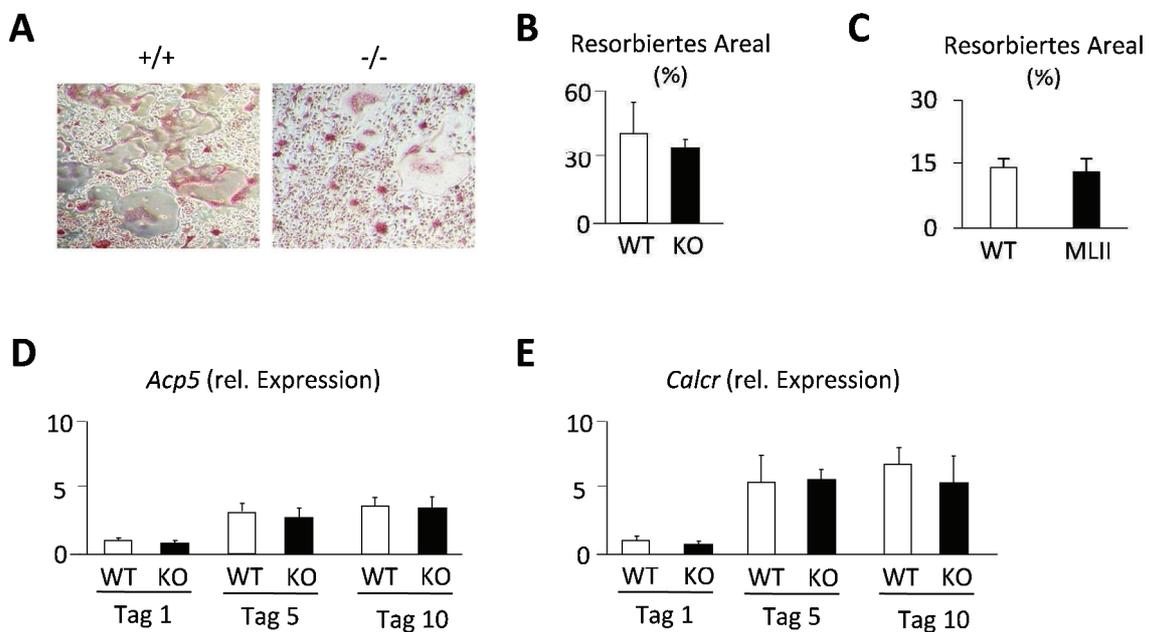


**Abbildung 16: Relative Expression Osteoblasten-spezifischer Gene in Wildtyp- und *Idua*-defizienten Kulturen.** A: Relative Expression von Osteocalcin (*Bglap*) während der Differenzierung primärer Maus-Osteoblasten an Tag 1, 5 und 10 nach Initiation der Differenzierung in Wildtyp- und in *Idua*-defizienten Osteoblasten. B: Relative Expression des Bone Sialoproteins (*Ibsp*) in genannten Osteoblastenkulturen. C: Relative Expression von *Tnfsf11* (*Rankl*) in genannten Osteoblastenkulturen. D: Relative Expression von *Il6* (interleukin-6) in genannten Osteoblastenkulturen.  $n=3$  pro Gruppe.  $*P<0,05$  gegen WT. E: Relative Expression von *Ibsp*, *Bglap*, *Tnfsf11*, *Tnfsf11b* (*Opg*) und *Il6* in MLII-Osteoblastenkulturen. F: IL6 Konzentration in pg/ml im Überstand von MLII-Osteoblastenkulturen.

*Ex vivo* isolierte Osteoklasten *Idua*-defizienter Mäuse konnten aus Knochenmarkszellen durch Zugabe von M-CSF und RANKL hergestellt und so die osteoklastogene Differenzierung primärer Knochenmarkszellen untersucht werden. Osteoklasten sind TRAP-positive Zellen und können durch Färbung dieses Markers sichtbar gemacht werden. In MLII-Mäusen konnte durch die Untersuchung primärer Osteoklasten ein Zell-autonomer Mechanismus als Ursache der pathologisch-erhöhten Anzahl der Osteoklasten im Knochen ausgeschlossen werden, da sie *ex vivo* in der Differenzierung und der Funktion nicht beeinträchtigt waren. In den hier verglichenen Osteoklastenkulturen aus Wildtyp- und *Idua*-defizienten Mäusen wurden Osteoklasten gleichermaßen durch eine TRAP-Färbung angefärbt. Es sollte jedoch nicht nur die Differenzierung von Knochenmarkszellen zu

Osteoklasten untersucht, sondern auch die Funktion der Osteoklasten geprüft werden. Hierfür wurde die Resorptionsfähigkeit der Zellen auf Dentinstücken getestet und die resorbierten Flächen durch eine Toluidinblau-Färbung sichtbar gemacht, die später quantifiziert werden konnten. Es war zu erkennen, dass Osteoklasten aus *Idua*-defizientem Knochenmark das Dentin moderat schlechter resorbieren können.

Auch auf molekularer Ebene wurde die Osteoklastogenese untersucht. Hierfür wurde die RNA aus reifen Osteoklasten isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert. Bei der Überprüfung der relativen Expression von zwei Differenzierungsmarkern der Osteoklastogenese, *Acp5* und *Calcr* (Calcitoninrezeptor), wurde kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und *Idua*-defizienten Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung gefunden.



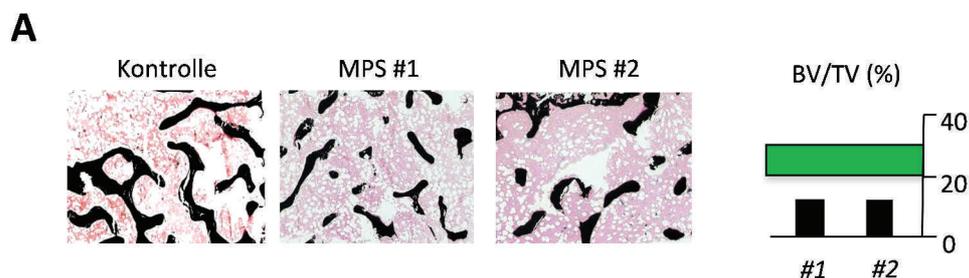
**Abbildung 17: Primäre Osteoklasten aus *Idua*-defizienten Mäusen sind funktionsfähig.** A: TRAP positiv angefärbte Osteoklasten aus Wildtyp- und *Idua*<sup>-/-</sup>-Mäusen. B: Quantifizierung der Resorptionsfähigkeit von Wildtyp- und *Idua*-defizienten Osteoklasten, die keine signifikanten Unterschiede aufzeigt. n=3 pro Gruppe. \*P<0,05 gegen WT. C: Funktion primärer Osteoklasten aus MLII-Mäusen sind *ex vivo* nicht beeinträchtigt. D: Relative Expression von TRAP (*Acp5*) während der Differenzierung primärer Maus-Osteoklasten an Tag 1, 5 und 10 nach Initiation der Differenzierung aus Wildtyp- und *Idua*-defizienten Tieren. E: Relative Expression von *Calcr* (Calcitoninrezeptor) in genannten Osteoklastenkulturen. n=3 pro Gruppe. \*P<0,05 gegen WT.

Anhand dieser Untersuchungen lässt sich zusammenfassen, dass *ex vivo* isolierte *Idua*-defiziente Osteoblasten einen moderaten Mineralisierungsdefekt, jedoch keine Beeinträchtigung auf Expressionsebene in der Differenzierung besitzen. *Ex vivo* isolierte *Idua*-defiziente Osteoklasten wiesen keine Beeinträchtigung in der Differenzierung und Funktion auf.

### 4.3 Einfluss von Therapieoptionen

#### 4.3.1 Auswirkungen einer Knochenmarktransplantation auf den *Idua*-defizienten Knochen

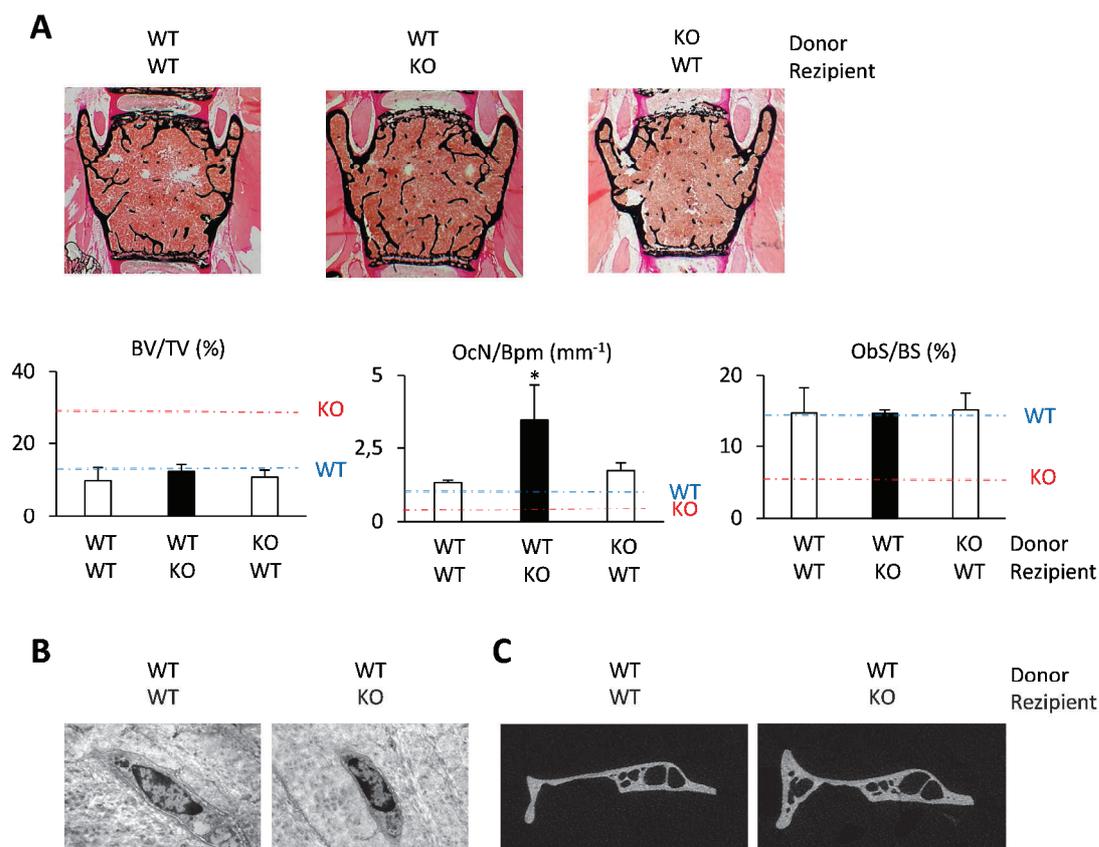
Patienten mit Mucopolysaccharidose Typ I werden oft, bei passendem Spender und bei einer Diagnose vor dem achtzehnten Lebensmonat, mit einer Knochenmarktransplantation (KMT) behandelt (Oussoren, Brands et al. 2011). Da die oben beschriebenen Ergebnisse aufzeigen, dass eine lysosomale Fehlfunktion zu sehr spezifischen Veränderungen in der Differenzierung und Aktivität Knochen-relevanter Zelltypen führt, wurde aus parallel der Knochenstatus von Patienten mit MPSI charakterisiert. Eine detaillierte, knochenphänotypische Untersuchung zweier humaner Beckenkammbiopsien aus MPSI-Patienten zeigte starke Pathologien im Vergleich zu gleichaltrigen, gesunden Kindern. Hierbei fiel auf, dass, anders als im untersuchten Mausmodell, das Knochenvolumen der Patienten deutlich unterhalb des Referenzbereichs lag und somit einen osteoporotischen Phänotyp aufwies. Da die beiden Patienten allerdings frühzeitig mit einer KMT behandelt worden waren, stellten sich zwei Fragen: Welche Auswirkungen hat eine Knochenmarktransplantation auf den defekten Knochen in einem Mausmodell mit MPSI? Welche Auswirkungen hat eine Knochenmarktransplantation mit *Idua*-defizienten Zellen auf den gesunden Knochen in Mäusen?



**Abbildung 18: Skelettaler Phänotyp in MPSI-Patienten.** A: Durch histologische Untersuchung von Beckenkammbiopsien aus Patienten mit MPSI konnte eine erniedrigte Knochendichte nachgewiesen werden (BV/TV, bone volume per tissue volume). Der grüne Balken stellt den Referenzbereich dar.

Zur Untersuchung der Auswirkungen einer Knochenmarktransplantation (KMT) auf den murinen Knochen wurde Knochenmark aus männlichen Donoren, entweder aus Wildtypen oder aus *Idua*-defizienten Tieren, isoliert und in mit einer letalen Dosis bestrahlen (10 Gy), weibliche Rezipienten, entweder Wildtyp- oder *Idua*<sup>-/-</sup>-Mäuse, transplantiert. Der Transplantationserfolg wurde mittels Y-chromosomaler PCR überprüft. In einem Alter von 26 Wochen wurde der skelettale Phänotyp der Behandlungsgruppen in nicht-entkalkten Wirbelsäulenschnitten und in  $\mu$ CT-Scans von Unterkieferschnitten analysiert. In nicht-entkalkten Wirbelsäulenschnitten von Wildtypen, die mit Wildtyp-Knochenmark als Kontrolle behandelt wurden, waren keine Unterschiede in der Knochendichte, in der Anzahl der Osteoklasten und in der mit Osteoblasten besetzten Knochenoberfläche zu erkennen. Somit war auszuschließen, dass eine KMT mit Wildtyp-

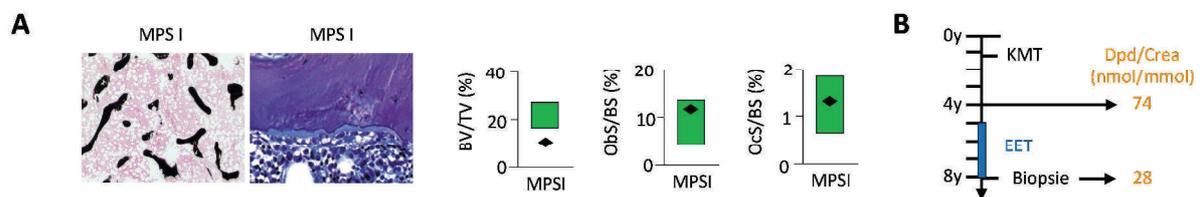
Knochenmark einen Einfluss auf den gesunden Knochen und Knochenzellen hat. Der osteopetrotische Knochenphänotyp der *Idua*-defizienten Mäuse konnte durch eine KMT mit Wildtyp-Donorzellen korrigiert werden, ebenso wie die mit Osteoblasten besetzte Gesamtknochenoberfläche und damit die verkürzten Reihen der Osteoblasten in den *Idua*-defizienten Tieren. Allerdings wurde durch die KMT eine massive Osteoklastogenese in den behandelten *Idua*-defizienten Mäusen induziert. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von trabekulären Osteozyten zeigten, dass der starke Osteozytendefekt in den *Idua*<sup>-/-</sup>-Mäusen, entstanden durch Einlagerungen von nicht-degradiertem Speichermaterial, durch eine KMT vollständig behoben wurde. Auch der cranio-faziale Phänotyp der *Idua*<sup>-/-</sup>-Mäuse, der sich in einer Gewebzunahme in Unterkieferschnitten äußerte, wurde durch eine KMT verbessert. Desweiteren wurde eine KMT mit Zellen aus *Idua*-defizienten Donoren in Wildtypen durchgeführt und der Knochenstatus dieser Tiere untersucht. Hier zeigte sich jedoch, dass die KMT mit *Idua*-defizientem Knochenmark keinen Einfluss auf die Knochendichte, die Anzahl der Osteoklasten oder die mit Osteoblasten besetzte Knochenoberfläche in Wildtyp-Mäusen zu haben schien.



**Abbildung 19: Eine Knochenmarkstransplantation beeinflusst den skelettalen Phänotyp von *Idua*-defizienten Mäusen.** A: Von Kossa/van Gieson gefärbte, unentkalkte Histologieschnitte einzelner Wirbelkörper im Alter von 26 Wochen aus Wildtyp- und *Idua*-defizienten Mäusen, die im Alter von 8 Wochen eine KMT mit gezeigtem Donor-Knochenmark erhielten. Eine Quantifizierung der Knochendichte (BV/TV), der Anzahl der Osteoklasten (OcN/Bpm) und eine Quantifizierung der mit Osteoblasten besetzten Knochenoberfläche (Obs/BS) sind ebenfalls gezeigt. n=3 pro Gruppe. \*P<0.05 gegen unbehandelte Mäuse. B: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Wildtyp- und *Idua*<sup>-/-</sup>-Osteozyten nach einer KMT. C: Repräsentative  $\mu$ CT-Scans von Unterkieferschnitten aus Wildtyp- und *Idua*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach einer KMT.

#### 4.3.2 Auswirkungen einer Enzyersatztherapie auf den *Idua*-defizienten Knochen

Eine der beiden MPSI-Patienten erhielt nicht nur mit einem Jahr eine Knochenmarktransplantation, sondern vier Jahre nach dieser Behandlung, nach Feststellung eines Transplantatversagens, eine Enzyersatztherapie mit wöchentlichen Iduronidaseinjektionen bis zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme. Drei Jahre nach der KMT wurde die Desoxypyridinolin (Dpd) Konzentration, einem Abbauprodukt des Collagens im Knochen, im Urin bestimmt und war deutlich oberhalb des Normalbereichs. Eine erneute Bestimmung der Dpd-Konzentration bei Biopsieentnahme zeigte eine normale, altersentsprechende Menge im Serum.

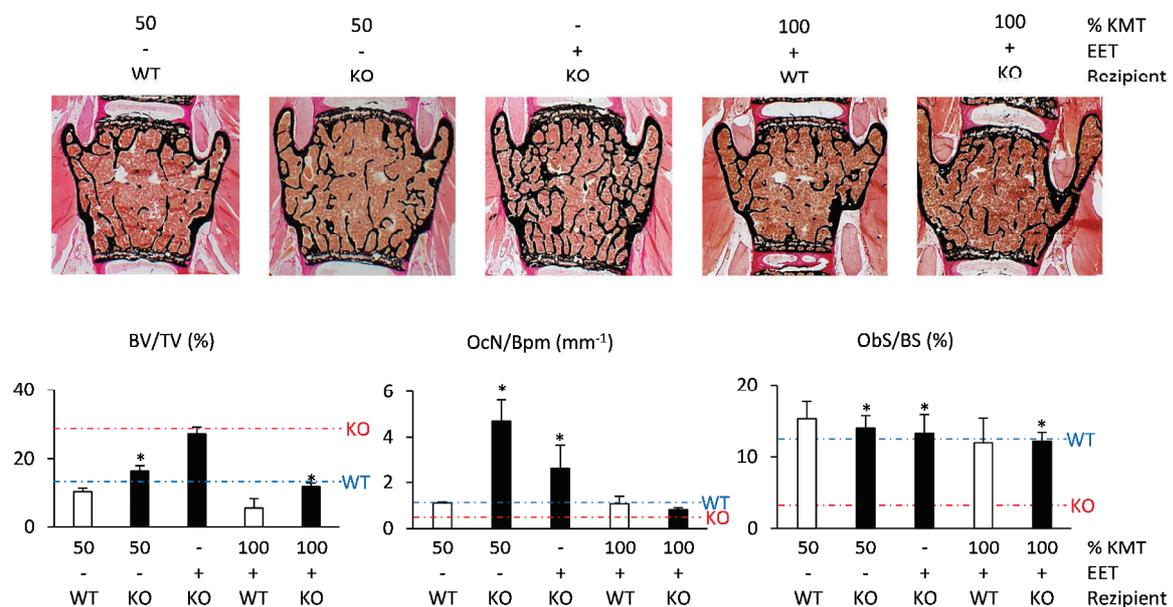


**Abbildung 20: Vermindertes Knochenvolumen in einem MPSI Patienten nach einer KMT und EET.** A: Von Kossa/van Gieson gefärbte Biopsie aus dem Beckenkamm eines 8-jährigen MPSI-Patienten mit sichtbarer Osteoporose und ein Schnitt derselben Biopsie, die mit Toluidinblau gefärbt wurde und die erodierte Knochenoberfläche zeigt. Eine Quantifizierung der Knochenmasse (BV/TV) und die mit Osteoblasten und Osteoklasten besetzte Knochenoberfläche (ObS/BS und OcS/BS) sind ebenfalls gezeigt. Der grüne Balken stellt den Referenzbereich dar. B: Behandlungsverlauf mit Zeitangaben des MPSI-Patienten.

Unter Beachtung der Tatsache, dass im Mausmodell ein erhöhtes Knochenvolumen und in der humanen Biopsie eine Osteoporose nach KMT und EET den Skelettphänotyp prägte, stellte sich die Frage, was für einen Einfluss einer unvollständigen Knochenmarktransplantation (50 % KMT) sowie eine Enzyersatztherapie auf den defekten Knochen in einem Mausmodell mit MPSI hat. Hierfür wurden unterschiedliche Experimente durchgeführt, in denen zum einen Wildtyp- und *Idua*-defiziente Mäuse mit einer halb-letalen Dosis (5 Gy) bestrahlt und darauffolgend mit einer Knochenmarktransplantation behandelt wurden oder zum anderen mit einer letalen Dosis (10Gy) bestrahlt und danach mit einer kombinierten Therapie aus KMT und anschließender ERT behandelt wurden. Aber auch die Frage, wie eine alleinige Enzyersatztherapie auf den *Idua*-defizienten Knochen wirkt, sollte untersucht werden. Im Alter von 26 Wochen wurde der Knochenphänotyp aller Behandlungsgruppen histologisch und histomorphometrisch ausgewertet.

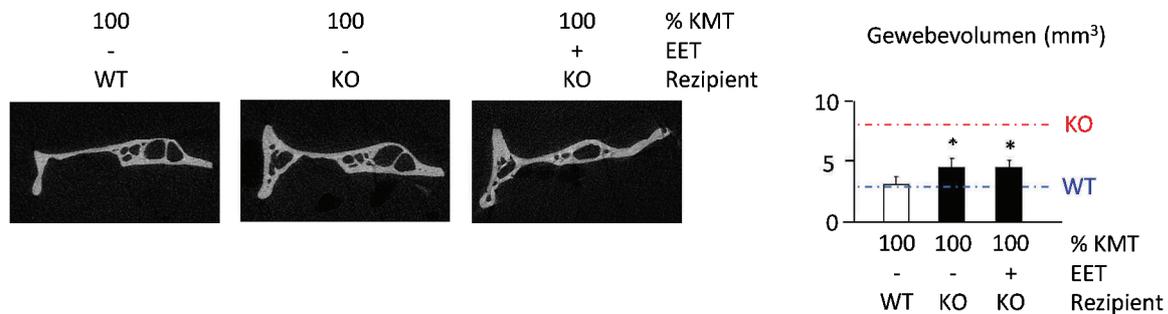
Der skeletale Phänotyp der fünf Behandlungsgruppen (Wildtyp 50 % KMT, *Idua*<sup>-/-</sup> 50 % KMT; *Idua*<sup>-/-</sup> EET, Wildtyp KMT/EET und *Idua*<sup>-/-</sup> KMT/EET) wurde in nicht-entkalkten Wirbelsäulenschnitten analysiert. Eine Knochenmarktransplantation mit Wildtyp-Donorzellen in Wildtyp-Rezipienten, mit oder ohne sich anschließender Enzyersatztherapie, zeigte keine Auswirkungen auf den gesunden skelettalen Phänotyp, weder bezogen auf die Parameter der Knochenmasse, die Anzahl der

Osteoklasten oder die mit Osteoblasten besetzte Knochenoberfläche, noch im Hinblick auf die Intensität der Strahlungs dosis (5 oder 10 Gy). Wie auch bei der vorherigen KMT von Wildtyp-Knochenmark in *Idua*-defiziente Mäuse ist nach einer halb-letalen Bestrahlungsdosis mit einer anschließender KMT eine verminderte Knochenmasse und eine signifikante Erhöhung in der mit Osteoblasten besetzten Gesamtoberfläche des Knochens in den *Idua*<sup>-/-</sup>-Tieren zu messen. Allerdings stieg die Anzahl der Osteoklasten noch dramatischer nach dieser Behandlung in den Mäusen an. Die Enzymersatztherapie mit der fehlenden Iduronidase verbesserte den Knochenstatus der *Idua*-defizienten Mäuse in Bezug auf die Knochenmasse nur gering. Sie induzierte ebenfalls einen Anstieg in der Anzahl der Osteoklasten, konnte jedoch die Fehlverteilung der Osteoblasten durch eine Zunahme der mit Osteoblasten besetzten Gesamtknochenoberfläche korrigieren. Die Kombinationstherapie aus KMT und EET korrigierte die erhöhte Knochenmasse und verringerte die mit Osteoblasten besetzte Knochenoberfläche in den *Idua*-defizienten Mäuse auf das Niveau der Wildtypen, was bereits zuvor durch eine alleinige KMT mit vorausgegangener halb-letalen und letalen Bestrahlungsdosis gezeigt werden konnte. Sehr auffällig war jedoch, dass sich die Osteoklastogenese nicht durch diese zwei Behandlungen normalisierte, sondern erheblich in den knochenmarktransplantierten *Idua*-defizienten Mäusen erhöht hatte. Dieser Pathologie konnte durch einen zusätzlichen Enzymersatz vorgebeugt werden. Durch die EET wurde die Anzahl der Osteoklasten signifikant auf das Niveau der unbehandelten Wildtyp-Mäuse reduziert.



**Abbildung 21: Knochenmarkstransplantation und Enzymersatztherapie beeinflussen den Knochenumbau *Idua*-defizienter Mäuse.** Von Kossa/van Gieson gefärbte, unentkalkte Wirbelsäulenschnitte aus 26 Wochen alten Wildtyp- und *Idua*-defizienten Mäusen, die einer Knochenmarkstransplantation (KMT) mit vorausgegangener halb-letaler (50 %) oder letaler (100 %) Bestrahlungsdosis, einer Enzymersatztherapie (EET) oder einer Kombinationstherapie aus KMT und EET unterzogen wurden. Auch wurde das Knochenvolumen, die Anzahl der Osteoklasten und die mit Osteoblasten besetzte Gesamtknochenoberfläche in den oben genannten Mausgruppen quantifiziert. Die blau und rot skizzierten Linien zeigen jeweils das zuvor quantifizierte Knochenvolumen in unbehandelten Wildtypen und *Idua*-defizienten Mäusen an.

Auch im Kieferknochen hatte die KMT mit kombinierter EET einen positiven Effekt auf das Gewebevolumen. Das Gewebevolumen in den *Idua*-defizienten Mäusen konnte signifikant auf das Volumen der unbehandelten Wildtypen reduziert werden.



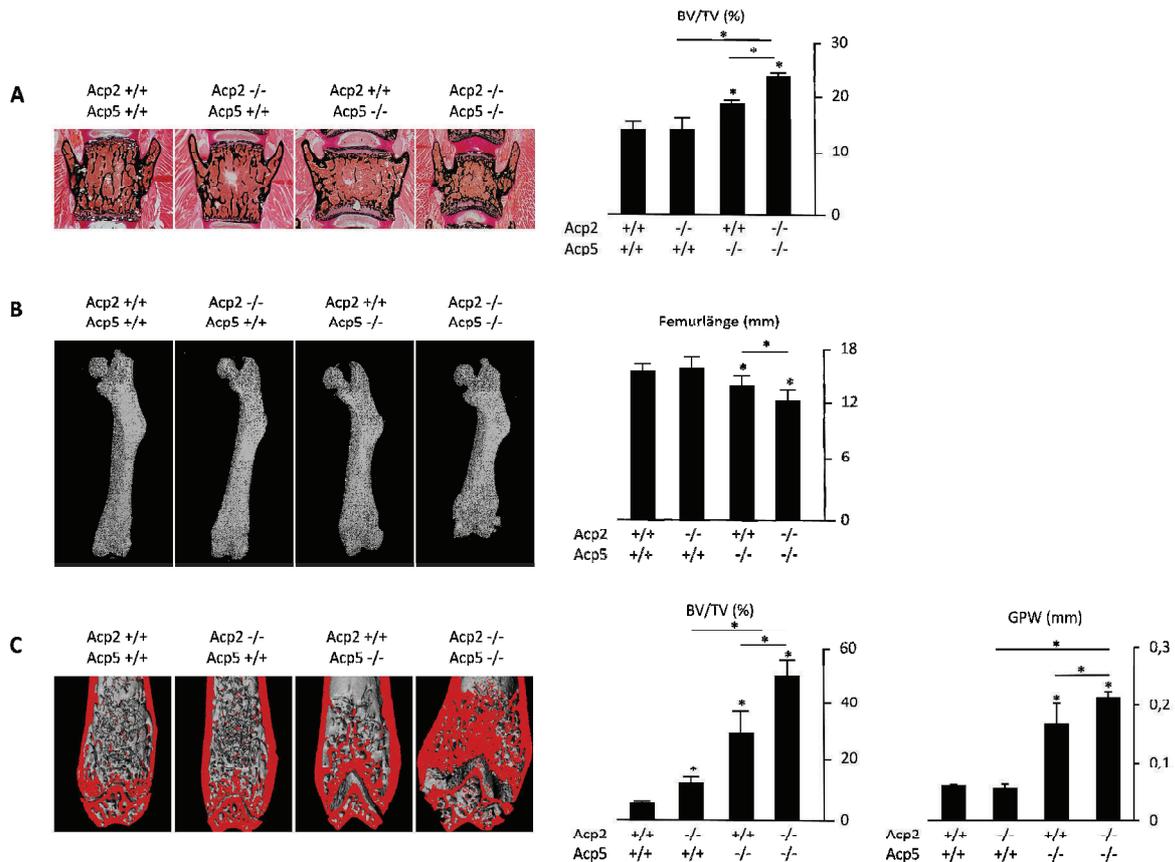
**Abbildung 22: Einfluss einer Knochenmarktransplantation und einer Enzyersatztherapie auf den cranio-fazialen Phänotyp *Idua*-defizienter Mäuse.** Repräsentative  $\mu$ CT-Scans von Unterkieferschnitten aus Wildtyp- und *Idua*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach einer KMT und nach einer Kombitherapie von KMT und ERT mit Quantifizierung des Unterkiefergewebevolumens aus gezeigten Behandlungsgruppen. n=3 pro Gruppe. \*P<0.05 gegen unbehandelte Kontrollen oder gegen KMT.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der in den *Idua*-defizienten Mäusen gezeigte Knochenremodelling-Phänotyp sehr komplex und nicht *in vitro* zu simulieren ist, was wahrscheinlich durch die Akkumulation von Glykosaminoglykanen in der Knochenmatrix erklärt werden kann. Die *Idua*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten keine Entwicklungsabnormitäten oder Beeinträchtigungen im Längenwachstum. Sie wiesen jedoch eine cranio-faziale Zunahme des Gewebevolumens im Kiefer und eine trabekulär stark erhöhte Knochendichte mit signifikant reduzierter Anzahl an Osteoklasten und Osteoblasten und einer Umverteilung der Osteoblasten-Reihen auf. Zudem konnte ein massiver Defekt der Osteozyten durch Einlagerung von großen Ansammlungen an Speichermaterial gezeigt werden. Durch eine kombinierte Therapie aus Knochenmarktransplantation und Enzyersatztherapie konnte der skelettale Knochenphänotyp der *Idua*-defizienten Mäuse normalisiert werden.

#### 4.4 Histologische Analyse des Knochenphänotyps des *Acp2/Acp5*-defizienten Mausmodells

Die derzeitige Behandlungsoption für eine Osteopetrose, wie sie in dem MPSI-Mausmodell vorliegt, ist die Knochenmarktransplantation. Auch die Defizienz eines anderen lysosomalen Enzyms, der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase Typ 5 (TRAP, *Acp5*), äußert sich in einer Osteopetrose. TRAP ist ein klassischer Marker für Osteoklasten, doch in der Funktion noch nicht ganz verstanden. Derzeit ist neben der TRAP eine weitere lysosomale saure Phosphatase bekannt, die lysosomale saure Phosphatase (LAP, *Acp2*). Das Fehlen von jeweils einer Phosphatase führt im Mausmodell zu einem relativ milden Phänotyp, was die Vermutung nahe legt, dass diese lysosomalen Enzyme sich wechselseitig komplementieren. Aus diesem Grund sollte das *Acp2/Acp5*-defiziente Mausmodell zuerst einmal im Hinblick auf den skelettalen Phänotyp der Mäuse analysiert werden.

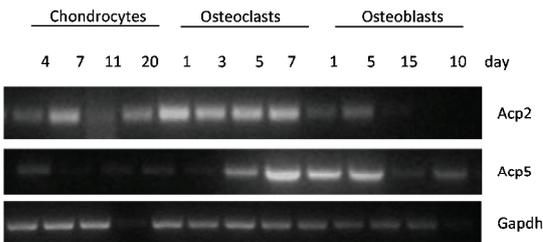
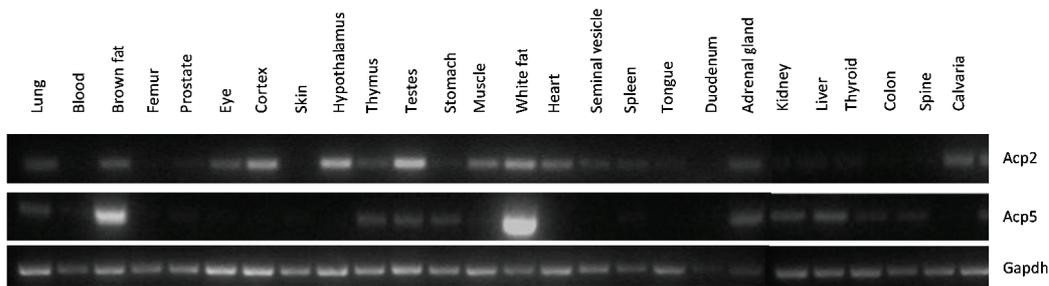
Um eine detaillierte Charakterisierung der *Acp2/Acp5*-defizienten Mäuse vorzunehmen, wurden zuerst nicht-entkalkte Wirbelkörper von Wildtypen und *Acp2/Acp5*-defizienten (*Acp2<sup>-/-</sup>/Acp5<sup>-/-</sup>*), aber auch einzel-defizienten *Acp2*- (*Acp2<sup>-/-</sup>*) und *Acp5*- (*Acp5<sup>-/-</sup>*) Mäusen im Alter von 12 Wochen histologisch aufgearbeitet und ausgewertet. In von Kossa/van Gieson gefärbten Histologien war zu erkennen, dass die *Acp2/Acp5*-defizienten Mäuse ein signifikant erhöhtes Knochenvolumen im einzelnen Wirbelkörper aufwiesen als die Wildtypen und die einzel-defizienten Tiere.  $\mu$ CT-Analysen der Femora bestätigten diese Ergebnisse. Hier war auffällig, dass die Länge der Femora signifikant kürzer in den doppel-defizienten Tieren als in gleichaltrigen Geschwistertieren war. Eine Vermessung der Wachstumsfuge zeigte eine signifikant verbreiterte Fuge in den Mäusen mit kombinierter Defizienz. Diese Ergebnisse zeigten, dass es einen Synergismus zwischen den beiden Phosphatasen gibt, der sich in einer erhöhten Knochenmasse, einem reduzierten Längenwachstum und einer verbreiterten Wachstumsfuge in den *Acp2/Acp5*-defizienten Mäusen äußerte.



**Abbildung 23: Erhöhte trabekuläre Knochenmasse und vermindertes Längenwachstum in Mäusen mit Acp2/Acp5-Defizienz.** A: Unentkalkte 4  $\mu$ m dicke Histologieschnitte einzelner Wirbelkörper von Wildtyp-, Acp2<sup>-/-</sup>, Acp5<sup>-/-</sup> und Acp2<sup>-/-</sup>/Acp5<sup>-/-</sup>-Mäusen im Alter von 12 Wochen. Die Präparate wurden nach von Kossa/van Gieson gefärbt und ausgewertet. Hierbei wird die mineralisierte Knochenmasse schwarz gefärbt. Zusätzlich ist eine histomorphometrische Auswertung des Knochenparameters BV/TV (bone volume per tissue volume) in % zu sehen. B: Repräsentative  $\mu$ CT-Aufnahme eines Femurs in einzel-defizienten Acp2- und Acp5-Mäusen mit Vermessung der Länge der Femora. C: Querschnitt eines repräsentativen  $\mu$ CT-Scan eines Femurs in einzel-defizienten und doppel-defizienten Acp2- und Acp5-Mäusen mit Quantifizierung des trabekulären Knochenvolumens und Vermessung der Breite der Wachstumsfuge (growth plate width (GPW)). n=5 pro Gruppe. \*P<0,05 gegen WT, Acp2<sup>-/-</sup> oder Acp5<sup>-/-</sup>.

#### 4.5 Zelluläre und molekulare Untersuchung des skelettalen Phänotyps Acp2/Acp5-defizienter Mäuse

Eine gewebspezifische Untersuchung mittels einer RT-PCR sollte Aufschluss über die generelle Expression von Acp2 und Acp5 in verschiedenen Geweben geben. Dafür wurde gewebspezifisch RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und diese im Anschluss als Matrize für eine PCR mit spezifischen Acp2- und Acp5-Primern genutzt. Es fiel auf, dass eine Acp2-Expression in verschiedenen Geweben zu finden ist, Acp5 neben dem Osteoklasten jedoch auffällig stark im braunen und weißen Fettgewebe exprimiert wird und ebenfalls in früh differenzierten Osteoblasten.

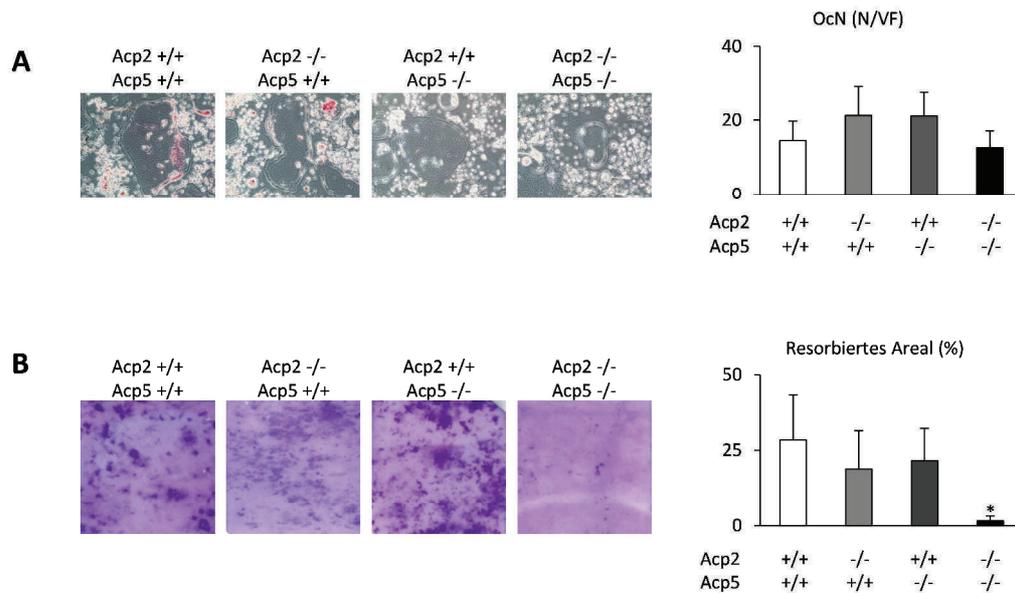


**Abbildung 24: Expression von Acp2 und Acp5 in verschiedenen Geweben.** Gelbild der gewebsspezifischen Acp2- bzw. Acp5-Expression nach einer cDNA-PCR aus den jeweils gezeigten Organen und Geweben. Als Ladekontrolle wurden Gapdh (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) verwendet.

Da sowohl Acp2 als auch Acp5 in Osteoklasten und Osteoblasten exprimiert wurden, sollte eine *ex vivo* Analyse von Osteoklasten und Osteoblasten aus Wildtypen, Acp2/Acp5-defizienten Mäusen sowie aus den einzel-defizienten Tieren Aufschluss über funktionale und molekulare Unterschiede in den Mausmodellen auf zellulärer Ebene liefern. Hierfür wurden Knochenmarkzellen aus den Femora und Tibien der Mausgruppen isoliert und in Richtung Osteoklasten oder Osteoblasten differenziert.

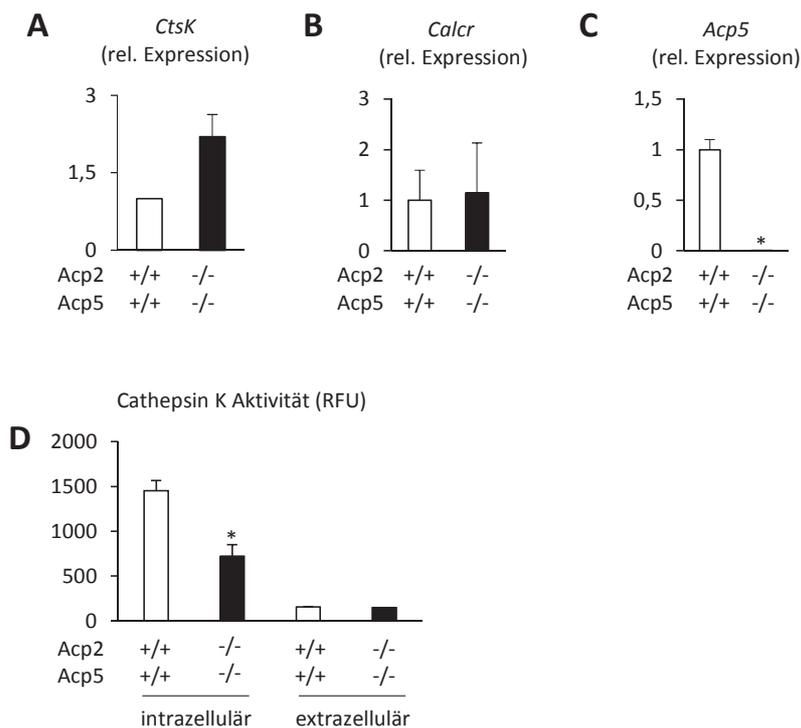
Aufgrund der eindeutigen Ergebnisse in der beeinträchtigten Funktion in den doppel-defizienten Mäusen, wurde im Folgenden nur noch der Vergleich zwischen Wildtyp- und Acp2/Acp5-defizienten Mäusen getätigt.

Zum Nachweis von Osteoklasten wurden diese mittels einer enzymatischen Färbung von TRAP in Wildtyp-, Acp2<sup>-/-</sup>, Acp5<sup>-/-</sup>- und Acp2/Acp5-defizienten Kulturen angefärbt, konnten jedoch nur in den Wildtyp- und Acp2<sup>-/-</sup>-Kulturen eindeutig markiert werden. Wie erwartet erfolgte keine Färbung von TRAP in den Acp5-defizienten und Acp2/Acp5-defizienten Kulturen. Eine Quantifizierung der Anzahl der multinukleären Osteoklasten in den Kulturen zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied. Desweiteren wurde die Resorptionsfähigkeit der Osteoklasten auf Dentin-Stücken untersucht. Hier zeigte sich, dass Osteoklasten aus Acp2/Acp5-defizienten Mäusen kaum Resorptionspotential im Vergleich zu Osteoklasten aus Wildtypen, Acp2<sup>-/-</sup>- oder Acp5<sup>-/-</sup>-Mäusen besitzen.



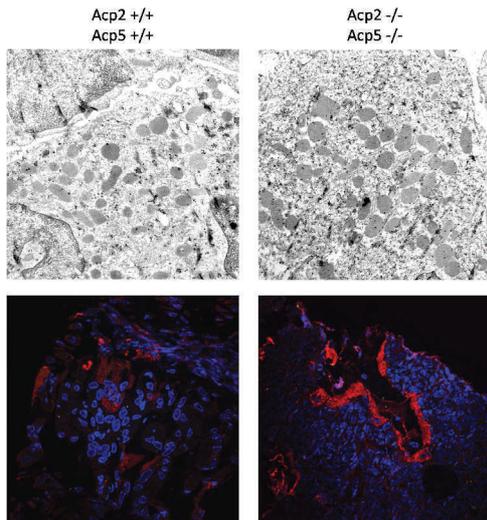
**Abbildung 25: Eingeschränkte Funktionalität von Osteoklasten aus Acp2/Acp5-defizienten Mäusen.** A: TRAP-positiv angefärbte Osteoklasten aus Wildtyp-, Acp2<sup>-/-</sup>, Acp5<sup>-/-</sup> und Acp2/Acp5-defizienten Mäusen mit Quantifizierung. B: Repräsentatives Dentin-Stück mit angefärbten Resorptionslakunen durch Osteoklasten und Quantifizierung der Resorptionsfähigkeit dieser in Wildtyp-, Acp2<sup>-/-</sup>, Acp5<sup>-/-</sup> und Acp2/Acp5-defizienten Kulturen. n=9 pro Gruppe. \*P<0,05 gegen WT.

Auch auf molekularer Ebene konnten Expressionsunterschiede in Osteoklasten aus Wildtyp- und Acp2/Acp5-defizienten Mäusen detektiert werden. Die Expression von Cathepsin K, einem lysosomalen Enzym des Osteoklasten, involviert in die Resorption von Knochen und dessen Umbau durch den Abbau von Typ1-Collagen, war in doppel-defizienten Kulturen stärker exprimiert. Die Expression eines weiteren Markers der Osteoklastogenese, dem Calcitoninrezeptor (*Calcr*), war jedoch nicht unterschiedlich beeinflusst. Wie erwartet war auch hier TRAP auf Expressionsebene in den Acp2/Acp5-defizienten Tieren nicht nachzuweisen. Um ebenfalls *in vitro* herauszufinden, ob die Cathepsin K-Konzentration innerhalb oder außerhalb der Zelle in den doppel-defizienten Osteoklasten im Gegensatz zu den Wildtyp-Osteoklasten verändert war, wurde in einem nächsten Schritt die extrazelluläre und intrazelluläre Aktivität von Cathepsin K bestimmt. Hierfür wurde Zellkulturüberstand von Osteoklasten aus beiden Genotypen nach Einleitung der Differenzierung mit M-CSF und RANKL und Osteoklastenlysat nach Induktion verwendet. Sowohl die extrazelluläre Cathepsin K-Aktivität als auch die intrazelluläre Aktivität waren signifikant reduziert in doppel-defizienten Osteoklastenkulturen.



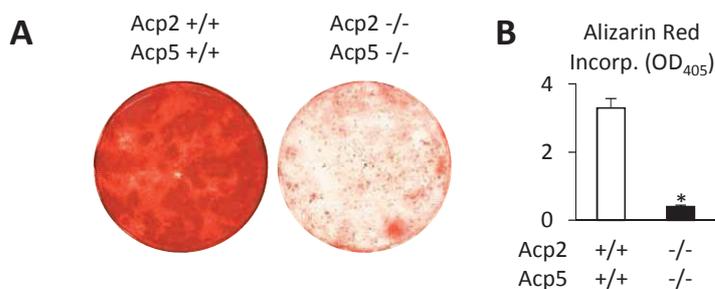
**Abbildung 26: Erhöhte Expression von Cathepsin K bei reduzierter extra- und intrazellulärer Aktivität in *Acp2/Acp5*-defizienten Osteoklastenkulturen.** A: Relative Expression von Cathepsin K (*CtsK*) in Wildtyp- und *Acp2*<sup>-/-</sup>/*Acp5*<sup>-/-</sup>-Osteoklastenkulturen. B: Relative Expression vom Calcitonin-Rezeptor (*Calcr*) in Wildtyp- und *Acp2*<sup>-/-</sup>/*Acp5*<sup>-/-</sup>-Osteoklastenkulturen. C: Relative Expression von *Acp5* in Wildtyp- und *Acp2*<sup>-/-</sup>/*Acp5*<sup>-/-</sup>-Osteoklastenkulturen. n=1 bzw 3 pro Gruppe. \*P<0,05 gegen WT. D: Bestimmung der Aktivität von Cathepsin K im Zelllysat und im Zellkulturüberstand von Wildtyp- und doppel-defizienten Osteoklastenkulturen an Tag 6 nach Differenzierung. n=3 pro Gruppe. \*P<0,05 gegen WT.

Cathepsin K ist, ebenso wie die TRAP, eine lysosomale Hydrolase. Beide werden hoch exprimiert im Osteoklasten und von dort über den M6P-abhängigen Transportweg in die Resorptionslakune sezerniert (van Meel, Boonen et al. 2011). In diesem Mausmodell wurde die TRAP depletiert, deren Funktion die Abspaltung von M6P-Resten saurer Hydrolasen ist, so möglicherweise auch im Falle von Cathepsin K. Es wurde postuliert, dass aufgrund der fehlenden LAP und TRAP Cathepsin K weiterhin den M6P-Rest trägt und daher nicht aus dem Osteoklasten in die Resorptionslakune sezerniert werden kann und es somit zu einer intrazellulär vermehrten Ansammlung des Enzyms kommt. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde eine Immunogoldfärbung von Cathepsin K im Wildtyp- und *Acp2/Acp5*-defizienten Femur angefertigt und elektronenmikroskopisch untersucht. Auch eine immunhistochemische Färbung gegen Cathepsin K derselben Proben wurde durchgeführt. Im Femur der Mäuse mit kombinierter *Acp2/Acp5*-Defizienz war eine erhöhte Menge an Goldpartikeln im Zytoplasma von Osteoklasten erkennbar. Auch in der immunhistochemischen Färbung war deutlich mehr Cathepsin K in den *Acp2*<sup>-/-</sup>/*Acp5*<sup>-/-</sup>-Schnitten angefärbt.



**Abbildung 27: Erhöhte intrazelluläre Lokalisation von Cathepsin K in Acp2/Acp5-defizienten Mäusen.** Immunogoldfärbung und immunhistochemische Färbung von Cathepsin K in Wildtyp- und Acp2/Acp5-defizienten Femurschnitten. In der immunhistochemischen Färbung sind Zellkerne blau gefärbt, das Cathepsin K ist in rot dargestellt.

Zum Nachweis von Osteoblasten wurden Knochenmarkszellen aus Wildtyp- und Acp2/Acp5-defizienten Mäusen mit  $\beta$ -Glycerophosphat und Ascorbat differenziert und an Tag 10 nach Differenzierung mit einer Alizarinrot-Färbung der Mineralisationsgrad bestimmt. Hier konnte eine eingeschränkte Osteoblastenfunktionalität in den Acp2/Acp5-defizienten Mäusen nachgewiesen werden, die signifikant schlechter mineralisierten. Dieses Ergebnis ist aufgrund der bislang vermuteten spezifischen Expression von TRAP im Osteoklasten nicht einfach zu erklären und muss weiterführend untersucht werden.



**Abbildung 28: Beeinträchtigte Osteoblastogenese in Acp2/Acp5-defizienten Mäusen.** A: Anfärbung von mineralisierten Arealen mit Alizarinrot in Wildtyp- und Acp2/Acp5-defizienten Osteoblastenkulturen. B: Quantifizierung der Mineralisation bei einer photometrischen Messung bei 405 nm. Die Mineralisationsfähigkeit primärer Osteoblasten aus Acp2/Acp5-defizienten Mäusen ist signifikant reduziert. n=6 pro Gruppe. \*P<0,05 gegen WT.

#### 4.6 Zelluläre und molekulare Untersuchung des Fettphänotyps in Acp2/Acp5-defizienten Mäusen

Da Acp5 eine hohe Expression im braunen und weißen Fettgewebe zeigte (Abbildung 24), wurden zur Analyse des Fettphänotyps der Acp2/Acp5-defizienten Mäuse Adipozyten aus subkutanem Fett der

Leistungsgend isoliert und kultiviert. Es sollte herausgefunden werden, ob es hier einen Osteoklasten-ähnlichen Zelltyp, der ebenso wie der Osteoklast aus der hämatopoetischen Zelllinie stammt und TRAP sezerniert, gibt und ob eine Defizienz des Gens Auswirkungen auf den Fettphänotyp der Maus besitzt.

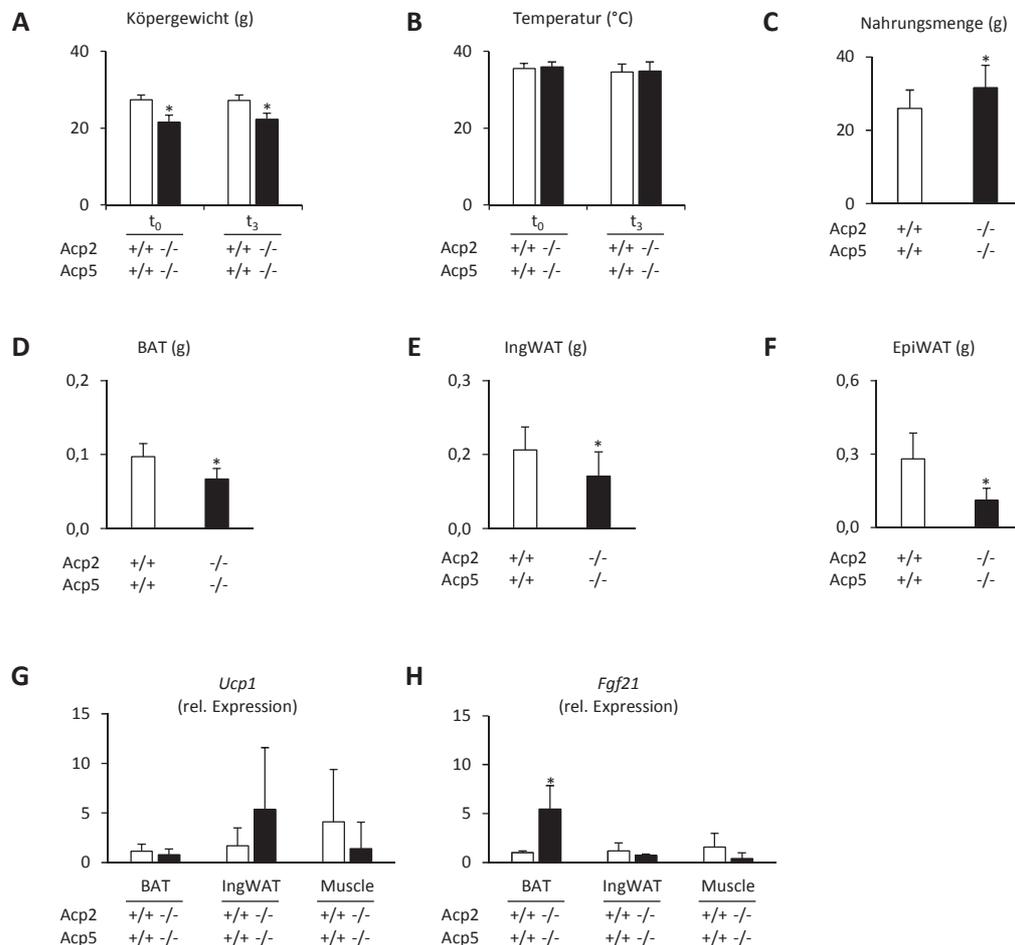
In diesem Zusammenhang war eine Publikation sehr interessant, in der Qiu und Kollegen zeigen konnten, dass durch Kälteeinfluss aktivierte Makrophagen eine wichtige Rolle im thermogenetischen Kreislauf von beigem Fett spielen (Qiu, Nguyen et al. 2014). Dieser Zelltyp entstammt, ebenso wie der Osteoklast, der hämatopoetischen Zelllinie. Es stellte sich die Frage, wie sich der Fettphänotyp der *Acp2/Acp5*-defizienten Mäuse nach Kälteinduktion verändern würde und ob dies Auswirkungen auf die Expression verschiedener Fett-assoziierten Markergene hätte.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden Wildtyp- und *Acp2/Acp5*-defiziente Geschwistermäuse einem Experiment unterzogen, in dem das induzierte *Browning* durch Kälteeinfluss in den beiden Gruppen verglichen werden sollte. Auch eine Quantifizierung des Gewichts, der Nahrungsaufnahme über die Zeit des Experiments und verschiedener Subfetttypen wurde durchgeführt. Während des Experiments wurden die Tiere für 3 Tage in einer kühlen Umgebung gehalten und vor und nach Versuchsbeginn jeweils das Gewicht und die Temperatur des Einzeltieres bestimmt. Im Gewicht zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtypen und den doppel-defizienten Mäusen sowohl zum Start als auch zum Ende des Versuches, wobei in beiden Versuchsgruppen keine Gewichtsveränderung über die Zeit beobachtet werden konnte. Über das Experiment hinweg zeigten sich keine Körpertemperaturveränderungen in den beiden Vergleichsgruppen. Auffällig war die signifikant erhöhte Nahrungsmenge, die die *Acp2/Acp5*-defizienten Tiere zu sich nahmen. Eine Quantifizierung der verschiedenen Fettdepots wie dem interscapularen (BAT), dem subkutanen, inguinalen (IngWAT) und dem epidermalen (EpiWAT) Fettgewebe der Tiere ergab, dass die *Acp2/Acp5*-defizienten Mäuse weniger Fettanteil per se aufwiesen.

Aus braunem Fettgewebe (BAT), inguinalem weißen Fettgewebe (IngWAT) und aus Muskel wurde ebenfalls RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und eine Expressionsanalyse von *Ucp1*, einem Marker für das braune Fettgewebe (*brown adipose tissue* (BAT)), das ermöglicht, in der mitochondrialen Atmungskette den Elektronentransport von der ATP-Synthese abzukoppeln und so durch diese stark exotherme Reaktion Wärme zu produzieren und *Fgf21*, einem *browning* induzierendem Gen nach Kälteeinfluss (Bartelt and Heeren 2014), durchgeführt. In den *Acp2<sup>-/-</sup>/Acp5<sup>-/-</sup>*-Mäusen zeigte sich eine erhöhte *Ucp1*-Expression im IngWAT, eine reduzierte Expression des Gens im Muskel und eine signifikante höhere Expression von *Fgf21* im BAT.

Die Ergebnisse zeigen, dass die *Acp2/Acp5*-defizienten Mäuse bei geringerem Körpergewicht mit kleineren Fettdepots zu Beginn und zum Ende des Versuchs eine signifikant erhöhte

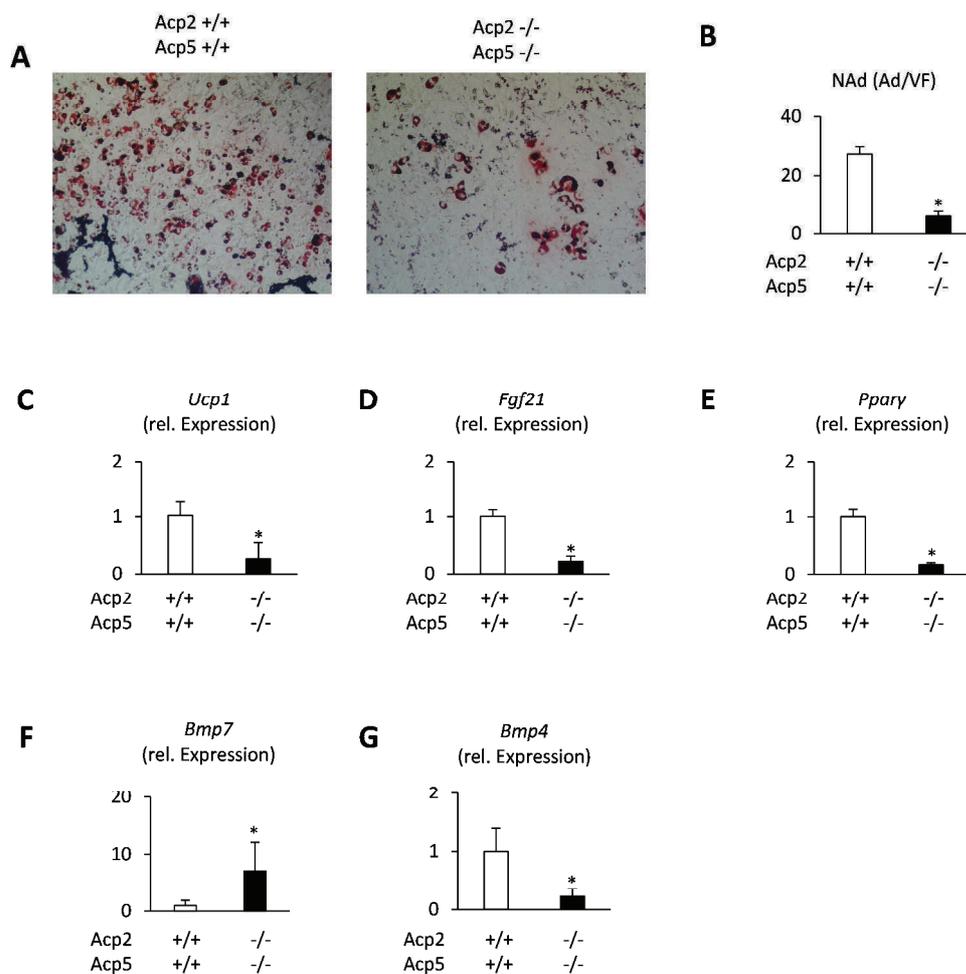
Nahrungsaufnahme besitzen. Zudem konnte gezeigt werden, dass *Ucp1* nach Kälte verstärkt im IngWAT, also dem weißen Fettgewebe, in den doppel-defizienten Tieren exprimiert wurde und in diesen Tieren ein *Browning* induziert werden konnte, was auch durch die signifikant erhöhte Expression des *Fgf21* unterstützt wurde.



**Abbildung 29: Reduziertes Fettpolster und erhöhtes Browning im weißen Fettgewebe nach Kälteeinfluss in den *Acp2/Acp5* defizienten Mäuse.** A: Körpergewicht angegeben in g zu Beginn (t<sub>0</sub>) und nach 3 Tagen Kälteinduktion (t<sub>3</sub>) in Wildtyp- und *Acp2*<sup>-/-</sup>/*Acp5*<sup>-/-</sup>-Geschwistermäusen. B: Temperatur angegeben in °C in Wildtyp- und *Acp2*<sup>-/-</sup>/*Acp5*<sup>-/-</sup>-Tieren zu Beginn (t<sub>0</sub>) und nach 3 Tagen Kälteinduktion (t<sub>3</sub>). C: Aufgenommene Nahrungsmenge der Wildtyp- und *Acp2*<sup>-/-</sup>/*Acp5*<sup>-/-</sup>-Mäuse während des Versuchs. D: Quantifizierung des braunen Fettgewebes (Brown adipose tissue (BAT) in g in Wildtyp- und *Acp2*<sup>-/-</sup>/*Acp5*<sup>-/-</sup>-Mäusen. E: Gewichtsanalyse in g des subkutanen, inguinalen weißen Fettgewebes (IngWAT) der beiden Vergleichsgruppen. F: Gewichtsanalyse in g des epidermalen, weißen Fettgewebes (EpiWAT) in Wildtyp- und *Acp2*<sup>-/-</sup>/*Acp5*<sup>-/-</sup>-defizienten Geschwistertieren. G: Relative Expression von *Ucp1* (Uncoupling protein 1) in BAT, IngWAT und Muskel in Wildtyp- und *Acp2*<sup>-/-</sup>/*Acp5*<sup>-/-</sup>-Tieren. H: Relative Expression von *Fgf21* (Fibroblast growth factor 21) in BAT, IngWAT und Muskel in genannten Vergleichsgruppen. n=8 pro Gruppe. \*P<0,05 gegen WT.

Im Anschluss daran wurde untersucht, ob auch *in vitro* die Adipogenese verändert war. Hierfür wurde die Adipozytenreifung mittels *Oil Red O* Färbung in den beiden Vergleichsgruppen untersucht, das zur Darstellung von Triglyceriden verwendet wird und reife Adipozyten angefärbt. Im Gegensatz zur Wildtyp-Kontrolle waren signifikant weniger reife, Tryglycerid-einlagernde Adipozyten in der *Acp2/Acp5*-defizienten Kultur vorhanden. Diese verminderte Adipozytenreifung konnte auch auf Expressionsebene beobachtet werden. *Ucp1* war ebenso wie *Fgf21* signifikant reduziert. Aber auch

im weißen Fett (*white adipose tissue* (WAT)) war eine beeinträchtigte Adipogenese in der reduzierten Expression von *Pparγ* (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), einem Marker, der hier hoch exprimiert wird, zu erkennen (Ahmadian, Suh et al. 2013). Des Weiteren wurde die Expression von *Bmp7* (*Bone morphogenetic protein 7*), einem Stimulator der Differenzierung von braunen Adipozyten (Boon, van den Berg et al. 2013), und *Bmp4* (*Bone morphogenetic protein 4*), das in der Entwicklung des weißen Fettes involviert ist (Qian, Tang et al. 2013), untersucht. In Adipozyten aus *Acp2/Acp5*-defizienten Mäusen ist die relative Expression von *Bmp7* signifikant erhöht und die relative Expression von *Bmp4* signifikant erniedrigt im Vergleich zu Adipozyten aus Wildtyp-Mäusen.



**Abbildung 30: Beeinträchtigte Adipogenese der *Acp2/Acp5*-defizienten Kulturen.** A: Oil Red O Färbung von Wildtyp- und *Acp2<sup>-/-</sup>/Acp5<sup>-/-</sup>*-Adipozyten. B: Quantifizierung der Anzahl der Adipozyten pro Gesichtsfeld (Number of adipocytes per visual field (NAd/VF)). C: Relative Expression von *Ucp1* (Uncoupling protein 1) in Wildtyp- und *Acp2/Acp5*-defizienten Adipozyten. D: Relative Expression von *Fgf21* (Fibroblast growth factor 21) in Wildtyp- und *Acp2/Acp5*-defizienten Adipozytenkulturen. E: Relative Expression von *Pparγ* (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) in Wildtyp- und *Acp2/Acp5*-defizienten Adipozyten. F: Relative Expression von *Bmp7* (Bone morphogenetic protein 7) in gezeigten Adipozytenkulturen. G: Relative Expression des *Bmp4* (Bone morphogenetic protein 4) in Wildtyp- und *Acp2/Acp5*-defizienten Adipozytenkulturen. n=6 pro Gruppe. \*P<0,05 gegen WT.

Diese *in vitro* Ergebnisse zeigen auf, dass in den *Acp2/Acp5*-defizienten Mäusen ein zellautonomer Defekt der Adipozyten für den Fettphänotyp verantwortlich sein könnte, der jedoch noch weiterführend untersucht werden muss.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die kombinierte Defizienz von LAP und TRAP in einer erhöhten trabekulären Knochenmasse und einem verminderten Längenwachstum mit verbreiteter Wachstumsfuge resultiert. Die Osteoklasten dieser Mäuse zeigten eine eingeschränkte Resorptionsfunktionalität mit einer erhöhten Expression von Cathepsin K, einer lysosomalen Hydrolase, die über den M6P-abhängigen Weg aus dem Osteoklasten in die Resorptionslaku­ne transportiert wird. *In vitro* war die intra- und extrazelluläre Aktivität dieser Hydrolase reduziert, was durch einen möglichen intrazellulären pH-Abfall aufgrund der Enzymdefizienz erklärt werden könnte, *in vivo* hingegen zeigte sich jedoch eine intrazellulär erhöhte Lokalisation von Cathepsin K in den doppel-defizienten Tieren. Eine weitere Auffälligkeit dieses *Acp2/Acp5*-defizienten Mausmodells war in dem veränderten Fettphänotyp der Tiere sichtbar. In einem Experiment mit Kälteeinfluss zeigten die doppel-defizienten Mäuse bei einem geringeren Körpergewicht mit kleineren Fettdepots eine erhöhte Nahrungsaufnahme und ein stärkeres *Browning* im weißen Fettgewebe, gekennzeichnet durch eine erhöhte Expression zweier Markergene, dem *Ucp1* und *Fgf21*. *In vitro* Untersuchungen von Adipozyten aus *Acp2/Acp5*-defizienten Mäusen ließen auf eine beeinträchtigte Adipogenese mit einem zellautonomen Defekt der Adipozyten schließen.

## 5 Diskussion und Ausblick

Lysosomale Speichererkrankungen (LSD) wurden zum ersten Mal im 19. Jahrhundert beschrieben, unser heutiges Konzept der Struktur und Funktion des Lysosoms verdanken wir jedoch den Arbeiten von Christian de Duve und Kollegen aus dem Jahr 1955. Er isolierte und charakterisierte Lysosomen und beschrieb sie als saures, verschiedene Hydrolasen enthaltendes Kompartiment (Klein and Futerman 2013). Zu degradierende oder zu recycelnde Makromoleküle gelangen hauptsächlich über den endozytotischen Transportweg zum Lysosom. Allerdings wurde auch beschrieben, dass Lysosomen nicht nur ein vitales Recyclingzentrum darstellen, sondern auch zusammen mit Endosomen und Autophagosomen die Signaltransduktion und Regulation der Genexpression beeinflussen (Walkley 2007; Settembre, Zoncu et al. 2012). Aus diesem Grund ist es nicht erstaunlich, dass Defekte innerhalb des lysosomalen Systems zu verheerenden Konsequenzen führen, wie sie in LSD-Patienten auftreten. Sie äußern sich in Symptomen wie Dysfunktionen des zentralen und peripheren Nervensystems, Skelettdysplasien und Vergrößerung viszeraler Organe, wie Leber und Milz. Obwohl die meisten Mutationen, die hierfür verantwortlich sind, beschrieben wurden, ist die molekulare Maschinerie, die zur Einlagerung von Speichermaterial und somit zu zellulärer Dysfunktion führt, noch weitestgehend unbekannt. Um die zugrunde liegenden, pathogenen Mechanismen zu erforschen, sind Tiermodelle mit vergleichbaren Mutationen wie im Menschen ein wichtiges Werkzeug für die Wissenschaft. Einige natürlich entstandene LSDs sind in Hunden, Katzen und Mäusen gefunden worden (Hemsley and Hopwood 2010). Aufgrund der heutigen Technologie ist es zudem möglich, Mausmodelle durch gezielte Deletion des gesamten Gens oder durch Einführung einer Punktmutation zu generieren, die die Mutationen in humanen Krankheiten imitieren (Haskins, Giger et al. 2006). Trotz dieser herausragenden Möglichkeit zur Untersuchung der pathologischen Kaskaden hinter dem Krankheitsbild durch die Entwicklung von Tiermodellen, haben diese ihre Limitierung, beispielsweise in der Ausprägung nicht aller Aspekte der Krankheit. Die Einlagerung von Speichermaterial beginnt in der Kindheit, verläuft fortschreitend und betrifft die verschiedensten Organe und das zentrale Nervensystem. Die zwei wichtigsten Therapieformen sind die Enzyersatztherapie oder Gentherapie, um die Funktion des fehlenden Proteins wiederherzustellen oder das Substrat zu reduzieren, aber auch die Knochenmarktransplantation in früher Kindheit, um eine mentale Beeinträchtigung zu minimieren. Für alle Optionen ist es jedoch notwendig, eine bessere Antwort auf folgende Fragen zu bekommen: Welchen Zellen sind therapeutisch relevant? Zu welchem Zeitpunkt der Krankheit ist diese reversibel? Welche Mechanismen lösen die Schäden am Gewebe aus? Vor allem gilt jedoch, dass für jede LSD die Antwort auf diese Fragen variiert und individuell beantwortet werden muss.

Eine Beeinträchtigung des Skelettsystems ist für mehrere lysosomale Speicherkrankheiten beschrieben worden. Aus diesem Grund und zur Beantwortung der oben genannten Fragen, wurde sich in dieser Doktorarbeit mit der Bedeutung lysosomaler Prozesse im Knochenumbau beschäftigt und diese besser charakterisiert. MPSI gehört zu den lysosomalen Speichererkrankungen, ausgelöst durch inaktivierende Mutationen in der  $\alpha$ -L-Iduronidase (*Idua*), die für die lysosomale Degradation der Glykosaminoglykane (GAG) wie Heparan- und Dermatansulfat essentiell ist. Diese IDUA-Inaktivierung führt auf zellulärer Ebene zu einer pathologischen Anreicherung von GAGs, die eine negative Beeinträchtigung von Organfunktionen in MPSI-Patienten zur Folge haben. Die Patienten zeigen Pathologien wie skelettale Dysplasie, Leber- und Nierenvergrößerung, sowie Beeinträchtigungen der Hirnfunktionen und des Sehvermögens. Eine komplette Heilung der Krankheit ist bislang nicht möglich, bei schwer betroffenen Patienten wird häufig eine Knochenmarktransplantation (KMT) in frühester Kindheit durchgeführt, wodurch die defekten Glia-Zellen im Gehirn teilweise ersetzt werden können.

Ziel dieser Dissertation war es, zunächst den skelettalen Phänotyp *Idua*-defizienter Mäuse auf histologischer, zellulärer und molekularer Ebene zu charakterisieren. In einem weiteren Schritt sollte der Einfluss einer Knochenmarktransplantation auf den skelettalen Phänotyp *Idua*-defizienter Mäuse untersucht werden. Parallel zu diesen Untersuchungen war ebenso angestrebt, *Idua*-defiziente Mäuse nach einer vorausgegangenen KMT ebenfalls mit einer Enzymersatztherapie zu behandeln und auch hier die Mäuse auf histologischer Ebene zu charakterisieren. Ein weiterer Fokus der Arbeit sollte zusätzlich auf dem Vergleich der MPSI-Mäuse mit weiteren Modellen lysosomaler Speichererkrankungen liegen. Von besonderem Interesse war hierbei ein Mausmodell mit gleichzeitiger Defizienz der Gene *Acp2* und *Acp5*, die eine wichtige Rolle in der Dephosphorylierung von M6P-haltigen Enzymen des Lysosoms spielen und somit für die Hydrolyse und Entfernung von Abbauprodukten der Zelle benötigt werden könnte.

## 5.1 Pathologischer Knochenphänotyp in MLII-Mäusen

Eine der schwerwiegendsten LSDs sind die Mucopolipidosen (ML), die klinisch den Mucopolysaccharidosen ähneln, jedoch eine andere Ätiologie aufweisen und zudem noch seltener sind als diese. Sie werden ebenfalls autosomal-rezessiv vererbt. Ursache der ML sind Mutationen von Genen, die für lysosomale Membranproteine kodieren, was zu einer Fehlfunktion im Stoffwechsel von Polysacchariden, Glykoproteinen und Lipiden führt. Es werden 4 ML-Typen unterschieden, MLI bis MLIV. Eine besonders schwere Form der LSDs stellt die MLII, auch *I-cell disease* genannt, dar (Leroy and Spranger 1970). Sie wird durch eine *nonsense* oder *frameshift*-Mutation im GNPTAB-Gen hervorgerufen und führt zu einem kompletten Funktionsverlust der GlcNAc-1-Phosphotransferase

(Tiede, Storch et al. 2005). Bei dieser Erkrankung werden neu-synthetisierte lysosomale Enzyme durch Fehlen des M6P-Erkennungssignals aus der Zelle sezerniert, was eine intrazelluläre Defizienz dieser Enzyme in den Lysosomen zur Folge hat und in einer Akkumulation von Speichermaterial resultiert. Die Patienten zeigen ein unterschiedliches Erscheinungsbild, Symptome äußern sich in schwerer psychomotorischer und mentaler Retardierung, Kleinwuchs, Skelettdeformitäten sowie in kardiologischen und respiratorischen Komplikationen. Meist versterben die Betroffenen im Alter zwischen 2 und 10 Jahren (Braulke, Jung et al. 2013).

Kürzlich konnten wir in Zusammenarbeit mit der AG Braulke (Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, UKE, Hamburg) den Knochenphänotyp des Mausmodells für MLII analysieren (Kollmann, Pestka et al. 2013) und es zeigte sich, dass die Aktivität von Wachstumschondrozyten und Osteoblasten in MLII-Mäusen aufgrund der lysosomalen Akkumulation von nicht-degradiertem Speichermaterial beeinträchtigt war, dass jedoch die Osteoklasten morphologisch intakt und nicht funktional betroffen waren. Stattdessen war die Osteoklastogenese in MLII-Mäusen stark erhöht, was zu einer Abnahme der Knochenmasse führte. Gleiche Beobachtungen konnten auch in einer Knochenbiopsie eines MLII-Patienten gefunden werden. Wir konnten ebenfalls zeigen, dass IL6, ein Zytokin, das die Osteoklastogenese positiv beeinflusst, in Osteoblasten und Chondrozyten von MLII-Mäusen verstärkt exprimiert wird. Da der osteoporotische Phänotyp der MLII-Mäuse durch Bisphosphonat-Behandlung verhindert werden konnte, zeigten diese Untersuchungen auf, dass eine genaue Charakterisierung einer jeden LSD von großer Bedeutung ist. Dementsprechend war das Ziel dieser Dissertation die skelettale Untersuchung des Phänotyp *Idua*-defizienter Mäuse auf histologischer, zellulärer und molekularer Ebene.

## 5.2 Pathologischer Knochenphänotyp im *Idua*-defizienten Mausmodell

In dieser Arbeit konnte in einer histologischen Untersuchung des *Idua*-defizienten Mausmodells gezeigt werden, dass, anders als in den MLII-Mäusen, das Knochenvolumen in 26 und 52 Wochen alten *Idua*<sup>-/-</sup>-Tieren stark erhöht ist. Die zelluläre histomorphometrische Auswertung ergab, dass es in den *Idua*-defizienten Mäusen zu einer verminderten Anzahl und Umverteilung Knochen-bildender Osteoblasten kommt, die sich jedoch nicht in einer erniedrigten Knochenbildungsrate niederschlägt. Im Hinblick auf die Knochenresorption fiel auf, dass die Anzahl der Osteoklasten in *Idua*-defizienten Mäusen signifikant erniedrigt ist, wodurch gleichermaßen erklärt werden kann, dass es keine signifikanten Unterschiede in der Serum-Konzentration Knochen-spezifischer Collagen-Abbauprodukte (Crosslaps) zwischen Wildtyp- und *Idua*-defizienten Mäusen gibt, obwohl letztere eine deutlich höhere Knochendichte aufweisen.

Durch eine Kontaktradiografie der *Idua*-defizienten Maus diagnostizierten Clarke und Kollegen in der Erstbeschreibung der Maus eine Dysostosis multiplex einhergehend mit einer Verbreiterung und Verdickung der Röhrenknochen, was sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit deckt. Allerdings fehlten hier quantitative und zelluläre Analysen der *Idua*-defizienten Maus (Clarke, Russell et al. 1997). Wird dieses Mausmodell für MPSI nun mit einem Hundemodell für MPSI verglichen, sind auch hier schon Unterschiede mit der Wahl des Modells zu erkennen. So beschrieben Chiaro und Kollegen den skelettalen Phänotyp von C2-Halswirbelkörpern in MPSI-Hunden mit einer reduzierten trabekulären Knochendichte, trabekulären Dicke und einer Reduktion in der Anzahl der Trabekel. Da in der hier vorliegenden Arbeit jedoch die trabekulär erhöhte Knochenmasse sowohl in Wirbelkörpern als auch in Femur und Tibia der *Idua*-defizienten Maus gefunden wurde, scheint sich eine MPSI-Erkrankung im Mausmodell anders auszuwirken als in einem caninen MPSI-Modell. Auch eine unterschiedlich analysierte Lokalisation könnte entscheidend sein.

Die in dieser Arbeit beschriebene Verdopplung der Knochendichte könnte durch eine verminderte Aktivität von Cathepsin K erklärt werden. Wilson und Kollegen quantifizierten die Cathepsin K-Aktivität in *Idua*-defizienten Mäusen und fanden heraus, dass die hohe Konzentration an akkumulierten GAGs in murinem MPSI-Knochen einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität von Cathepsin K hat, die sich in einer gestörten osteoklastären Aktivität und einer verminderten Knorpelresorption äußert und vermutlich zur typischen Knochenpathologie in MPS-Krankheiten führt (Wilson, Hashamiyan et al. 2009). Cathepsin K ist eine lysosomale Cysteinprotease, die hoch im Osteoklasten exprimiert wird und an der Knochenresorption beteiligt ist. Glykosaminoglykane (GAG) haben eine wichtige Rolle in der collagenolytischen Aktivität von Cathepsin K (Li, Hou et al. 2000; Li, Hou et al. 2002). So bildet Cathepsin K einen Komplex mit Chondroitinsulfat und ist somit in der Lage, TypI-Collagen komplett zu degradieren. Andere GAGs, wie Dermatansulfat (DS) oder Heparansulfat (HS), inhibieren die collagenolytische Aktivität des Enzyms (Li, Yasuda et al. 2004). Im gesunden Organismus können diese Moleküle in freier Form in der extrazellulären Matrix oder als Teil von verschiedenen Proteoglycanen mit wichtigen Funktionen in Gewebsstrukturen oder intrazellulärer Kommunikation gefunden werden. Wie bereits erwähnt, kommen DS und HS in MPSI-Geweben aufgrund des Iduronidasedefekts in hohen Konzentrationen vor, so möglicherweise auch im Knochen. Während der endochondralen Ossifikation degradiert Cathepsin K den Knorpel unterhalb der Wachstumsfuge, um neuen Platz für von Osteoblasten gebildeten Knochen zu schaffen. Dieser Schritt ist essentiell für die Neuf ormation von Knochen. In *ex vivo* Analysen zeigten Wilson und Kollegen, wie auch bereits in der MLI-Maus gezeigt werden konnte, eine Erhöhung der Anzahl der Osteoklasten, die jedoch *in vivo* in der hier vorliegenden Analyse des Knochenphänotyps der *Idua*-defizienten Maus nicht gefunden wurde. In *in vitro* Experimenten mit Dentin-Stücken zur Quantifizierung der Resorbierfähigkeit der Osteoklasten konnten Wilson und Kollegen zeigen, dass

die *Idua*-defizienten Zellen in ihrer Funktion zu resorbieren beeinträchtigt waren. In der hier vorliegenden Arbeit konnte *in vivo* gezeigt werden, dass die *Idua*-defizienten Osteoklasten gleiche Collagen-Abbauraten (Crosslaps) wie der Wildtyp aufwiesen, allerdings nicht bei einer Normierung auf das erhöhte Knochenvolumen. Somit ist generell festzuhalten, dass *Idua*-defiziente Osteoklasten weniger gut *in vivo* und *in vitro* resorbieren als die verglichenen Wildtyp-Osteoklasten. *In vivo* könnte erschwerend hinzukommen, dass die Anwesenheit großer Mengen an akkumuliertem HS und DS in der trabekulären Matrix und im kortikalen Knochen den Osteoklasten den direkten Zugang zum Knochen verhindert und sie somit in ihrer degradierenden Funktion behindert werden. Anders als in anderen MPS-Formen, beispielsweise MPSVII, wiesen die *Idua*<sup>-/-</sup>-Osteoklasten keine lysosomalen Inklusionen an nicht-degradiertem Speichermaterial auf (Sands, Barker et al. 1993). Doch aufgrund ihrer Funktionsbeeinträchtigung könnte es sich wie in der veränderten Osteoklast-Morphologie in MPSVII-Mäusen, beschrieben von Monroy und Kollegen, verhalten. Sie zeigten, dass MPSVII-Osteoklasten *in vivo* nicht im Stande waren funktionsfähige *ruffled border*-Membranen auszubilden und separiert von der Knochenoberfläche erscheinen. In Resorptionsversuchen mit Dentin-Stücken konnten sie ebenfalls zeigen, dass MPSVII-Osteoklasten signifikant kleinere und vor allem weniger Resorptionslakunen als zu vergleichende Wildtyp-Osteoklasten formten (Monroy, Ross et al. 2002).

Diese Ergebnisse zeigen, dass über Osteoklasten aus *Idua*-defizienten Mäusen bereits einiges bekannt ist und dass dies darauf schließen lässt, dass sie einen Defekt haben könnten. Anders dazu sind bislang sehr wenige Untersuchungen zu Osteoblasten und Osteozyten aus *Idua*-defizienten Mäusen gemacht worden. In dieser Arbeit jedoch wurden diese zwei Zelltypen angeschaut und untersucht. *In vivo* konnte anhand von Wirbelkörperschnitten aus *Idua*-defizienten Mäusen eine signifikant reduzierte Anzahl an Osteoblasten und eine signifikant verringerte mit Osteoblasten besetzte Gesamtknochenoberfläche festgestellt werden. Auffällig in den *Idua*-defizienten Mäusen war eine Umverteilung in der Länge der Osteoblastenreihen, die hier signifikant kürzer waren als in Wildtypen. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Osteoblasten in den Oberschenkelknochen von *Idua*-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass sich geringe Mengen an nicht-degradiertem Speichermaterial innerhalb der Zellen befinden. In *in vitro*-Funktionsanalysen der Osteoblastenkulturen zeigte sich, dass die *Idua*-defizienten Osteoblasten moderat schlechter mineralisierten als die Wildtyp-Osteoblasten. In Expressionsanalysen von Markergenen der osteoblastären Differenzierung konnten hingegen keine Auffälligkeiten festgestellt werden. Primäre Osteoblastenkulturen von MLII-Mäusen zeigte sich, dass diese nicht nur einen viel stärkeren Differenzierungsdefekt aufwiesen, sondern ebenso eine signifikant erhöhte Expression des Zytokins Il6. Diese Ergebnisse zeigen erneut den Unterschied zwischen den einzelnen LSDs und die Wichtigkeit der individuellen Charakterisierung auf.

Auch der Osteozyt wurde in diesem Mausmodell untersucht. Der Osteozyt ist der Signalsensor und – geber des Skeletts. Er koordiniert die Knochenresorption und Knochenformation durch Kontrolle der Osteoklasten- und Osteoblastenaktivität. Osteozyten setzen RANKL (*Receptor activator of nuclear factor kappa-b ligand*) frei, um die Osteoklastendifferenzierung zu induzieren, aber auch OPG (Osteoprotegerin), um die Osteoklastogenese herunter zu regulieren. Hinzu kommt, dass sie auch FGF23 (*Fibroblast growth factor 23*), BMPs (*Bone morphogenetic proteins*) und SOST (Sclerostin) frei setzen, um die Aktivität der Osteoblasten zu regulieren. Osteozyten formen ein lebendes Netzwerk innerhalb der mineralisierten Knochenmatrix. Hieraus interagiert der osteozytäre Zellkörper über Dendriten, die in tubulären Canaliculi auslaufen (Palumbo, Palazzini et al. 1990), mit anderen Osteozyten, dem Knochenmark und der Osteoblastenschicht (Palumbo, Palazzini et al. 1990; Kamioka, Honjo et al. 2001). Die Verteilung der Osteozyten ist hoch organisiert in der dreidimensionalen Matrix, um beste Anpassung zu gewährleisten (Aarden, Burger et al. 1994). Sie sind umgeben von einer canalikulären Flüssigkeit, die für eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen, Sauerstoff und Informationen des umliegenden Gewebes liefert (Ramp 1975). Der Signalweg, dem die Osteoblastendifferenzierung hin zu Osteozyten zugrunde liegt, ist derzeit im Fokus der wissenschaftlichen Aufklärung. Einige Markerproteine des reifen Osteozyts, wie PHEX (*Pi-regulating endopeptidase on chromosome X*), DMP1 (*Dentin matrix acidic phosphoprotein 1*), MEPE (*Matrix extracellular phosphoglycoprotein*), SOST oder FGF23 sind jedoch bereits bekannt (van der Plas, Aarden et al. 1994; Zhao, Byrne et al. 2000; Holmbeck, Bianco et al. 2005; Franz-Odenaal, Hall et al. 2006; Dallas and Bonewald 2010; Bonewald 2011). FGF23 wird erst in der späten Phase der osteozytären Reifung gebildet und wirkt lokal im Knochen aber auch in den Nieren und hat darüber Auswirkungen auf den Phosphathaushalt im Körper (Compton and Lee 2014).

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *Idua*-defizienten Osteozyten wurden massive Ansammlungen lysosomaler Inklusionen von nicht-abgebautem Speichermaterial gefunden. Aufgrund des akkumulierten Heparansulfats und Dermatansulfats im trabekulären und kortikalen Knochen könnte die Kommunikation zwischen Osteoblast, Osteoklast und Osteozyt eingeschränkt sein, so dass der Osteozyt seiner Funktion als Koordinator der Knochenresorption und Knochenformation nicht nachkommen kann. Eine Quantifizierung der Anzahl der Osteozyten in den *Idua*-defizienten Mäusen zeigte, dass diese sich nicht von der Anzahl der Osteozyten im Wildtyp-Knochen unterscheiden. Serumanalysen von gleichaltrigen Geschwistertieren zeigten jedoch, dass im Serum von *Idua*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Gegensatz zu verglichenen Wildtyp-Tieren eine erheblich erhöhte Phosphatkonzentration zu finden war. Diese Hyperphosphatämie zusammen mit den Ansammlungen von Speichermaterial wiesen auf einen starken Defekt dieser Zellen hin.

### 5.3 Therapiemethoden für das murine MPSI-Modell

Die Therapiemethode der Wahl für MPSI-Patienten ist, bei frühzeitiger Diagnose, eine Knochenmarktransplantation, um vor allem den glialen Zell-Defekt und damit die mentale Beeinträchtigung aber auch bereits zuvor beschriebene Symptome so gering wie möglich zu halten. Eine zweite Methode ist die wöchentliche Injektion der fehlenden Iduronidase, auch Enzyersatztherapie (EET) genannt. Histomorphometrische Untersuchungen humaner Biopsien von MPSI-Patienten zeigten, dass hier, anders als im Mausmodell, eine deutlich verminderte Knochendichte unterhalb des altersentsprechenden Referenzbereichs vorlag. Zu sagen ist allerdings hier, dass all diese Patienten in ihren ersten Lebensjahren mit einer Knochenmarktransplantation (KMT) behandelt wurden, so dass sich die Frage stellte, welchen Einfluss die KMT auf den murinen MPSI-Knochen hat. Auch sollte die Frage beantwortet werden, welchen Einfluss eine EET auf den murinen Knochenphänotyp hat.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine KMT den skelettalen Phänotyp von *Idua*-defizienten Mäusen deutlich beeinträchtigt. Die signifikant erhöhte Knochenmasse in den *Idua*-defizienten Mäusen konnte nach einer KMT sowohl mit einer halb-letalen als auch einer letalen Bestrahlungsdosis wieder auf das Wildtyp-Niveau normalisiert werden. Dies galt ebenso für die mit Osteoblasten besetzte Knochenoberfläche, die in den *Idua*-defizienten Tieren signifikant reduziert war, in den transplantierten Tieren jedoch wieder auf Normalmaß stieg. Nach einer Bestrahlung mit halb-letaler Dosis (5Gy) und anschließender KMT wurde nur ein Teil mit dem männlichen Donor-Knochenmark ausgetauscht, ein Anteil des Knochenmarks stammte jedoch noch vom weiblichen Rezipienten, wie eine Y-chromosomale PCR zeigte. Im Falle der halb-letal bestrahlten, *Idua*-defizienten Mäuse erhielten diese nur einen Anteil an funktionsfähigem Knochenmark. Dieser Anteil reichte jedoch aus, die erhöhte Knochenmasse und die Verteilung der Osteoblasten auf der Knochenoberfläche zu normalisieren. Hier könnte auch das Prinzip, das sich in der Enzyersatztherapie zu Nutze gemacht wird, wirken und die von den gesunden Spenderzellen produzierte Iduronidase, die aus den Zellen in den extrazellulären Raum gelangt, von *Idua*-defizienten Zellen über M6P-Rezeptoren auf der Oberfläche mittels Endozytose aufgenommen und somit einen Teil der akkumulierten GAGs verstoffwechselt werden (Rome, Weissmann et al. 1979; Unger, Durrant et al. 1994; Tsukimura, Tajima et al. 2008). Ein Erreichen einer fünfprozentigen IDUA-Aktivität in den entsprechenden Zellen reicht bereits aus, um eine Ausprägung der Krankheit zu verhindern (Ashton, Brooks et al. 1992; Bunge, Clements et al. 1998).

Auch in den Osteozyten innerhalb des trabekulären Knochens war eine Verbesserung zu erkennen, da sie nach der KMT keine Inklusionen an nicht-degradiertem Speichermaterial mehr aufwiesen. Eine Korrektur des osteozytären Phänotyps konnten auch Liu und Kollegen in einem MPSI-Mausmodell nach einer Leber-spezifischen neonatalen Gentherapie beobachten. Sie injizierten neugeborene

MPSI-Mäuse mit einem retroviralen Vektors (RV), der die kodierende Sequenz des caninen IDUA-Gens trug und untersuchten die Tiere hinsichtlich des skelettalen Erscheinungsbilds. In Querschnitten von Femora der MPSI-Mäuse konnten sie Osteozyten mit großen Ansammlungen an Speichermaterial und verdickten Kortizes erkennen. Nach der RV-Behandlung war die osteozytäre Speicherung komplett korrigiert (Liu, Xu et al. 2005).

Die Anzahl der Osteoklasten nach einer KMT wurde nicht nur korrigiert sondern dramatisch erhöht, was auf längere Zeit gesehen zu einem osteoporotischen Phänotyp führen würde, wie es in den humanen Biopsien der Fall ist. Die pathologische Osteoklastogenese konnte jedoch durch die zusätzliche Injektion der Iduronidase unterbunden werden. Die Enzymersatztherapie alleine hatte nur einen geringen Verbesserungseffekt auf die Knochendichte der *Idua*-defizienten Tiere. Allerdings wurde die mit Osteoblasten besetzte Gesamtknochenoberfläche auch nach dieser Behandlung im Knochen der *Idua*<sup>-/-</sup>-Tiere normalisiert. Die Anzahl der Osteoklasten durch EET wurde ebenfalls signifikant erhöht, was bei längerer Behandlung der Mäuse mit dem Ersatzpräparat unvermeidlich zu einer Abnahme in der Knochenmasse geführt hätte. Es wird an dieser Stelle die Hypothese aufgestellt, dass durch den Enzymersatz auf der Knochenoberfläche und in der Knochenmatrix angelagerte GAGs degradiert wurden und nun die Osteoklastogenese durch die korrigierten Osteoblasten angeregt wurde, um die hohe Knochenmasse zu normalisieren, diese kurzzeitige Gabe des Enzyms jedoch nicht dafür ausreichte, um einen stärkeren Effekt hervorzurufen.

Patienten mit einer MPSI zeigen häufig starke Verformungen im Gesichtsbereich. In  $\mu$ CT-Analysen von *Idua*-defizienten Mäusen konnte ebenfalls eine Verbreiterung des Schädels mit einer altersabhängigen Zunahme des Unterkieferknochenvolumens dargestellt werden. Auch der craniofaziale Phänotyp konnte durch die KMT korrigiert werden, eine sich anschließende EET hatte darüber hinaus keinen zusätzlichen Einfluss. In den Schnitten der 6 Wochen alten Wildtyp- und *Idua*-defizienten Mäuse war noch kein Unterschied im Gewebsvolumen und der Porosität im Kieferknochen erkennbar, beides nahm altersabhängig signifikant in den *Idua*-defizienten Tieren zu. In den Wildtypen nahm die Porosität des Kieferknochens jedoch altersabhängig wieder ab, so dass hier von einem Knochenremodelling ausgegangen werden kann, das in den *Idua*-defizienten Tieren nicht stattgefunden hat. Dieser Defekt konnte ebenfalls durch eine KMT korrigiert werden.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Dysostosis multiplex, wie sie hier im *Idua*-defizienten Mausmodell zu finden ist, durch ein gestörtes Knochenremodelling verursacht wird und, dass es in Zukunft noch detaillierter zu charakterisieren gilt, um betroffenen Patienten zu helfen.

Eine KMT mit *Idua*-defizientem Knochenmark schien keine Auswirkungen auf den gesunden Knochen einer Wildtyp-Maus zu haben. Es konnten keine skelettalen Unterschiede festgestellt werden. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass hier keine Speicherung von GAGs, wie im *Idua*-defizienten

Knochen von Geburt an, zu finden sind und damit eine Kommunikation der Osteozyten mit den Osteoblasten und den Osteoklasten trotz induzierter Enzymdefizienz weiterhin gewährleistet ist und dieser durch gezielte Freigabe von Faktoren, wie RANKL, OPG, FGF23 oder SOST, die beiden Zelltypen aktiv stimulieren oder hemmen kann.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass sich der Knochenphänotyp der hier analysierten *Idua*-defizienten Maus grundsätzlich von dem der MLII-Maus unterscheidet, und dass eine detaillierte Charakterisierung einer jeden lysosomalen Speichererkrankung dringend notwendig ist, um gezielte Therapieoptionen anwenden zu können. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Knochenmarktransplantation mit sich anschließender Enzymersatztherapie die Methode der Wahl ist, um den pathologischen Knochenphänotyp der *Idua*-defizienten Mäuse zu korrigieren.

Im Laufe der hier verfassten Dissertation ist von Pievani und Kollegen eine Publikation erschienen, die sich mit dem skelettalen Phänotyp der *Idua*-defizienten Maus nach neonataler Knochenmarktransplantation befasst. Auch sie zeigten, dass die stark erhöhte Knochenmasse in den *Idua*-defizienten Mäusen durch eine KMT normalisiert wurde. Allerdings zeigten sie ihrer Studie jedoch ausschließlich  $\mu$ CT-Auswertungen und strukturelle Knochenparameter im Gegensatz zu den hier dargestellten histomorphometrischen Analysen an unentkalkten Knochenschnitten (Pievani, Azario et al. 2014).

#### 5.4 Pathologischer Knochenphänotyp in einem *Acp2/Acp5*-defizienten Mausmodell

Der Osteoklast ist ein multinukleärer Zelltyp, der darauf spezialisiert ist, Knochen zu resorbieren. Kommen Osteoklasten in Kontakt mit der Knochenoberfläche, polarisieren diese und bilden eine *ruffled border*-Membran mit Aktinring aus, durch die die unter dem Osteoklasten entstandene, saure Resorptionslakune zu beiden Seiten verschlossen wird. Innerhalb der Lakune befinden sich verschiedene saure Hydrolasen, zwei davon werden besonders hoch im Osteoklasten exprimiert und sezerniert, zum einen Cathepsin K und zum anderen TRAP (*Tartrate-resistant acid phosphatase type 5*, *Acp5*). Cathepsin K ist eine Cysteinprotease, die TypI-Collagen, den Hauptbestandteil des Knochens, degradiert (Bossard, Tomaszek et al. 1996; Bromme, Okamoto et al. 1996). TRAP ist eine Mettallophosphoesterase, die in Kombination mit LAP M6P-haltige lysosomale Proteine dephosphoryliert (Halleen, Raisanen et al. 1999; Angel, Walsh et al. 2000; Makrypidi, Damme et al. 2012). Eine Defizienz der beiden lysosomalen sauren Phosphatasen äußerte sich im Mausmodell in einem relativ milden Phänotyp, was die Vermutung aufkommen ließ, dass diese lysosomalen Enzyme sich wechselseitig komplementieren.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde der skeletale Phänotyp der *Acp2/Acp5*-defizienten Mäuse untersucht, welcher sich in einer trabekulär erhöhten Knochendichte und einem verminderten Längenwachstum mit einhergehender Verbreiterung der Wachstumsfuge äußerte. Eine Analyse der einzel-defizienten Tiere zeigte einen synergistischen Mechanismus in Bezug auf die Knochenarchitektur, das Längenwachstum und die Breite der Wachstumsfuge.

Saure Hydrolasen sind meistens lösliche Glykoproteine, die, nachdem sie im Endoplasmatischen Retikulum als Preproproteine synthetisiert worden sind, an einen Mannose 6-Phosphat (M6P)-Sortierungsmarker gebunden werden und dadurch von Mannose-6-Phosphatrezeptoren (MPRs) erkannt werden, die die sauren Hydrolasen durch das trans-Golgi-Netzwerk (TGN) transportieren. Die MPR-gebundenen Intermediate fusionieren mit den Endosomen und entlassen die M6P-markierten sauren Hydrolasen, die im Anschluss zu den Lysosomen transportiert werden, wo daraufhin der M6P-Sortierungsmarker von den oben genannten sauren Phosphatasen, LAP und TRAP, entfernt wird. Wie die sauren Hydrolasen in die Resorptionslakune des Osteoklasten gelangen, ist nicht ganz verstanden, es gibt zwei vorgeschlagene Modelle. Im ersten Modell wird angenommen, dass neu-synthetisierte saure Hydrolasen im TGN in Transportvesikel verpackt und zur *ruffled border*-Membran transportiert werden, wo sie ihren Inhalt entlassen (Baron, Neff et al. 1985; Baron, Neff et al. 1988; Czupalla, Mansukoski et al. 2006). Im zweiten Modell wird angenommen, dass die sauren Hydrolasen zuerst vom TGN zum endosomalen/lysosomalen Kompartiment transportiert werden, welches dann mit der *ruffled border*-Membran verschmilzt und daraufhin seinen Inhalt entlässt (Goto, Yamaza et al. 2003; Mulari, Vaaraniemi et al. 2003; Toyomura, Murata et al. 2003). Van Meel und Kollegen untersuchten die subzelluläre Lokalisation und die Transportwege von Cathepsin K, TRAP und Cathepsin D im Osteoklasten in Wildtyp- und MLII-Mäusen und fanden heraus, dass Osteoklasten, die *in vitro* aus murinen Knochenmarkmakrophagen differenziert wurden, zwei Typen von Lysosomen enthielten. Der Hauptanteil war ein sogenanntes sekretorisches Lysosom, das Cathepsin K und TRAP beinhaltet und mit der *ruffled border*-Membran verschmolz und so aktiv diesen Prozess regulieren konnte. Der andere Teil enthielt das Cathepsin D und nur geringe Mengen an Cathepsin K und TRAP. MLII-Osteoklasten zeigten eine erhöhte Cathepsin K- und TRAP-Sezernierung und eine Beeinträchtigung in der Formation der sekretorischen Lysosomen. Die Sortierung von Cathepsin D war intakt, was zeigte, dass der Osteoklast ebenfalls M6P-unabhängige Transportwege für ausgewählte saure Hydrolasen besitzt (van Meel, Boonen et al. 2011).

In dem hier untersuchten Mausmodell mit einer Doppel-Defizienz von *Acp2* und *Acp5* wurde postuliert, dass es sich genau gegensätzlich zu dem oben beschriebenen MLII-Mausmodell verhalten sollte. M6P-Reste sollten aufgrund der Defizienz beider Gene nicht mehr abgespalten werden können und dadurch die sauren Hydrolasen intrazellulär verbleiben. Da Cathepsin K im Osteoklasten eine

wichtige Rolle spielt und über den M6P-abhängigen Transportweg in die Resorptionslakune des Osteoklasts gelangt, wurde sich in dieser Arbeit mit der Aktivität und der Lokalisation dieses lysosomalen Enzyms im *Acp2/Acp5*-defizienten Mausmodells beschäftigt. Es konnte gezeigt werden, dass die relative Expression von Cathepsin K in Osteoklasten der doppel-defizienten Mäusen signifikant erhöht war, die Aktivität jedoch sowohl intra- als auch extrazellulär signifikant reduziert war. Einen möglichen Erklärungsansatz bieten hierfür Guha und Kollegen, die zeigten, dass die Aktivität von Cathepsin K stark pH-abhängig ist (Guha and Padh 2008). Durch ein Fehlen der zwei sauren Phosphatasen könnte es zu einer pH-Veränderung gekommen sein, wodurch die Aktivität des lysosomalen Enzyms stark reduziert würde. Eine immunhistochemische Färbung von Cathepsin K in *Acp2/Acp5*-defizienten Femoren zeigte eine erhöhte intrazelluläre Lokalisation in den Osteoklasten. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass Cathepsin K aufgrund des nicht-abgespaltenen M6P-Rests innerhalb des Osteoklasts verbleibt, dadurch nicht in die Resorptionslakune gelangt und der Funktion, Knochen zu resorbieren, nicht nachkommen kann, was sich in einer erhöhten trabekulären Knochenmasse äußert. Des Weiteren wird diese Hypothese, dass Cathepsin K nicht innerhalb der Lakune des Osteoklasts zu finden ist, durch die signifikant verminderte Resorptionsfähigkeit der *Acp2/Acp5*-defizienten Osteoklasten von Dentin-Stücken unterstützt.

## 5.5 Veränderter Fettphänotyp in einem *Acp2/Acp5*-defizienten Mausmodell

Das Fettgewebe ist ein Teil des Bindegewebes und der hier vorherrschende Zelltyp ist der Adipozyt, der ebenfalls aus der mesenchymalen Zelllinie stammt. Aus einer pluripotenten Stammzelle geht eine multipotente Stammzelle hervor, die im Falle des Fettgewebes die Fähigkeit besitzt noch in die Vorläuferform des Chondroblasts, des Myoblasts, des Osteoblasts oder des Adipoblasts zu differenzieren.

Zwei Formen von Fettgeweben werden unterschieden, zum einen das weiße Fettgewebe (*white adipose tissue*, WAT) und zum anderen das braune Fettgewebe (*brown adipose tissue*, BAT). Die bräunliche Farbe charakterisiert diesen Fetttyp, was auf einem hohen Cytochromgehalt der vielen Mitochondrien beruht. Die Struktur des BAT zeichnet sich durch das Vorhandensein von mehreren Fetteinschlüssen auch nach Differenzierung aus, daher wird es auch oft als plurivakuoläres Fettgewebe bezeichnet. Evolutionär gesehen kommt dieses Gewebe nur bei Säugern vor, und wird benötigt, um den homoiothermen Körper vor niedrigen Umgebungstemperaturen zu schützen. Dafür sind braune Adipozyten mit einem Protein, dem *uncoupling protein 1* (UCP1) ausgestattet, das ermöglicht, in der mitochondriellen Atmungskette den Elektronentransport von der ATP-Synthese abzukoppeln und so durch diese stark exotherme Reaktion Wärme zu produzieren (dieser Prozess wird als non-shivering thermogenesis bezeichnet). Das braune Fett ist stark vaskularisiert, so dass das

hindurch fließende Blut aufgewärmt und die Wärme in den Rest des Körpers transportiert wird. Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass braunes Fettgewebe nur im Neugeborenen vorkommt, neue Studien belegen jedoch, dass auch im erwachsenen Menschen diesem eine große Rolle zukommt und sogar eine inverse Korrelation mit Fettmasse besteht (Cypess, Lehman et al. 2009; van Marken Lichtenbelt, Vanhomerig et al. 2009; Virtanen, Lidell et al. 2009). Da das BAT durch das „Verbrennen“ von sowohl Glukose als auch Fettsäuren einen starken Energiebedarf- und umsatz hat, erhofft man sich dieses Gewebe als Therapieansatz für Adipositas und andere Erkrankungen zu nutzen (Farmer 2009). Das weiße Fettgewebe ist im Körper weit verbreitet und wird je nach Einlagerungsort unterscheiden, beispielsweise das Unterhautfett (subkutan) oder das Fettgewebe in der Bauchhöhle (viszeral). Im Gegensatz zum BAT wird das WAT auch oft als univakuoläres Fettgewebe bezeichnet, da es sich durch einen großen Lipideinschluss auszeichnet, der das Zytoplasma an den Zellkern an den Rand der Zelle drängt. Die Aufgaben des WATs sind einerseits die Speicherung von Energie in Form von Triglyceriden bei Nahrungsüberschuss und andererseits die Freisetzung dieser als freie Fettsäuren und Glycerol in Hungerperioden (Zechner, Zimmermann et al. 2012). Außerdem dient das Körperfett der Wärmeisolierung und hat mechanische Funktion als Polsterung von Organen. Eine weitere wichtige Funktion des WATs ist die Sekretion von Hormonen und Adipozytokinen, die einen großen Beitrag zur Gesamtregulation von Körperfunktionen beitragen.

Durch eine Expressionsanalyse von *Acp2* und *Acp5* in verschiedenen murinen Geweben wurde herausgefunden, dass *Acp5*, neben dem Osteoklasten, stark im braunen und weißen Fettgewebe exprimiert wird. Bislang wurde *Acp5* nur in einer weiteren Publikation im Zusammenhang mit dem Fettgewebe beschrieben, allerdings in einem porkinen Modell. Padilla und Kollegen identifizierten in einer Transkriptom-weiten Microarray-Analyse *ACP5* als ein Gen, was in jugendlicher Adipositas von Schweinen eine Rolle spielt (Padilla, Jenkins et al. 2013).

Neue Studien belegen, dass auch im erwachsenen Menschen Depots an braunen Adipozyten vorhanden sind, die Kälte-induzierbar sind und sich zwischen weißen Adipozyten der supraklavikulären und para-aortalen Regionen aber auch in der Nebennierengegend befinden (Cypess, Lehman et al. 2009; Saito, Okamatsu-Ogura et al. 2009; van Marken Lichtenbelt, Vanhomerig et al. 2009; Virtanen, Lidell et al. 2009). Da diese humanen braunen Adipozyten einige molekulare, histologische und funktionale Charakteristiken mit Kälte-induzierten, beigen Adipozyten teilen, sind diese Zellen in den Fokus des klinischen Interesses gegen die Bekämpfung von Fettleibigkeit gerückt. UCP1 vermittelt in beiden Zelltypen, in braunen und in beigen Adipozyten die thermogenetische Aktivität (Feldmann, Golozoubova et al. 2009; Cannon and Nedergaard 2010; Cannon and Nedergaard 2011). In einer Arbeit konnten Qiu und Kollegen zeigen, dass durch Kälteeinfluss aktivierte Makrophagen eine wichtige Rolle im thermogenetischen Kreislauf von beigem

Fett spielen (Qiu, Nguyen et al. 2014). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die *Acp2/Acp5*-Defizienz eine Auswirkung auf den Fettphänotyp der Mäuse hat, und dass es hier einen Osteoklasten-ähnlichen Zelltyp gibt, der ebenfalls aus der hämatopoetischen Zelllinie stammt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die *Acp2/Acp5*-defizienten Mäuse in einem Experiment mit Kälteeinfluss bei einem geringeren Körpergewicht mit kleineren Fettdepots eine erhöhte Nahrungsaufnahme und ein stärkeres *Browning* im weißen Fettgewebe aufwiesen, gekennzeichnet durch eine erhöhte Expression zweier Markergene, dem *Ucp1* und *Fgf21*. Somit ist festzuhalten, dass eine Doppel-Defizienz von *Acp2* und *Acp5* *in vivo* eine Auswirkung auf den Fettphänotyp der Mäuse hat. Dadurch dass Makrophagen, die ebenfalls aus der hämatopoetischen Zelllinie stammen, durch Kälteeinfluss eine Rolle im beigen Fett spielen und in den *Acp2/Acp5*-defizienten Mäusen eine erhöhte *Ucp1*-Expression im weißen Fettgewebe gefunden wurde, ist es möglich, dass dieser Zelltyp hier eine wichtige Funktion übernimmt.

Auch *in vitro* Untersuchungen von Adipozyten aus *Acp2/Acp5*-defizienten Mäusen zeigten, dass die Adipogenese beeinträchtigt war und dies auf einen zellautonomen Defekt zurückzuführen ist. Nicht nur die Anzahl der reifen Adipozyten war signifikant vermindert, auch Markergene der Adipogenese, sowohl des weißen Fettgewebes, beispielsweise *Ppar $\gamma$* , als auch des braunen Fettgewebes, beispielsweise *Ucp1* oder *Fgf21*, waren signifikant reduziert.

Zudem wurde in dieser Arbeit herausgefunden, dass die *Acp2/Acp5*-defizienten Tiere eine signifikant erhöhte Expression von *Bmp7* und eine signifikant verminderte Expression von *Bmp4* aufweisen. Es ist bekannt, dass auch BMPs (Knochenmorphogenetische Proteine; *Bone morphogenetic proteins*) die Formation und Aktivität des weißen und braunen Fettgewebes regulieren (Tseng, Kokkotou et al. 2008; Schulz, Huang et al. 2011; Whittle, Carobbio et al. 2012). *Bmp7* induzierte die Differenzierung von braunen Präadipozyten, hatte jedoch keinen Einfluss auf weiße Präadipozyten (Tseng, Kokkotou et al. 2008; Boon, van den Berg et al. 2013). *Bmp4* induzierte multipotente Mausstammzellen, die gleiche Charakteristika zeigten wie weiße Präadipozyten in Kultur (Tang, Otto et al. 2004). Eine Überexpression und eine Defizienz von *Bmp4* zeigten, dass *Bmp4* das WAT-Remodelling regulierte und dort beige Adipozyten induzierte (Qian, Tang et al. 2013). Die signifikant erhöhte Expression von *Bmp7* in den *Acp2/Acp5*-defizienten Adipozyten unterstützte die Aussage des *Browning*-Phänotyps der Mäuse. Aufgrund der signifikant reduzierten Expression von *Bmp4* in den doppel-defizienten Adipozyten könnte es in diesem Mausmodell im weißen Fett zu einem veränderten Remodelling kommen, was die Reifung der Adipozyten inhibieren und somit Auswirkungen auf die Masse des weißen Fettdepots haben könnte.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TRAP nicht nur ein klassischer Osteoklastenmarker ist, sondern auch im Fettgewebe eine Rolle spielt. Eine kombinierte Defizienz von TRAP mit LAP äußert sich in einer erhöhten Knochendichte und einem verminderten Längenwachstum von Knochen mit einer Verbreiterung der Wachstumsfuge. Darüber hinaus spielen die beiden Gene im Transport des lysosomalen Enzyms Cathepsin K eine wichtige Rolle und somit in der Resorptionsfähigkeit des Osteoklasten. Wie bereits erwähnt hat eine Defizienz der beiden Gene auch Auswirkungen auf den Fettphänotyp der Mäuse und äußert sich in einem reduzierten Gewicht mit kleineren Fettdepots und einem erhöhten *Browning* des weißen Fettgewebes.

## 5.6 Ausblick

Um den skelettalen Phänotyp der *Idua*-defizienten Maus und die Auswirkungen einer Knochenmarktransplantation, einer Enzymersatztherapie oder einer kombinierten Therapie noch besser zu charakterisieren, wäre es sinnvoll für die Zukunft noch weitere Experimente zu planen. So wäre es beispielsweise interessant herauszufinden, ob eine Knochenmarktransplantation mit sich anschließender Enzymersatztherapie in älteren Mäusen ebenfalls den Knochenstatus normalisiert. Eine weitere interessante Frage wäre, welche Auswirkungen eine Iduronidase-Injektion auf den Knochen von Wildtyp-Mäusen hat. Des Weiteren sind zurzeit Kreuzungen der MLII-Maus mit einer *Il6*-defizienten Maus angesetzt, um zu überprüfen, ob der starke skelettale Phänotyp der MLII-Maus durch die *Il6*-Defizienz korrigiert werden kann. Seit kurzem steht diesem Labor ebenfalls ein Mausmodell für MPSVI zur Verfügung, das ebenfalls im Hinblick auf den Knochenphänotyp analysiert werden und Unterschiede zum *Idua*-defizienten Mausmodell aufzeigen soll.

Um weitere Aussagen über den Knochenphänotyp der *Acp2/Acp5*-defizienten Mäuse machen zu können, ist eine histomorphometrische Auswertung von nicht-entkalkten Knochenschnitten angedacht, die zeigt, ob hier Veränderungen auf zellulärer Ebene vorliegen. Desweiteren sollen in Zellkulturexperimenten mit Adipozyten aus Wildtyp- und *Acp2/Acp5*-defizienten Mäusen CD11b-positive von CD11b-negativen Zellen durch eine magnetische Zelltrennung (MACS System der Miltenyi Biotec GmbH) isoliert werden, um so Unterschiede in den CD11b-positiven Makrophagen sichtbar zu machen und dadurch den Fettphänotyp der *Acp2/Acp5*-defizienten Mäuse genauer zu verstehen. Zusätzlich zu dem bereits durchgeführten Experiment mit Kälteeinfluss werden die Wildtyp- und *Acp2/Acp5*-defizienten Mäuse derzeit über einen Zeitraum von 16 Wochen auf eine Fettdiät gesetzt und im Anschluss daran der Fettphänotyp ausgewertet.

## 6 Anhang

### 6.1 Zusammenfassung auf Deutsch

Kürzlich konnten wir in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Bräulke (Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, UKE, Hamburg) den Knochenphänotyp des Mausmodells für Mucopolidose Typ II (MLII-Maus) analysieren, einer lysosomalen Speichererkrankung (LSD) mit einer generalisierten lysosomalen Dysfunktion. Es zeigte sich, dass das Längenwachstum aufgrund einer Akkumulation lysosomalen Speichermaterials in Chondrozyten der Wachstumsfuge in den MLII-Mäusen beeinträchtigt war, und dass der osteoporotische Phänotyp dieser Mäuse von reduzierter Knochenbildung durch Osteoblasten begleitet wurde. Unerwartet war jedoch, dass die Osteoklasten der MLII-Mäuse keine pathologischen Veränderungen aufwiesen, aber in ihrer Anzahl deutlich erhöht waren. Diese Beobachtungen konnten auch in einer Knochenbiopsie eines MLII-Patienten bestätigt werden. Wir konnten ebenfalls zeigen, dass IL6, ein Zytokin, das die Osteoklastogenese positiv beeinflusst, in Osteoblasten und Chondrozyten von MLII-Mäusen verstärkt exprimiert wird. Durch eine Behandlung mit Bisphosphonaten konnte der osteoporotische Phänotyp der MLII-Mäuse verhindert werden. Da die oben beschriebenen Ergebnisse aufzeigen, dass eine lysosomale Fehlfunktion zu sehr spezifischen Veränderungen von Differenzierung und Aktivität Knochenrelevanter Zelltypen führt, ist es von entscheidender Bedeutung, die gleiche Art der Analyse auch zur Erforschung anderer lysosomaler Speicherkrankheiten anzuwenden.

Mucopolysaccharidose Typ I (MPSI) gehört zu den lysosomalen Speichererkrankungen, ausgelöst durch inaktivierende Mutationen in der  $\alpha$ -L-Iduronidase (IDUA), die für die lysosomale Degradation der Glykosaminoglykane (GAG) wie Heparan- und Dermatan-sulfat essentiell ist. Diese IDUA-Inaktivierung führt auf zellulärer Ebene zu einer pathologischen Anreicherung von GAGs, die eine negative Beeinträchtigung von Organfunktionen in MPSI-Patienten zur Folge haben. Die Patienten zeigen Pathologien wie skelettale Dysplasie, Leber- und Nierenvergrößerung, sowie Beeinträchtigungen der Hirnfunktionen und des Sehvermögens. Eine komplette Heilung der Krankheit ist bislang nicht möglich. Bei schwer betroffenen Patienten wird häufig eine Knochenmarktransplantation (KMT) durchgeführt, wodurch die defekten Glia-Zellen im Gehirn teilweise ersetzt werden können, aber auch eine Enzyersatztherapie (EET) wird als Option genutzt.

In dieser Dissertation sollte zunächst der skelettale Phänotyp *Idua*-defizienter Mäuse auf histologischer, zellulärer und molekularer Ebene charakterisiert werden. In einem weiteren Schritt sollte der Einfluss einer KMT und EET auf den skelettalen Phänotyp *Idua*-defizienter Mäuse untersucht werden.

Der in den *Idua*-defizienten Mäusen gezeigte Knochenremodelling-Phänotyp ist sehr komplex und nicht *in vitro* zu simulieren, was wahrscheinlich durch die Akkumulation von Glykosaminoglykanen in

und auf der Knochenmatrix erklärt werden kann. Die *Idua*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten keine Skelett- oder Entwicklungsabnormitäten oder Beeinträchtigungen im Längenwachstum. Sie wiesen jedoch eine cranio-faziale Zunahme des Gewebevolumens und der Porosität im Kiefer auf, sowie eine trabekulär stark erhöhte Knochendichte mit signifikant reduzierter Anzahl an Osteoklasten und Osteoblasten und einer Umverteilung der Osteoblasten-Reihen auf. Zudem konnte ein massiver Defekt der Osteozyten durch Einlagerung von großen Ansammlungen an Speichermaterial gezeigt werden. Durch eine kombinierte Therapie aus KMT und EET konnte der skelettale Knochenphänotyp der *Idua*-defizienten Mäuse normalisiert werden. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass sich der Knochenphänotyp des hier analysierten *Idua*-defizienten Mausmodells grundsätzlich von dem der MLI-Mäuse unterscheidet, und dass eine detaillierte Charakterisierung einer jeden lysosomalen Speichererkrankung dringend notwendig ist, um gezielte Therapieoptionen anwenden zu können. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine KMT mit sich anschließender EET die Methode der Wahl ist, um den pathologischen Knochenphänotyp der *Idua*-defizienten Mäuse zu korrigieren.

Das zweite in dieser Arbeit analysierte Mausmodell zeigt eine lysosomale Speichererkrankung mit kombinierter Defizienz der LAP (*Lysosomal acid phosphatase, Acp2*) und der TRAP (*Tartrate-resistant acid phosphatase type 5, Acp5*). LAP ist ein biochemischer Marker für Lysosomen, TRAP ist ein klassischer Osteoklastenmarker. In Kombination dephosphorylieren Acp2 und Acp5 Mannose-6-Phosphat-haltige lysosomale Proteine. Im Mausmodell äußerte sich eine Defizienz dieser beiden Gene in einer erhöhten trabekulären Knochenmasse und einem verminderten Längenwachstum mit verbreiteterer Wachstumsfuge. Die Osteoklasten zeigten eine eingeschränkte Resorptionsfunktionalität mit einer erhöhten Expression von Cathepsin K, einer lysosomalen Hydrolase, die über den M6P-abhängigen Weg aus dem Osteoklasten in die Resorptionslakune transportiert wird. *In vitro* war die intra- und extrazelluläre Aktivität dieser Hydrolase reduziert, was durch einen möglichen intrazellulären pH-Abfall aufgrund der Enzymdefizienz erklärt werden könnte. *In vivo* konnte hingegen eine intrazellulär erhöhte Lokalisation von Cathepsin K in den doppel-defizienten Tieren nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigten, dass beide Gene im Transport der lysosomalen Hydrolase eine Rolle spielen. Eine weitere Auffälligkeit dieses *Acp2/Acp5*-defizienten Mausmodells war ein veränderter Fettphänotyp der Tiere. In einem Experiment mit Kälteeinfluss zeigten die doppel-defizienten Mäuse bei einem geringeren Körpergewicht mit kleineren Fettdepots einen höheren Energieverbrauch und ein stärkeres *Browning* im weißen Fettgewebe, gekennzeichnet durch eine erhöhte Expression zweier Markergene, dem *Ucp1* und *Fgf21*. *In vitro* Untersuchungen von Adipozyten aus *Acp2/Acp5*-defizienten Mäusen ließen auf eine beeinträchtigte Adipogenese mit einem zellautonomen Defekt der Adipozyten schließen.

## 6.2 Summary in English

In cooperation with the group of Prof. Dr. Thomas Bräulke (Department of Biochemistry, Children's Hospital, University Medical Center Hamburg Eppendorf ) we were recently able to analyze the skeletal phenotype of a mouse model for mucopolidosis type II, a lysosomal storage disorder (LSD) characterized by a generalized lysosomal dysfunction. While the function of growth plate chondrocytes and bone-forming osteoblasts was impaired due to lysosomal accumulation of non-degraded material, bone-resorbing osteoclasts appeared morphologically intact and were not functionally affected. Osteoclastogenesis was markedly increased in MLII mice, and a similar observation was made in one individual with MLII. Using a combination of cell culture experiments and *in vivo* analyses we could further show that IL6, a cytokine known to increase osteoclastogenesis, was highly expressed in MLII osteoblasts and chondrocytes. The osteoporotic phenotype of MLII mice could be prevented by bisphosphonate treatment. Since these findings demonstrated the importance of a deep phenotyping approach for fully understanding the disease pathologies, our aim was to perform the same type of skeletal analysis for another lysosomal storage disorder.

Mucopolysaccharidosis type I (MPSI) is caused by homozygous inactivating mutations of the IDUA gene, encoding the lysosomal enzyme  $\alpha$ -L-Iduronidase, an enzyme primarily required for degradation of heparan and dermatan sulfate, representing two highly abundant glycosaminoglycans (GAGs). IDUA-inactivation leads to a pathological accumulation of GAGs within cells resulting in impairments on organ function in patients with MPSI. Patients are characterized by mental retardation, hepatosplenomegaly, dysostosis multiplex, corneal clouding, and cardiac dysfunction. A complete cure of the disease is not yet possible, most of the affected individuals are currently treated by bone marrow transplantation (BMT) in early childhood, which reduces some of the detrimental symptoms, possibly due to substitution of glial cells, or by enzyme replacement therapy (ERT).

The first goal of this thesis was to characterize the skeletal phenotype of *Idua*-deficient mice on a histological, cellular and molecular level. In a further step, the influence of BMT and ERT on skeletal remodeling of *Idua*-deficient mice should be studied.

The bone remodeling phenotype shown in the *Idua*-deficient mice was very complex and no *in vitro* simulation was probably explained by accumulation of glycosaminoglycans within the bone matrix. *Idua*-deficient mice showed no major abnormalities of skeletal patterning, development or growth, but a cranio-facial increase in tissue volume and porosity in the jaw bone and a dramatically elevated trabecular bone density with significantly reduced numbers of osteoclasts and osteoblasts and a redistribution of osteoblasts. In addition, a massive defect of osteocytes by incorporation of large accumulations of storage material was shown. Through a combined therapy with BMT and ERT, the skeletal bone phenotype of the *Idua*-deficient mice could be rescued. In summary, these results show

that the bone phenotype of the *Idua*-deficient mice differs from the one of MLII mice and that a detailed characterization of each lysosomal storage disease is an urgent need to apply targeted treatment options. Furthermore, it was shown that BMT in combination with ERT is the method of choice to correct the pathological bone phenotype of *Idua*-deficient mice.

The second analyzed mouse model displays a lysosomal storage disease with combined deficiency of LAP (*Acp2*) and TRAP (*Acp5*). LAP is a biochemical marker for lysosomes, TRAP is a classical marker for osteoclasts. In combination *Acp2* and *Acp5* dephosphorylate mannose-6-phosphate (M6P)-containing lysosomal proteins. In the mouse model a deficiency of these two genes caused an increased trabecular bone mass and reduced bone growth associated with a widening of the growth plate. The osteoclast function was found to be impaired with increased expression of cathepsin K, a lysosomal hydrolase that is transported via the M6P-dependent pathway into the resorption lacuna. *In vitro* it was shown that intracellular and extracellular activity of this lysosomal hydrolase was reduced possibly explained by a intracellular pH drop due to the enzyme deficiency. In contrast, Cathepsin K showed *in vivo* an increased intracellular localization. These results indicate that both genes play a role in trafficking of cathepsin K. Another interesting point in the *Acp2/Acp5*-deficient model was the altered fat phenotype. In a cold induction experiment it was shown that in comparison to wildtype *Acp2/Acp5*-deficient mice had an increased food intake, reduced fat pads and a higher energy expenditure with a browning of white adipose tissue that is characterized by an increased expression of the genes, *Ucp1* and *Fgf21*. *In vitro* studies of adipocytes from *Acp2/Acp5*-deficient mice pointed to impaired adipogenesis with a cell autonomous defect of these cells.

## 6.3 Vorveröffentlichungen

### 6.3.1 Publikationen

Kollmann, K., Pestka, J. M., **Kühn, S. C.**, Schöne, E., Schweizer, M., Karkmann, K., Otomo, T., Catala-Lehnen, P., Failla, A. V., Marshall, R. P., Krause, M., Santer, R., Amling, M., Bräulke, T., and Schinke, T., *Decreased bone formation and increased osteoclastogenesis cause bone loss in mucopolipidosis II*, EMBO Mol Med, 5, 1871 (2013).

**Kühn, S. C.**, Peska, J., M., Köhne, T., Krause, M., Neven, M., Cornils, K., Fehse, B., Breyer, S., Srücker, R., Muschol, N., Bräulke, T., Amling, M., and Schinke, T. *Impaired bone remodeling in Idua-deficient mice is profoundly affected by bone marrow transplantation*, Manuskript in Bearbeitung

### 6.3.2 Posterpräsentation

**Kühn, S. C.**, Peska, J., M., Köhne, T., Krause, M., Neven, M., Cornils, K., Fehse, B., Breyer, S., Srücker, R., Muschol, N., Bräulke, T., Amling, M., and Schinke, T. *Impaired bone remodeling in Idua-deficient mice is profoundly affected by bone marrow transplantation*, American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), Annual Meeting, Houston (2014)

## 6.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich direkt oder indirekt bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Thorsten Schinke und Prof. Dr. Michael Amling für die Bereitstellung des spannenden Themas, für die stetige Unterstützung, die anregenden Diskussionen, die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die kritische Durchsicht meiner Arbeit.

Ich danke Prof. Dr. Thorsten Burmester für die Begutachtung der Arbeit.

Ein weiterer großer Dank geht an Prof. Dr. Boris Fehse, Dr. Kerstin Cornils und Tanja Sonntag für die Hilfe bei den Knochenmarktransplantationen. Bei Dr. Michaela Schweizer möchte ich mich für die histochemischen und elektronenmikroskopischen Analysen bedanken. Dr. Till Köhne möchte ich danken für die  $\mu$ CT-Analysen. Herzlichen Dank Prof. Dr. Jörg Heeren und Sandra Ehret für die Einführung ins Fettgewebe. Prof. Dr. Thomas Braulke danke ich für die Bereitstellung der *Acp2/Acp5*-defizienten Mäuse.

Gudrun Arndt, Philipp Missberger und Nicole Lüder möchte ich herzlich für die zuverlässige Verwaltung der Mauslinien danken.

Mein ganz besonderer Dank geht an alle meine (ehemaligen) Kollegen für die wunderbare Arbeitsatmosphäre im Labor, die lustigen Unterhaltungen, die kollegiale Unterstützung, die nie enden wollende Hilfe bei fachlichen Problemen, die unzähligen kleinen Dinge am Rande und den einen oder anderen gelungenen Feierabend.

Ich möchte all meinen Freunden danken. Ich bin so froh, dass es euch gibt!

Mein größter Dank gilt meiner Familie. Vielen Dank Mama, für deine immerwährende, uneingeschränkte Unterstützung und dein Vertrauen auf all meinen Lebenswegen. Auch meinen Brüdern und meinen Großeltern danke ich, dass ihr immer für mich da seid.

## 6.5 Erklärung

### Eidesstattliche Versicherung

Hiermit bestätige ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig verfasst wurde und ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel – insbesondere keine im Quellenverzeichnis nicht benannten Internet-Quellen – benutzt habe und die Arbeit von mir vorher nicht einem anderen Prüfungsverfahren eingereicht wurde. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich bin damit einverstanden, dass die Dissertation veröffentlicht wird.

---

Ort, Datum

Unterschrift

## 6.6 Literaturverzeichnis

- Aarden, E. M., E. H. Burger, et al. (1994). "Function of osteocytes in bone." *J Cell Biochem* **55**(3): 287-299.
- Afratis, N., C. Gialeli, et al. (2012). "Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment." *FEBS J* **279**(7): 1177-1197.
- Ahmadian, M., J. M. Suh, et al. (2013). "PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future." *Nat Med* **19**(5): 557-566.
- Andersson, G., B. Ek-Rylander, et al. (2003). "TRACP as an osteopontin phosphatase." *J Bone Miner Res* **18**(10): 1912-1915.
- Angel, N. Z., N. Walsh, et al. (2000). "Transgenic mice overexpressing tartrate-resistant acid phosphatase exhibit an increased rate of bone turnover." *J Bone Miner Res* **15**(1): 103-110.
- Ashton, L. J., D. A. Brooks, et al. (1992). "Immunoquantification and enzyme kinetics of alpha-L-iduronidase in cultured fibroblasts from normal controls and mucopolysaccharidosis type I patients." *Am J Hum Genet* **50**(4): 787-794.
- Babst, M. (2005). "A protein's final ESCRT." *Traffic* **6**(1): 2-9.
- Ballabio, A. and V. Gieselmann (2009). "Lysosomal disorders: from storage to cellular damage." *Biochim Biophys Acta* **1793**(4): 684-696.
- Baron, R., L. Neff, et al. (1988). "Polarized secretion of lysosomal enzymes: co-distribution of cation-independent mannose-6-phosphate receptors and lysosomal enzymes along the osteoclast exocytic pathway." *J Cell Biol* **106**(6): 1863-1872.
- Baron, R., L. Neff, et al. (1985). "Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border." *J Cell Biol* **101**(6): 2210-2222.
- Bartelt, A. and J. Heeren (2014). "Adipose tissue browning and metabolic health." *Nat Rev Endocrinol* **10**(1): 24-36.
- Baumbach, G. A., P. T. Saunders, et al. (1984). "Uteroferrin has N-asparagine-linked high-mannose-type oligosaccharides that contain mannose 6-phosphate." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(10): 2985-2989.
- Behrens, T. W. and R. R. Graham (2011). "TRAPing a new gene for autoimmunity." *Nat Genet* **43**(2): 90-91.
- Bonewald, L. F. (2011). "The amazing osteocyte." *J Bone Miner Res* **26**(2): 229-238.
- Boon, M. R., S. A. van den Berg, et al. (2013). "BMP7 activates brown adipose tissue and reduces diet-induced obesity only at subthermoneutrality." *PLoS One* **8**(9): e74083.
- Bossard, M. J., T. A. Tomaszek, et al. (1996). "Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification." *J Biol Chem* **271**(21): 12517-12524.
- Braulke, F., K. Jung, et al. (2013). "Molecular cytogenetic monitoring from CD34+ peripheral blood cells in myelodysplastic syndromes: first results from a prospective multicenter German diagnostic study." *Leuk Res* **37**(8): 900-906.
- Braulke, T. and J. S. Bonifacino (2009). "Sorting of lysosomal proteins." *Biochim Biophys Acta* **1793**(4): 605-614.
- Braun, M., A. Waheed, et al. (1989). "Lysosomal acid phosphatase is transported to lysosomes via the cell surface." *EMBO J* **8**(12): 3633-3640.
- Brix, K., M. Linke, et al. (2001). "Cysteine proteinases mediate extracellular prohormone processing in the thyroid." *Biol Chem* **382**(5): 717-725.
- Bromme, D., K. Okamoto, et al. (1996). "Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme." *J Biol Chem* **271**(4): 2126-2132.
- Bune, A. J., A. R. Hayman, et al. (2001). "Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disordered macrophage inflammatory responses and reduced clearance of the pathogen, *Staphylococcus aureus*." *Immunology* **102**(1): 103-113.

- Bunge, S., P. R. Clements, et al. (1998). "Genotype-phenotype correlations in mucopolysaccharidosis type I using enzyme kinetics, immunoquantification and in vitro turnover studies." Biochim Biophys Acta **1407**(3): 249-256.
- Campos, D. and M. Monaga (2012). "Mucopolysaccharidosis type I: current knowledge on its pathophysiological mechanisms." Metab Brain Dis **27**(2): 121-129.
- Cannon, B. and J. Nedergaard (2010). "Metabolic consequences of the presence or absence of the thermogenic capacity of brown adipose tissue in mice (and probably in humans)." Int J Obes (Lond) **34 Suppl 1**: S7-16.
- Cannon, B. and J. Nedergaard (2011). "Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies." J Exp Biol **214**(Pt 2): 242-253.
- Clark, S. A., W. W. Ambrose, et al. (1989). "Ultrastructural localization of tartrate-resistant, purple acid phosphatase in rat osteoclasts by histochemistry and immunocytochemistry." J Bone Miner Res **4**(3): 399-405.
- Clarke, L. A. (2008). "The mucopolysaccharidoses: a success of molecular medicine." Expert Rev Mol Med **10**: e1.
- Clarke, L. A., C. S. Russell, et al. (1997). "Murine mucopolysaccharidosis type I: targeted disruption of the murine alpha-L-iduronidase gene." Hum Mol Genet **6**(4): 503-511.
- Cohen, M. M., Jr. (2006). "The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates." Am J Med Genet A **140**(23): 2646-2706.
- Compton, J. T. and F. Y. Lee (2014). "A Review of Osteocyte Function and the Emerging Importance of Sclerostin." J Bone Joint Surg Am **96**(19): 1659-1668.
- Cuppoletti, J., D. Aures-Fischer, et al. (1987). "The lysosomal H<sup>+</sup> pump: 8-azido-ATP inhibition and the role of chloride in H<sup>+</sup> transport." Biochim Biophys Acta **899**(2): 276-284.
- Cypess, A. M., S. Lehman, et al. (2009). "Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans." N Engl J Med **360**(15): 1509-1517.
- Czupalla, C., H. Mansukoski, et al. (2006). "Proteomic analysis of lysosomal acid hydrolases secreted by osteoclasts: implications for lytic enzyme transport and bone metabolism." Mol Cell Proteomics **5**(1): 134-143.
- Dallas, S. L. and L. F. Bonewald (2010). "Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte." Ann N Y Acad Sci **1192**: 437-443.
- de Araujo, P. S., V. Mies, et al. (1976). "Subcellular distribution of low- and high-molecular-weight acid phosphatases." Biochim Biophys Acta **452**(1): 121-130.
- de Duve, C. (1983). "Lysosomes revisited." Eur J Biochem **137**(3): 391-397.
- De Duve, C., B. C. Pressman, et al. (1955). "Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue." Biochem J **60**(4): 604-617.
- De Duve, C. and R. Wattiaux (1966). "Functions of lysosomes." Annu Rev Physiol **28**: 435-492.
- Deschaseaux, F., L. Sensebe, et al. (2009). "Mechanisms of bone repair and regeneration." Trends Mol Med **15**(9): 417-429.
- Drexler, H. G. and S. M. Gignac (1994). "Characterization and expression of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in hematopoietic cells." Leukemia **8**(3): 359-368.
- Eleftheriou, F., J. D. Ahn, et al. (2005). "Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART." Nature **434**(7032): 514-520.
- Farmer, S. R. (2009). "Obesity: Be cool, lose weight." Nature **458**(7240): 839-840.
- Feldmann, H. M., V. Golozoubova, et al. (2009). "UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality." Cell Metab **9**(2): 203-209.
- Franz-Odenaal, T. A., B. K. Hall, et al. (2006). "Buried alive: how osteoblasts become osteocytes." Dev Dyn **235**(1): 176-190.
- Freeze, H. H. (2009). Genetic Disorders of Glycan Degradation. Essentials of Glycobiology. A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko et al. Cold Spring Harbor (NY).
- Fu, L., M. S. Patel, et al. (2005). "The molecular clock mediates leptin-regulated bone formation." Cell **122**(5): 803-815.

- Fukuda, M. (1991). "Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking." *J Biol Chem* **266**(32): 21327-21330.
- Futerman, A. H. and G. van Meer (2004). "The cell biology of lysosomal storage disorders." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(7): 554-565.
- Geuze, H. J. (1998). "The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning." *Immunol Today* **19**(6): 282-287.
- Gieselmann, V. (1995). "Lysosomal storage diseases." *Biochim Biophys Acta* **1270**(2-3): 103-136.
- Gieselmann, V., A. Hasilik, et al. (1984). "Tartrate-inhibitable acid phosphatase. Purification from placenta, characterization and subcellular distribution in fibroblasts." *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **365**(6): 651-660.
- Goto, T., T. Yamaza, et al. (2003). "Cathepsins in the osteoclast." *J Electron Microsc (Tokyo)* **52**(6): 551-558.
- Grimes, R., S. V. Reddy, et al. (1993). "Assignment of the mouse tartrate-resistant acid phosphatase gene (Acp5) to chromosome 9." *Genomics* **15**(2): 421-422.
- Guha, S. and H. Padh (2008). "Cathepsins: fundamental effectors of endolysosomal proteolysis." *Indian J Biochem Biophys* **45**(2): 75-90.
- Hadjidakis, D. J. and Androulakis, II (2006). "Bone remodeling." *Ann N Y Acad Sci* **1092**: 385-396.
- Halleen, J. M., S. Raisanen, et al. (1999). "Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase." *J Biol Chem* **274**(33): 22907-22910.
- Harada, S. and G. A. Rodan (2003). "Control of osteoblast function and regulation of bone mass." *Nature* **423**(6937): 349-355.
- Hartmann, C. (2009). "Transcriptional networks controlling skeletal development." *Curr Opin Genet Dev* **19**(5): 437-443.
- Haskins, M. E., U. Giger, et al. (2006). Animal models of lysosomal storage diseases: their development and clinical relevance. *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. A. Mehta, M. Beck and G. Sunder-Plassmann. Oxford.
- Hayman, A. R. (2008). "Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy." *Autoimmunity* **41**(3): 218-223.
- Hayman, A. R., A. J. Bune, et al. (2000). "Osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5): its localization to dendritic cells and diverse murine tissues." *J Histochem Cytochem* **48**(2): 219-228.
- Hayman, A. R., A. J. Bune, et al. (2000). "Widespread expression of tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) in the mouse embryo." *J Anat* **196 ( Pt 3)**: 433-441.
- Hayman, A. R., S. J. Jones, et al. (1996). "Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disrupted endochondral ossification and mild osteopetrosis." *Development* **122**(10): 3151-3162.
- Hayman, A. R., P. Macary, et al. (2001). "Tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5): identification in diverse human tissues and dendritic cells." *J Histochem Cytochem* **49**(6): 675-684.
- Hemsley, K. M. and J. J. Hopwood (2010). "Lessons learnt from animal models: pathophysiology of neuropathic lysosomal storage disorders." *J Inherit Metab Dis* **33**(4): 363-371.
- Hers, H. G. (1965). "Inborn Lysosomal Diseases." *Gastroenterology* **48**: 625-633.
- Holmbeck, K., P. Bianco, et al. (2005). "The metalloproteinase MT1-MMP is required for normal development and maintenance of osteocyte processes in bone." *J Cell Sci* **118**(Pt 1): 147-156.
- Honing, S., I. V. Sandoval, et al. (1998). "A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3." *EMBO J* **17**(5): 1304-1314.
- Hunziker, W. and H. J. Geuze (1996). "Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins." *Bioessays* **18**(5): 379-389.
- Huotari, J. and A. Helenius (2011). "Endosome maturation." *EMBO J* **30**(17): 3481-3500.
- Janckila, A. J., E. D. Lederer, et al. (2009). "Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5a as an inflammation marker in end-stage renal disease." *Clin Nephrol* **71**(4): 387-396.
- Kakkis, E. D., J. Muenzer, et al. (2001). "Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I." *N Engl J Med* **344**(3): 182-188.

- Kamioka, H., T. Honjo, et al. (2001). "A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy." Bone **28**(2): 145-149.
- Karsenty, G., H. M. Kronenberg, et al. (2009). "Genetic control of bone formation." Annu Rev Cell Dev Biol **25**: 629-648.
- Kaushik, S. and A. M. Cuervo (2012). "Chaperones in autophagy." Pharmacol Res **66**(6): 484-493.
- Keller, J., P. Catala-Lehnen, et al. (2014). "Calcitonin controls bone formation by inhibiting the release of sphingosine 1-phosphate from osteoclasts." Nat Commun **5**: 5215.
- Klein, A. D. and A. H. Futerman (2013). "Lysosomal storage disorders: old diseases, present and future challenges." Pediatr Endocrinol Rev **11 Suppl 1**: 59-63.
- Kollmann, K., J. M. Pestka, et al. (2013). "Decreased bone formation and increased osteoclastogenesis cause bone loss in mucopolidosis II." EMBO Mol Med **5**(12): 1871-1886.
- Kornfeld, S. and I. Mellman (1989). "The biogenesis of lysosomes." Annu Rev Cell Biol **5**: 483-525.
- Krivit, W., P. Aubourg, et al. (1999). "Bone marrow transplantation for globoid cell leukodystrophy, adrenoleukodystrophy, metachromatic leukodystrophy, and Hurler syndrome." Curr Opin Hematol **6**(6): 377-382.
- Lacombe, J., G. Karsenty, et al. (2013). "Regulation of lysosome biogenesis and functions in osteoclasts." Cell Cycle **12**(17): 2744-2752.
- Lang, P. and G. Andersson (2005). "Differential expression of monomeric and proteolytically processed forms of tartrate-resistant acid phosphatase in rat tissues." Cell Mol Life Sci **62**(7-8): 905-918.
- Lausch, E., A. Janecke, et al. (2011). "Genetic deficiency of tartrate-resistant acid phosphatase associated with skeletal dysplasia, cerebral calcifications and autoimmunity." Nat Genet **43**(2): 132-137.
- Lawrence, B. P. and W. J. Brown (1992). "Autophagic vacuoles rapidly fuse with pre-existing lysosomes in cultured hepatocytes." J Cell Sci **102 ( Pt 3)**: 515-526.
- Lazzarino, D. A. and C. A. Gabel (1988). "Biosynthesis of the mannose 6-phosphate recognition marker in transport-impaired mouse lymphoma cells. Demonstration of a two-step phosphorylation." J Biol Chem **263**(21): 10118-10126.
- Lees, S. (1981). "A mixed packing model for bone collagen." Calcif Tissue Int **33**(6): 591-602.
- Leroy, J. G. and J. W. Spranger (1970). "I-cell disease." N Engl J Med **283**(11): 598-599.
- Li, Z., W. S. Hou, et al. (2000). "Collagenolytic activity of cathepsin K is specifically modulated by cartilage-resident chondroitin sulfates." Biochemistry **39**(3): 529-536.
- Li, Z., W. S. Hou, et al. (2002). "Collagenase activity of cathepsin K depends on complex formation with chondroitin sulfate." J Biol Chem **277**(32): 28669-28676.
- Li, Z., Y. Yasuda, et al. (2004). "Regulation of collagenase activities of human cathepsins by glycosaminoglycans." J Biol Chem **279**(7): 5470-5479.
- Liou, W., H. J. Geuze, et al. (1997). "The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles." J Cell Biol **136**(1): 61-70.
- Liu, Y., L. Xu, et al. (2005). "Liver-directed neonatal gene therapy prevents cardiac, bone, ear, and eye disease in mucopolysaccharidosis I mice." Mol Ther **11**(1): 35-47.
- Ljusberg, J., B. Ek-Rylander, et al. (1999). "Tartrate-resistant purple acid phosphatase is synthesized as a latent proenzyme and activated by cysteine proteinases." Biochem J **343 Pt 1**: 63-69.
- Long, F. (2012). "Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(1): 27-38.
- Lord, D. K., N. C. Cross, et al. (1990). "Type 5 acid phosphatase. Sequence, expression and chromosomal localization of a differentiation-associated protein of the human macrophage." Eur J Biochem **189**(2): 287-293.
- Lorenzo, J., M. Horowitz, et al. (2008). "Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system." Endocr Rev **29**(4): 403-440.
- Luzio, J. P., M. D. Parkinson, et al. (2009). "The delivery of endocytosed cargo to lysosomes." Biochem Soc Trans **37**(Pt 5): 1019-1021.

- Makrypidi, G., M. Damme, et al. (2012). "Mannose 6 dephosphorylation of lysosomal proteins mediated by acid phosphatases Acp2 and Acp5." *Mol Cell Biol* **32**(4): 774-782.
- Meijer, A. J. and P. Codogno (2004). "Regulation and role of autophagy in mammalian cells." *Int J Biochem Cell Biol* **36**(12): 2445-2462.
- Metcalfe, D. and A. M. Isaacs (2010). "The role of ESCRT proteins in fusion events involving lysosomes, endosomes and autophagosomes." *Biochem Soc Trans* **38**(6): 1469-1473.
- Mijaljica, D., M. Prescott, et al. (2007). "Autophagy and vacuole homeostasis: a case for self-degradation?" *Autophagy* **3**(5): 417-421.
- Mizushima, N., B. Levine, et al. (2008). "Autophagy fights disease through cellular self-digestion." *Nature* **451**(7182): 1069-1075.
- Monroy, M. A., F. P. Ross, et al. (2002). "Abnormal osteoclast morphology and bone remodeling in a murine model of a lysosomal storage disease." *Bone* **30**(2): 352-359.
- Moore, D., M. J. Connock, et al. (2008). "The prevalence of and survival in Mucopolysaccharidosis I: Hurler, Hurler-Scheie and Scheie syndromes in the UK." *Orphanet J Rare Dis* **3**: 24.
- Mulari, M., J. Vaaraniemi, et al. (2003). "Intracellular membrane trafficking in bone resorbing osteoclasts." *Microsc Res Tech* **61**(6): 496-503.
- Nadler, H. L. and T. J. Egan (1970). "Deficiency of lysosomal acid phosphatase. A new familial metabolic disorder." *N Engl J Med* **282**(6): 302-307.
- Nakamura, M., H. Nagano, et al. (2007). "Role of the Fas/FasL pathway in combination therapy with interferon-alpha and fluorouracil against hepatocellular carcinoma in vitro." *J Hepatol* **46**(1): 77-88.
- Nesbitt, S. A. and M. A. Horton (1997). "Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts." *Science* **276**(5310): 266-269.
- Ohkuma, S. and B. Poole (1978). "Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents." *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(7): 3327-3331.
- Oussoren, E., M. M. Brands, et al. (2011). "Bone, joint and tooth development in mucopolysaccharidoses: relevance to therapeutic options." *Biochim Biophys Acta* **1812**(11): 1542-1556.
- Padilla, J., N. T. Jenkins, et al. (2013). "Vascular transcriptional alterations produced by juvenile obesity in Ossabaw swine." *Physiol Genomics* **45**(11): 434-446.
- Palumbo, C., S. Palazzini, et al. (1990). "Morphological study of intercellular junctions during osteocyte differentiation." *Bone* **11**(6): 401-406.
- Palumbo, C., S. Palazzini, et al. (1990). "Osteocyte differentiation in the tibia of newborn rabbit: an ultrastructural study of the formation of cytoplasmic processes." *Acta Anat (Basel)* **137**(4): 350-358.
- Pederson, L., M. Ruan, et al. (2008). "Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(52): 20764-20769.
- Peters, C. and K. von Figura (1994). "Biogenesis of lysosomal membranes." *FEBS Lett* **346**(1): 108-114.
- Pievani, A., I. Azario, et al. (2014). "Neonatal bone marrow transplantation prevents bone pathology in a mouse model of mucopolysaccharidosis type I." *Blood*.
- Platt, F. M., B. Boland, et al. (2012). "The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction." *J Cell Biol* **199**(5): 723-734.
- Priemel, M., C. von Domarus, et al. (2010). "Bone mineralization defects and vitamin D deficiency: histomorphometric analysis of iliac crest bone biopsies and circulating 25-hydroxyvitamin D in 675 patients." *J Bone Miner Res* **25**(2): 305-312.
- Prill, V., L. Lehmann, et al. (1993). "The cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase contains overlapping but distinct signals for basolateral sorting and rapid internalization in polarized MDCK cells." *EMBO J* **12**(5): 2181-2193.
- Pritchard, J. J. (1952). "A cytological and histochemical study of bone and cartilage formation in the rat." *J Anat* **86**(3): 259-277.

- Qian, S. W., Y. Tang, et al. (2013). "BMP4-mediated brown fat-like changes in white adipose tissue alter glucose and energy homeostasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(9): E798-807.
- Qiu, Y., K. D. Nguyen, et al. (2014). "Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat." *Cell* **157**(6): 1292-1308.
- Ramp, W. K. (1975). "Cellular control of calcium movements in bone. Interrelationships of the bone membrane, parathyroid hormone and alkaline phosphatase." *Clin Orthop Relat Res*(106): 311-322.
- Reczek, D., M. Schwake, et al. (2007). "LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase." *Cell* **131**(4): 770-783.
- Rome, L. H., B. Weissmann, et al. (1979). "Direct demonstration of binding of a lysosomal enzyme, alpha-L-iduronidase, to receptors on cultured fibroblasts." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(5): 2331-2334.
- Rosen, C. J. (2005). "Clinical practice. Postmenopausal osteoporosis." *N Engl J Med* **353**(6): 595-603.
- Saftig, P., W. Beertsen, et al. (2008). "LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation." *Autophagy* **4**(4): 510-512.
- Saftig, P., D. Hartmann, et al. (1997). "Mice deficient in lysosomal acid phosphatase develop lysosomal storage in the kidney and central nervous system." *J Biol Chem* **272**(30): 18628-18635.
- Saftig, P., E. Hunziker, et al. (2000). "Functions of cathepsin K in bone resorption. Lessons from cathepsin K deficient mice." *Adv Exp Med Biol* **477**: 293-303.
- Saftig, P. and J. Klumperman (2009). "Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(9): 623-635.
- Saito, M., Y. Okamatsu-Ogura, et al. (2009). "High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity." *Diabetes* **58**(7): 1526-1531.
- Sands, M. S., J. E. Barker, et al. (1993). "Treatment of murine mucopolysaccharidosis type VII by syngeneic bone marrow transplantation in neonates." *Lab Invest* **68**(6): 676-686.
- Schmid, S. L., R. Fuchs, et al. (1988). "Two distinct subpopulations of endosomes involved in membrane recycling and transport to lysosomes." *Cell* **52**(1): 73-83.
- Schulz, T. J., T. L. Huang, et al. (2011). "Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(1): 143-148.
- Settembre, C., A. Fraldi, et al. (2013). "Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism." *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**(5): 283-296.
- Settembre, C., R. Zoncu, et al. (2012). "A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB." *EMBO J* **31**(5): 1095-1108.
- Simonet, W. S., D. L. Lacey, et al. (1997). "Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density." *Cell* **89**(2): 309-319.
- Stromhaug, P. E. and P. O. Seglen (1993). "Evidence for acidity of prelysosomal autophagic/endocytic vacuoles (amphisomes)." *Biochem J* **291** ( Pt 1): 115-121.
- Suter, A., V. Everts, et al. (2001). "Overlapping functions of lysosomal acid phosphatase (LAP) and tartrate-resistant acid phosphatase (Acp5) revealed by doubly deficient mice." *Development* **128**(23): 4899-4910.
- Takayanagi, H. (2007). "Novel signaling pathways and therapeutic targets in osteoclasts." *Adv Exp Med Biol* **602**: 93-96.
- Tang, Q. Q., T. C. Otto, et al. (2004). "Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(26): 9607-9611.
- Tang, Y., X. Wu, et al. (2009). "TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation." *Nat Med* **15**(7): 757-765.
- Teitelbaum, S. L. (2000). "Bone resorption by osteoclasts." *Science* **289**(5484): 1504-1508.
- Tiede, S., S. Storch, et al. (2005). "Mucopolipidosis II is caused by mutations in GNPTA encoding the alpha/beta GlcNAc-1-phosphotransferase." *Nat Med* **11**(10): 1109-1112.
- Tolar, J., S. L. Teitelbaum, et al. (2004). "Osteopetrosis." *N Engl J Med* **351**(27): 2839-2849.

- Toyomura, T., Y. Murata, et al. (2003). "From lysosomes to the plasma membrane: localization of vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase with the  $\alpha 3$  isoform during osteoclast differentiation." J Biol Chem **278**(24): 22023-22030.
- Trombetta, E. S. and A. Helenius (1998). "Lectins as chaperones in glycoprotein folding." Curr Opin Struct Biol **8**(5): 587-592.
- Tseng, Y. H., E. Kokkotou, et al. (2008). "New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure." Nature **454**(7207): 1000-1004.
- Tsukimura, T., Y. Tajima, et al. (2008). "Uptake of a recombinant human alpha-L-iduronidase (Iaronidase) by cultured fibroblasts and osteoblasts." Biol Pharm Bull **31**(9): 1691-1695.
- Unger, E. G., J. Durrant, et al. (1994). "Recombinant alpha-L-iduronidase: characterization of the purified enzyme and correction of mucopolysaccharidosis type I fibroblasts." Biochem J **304** (Pt 1): 43-49.
- Vaananen, H. K. and M. Horton (1995). "The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure." J Cell Sci **108** ( Pt 8): 2729-2732.
- van der Plas, A., E. M. Aarden, et al. (1994). "Characteristics and properties of osteocytes in culture." J Bone Miner Res **9**(11): 1697-1704.
- van Marken Lichtenbelt, W. D., J. W. Vanhommerig, et al. (2009). "Cold-activated brown adipose tissue in healthy men." N Engl J Med **360**(15): 1500-1508.
- van Meel, E., M. Boonen, et al. (2011). "Disruption of the Man-6-P targeting pathway in mice impairs osteoclast secretory lysosome biogenesis." Traffic **12**(7): 912-924.
- Vellodi, A. (2005). "Lysosomal storage disorders." Br J Haematol **128**(4): 413-431.
- Vihko, P., P. Virkkunen, et al. (1988). "Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding human prostatic acid phosphatase." FEBS Lett **236**(2): 275-281.
- Virtanen, K. A., M. E. Lidell, et al. (2009). "Functional brown adipose tissue in healthy adults." N Engl J Med **360**(15): 1518-1525.
- von Figura, K. and A. Hasilik (1986). "Lysosomal enzymes and their receptors." Annu Rev Biochem **55**: 167-193.
- Walkley, S. U. (2007). "Pathogenic mechanisms in lysosomal disease: a reappraisal of the role of the lysosome." Acta Paediatr Suppl **96**(455): 26-32.
- Walter, P. and A. E. Johnson (1994). "Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane." Annu Rev Cell Biol **10**: 87-119.
- Wetmore, J. B. and L. D. Quarles (2009). "Calcimimetics or vitamin D analogs for suppressing parathyroid hormone in end-stage renal disease: time for a paradigm shift?" Nat Clin Pract Nephrol **5**(1): 24-33.
- Whittle, A. J., S. Carobbio, et al. (2012). "BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions." Cell **149**(4): 871-885.
- Wilson, S., S. Hashamiyan, et al. (2009). "Glycosaminoglycan-mediated loss of cathepsin K collagenolytic activity in MPS I contributes to osteoclast and growth plate abnormalities." Am J Pathol **175**(5): 2053-2062.
- Wolf, D. A., A. W. Lenander, et al. (2012). "Increased longevity and metabolic correction following syngeneic BMT in a murine model of mucopolysaccharidosis type I." Bone Marrow Transplant **47**(9): 1235-1240.
- Zaidi, M. (2007). "Skeletal remodeling in health and disease." Nat Med **13**(7): 791-801.
- Zechner, R., R. Zimmermann, et al. (2012). "FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling." Cell Metab **15**(3): 279-291.
- Zhao, W., M. H. Byrne, et al. (2000). "Osteocyte and osteoblast apoptosis and excessive bone deposition accompany failure of collagenase cleavage of collagen." J Clin Invest **106**(8): 941-949.