

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Osteologie und Biomechanik

Institutsdirektor: Prof. Dr. med. Michael Amling

**Skelettale Charakterisierung eines murinen Modells für Mucopolysaccharidose
Typ VI**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Alexandra Angermann
aus Münster

Hamburg 2018

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 31.08.2018

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Thorsten Schinke

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Nicole Muschol

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Das Skelettsystem	6
1.1.1. Knochenentwicklung und -wachstum	6
1.1.2. Knochenzellen	8
1.1.2.1. Osteoblasten	8
1.1.2.2. Osteozyten	9
1.1.2.3. Osteoklasten	10
1.1.3. Knochenumbau und assoziierte Knochenerkrankungen	10
1.2. Das Lysosom	11
1.2.1. Lysosomale Speichererkrankungen	12
1.2.2. Degradation von Glykosaminoglykanen	13
1.2.3. Mucopolysaccharidose Typ VI	13
1.3. Aufgabenstellung	15
2. Material und Methoden	16
2.1. Material	16
2.1.1. Geräte	16
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	18
2.1.3. Chemikalien und Substanzen	19
2.1.4. Kits und Assays	20
2.1.4.1. TaqMan® Gene Expression Assay	20
2.1.5. Puffer und Lösungen	21
2.1.6. Zellkulturmedien	22
2.1.7. Antikörper	23
2.1.8. Primersequenzen	23
2.1.8.1. Genotypisierung	23
2.2. Methoden	24
2.2.1. Molekularbiologische Methoden	24
2.2.1.1. Genotypisierung der Mäuse	24
2.2.1.1.1. Isolierung von genomischer DNA aus Schwanzbiopsien	24
2.2.1.1.2. PCR	24
2.2.1.1.3. Agarosegelelektrophorese	24
2.2.1.1.3.1. Sequenzierung	25
2.2.1.2. RNA-Isolation	25
2.2.1.3. Reverse Transkription und quantitative Realtime-PCR	26

2.2.2. Zellbiologische Methoden	26
2.2.2.1. Generierung primärer Osteoblasten	26
2.2.2.1.1. Mineralisationsanalyse.....	27
2.2.2.1.2. Lysosomenfärbung (Immunfluoreszenz).....	28
2.2.2.2. Generierung primärer Osteoklasten	28
2.2.2.3. Dentin-Resorption	29
2.2.3. Präparation der Mäuse	29
2.2.4. Radiologische Untersuchungen	30
2.2.4.1. Kontaktradiographie	30
2.2.4.2. μ CT.....	30
2.2.5. Histologische und histomorphometrische Methoden	30
2.2.5.1. Calcein-Labeling.....	30
2.2.5.2. Unentkalkte Knochenhistologie.....	30
2.2.5.3. Färbungen.....	31
2.2.5.3.1. Alcianblau/Alizarinrot-Färbung von Skeletten	31
2.2.5.3.2. Acrylat	32
2.2.5.4. Histomorphometrie.....	32
2.2.6. Sonstige Methoden	33
2.2.6.1. Tierhaltung.....	33
2.2.6.2. Enzymersatztherapie.....	33
2.2.6.3. Statistische Auswertung.....	33
3. Ergebnisse	34
3.1. Entwicklung und Wachstum des Skeletts Arsb-defizienter Mäuse	34
3.2. Erfassung der strukturellen Morphologie durch radiologische und histologische Analyse.....	36
3.3. Einfluss der Arsb-Defizienz auf die verschiedenen Knochenzellen in vitro und in vivo	39
3.3.1. Osteoblasten und Osteozyten	40
3.3.2. Osteoklasten.....	42
3.3.3. Osteozyten im kortikalen Knochen	44
3.4. Der Effekt von Enzymersatztherapie auf den Knochenphänotyp in vitro und in vivo	46
3.4.1. Der Einfluss auf die lysosomale Speicherung in Osteoblasten in vitro.....	46
3.4.2. Der Einfluss der EET auf das Knochenwachstum Arsb-defizienter Mäuse.....	47
3.4.2.1. Einfluss der EET auf die Knochendichte Arsb-defizienter Mäuse	48
3.4.2.2. Einfluss der EET auf Arsb-defiziente Knochenzellen	50
3.4.2.3. Einfluss der EET auf kortikalen Knochen in Arsb-defizienten Mäusen	51
4. Diskussion	53

4.1. Beeinflussung der Skelettentwicklung und des Wachstums durch die lysosomale Speicherung.....	54
4.2. Knochenphänotyp Arsb-defizienter Mäuse	54
4.3. Affektion der Osteozyten.....	55
4.4. Bedeutung der Enzyersatztherapie für die Knochenpathologien	56
5. Zusammenfassung	59
6. Abstract.....	60
7. Abkürzungsverzeichnis	61
8. Literaturverzeichnis.....	63
9. Danksagung.....	69
10. Lebenslauf	70
11. Eidesstattliche Versicherung	71

1. Einleitung

1.1. Das Skelettsystem

Das knöchernerne Skelett ist, neben Knorpel und Bändern, Teil des passiven Bewegungsapparates und Ansatzpunkt für den aktiven Bewegungsapparat, die Skelettmuskulatur. Neben dieser Stützfunktion dient das Skelett dem Schutz vor mechanischen Schäden am zentralen Nervensystem sowie an inneren Organen. Zusätzlich ist der Knochen als größtes Kalzium- und Phosphatreservoir des Körpers metabolisch beteiligt und bedeutsam für die Mineralhomöostase. Das im Markraum befindliche Knochenmark ist ab der Geburt der Hauptort der Blutbildung.

Das menschliche Skelett besteht aus 223 Knochen, die nach ihrer äußeren Form in folgende Gruppen eingeteilt werden: Röhrenknochen (*Ossa longa*), kurze Knochen (*Ossa brevia*), Plattenknochen (*Ossa plana*), lufthaltige Knochen (*Ossa pneumatica*) sowie irreguläre Knochen (*Ossa irregularia*), die den anderen Gruppen nicht zuzuordnen sind. Den meisten dieser Knochen ist der gleiche Aufbau gemein. Sie bestehen aus einer dünneren äußeren Schicht, der *Kortikalis*, die von der äußeren Knochenhaut, dem Periost, überzogen ist, sowie aus den schwammartigen *Trabekeln*, die sich innen anschließen. Die inneren Anteile des Knochens sind durch die innere Knochenhaut, das Endost, bedeckt. Der Markraum liegt zwischen der festen Knochensubstanz (Aumüller et al. 2014).

1.1.1. Knochenentwicklung und -wachstum

Betrachtet man das Skelett aus der embryologischen Perspektive entstammt es dem sogenannten Mesoderm, einem der drei Keimblätter. Aus den sogenannten Sklerotomen der Somiten entwickeln sich die Wirbel, Bandscheiben und Rippen. Die Chorda dorsalis verbleibt als Teil des Nucleus pulposus der Bandscheibe. Die Extremitäten entstehen aus Falten an der ventrolateralen Körperwand, deren Wachstum durch die Freisetzung von FGFs sowie BMPs gesteuert wird (Benninghoff et al. 2008).

Das Knochenwachstum findet auf zwei unterschiedliche Weisen statt: Die Schädelknochen, sowie Schlüsselbeine entstehen durch die sogenannte desmale Ossifikation, bei der Knochen direkt aus Bindegewebe gebildet wird. Die meisten anderen Knochen, insbesondere zu nennen die Wirbelkörper sowie die Röhrenknochen, entstehen durch chondrale Ossifikation, bei der

zunächst eine Knorpelanlage vorliegt. Bei beiden Vorgängen entsteht Geflechtknochen, der zu stabilerem lamellären Knochen umgebaut wird (Welsch et al. 2014).

Desmale Ossifikation

Bei der desmalen Ossifikation differenzieren mesenchymale Stammzellen (MSC), die sich an gefäßreichen, sogenannten *Ossifikationspunkten* konzentrieren, zu Osteoblasten, die eine proteinreiche Knochenmatrix sezernieren. Diese wird durch Einlagerung von Kalzium und Phosphat in Form von Hydroxylapatit nach und nach mineralisiert (Welsch et al. 2014).

Chondrale Ossifikation

Die chondrale Ossifikation findet über zwei Schritte statt. Zunächst erfolgt die perichondrale Ossifikation, bei der sich um den diaphysären Knorpelanteil eine Knochenmanschette bildet, die das abzubauen Knorpelgewebe von außen stützt (Welsch et al. 2014).

Zentral bildet sich der sogenannte Blasenknorpel. Dieser besteht aus hypertrophen Knorpelzellen (Chondrozyten), die durch Verkalkung der umgebenden Matrix zugrunde gehen und dadurch einen Angriffspunkt für den Umbau in Knochen bilden. Es wachsen Blutgefäße ein, die Zellen mitführen, die zu mehrkernigen Chondroklasten fusionieren. Diese bauen die verkalkte Knorpelmatrix ab und bahnen damit die Ansiedlung weiterer Blutgefäße und Mesenchymzellen sowie Osteoprogenitorzellen, die zu Osteoblasten differenzieren und wiederum nicht mineralisierte Knochenmatrix produzieren. Die perichondrale Knochenmanschette wächst mit den entstehenden Trabekeln zusammen, die zunächst noch verkalkte Knorpelmatrix enthalten können. Die Knorpel-Knochen-Grenze wächst dabei kontinuierlich auf die Enden zu. Es ergibt sich dadurch, vornehmlich in Röhrenknochen, eine Gliederung des Knochens in Diaphyse, jeweils proximal und distal davon eine Metaphyse sowie jeweils das Ende bildend eine Epiphyse.

Die sogenannte Epiphysenfuge, an der das Längenwachstum stattfindet, ist Teil der Metaphyse. Sie hat einen charakteristischen 4-zonalen Aufbau: Epiphysennah befindet sich eine Zone mit ruhendem Knorpel, der die Epiphysenfuge verankert. Diaphysenwärts folgt eine Zone mit proliferierenden Chondrozyten, die einen charakteristischen säulenartigen Aufbau besitzt. Deren Zellen differenzieren, werden zunehmend hypertroph und bilden eine weitere Zone. Sie enthalten in diesem Stadium in besonderem Maße das Enzym *Alkalische Phosphatase*, das die Mineralisierung der Matrix anregt. Dieser dann verkalkte Bereich bildet die letzte Zone der

Wachstumsfuge, in der die Chondrozyten zugrunde gehen und die Knorpelmatrix durch Knochengewebe ersetzt wird.

1.1.2. Knochenzellen

Am Auf- und Umbau von Knochen sind im Wesentlichen vier Zelltypen beteiligt (Parfitt 1994, Feng and McDonald 2011). Osteoblasten bewerkstelligen den Knochenaufbau. Sogenannte *Lining Cells*, die der Osteoblastenreihe angehören, bedecken die Knochenoberfläche und können so verschiedene Kompartimente bilden. Osteozyten, die aus Osteoblasten differenzieren und in der Matrix eingemauert sind, lenken dort als mechanosensitive Zellen u.a. den Knochenumbau. Osteoklasten schließlich können Knochen resorbieren. Diese Zellen bilden anatomisch und funktional zusammen eine sogenannte *BMU (basic multicellular unit)* und unterliegen einer strengen Regulation, um den regelhaften Prozess des Knochenumbaus zu gewährleisten.

1.1.2.1. Osteoblasten

Osteoblasten entstammen der mesenchymalen Zellreihe. Die Differenzierung wird durch den Einfluss von BMPs eingeleitet, die die Phosphorylierung von *Smads* sowie die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs bewirken. Zusätzlich wird diese durch das Einwirken verschiedener Hormone und Zytokine, wie PTH, IGF-1, TGF- β sowie Prostaglandin E₂ moduliert (Zaidi 2007, Crockett et al. 2011). Der Transkriptionsfaktor *Runx2*, sowie das nachgeschaltete Osterix nehmen hierbei Schlüsselrollen ein und aktivieren die Expression von Osteoblastenspezifischen Genen, zum Beispiel kodierend für Osteocalcin, Osteopontin, alkalische Phosphatase oder Kollagen Typ I.

Aktive Osteoblasten sezernieren eine proteinreiche Matrix, die zu 85 bis 90% aus kollagenen Proteinen besteht, wobei Kollagen Typ I den größten Anteil ausmacht. Die verbleibenden 10 bis 15% sind nicht-kollagene Matrixproteine (Brodsky and Persikov 2005, Clarke 2008). Die Mineralisierung der Matrix erfolgt initial durch die Abschnürung von Kalzium-haltigen Vesikeln, die mit Phosphat Hydroxylapatit-Kristalle bilden. Dies wird durch das Enzym alkalische Phosphatase begünstigt. Durch die Anlagerung weiterer Kalzium-Ionen entstehen immer größere Aggregate (Zaidi 2007).

Osteoblasten sind die Zellen der Knochenbildung, aber auch maßgeblich an der Osteoklastenentstehung und -differenzierung beteiligt. Sie produzieren M-CSF sowie RANKL und OPG, das als freier Rezeptor von RANKL zusätzlich regulierend wirkt (Udagawa et al. 1999, Crockett et al. 2011).

1.1.2.2. Osteozyten

Osteozyten differenzieren sich aus Osteoblasten, die sich während der Knochenformation haben „einmauern“ lassen. Sie verändern ihre Morphologie von kubischen zu eher sternförmigen Zellen und bilden dendritische Fortsätze, durch die sie untereinander, aber auch mit der Knochenoberfläche sowie Osteoblasten über *gap junctions* verbunden werden. Sie machen ca. 90% der Zellen aus (Guo and Bonewald 2009, Bonewald 2011).

Osteozyten sind maßgeblich an der Regulation des Phosphatstoffwechsels beteiligt. Zwei der Moleküle, deren Expression in Osteozyten am höchsten ist, DMP1 sowie Phex, haben bekannte Funktionen bei der Phosphathomöostase. Ein drittes wichtiges Molekül, welches in Osteozyten exprimiert und von den anderen beiden Molekülen negativ reguliert wird, ist FGF23. Es wird von den Osteozyten freigesetzt und gelangt über den Blutkreislauf zur Niere. Dort hemmt dieser zum einen die Expression der Gene für Phosphattransporter, die Phosphat aus den Nierentubuli zurückresorbieren und erhöht so die Phosphatausscheidung im Urin (Toyosawa et al. 2001, Feng et al. 2006, Liu et al. 2006, Martin and Quarles 2012). Zum anderen wird die 25-OH-D1*-Hydroxylase gehemmt, die Vitamin D in die aktive Form, 1,25-(OH)₂-D, umwandelt, sowie deren Abbau durch Stimulation von Cyp24 gefördert, was ebenfalls Effekte auf den Knochenstoffwechsel vermittelt, da beispielsweise die Calciumresorption im Dünndarm durch aktives Vitamin D reguliert wird (Van Cromphaut et al. 2001).

In ihrer Funktion als Mechanosensoren steuern Osteozyten den Knochenumbauprozess. Sie detektieren sogenannte *Microcracks* und sezernieren Faktoren, die die Bildung und Differenzierung von Osteoblasten beeinflussen: zum Beispiel Sclerostin, das den Wnt/ β -Catenin Signalweg hemmt (van Bezooijen et al. 2004, Poole et al. 2005), sowie PGE₂ oder Stickstoffmonoxid (NO) (Klein-Nulend et al. 1995, Klein-Nulend et al. 1995, Bakker et al. 2001), die die Knochenformation einleiten. Sie scheinen auch einerseits durch die Expression von RANKL und OPG (Zhao et al. 2002), andererseits durch Apoptose Osteoklasten zu regulieren (Kogianni et al. 2008, Bonewald 2011).

1.1.2.3. Osteoklasten

Osteoklasten sind resorptionsfähige Knochenzellen, die der hämatopoetischen Stammzelllinie entstammen. Unter Einfluss von M-CSF und RANKL differenzieren sich Vorläuferzellen über Makrophagen zu einkernigen Osteoklastenprogenitorzellen und fusionieren zu mehrkernigen Riesenzellen, den reifen Osteoklasten (Boyle et al. 2003, Welsch et al. 2014).

M-CSF bindet an den Rezeptor c-Fms, der von frühen Osteoklasten-Vorläuferzellen exprimiert wird und vermittelt Signale für das Zellüberleben und Proliferation. Durch Zellkontakt zu Stromazellen oder Osteoblasten bindet der membranständige RANK-Ligand an seinen Rezeptor RANK auf den Osteoklast-Vorläuferzellen und vermittelt deren weitere Differenzierung zu Osteoklasten (Teitelbaum 2000).

Um Knochen zu resorbieren, binden die reifen Osteoklasten mittels Integrinrezeptoren an Proteine der mineralisierten Matrix. Sie erhalten durch Zytoskelettveränderungen eine polarisierte Morphologie und bilden einen Faltsaum an der Seite des zu resorbierenden Knochens, über den sie H^+ -Ionen via der vacuolar-type H^+ -ATPase in ein abgeschlossenes Kompartiment, die sogenannte Howship-Lakune, sezernieren und so ein saures Milieu mit einem pH von ca. 4,5 erzeugen. Durch einen Chloridtransporter erfolgt die Elektronenneutralisation (Blair et al. 1989, Schlesinger et al. 1997, Mulari et al. 2003). Diese saure Umgebung mobilisiert zum einen das anorganische Mineral und ist zusätzlich erforderlich, um ebenfalls sezernierte Enzyme teils lysosomalen Ursprungs, wie Cathepsin K und Metalloproteinasen zu aktivieren, die die organischen Anteile der Matrix degradieren (Li et al. 1999, Zhao et al. 1999). Die entstehenden Fragmente werden zusammen mit den freigesetzten Ionen endocytisiert. Durch Cathepsin K und TRAP, ein Osteoklasten-spezifisches Enzym, das durch Cathepsin K aktiviert wird, werden sie weiter proteolysiert und an der basolateralen Seite exocytotisch freigesetzt (Nesbitt and Horton 1997, Ljusberg et al. 2005).

1.1.3. Knochenumbau und assoziierte Knochenerkrankungen

Knochenumbau dient der Erneuerung von Knochendefekten und sorgt für die Anpassung der Knochenarchitektur an sich ändernde Beanspruchungen zur Erhaltung der Stabilität. Etwa 10 % des Knochens werden pro Jahr erneuert, was in einer vollständigen Erneuerung des Skeletts innerhalb von 10 Jahren resultiert (Lerner 2006). Er bedarf einer genauen Steuerung der beteiligten Zellen, um das Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau zu erhalten. Die Expression

von RANKL wird durch den Einfluss von IL-1, TNF- α oder Vitamin D beispielsweise erhöht, was zu einer verstärkten Osteoklastogenese führt und so eine vermehrte Knochenresorption bewirkt. TGF- β und Östrogene haben einen gegenteiligen Effekt (Proff and Römer 2009). Je nach Art der Störung ergeben sich verschiedene Knochenerkrankungen (Feng and McDonald 2011).

Osteoporose umfasst eine Gruppe von Erkrankungen, die mit einer verringerten Knochenmasse und Verschlechterung der Knochenstruktur einhergehen und so zu einer erhöhten Fragilität der Knochen und Frakturanfälligkeit führen (N. I. H. Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention 2001). Mögliche Ursachen sind hormonelle Veränderungen, beispielsweise bei postmenopausalen Frauen, Medikamente, wie Glukokortikoide, oder Erkrankungen, wie u.a. chronische Nierenleiden. Ebenso können Mutationen von Genen, die am Knochenstoffwechsel beteiligt sind, eine Osteoporose verursachen.

Eine weitere, durch seltene genetische Defekte ausgelöste Erkrankungsgruppe ist die Osteopetrose, die durch eine erhöhte Knochendichte, bedingt durch eine Resorptionsstörung der Osteoklasten, charakterisiert wird. Die drei wichtigsten Mutationen betreffen die Carboanhydrase II, die H⁺-Ionen generiert, die V-H⁺-ATPase sowie den Chloridkanal CLCN7, die alle in der Resorptionslakune zugewandten Membran lokalisiert sind.

Eine dritte bedeutende Erkrankung ist der Morbus Paget. Es besteht hierbei ein allgemein erhöhter Knochenumsatz, der abnormale, Geflechtknochen-artigen Areale des trabekulären Knochens hervorruft und zu Knochenschmerzen, -deformitäten und sekundär Gelenkentzündungen führt. In den betroffenen Arealen treten gehäuft Osteosarkome auf. Über die Pathogenese ist bisher wenig bekannt. Genetisch besteht ein Zusammenhang mit der Mutation des Gens, das für ein Ubiquitin-bindendes Protein kodiert und in den NF κ B-Signalweg involviert ist. Ein weiterer Mechanismus wird in der Assoziation mit chronischen viralen Infektionen, wie paramyxoviralen Infektionen, vermutet (Michou et al. 2010, Feng and McDonald 2011).

1.2. Das Lysosom

Lysosomen sind membrangebundene Zellorganellen, die aus einer externen Membran und intralysosomalen Vesikeln bestehen (Futerman and van Meer 2004). Ihre Funktion besteht im Abbau von verschiedenen intra- und extrazellulären Strukturen und Molekülen sowie Membranbestandteilen, wozu sie über 40 Typen an hydrolytischen Enzymen verfügen, die

unter dem Begriff der sauren Hydrolasen zusammengefasst werden (Alberts 2002, Heinrich et al. 2014). Sie sind im, mit einem pH von 3 bis 5, sauren Milieu der Lysosomen aktiv. Ihre Vorstufen werden nach der Synthese im rauen endoplasmatischen Retikulum im Golgi-Apparat mit Mannose-6-Phosphat-Resten versehen und so für den Transport ins Lysosom adressiert. Zum Schutz der Lysosomenmembran vor den sauren Hydrolasen befindet sich auf der luminalen Seite eine Glykokalix aus stark glykosylierten, lysosomal assoziierten Membranproteinen (LAMPs).

1.2.1. Lysosomale Speichererkrankungen

Lysosomale Speichererkrankungen sind eine Gruppe von ca. 50 Erkrankungen, die durch die Akkumulierung von nicht abgebautem Material in den Lysosomen charakterisiert werden (Greiner-Tollersrud and Berg 2000-2013).

Die meisten Speichererkrankungen werden autosomal rezessiv vererbt. Ausnahmen hiervon sind der Morbus Fabry sowie Hunter und die Danon-Krankheit. Sie werden X-chromosomal rezessiv vererbt (Hopwood et al. 1993, Nishino et al. 2000, Masson et al. 2004). Gemein ist allen, dass die meisten Patienten bei Geburt unauffällig erscheinen und die Symptome progressiv auftreten.

Der größte Anteil dieser Erkrankungen wird durch die Defizienz einer Hydrolase, ihres Aktivators oder eines Transporters verursacht. Defekte des vesikulären Transports im endosomalen/lysosomalen System haben mitunter einen den lysosomalen Speichererkrankungen ähnlichen Phänotyp. Ein Beispiel hierfür sind die Mucopolipidosen, allen voran Typ II, bei denen die UDP-N-Acetylglucosamin-Phosphotransferase-Aktivität beeinträchtigt ist. Dieses im cis-Golgiapparat lokalisiertes Enzym hängt GlcNAc-1-P an terminale Mannose-Reste an N-Glykane von lysosomalen Hydrolasen. Störungen dieses Prozesses führen zu einer fehlerhaften Sortierung und Freisetzung dieser Enzyme in den extrazellulären Raum, weshalb sowohl Lipide als auch wasserlösliche Substanzen in den Lysosomen verbleiben (Raas-Rothschild et al. 2000, Greiner-Tollersrud and Berg 2000-2013).

Der größten Gruppe der lysosomalen Speichererkrankungen jedoch, ca. 30 von ihnen, liegen Defekte im Glykan-Abbau zugrunde. Hierunter fallen die Glykoprotein-, Glykolipid-, Glykosaminoglykan-, sowie Glykogen-Degradation. Erkrankungen, die erstere betreffen, werden auch als Glykoproteinosen bezeichnet. Beispiele sind die Sialinidose, der ein Defekt der α -Sialidase zugrunde liegt, und die Fucosidose, bei der das Enzym α -Fucosidase gestört ist.

Defekte des Glykolipidabbaus resultieren beispielsweise in der Speicherung von GM1-Gangliosiden (Monosialotetrahexosylganglioside), die etwa das Tay-Sachs-Syndrom oder den Morbus Gaucher hervorrufen und vor allem das zentrale Nervensystem (ZNS) betreffen. Bei der Pompe'schen Krankheit sind vor allem die Leber sowie die Muskulatur inklusive des Herzens betroffen, da hier ein Mangel der α -Glucosidase vorliegt, die am Glykogen-Abbau beteiligt ist. Erkrankungen, die die Glykosaminoglykan-Degradation betreffen, werden unter dem Begriff der Mukopolysaccharidosen zusammengefasst. In Abhängigkeit vom betroffenen Enzym und unterschiedlichen Gewebelokalisationen des gespeicherten Materials reichen die Symptome von Organomegalie über Skelettabnormitäten und Wachstumsstörungen bis hin zu chronischen Infektionen, vor allem der Atemwege, und neurologischen Auffälligkeiten durch Beteiligung des ZNS.

1.2.2. Degradation von Glykosaminoglykanen

„Glykosaminoglykane (GAGs) sind lange, unverzweigte Heteroglykanketten aus repetitiven Disaccharideinheiten“ (Heinrich et al. 2014). Mit Ausnahme von Hyaluronsäure, die frei vorliegt, sind GAGs an spezifische Proteine, die Proteoglykane, gebunden, die ausschließlich in der extrazellulären Matrix vorkommen und für deren funktionelle Vielfalt verantwortlich sind. Die wichtigsten dieser Glykosaminoglykane sind: Chondroitinsulfat (Chondroitin-4- und -6-sulfat (A und C)), Dermatansulfat (Chondroitinsulfat B), sowie Keratan- und Heparansulfat. Ihr Abbau ist hoch organisiert: Der Proteinanteil der gebundenen Proteoglykane wird nach deren Internalisierung abgebaut. Die Degradation der GAG-Ketten erfolgt schrittweise durch Endo- und Exoglycosidasen. Bevor jedoch letztere tätig werden können, müssen die Modifikationen der Zuckermoleküle beseitigt werden. Die Abspaltung von Sulfatgruppen erfolgt hierbei durch spezifische Sulfatasen (Freeze 2009).

1.2.3. Mucopolysaccharidose Typ VI

Der Mucopolysaccharidose Typ VI, die auch als Maroteaux-Lamy-Syndrom bezeichnet wird, liegt ein Defekt des Enzyms N-Acetylgalaktosamin-4-Sulfatase (Arylsulfatase B) zugrunde. Dieser Enzymbezeichnung ist zu entnehmen, dass die Abspaltung der Sulfatgruppe von N-Acetylgalaktosamin gestört ist, was zu einer Ansammlung von unvollständig degradierten

Glykosaminoglykanen, Chondroitin- und insbesondere Dermatansulfat, in den Lysosomen führt (Freeze 2009).

Dies ruft eine Reihe an Symptomen hervor, die vor allem Binde- und Stützgewebe betreffen, da dort besonders Dermatansulfat-enthaltende Proteoglykane vorkommen (Trowbridge and Gallo 2002). Skelettal manifestiert sich die Erkrankung durch einen als Dysostosis multiplex bezeichneten Symptomkomplex: Hierzu gehören hypoplastische Wirbelkörper mit oder ohne Kyphose bzw. Skoliose, eine Hüft dysplasie, sowie Knie in Valgusposition. Schädelveränderungen, die mit einer mehr oder minder ausgeprägten Gesichtsdysmorphie einhergehen sind die Vergrößerung des Schädels mit einer Verdickung des Schädeldachs, eine J-förmigen Sella turcica und ein erweiterter Diploe-Raum. Zudem sind Schlüsselbeine und Rippen verbreitert. Die Epiphysen sind hypoplastisch veranlagt, die Diaphysen verdickt und vergrößert. Die Ulna ist häufig hypoplastisch, die Mittelhandknochen sind verkürzt und erhalten eine charakteristische *bullet shape*-Form. Besonders mit Komplikationen vergesellschaftet sind die ebenfalls auftretende atlanto-axiale Instabilität sowie Stenosen des Wirbelkanals, die zu einer Rückenmarkskompression mit Lähmung als Folge führen können (White 2011). Die sogenannte *Ear-Nose-Throat-Disease* beinhaltet eine Hörstörung, sowie eine Verengung der oberen Atemwege. Die unteren Atemwege inklusive der Lunge sind ebenfalls verengt, was zusammen mit dem kleinen und steifen Brustkorb die Respiration erschwert und häufig zu Infektionen führt (Shih et al. 2002, Valayannopoulos et al. 2010). Das Herz-/Kreislaufsystem wird durch mögliche Stenosen oder Insuffizienzen von Herzklappen, die zusätzlich ein höheres Risiko für Infektionen bedeuten, sowie Bluthochdruck durch die Beteiligung der Gefäße belastet. Durch Speichermaterial verdickt sich auch die Cornea und trübt ein. Zusätzlich kann es zu einer Augenninnendruckerhöhung, dem sogenannten Glaukom, kommen. Das zentrale Nervensystem ist bei dieser Erkrankung primär nicht betroffen. (Ashworth et al. 2006, Valayannopoulos et al. 2010)

Neben symptomatischer Behandlung ist Therapie der Wahl die Enzyersatztherapie (EET) mit rekombinantem humanem Arsb (Naglazyme®, Biomarin) (Giugliani et al. 2007).

1.3. Aufgabenstellung

MPS-VI ist eine seltene Erkrankung mit einer Geburtsprävalenz zwischen 1 zu 43.261 und 1 zu 1.505.160, die sich vor allem in Binde- und Stützgewebe manifestiert (Valayannopoulos et al. 2010). Bisher wurden die Skelettauffälligkeiten der Patienten zwar auf radiologischer Ebene charakterisiert, jedoch auf zellulärer und molekularer Ebene nur unzureichend untersucht.

Ein Ziel der Arbeit war deshalb die Analyse des skelettalen Phänotyps im Rahmen eines MPS-VI Mausmodells.

Da bereits die Enzyersatztherapie Einzug in die klinische Anwendung gefunden hat, sollte in einem zweiten Schritt untersucht werden, wie sich diese auf den Phänotyp im angewendeten Tiermodell auswirkt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Schüttelinkubator	innova 4000	New Brunswick Scientific, Enfield, US
Zentrifugen	5415D 5430R GS-6	Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Beckman Coulter, Brea, US
pH-Meter	pH538	WTW, Weilheim
Magnetrührer	RCT basic	IKA Labortechnik, Staufen
UV-/Spektrophotometer	Otrospec 2100 pro Nano Drop ND-1000	Biochrom, Cambridge, UK peqlab Biotechnologie GmbH
Inkubator	BBD 6220	Heraeus (Thermo), Hanau
Mikroskop	IX50 Sp5	Zeiss, Oberkochen Leyca
Mikroskop-Kamera	Axioskop, Camera AxioCam Axio Scope.A1 DP72 Camera	Zeiss, Oberkochen Zeiss, Oberkochen Olympus
Wasserbad	1012	GFL, Burgwedel
Sterilwerkbank	BDK 51200 Hera safe	BDK, Sonnenbuhl Heraeus, Hanau
Microplatereader	Versamax microplate reader	Molecular Devices, Sunnyvale (CA)
Power Pac HC	Power supply, Modell 200/2.0	BioRad, Hercules, US
UV-Transilluminator	Universal Hood 75S	BioRad, Hercules, US
Gelelektrophoresekammer	Sub-Cell	BioRad, Hercules, US
Thermocycler	Thermomixer 5436/comfort	Eppendorf, Hamburg
PCR-Cycler	MasterCycler pro S	Eppendorf, Hamburg
Real Time PCR-System	StepOnePlus System	Applied Biosystems, Foster City, US
Waagen	440-33 TE2101 CPA224S	Kern, Balingen Sartorius, Göttingen Sartorius, Göttingen
Pipetten	0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl Finnpipette 12 Kanal, 30- 300 µl	Eppendorf, Hamburg/ Gilson, Middleton, US Thermo Scientific, Waltham, US

Vortexer	REAX top	Heidolph, Schwabach
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	INTEGRA Biosciences, Zizers, CH
Autotechnikon	2050	Bavimed Laborgeräte, Birkenau
Homogenisierer	Ultra-Turrax T25	IKA, Staufen
μ-Computertomograph	μCT 40	Scanco Medical AG, Brüttisellen, CH
Scanner	Scanjet G4050	Hewlett-Packard Company, Palo Alto, US
Rotationsmikrotome	CUT 4060E	microTec, Walldorf
	1140/Autocut	Reichert-Jung, Cambridge Instruments, St. Neots, UK
Schleifgerät	Phoenix Alpha	Buehler, Lake Bluff, US
Wärmeschrank		Heraeus, Hanau
Röntgengerät	Faxitron XRay Sterile	Faxitron Xray Corp., Tucson, US
Leuchtpult	1634	Hama, Monheim
Kamera	EOS 10D	Canon K.K., Tokio, JP
Eisbereiter	FM-120DE	Hoshikazi Denki, K.K., Toyoake, JP
Filmentwickler	Optimax 1170-1-0000	Protec, Oberstenfeld

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Materialbezeichnung	Typ	Hersteller
Eppendorf Tubes	1,5ml, 2ml/5ml	Sarstedt, Nümbrecht/Eppendorf, Hamburg
Platte für RT-PCR	MicroAmp 96-well fast reaction plate	Applied Biosystems, Foster City, US
Pipettenspitzen		Sarstedt, Nümbrecht
Filter Tips Pipettenspitzen		Biosphere Filter Tips, Sarstedt AG &Co., Nümbrecht
MicroAmp Optical Adhesive film		Applied Biosystems, Foster City, US
Zellsiebe		Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT
Parafilm		Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL
PCR-Reaktionsgefäße		Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Falcon Tubes	10, 50 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT
Glas-Pasteurpipetten, 230 mm		VWR, Radnor, PA, US
UV-Küvetten		Eppendorf, Hamburg
Filter	Rapid-Flow Bottle Top Filter 150ml /500 ml	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Zellkulturschalen		Sarstedt, Nümbrecht
Cell Scraper		Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten		Sarstedt Inc. Newton, NC, USA
Skalpellklingen		C. Bruno Bayha, Tuttlingen
Einbettcassetten		Roth, Karlsruhe
Rollrandgläser		Roth, Karlsruhe
Schleifpapier		Hermes Schleifmittel, Hamburg
Mikrotommesser		Leyca Biosystems, Nussloch
Deckgläschen		Roth, Karlsruhe
Objektträger	Polysine Slides	Roth, Karlsruhe
Objektträger	Assistent	Roth, Karlsruhe Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim
Dentinchips	aus Elefantenstoßzahn	

2.1.3. Chemikalien und Substanzen

Chemikalie/Substanz	Hersteller
Ethidiumbromid	Sigma
Tris	Roth
Natriumacetat	Sigma
EDTA	Sigma
Agarose (SeaKem LE Agarose)	Lonza
PBS Dulbecco	Merck
Collagenase Ia	Sigma
Dispase II	Roche
α -MEM (Minimal Essential Medium)	Sigma
β -Glycerophosphat	Sigma
Alizarinrot	Chroma
Ascorbat	Sigma-Aldrich
Ethanol 100%	Merck
Alcianblau	Chroma
Aceton	ChemSolute, Th. Geyer Group
Kaliumhydroxid – (Plätzchen)	Merck
Glycerol	Roth
PFA	Sigma
Triton X-100	Merck
BSA (bovines Serum Albumin)	Fluka
β -Mercaptoethanol	Aldrich
peq GOLD Trifast	peqlab
Chloroform	Sigma
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth
Isopropanol	Roth
Titriplex	Merck
Natriumchlorid-Lösung 0,9%	B Braun
Silbernitrat	Merck
Glycin	Roth
Natriumcarbonat	J.T.Baker
H ₂ O (DEPC treated)	Sigma
Fetales Kälberserum (FCS, Obl), Fetal Bovine Serum (FBS) (Hyclone, RYL35914)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Fetales Kälberserum (FCS, Ocl), FBS (Gibco, 41G8512K)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US

2.1.4. Kits und Assays

DNA-Aufreinigung	Phire Animal Tissue Direct PCR kit	Thermo Scientific
Crosslaps	RatLapsEIA	Immunodiagnostic Systems Ltd (IDS Ltd)
OPG	Quantikine ELISA	R&D Systems Ltd.
RANKL	Quantikine ELISA, Mouse TRANCE/RANKL/TNFSF 11	R&D Systems Ltd.
SOST	Quantikine ELISA	R&D Systems Ltd.
Creatinine	MicroVue Creatinine Assay Kit	Quidel Co. San Diego (CA)
Phosphat	Phosphorus Liqui-UV	Stanbio Laboratory, Boerne Texas (USA)

2.1.4.1. TaqMan® Gene Expression Assay

TaqMan® Gene Expression Master Mix #4369016

TaqMan® Sonden

Acp5 – Mm00475698_m1

Alpl – Mm00475834_m1

Arsb – Mm00802167_m1

Bglap – Mm03413826_mH

Col1a1 – Mm00801666_g1

Cyp27b1 – Mm0116518_g1

Dmp1 – Mm01208363_m1

FGF23 – Mm01183126_m1

Ibsp – Mm00492555_m1

IL-6 – Mm00446190_m1

Phex – Mm00448119_m1

Slc34a1 – Mm00441450_m1

Sost – Mm00470479_m1

Tnfsf11 (Rank-L) – Mm00441906_m1

Tnfrsf11b (OPG) Mm01205928_m1

2.1.5. Puffer und Lösungen

Ascorbat-Stammlösung	10 mg/ml	L-Ascorbinsäure ad H ₂ O
MCSF-Stammlösung	10 µg/ml	M-CSF ad H ₂ O
RANKL-Stammlösung	10 µg/ml	msRANKL ad H ₂ O
Vitamin-D ₃ -Stammlösung	10 µM	Vitamin-D ₃ ad EtOH
β-Glycerophosphat-Stammlösung	2 M	β-Glycerophosphat ad H ₂ O
TAE-Puffer (50x)	2 M 50 mM	Tris/HCl EDTA ad H ₂ O pH 7,8
PBS-Puffer	10 mM 137 mM 2,7 mM 2mM	Dinatriumhydrogenphosphat NaCl KCl Kaliumhydrogenphosphat ad H ₂ O pH 7,4
DEPC-H ₂ O	0,2 % (v/v)	DEPC ad H ₂ O
Immunfluoreszenz-Blockpuffer		10 % FKS ad PBS
Immunfluoreszenz-Permeabilisationspuffer		0,1 % Triton X-100 ad PBS
Acrylat-Gießlösung	0,33 % (w/v) 11 % (v/v)	Benzoylperoxid Nonylphenylpolyethyleneglykolacetat ad Methylmethacrylat (entstabilisiert)
Acrylat-Infiltrationslösung I	0,33 % (w/v)	Benzoylperoxid ad Methylmethacrylat (entstabilisiert)
Acrylat-Infiltrationslösung II	0,33 % (w/v) 11 % (v/v)	Benzoylperoxid Nonylphenyl-polyethyleneglykol- acetat ad Methylmethacrylat (entstabilisiert)
Alizarinrot-Färbelösung	40 mM	Alizarinrot S ad H ₂ O pH 4,2
Chromalaun-Gelatine	10 % (w/v) 4 % (v/v) 60 St/ L	Gelatine Chromalaun-Lösung Thymol-Kristalle ad H ₂ O

Chromalaun-Lösung	4 % (w/v)	Chromalaun ad H ₂ O
Schneidelösung	0,1 % (v/v)	Polysorbat 20 ad H ₂ O
Sodaformollösung	473 mM 24,8 % (v/v)	Natriumcarbonat 37 % Formaldehydlösung ad H ₂ O
Strecklösung	80 % (v/v) 1 Tropfen/L	Isopropanol Monoglykol-Butylether ad H ₂ O
Toluidin-Färbelösung	32,7 mM	Toluidinblau O ad H ₂ O pH 4,5
Van Gieson-Färbelösung	4,27 mM 10 % (v/v) 0,5 % (v/v)	Säurefuchsin Glycerin 65 % Salpetersäure ad gesättigte Pikrinsäure
Von Kossa-Färbelösung	194 mM	Silbernitrat ad H ₂ O

2.1.6. Zellkulturmedien

Minimal Essential Medium (MEM)	32,5 g/L 2,2 g/L	α-MEM Natriumhydrogencarbonat ad H ₂ O pH 7,4
Osteoblastenmedium	10% (v/v) 100 U/ml	FCS (Obl) Penicillin/Streptomycin ad MEM
Differenzierungsmedium (Obl)	50 µg/ml 10mM	Ascorbinsäure β-Glycerophosphat ad Osteoblastenmedium
Osteoklastenmedium	10% (v/v) 100 U/ml	FCS (Ocl) Penicillin/Streptomycin ad MEM
Differenzierungsmedium (Ocl)	10 nM 20 ng/ml 40 ng/ml	Vitamin D ₃ MCSF msRANKL ad Osteoklastenmedium
Verdaumedium	1mg/ml 2 mg/ml	Collagenase Dispase II ad MEM

2.1.7. Antikörper

Lamp1 1D4B, Hybridoma

Alexa Fluor donkey anti rat 488, life Technologies

2.1.8. Primersequenzen

2.1.8.1. Genotypisierung

Arsb WT for

5'-GCT ATA TCA CGG GCA CTA ATC C3'

Arsb WT rev

5'-GCA TAG CCT GCT TCC TTT AAA AG-3'

Für die PCR wurde aus der Stocksolution des Primers (200 pmol/ μ l) eine 1:100-Verdünnung, für die anschließende Sequenzierung eine 1:10-Verdünnung erstellt und anschließend verwendet.

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Genotypisierung der Mäuse

2.2.1.1.1. Isolierung von genomischer DNA aus Schwanzbiopsien

Für die DNA-Extraktion mit dem Phire Animal Tissue Direct PCR kit (Thermo Scientific) wurde die Schwanzbiopsie mit 20 µl des Dilution Buffer, der 0,5 µl DNA release Additive enthielt, für 5 min bei Raumtemperatur und anschließend 2 min bei 98 °C im Thermomixer inkubiert. Danach wurden die Proben für 10 s herunterzentrifugiert.

2.2.1.1.2. PCR

Um die gewonnene DNA zu amplifizieren, wurde eine PCR durchgeführt. Hierzu wurden zu je 1 µl DNA pro Reaktionsansatz 49 µl eines Mastermixes hinzupipettiert, der je Probe folgende Substanzen enthielt: 30,75 µl H₂O, 5 µl DreamTaq Green Buffer, je 5 µl Primer Arsb WT for/ Arsb WT rev (1:100 Verdünnung), 1,25 µl dNTP, 1,25 µl DMSO und 0,75 µl DreamTaq DNA-Polymerase. Der Reaktionsansatz wurde dann in den Thermocycler gestellt und die PCR nach folgendem Programm durchgeführt:

95°C 5 min
95°C 30 s
60°C 30 s
72 °C 35 s
72°C 10 min
4 °C ∞

} 40x

2.2.1.1.3. Agarosegelelektrophorese

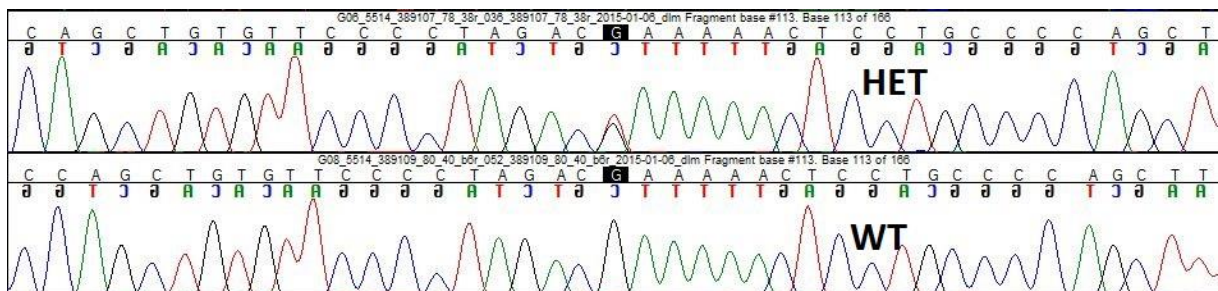
Das PCR-Produkt der Schwanzbiopsien-DNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierzu wurde ein 1-1,5%iges Agarosegel (1x TAE Puffer) gegossen, das 5 µl Ethidiumbromid zur DNA Visualisierung enthielt, und in eine Elektrophoreskammer mit 1x TAE-Laufpuffer gelegt. Zusätzlich zu den Proben wurden in eine Tasche 5 µl von einer 1kB DNA-Leiter (Gene Ruler 1 kB DNA Ladder Plus) gegeben. Danach wurde für 30 min eine Spannung

von 80-100V angelegt. Die Bandenhöhe für Arsb war sowohl bei Wildtypen (WT), Heterozygoten (Het) und Mutanten (KO) bei 151 bp.

2.2.1.1.3.1. Sequenzierung

Für die Sequenzierung der Arsb-Mäuse wurden die Banden des PCR-Produktes unter UV-Licht aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und die DNA mittels NucleoSpin PCR and Gel Clean Up-Kit nach Herstellerprotokoll aufgereinigt und in 15 µl Elution buffer gelöst. Anschließend wurde die Konzentration der DNA mittels NanoDrop bestimmt und pro 15 µl Sequenzierungsansatz 45 ng DNA verwendet. Zu der DNA wurden 1µl 70mM Tris-HCl, 1,5 µl Primer (Arsb WT for, 1:10) und ad 15 µl H₂O pipettiert. Die Sequenzierung wurde durch die SEQLAB Sequence Laboratories Göttingen GmbH durchgeführt und nach folgender Sequenz (ca. 60-80 bp) ausgewertet:

...CCCCTAGAC -G (WT)- AAAAA....
 -T (KO) -



Sequenzdarstellung 1 - Quelle: The Jackson Laboratory (Website)

2.2.1.2. RNA-Isolation

Aus Zellkulturen

Zur Präparation wurde das NucleoSpin RNA/Protein kit von MACHERY-NAGEL benutzt.

Im ersten Schritt wurde zu der zu analysierenden Zellkultur je Well 350 µl eines Mastermixes aus 350 µl Buffer RP1 (kit) und 3,5 µl β-Mercaptoethanol gegeben. Danach wurden die Zellen ca. 10s je Well mit einem Zellkratzer bearbeitet, um die Zellen zu lösen. Im Anschluss wurde weiter nach Protokoll des Herstellers verfahren, und das entstandene Lysat filtriert. Der Schritt zum Verdau von DNA wurde ausgelassen und die aufgereinigte RNA in 23 µl RNase freiem Wasser gelöst.

Aus Gewebe

Um RNA aus Gewebe zu isolieren, wurde die Trizol-Chloroform-Extraktion angewendet. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Proben permanent auf Eis gekühlt.

Das zuvor bei -80°C gelagerte Gewebe wurde mit 1 ml Trizol versetzt und mittels Ultra Turrax homogenisiert und in ein Eppendorf Tube, in das 300 µl Chloroform vorgelegt wurden, überführt. Danach wurde es gut geschüttelt und im Anschluss bei 13.000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Die obere, RNA-haltige, der durch die Zentrifugation entstehenden 3 Phasen wurde in ein neues Tube pipettiert und dem Volumen entsprechend Isopropanol dazugegeben. Nach erneutem Schütteln folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt unter den gleichen Bedingungen wie zuvor. Nach Dekantieren des Isopropanols wurde 1 ml 70%igen Ethanol in DEPC-Wasser hinzugefügt und erneut zentrifugiert. Dieser wurde wiederum dekantiert und das Pellet, um sich zu festigen für 2 Minuten „trocken“ zentrifugiert. Die verbleibende Flüssigkeit wurde abpipettiert und das Pellet, bis es leicht glasig aussah, trocken gelassen, bevor es in DEPC-Wasser gelöst wurde.

Anschließend wurde die RNA-Konzentration mittels NanoDrop bestimmt.

Bis zur ihrer Verwendung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

2.2.1.3. Reverse Transkription und quantitative Realtime-PCR

Vor Durchführung der qRT-PCR wurde zunächst die RNA der Probe in cDNA umgeschrieben. Dies erfolgte mit dem „Verso cDNA Synthesis kit“ von Thermo Scientific. Verwendet wurden 1µg RNA und Oligo-dT als Primer. Im Anschluss folgte eine 1:5 Verdünnung.

Die qRT PCR wurde mit TaqMan-Sonden durchgeführt. GAPDH wurde als House-keeping-Gen referenziell zugrunde gelegt. Entsprechend der Gene von Interesse wurden die cDNA-Proben und der entsprechende Mastermix in eine 96-well-Platte pipettiert und die qRT-PCR mit dem StepOnePlus™ Real Time PCR Systems von Applied Biosystems® durchgeführt.

2.2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.2.1. Generierung primärer Osteoblasten

Zur Gewinnung von primären Osteoblasten wurden Schädeldächer 3-5 Tage alter Mausneugeborener herauspräpariert und in 1x PBS gewaschen. Diesem Schritt folgte ein zweifacher Verdau mit 0,1% Collagenase/0,2% Dispase-α-MEM-Lösung. Der erste Verdau

erfolgte für 15 min bei 37°C und 225 rpm in einem Schüttelinkubator; der Überstand wurde danach verworfen. Der zweite Verdau erfolgte für 45 min. Der Überstand aus dieser Inkubation wurde durch ein 70 µm Zellsieb filtriert und dann bei 1300 rpm 6 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das bei der Zentrifugation entstandene Zellpellet in Osteoblastenkomplettmedium resuspendiert. Nach Auszählen der Zellen in einer Thoma Kammer wurden diese mit 50000 Zellen/ml auf 12 Well-Kulturschalen ausplattiert. In den Schalen mit Coverslips wurden die Zellen 1: 10 bzw. 1:50 verdünnt. Nach 2-3 Tagen wurde das Medium abgesaugt und durch neues Komplettmedium ersetzt. Bei einer ca. 80 %igen Konfluenz wurde durch die Zugabe von 50 µg/ml Ascorbat und 10 mM β-Glycerophosphat zum Komplettmedium die Differenzierung der Osteoblasten induziert. Bis zum Zeitpunkt der Analyse wurde das Differenzierungsmedium alle 2, über Wochenenden alle 3 Tage gewechselt.

2.2.2.1.1. Mineralisationsanalyse

Um die Mineralisierung in Osteoblastenkulturen sichtbar zu machen und sie zu vergleichen, wurden diese mit Alizarinrot-Lösung gefärbt. Dabei kommt es zur Ausbildung eines Chelat-Komplexes zwischen dem Calcium der extrazellulären Matrix und dem Farbstoff wodurch die Mineralisationskerne rot erscheinen.

Zuerst erfolgte die Fixation mit eiskaltem 90%igem Ethanol bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen, bevor sie mit 40mM Alizarinrot-Färbelösung für 10 min unter leichtem Schütteln inkubiert wurden. Nach fünf weiteren Waschschritten mit destilliertem Wasser wurden die Zellen mit PBS überschichtet und für die Auswertung fotografiert.

Um die Mineralisierung vergleichen zu können, wurde die Färbung quantifiziert.

Zu diesem Zweck wurden 800 µl einer 10%igen Essigsäure zu den Zellen gegeben und für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Zellrasen mit einem Zellschaber abgekratzt, in ein Eppendorftube überführt und für 5 Minuten bei 85°C inkubiert. Nach einer 2-minütigen Abkühlung auf Eis wurde das Zellgemisch für 10 Minuten bei 13.000rpm zentrifugiert und 400µl des Überstandes mit 140 µl Ammoniumhydroxidlösung sowie 40 µl Essigsäure versetzt. Davon wurden 100µl mit 150 µl 10%iger Ammoniumhydroxidlösung sowie 50 µl 10%iger Essigsäure versetzt. Nach Einstellen des pH-Wertes auf 4,1-4,5 erfolgte die Quantifizierung bei OD 405 nm.

2.2.2.1.2. Lysosomenfärbung (Immunfluoreszenz)

Zur Sichtbarmachung von Lysosomenstrukturen in den primären Osteoblastenkulturen wurden diese 1:10 verdünnt auf Coverslips ausplattiert und mit immunfluoreszierenden Verfahren gefärbt und ausgewertet. Dabei erfolgte im ersten Schritt die Fixierung mit PFA, für die zunächst das Medium abgenommen wurde und die Zellen nach einem zweimaligem Waschvorgang mit PBS für 30 min mit 4%iger PFA/PBS-Lösung überschichtet wurden. Danach wurden sie erneut zweimal mit PBS gewaschen und, wenn erforderlich, zum Lagern bei 4°C mit PBS überschichtet. In einem zweiten Schritt wurden die Zellen mit 0,2%iger Triton X-100 in PBS-Lösung 2x für 5 Minuten permeabilisiert.

Im dritten Schritt wurden die Zellen zunächst 15 Minuten mit 1% BSA in PBS blockiert. Danach wurden 50 µl des PBS/1% BSA- verdünnten 1. Antikörpers auf Parafilm gegeben und die Zellseite des Coverslips auf den Tropfen gelegt. Nach 1 Stunde Inkubation bei Dunkelheit wurden die Coverslips drei Mal à 5 Minuten mit PBS gewaschen und danach mit dem 2. Antikörper wie vorher beschrieben verfahren. Nach dem erneuten Waschschrift wurden die Coverslips mit der Zellseite nach unten auf einen Objektträger überführt, der vorher mit einem Tropfen je Coverslip Dapi-versetzten Eindeckmediums versehen wurde.

Die Bilder wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Sp5 der Firma Leyca (Bereitstellung durch UMIF) begutachtet.

2.2.2.2. Generierung primärer Osteoklasten

Um Osteoklasten in Kultur zu nehmen, wurden Knochenmarkzellen aus langen Röhrenknochen isoliert. Hierzu wurden zunächst die Extremitäten (vor allem Hinterläufe) von mindestens 8 Wochen alten Mäusen präpariert, sowie die einzelnen Knochen von Muskel und Bindegewebe befreit und bis zur weiteren Bearbeitung in Petrischalen auf Eis gelagert. Unter der Sterilwerkbank wurde der Markraum durch das Abtrennen einer Seite (Femur proximal, Tibia distal) eröffnet und die Knochen mit dieser Seite nach unten in ein mit einem gelochten PCR-Tube versehenen Eppendorftube gesteckt. Anschließend wurde das Knochenmark bei 8000 rpm für 16 s herauszentrifugiert. Diese wurden mit Vitamin D haltigem Osteoklastenmedium behandelt. Sobald Vorläuferzellen erkennbar waren (ca. Tag 5) wurde dem Medium zusätzlich RANK-L sowie M-CSF zugesetzt, um diese zu reifen Osteoklasten zu differenzieren.

2.2.2.3. Dentin-Resorption

Zur Überprüfung der Osteoklastenaktivität in vitro wurden Knochenmarkzellen auf Dentin (ca. 8x5x0,8 mm) aus Elefantenstoßzahn ausplattiert. Analog zum Knochen entstehen bei vorhandener Osteoklastentätigkeit Resorptionslakunen.

Die Knochenmarkzellen wurden zu Osteoklasten differenziert und die Dentinplättchen an Tag 11 der Differenzierung ausgewertet.

Hierzu wurden diese mit 2ml Natriumhypochlorid versetzt und vom Zellrasen befreit. Nach einem Waschschrift in destilliertem Wasser wurden diese dreimal in 0,2%ige Toluidinblau-Lösung getaucht und zur Entfernung der überschüssigen Farbe erneut gewaschen und getrocknet.

Die resorbierten, nun blauviolett angefärbten Areale wurden, nachdem die Dentinplättchen fotografiert und gescannt worden waren, mit der Software ImageJ quantifiziert und ausgewertet.

2.2.3. Präparation der Mäuse

Die zu analysierenden Mäuse wurden zunächst mit einem O₂/CO₂-Gemisch narkotisiert, bevor durch Einleitung von reinem CO₂ die Tötung erfolgte. Nach Ermittlung des Gewichts wurde zur Serumgewinnung durch finale Herzpunktion Blut gewonnen und dieses nach ca. 30 Minuten Standzeit im Eppendorftube, um die Koagulation der zellulären Bestandteile zu erreichen, bei 6000 rpm für 6 Minuten zentrifugiert. Das als Überstand auf den Blutzellen befindliche Serum wurde in ein separates Gefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Nach der Punktion wurden alle Organe entfernt und ggf. zur weiteren Analyse ebenfalls in Eppendorftubes überführt und fixiert bzw. ebenfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zusätzlich wurde eine Schwanzbiopsie zur möglichen Überprüfung des Genotyps genommen. Anschließend erfolgte die Entfernung der Haut.

Zur Gewinnung von Knochen-RNA wurde der Femur aus dem Gelenk präpariert und von Muskelgewebe befreit. Nach Eröffnung des Markraums an der distalen und proximalen Seite wurde der Knochen in ein PCR-Tube mit im Boden befindlichen Loch überführt und das Knochenmark bei 8000 rpm für 16 Sekunden herauszentrifugiert. Der „gespülte“ Knochen wurde ebenfalls in flüssigen Stickstoff überführt.

Zuletzt wurden die Skelette auf Korkplatten gestreckt aufgespannt und zunächst für mindestens 24 Stunden in Formafix-Lösung fixiert und dann bis zur weiteren Bearbeitung und Lagerung in 80%igen Ethanol überführt.

Alle schockgefrorenen Gewebe wurden bis zu ihrer weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert.

2.2.4. Radiologische Untersuchungen

2.2.4.1. Kontaktradiographie

Die fixierten Mausskelette wurden auf der Röntgenkassette positioniert und diese im Kontaktröntgenapparat (Faxitron XRay) bei 35 kV 2 Sekunden belichtet. Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte mit einem automatischen Entwickler (Protec).

Die entwickelten Filme wurden gescannt und die Knochenlängen mit der Software ImageJ ausgemessen.

2.2.4.2. μ CT

Zur detaillierten dreidimensionalen Darstellung sowie Auswertung von statischen Knochenparametern erfolgte der Scan im μ CT mit anschließender Analyse.

2.2.5. Histologische und histomorphometrische Methoden

2.2.5.1. Calcein-Labeling

Um die Osteoblastenaktivität in vivo verfolgen zu können, gibt es die Möglichkeit, fluoreszierende Stoffe zu applizieren, die sich an die Knochenoberfläche anlagern. Das Calcein, ein grün fluoreszierender Farbstoff, wird in einem geeigneten Trägermedium gelöst und als steril filtrierte Lösung den Mäusen 9 und 2 Tage vor der Tötung i.p. injiziert. Es ergeben sich sogenannte „Double Label“, die dadurch entstehen, dass sich über der Stelle, an der sich der Farbstoff nach der ersten Injektion angelagert hat, neuer Knochen bildet und sich nach der zweiten Injektion erneut Calcein anlagert.

2.2.5.2. Unentkalkte Knochenhistologie

Für die histologische Auswertung des Knochens wurden aus den fixierten Skeletten die Tibia, der Femur sowie die Lumbalwirbelsäule von den Wirbelkörpern L2-L5 verwendet. Von der Tibia wurde weitestgehend das Muskelgewebe entfernt und der distale Anteil so abgetrennt, dass

der Markraum eröffnet war. Das Femur wurde vorsichtig unter Erhaltung des Kopfes aus der Gelenkpfanne präpariert und ebenfalls das Muskelgewebe entfernt.

Die Wirbelsäule wurde ventral vom Muskel befreit und auf Höhe der Zwischenwirbelscheiben durchtrennt. Danach wurde das Präparat zur Orientierung pyramidenförmig zugeschnitten.

Die so vorbereiteten Knochen wurden in das Acrylatautotechikon überführt und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (4x 80%, 4x96%, 4x100% Ethanol) entwässert. Nach je 24 Stunden in zunächst Infiltrationslösung I und dann II konnten diese in Acrylat eingebettet werden.

Hierzu wurde ein Rollrandglas zu ca. Dreivierteln mit Gießlösung gefüllt und die Knochen in gewünschter Richtung darin positioniert. Zum Ausschluss von Luft wurden diese mit Deckeln versehen und über Nacht im Wasserbad bei 4°C zum Auspolymerisieren des Acrylats gelagert.

Am nächsten Tag wurden die Deckel entfernt, der Rest flüssiger Gießlösung abgegossen und die Blöcke unter dem Abzug über Nacht ausdampfen gelassen.

Nach dem Herausschlagen aus dem Glas wurden die Blöcke der Femora so zugesägt und geschliffen, dass der Querschnitt der Diaphyse sichtbar war und in vertikaler Ausrichtung erneut eingebettet.

Fertige Blöcke wurden an der Schnittseite in schrägem Winkel diamantförmig angeschliffen.

Am Rotationsmikrotom wurden 3-5 µm dicke Schnitte für Färbungen und 12 µm dicke ungefärbte Schnitte für die Auswertung der Calcein-Label erstellt. Nachdem diese auf gelatinebeschichtete Objektträger gezogen und gestreckt worden waren, wurden sie mit einer Folie abgedeckt und zunächst in einem Trockenblock die Strecklösung entfernt, bevor sie, eingespannt in eine Presse, über Nacht in einem 60°C-Wärmeschrank zur Fixierung gelagert wurden.

2.2.5.3. Färbungen

2.2.5.3.1. Alcianblau/Alizarinrot-Färbung von Skeletten

Für die Alcianblau-Alizarinrot-Färbung wurden nach Tötung der Mäuse Haut und innere Organe so weit wie möglich entfernt. Nach Fixierung der Skelette in 100% Aceton als Fixierlösung für 2 Tage, wurde dieses durch 0,015%ige Alcianblau-Lösung ersetzt und für 3 Tage gefärbt, um nicht mineralisiertes Knorpelgewebe sichtbar zu machen. Nach einem dreistündigen Waschschrift in 95%igem Ethanol wurden sie anschließend 3 Tage in 2%iger KOH-Lösung inkubiert, um Reste des Weichgewebes weitestgehend aufzulösen. Nach Entfernung der KOH-Lösung wurden die mineralisierten Anteile mit 0,005%iger Alizarinrot-Lösung für 2 Tage angefärbt. Im letzten

Schritt wurden die Skelette in einer Lösung mit 1% KOH und 20% Glycerol 1 Woche inkubiert. Zur Lagerung wurden die Skelette schließlich in ein 1:1 Gemisch aus Glycerol und 95% Ethanol überführt und für die fotografische Auswertung die Reste des Weichgewebes vorsichtig abpräpariert.

2.2.5.3.2. Acrylat

Zunächst wurden die Präparate 3mal für 5 Minuten in Entplaster gestellt, um das Acrylat herauszulösen. Anschließend wurde eine absteigende Alkoholreihe (100%, 96%, 80%, 70%, 50%; je 2 Minuten) durchlaufen und die Objektträger mit Aqua dest. gespült. Danach wurde je nach Färbung unterschiedlich weiterverfahren.

Von Kossa/Van Gieson

Im ersten Schritt wurden die Objektträger für 5 Minuten in 3%iger Silbernitrat-Lösung getaucht und dann für 10 Minuten in destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurden sie für 5 Minuten in Sodaformollösung überführt und 10 Minuten mit Leitungswasser gespült. Nach 5 Minuten in Natriumthiosulfat-Lösung wurden die Objektträger erneut für 10 Minuten mit Leitungswasser gespült und anschließend in einem Gemisch von Säurefuchsin und Pikrinsäure für 20 Minuten gegengefärbt. Als Nächstes wurden die Präparate in Leitungswasser, dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe (80%, 96%, 2x 100%) und 3mal für je 5 Minuten in Xylol entwässert.

Toluidinblau

Die Objektträger wurden für 30 Minuten in 1%iger Toluidinblau-Lösung gefärbt und anschließend in Aqua dest. und 50%igem Ethanol gespült. Nach Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%; 80%; 96%, je 2 Minuten; 100%, 5 Minuten) und Spülen in 100%igem Ethanol, wurden sie zur Restentwässerung dreimal für 5 Minuten in Xylol getaucht.

Alle Schnitte wurden nach dem Färben mit DXP und Deckgläsern eingedeckt.

2.2.5.4. Histomorphometrie

Um den Knochenphänotypen der Mäuse quantitativ zu erfassen, wurde Histomorphometrie mit dem OsteoMeasure-System bzw. Bioquant-Systems durchgeführt. Hierzu wurden für die

statische von Kossa/van Gieson gefärbte histologische Schnitte in 1,25facher Vergrößerung, für die zelluläre Toluidinblau gefärbte Schnitte in 20facher und für die dynamische Histomorphometrie 12 µm Schnitte, von Calcein-gelabelten Mäusen, in 10facher Vergrößerung ausgewertet. Die 12 µm Schnitte wurden unter fluoreszierendem Licht gemessen.

2.2.6. Sonstige Methoden

2.2.6.1. Tierhaltung

Die verwendeten Tiere wurden vom Jackson Laboratory (Stock No: 005598, Curtain MM; Donahue LR. 2009. A mutation in the Arsb gene; a mouse model that resembles Maroteaux_Lamy syndrome MGI Direct Data Submission) bezogen und in den Räumlichkeiten der Zentralen Forschungstierhaltung gezüchtet und bei einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Wasser und Nahrung standen ad libitum zur Verfügung. Die Organentnahmen wurden von der Tierschutzkommission des UKE und der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt (Org529).

2.2.6.2. Enzyersatztherapie

Die Enzyersatztherapie erfolgte einmal wöchentlich durch Injektion von rekombinanter Arylsulfatase B (Naglazyme®, Biomarin) in die Schwanzvene durch die Tierpfleger der FTH. Das Enzym wurde in der Dosierung von 1 Mikrogramm Enzym pro Gramm Körpergewicht ab der 12. Lebenswoche für 12 Wochen appliziert. Als Trägermedium diente sterile 0,9%ige NaCl-Lösung.

2.2.6.3. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde der *Student's t-test* verwendet. Ergebnisse mit einem p-Wert kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant angenommen und entsprechend in den Abbildungen mit einem * versehen.

3. Ergebnisse

3.1. Entwicklung und Wachstum des Skeletts Arsb-defizienter Mäuse

Mucopolysaccharidose Typ VI ist eine Erkrankung, die sich bereits im Kindesalter manifestiert und sich unter anderem durch Kleinwüchsigkeit und vergrößerte Gesichtszüge präsentiert. Zunächst sollte daher untersucht werden, ob beim Skelett von Arsb-defizienten Tieren eine normale Entwicklung sowie normales Wachstum stattfindet.

Hierzu wurden Arsb-defiziente und Wildtyp-Mäuse im Alter von vier Wochen präpariert und das Skelett mit Alcianblau/Alizarinrot angefärbt (Abb. 1A). Dabei zeigte sich neben einer geringeren Gesamtlänge eine allgemeine Verkürzung bzw. Verkleinerung der Knochen Arsb-defizienter Mäuse. Zudem fiel auf, dass sich die Bereiche, die die Wachstumsfugen beinhalteten, bei den Mäusen mit Arsb-Defekt stärker anfärbten als bei den Wildtypen.

Um festzustellen, ob sich diese Größenunterschiede mit fortschreitendem Alter und Wachstum der Mäuse weiter ausprägen, wurden die Skelette von 12 Wochen alten Wildtyp und Arsb-defizienten Tieren radiologisch vermessen (Abb. 1B). In diesem Alter lag eine signifikante Verkürzung aller vermessenen Knochen vor.

Da schon die Färbung der vier Wochen alten Skelette Hinweise auf eine Störung der Wachstumsfuge gab, wurde diese in unentkalkten histologischen Schnitten der Tibia bei den 12 Wochen alten Tieren weiter untersucht (Abb. 1C). Die Wachstumsfuge zeigte in den Arsb-defizienten Tieren eine gestörte Architektur. Sonst in einer gleichmäßig starken Linie verlaufend, war diese durch Ausziehungen von Trabekelwerk teilweise unterbrochen oder durch Knorpel untypisch verbreitert. Zudem zeigte sich eine abnormale Anordnung der Chondrozyten innerhalb der Wachstumsfuge; die sonst übliche Säulenformation wirkte aufgebrochen. Die Morphologie der Chondrozyten war verändert, der Zellkörper stark vakuolisiert und der umgebende Knorpelhof vergrößert. In der Quantifizierung zeigte sich eine signifikante Verbreiterung der Wachstumsfuge in Arsb-defizienten Tieren (Abb. 1D).

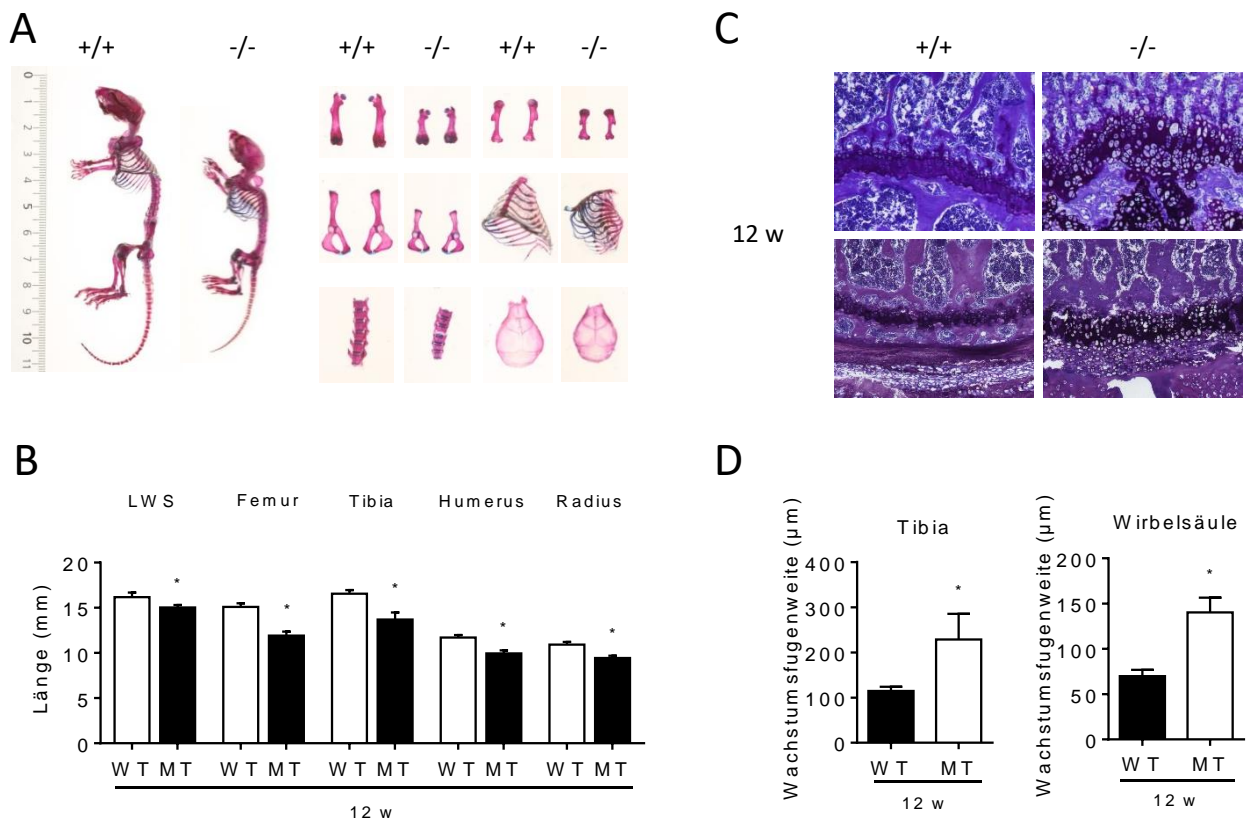


Abbildung 1 – Entwicklung und Wachstum des Skeletts Arsb-defizienter Mäuse

A Alizarinrot/Alcianblau-gefärbte Skelette 4 Wochen alter Wildtyp- und Arsb-defizienter Mäuse, n=1 (v.l.n.r v.o.n.u.: ganze Maus, Femur, Humerus, Becken, Brustkorb, Lendenwirbelsäule, Schädeldach)

B Radiologische Vermessung von Lendenwirbelsäule und langen Röhrenknochen (Kontaktröntgen), 12 Wochen alte Wildtyp- und Arsb-defiziente Mäuse, n=5 und 4, p=0,005 (LWS), p=0,00001 (Femur), p=0,0002 (Tibia), p=0,00006 (Humerus), p=0,0001 (Radius) **C** Histologische Schnitte der Wachstumsfuge der Tibia und Wirbelsäule (Lendenwirbelsäule), Toluidinblau, 10x Vergr., 12 Wochen alte Wildtyp- und Arsb-defiziente Mäuse, n=5 **D** Quantifizierung der Wachstumsfugenweite an Tibia und Wirbelsäule (LWS), 12 Wochen alte Wildtyp- und Arsb-defiziente Mäuse, n=5, p=0,002 (Tibia), p=0,00002 (LWS)

Die Vermessung der Schädel in der µ-Computertomographie zeigte eine signifikant verringerte Schädelgröße und vergrößerte Schädelbreite bei der Gruppe der 12 Wochen alten Arsb-defizienten Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen. Weder Nasenlänge noch Nasenbreite waren signifikant verändert (Abb. 2).

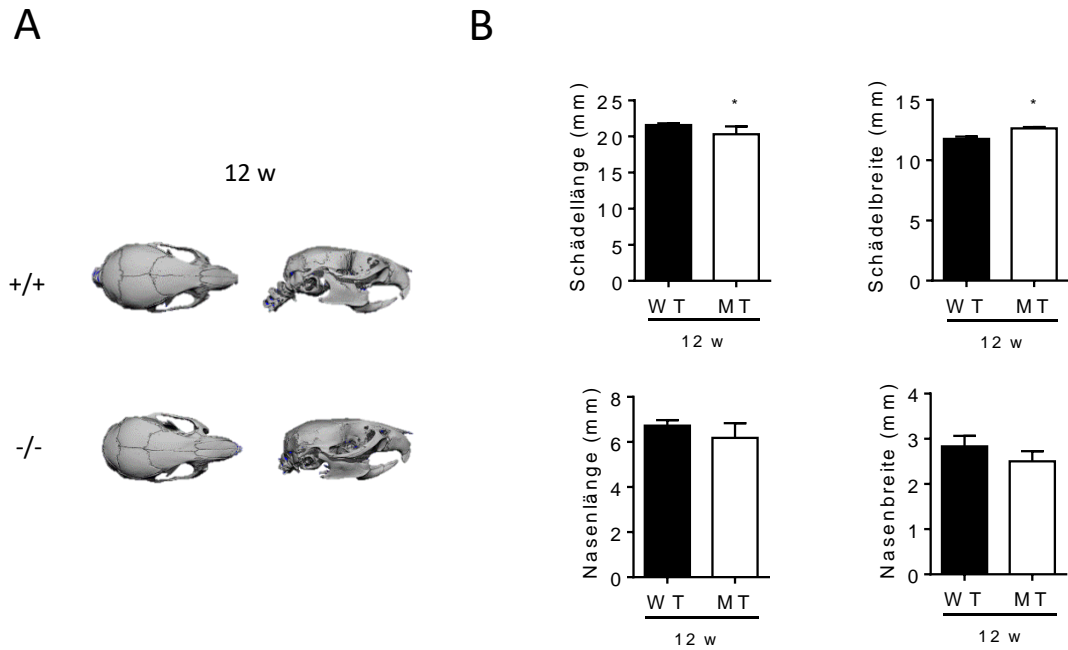


Abbildung 2 – μ CT-Untersuchung des Schädels 12 Wochen alter Wildtyp- und Arsb-defizienter Mäuse

A Repräsentative Ansicht des Schädels von cranial (oben), sowie lateral (unten) **B** Quantitative Auswertung der Schädelmaße, $n=5$, $p=0,04$ (Schädellänge), $p=0,00002$ (Schädelbreite), $p=0,1$ (Nasenlänge), $p=0,05$ (Nasenbreite)

3.2. Erfassung der strukturellen Morphologie durch radiologische und histologische Analyse

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Arsb-Defizienz auch einen Einfluss auf die Architektur des Knochens hat. Hierzu wurden zunächst zur basalen Analyse μ -CT-Aufnahmen der 12 Wochen alten Wildtyp- und Arsb-defizienten Mäuse erstellt und die statischen Knochenparameter ermittelt. Hier zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Knochenvolumens, das sowohl durch eine größere Dicke, als auch durch eine vermehrte Anzahl der Trabekel und somit verringertem Abstand bedingt war (Abb.3).

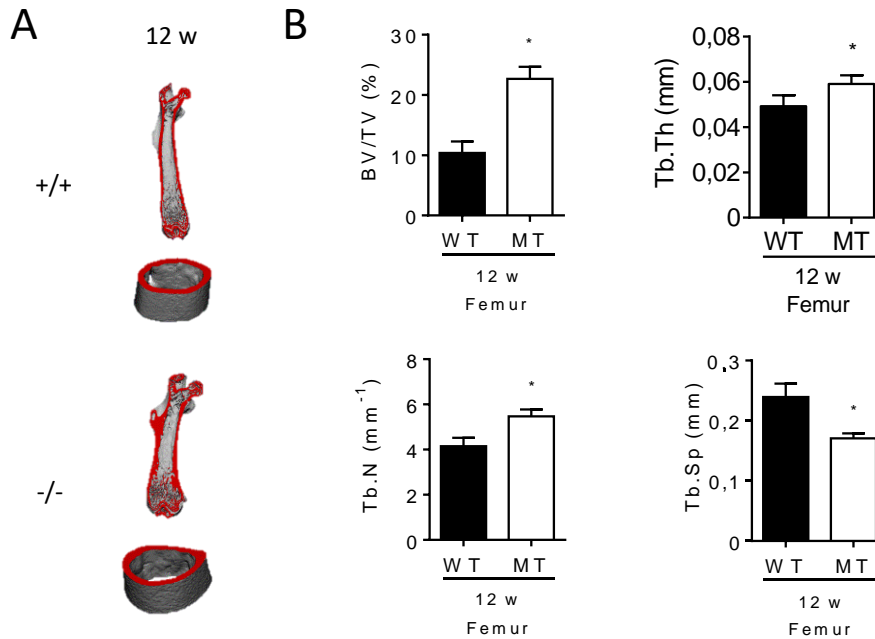


Abbildung 3 – Strukturelle Analyse der Femora 12 Wochen alter Wildtyp- und Arsb-defizienter Mäuse mit μ CT

A Repräsentative Ansicht der Femora, oben: medialer Schnitt in der Frontalebene, unten: craniale Ansicht des Kortikalisringes auf Höhe der Diaphyse **B** Auswertung der statischen Knochenparameter, $n=5$, $p=0,00001$ (BV/TV), $p=0,07$ (Tb.Th), $p=0,0003$ (Tb.N), $p=0,0002$ (Tb.Sp), Abk.: Bone Volume/Tissue Volume (BV/TV), Trabecular Thickness (Tb.Th), Trabecular Number (Tb.N), Trabecular Separation (Tb.Sp)

In der histomorphometrischen Analyse der statischen Knochenparameter in der Tibia (Abb.4), einem weiteren Röhrenknochen, sowie der Lumbalwirbelsäule (LWS, Abb.5) konnten die Ergebnisse der μ CT-Untersuchung weitestgehend bestätigt werden.

Lediglich die Trabekeldicke in der Tibia sowie der LWS der 12 Wochen alten Arsb-defizienten Tiere war nicht signifikant verändert.

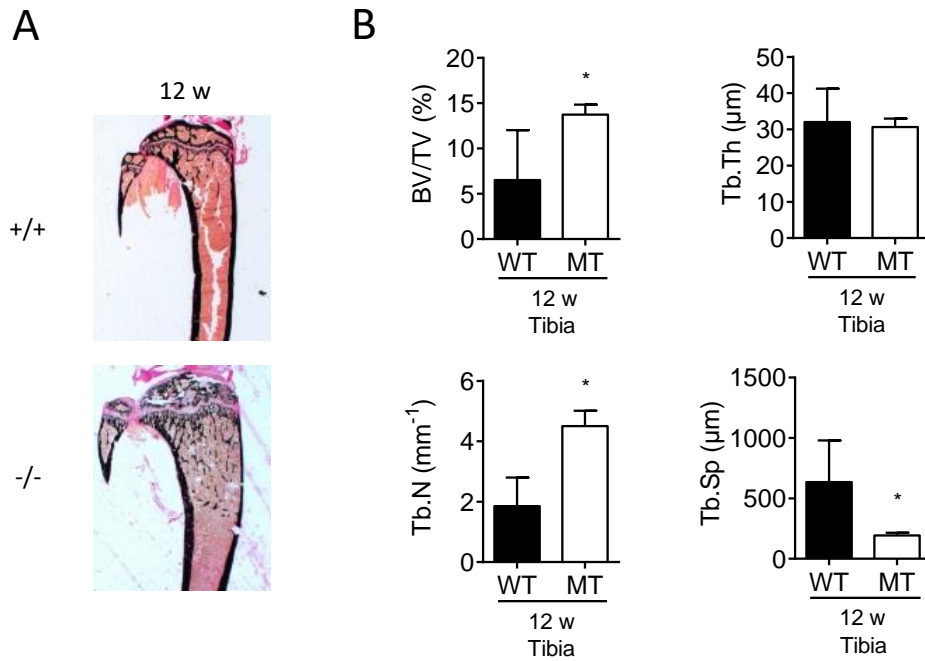


Abbildung 4 – Analyse der statischen Knochenparameter in der Tibia 12 Wochen alter Wildtyp- und Arsb-defizienter Mäuse

A Repräsentative histologische Schnitte der Tibia, Von Kossa/van Gieson-Färbung, 1,25x Vergr.
B Auswertung der statischen Histomorphometrie, n=5, p=0,04 (BV/TV), p=0,8 (Tb.Th), p=0,002 (Tb.N), p=0,04 (Tb.Sp), Abk. s. Abb.3

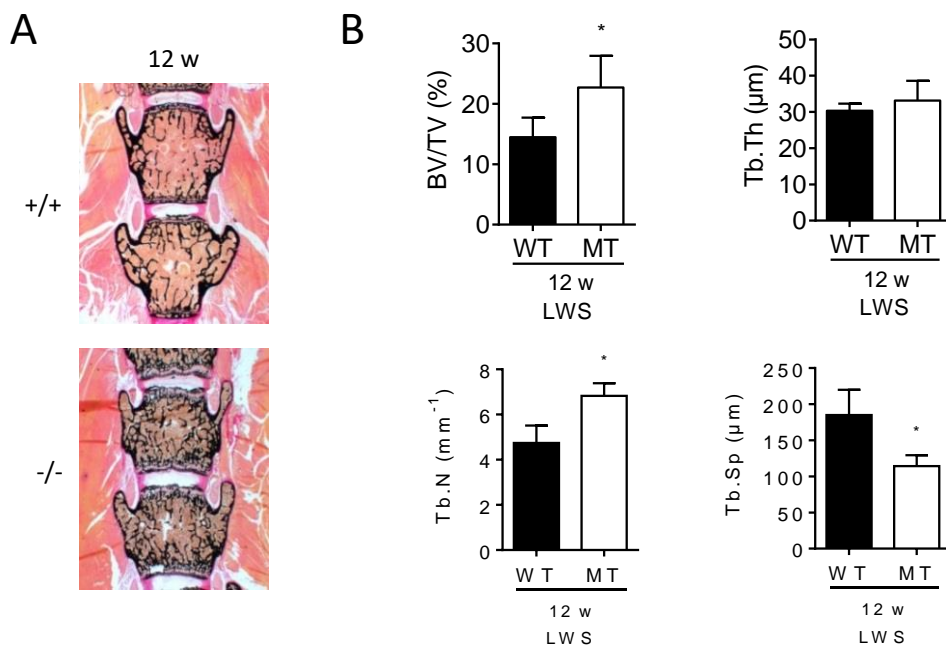


Abbildung 5 – Analyse der statischen Knochenparameter in der Wirbelsäule 12 Wochen alter Wildtyp- und Arsb-defizienter Mäuse

A Repräsentative histologische Schnitte der LWS, Von Kossa/van Gieson-Färbung, 1,25x Vergr.
B Auswertung der statischen Histomorphometrie, n=5, p=0,02 (BV/TV), p=0,3 (Tb.Th), p=0,003 (Tb.N), p=0,007 (Tb.Sp) Abk. s. Abb.3

3.3. Einfluss der Arsb-Defizienz auf die verschiedenen Knochenzellen in vitro und in vivo

Um zu klären, welche Zellen maßgeblich am erhöhten Knochenvolumen beteiligt sind und über welchen möglichen Mechanismus dies vermittelt wird, wurden verschiedene Experimente in vitro und in vivo durchgeführt.

Um einen ersten Anhaltspunkt dafür zu erhalten wurde eine Genexpressionsanalyse anhand der beiden wichtigsten Zelltypen mittels qRT-PCR durchgeführt. Hierzu wurde die Expression von Arsb, sowie je eines Differenzierungsmarkers für Osteoblasten (Bglap) und Osteoklasten (Acp5) als Kontrolle, in einer Wildtyp- Osteoblasten- (d0-d25) sowie Osteoklastendifferenzierungsreihe (d0-d10) überprüft (Abb.6). Es zeigte sich, dass keine Veränderung in der Arsb-Expression im Verlauf der Differenzierung von Osteoblasten, wohl aber von Osteoklasten stattfindet, bei der ein Anstieg der relativen Expression beobachtet werden konnte.

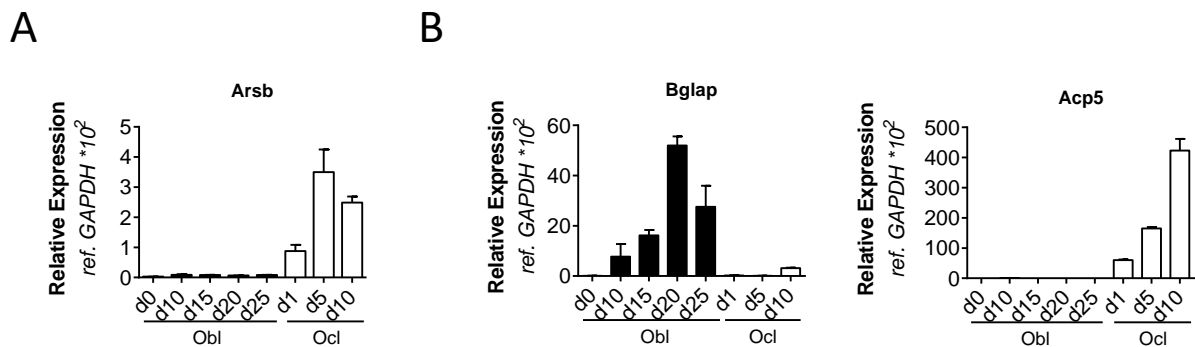


Abbildung 6 – qRT-PCR: Analyse der Arsb-Genexpression in Wildtyp-Osteoblasten und Osteoklasten

A Auswertung der Arsb-Genexpression in Osteoblasten (Obl)- (d0-25) und Osteoklasten(Ocl)-differenzierungsreihen (d 1-10), C57BL6-Wildtyp, GAPDH-normiert, n=3 **B** Überprüfung typischer Osteoblasten- (Bglap) bzw. Osteoklastenmarker (Acp5), n=3

3.3.1. Osteoblasten und Osteozyten

Trotz der durchgängig niedrigen Expression von Arsb während der Osteoblastendifferenzierung, wurde der Einfluss der Arsb-Defizienz auf Osteoblasten in vivo untersucht. Ausgangspunkt dafür war die auffällige Morphologie der Osteoblasten und Osteozyten in der unentkalkten Knochenhistologie. Die Zellen zeigten, wie auch die Chondrozyten, eine ausgedehnte Vakuolisierung, die auf eine massive Ansammlung von Speichermaterial hindeutete (Abb. 7A).

In der zellulären histomorphometrischen Auswertung zeigte sich eine signifikant verringerte Anzahl an Osteoblasten bei der Gruppe der 12 Wochen alten Arsb-defizienten Tiere. Die Analyse des Osteoidvolumens ergab eine signifikante Erniedrigung. Die von Osteoblasten bedeckte Knochenoberfläche war nicht signifikant verändert.

Da die Speicherung in den Osteozyten besonders ausgeprägt war, sodass die Osteozytenlakunen teils leer erschienen („empty lacunae“) wurden diese sowie die leeren Osteozytenlakunen gesondert quantifiziert. Die Anzahl an leeren Osteozytenlakunen war signifikant erhöht, wohingegen die Osteozytenanzahl keinen signifikanten Unterschied aufwies (Abb. 7B).

Die Aktivität der Osteoblasten in vivo, die durch dynamische Histomorphometrie an 12µm-dicken Schnitten von Calcein-markierten Knochen untersucht wurde, zeigte bei den 12 Wochen alten Tieren keinen signifikanten Unterschied in der Knochenformationsrate (Abb. 7C).

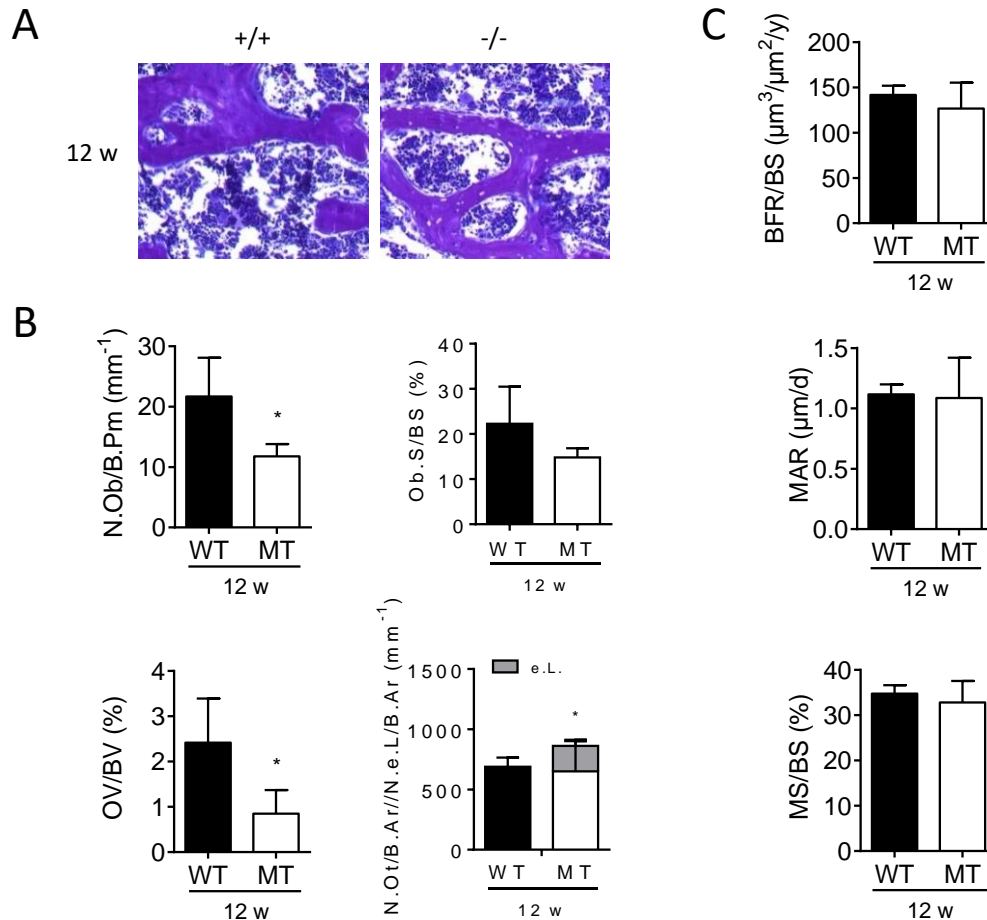


Abbildung 7 – Zelluläre Analyse in Wirbelkörpern 12 Wochen alter Wildtyp und Arsb-defizienter Mäuse: Osteoblasten und Osteozyten

A Repräsentative Trabekelansicht in histologischen Schnitten der WS, Toluidinblau, 20x Vergr.

B Quantifizierung der zellulären Parameter im Trabekelwerk, n=5, p=0,02 (N.Ob/B.Pm), p=0,1 (Ob.S), p=0,02 (OV/BV), p=0,8 (N.Ot/B.Ar), p=0,00006 (N.e.L/B.Ar), Abk.: Number of Osteoblasts/Boneperimeter (N.Ob/B.Pm), Osteoblast Surface/Bone Surface (Ob.S/BS), Osteoid Volume/Bone Volume (OV/BV), Number of Osteocytes/Bone Area (N.Ot/B.Ar)/Number of Empty Lacunae/Bone Area (N.e.L/B.Ar) **C** Auswertung der dynamischen Histomorphometrie, n=5 und 4, p=0,3 (BFR/BS), p=0,4 (MAR), p=0,9 (MS/BS), Bone Formation Rate (BFR/BS), Mineral Apposition Rate (MAR), Mineralizing Surface/Bone Surface (MS/BS)

Zur weiteren Untersuchung des Effektes der Arsb-Defizienz auf Osteoblasten wurden primäre Osteoblasten aus Schädeldächern generiert und bis Tag 20 in Kultur genommen und differenziert. Da der größte Zelldefekt im terminalen Differenzierungsstadium der Osteoblasten, den Osteozyten, nachweisbar war, wurde der relativ späte Analysezeitpunkt an Tag 20 gewählt. Es erfolgten eine Mineralisationsanalyse mittels Alizarinrotfärbung inklusive Quantifizierung und eine Genexpressionsanalyse von Osteoblasten- und Osteozyten-Markern mittels qRT-PCR. Ersteres zeigte eine signifikant verringerte Mineralisierungsfähigkeit der Kulturen mit Arsb-Defizienz (Abb. 8A). Die Expression von Fgf23 sowie OPG war hier signifikant erhöht (Abb. 8B).

Der in vivo Vergleich durch Bestimmung der Serumkonzentration von Osteoprotegerin (OPG) ergab keine signifikante Erhöhung und konnte somit das in vitro Ergebnis nicht bestätigen. (Abb. 8C) Die Bestimmung von RANKL, dem Gegenspieler von OPG, der in Osteoblasten und Osteozyten gebildet wird, ergab eine signifikante Erniedrigung bei den 12 Wochen alten Arsb-defizienten Tieren (Abb. 8D).

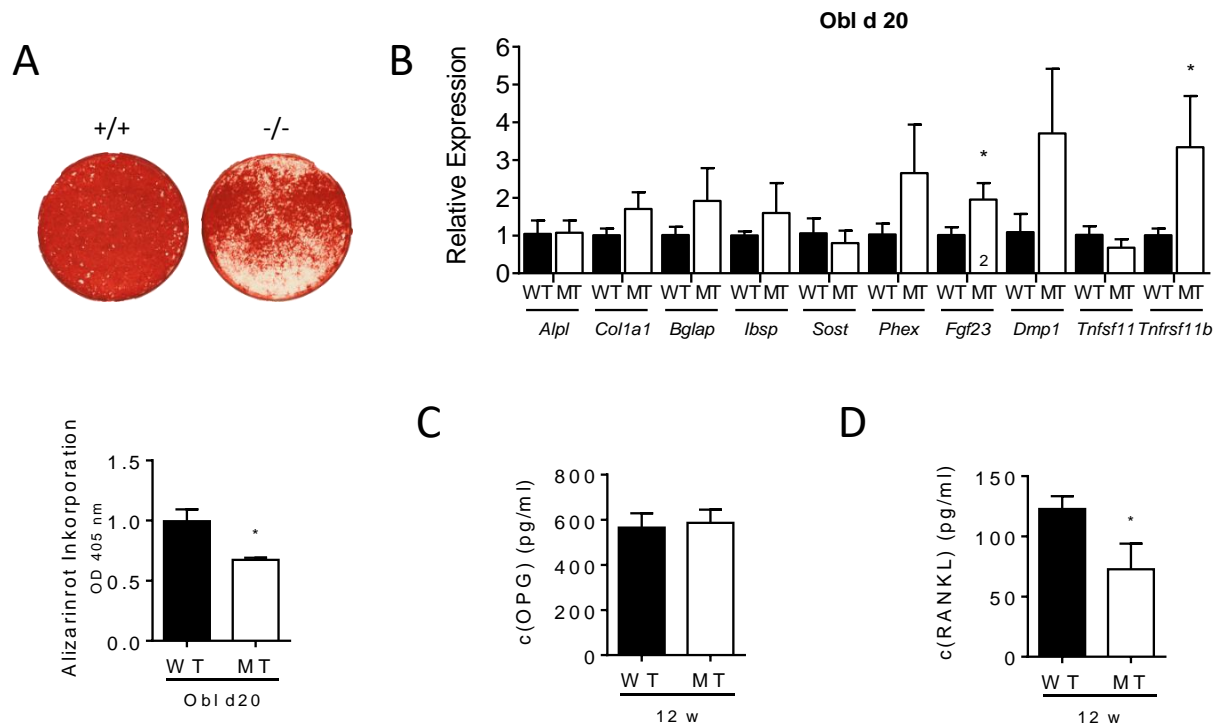


Abbildung 8 – Analyse von Wildtyp- und Arsb-defizienten Osteoblasten

A In vitro-Mineralisationsanalyse Wildtyp- und Arsb-defizienter Osteoblasten zu einem späten Differenzierungszeitpunkt (d20) mittels Alizarinrotfärbung und anschließender photometrischer Quantifizierung, n=4, p= 0,0007 **B** qRT- PCR zur Analyse von typischen Genen für Osteoblasten (Alpl, Col1a1, Bglap, lbsp, Tnfsf11, Tnfrsf11b) und Osteozyten (Sost, Phex, Fgf23, Dmp1, Tnfsf11, Tnfrsf11b), n=3, Alpl: p= 0,9; Col1a1: p=0,06; Bglap: p=0,2; lbsp: p=0,3; Sost: p=0,4; Phex: p=0,1; Fgf23: p=0,04; Dmp1: p=0,06; Tnfsf: p=0,1; Tnfrsf11b: p=0,04 **C, D** Analyse der Serumkonzentrationen von OPG und RANKL, n=5 und 4, OPG: p=0,6; RANKL: p=0,002

3.3.2. Osteoklasten

Die verstärkte Expression von Arsb im Verlauf der Differenzierung von Osteoklasten deutete darauf hin, dass möglicherweise eine gestörte Entwicklung in der Osteoklastenlinie mit resultierender verringerter Resorption am erhöhten Knochenvolumen Arsb-defizienter Mäuse beteiligt ist. Zur Klärung dieser Frage wurden auch die Osteoklasten in vivo und in vitro untersucht.

In der Analyse der zellulären histomorphometrischen Parameter fiel weder eine erhöhte Anzahl von Osteoklasten sowie der Osteoklasten bedeckten Knochenoberfläche bei 12 Wochen alten Tieren auf (Abb. 9A). Um zu überprüfen, ob die Resorption gestört ist, wurden *Crosslaps* im Serum bestimmt. Diese sind als Abbauprodukt von Kollagen Typ I ein Knochenresorptionsmarker. Hierbei konnte bei den 12 Wochen alten *Arsb*-defizienten Mäusen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 9B). Zur weiteren Untersuchung wurden primäre Osteoklastenkulturen aus Knochenmark generiert und differenziert. Die Ausplattierung erfolgte auf Dentin, das als Knochen-ähnliches, resorbierbares Material zur Untersuchung der Resorptionsfähigkeit von Osteoklasten geeignet ist. Die Zellen wurden an den Tagen 7, 8 und 11 gezählt sowie das Dentin an Tag 11 ausgewertet. Die Quantifizierung der Osteoklastenzahl ergab zu keinem Zeitpunkt der Analyse einen signifikanten Unterschied (Abb.9C). Dies traf ebenso für die Quantifizierung der Resorptionslakunen auf den Dentin-Chips zu, bei der jedoch eine schwache Negativ-Tendenz zu sehen war (Abb. 9D).

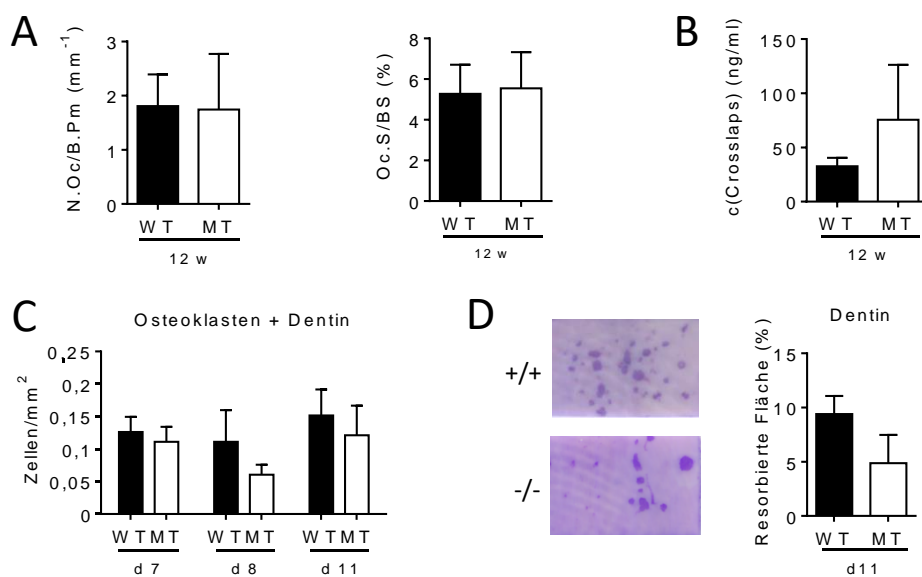


Abbildung 9 – Analyse von Wildtyp- und *Arsb*-defizienten Osteoklasten

A Quantifizierung der zellulären Parameter im Trabekelwerk von 12 Wochen alten Wildtyp- und *Arsb*-defizienten Mäusen, n=5, p=0,9 (N.Oc/B.Pm), p=0,8 (Oc.S/BS) **B** Analyse der Crosslaps-Serumkonzentration, n=4 und 3, p=0,1 **C** In vitro Analyse von Osteoklasten: Analyse der Osteoklastenzahl bei Wildtyp und *Arsb*-defizienten Zellen, n=3, p= 0,5 (d7); p=0,2 (d8); p=0,4 (d11) **D** In vitro-Analyse der Resorptionsfähigkeit von Wildtyp und *Arsb*-defizienten Osteoklasten mittels Dentinchips (mit Toluidinblau angefärbt), n=3, p=0,06

3.3.3. Osteozyten im kortikalen Knochen

Zur weiteren Klärung der Beteiligung von Osteozyten am Arsb-defizienten Phänotyp wurden diese Zellen auch im kortikalen Knochen untersucht.

Die Begutachtung von histologischen Schnitten der Tibia ergab, dass neben der auch im trabekulären Knochen auffälligen Speicherung von Material im Osteozyten und der signifikanten Mehrung von leeren Lakunen (Abb. 10A) Areale existierten, bei denen um die Osteozyten herum ein Saum von nicht mineralisierter Matrix bestand (Abb. 10B).

Die Messung des Serum-Phosphats, dessen Konzentration maßgeblich über die Produktion von FGF23 in Osteozyten reguliert wird, ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied (Abb. 10C).

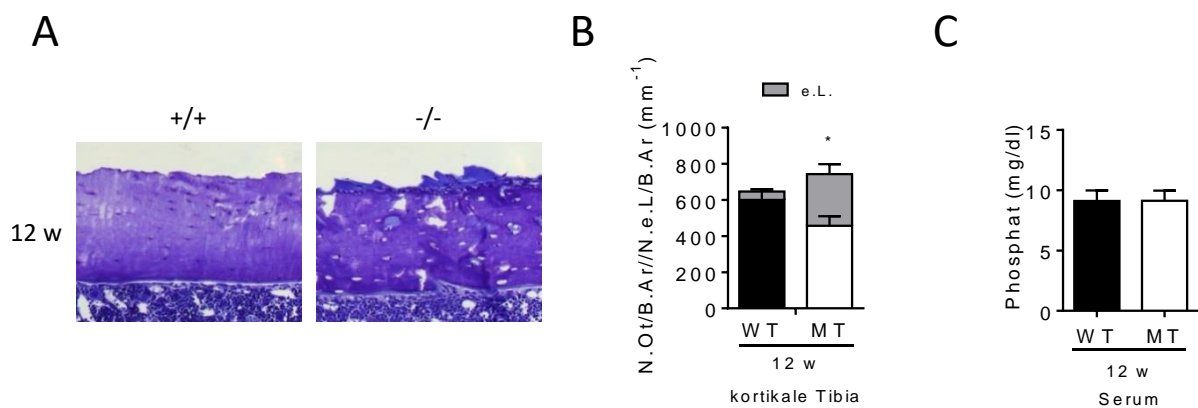


Abbildung 10 – Analyse der Osteozyten bei 12 Wochen alten Wildtyp- und Arsb-defizienten Mäusen, kortikal

A repräsentative Aufnahme der Kortikalis in der Tibia, Toluidinblau, 20x B Quantifizierung der Anzahl von Osteozyten und *empty lacunae* in der kortikalen Tibia, n=5, p=0,006 (N.Ot/B.Ar), p=0,00003 (N.e.L./B.Ar) C Bestimmung der Serumphosphatkonzentration, n=8 und 4, p=1

Um diese Besonderheit weiter zu analysieren wurde die Genexpression typischer Marker von Osteoblasten und Osteozyten im kortikalen Knochen, hier Femur, untersucht. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression bei den 12 Wochen alten Tieren. Die Expression von FGF23 war nicht konstant (Abb. 11A).

Da jedoch aufgrund der Osteozytenmorphologie eine Beeinflussung der FGF23-Synthese nahe lag, wurden zwei FGF23-Zielgene in der Niere ebenfalls überprüft. Hierbei zeigte sich eine signifikant verringerte Expression von Slc34a1, codierend für einen Phosphattransporter, in der Gruppe der 12 Wochen alten Arsb-defizienten Mäuse (Abb. 11B). Dies implizierte ein verstärktes FGF23-Signal, da dies eine negativ-regulatorische Wirkung auf die Expression des

Zielgens hat. Die Analyse des Urins ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Phosphatausscheidung (Abb. 11C).

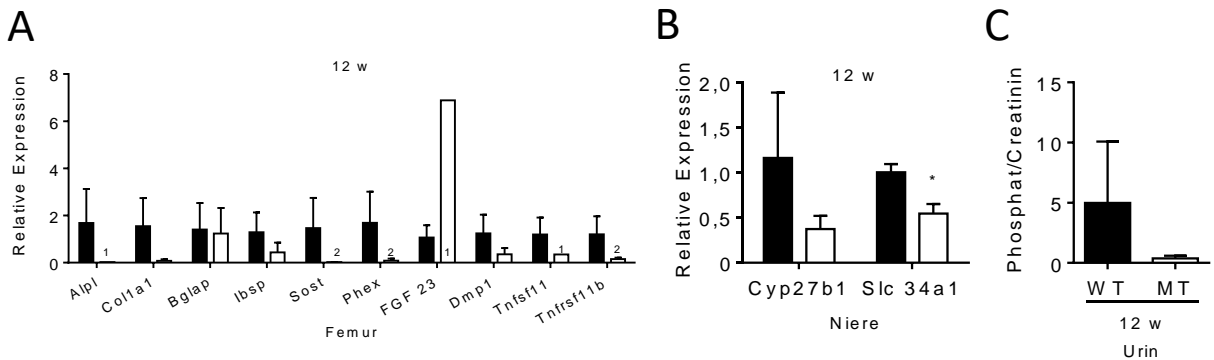


Abbildung 11 – Genexpression in Knochen und Niere von Wildtyp- und Arsb-defizienten Mäusen

A qRT-PCR: Analyse von typischen Genen, die in Osteoblasten und Osteozyten exprimiert werden; GAPDH als *house-keeping gene*, WT normiert, $n=3$, **B** qRT-PCR: Analyse von Fgf23-Zielgenen in der Niere, $n=3$, Cyp27b1: $p=0,1$; Slc34a1: $p=0,005$ **C** Analyse der Phosphatausscheidung im Urin, Creatinin-normiert, $n=3$ und 2 , $p=0,2$

3.4. Der Effekt von Enzymersatztherapie auf den Knochenphänotyp in vitro und in vivo

Zur Überprüfung des Effektes einer EET wurden zunächst Osteoblasten in vitro untersucht, da dieser Zelltyp insbesondere im Osteozyten-Stadium die auffälligste Speichermorphologie in Arsb-defizienten Mäusen aufwies.

Zudem wurden 12 Wochen alte Arsb-defiziente Mäuse für 12 Wochen mit EET behandelt und anschließend im Vergleich zu 24 Wochen alten unbehandelten Wildtyp- und Arsb-defizienten Mäusen analysiert.

3.4.1. Der Einfluss auf die lysosomale Speicherung in Osteoblasten in vitro

Zum Vergleich der lysosomalen Speicherung wurden primäre Osteoblastenkulturen für unterschiedliche Zeiträume mit Enzym behandelt und an Tag 17 der Differenzierung analysiert. Hierzu wurden die Lysosomen der Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen Lamp1 angefärbt und das Farbsignal verglichen.

Dabei zeigten die unbehandelten Arsb-defizienten Osteoblasten ein deutlich stärkeres Anfärben im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen. Bei den mit rekombinantem ARSB-behandelten Arsb-defizienten Osteoblasten zeigte sich ein verringertes Anfärben, das am deutlichsten bei den für den gesamten Zeitraum behandelten Zellen zu sehen war (Abb. 12).

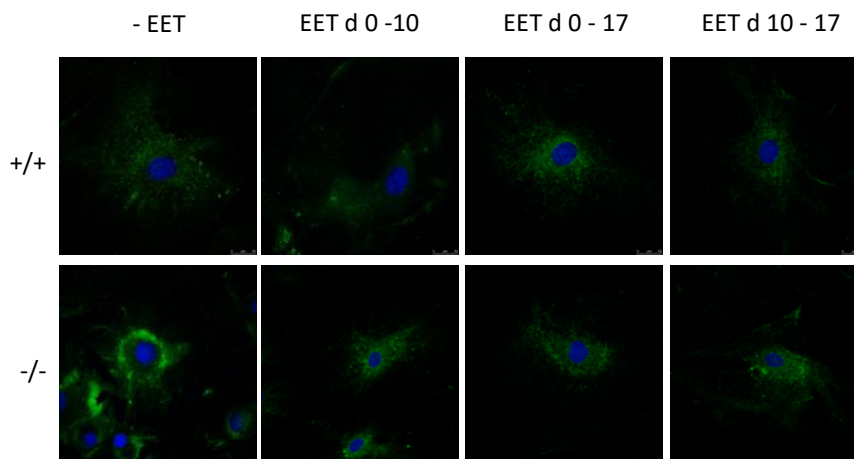


Abbildung 12 – In vitro-Einfluss der EET (d 0-10, d 0-17, d10-17) auf die lysosomale Speicherung in Wildtyp- und Arsb-defizienten Osteoblasten an Tag 17 der Differenzierung

63x Vergr., grün: Lamp1, blau: Dapi

3.4.2. Der Einfluss der EET auf das Knochenwachstum Arsb-defizienter Mäuse

Zunächst wurden ebenso wie bei der basalen Analyse der 12 Wochen alten Tiere die Röntgenbilder untersucht. Es zeigte sich eine tendenziell verringerte Röntgendichte im Vergleich der 24 Wochen alten behandelten und unbehandelten Arsb-defizienten Mäuse (Abb. 13A).

Außerdem wurden wiederum die Wirbelsäule und die langen Röhrenknochen vermessen. Es zeigten sich signifikante Verkürzungen der langen Röhrenknochen bei den 24 Wochen alten Arsb-defizienten Tieren im Vergleich zu den Wildtypkontrollen, die in der EET-Gruppe nicht korrigiert werden konnten. Lediglich die Lumbalwirbelsäule wies schon im Vergleich von Wildtypen zu Arsb-defizienten Tieren keinen signifikanten Unterschied auf (Abb. 13B).

Die anschließende Analyse der Wachstumsfuge zeigte sowohl morphologisch als auch in Vermessung der Wachstumsfugenweite zwischen den unbehandelten Gruppen die gleichen Unterschiede wie bei den 12 Wochen alten Tieren. Die Chondrozyten in den Wachstumsfugen der behandelten Tiere erschienen verglichen mit den unbehandelten Arsb-defizienten Tieren in der Tibia vergrößert, in der Wirbelsäule in Anzahl und Größe verringert. In der Wachstumsfugenweite konnte die EET jedoch keine Korrektur bewirken (Abb. 13C und D).

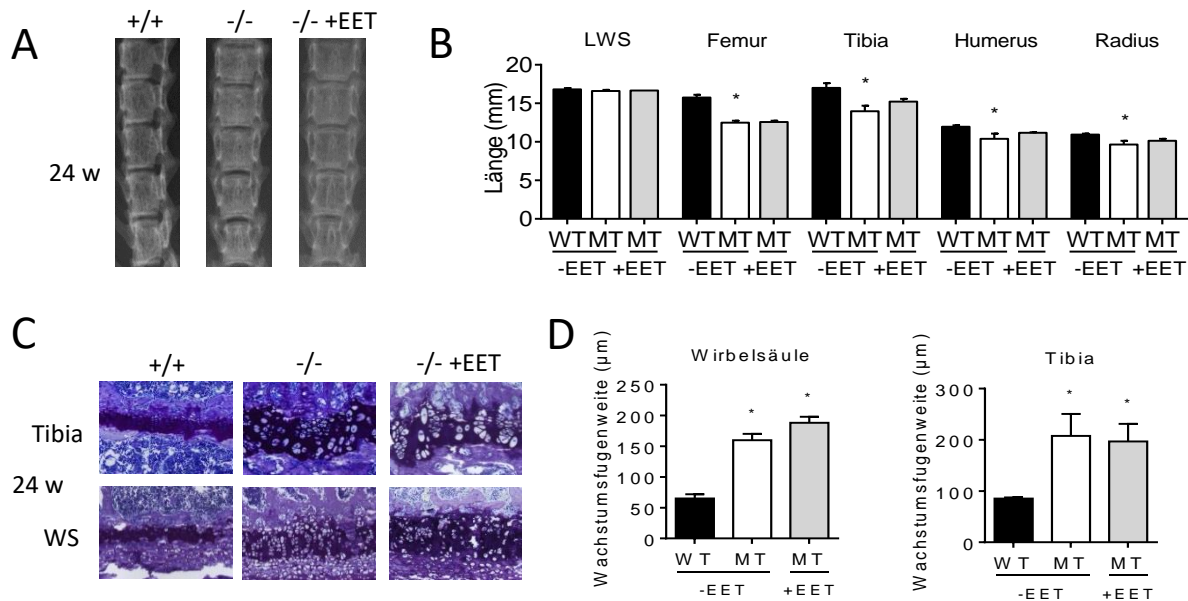


Abbildung 13 – Wachstumsparemetere in 24 Wochen alten Wildtyp- sowie unbehandelten und behandelten Arsb-defizienten Mäusen

A Repräsentativer Röntgenbildausschnitt der LWS **B** Vermessung von LWS und langen Röhrenknochen, n=3, WT vs. MT: p=0,2 (LWS), p=0,0002 (Femur), p=0,005 (Tibia), p=0,02 (Humerus), p=0,01 (Radius), WT vs. MT+EET p=0,4 (LWS), p=0,002 (Femur), p=0,04 (Tibia), p=0,01 (Humerus), p=0,02 (Radius) **C** Repräsentative Ausschnitte der Wachstumsfugen, histologische Schnitte von Tibia und LWS, Toluidinblau, 10x Vergr. **D** Quantitative Auswertung der Wachstumsfugenweite in Tibia und WS, n=3, p=0,0002 (LWS WT vs. MT), p=0,00006 (LWS WT vs. MT+EET), p=0,008 (Tibia WT vs. MT), p=0,005 (Tibia WT vs. MT+EET)

3.4.2.1. Einfluss der EET auf die Knochendichte Arsb-defizienter Mäuse

Die trabekuläre Architektur der 24 Wochen alten Wildtyp- sowie unbehandelten und behandelten Arsb-defizienten Mäuse wurde mittels μ CT und histomorphometrischer Methoden analysiert. Die radiologische Auswertung der Femora zeigte eine signifikante Erhöhung der trabekulären Knochendichte bei den 24 Wochen alten unbehandelten Arsb-defizienten Tieren im Vergleich zur Wildtypkontrolle. Dies konnte durch Enzymersatztherapie korrigiert werden (Abb. 14A). Dieses Ergebnis konnte bei der statischen Histomorphometrie der Wirbelsäule bestätigt werden. In der Tibia ließ sich der Phänotyp partiell korrigieren (Abb. 14B und C).

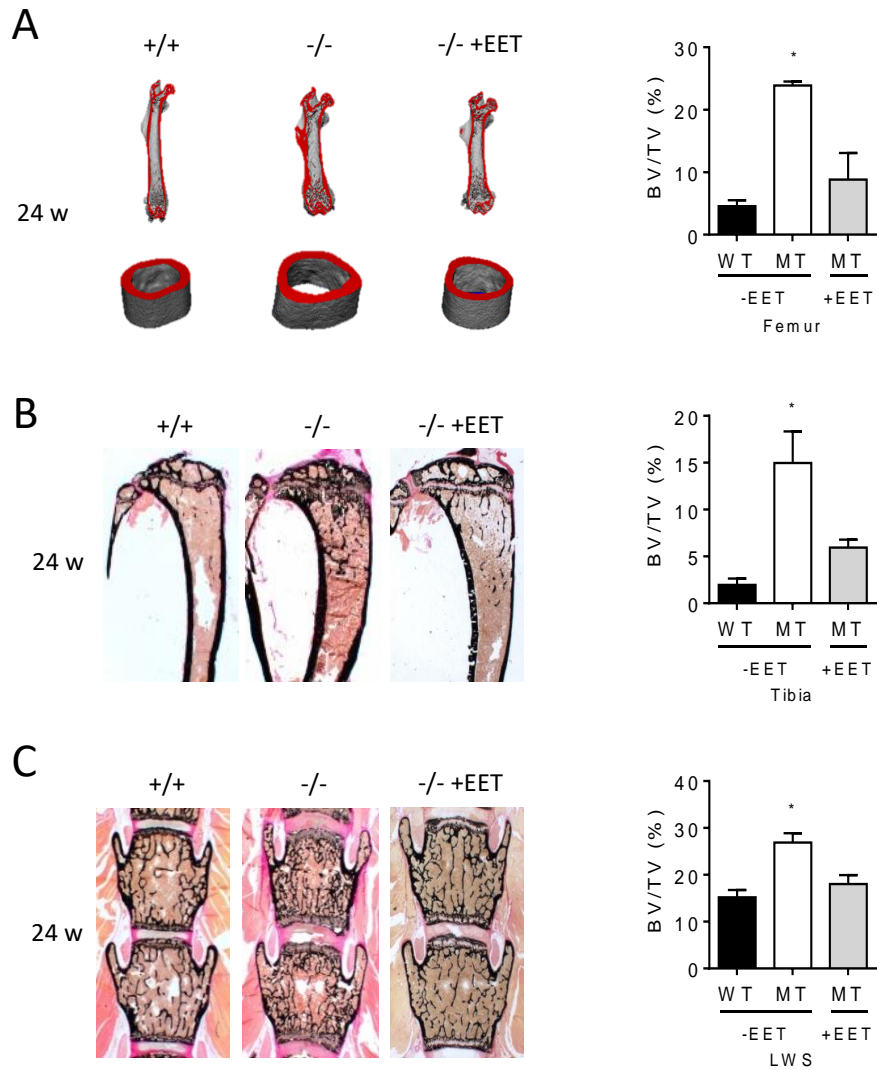


Abbildung 14 – Knochendichte in 24 Wochen alten Wildtyp- sowie unbehandelten und behandelten Arsb-defizienten Mäusen

A Repräsentative Darstellung der Knochenarchitektur des Femurs im Längs- und Querschnitt sowie Auswertung der statischen Knochenparameter des Femurs in der μ CT-Analyse, $n=3$, $p=0,000008$ (BV/TV: WT vs. MT), $p=0,2$ (BV/TV: WT vs. MT+EET) **B** Repräsentative Bilder von histologischen Schnitten der Tibia, von Kossa/van Gieson, 1,25x Vergr. und Auswertung der statischen Knochenparameter in der Tibia durch Histomorphometrie, $n=3$, $p=0,01$ (BV/TV: WT vs. MT), $p=0,005$ (BV/TV: WT vs. MT+EET) **C** Repräsentative Bilder von histologischen Schnitten der LWS, von Kossa/van Gieson, 1,25x Vergr. und Auswertung der statischen Knochenparameter in Wirbelkörpern durch Histomorphometrie, $n=3$, $p=0,001$ (BV/TV: WT vs. MT), $p=0,1$ (BV/TV: WT vs. MT+EET)

3.4.2.2. Einfluss der EET auf Arsb-defiziente Knochenzellen

Da sich die Architektur des Trabekelwerks offensichtlich durch EET weitestgehend korrigieren ließ, stellte sich die Frage nach der Morphologie und Anzahl der Knochenzellen. Zur eingehenden Analyse wurden diese histologisch begutachtet und histomorphometrisch ausgewertet.

Morphologisch ließ sich trabekulär eine vollständige Korrektur der Zellen einschließlich der Osteozyten in der Gruppe der behandelten Arsb-defizienten Mäuse beobachten. Infolgedessen ergab sich eine Normalisierung bei der Anzahl der *empty lacunae* (Abb. 15A und B).

In der Quantifizierung der anderen Zellen zeigten sich bei den Osteoblasten keine signifikanten Unterschiede. In der Gruppe der unbehandelten Arsb-defizienten Tiere fand sich im Gegensatz zu den 12 Wochen alten Tieren eine signifikante Erhöhung der Osteoklastenanzahl, die wiederum in der behandelten Gruppe korrigiert werden konnte (Abb. 15B).

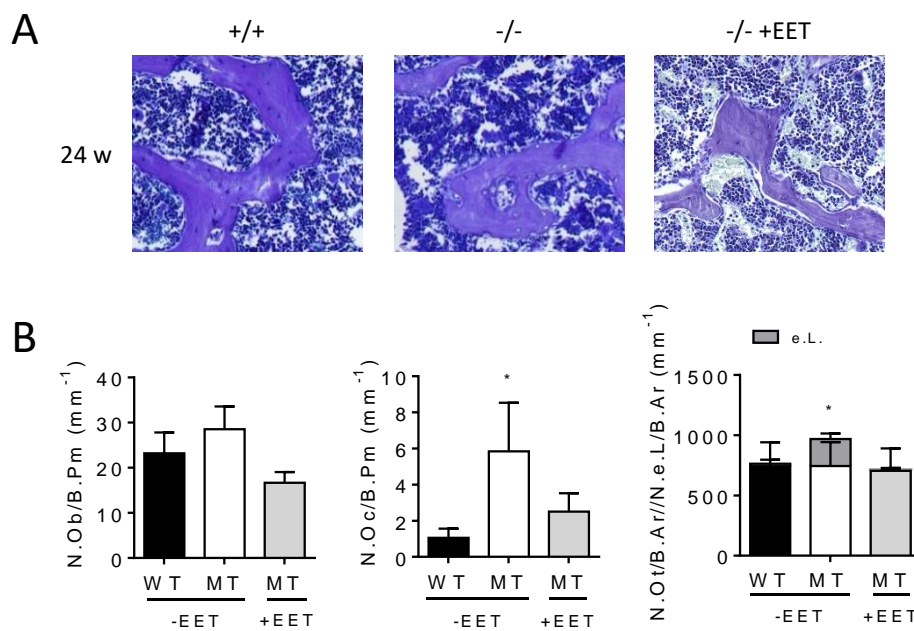


Abbildung 15 – Quantifizierung der Knochenzellen 24 Wochen alter Wildtyp- sowie unbehandelter und behandelter Arsb-defizienter Mäuse

A Repräsentative Bilder von Trabekelwerk inkl. anliegender Knochenzellen, Toluidinblau, 20x Vergr.

B Auswertung der Zellzahl von Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten, n=3, N.Ob/B.Pm: p=0,3 (WT vs. MT), p=0,01 (WT vs. MT+ERT); N.Oc/B.Pm: p=0,04 (WT vs. MT), p=0,09 (WT vs. MT+ERT); N.Ot/B.Ar: p=0,05 (WT vs. MT), p=0,8 (WT vs. MT+ERT); NeL/B.Ar: p=0,004 (WT vs. MT), p=0,6 (WT vs. MT+ERT)

3.4.2.3. Einfluss der EET auf kortikalen Knochen in Arsb-defizienten Mäusen

Zusätzlich zum trabekulären Knochen wurde auch der kortikale Knochen untersucht.

Hierzu wurde die Kortikalis der Tibia begutachtet. Es zeigte sich in der Durchsicht der histologischen Schnitte, dass der diaphysäre Anteil bei den unbehandelten Arsb-defizienten Tieren einen größeren Durchmesser hatte, der zusätzlich durch große Osteoid-haltige Areale durchzogen war. Dieser schien in den EET-behandelten Arsb-defizienten Mäusen partiell korrigiert zu werden, wobei eine größere Tendenz dazu im endokortikalen Abschnitt zu liegen schien (Abb. 16A).

Die Analyse der empty lacunae ergab eine signifikante Erhöhung bei den unbehandelten Arsb-defizienten Tieren, die sich nicht durch EET korrigieren ließ (Abb. 16B). Da jedoch auch hier eine Diskrepanz in der Morphologie zwischen periostalem und endokortikalem Knochen zu bestehen schien, wurden die Osteozyten separat histomorphometrisch ausgewertet, wobei die Tibia eine imaginäre Trennung in der Mitte erfuhr. Bei den unbehandelten Arsb-defizienten Tieren blieb in beiden Arealen die signifikante Erhöhung empty lacunae bestehen. In der Gruppe der EET-behandelten Mäuse konnte endokortikal eine Korrektur beobachtet werden (Abb. 16C).

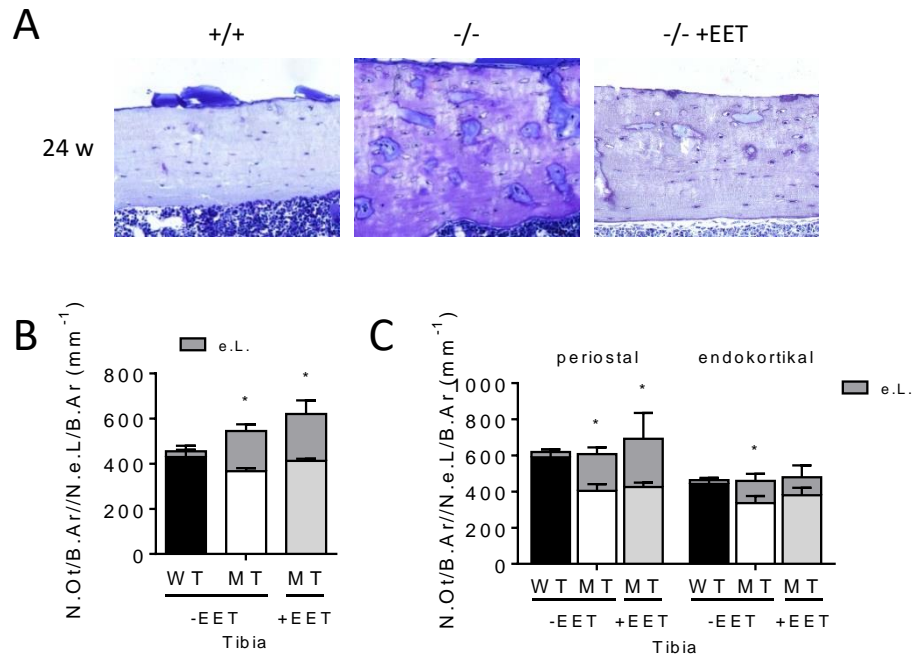


Abbildung 16 – Analyse des kortikalen Knochens in 24 Wochen alten Wildtyp- sowie unbehandelten und behandelten *Arb*-defizienten Mäusen

A Repräsentative Ausschnitte aus der Kortikalis im histologischen Schnitt der Tibia, Toluidinblau, 20x Vergr. **B** Auswertung von Osteozyten und *empty lacunae* in der kortikalen Tibia, n=3, N.Ot/B.Ar: p=0,1 (WT vs. MT), p=0,6 (WT vs. MT+EET); N.e.L/B.Ar: p=0,0009 (WT vs. MT), p=0,006 (WT vs. MT+EET) **C** Separate Auswertung von Osteozyten und *empty lacunae* in periostalen und endokortikalen Arealen, n=3, periosteal: N.Ot/B.Ar: p=0,005 (WT vs. MT), p=0,005 (WT vs. MT+EET); N.e.L/B.Ar: p=0,002 (WT vs. MT), p=0,05 (WT vs. MT+EET) // endokortikal: N.Ot/B.Ar: p=0,02 (WT vs. MT), p=0,1 (WT vs. MT+EET); N.e.L/B.Ar: p=0,01 (WT vs. MT), p=0,1 (WT vs. MT+EET)

4. Diskussion

Obwohl LSDs einzeln betrachtet sehr selten auftreten, haben sie zusammen jedoch eine Frequenz von einer auf 8000 Lebendgeburten, weshalb ihnen eine große Bedeutung für das Gesundheitssystem zukommt (Meikle et al. 1999). Deshalb hat die Untersuchung der Pathologien der einzelnen Erkrankungen und der dahinterstehenden Mechanismen einen hohen medizinischen Stellenwert. Eine umfassende Forschung auf diesem Gebiet könnte neben einem tieferen Verständnis von zellulären Mechanismen der Entwicklung möglicher neuer Therapien dienen und die Behandlung der Betroffenen so verbessern. Aufgrund der unterschiedlichen Gewebeaffektion, die durch das teils recht spezifische Vorkommen der nicht adäquat abgebauten Moleküle begründet ist, ergeben sich für manche LSDs recht spezifische pathologische Merkmale.

Unsere Arbeitsgruppe hat in der Vergangenheit schon mehrere Erkrankungen dieses Formenkreises hinsichtlich ihrer skelettalen Auffälligkeiten untersucht. So konnte für die Mucopolidose II, der eine Fehlsortierung der lysosomalen Enzyme zugrunde liegt und so eine lysosomale Speicherung vieler verschiedener Abbauprodukte erfährt (Settembre and Ballabio 2013), eine Osteopenie nachgewiesen werden, die auf eine verringerte Knochenformation und gesteigerte Knochenresorption zurückzuführen ist. Verursacht wurde dies einerseits durch eine gestörte Osteoblastendifferenzierung und andererseits durch eine gesteigerte Osteoklastogenese (Kollmann et al. 2013). Dem gegenüberstehend zeigten Untersuchungen eines Mausmodells für Mucopolysaccharidose Typ I, eine erhöhte trabekuläre Knochenmasse, die durch verkürzte Bone-forming Units und eine verringerte Osteoklastenzahl hervorgerufen wurde (Kuehn et al. 2015). Diese beiden Beispiele zeigen, dass sich trotz der gemeinsamen skelettalen Beteiligung, die Art der Pathologien unterscheidet und sich somit auch die möglichen Therapieoptionen unterscheiden.

Die Effekte einer Arsb-Inaktivierung auf das Skelettsystem sind bislang nicht umfassend charakterisiert. Bisher wurden ausschließlich im Rahmen der Anwendung von EET bzw. Pentosanpolysulfat bei Katzen und Ratten mit einer Arsb-Defizienz Ergebnisse erhoben, die mit einer eher basalen Charakterisierung des Knochenphänotyps einhergingen (Byers et al. 1997, Frohbergh et al. 2014). Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die skelettale Charakterisierung eines Mausmodells für MPS VI, sowie die Evaluation der Effekte von Enzymersatztherapie auf den Knochenphänotyp.

4.1. Beeinflussung der Skelettentwicklung und des Wachstums durch die lysosomale Speicherung

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Arsb-defizienten Mäuse in allen untersuchten Altersstufen eine Längendifferenz vor allem der langen Röhrenknochen aufwiesen. Als wahrscheinliche Ursache hierfür konnte eine veränderte Architektur der Wachstumsfugen eruiert werden, die sich durch eine Verbreiterung der Fuge sowie eine Auflösung der typischen Säulenstruktur präsentierte.

Hierfür kommen, neben dem reinen Anschwellen der Zellen, eine gestörte Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten als Erklärung in Frage. In eigenen Untersuchungen zur Apoptose (Daten nicht gezeigt), die erforderlich ist, um den Umbau in Knochen zu ermöglichen, konnten bislang keine Auffälligkeiten festgestellt werden. Da aber aufgrund der sehr starken Speicherung von Material in Chondrozyten und deswegen angenommenen Beeinflussung des Zellstoffwechsels und der normalen Zellfunktion dies einen möglichen Mechanismus darstellt, wäre eine eingehendere Untersuchung zum Verständnis der Prozesse sehr interessant. Umgekehrt sollte überprüft werden, ob möglicherweise stattdessen nekrotische Vorgänge in den Vordergrund rücken, die Entzündungsreaktionen hervorrufen (Rock and Kono 2008) und so das normale Wachstum gestört wird. Denn es konnte von Mårtensson et al. gezeigt werden, dass pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 β sowie Tumor Nekrose Faktor α lokal durch verringerte Chondrozytenproliferation und eine verstärkte Apoptose zu einer Inhibition des Längenwachstums führen (Mårtensson et al. 2004).

4.2. Knochenphänotyp Arsb-defizienter Mäuse

Die radiologischen und histomorphometrischen Untersuchungen ergaben, dass der Knochenphänotyp der Arsb-defizienten Tiere durch eine erhöhte trabekuläre Knochenmasse geprägt wurde, die vor allem durch eine erhöhte Trabekelzahl gekennzeichnet war. Die weiteren in vitro und in vivo Untersuchungen der Knochenzellen gaben Hinweise darauf, dass dies wahrscheinlich auf eine verringerte Resorptionsfähigkeit der Osteoklasten zurückzuführen ist. Diese wiesen in der 12 Wochen alten Gruppe eine normale Anzahl, in der Gruppe der 24 Wochen alten unbehandelten Tiere sogar eine erhöhte Anzahl auf, was zunächst eine verringerte Knochenmasse erwarten ließ. Die normalen Serumlevel der Crosslaps trotz erhöhter Knochenmasse bei gleichzeitig erhöhter Osteoklastenanzahl in der Gruppe der 24 Wochen alten Arsb-defizienten Tiere boten jedoch zusammen mit der anschließenden in vitro

Analyse, die eine Tendenz zu verringerter Resorption zeigte, einen schlüssigen Erklärungsansatz. Dies konnte von unserer Arbeitsgruppe bereits als Erklärung für den Knochenphänotyp bei MPS-I eruiert werden, dessen gemeinsamer Nenner mit MPS-VI die Speicherung von Dermatansulfat darstellt (Kuehn et al. 2015).

Der Einfluss der Osteoblasten auf die Knochenmasse schien eher nachrangig, da in vivo sowohl die Anzahl der Zellen also auch das Osteoidvolumen normal bis erniedrigt war und in vitro eine schwächere Mineralisierung nachgewiesen werden konnte, was zusammen auf eine tendenziell verringerte Knochenbildung hindeutete, jedoch durch die dynamische Histomorphometrie nicht bestätigt werden konnte.

4.3. Affektion der Osteozyten

Eine besonders auffällig veränderte Zellpopulation bei den Arsb-defizienten Tieren stellten die Osteozyten dar. Normalerweise in den Knochen eingelassen, präsentierten sich die Osteozytenlakunen teilweise als vollkommen leer, welche sich in der Quantifizierung als signifikant vermehrt erwiesen. Diese möglicherweise durch Apoptose bedingte Auffälligkeit, liefert einen Erklärungsansatz für die erhöhte Anzahl von Osteoklasten, da bekannt ist, dass die Apoptose von Osteozyten die Osteoklastogenese triggern kann (Kogianni et al. 2008, Al-Dujaili et al. 2011, Bonewald 2011, Plotkin 2014).

An die regulatorische Funktion der Osteozyten im Phosphatstoffwechsel ist vor allem die Expression von DMP1 sowie PheX gebunden. Sie regulieren die Expression von FGF23 negativ, welches ebenfalls in Osteozyten exprimiert wird. In der Niere bewirkt es die vermehrte Expression der Gene für Phosphattransporter, die Phosphat aus den Nierentubuli zurückresorbieren, wodurch sich die Phosphatausscheidung im Urin erhöht (Toyosawa et al. 2001, Feng et al. 2006, Liu et al. 2006, Martin and Quarles 2012).

In der 24 Wochen alten unbehandelten Gruppe der Arsb-defizienten Tiere zeigten sich Areale von nicht-mineralisierter Matrix um die Osteozytenlakunen, die ebenfalls bei PheX-defizienten *Hyp*-Mäusen festgestellt werden konnten, die von unserer Arbeitsgruppe untersucht wurden, wobei die verringerte Mineralisierung bei diesen Tieren mit einer durch den Gendefekt hervorgerufenen Hypophosphatämie einherging (Seitz et al. 2013). Bei der Untersuchung der Arsb-defizienten Tiere schien die optisch sehr starke Beeinträchtigung dagegen die Phosphathomöostase nicht erheblich zu beeinflussen, da weder das Serumphosphat, noch die Phosphatausscheidung über den Urin signifikant verändert waren. Als weiterer

Erklärungsansatz ergab sich, dass DMP1 neben der systemischen Wirkung lokal Einfluss auf die perilakunäre Mineralisierung hat (Guo and Bonewald 2009). Die Untersuchung von Arsb-defizienten Osteoblasten zu einem späten Differenzierungszeitpunkt zeigte jedoch auch in der Expression von DMP1 keinen signifikanten Unterschied. Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit deshalb keine wegweisenden Hinweise auf den molekularen Mechanismus hierzu eruiert werden. Trotzdem zeigen die Ergebnisse, dass die Expression von Arsb in Osteozyten essenziell ist, was auf eine Beteiligung dieses Zelltyps beim Abbau der GAG-Matrix hindeutet.

4.4. Bedeutung der Enzymersatztherapie für die Knochenpathologien

In vorangegangenen Tierstudien bei Katzen mit einer Arsb-Defizienz wurden, bei zwar abweichenden Grundvoraussetzungen mit eher osteopenischem Phänotyp, Ergebnisse erhoben, die eine partielle Korrektur der Knochenarchitektur und Knochenlänge zeigten (Byers et al. 1997). Systematische Studien zur Evaluierung des Knochenphänotyps beim Menschen und zur Überprüfung des Effekts von Enzymersatztherapie am Knochen liegen zurzeit nicht vor. Es konnten lediglich im Rahmen von allgemeinen Untersuchungen ein gering verbessertes Körperwachstum sowie bei klinischen Assessments in Phase II bzw. III, sowie in Follow-up-Studien eine verbesserte Bewegungsfähigkeit des muskuloskelettalen Apparats eruiert werden (Harmatz et al. 2005, Harmatz et al. 2006, Decker 2010, Giugliani et al. 2014, Harmatz and Shediak 2016).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit EET im Tiermodell sowohl in vitro als auch in vivo zu einer verminderten Speicherung von lysosomalem Material führt. Dies konnte insbesondere für Osteoblasten bestätigt werden. Bei der Untersuchung von 24 Wochen Arsb-defizienten Tieren, die für 12 Wochen intravenös mit EET behandelt wurden, konnte im Vergleich zu unbehandelten Geschwistertieren eine statistisch signifikante Normalisierung des trabekulären Phänotyps erreicht werden. Kortikal kam es zu einer, insbesondere die Osteozyten betreffend, partiellen Korrektur, die wahrscheinlich auf eine höhere Remodellingrate im trabekulären Kompartiment zurückzuführen ist und eher nicht auf eine Aufnahme des Enzyms durch die Osteozyten, da die periostalen Areale weiterhin auffällige Lakunen zeigten. Diese Ergebnisse werden durch die Analyse einer Beckenkammbiopsie eines 13 Jahre alten MPS-VI Patienten gestützt (Ergebnisse nicht gezeigt), der zuvor für 4 Jahre mit EET behandelt wurde. Hier zeigten sich ebenfalls die Knochenmasse und Osteoklasten im

kindlichen Referenzbereich und dass eine partielle Korrektur der Osteozytenmorphologie vorlag.

Im Tiermodell wurden jedoch keine signifikanten Veränderungen im Bereich der Knochenlänge und der Wachstumsfuge beobachtet, was darauf zurückgeführt werden kann, dass das Längenwachstum der Arsb-defizienten Mäuse zu Behandlungsbeginn größtenteils bereits abgeschlossen war. Allerdings könnte aufgrund der unveränderten Morphologie der Chondrozyten in der Wachstumsfuge der behandelten Tiere im Vergleich zur unbehandelten Gruppe darauf geschlossen werden, dass stoffwechselarmes, und schlechter durchblutetes Gewebe ein geringeres Ansprechen auf EET zeigt. Um den Aspekt des Wachstums und das Ansprechen von Geweben wie Knorpel auf die EET eingehender zu untersuchen, wäre es indiziert einen früheren Behandlungsbeginn festzusetzen. Dieser Schritt wäre zudem medizinisch bedeutsam, da auch bei Patienten mit MPS-VI die Symptomatik im Kindesalter zum Vorschein kommt und die Therapie so früh wie möglich begonnen wird. Die Frage, die aufgeworfen wird, ist insbesondere, ob sich der Symptomkomplex Dysostosis multiplex verhindern ließe, da eine nachträgliche Korrektur, wie sich im Falle unserer Untersuchungen gezeigt hatte, nicht möglich erscheint. Bisherige Untersuchungen in kleinen Geschwisterkontrollstudien und Case Reports deuten ebenfalls darauf hin, dass bestehende skelettale Veränderungen nicht beeinflussbar sind, jedoch bei frühem Therapiebeginn einen verlangsamten Progress zeigen oder teilweise verhindert werden können (Furujo et al. , McGill et al. 2010, Harmatz and Shediach 2016). Bei jedoch äußerst kleinen Stichgruppen wären weitere Untersuchungen unter standardisierten Bedingungen wünschenswert. Insbesondere ist die Frage nach Verhinderung klinischer Merkmale interessant, da für MPS- VI sowie auch andere lysosomale Speichererkrankungen eine Screeningmethode mit Trockenblutkarten existiert (Meikle et al. 2006). Diese Untersuchungen finden, flächendeckend zumindest in Deutschland, schon Anwendung für verschiedene vor allem Stoffwechselerkrankungen wie zum Beispiel die Phenylketonurie im Rahmen des Neugeborenen Screenings. Ziel dabei ist, einen möglichst frühen Behandlungsbeginn für die sonst im Verlauf schwer betroffenen Kinder zu gewährleisten.

Die in dieser Arbeit gezeigte vollständige Korrektur der trabekulären Pathologie, die in Studien bei Patienten bisher nicht hinreichend untersucht wurde, ist ungeachtet der weiteren Affektionen, die nicht korrigiert werden konnten, klinisch bedeutsam, da Aspekte wie allgemeine Knochenstabilität und Frakturheilung unmittelbar an einen adäquat

funktionierenden Remodellingprozess gekoppelt sind. Daher wäre eine eingehende Untersuchung von Patienten in Hinblick auf die Beeinflussung der trabekulären Knochenstruktur ebenfalls interessant, da Immobilisierung aufgrund von z.B. Frakturen zusätzlich negative Auswirkung auf die Atemmechanik und Atemwege hat, die bei Betroffenen mit MPS-VI zumeist ebenfalls stark beeinträchtigt sind und häufig zu komplizierten Verläufen und Komplikationen wie Pneumonien beitragen.

5. Zusammenfassung

Mucopolysaccharidose VI ist mit einer Geburtsprävalenz zwischen 1 zu 43.261 und 1 zu 1.505.160 eine seltene genetische Erkrankung des Formenkreises der lysosomalen Speichererkrankungen. Betroffene Gewebe sind insbesondere Binde- und Stützgewebe, die daraus resultierenden skelettalen Auffälligkeiten werden klinisch als Symptomkomplex unter dem Begriff Dysostosis multiplex zusammengefasst. Auf zellulärer und molekularer Ebene wurden diese bislang jedoch nur unzureichend untersucht. Daher wurde in dieser Arbeit der skelettale Phänotyp im Rahmen eines MPS-VI Mausmodells analysiert.

Es konnte beobachtet werden, dass *Arsb*-defiziente Mäuse signifikant verkürzte Knochen mit einhergehender Affektion der Architektur beteiligter Wachstumszonen zeigen. Des Weiteren wurde in der radiologischen sowie histomorphometrischen Untersuchung eine erhöhte Knochendichte festgestellt, die am ehesten auf eine verminderte Resorptionsfähigkeit der Osteoklasten zurückzuführen ist. Unsere Arbeitsgruppe konnte dies bereits als möglichen Pathomechanismus im *Idua*-Mausmodell für MPS-I beobachten. Die morphologisch auffälligste Zelllinie waren Osteozyten, deren Analyse jedoch keine Hinweise auf eine Einschränkung ihrer Funktion insbesondere in der Phosphathomöostase zeigte.

Da bereits die Enzyersatztherapie Einzug in die klinische Anwendung gefunden hat, sollte in einem zweiten Schritt untersucht werden, wie sich diese auf den Phänotyp im Tiermodell auswirkt. Hierzu wurden zunächst Osteoblasten *in vitro* bis zu einem späten Differenzierungszeitpunkt ohne und mit Enzym kultiviert und die lysosomale Speicherung mittels Immunfluoreszenz untersucht. Es zeigte sich ein gesteigertes Signal in den unbehandelten *Arsb*-defizienten Kulturen sowie eine Normalisierung bei den behandelten Zellen. In der Analyse behandelter *Arsb*-defizienter Mäuse im Vergleich zu unbehandelten *Arsb*-defizienten und Wildtypen wurde eine vollständige Normalisierung der Knochendichte, sowie der Morphologie und Anzahl der beteiligten Knochenzellen im trabekulären Kompartiment beobachtet, in den kortikalen Arealen konnte teilweise eine Korrektur erzielt werden. Diese Effekte sind am ehesten auf die höhere Remodelling-Rate im trabekulären Kompartiment zurückzuführen. Nicht korrigiert werden konnte die Längendiskrepanz der einzelnen Knochen, sowie die pathologische Architektur der Wachstumszone, wobei eine Funktionseinschränkung eben dieser als Ursache für das fehlende Längenwachstum wahrscheinlich ist. Der ausbleibende Effekt von Enzyersatztherapie auf das Längenwachstum ist durch die fehlende Durchblutung des Knorpels im Alter des Therapiebeginns erklärbar.

6. Abstract

Mucopolysaccharidosis Type VI is a rare lysosomal storage disease having a birth prevalence between 1 in 43,261 and 1 in 1,505,160 live births. Connective and supporting tissues are mainly affected resulting in skeletal abnormalities, subsumed under the clinical term Dysostosis multiplex. Because cellular and molecular effects have been researched in depth to date, it is the aim of this work to analyse the skeletal phenotype in a MPS-VI mouse model.

It has been shown that *Arsb*-deficient mice have significantly shortened bones and an affected architecture of adjoining growth plates. Radiological and histomorphometrical analysis indicated increased bone density that is most likely attributable to a decreased resorption ability of the osteoclasts, which our working group already described as a potentially pathomechanism in IDUA mice, a model for MPS-I. Morphologically, Osteocytes were the most affected cells, not showing functional impairment, especially in phosphate homeostasis.

Enzyme replacement therapy has already been implemented in clinical routine, so the effects on the phenotype were investigated in the mouse model too. In vitro experiments with highly differentiated Osteoblasts with or without treatment with recombinant *Arsb* showed an increased signal in untreated cells and normalisation in treated cells performing immunofluorescence labelling representing the lysosomal storage. The analysis of wildtype and treated and untreated *Arsb*-deficient mice with recombinant *Arsb* showed a normalisation of bone density, cell numbers and cell morphology in the trabecular bone but a partial correction in cortical bone, most likely related to a higher remodelling rate in the trabecular compartment. There was no correction of the shortened bones and the pathological architecture of the growth plates, indicating an impaired function of the cells. The absent effect of ERT on these cells could be explained by missing vascularization of the cartilage from the age when treatment began.

7. Abkürzungsverzeichnis

Arsb	Arylsulfatase B
ATP	Adenosintriphosphat
BFR/BS	Bone Formation Rate/Bone Surface
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMU	Basic Multicellular Unit
BV/TV	Bone Volume/Tissue Volume
c-Fms	Colony stimulating factor 1 - receptor
CLCN7	Chloride Voltage-gated Channel 7
Cyp24	Cytochrom 24 der Cytochrom P450-Familie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMP1	Dentin Matrix Protein 1
EET	Enzymersatztherapie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FGF	Fibroblast Growth Factor
GAG	Glykosaminoglykan
GlcNAc-1-P	N-Acetylglucosamin-1-phosphat
i.p.	intraperitoneal
IGF-1	Insuline-like Growth Factor-1
IL-1	Interleukin-1
LAMP	Lysosomal Associated Membrane Proteine
LSD	Lysosomal Storage Disease
LWS	Lendenwirbelsäule
MAR	Mineral Apposition Rate
M-CSF	Macrophage/Monocytes Colony-Stimulating Factor
MPS-VI	Mucopolysaccharidose Typ VI
MS/BS	Mineralizing Surface/Bone Surface
MSC	mesenchymal Stemcell
N.e.L/B.Ar	Number of empty lacunae/Bone Area
N.Ob/B.Pm	Number of Osteoblasts/Boneperimeter
N.Oc/B.Pm	Number of Osteoclasts/Bone Perimeter
N.Ot/B.Ar	Number of Osteocytes/Bone Area
Ob.S/BS	Osteoblast Surface/Bone Surface
Oc.S/BS	Osteoclast Surface/Bone Surface
OPG	Osteoprotegerin
OV/BV	Osteoid Volume/Bone Volume
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
Phex	Phosphate regulating neutral endopeptidase on chromosome X
PTH	Parathormon
RANKL	Receptor Activator of NF-κB ligand
Runx2	Runt-related transcription factor 2
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tb.N	Trabecular Number
Tb.Sp	Trabecular Separation

Tb.Th	Trabecular Thickness
TGF- β	Transforming Growth Factor
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α
TRAP	Tartrate Resistant Acid Phosphatase
UDP	Uridindiphosphat
ZNS	Zentrales Nervensystem

8. Literaturverzeichnis

- Al-Dujaili, S. A., E. Lau, H. Al-Dujaili, K. Tsang, A. Guenther and L. You (2011). "Apoptotic osteocytes regulate osteoclast precursor recruitment and differentiation in vitro." Journal of Cellular Biochemistry **112**(9): 2412-2423.
- Alberts, B. (2002). Molecular biology of the cell. New York, NY, Garland Science.
- Ashworth, J. L., S. Biswas, E. Wraith and I. C. Lloyd (2006). "Mucopolysaccharidoses and the Eye." Survey of Ophthalmology **51**(1): 1-17.
- Aumüller, G., G. Aust, J. Engele and e. al. (2014). Duale Reihe Anatomie. Stuttgart, Thieme.
- Bakker, A. D., K. Soejima, J. Klein-Nulend and E. H. Burger (2001). "The production of nitric oxide and prostaglandin E₂ by primary bone cells is shear stress dependent." Journal of Biomechanics **34**(5): 671-677.
- Benninghoff, A., D. Drenckhahn and J. Waschke (2008). Taschenbuch Anatomie. München/Jena, Urban & Fischer.
- Blair, H., S. Teitelbaum, R. Ghiselli and S. Gluck (1989). "Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump." Science **245**(4920): 855-857.
- Bonewald, L. F. (2011). "The amazing osteocyte." Journal of Bone And Mineral Research **26**(2): 229-238.
- Boyle, W. J., W. S. Simonet and D. L. Lacey (2003). "Osteoclast differentiation and activation." Nature **423**(6937): 337-342.
- Brodsky, B. and A. V. Persikov (2005). Molecular Structure of the Collagen Triple Helix. Advances in Protein Chemistry, Academic Press. **Volume 70**: 301-339.
- Byers, S., J. D. Nuttall, A. C. Crawley, J. J. Hopwood, K. Smith and N. L. Fazzalari (1997). "Effect of enzyme replacement therapy on bone formation in a feline model of mucopolysaccharidosis type VI." Bone **21**(5): 425-431.
- Clarke, B. (2008). "Normal Bone Anatomy and Physiology." Clinical Journal of the American Society of Nephrology **3**(Supplement 3): S131-S139.
- Crockett, J. C., M. J. Rogers, F. P. Coxon, L. J. Hocking and M. H. Helfrich (2011). "Bone remodelling at a glance." Journal of Cell Science **124**(7): 991-998.
- Decker, C. Y., Zi-Fan | Giugliani, Roberto | Schwartz, Ida Vanessa D. | Guffon, Nathalie | Teles, Elisa Leão | Miranda, M. Clara Sá | Wraith, J. Edmond | Beck, Michael | Arash, Laila | Scarpa, Maurizio | Ketteridge, David | Hopwood, John J. | Plecko, Barbara | Steiner, Robert | Whitley, Chester B. | Kaplan, Paige | Swiedler, Stuart J. | Conrad, Susan | Paul Harmatz for the MPS VI Study Group (2010). "Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: Growth and

pubertal development in patients treated with recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase." Journal of Pediatric Rehabilitation Medicine **vol. 3**(no. 2): pp. 89-100.

Feng, J. Q., L. M. Ward, S. Liu, Y. Lu, Y. Xie, B. Yuan, X. Yu, F. Rauch, S. I. Davis, S. Zhang, H. Rios, M. K. Drezner, L. D. Quarles, L. F. Bonewald and K. E. White (2006). "Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism." Nature genetics **38**(11): 1310-1315.

Feng, X. and J. M. McDonald (2011). "Disorders of Bone Remodeling." Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease **6**(1): 121-145.

Freeze, H. H. (2009). Chapter 41: Genetic Disorders of Glycan Degradation In: Essentials of glycobiology. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Frohbergh, M., Y. Ge, F. Meng, N. Karabul, A. Solyom, A. Lai, J. Iatridis, E. H. Schuchman and C. M. Simonaro (2014). "Dose Responsive Effects of Subcutaneous Pentosan Polysulfate Injection in Mucopolysaccharidosis Type VI Rats and Comparison to Oral Treatment." PLoS ONE **9**(6): e100882.

Furujo, M., T. Kubo, M. Kosuga and T. Okuyama "Enzyme replacement therapy attenuates disease progression in two Japanese siblings with mucopolysaccharidosis type VI." Molecular Genetics and Metabolism **104**(4): 597-602.

Futerman, A. H. and G. van Meer (2004). "The cell biology of lysosomal storage disorders." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(7): 554-565.

Giugliani, R., P. Harmatz and J. E. Wraith (2007). "Management Guidelines for Mucopolysaccharidosis VI." Pediatrics **120**(2): 405-418.

Giugliani, R., C. Lampe, N. Guffon, D. Ketteridge, E. Leão-Teles, J. E. Wraith, S. A. Jones, C. Piscia-Nichols, P. Lin, A. Quartel and P. Harmatz (2014). "Natural history and galsulfase treatment in mucopolysaccharidosis VI (MPS VI, Maroteaux–Lamy syndrome)—10-year follow-up of patients who previously participated in an MPS VI survey study." American Journal of Medical Genetics Part A **164**(8): 1953-1964.

Greiner-Tollersrud, O. K. and T. Berg (2000-2013). Lysosomal Storage Disorders. In: Madame Curie Bioscience Database. Austin (TX), Landes Bioscience.

Guo, D. and L. F. Bonewald (2009). "Advancing Our Understanding of Osteocyte Cell Biology." Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease **1**(2): 87-96.

Harmatz, P., R. Giugliani, I. Schwartz, N. Guffon, E. L. Teles, M. C. S. Miranda, J. E. Wraith, M. Beck, L. Arash, M. Scarpa, Z.-F. Yu, J. Wittes, K. I. Berger, M. S. Newman, A. M. Lowe, E. Kakkis and S. J. Swiedler (2006). "Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: A phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled, multinational study of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase (recombinant human arylsulfatase B or rhASB) and follow-on, open-label extension study." The Journal of Pediatrics **148**(4): 533-539.e536.

- Harmatz, P., D. Ketteridge, R. Giugliani, N. Guffon, E. L. Teles, M. C. S. Miranda, Z.-F. Yu, S. J. Swiedler and J. J. Hopwood (2005). "Direct Comparison of Measures of Endurance, Mobility, and Joint Function During Enzyme-Replacement Therapy of Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy Syndrome): Results After 48 Weeks in a Phase 2 Open-Label Clinical Study of Recombinant Human α -Acetylgalactosamine 4-Sulfatase." *Pediatrics* **115**(6): e681-e689.
- Harmatz, P. R. and R. Shediach (2016). "Mucopolysaccharidosis VI: pathophysiology, diagnosis and treatment." *Front Biosci* **21**(1): 385-406.
- Heinrich, P. C., M. Müller, L. Graeve and G. Löffler (2014). *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin u.a., Springer.
- Hopwood, J. J., S. Bunge, C. P. Morris, P. J. Wilson, C. Steglich, M. Beck, E. Schwinger and A. Gal (1993). "Molecular basis of mucopolysaccharidosis type II: Mutations in the iduronate-2-sulphatase gene." *Human Mutation* **2**(6): 435-442.
- Klein-Nulend, J., C. M. Semeins, N. E. Ajubi, P. J. Nijweide and E. H. Burger (1995). "Pulsating Fluid Flow Increases Nitric Oxide (NO) Synthesis by Osteocytes but Not Periosteal Fibroblasts - Correlation with Prostaglandin Upregulation." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **217**(2): 640-648.
- Klein-Nulend, J., A. van der Plas, C. M. Semeins, N. E. Ajubi, J. A. Frangos, P. J. Nijweide and E. H. Burger (1995). "Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro." *The FASEB Journal* **9**(5): 441-445.
- Kogianni, G., V. Mann and B. S. Noble (2008). "Apoptotic Bodies Convey Activity Capable of Initiating Osteoclastogenesis and Localized Bone Destruction." *Journal of Bone And Mineral Research* **23**(6): 915-927.
- Kollmann, K., J. M. Pestka, S. C. Kühn, E. Schöne, M. Schweizer, K. Karkmann, T. Otomo, P. Catala-Lehnen, A. V. Failla, R. P. Marshall, M. Krause, R. Santer, M. Amling, T. Bräulke and T. Schinke (2013). "Decreased bone formation and increased osteoclastogenesis cause bone loss in mucopolysaccharidosis II." *EMBO Molecular Medicine* **5**(12): 1871-1886.
- Kuehn, S. C., T. Koehne, K. Cornils, S. Markmann, C. Riedel, J. M. Pestka, M. Schweizer, C. Baldauf, T. A. Yorgan, M. Krause, J. Keller, M. Neven, S. Breyer, R. Stuecker, N. Muschol, B. Busse, T. Bräulke, B. Fehse, M. Amling and T. Schinke (2015). "Impaired bone remodeling and its correction by combination therapy in a mouse model of mucopolysaccharidosis-I." *Human Molecular Genetics* **24**(24): 7075-7086.
- Lerner, U. H. (2006). "Bone Remodeling in Post-menopausal Osteoporosis." *Journal of Dental Research* **85**(7): 584-595.
- Li, Y.-P., W. Chen, Y. Liang, E. Li and P. Stashenko (1999). "Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification." *Nat Genet* **23**(4): 447-451.

- Liu, S., J. Zhou, W. Tang, X. Jiang, D. W. Rowe and L. D. Quarles (2006). "Pathogenic role of Fgf23 in Hyp mice." American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism **291**(1): E38-E49.
- Ljusberg, J., Y. Wang, P. Lång, M. Norgård, R. Dodds, K. Hultenby, B. Ek-Rylander and G. Andersson (2005). "Proteolytic Excision of a Repressive Loop Domain in Tartrate-resistant Acid Phosphatase by Cathepsin K in Osteoclasts." Journal of Biological Chemistry **280**(31): 28370-28381.
- Mårtensson, K., D. Chrysis and L. Sävendahl (2004). "Interleukin-1 β and TNF- α Act in Synergy to Inhibit Longitudinal Growth in Fetal Rat Metatarsal Bones." Journal of Bone And Mineral Research **19**(11): 1805-1812.
- Martin, A. and L. D. Quarles (2012). Evidence for FGF23 Involvement in a Bone-Kidney Axis Regulating Bone Mineralization and Systemic Phosphate and Vitamin D Homeostasis. Endocrine FGFs and Klothos. M. Kuro-o. New York, NY, Springer US: 65-83.
- Masson, C., I. Cissé, V. Simon, P. Insalaco and M. Audran (2004). "Fabry disease: a review." Joint Bone Spine **71**(5): 381-383.
- McGill, J. J., A. C. Inwood, D. J. Coman, M. L. Lipke, D. De Lore, S. J. Swiedler and J. J. Hopwood (2010). "Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI from 8 weeks of age—a sibling control study." Clinical Genetics **77**(5): 492-498.
- Meikle, P. J., D. J. Grasby, C. J. Dean, D. L. Lang, M. Bockmann, A. M. Whittle, M. J. Fietz, H. Simonsen, M. Fuller, D. A. Brooks and J. J. Hopwood (2006). "Newborn screening for lysosomal storage disorders." Molecular Genetics and Metabolism **88**(4): 307-314.
- Meikle, P. J., J. J. Hopwood, A. E. Clague and W. F. Carey (1999). "Prevalence of lysosomal storage disorders." JAMA **281**(3): 249-254.
- Michou, L., E. Chamoux, J. Couture, J. Morissette, J. P. Brown and S. Roux (2010). "Gene expression profile in osteoclasts from patients with Paget's disease of bone." Bone **46**(3): 598-603.
- Mulari, M., J. Vääräniemi and H. K. Väänänen (2003). "Intracellular membrane trafficking in bone resorbing osteoclasts." Microscopy Research and Technique **61**(6): 496-503.
- N. I. H. Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, D., and Therapy (2001). "Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy." JAMA **285**(6): 785-795.
- Nesbitt, S. A. and M. A. Horton (1997). "Trafficking of Matrix Collagens Through Bone-Resorbing Osteoclasts." Science **276**(5310): 266-269.
- Nishino, I., J. Fu, K. Tanji, T. Yamada, S. Shimojo, T. Koori, M. Mora, J. E. Riggs, S. J. Oh, Y. Koga, C. M. Sue, A. Yamamoto, N. Murakami, S. Shanske, E. Byrne, E. Bonilla, I. Nonaka, S. DiMauro and M. Hirano (2000). "Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease)." Nature **406**(6798): 906-910.

Parfitt, A. M. (1994). "Osteonal and hemi-osteonal remodeling: The spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone." Journal of Cellular Biochemistry **55**(3): 273-286.

Plotkin, L. I. (2014). "Apoptotic Osteocytes and the Control of Targeted Bone Resorption." Current Osteoporosis Reports **12**(1): 121-126.

Poole, K. E. S., R. L. van Bezooijen, N. Loveridge, H. Hamersma, S. E. Papapoulos, C. W. Löwik and J. Reeve (2005). "Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation." The FASEB Journal.

Proff, P. and P. Römer (2009). "The molecular mechanism behind bone remodelling: a review." Clinical Oral Investigations **13**(4): 355-362.

Raas-Rothschild, A., V. Cormier-Daire, M. Bao, E. Genin, R. Salomon, K. Brewer, M. Zeigler, H. Mandel, S. Toth, B. Roe, A. Munnich and W. M. Canfield (2000). "Molecular basis of variant pseudo-Hurler polydystrophy (mucopolysaccharidosis IIIc)." Journal of Clinical Investigation **105**(5): 673-681.

Rock, K. L. and H. Kono (2008). "The inflammatory response to cell death." Annual review of pathology **3**: 99-126.

Schlesinger, P. H., H. C. Blair, S. L. Teitelbaum and J. C. Edwards (1997). "Characterization of the Osteoclast Ruffled Border Chloride Channel and Its Role in Bone Resorption." Journal of Biological Chemistry **272**(30): 18636-18643.

Seitz, S., C. Rendenbach, F. Barvencik, T. Streichert, A. Jeschke, J. Schulze, M. Amling and T. Schinke (2013). "Retinol deprivation partially rescues the skeletal mineralization defects of PheX-deficient Hyp mice." Bone **53**(1): 231-238.

Settembre, C. and A. Ballabio (2013). "New targets for old diseases: lessons from mucopolysaccharidosis type II." EMBO Molecular Medicine **5**(12): 1801-1803.

Shih, S.-L., Y.-J. Lee, L. S.-P., S. C.-Y. and J. G. Blickman (2002). "Airway changes in children with mucopolysaccharidoses: CT evaluation." Acta Radiologica **43**(1): 40-43.

Teitelbaum, S. L. (2000). "Bone Resorption by Osteoclasts." Science **289**(5484): 1504-1508.

Toyosawa, S., S. Shintani, T. Fujiwara, T. Ooshima, A. Sato, N. Ijuhin and T. Komori (2001). "Dentin Matrix Protein 1 Is Predominantly Expressed in Chicken and Rat Osteocytes But Not in Osteoblasts." Journal of Bone And Mineral Research **16**(11): 2017-2026.

Trowbridge, J. M. and R. L. Gallo (2002). "Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan." Glycobiology **12**(9): 117R-125R.

Udagawa, N., N. Takahashi, E. Jimi, K. Matsuzaki, T. Tsurukai, K. Itoh, N. Nakagawa, H. Yasuda, M. Goto, E. Tsuda, K. Higashio, M. T. Gillespie, T. J. Martin and T. Suda (1999).

"Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor." Bone **25**(5): 517-523.

Valayannopoulos, V., H. Nicely, P. Harmatz and S. Turbeville (2010). "Mucopolysaccharidosis VI." Orphanet Journal of Rare Diseases **5**: 5-5.

van Bezooijen, R. L., B. A. J. Roelen, A. Visser, L. van der Wee-Pals, E. de Wilt, M. Karperien, H. Hamersma, S. E. Papapoulos, P. ten Dijke and C. W. G. M. Löwik (2004). "Sclerostin Is an Osteocyte-expressed Negative Regulator of Bone Formation, But Not a Classical BMP Antagonist." The Journal of Experimental Medicine **199**(6): 805-814.

Van Cromphaut, S. J., M. Dewerchin, J. G. J. Hoenderop, I. Stockmans, E. Van Herck, S. Kato, R. J. M. Bindels, D. Collen, P. Carmeliet, R. Bouillon and G. Carmeliet (2001). "Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor–knockout mice: Functional and molecular aspects." Proceedings of the National Academy of Sciences **98**(23): 13324-13329.

Welsch, U., T. Deller and W. Kummer (2014). Lehrbuch Histologie. München, Elsevier, Urban & Fischer.

White, K. K. (2011). "Orthopaedic aspects of mucopolysaccharidoses." Rheumatology **50**(suppl 5): v26-v33.

Zaidi, M. (2007). "Skeletal remodeling in health and disease." Nat Med **13**(7): 791-801.

Zhao, S., Y. Kato, Y. Zhang, S. Harris, S. S. Ahuja and L. F. Bonewald (2002). "MLO-Y4 Osteocyte-Like Cells Support Osteoclast Formation and Activation." Journal of Bone And Mineral Research **17**(11): 2068-2079.

Zhao, W., M. H. Byrne, B. F. Boyce and S. M. Krane (1999). "Bone resorption induced by parathyroid hormone is strikingly diminished in collagenase-resistant mutant mice." Journal of Clinical Investigation **103**(4): 517-524.

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei Herrn Prof. Dr. Thorsten Schinke, sowie Herrn Prof. Dr. Michael Amling für die Bereitstellung dieses interessanten Themas sowie die Möglichkeit der Durchführung der benötigten Untersuchungen bedanken. Im Besonderen bedanke ich mich für die äußerst bemühte und umfassende Betreuung durch meinen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Schinke, und die fachliche Beratung in allen Belangen sowie die äußerst angenehmen Gespräche und anregenden Diskussionen.

Weiterhin gilt mein ausgesprochener Dank Mona Neven sowie Christina Baldauf, die mich geduldig in den Laboralltag und die benötigte Methodik eingearbeitet haben. Mona Neven möchte ich noch einmal in besonderer Weise für die Durchführung der notwendigen μ CT-Untersuchungen, sowie die tollen Histologien danken.

Ebenfalls ein großes Dankeschön an Olga Winter und Sandra Perkovic, die mich stets bei technischen Fragen zu Histologien beraten und hervorragende Schnitte erstellt haben.

Anke Jeschke und Timur Yorgan möchte ich ganz herzlich für die Beratung in Sachen Zellkultur und statistische Auswertung, sowie Stephanie Peters für die Unterstützung bei der Durchführung der molekularbiologischen Methoden danken.

Für die kompetente und umsichtige Pflege der Mäuse und Verwaltung der Mauslinie danke ich Gudrun Arndt und insbesondere Nicole Lüder und ihren Kollegen, die freundlicherweise auch die Durchführung der Enzyersatztherapie übernommen haben.

Nochmals einen großen Dank an das gesamte IOBM und insbesondere die AG Schinke für die tolle Zeit, die vielen Erfahrungen, die angenehme Atmosphäre sowie netten Gespräche und die Hilfe und Unterstützung in jeder Lage und bei jeder Frage.

Abschließend danke ich meiner Familie von ganzem Herzen für die stete Unterstützung in jeglicher Hinsicht und die Aufmunterung, wenn die ein oder andere Sache nicht auf Anhieb gelingen mochte; insbesondere meinen Eltern, ohne die die Zeit im Labor gar nicht erst möglich gewesen wäre. Ihr seid einfach die Besten!

10. Lebenslauf

➤ Persönliche Daten

Name Alexandra Angermann
Geburtsdatum 13.09.1991
Geburtsort Münster/Westfalen

➤ Ausbildung

- 21.11.2016 - 22.10.2017 Praktisches Jahr, Tertiale:
 1. Städtisches Klinikum Lüneburg, Wahlfach Pädiatrie
 2. Bundeswehrkrankenhaus Hamburg, Chirurgie
 3. Bundeswehrkrankenhaus Hamburg, Innere Medizin
- 10/2010 - 11/2017 Universität Hamburg; Medizinstudium
 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (September 2012):
Note 1,5
 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Oktober 2016):
Note 2,0
 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (November 2017):
Note 2,0
- 2002 - 2010 Gymnasium Marianum Meppen; Abschluss: Abitur

➤ Praktische Erfahrungen

- 04/2015 bis 05/2016 Labortätigkeit und tierexperimentelle Arbeit im Institut für Osteologie und Biomechanik, AG Schinke zur Erlangung der Promotion

Famulaturen

- 02.02.2015 bis 01.03.2015 Anästhesiologie, Intensivmedizin und Notfallmedizin, Friederikenstift Hannover
- 18.08.2014 bis 17.09.2014 Neurologie, KH Ludmillenstift Meppen
- 14.07.2014 bis 13.08.2014 Allgemeinmedizin, Hausarztpraxis
- 22.04.2013 bis 24.05.2013 Sportmedizin, Sportmedizinisches Institut der BW

Wahlfächer

Klinischer Abschnitt (04-06/2015) Experimentelle Medizin (Note 1,0)
Vorklinischer Abschnitt Einführung in die experimentelle Medizin (Note 2,0)

Hamburg, 11.09.2018

Alexandra Angermann

11. Eidesstattliche Versicherung

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

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

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:

Alexandra Angermann