

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Osteologie und Biomechanik

Direktor: Prof. Dr. med. Michael Amling

Auswirkungen von Mukopolysaccharidose Typ VI und dessen Therapie mit Enzymersatz auf das kraniofaziale System: eine Studie im Mausmodell

Dissertation

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

vorgelegt von:

Rohit Nagpal

aus Hamburg

Hamburg 2020

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 07.12.2020**

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

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: PD Dr. Nicole Muschol

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thorsten Schinke

Inhaltsverzeichnis

1	Arbeitshypothese und Fragestellung	5
2	Einleitung	6
2.1	Das Lysosom	6
2.2	Lysosomale Speicherkrankheiten	6
2.3	Mukopolysaccharidose Typ VI	7
2.3.1	Diagnostik und allgemeine Befunde	8
2.3.2	Dentale und kraniofaziale Befunde	10
2.3.3	Therapie	11
3	Material und Methoden	14
3.1	Versuchstiere	14
3.2	Micro-Computer-Tomographie	14
3.3	Kontaktradiographie	17
3.4	Histologie	17
3.4.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	19
3.4.2	Toluidinblau-Färbung	20
3.4.3	Safranin O-Färbung	21
3.5	Histologische Auswertung	22
3.6	Statistische Auswertung	23
4	Ergebnisse	24
4.1	Kieferexostosen und Hypertrophie der Kaumusculatur bei <i>Arsb^{m/m}</i> -Mäusen	24
4.2	Degenerative Veränderungen des Zahnhalteapparates bei <i>Arsb^{m/m}</i> -Mäusen	26
4.3	Untersuchung des Kiefergelenks	31
5	Diskussion	39
5.1	Knochenexostosen hängen bei <i>Arsb</i> -defizienten Mäusen mit der muskulären Anatomie zusammen	39
5.2	Ein früher Beginn der ERT kann alveolären Knochenverlust bei <i>Arsb</i> -defizienten Mäusen verhindern	41
5.3	Das Kiefergelenk ist bei <i>Arsb^{m/m}</i> -Mäusen verändert	42

5.4	Fazit.....	46
6	Zusammenfassung.....	47
7	Abstract.....	48
8	Abkürzungsverzeichnis.....	49
9	Abbildungsverzeichnis.....	51
10	Literaturverzeichnis.....	53
11	Danksagung.....	59
12	Lebenslauf.....	60
13	Eidesstattliche Versicherung.....	61

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Mukopolysaccharidose Typ VI (MPS VI oder Maroteaux-Lamy-Syndrom) ist eine genetisch bedingte Erkrankung, die zu der Gruppe der lysosomalen Speicherkrankheiten gehört und durch eine Störung des Glykosaminoglykan-Stoffwechsels charakterisiert ist. Die Prävalenz wird mit 1-9:1.000.000 beziffert und die Krankheit wird autosomal-rezessiv vererbt. Bei der Erkrankung liegt ein Defekt des Enzyms N-Acetylgalaktosamin-4-Sulfatase bzw. Arylsulfatase B (ARSB) vor. Da dieses Enzym für den lysosomalen Abbau der zwei Glykosaminoglykane Dermatan sulfat und Chondroitin sulfat verantwortlich ist, kommt es bei MPS VI zu einer Anhäufung dieser Glykosaminoglykane in allen Geweben und Organen (O'Brien et al., 1974).

Die Erstmanifestation von MPS VI erfolgt bereits im Kindesalter. Zu den auffälligsten Symptomen der Erkrankung gehören dysplastische, degenerative Veränderungen des gesamten Skeletts. Dazu zählen Kleinwuchs, Dysostosis multiplex und degenerative Gelenkveränderungen. Hiervon sind ebenfalls die Kiefergelenke betroffen, wodurch die Patienten einen ausgeprägten kraniofazialen Phänotyp aufweisen.

Seit einigen Jahren besteht die Möglichkeit einer medikamentösen Behandlung mittels Enzymersatztherapie (Galsulfase). Pohl et al. hatten 2018 die Auswirkungen dieser Enzymersatztherapie auf das gesamte Knochensystem im Mausmodell untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Enzymersatztherapie insgesamt positiv auf den skelettalen Phänotyp der MPS VI-Mäuse auswirkt (Pohl et al., 2018). Es wurde jedoch bisher nicht eingehend untersucht, inwiefern die MPS VI-Mäuse den dentalen und kraniofazialen Phänotyp der MPS VI-Patienten widerspiegeln und welche Auswirkungen eine Enzymersatztherapie auf den Phänotyp der Mäuse besitzt.

Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss einer fehlenden Enzymaktivität von Arylsulfatase B auf das kraniofaziale und orofaziale System im Mausmodell (*Arsb^{m/m}*) genauer zu untersuchen und zu überprüfen, ob diese Pathologien durch eine Enzymersatztherapie korrigiert werden können. Hierfür wurden die Schädel von *Arsb^{m/m}*-Mäusen ohne Therapie, von *Arsb^{m/m}*-Mäusen mit Enzymersatztherapie und von Wildtypkontrolltieren mittels Kontaktradiographie, Micro-Computertomographie und entkalkter Histologie vergleichend untersucht.

2 Einleitung

2.1 Das Lysosom

Da Mukopolysaccharidosen zur Gruppe der lysosomalen Speicherkrankheiten gehören, wird zunächst das Lysosom näher betrachtet. Diese Art der Zellorganellen findet man ausschließlich in Eukaryoten. Sie gelten gemeinhin als Abfallentsorgungssystem der Zelle (de Duve, 1963). Sie sind membranumhüllt und gefüllt mit Hydrolyseenzymen. Das Innere des Lysosoms wird stets in einem sauren pH-Bereich von 4,5-5,0 gehalten (Ohkuma and Poole, 1978). Dies unterscheidet sich sehr vom pH-neutralen Zytosol mit einem pH-Wert von 7,2. Das saure Milieu und die Membranhülle sind zwei Abwehrmechanismen, um eine Schädigung der Zelle bei Austreten von Enzymen aus dem Lysosom zu verhindern. Hierzu dient einerseits die Membran als eine Barriere. Falls diese versagt, können die Hydrolyseenzyme, die ihr Aktivitätsoptimum im sauren Bereich haben, im neutralen Cytosol keinen Schaden anrichten (Alberts et al., 2017, S. 817).

Die Funktion der Verdauungsenzyme besteht darin, Makromoleküle durch proteolytische Spaltung in kleinere Moleküle zu zersetzen. Diese können dann entweder aus der Zelle hinaus ausgeschieden werden oder der Zelle recycelt wieder zur Verfügung gestellt werden (Saftig and Klumperman, 2009). Die Enzyme, die an das Lysosom gerichtet sind, durchlaufen den Golgi-Apparat und werden mit Mannose-6-Phosphat gekennzeichnet. Durch spezielle Rezeptoren an der Membran können diese dann mittels Endozytose eingeschleust werden (Lodish, 2004, S. 723).

2.2 Lysosomale Speicherkrankheiten

Bei lysosomalen Speicherkrankheiten kommt es zu einer Mutation in einem der Gene, die für die lysosomalen Enzyme kodieren. Diese Gruppe umfasst über 40 seltene, erblich bedingte Stoffwechselkrankheiten (Winchester et al., 2000). Eine Gruppe davon sind die Mukopolysaccharidosen. Bei Ihnen liegt eine Mutation von Enzymen vor, die für den Abbau von Glykosaminoglykanen zuständig sind (Muenzer, 2004).

Glykosaminoglykane (GAG) sind lange Moleküle, die aus den linearen, negativ geladenen Disacchariden Chondroitinsulfat (CS), Dermatansulfat (DS), Keratansulfat (KS) und Heparansulfat (HS) bestehen. Diese liegen gebunden mit Proteoglykanen in der extrazellulären Matrix vor. Hierbei ist CS in Knorpel, Sehnen, Ligamenten und der Aorta mit Bindungen zu Proteinen wie Kollagen vorzufinden. DS findet man vornehmlich in Haut, Blutgefäßen und Herzklappen.

GAG sind in der Lage hohe Mengen an Wasser zu binden und bilden somit eine gelartige Substanz, die Gelenken ihre typische stoßdämpfende Eigenschaft verleiht (Gandhi and Mancera, 2008). Abgesehen von den mechanischen Eigenschaften steuern sie auch verschiedene Zellprozesse und sind somit wichtige Biomodulatoren (Trowbridge and Gallo, 2002). Ebenso wird angenommen, dass GAG Aktivatoren für das „bone morphogenetic protein“ (BMP) sind und somit eine wichtige Funktion bei der Entwicklung des Skelettsystems (Khan et al., 2008) besitzen (Wang et al., 2012).

2.3 Mukopolysaccharidose Typ VI

Mukopolysaccharidose Typ VI (MPS VI), auch bekannt als Maroteaux-Lamy-Syndrom, ist eine von jenen sieben Mukopolysaccharidosen, die mit römischen Zahlen und den Erstbeschreibern als Eponym benannt sind. Bei jeder dieser Erkrankungen liegt ein genetischer Defekt für ein bestimmtes lysosomales Enzym vor (Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht der Mukopolysaccharidosen (Muenzer, 2011, Valayannopoulos et al., 2010).

Erkrankung	Betroffenes Enzym	GAG-Anhäufung	Primäre klinische Symptome
MPS I (Hurler-Scheie)	α -L-iduronidase	DS, HS	Neurokognitive Retardierung, Herz-, Kreislaufkrankung, Dysostosis multiplex, Hepatosplenomegalie, Nabelhernien, Hornhauttrübung
MPS II (Hunter)	Iduronate-2-sulfatase	DS, HS	Wie in MPS I
MPS III (Sanfillipo)	A: Heparan N-sulfatase B: α -N-acetylglucosaminidase C: acetyl-CoA: α -glucosaminid acetyltransferase D: N-acetylglucosamin-6-sulfatase	HS	Neurokognitive Retardierung
MPS IV (Morquio)	A: galactose-6-sulfatase B: β -galactosidase	A: KS, CS B: KS	Normale Intelligenz, Skelettale Dysplasie, Gelenkinstabilität, Zervikale Myelopathie
MPS VI (Maroteaux-Lamy)	Arylsulfatase B	DS, CS	Normale Intelligenz, Kardiorespiratorische Probleme, Dysostosis multiplex. Hepatosplenomegalie, Hornhauttrübung
MPS VII (Sly)	β -Glucuronidase	DS, HS, CS	Variabler Phänotyp, Hydrops fetalis, ähnlich wie MPS I
MPS IX (Natowicz)	Hyaluronidase	Hyaluronan	Muskuloskelettale Probleme mit periartikulären Schwellungen

Bei Mukopolysaccharidose VI wird durch eine Punktmutation im Genlocus 5q14.1 das Enzym N-Acetylgalaktosamin-4-Sulfatase (auch Arylsulfatase B oder ARSB genannt) fehlerhaft synthetisiert und es resultiert ein Defekt der Proteinfunktion (Litjens et al., 1989). Dieses Enzym spaltet Chondroitin- und Dermatansulfat (Muenzer, 2011, Valayannopoulos et al., 2010). Der Enzymdefekt führt daher bei MPS VI zu einer Anhäufung dieser GAG in diversen Geweben und Organen.

MPS VI wird autosomal-rezessiv vererbt. Dies bedeutet, dass die Erkrankung nur dann phänotypisch ausgeprägt wird, wenn man das veränderte Allel auf beiden homologen Autosomen trägt. Mit nur einem fehlerhaften Allel ist man lediglich Konduktor und es wird keine Erkrankung ausgeprägt. Genaue Zahlen zur Inzidenz von MPS VI weltweit sind nicht bekannt. In Deutschland wurde eine kumulative Inzidenz von 0,23 in 100.000 Geburten festgestellt. Auffällig ist hierbei ein vermehrtes Auftreten bei türkischstämmigen Patienten (Baehner et al., 2005).

2.3.1 Diagnostik und allgemeine Befunde

Das klinische Bild der Erkrankung kann stark variieren und ist von der Schwere und der Progredienz abhängig. Da GAG bei Patienten mit MPS VI vermehrt über den Urin ausgeschieden werden, kann die GAG-Konzentration im Urin

diagnostisch verwendet werden. Hohe GAG-Konzentrationen ($> 100 \mu\text{g}/\text{mg}$ Kreatinin) im Urin sind meist mit starkem Kleinwuchs, geringem Körpergewicht, eingeschränkter Lungenfunktion und einem frühzeitigen Tod assoziiert. Bei niedrigen GAG-Konzentrationen ($<100 \mu\text{g}/\text{mg}$ Kreatinin) sind die Symptome milder und es wird eine viel längere Lebenserwartung vermutet (Swiedler et al., 2005). Ohne Therapie liegt die Lebenserwartung der Patienten im Bereich der 2. bis 3. Lebensdekade.

Zu den allgemeinmedizinischen Befunden zählen hierbei unter anderem: Veränderungen der Herzklappen, eingeschränkte Lungenfunktion, Hepatosplenomegalie, Sinusitis, Otitis media, Hörverlust, Schlafapnoe, Hornhauttrübung, Karpaltunnel-Syndrom, Leisten- und Nabelhernien. Patienten mit MPS VI haben im Gegensatz zu Patienten mit MPS I, II, III und VII in der Regel keine mentale Retardierung.

Skelettale Manifestationen sind charakteristisch für MPS VI-Patienten und gehören zu den wichtigsten Symptomen dieser Erkrankung. Der skelettale Phänotyp ist durch eine Dystostosis multiplex gekennzeichnet, was einen Symptomkomplex von Deformitäten verschiedener Knochen beschreibt. Radiologisch gehören hierzu verdickte und verkürzte Mittelhandknochen, dysplastische Femurköpfe, eine abnormale Entwicklung der Wirbelkörper, verbreiterte Rippen, verkürzte und irregulär verdickte Schlüsselbeine, verbreiterte Diploe-Räume und eine J-förmige Sella turcica. Weitere skelettale Pathologien sind Skoliose oder Kyphose. Hierdurch können neurologische Symptome, wie die Kompression des Halsmarkes durch die Instabilität der Wirbelkörper, auftreten.

Ferner sind degenerative Gelenkveränderungen zu beobachten. Die meisten Gelenke sind versteift und verengt. Diese können mit Schmerzen verbunden sein. Infolgedessen haben viele MPS VI-Patienten eine verminderte Mobilität diverser Gelenke. Dies kann zu „Klauen-Händen“ und Gangstörungen führen. Es wird auch ein Gehen auf Zehenspitzen beobachtet. Schlussendlich können Patienten auf einen Rollstuhl angewiesen sein (Giugliani et al., 2007, Valayannopoulos et al., 2010).

2.3.2 Dentale und kraniofaziale Befunde

Darüber hinaus besitzen MPS VI-Patienten aber auch einen ausgeprägten dentalen und kraniofazialen Phänotyp (Abbildung 1). Die charakteristischen Gesichtsveränderungen werden hierbei häufig als „Vergrößerung der Gesichtszüge“ beschrieben (Abbildung 1 A & B). Außerdem weisen die Patienten häufig einen verspäteten Zahndurchbruch mit retinierten Zähnen, follikulären Zysten und Gingivahyperplasie auf (Abbildung 1 C-G & I) (Kantaputra et al., 2014). Radiologisch besonders charakteristisch sind für MPS VI-Patienten die hypoplastischen Kondylen (Abbildung 1 G & I) (Roberts et al., 1984, Kantaputra et al., 2014, de Santana Sarmiento et al., 2015). Hierdurch weisen viele Patienten ein vertikales Wachstumsmuster auf (Abbildung 1J) (Fonseca et al., 2014). Bisher noch unbeschrieben in der Literatur ist der alveoläre Knochenabbau, den wir bei einem 23 Jahre alten MPS VI-Patienten beobachten konnten (Abbildung 1H).

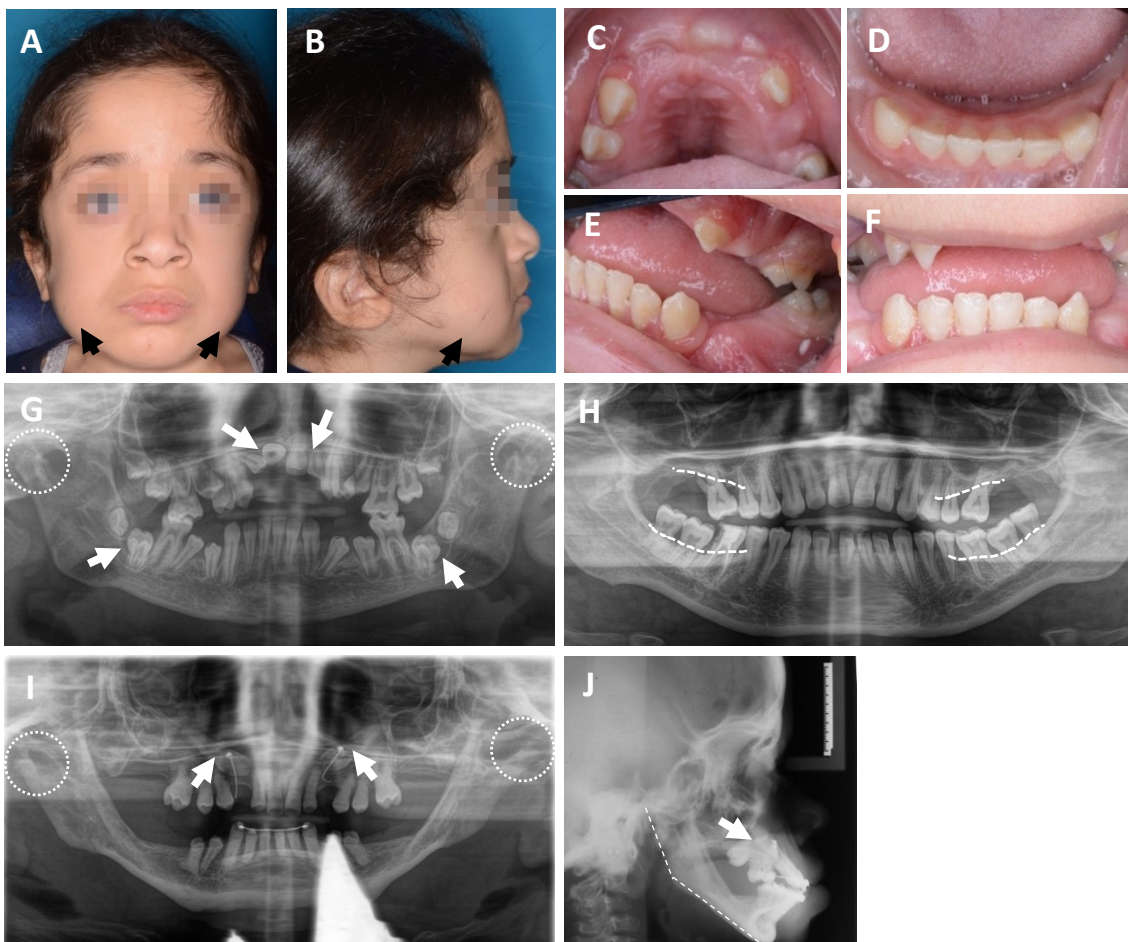


Abbildung 1: Fotos und Röntgenaufnahmen von Mukopolysaccharidose Typ VI – Patienten aus der Poliklinik für Kieferorthopädie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Eine Patientin (A-G) mit Maroteaux-Lamy-Syndrom (MPS VI) wurde seit dem Alter von zwei

Jahren ohne Unterbrechung mit einer Enzyersatztherapie (Naglazyme®, BioMarin Pharmaceuticals, Novato, Kalifornien, USA) behandelt. Zum Zeitpunkt der Aufnahmen war die Patientin 11 Jahre alt. Auf den extraoralen Fotos (A-B) sieht man sehr deutlich die Aufwölbung des Unterkiefers (schwarze Pfeile). Intraoral zeigt sich eine Gingivahyperplasie sowie ein fehlender Durchbruch der Frontzähne, welche normalerweise im Alter von 6-9 Jahren durchbrechen sollten (C-F). Auf der Panoramaschichtaufnahme (G) der Patientin sieht man retinierte und verlagerte Frontzähne im Oberkiefer (weiße Pfeile) sowie follikuläre Zysten an den zweiten Unterkiefermolaren (weiße Pfeile). Im Zuge des parodontalen Befundes wurden Sondierungstiefen von 2-3mm gemessen sowie Blutungen in allen Sextanten beobachtet. Außerdem sind Hypoplasien der Kondylen deutlich zu erkennen (weiß gestrichelte Kreise).

Panoramaschichtaufnahme (H) eines 23 Jahre alten Patienten, welcher seit seinem elften Lebensjahr eine Enzyersatztherapie mit Naglazyme® ohne Unterbrechung erhält. Hierbei ist zu erkennen, dass der horizontale Knochenabbau im Ober- und Unterkiefer für das Lebensalter relativ weit fortgeschritten ist (weiße gestrichelte Linien). Außerdem wurden stellenweise Sondierungstiefen bis 6mm gemessen. Im späteren Verlauf erfolgte die Extraktion von den Zähnen 37 und 47 aufgrund eines erhöhten Lockerungsgrades. Die Kondylen sind auf diesem Bildausschnitt nicht dargestellt.

Panoramaschichtaufnahme (I) einer 35 Jahre alten Patientin. Das Fernröntgenseitenbild (J) wurde im Alter von 16 Jahren aufgenommen. Die Patientin erhielt eine Enzyersatztherapie mit Naglazyme® zwischen ihrem 26. und 27. Lebensjahr. Auf der Panoramaschichtaufnahme (I) sind auch in diesem Fall retinierte und verlagerte Zähne zu erkennen. Die Ketten an den oberen Eckzähnen weisen auf einen erfolglosen Versuch der kieferorthopädischen Einordnung hin (weiße Pfeile). Ebenfalls ersichtlich sind auch hier bei dieser Patientin die hypoplastischen Kondylen (weiß gestrichelte Kreise). Das Fernröntgenseitenbild (J) der Patientin zeigt einen vertikalen Aufbau des Schädels mit extrem flachen Kieferwinkel (weiße gestrichelte Linie). Die Retention der Eckzähne ist bei dieser Aufnahme ebenfalls erkennbar (weißer Pfeil).

2.3.3 Therapie

Neben den meist symptomatischen Therapiemaßnahmen sind für MPS VI-Patienten zwei grundlegende Therapieoptionen vorhanden: Stammzelltransplantation und Enzyersatztherapie.

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT) wurde lange vor der Enzyersatztherapie konzipiert. 1981 wurde sie zuerst an einem MPS-Patienten angewandt (Vellodi et al., 1999). 1984 folgte dann die erste Transplantation bei MPS VI (Krivit et al., 1984). Bei dieser Art der Therapie wird zunächst ein gesunder Spender gesucht und Stammzellen aus peripherem Blut, Knochenmark oder Nabelschnurblut entnommen. Diese gesunden Zellen werden dann dem Empfänger transfundiert. In der Blutbahn differenzieren sie sich von Monozyten zu Makrophagen und sezernieren lysosomale Enzyme in den extrazellulären Raum. Dort werden sie von benachbarten Zellen sowie den Zielzellen aufgenommen (Taylor et al., 2019). Während diese Methode bei einigen anderen lysosomalen Speicherkrankheiten die primäre Therapieoption darstellt, ist sie aufgrund einiger Risiken bei MPS VI nur die zweite Wahl. In einer Studie an 45

MPS VI-Patienten zwischen 1982 und 2007 betrug die Überlebensrate 66% nach 1-3 Jahren und es kam bei 44% der Patienten zu einer Graft-versus-Host-Reaktion (Turbeville et al., 2011). Außerdem variiert die Effektivität dieser Therapieoption stark. Positive Effekte der Therapie waren die Verbesserung diverser Manifestationen der Erkrankung wie z.B. Gelenkmobilität, Wachstum, Lungen- und Atemwegsfunktion, der vergrößerten Gesichtszüge und Hepatosplenomegalie. Allerdings konnte andererseits die Progredienz der Dysostosis multiplex, muskuloskeletale Probleme sowie die Corneatrübung nicht verhindert werden (Harmatz and Shediach, 2017, Herskhovitz et al., 1999). Somit eignet sich die HSCT nur bei einer nicht effektiven ERT.

Die Enzyersatztherapie (ERT) ist bei MPS VI die erste Wahl. Hierbei wird rekombinantes humanes Arylsulfatase B (rhASB) mittels DNA-Technologie aus Säugetierzelllinien des chinesischen Hamsterovars (CHO) gewonnen. Im Jahr 2005 wurde rhARSB (Naglazyme[®], BioMarin Pharmaceuticals, Novato, Kalifornien, USA) von der FDA zugelassen und wird seither klinisch verwendet. Die empfohlene Dosis beträgt laut Hersteller 1mg/kg KG und wird einmal wöchentlich als intravenöse Infusion über einen Zeitraum von vier Stunden verabreicht. Es übernimmt die Funktion der enzymatischen Spaltung von den Glykosaminoglykanen Chondroitinsulfat und Dermatansulfat. Das Enzym wird durch Phosphorylierung der Mannosereste modifiziert und kann so von den Zellen aufgenommen werden (Sly et al., 2006).

Ende der 1990er Jahre fanden erste Studien zu der Wirkung von rhARSB an Tieren statt. Hierbei zeigte sich eine nahezu komplette Normalisierung und ein Rückgang der Akkumulation von GAG im Gewebe. Eine Ausnahme bildete hierbei jedoch das Knorpelgewebe und die Cornea (Crawley et al., 1997). Auch in klinischen Studien wurde eine rasche Verminderung von GAG im Urin nach Enzyersatztherapie beobachtet (Harmatz et al., 2004). Der stabilisierende Effekt und die Sicherheit der Therapie wurde fortlaufend immer wieder bestätigt (Harmatz et al., 2006, Harmatz et al., 2019). Tierversuche (Auclair et al., 2003) und Studien mit betroffenen Zwillingen und Geschwistern deuteten darauf hin, dass die Prognose und der Therapieerfolg umso besser waren, je früher mit der Therapie begonnen wurde (Furujo et al., 2011, McGill et al., 2010). So konnten auch Hendrickx et al. bei Arylsulfatase B-defizienten Mäusen (*Arsb^{m/m}*) zeigen, dass ein sehr früher Beginn der Enzyersatztherapie den Knochenumbau fast

vollständig normalisiert. Im Knorpelgewebe zeigte sich jedoch kein positiver Effekt der Enzyersatztherapie (Hendrickx et al., 2020).

Bisher gab es jedoch keine Arbeiten im Mausmodell, in denen orofaziale Pathologien bei Mukopolysaccharidose Typ VI im Fokus lagen. Es war bisher auch unklar, ob sich eine Enzyersatztherapie positiv auf die Zahn- und Kieferentwicklung bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen auswirkt. Das Ziel dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, inwiefern *Arsb^{m/m}*-Mäuse den dentalen und kraniofazialen Phänotyp der Patienten widerspiegeln und ob sich eine Enzyersatztherapie positiv auf diese Pathologien auswirkt.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Die Versuchstiere entstammen aus früheren Versuchsvorhaben (Hendrickx et al., 2020, Pohl et al., 2018) und lagen im Institut für Osteologie und Biomechanik in fixierter Form vor. Die Tierversuche wurden von der Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt (43/15 und G14/068, Org529). Es wurden Wildtypmäuse (*Arsb^{+/+}*) und MPS VI-Mäuse (*Arsb^{m/m}*) im Alter von jeweils 12 und 24 Wochen untersucht. Zusätzlich wurden 24 Wochen alte *Arsb^{m/m}*-Mäuse analysiert, denen ab der 4. bzw. 12. Lebenswoche eine Enzymersatztherapie (ERT) mit rhARSB (Naglazyme, BioMarin, Novato, Kalifornien, USA) intravenös verabreicht wurde. Hierfür wurde eine wöchentliche Einmaldosis von 1mg/kg KG bei einem Volumen von 150µl angesetzt.

3.2 Micro-Computer-Tomographie

Die Schädel der Versuchstiere wurden mittels Mikro-Computertomographie gescannt (µCT-40, SCANCO Medical, Brüttsellen, Schweiz). Die dreidimensionale Analyse erfolgte durch die eingebettete Gerätesoftware.

Für die Segmentierung und 3D-Darstellung wurden zwei verschiedene Programme mit folgendem Arbeitsablauf verwendet:

Evaluation-Programm:

1. Datensatz öffnen.
2. Die erwünschten Strukturen in verschiedenen Schichten umfahren (contouring).
3. Mithilfe des Contouring-Fensters (C...) die erste umfahrene Schicht auswählen und „Forwards“ auswählen.
Anschließend „Morph“ auswählen: das Programm analysiert die vorgegebenen Eingaben und versucht zusammenhängende Strukturen zu erkennen und automatisch zu konturieren.
4. Alle Schichten kontrollieren und bei Bedarf fehlerhafte Schichten manuell korrigieren.
5. Auf „T...“ klicken und „VOI“ für „solid objects“ auswählen.

Für den Unterkiefer wurde hierbei ein „lower threshold“ von 250 und bei ganzen Schädeln 330 genutzt. Der „upper threshold“ betrug in beiden Fällen 1000.

6. „Start Evaluation“

3D-Programm:

1. Den fertigen Datensatz öffnen.
2. Das Programm zeigt nach dem Laden nun ein 3D-Bild.
3. Mithilfe der Maus und den dazugehörigen Optionen links kann das Bild gedreht, verschoben, vergrößert und durch „Cutplanes“ und „Subdim“ angeschnitten werden.
4. In der gewünschten Ansicht können nach dem Laden die Längen gemessen werden. Hierfür den Mauszeiger auf einen Anfangspunkt bewegen, „Strg“-Taste gedrückt halten, den Mauszeiger zum Endpunkt bewegen und die „Strg“-Taste loslassen. Es wird die entsprechende Länge in Millimeter angezeigt.

In Abbildung 2 sind die entsprechenden Messpunkte für die Mandibula dargestellt.

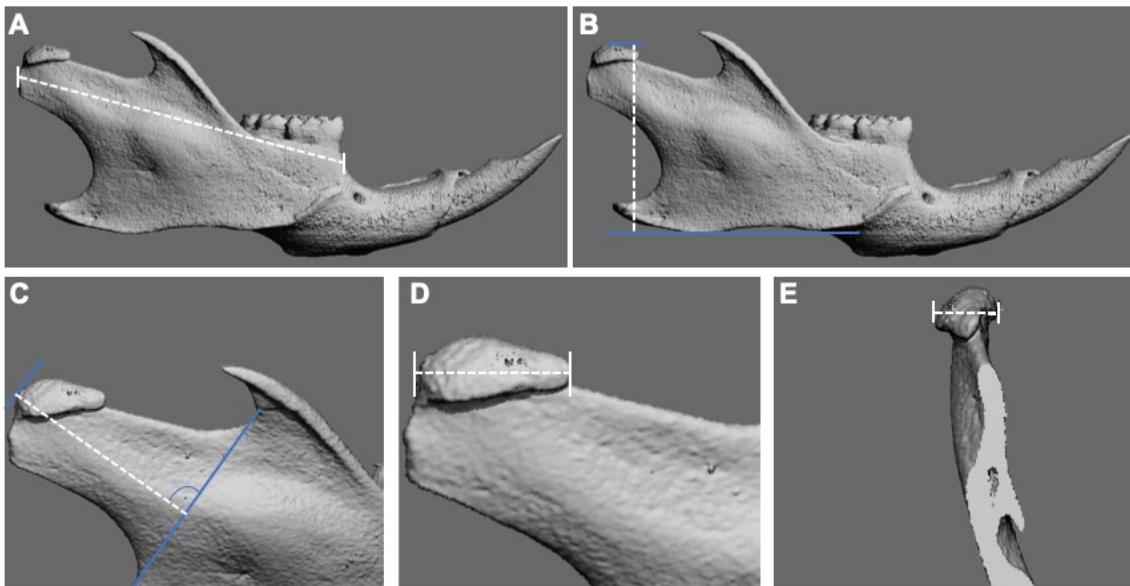


Abbildung 2: Darstellung der Messparameter an der Mandibula. (A) Länge der Mandibula: dorsalster Rand des Kondylus - ventralster Vorsprung des Alveolarfortsatzes. (B) Höhe der Mandibula: kranialster Rand des Gelenkköpfchens - kaudalster Rand der Mandibula. (C) Länge des Processus condylaris: Orthogonale Gerade zu einer Basislinie zwischen den Incisurae semilunares bis zum dorsokranielsten Punkt des Kondylus. (D) Länge des Kondylus: ventralster Rand – dorsalster Rand des Gelenkköpfchens. (E) Breite des Kondylus: medialster Rand – lateralster Rand des Gelenkköpfchens.

Für Schnittbild-Ansichten im Bereich der Zähne ist ein abweichendes Vorgehen im 3D-Programm notwendig:

1. Datensatz auswählen und die Datei mit „.aim.“-Suffix auswählen.
2. Nachdem das Bild geladen ist, „Options“ auswählen und den „Lower Value“ auf 0 setzen.
3. Das Bild wird nochmals geladen. Nun kann man die Hintergrundfarbe ändern und durch „Cutplanes“ tiefer durch das Objekt hindurchfahren und durch Drehen und Ändern der Werte die gewünschte Ebene suchen.

Die bereits vorhandenen Rohdaten wurden auf Speichermedien archiviert und bei diesem Projekt auf den Computer übertragen. Anschließend wurden die entsprechenden μ CT-Schichten teils manuell und teils automatisiert ausgewählt, um den Unterkiefer isoliert darzustellen.

Nachdem die Software ein dreidimensionales Bild errechnet hat, wurden Längenmessungen am Kiefergelenk und am Unterkieferkörper vorgenommen (Abbildung 2). Abschließend wurden aus verschiedenen Ansichten Bilder vom Schädel, der Mandibula und der Zähne gespeichert.

Bilder von den Zähnen aus lingualer Ansicht wurden nachher auf den Computer geladen und mithilfe der Software ImageJ (Version 1.52q, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) die freie Wurzeloberfläche ausgemessen (siehe Abbildung 3). Hierdurch wurde ein Vergleich des Knochenrückgangs ermöglicht.

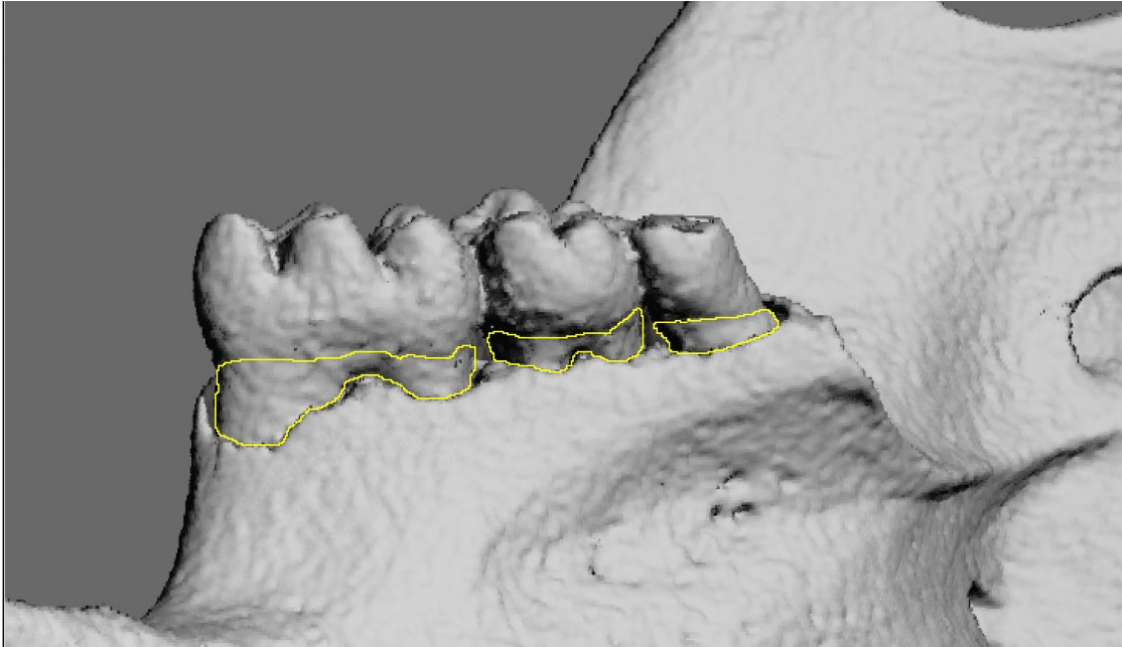


Abbildung 3: Screenshot aus ImageJ bei Messung der Wurzeloberfläche. Die sichtbare Wurzeloberfläche wurde mit dem „brush selection tool“ manuell markiert (gelbe Umrandung), um die Fläche zu errechnen. Als Begrenzung wurde koronal die Schmelz-Zement-Grenze und apikal der alveoläre Knochenverlauf genutzt.

3.3 Kontaktradiographie

Für die weiteren Untersuchungen wurden die Köpfe dann in der Medianebene in zwei Hälften geteilt. Die rechte Kopfhälfte wurde anschließend mittels eines Röntgengerätes (Faxitron Bioptics, Tucson, Arizona, USA) für 23ms bei 60kV geröntgt.

3.4 Histologie

Nach der Kontaktradiographie und dem Zuschnitt wurden die Präparate in eine Einbettkassette platziert. Im Anschluss wurden die Präparate in einer Entkalkungslösung (USEDECALC, MEDITE Medical GmbH, Burgdorf) für 14-17 Tage gelegt. Es erfolgte hierbei ein Wechseln der Flüssigkeit nach jeweils 3 Tagen.

Nach der Entkalkung erfolgte nun das Entwässern im Autotechnikon über Nacht. Innerhalb von 12 Stunden wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und Fixativ sowie Gewebeflüssigkeit durch Paraffin ersetzt.

Der genaue Ablauf der Lösungen im Autotechnikon ist wie folgt:

Ablauf im Autotechnikon		
1.	70% Ethanol	1h
2.	70% Ethanol	1h
3.	80% Ethanol	1h
4.	96% Ethanol	1h
5.	96% Ethanol	1h
6.	Abs. Ethanol	1h
7.	Abs. Ethanol	1h
8.	Xylol	1h
9.	Xylol	1h
10.	Paraffin 60°C	1h
11.	Paraffin 60°C	1h
12.	Paraffin 60°C	1h

Als Nächstes wurden die Präparate in einer für das Mikrotom passenden Einbettkassette platziert und mit heißem Paraffin übergossen und anschließend auf einer Kühlplatte bei ca. -15°C gekühlt (TES 99 Paraffineinbettssystem, MEDITE Medical GmbH, Burgdorf).

Die gekühlten Paraffinblöcke wurden dann mit einem Mikrotom (Leica Biosystems RM2245, Leica Biosystems, Wetzlar) in 30µm-Schritten angeschnitten. Unter ständiger mikroskopischer Kontrolle wurde überprüft, ob man die jeweilige Schnittebene erreicht hat. Das Ziel war hierbei die in Abbildung 4 dargestellten Strukturen Zahn, Unterkieferkörper und Kiefergelenk in der Frontalebene von frontal nach dorsal anzuschneiden. In diesen Ebenen wurden dann Schnitte mit einer Schichtdicke von 3µm angefertigt. Die Schnitte wurden danach vorsichtig in ein Wasserbad (pfm Waterbath 1000, pfm medical ag, Köln) mit 49°C heißem, destilliertem Wasser überführt und auf Überlagerungen und Defekte kontrolliert. Danach wurden die Schnitte mit einem polysinbeschichteten Objektträger (Thermo-Scientific Polysine Slides, Menzel GmbH und Co KG, Braunschweig) aus dem Wasserbad aufgenommen und kurz luftgetrocknet. Es erfolgte erneut eine mikroskopische Kontrolle.

Danach wurden die Objektträger in einer Glasküvette für 1 bis 3 Tage im Wärmeschrank bei 37° gelagert. Nun konnten die Schnitte entweder für die

Färbung weiterverwendet oder als Leerschnitte für spätere Färbungen bei Zimmertemperatur gelagert werden. Für alle Färbungen wurden die Paraffinschnitte für mindestens 30 Minuten in den Ofen (Heraeus, Hanau) bei 60°C gestellt, um sie zu fixieren. Danach wurden die Proben nach jeweiligem Färbeprotokoll bearbeitet.

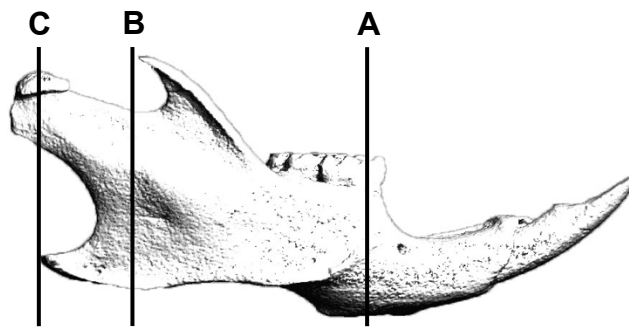


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Unterkiefers einer Maus. Schnittebene A - Zahn, B - Unterkieferkörper und C - Kiefergelenk

3.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung wurde vor allem für die Bereiche Zahn und Kiefer genutzt.

HE-Färbeprotokoll	
3x Xylol	je 5 min entparaffinieren
2x Ethanol abs.	je 2 min
Ethanol 96%	2 min
Ethanol 80%	2 min
Ethanol 70%	2 min
Aqua dest.	3-5x eintauchen
Mayers Hämalaunlösung	5 min (ggf. filtrieren)
Aqua dest.	mehrfach eintauchen
0,1% HCL-Alkohol	2-3x eintauchen
Leitungswasser	10 min unter fließendem Wasser bläuen
Eosinlösung 0,1%	5 min
Ethanol 80%	mehrfach eintauchen
Ethanol 96%	mehrfach eintauchen
2x Ethanol abs.	Je 2 min

3x Xylol	Je 5 min
Eindecken	mit Eukitt

Färbeergebnis:

blau-violett: Zellkerne, Bakterien, Kalk

rot: Bindegewebe, Protein, Keratin, Cytoplasma,
Interzellulärsubstanzen

3.4.2 Toluidinblau-Färbung

Toluidinblau eignet sich besonders für die Färbung des Kiefergelenks und dessen einzelner Knorpelschichten.

Toluidinblau-Färbeprotokoll	
3x Xylol	Je 5 min entparaffinieren
2x Ethanol abs.	Je 2 min
Ethanol 96%	2 min
Ethanol 80%	2 min
Ethanol 70%	2 min
Aqua dest.	3-5x eintauchen
Toluidinblau 1%, pH 4,5	30 min
Aqua dest.	mehrfach eintauchen
Ethanol 80%	mehrfach eintauchen
Ethanol 96%	mehrfach eintauchen
2x Ethanol abs.	Je 2 min
3x Xylol	Je 5 min
Eindecken	mit Eukitt

Färbeergebnis:

Dunkelblau: Zellkerne

Blau: Osteoblasten

Türkisblau: Osteoklasten

Hellblau: mineralisierter Knochen

Violett: Knorpel

3.4.3 Safranin O-Färbung

Die Safranin O-Färbung wird verwendet, um unter anderem Knorpelgewebe zu färben und wurde daher für die Färbung von Glykosaminoglykanen im Kiefergelenk verwendet.

Safranin O-Färbeprotokoll	
3x Xylol	je 5 min entparaffinieren
2x Ethanol abs.	je 2 min
Ethanol 96%	2 min
Ethanol 80%	2 min
Ethanol 70%	2 min
Aqua dest.	3-5x eintauchen
Weigerts Eisenhämatoxylin	7 min
Leitungswasser	10 min unter fließendem Wasser spülen
Fast Green 0,08%	3 min
Essigsäure 1%	10 sek
Safranin O 0,1%	5 min
Essigsäure 0,5%	1x kurz eintauchen
2x Aqua dest.	mehrfach eintauchen
Ethanol 80%	mehrfach eintauchen
Ethanol 96%	mehrfach eintauchen
2x Ethanol abs.	Je 2 min
2x Xylol	Je 10 min
Eindecken	Eukitt
Färbeergebnis:	
Zellkerne:	schwarz
Zytoplasma:	grau-grün
Knorpel:	orange bis rot

3.5 Histologische Auswertung

Für die Auswertung kamen ein Mikroskop (Axio Scope.A1, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) und eine Kamera zum Fotografieren (AxioCam, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) zum Einsatz. Hierbei wurde mit 1,25- bis 40-facher Vergrößerung lichtmikroskopisch unter Einhaltung reproduzierbarer Belichtungs- und Farbverhältnisse gearbeitet. Mit der Software AxioVision (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) wurden die Abbildungen angefertigt.

Für die histologische Analyse wurde der Schädel sukzessive in Richtung dorsal geschnitten und Schnitte auf Höhe des rechten Kiefergelenks unter anderem mit Toluidinblau gefärbt. Die Toluidinblau-Färbung ist eine kationische Färbung und hat eine hohe Affinität zu Proteoglykanen im Knorpel. Außerdem ist die Färbung relativ intensiv durch die stärkere Bindung an Sulfat in den Proteoglykanen (Camplejohn and Allard, 1988). Somit eignet sich diese Färbemethode sehr gut, um die verschiedenen Schichten am Gelenk distinktiv zu erfassen. Dies war von großer Bedeutung, um degenerative Veränderungen mikroskopisch zu begutachten. Eine Übersicht über die mikroskopische Anatomie des Kiefergelenks bei Mäusen ist in Abbildung 5 dargestellt und beschrieben.

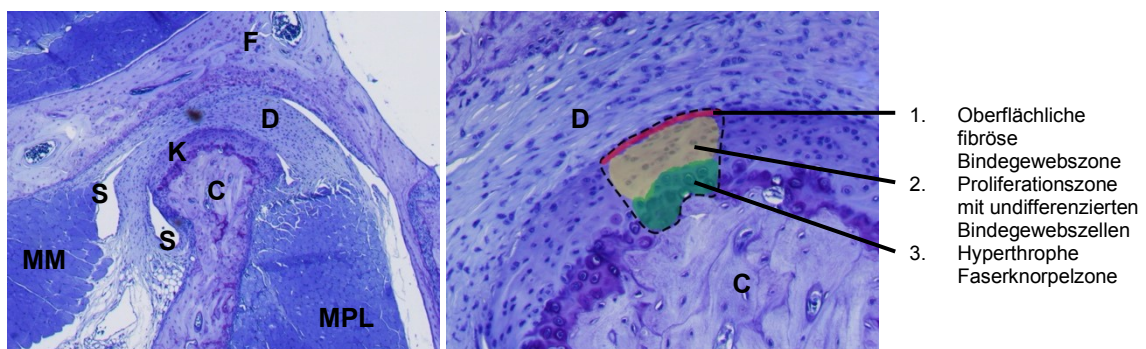


Abbildung 5: Histologische Schnitte des Kiefergelenks von Mäusen in frontaler Ansicht mit anatomischen Kennzeichnungen. Links: Toluidinblau-Färbung mit 5-facher Vergrößerung. F = Fossa mandibularis, K = Gelenkknorpel, C = Caput mandibulae, S = Synovialmembran, MM = Musculus masseter, MPL = Musculus pterygoideus lateralis. Rechts: Toluidinblau-Färbung mit 20-facher Vergrößerung und Darstellung der Zellorganisation im Gelenkknorpel. D = Discus articularis, C = Caput mandibulae.

Die Ausdehnung des Saumepithels von der Schmelz-Zement-Grenze bis zum apikalsten Punkt wurde mithilfe der Software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) gemessen.

3.6 Statistische Auswertung

Die Darstellung der Diagramme und statistische Analyse der Daten erfolgte mit der Software GraphPad PRISM 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, Kalifornien, USA).

Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Tukey post-hoc Testung verwendet. Der Signifikanzwert, oder auch p-Wert genannt, wurde wie folgt mit Sternen gekennzeichnet: $p \leq 0,05 = \text{„*“}$, $p \leq 0,01 = \text{„**“}$ und $p \leq 0,001 = \text{„***“}$. Die Diagramme zeigen die jeweiligen Mittelwerte als Säulen und Standardabweichungen als Whisker.

4 Ergebnisse

4.1 Kieferexostosen und Hypertrophie der Kaumuskulatur bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen

Zunächst wurden die Schädel von Mäusen im Alter von 24 Wochen mittels μ CT untersucht und in ihrer Morphologie verglichen. Analysiert wurden hierbei Wildtypmäuse (*Arsb^{+/+}*), *Arsb^{m/m}*-Mäuse ohne Therapie sowie *Arsb^{m/m}*-Mäuse, die ab der 12. (ERT 12-24w) bzw. 4. Woche (ERT 4-24w) eine Enzymersatztherapie erhielten. Im Vergleich zu *Arsb^{+/+}*-Mäusen zeigten *Arsb^{m/m}*-Mäuse Knochenexostosen am Unterrand der Mandibula (Abbildung 6, schwarze Pfeile). Diese sind vor allem in der frontalen Ansicht gut zu erkennen (Abbildung 6, unten). Außerdem wurden weitere Knochenexostosen am Schädel bemerkt. Diese befanden sich am Jochbogen (Arcus zygomaticus) (Abbildung 6, rote Pfeile) und an der kranialen Begrenzung der Fossa temporalis (Abbildung 6, grüne Pfeile). Bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen mit ERT entwickelten sich ebenfalls Knochenexostosen an den zuvor benannten Strukturen. Allerdings waren diese nach Enzymersatztherapie etwas weniger stark ausgebildet.

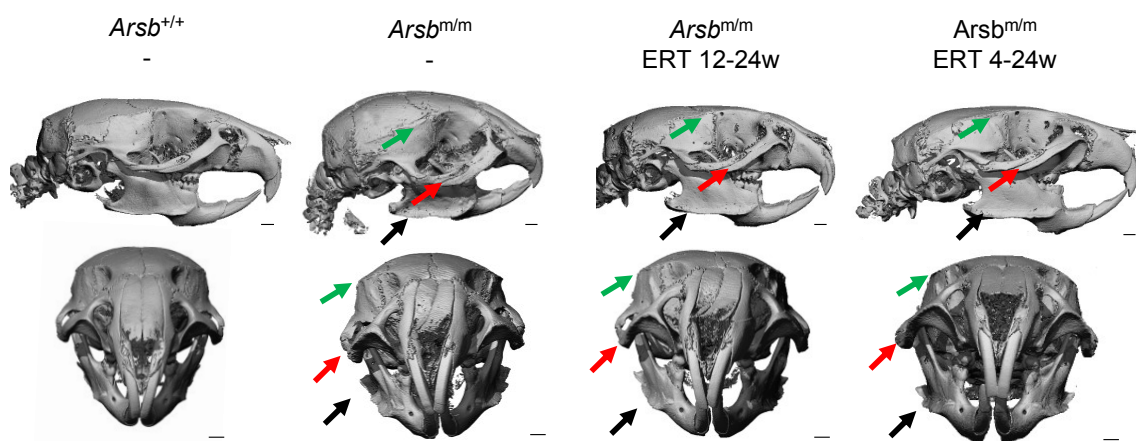


Abbildung 6: Exostosen der Schädelknochen bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen. μ CT-Aufnahmen von 24 Wochen alten Wildtypmäusen (*Arsb^{+/+}*), *Arsb^{m/m}*-Mäusen ohne Therapie sowie *Arsb^{m/m}*-Mäusen mit Enzymersatztherapie ab der 12. (ERT 12-24w) bzw. 4. Woche (ERT 4-24w). Ansicht des Schädels von lateral (oben) und frontal (unten). Gekennzeichnet sind die Knochenexostosen am Unterrand der Mandibula (schwarze Pfeile), Arcus zygomaticus (rote Pfeile) und Oberrand der Fossa temporalis (grüne Pfeile). Maßstabsbalken: 1mm.

Um die Ursache der Knochenexostosen näher zu untersuchen, erfolgte als Nächstes die histologische Untersuchung der Schädel, indem Paraffinschnitte in der Frontalebene im Bereich zwischen Processus coronoideus und Processus

condylaris durchgeführt und mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbt wurden. Bei Wildtypmäusen waren keine Knochenexostosen zu erkennen und der Unterkiefer hatte eine L-förmige Form (Abbildung 7, weiß gestrichelte Linie). Bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen waren jedoch sehr deutlich die Exostosen am Unterrand der Mandibula sichtbar, welche bereits auf den μ CT-Aufnahmen zu beobachten waren. Die Mandibula von *Arsb^{m/m}*-Mäusen wies daher eine T-förmige Form auf (Abbildung 7, weiß gestrichelte Linie). Weiterhin war sehr auffällig, dass bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen der Knochen mehr Porositäten aufwies, welche nicht nur in der Mandibula vorzufinden waren, sondern auch im Arcus zygomaticus (Abbildung 7, Kästchen 2) sowie Processus pterygoideus des Os sphenoidale (Abbildung 7, Kästchen 3). Ebenfalls war der Knochen an den erwähnten Strukturen verdickt und vergrößert.

Arsb^{m/m}-Mäuse mit ERT (12-24 Wochen) entwickelten ebenfalls Knochenexostosen mit Porosität. Diese waren jedoch insgesamt kleiner und beim Unterrand der Mandibula an der lateralen Seite weniger stark ausgebildet. *Arsb^{m/m}*-Mäuse mit ERT ab der 4. Woche (4-24 Wochen) zeigten histologisch eine noch höhere Ähnlichkeit zu Wildtypmäusen. Die Knochenexostose am Unterrand der Mandibula war nur gering ausgeprägt. Ebenso erschien der Knochen insgesamt weniger stark vergrößert sowie weniger porös im Vergleich zu den *Arsb^{m/m}*-Mäusen mit späterem Beginn der Enzyersatztherapie (ERT 12-24w).

Neben den knöchernen Veränderungen wurden auch muskuläre Veränderungen bemerkt. Betrachtet wurden hierbei der lateral der Mandibula gelegene Musculus masseter und der medial davon gelegene Musculus pterygoideus medialis (Abbildung 7, gelb gestrichelte Linien). Beide Muskeln, vor allem der Musculus masseter, wiesen bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen ein größeres Volumen auf als in der Wildtypgruppe. Die Kaumuskulatur erschien bei *Arsb^{m/m}*-Mäuse mit ERT (12-24 Wochen und 4-24 Wochen) im Vergleich zu Wildtypmäusen ebenfalls vergrößert. Insgesamt konnten damit die auf den μ CT-Bildern erkennbaren Knochenexostosen histologisch bestätigt werden. Außerdem konnte histologisch eine vermehrte Porosität im Bereich der Knochenexostosen festgestellt werden, die bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen mit Enzyersatztherapie weniger stark ausgebildet war.

Interessanterweise zeigten alle *Arsb^{m/m}*-Mäuse eine Hypertrophie der Kiefermuskulatur.

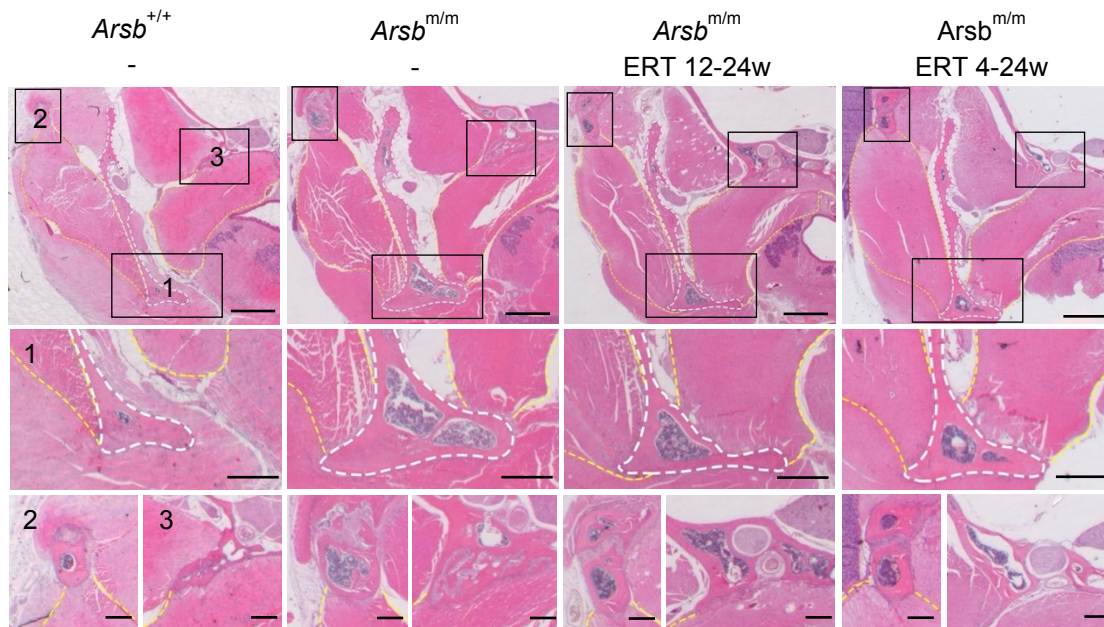


Abbildung 7: Histologien der Mandibula von Wildtyp- (*Arsb^{+/+}*), MPS VI- (*Arsb^{m/m}*) und MPS VI-Mäusen mit Enzymersatztherapie (*Arsb^{m/m}* ERT 12-24w und *Arsb^{m/m}* ERT 4-24w) in der Frontalebene. Der Unterrand der Mandibula (1), Arcus zygomaticus (2) und Processus pterygoideus (3) sind in der mittleren und unteren Reihe vergrößert dargestellt. Die Begrenzung der Mandibula ist mit einer weiß gestrichelten Linie gekennzeichnet. Die Muskelschlinge, gebildet durch Musculus masseter und Musculus pterygoideus medialis, wurde mit gelb gestrichelter Linie umfahren. Maßstabsbalken: Oben 1mm, Mitte 500µm, Unten 250µm.

4.2 Degenerative Veränderungen des Zahnhalteapparates bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen

Da viele MPS VI-Patienten Veränderungen an den Zähnen aufweisen und zwei der anfangs vorgestellten Patienten einen starken alveolären Knochenverlust zeigten, wurden als Nächstes die Zähne und der Zahnhalteapparat bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen untersucht.

Die Analyse der Zähne erfolgte zunächst anhand von µCT-Bildern. Dafür wurden 3D-Rekonstruktionen parallel zur Okklusionsebene aufgenommen und µCT-Schnittbilder angefertigt (Abbildung 8).

Wildtypmäuse wiesen einen physiologischen Zahndurchbruch mit normaler Struktur des Alveolarknochens auf (Abbildung 8 oben). In der Schnittbildansicht (Abbildung 8 unten) zeigte sich bei Wildtypmäusen eine normgerechte Schmelz- und Dentinstruktur der Zähne. Es konnten keine Zysten oder sonstigen Pathologien festgestellt werden. Der proximale Knochen verfügte über ein

normales Niveau. *Arsb^{m/m}*-Mäuse zeigten ebenfalls einen normalen Zahndurchbruch und eine normale Schmelz- und Dentinstruktur. Zysten waren nicht erkennbar. Es konnte jedoch bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen ein deutlicher Knochenabbau an den Zähnen festgestellt werden. Der interradikuläre Knochen, der bei den Wildtypmäusen auf Höhe des Pulpencavumbodens lag, wies bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen einen deutlichen Abbau auf (Abbildung 8 unten, weißer Pfeil). Um den Knochenverlust bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen zu quantifizieren, wurde die freie sichtbare Wurzelfläche von der Schmelz-Zement-Grenze bis zum Alveolarknochen ausgemessen. 12 und 24 Wochen alte *Arsb^{m/m}*-Mäuse wiesen im Vergleich zu ihren gleichaltrigen Wildtypgruppen einen erhöhten Knochenverlust auf. Dieser war so stark, dass die Bifurkation der Molaren exponiert wurde (Abbildung 8, oben, weiße Pfeile). *Arsb^{m/m}*-Mäuse mit ERT (12 – 24 Wochen) verzeichneten ebenfalls einen stark erhöhten Knochenverlust im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe. Auch hier waren Zahnhälsen und Wurzelfurkationen exponiert (Abbildung 8, oben, weiße Pfeile). Interessanterweise konnte bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen, die eine frühe Enzyersatztherapie erhielten (im Alter von 4 bis 24 Wochen), kein Knochenverlust festgestellt werden. Das approximale Knochenniveau war auch im Schnittbild nahezu identisch mit dem von Wildtypmäusen (Abbildung 8 unten).

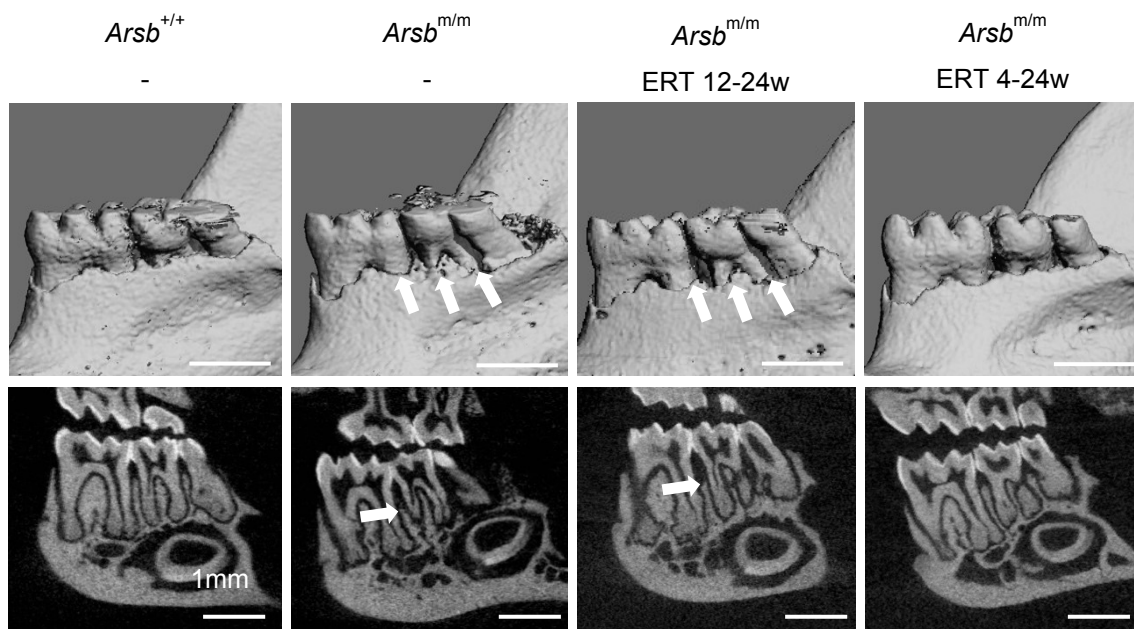


Abbildung 8: 3D-Rekonstruktion der Zähne aus lingualer Ansicht sowie µCT-Schnittbildansichten von 24 Wochen alten Wildtyp (*Arsb^{+/+}*), MPS VI- (*Arsb^{m/m}*) und MPS VI-Mäusen mit Enzyersatztherapie (*Arsb^{m/m}* ERT 12-24w und *Arsb^{m/m}* ERT 4-24w). Oben: 3D-Ansicht mit Kennzeichnung des Alveolarknochenverlaufes (weiße Pfeile). *Arsb^{m/m}*-Mäuse ohne Therapie und *Arsb^{m/m}*-Mäuse mit ERT (12-24w) zeigen im Vergleich zu Wildtypmäusen

einen erhöhten Knochenverlust, sodass Zahnhäse und Wurzelfurkationen exponiert sind. *Arsb^{m/m}* mit früherem ERT-Beginn (4-24w) weisen keinen erhöhten Knochenverlust auf. Unten: Schnittbildansicht mit Kennzeichnung der approximalen Knochenhöhe (weiße Pfeile). Hier konnten die Befunde bestätigt werden. Maßstabsbalken: 1mm.

Bei der Messung der freien Wurzeloberfläche konnte errechnet werden, dass im Vergleich zu 12 Wochen alten Wildtypmäusen, 12 Wochen alte *Arsb^{m/m}*-Mäuse einen 40% höheren Knochenverlust aufwiesen. 24 Wochen alte *Arsb^{m/m}*-Mäuse zeigten im Vergleich zu 24 Wochen alten Wildtypmäusen 42% mehr Knochenverlust. *Arsb^{m/m}*-Mäuse mit ERT (12 – 24 Wochen) wiesen im Gegensatz zu 24 Wochen alten Wildtypmäusen ebenfalls einen ähnlich hohen Knochenverlust auf. *Arsb^{m/m}*-Mäuse mit früher ERT zeigten allerdings nahezu gleiche Verhältnisse wie bei der Wildtypgruppe (Abbildung 9).

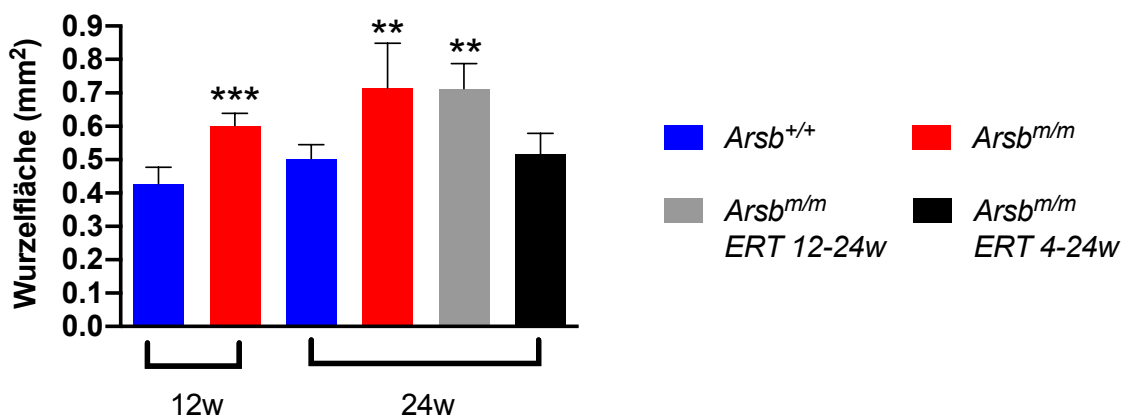


Abbildung 9: Auswertung der freien Wurzeloberfläche von 12 Wochen alten Wildtyp- (*Arsb^{+/+}*) und *Arsb^{m/m}*-Mäusen sowie von 24 Wochen alten Wildtyp- (*Arsb^{+/+}*), *Arsb^{m/m}*-Mäusen und *Arsb^{m/m}*-Mäusen mit Enzymersatztherapie (*Arsb^{m/m}* ERT 12-24w und *Arsb^{m/m}* ERT 4-24w).

Um den in den μ CT-Aufnahmen ersichtlichen Knochenabbau genauer zu untersuchen, wurden als Nächstes histologische Schnitte an den Zähnen durchgeführt und einer HE-Färbung unterzogen. Bei der mikroskopischen Auswertung wurde unter anderem das Saumepithel, welches um den Zahn angeheftet ist und den Übergang zwischen Gingiva und Zahn darstellt, untersucht. Bei Wildtypmäusen reichte das Saumepithel physiologisch bis kurz unterhalb der Schmelz-Zement-Grenze. Bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen konnte im Vergleich zu Wildtypmäusen ein sogenanntes „Herunterwachsen“ des Saumepithels beobachtet werden. Bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen mit frühem (ERT 4-24w) und spätem Beginn (ERT 12-24w) der Enzymersatztherapie waren diese Veränderungen des Saumepithels nicht klar ersichtlich (Abbildung 10). Eine Quantifizierung der Tiefe des Saumepithels von der Schmelz-Zement-Grenze bis

zur seiner apikalsten Ausdehnung gemessen (Abbildung 10B, weiße Dreiecke) zeigte in der Tat nur bei nicht therapierten *Arsb^{m/m}*-Mäusen eine signifikante Zunahme der mittleren Länge im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 11).

Bei einer genaueren Analyse des Desmodonts und des Alveolarknochens (Abbildung 10C und D) konnte zudem festgestellt werden, dass die Osteozyten der *Arsb^{m/m}*-Mäuse eine Hypertrophie aufwiesen (weiße Pfeile). Die Osteozytenlakunen von Wildtypmäusen enthielten außerdem Zellkerne, welche bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen teilweise komplett fehlten. Auch bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen mit Enzymersatztherapie (12 bis 24 und 4 bis 24 Wochen) konnten diese Veränderungen festgestellt werden. Hier zeigten sich ebenfalls hypertrophe Osteozytenlakunen ohne bzw. mit randständigen Zellkernen.

Darüber hinaus hatten die parodontalen Fasern, die zur Aufhängung des Zahnes in der knöchernen Alveole dienen und vom Knochen aus in die Wurzeloberfläche inserieren, bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen eine relativ aufgelockerte Struktur im Gegensatz zu Wildtypmäusen. Bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen mit Enzymersatztherapie erschien das Desmodont bereits weniger stark aufgelockert.

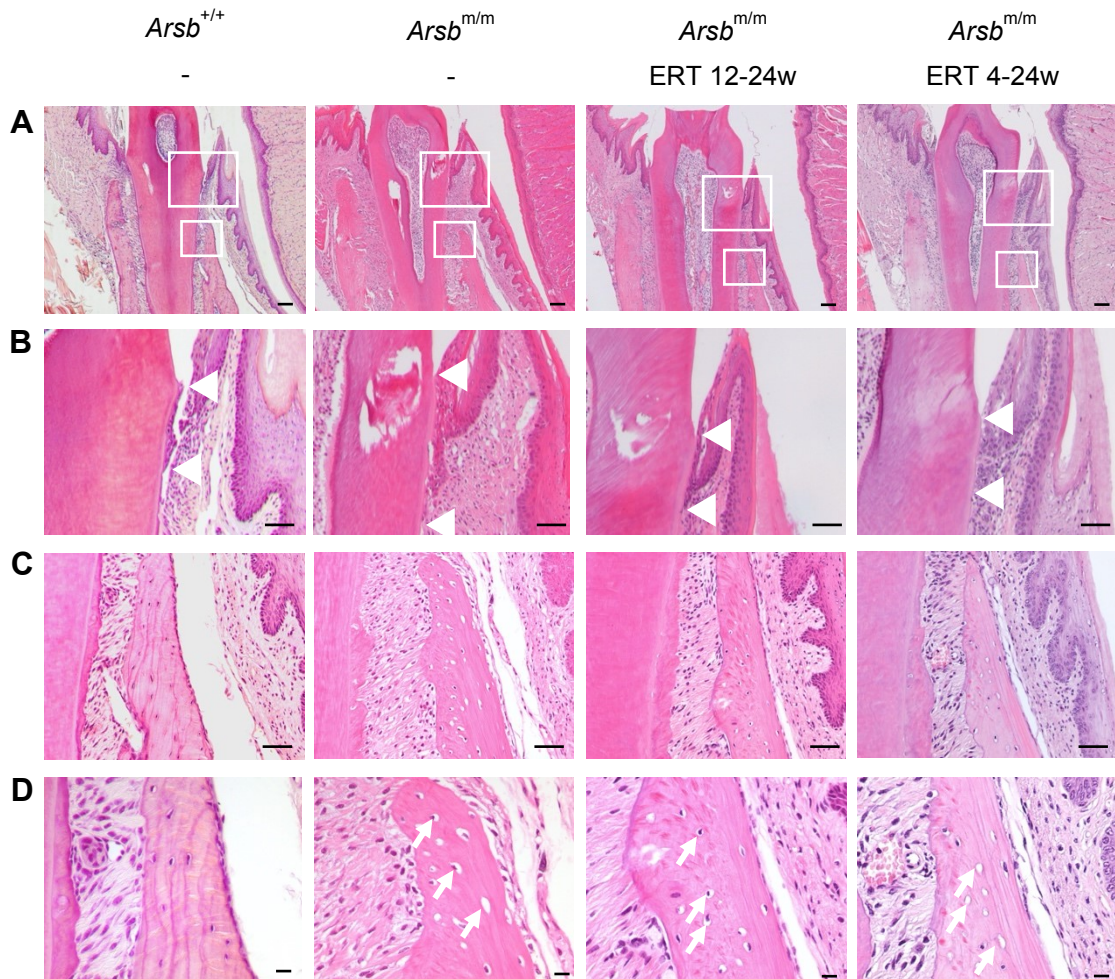


Abbildung 10: Histologien der Zähne und des Zahnhalteapparates von 24 Wochen alten Wildtyp- (*Arsb*^{+/+}), *Arsb*^{m/m}-Mäusen und *Arsb*^{m/m}-Mäusen mit Enzyersatztherapie (*Arsb*^{m/m} ERT 12-24w und *Arsb*^{m/m} ERT 4-24w). Ansicht in der Frontalebene. (A) Übersicht der Zähne mit (B) Vergrößerung auf das Saumepithel. Schmelz-Zement-Grenze und apikales Ende des Saumepithels mit weißen Pfeilen markiert. Maßstabsbalken 100µm. (C) Ansicht auf den Zahnhalteapparat: Wurzelzement, desmodontale Fasern und Alveolarknochen. Maßstabsbalken: 50µm. (D) 40-fache Vergrößerung auf den Alveolarknochen. Vergrößerte Zellen im Knochen bei *Arsb*^{m/m}, *Arsb*^{m/m} ERT 12-24w und 4-24w wurden mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. Maßstabsbalken: 10µm.

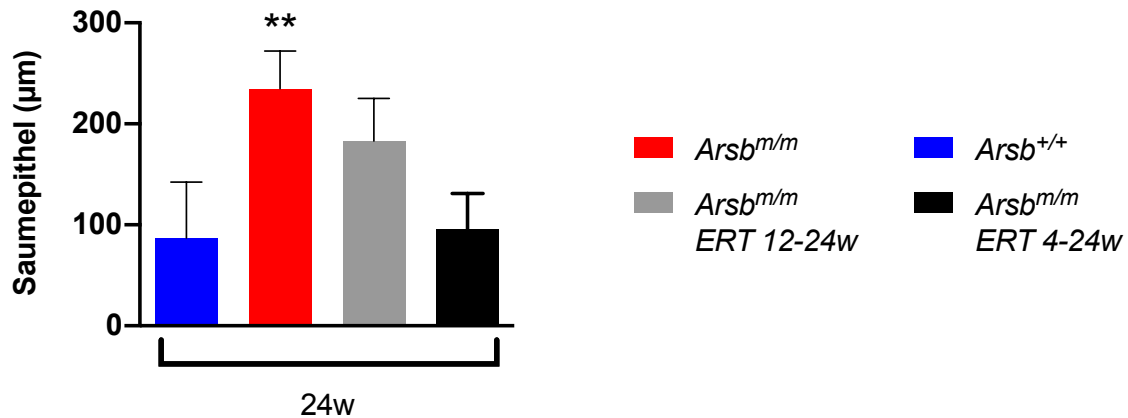


Abbildung 11: Quantifizierung der Tiefe des Saumepithels bei 24 Wochen alten Wildtyp- (*Arsb*^{+/+}), *Arsb*^{m/m}-Mäusen und *Arsb*^{m/m}-Mäusen mit Enzymersatztherapie (*Arsb*^{m/m} ERT 12-24w und *Arsb*^{m/m} ERT 4-24w).

Zusammenfassend zeigen *Arsb*^{m/m}-Mäuse im Gegensatz zu Wildtypmäusen einen erhöhten alveolären Knochenabbau. *Arsb*^{m/m}-Mäuse mit ERT (12-24 Wochen) weisen ebenfalls einen hohen Knochenverlust auf. Bei *Arsb*^{m/m}-Mäusen mit früher ERT (4-24 Wochen) hingegen zeigte sich kein Knochenverlust. Außerdem befindet sich das Saumepithel bei *Arsb*^{m/m}-Mäusen weiter apikal als bei Wildtypmäusen. Bei *Arsb*^{m/m}-Mäusen mit früher ERT (4-24 Wochen) zeigte sich hingegen eine deutliche Verbesserung und eine nahezu physiologische Länge des Saumepithels. Bei *Arsb*^{m/m}-Mäusen wurden außerdem vergrößerte Osteozyten im Alveolarknochen sowie eine sehr aufgelockerte Struktur der desmodontalen Fasern mit hypertrophen Zellen festgestellt. Beides war bei *Arsb*^{m/m}-Mäusen mit ERT (beide Gruppen) weniger stark ausgeprägt.

4.3 Untersuchung des Kiefergelenks

MPS VI-Patienten weisen röntgenologisch erhebliche Resorptionen an den Kondylen der Mandibula auf (Abbildung 1). Hierdurch kommt es zu einer Hypoplasie der Kondylen und Limitationen der Beweglichkeit des Kiefergelenks. Um zu untersuchen, ob *Arsb*^{m/m}-Mäuse diese Veränderungen ebenfalls aufweisen, wurden die Schädelhälften der Mäuse von lateral mit dem Fokus auf das Kiefergelenk mittels Kontaktradiografie geröntgt.

In Abbildung 12 erkennt man deutliche Unterschiede zwischen Wildtyp- und den *Arsb*^{m/m}-Mäusen. Zum einen besitzt der Knochen im Bereich der Schädelkalotte bei *Arsb*^{m/m}-Mäusen eine höhere Röntgendichte mit netzartiger Struktur. Außerdem ist bei *Arsb*^{m/m}-Mäusen im Bereich der Unterkante der Mandibula eine

höhere Röntgendichte zu erkennen, da sich hier der Unterkiefer aufgrund der vorliegenden Knochenexostosen in latero-medialer Ebene ausdehnt. Bei näherer Untersuchung des Kiefergelenks zeigte sich bei Wildtypmäusen eine physiologisch rund-konvexe Form des Kiefergelenks. Bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen ohne ERT war das Kiefergelenk am stärksten in seiner Form verändert und wies Exostosen im distalen Bereich auf. Diese Exostosen waren auch bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen mit später ERT (12-24 Wochen) präsent. Allerdings war der Kondylus hier in seiner Form weniger stark verändert. Bei früher ERT (4-24 Wochen) zeigte sich röntgenologisch eine normale Knochenstruktur. Auch die Unterkante der Mandibula zeigte keine erhöhte Röntgendichte. Insgesamt wiesen Wildtypmaus und *Arsb^{m/m}*-Mäuse mit ERT (4-24 Wochen) eine hohe Ähnlichkeit zueinander auf.

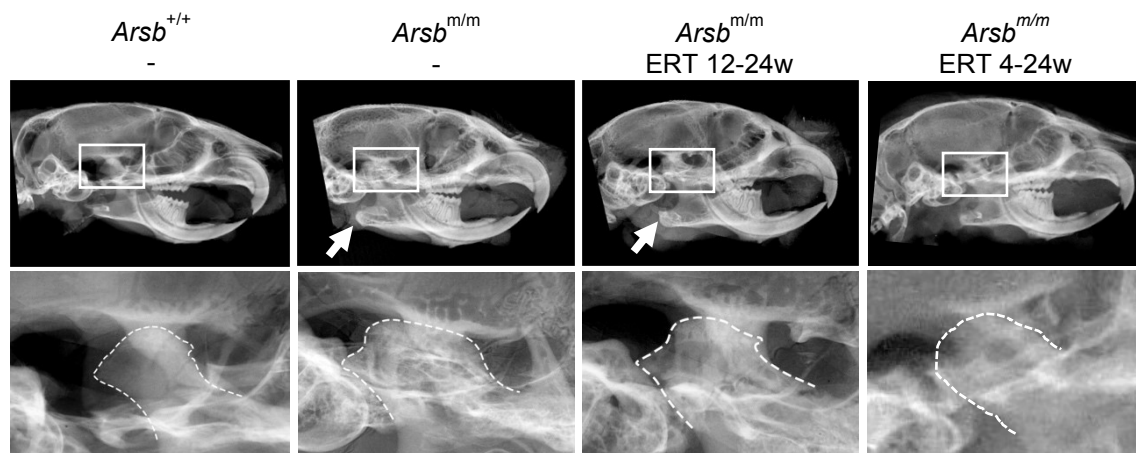


Abbildung 12: Kontaktradiographie von Schädelhälften in lateraler Ansicht von 24 Wochen alten Wildtyp-, *Arsb^{m/m}*-Mäusen und *Arsb^{m/m}*-Mäusen mit Enzymersatztherapie (*Arsb^{m/m}* ERT 12-24w und *Arsb^{m/m}* ERT 4-24w). Oben: Bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen ist im Bereich der Unterkante der Mandibula eine höhere Röntgendichte des Knochens zu erkennen (weißer Pfeil). Diese erhöhte Röntgendichte wird vermutlich durch die bereits vorgestellten lateralen und medialen Knochenexostosen verursacht. Unten: Vergrößerte Darstellung des Kiefergelenks. Die weiß gestrichelte Umrandung des Condylus mandibulae verdeutlicht die irreguläre Form der Kondylen bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen ohne Therapie bzw. später ERT. *Arsb^{m/m}*-Mäuse mit früher ERT zeigen hingegen einer normalisierte Form des Kondylus.

Um die makroskopische Morphologie des Unterkiefers und insbesondere des Condylus mandibulae näher zu untersuchen, wurden der Unterkiefer als Nächstes mittels Mikro-Computertomographie analysiert und vermessen (Abbildung 13). Zunächst wurde die Länge und Höhe der Mandibula sowie die Länge des Processus condylaris ausgemessen. Alle drei Parameter wiesen keine signifikanten Veränderungen zwischen Wildtyp- und *Arsb^{m/m}*-Mäusen mit und ohne Therapie auf (Daten nicht gezeigt).

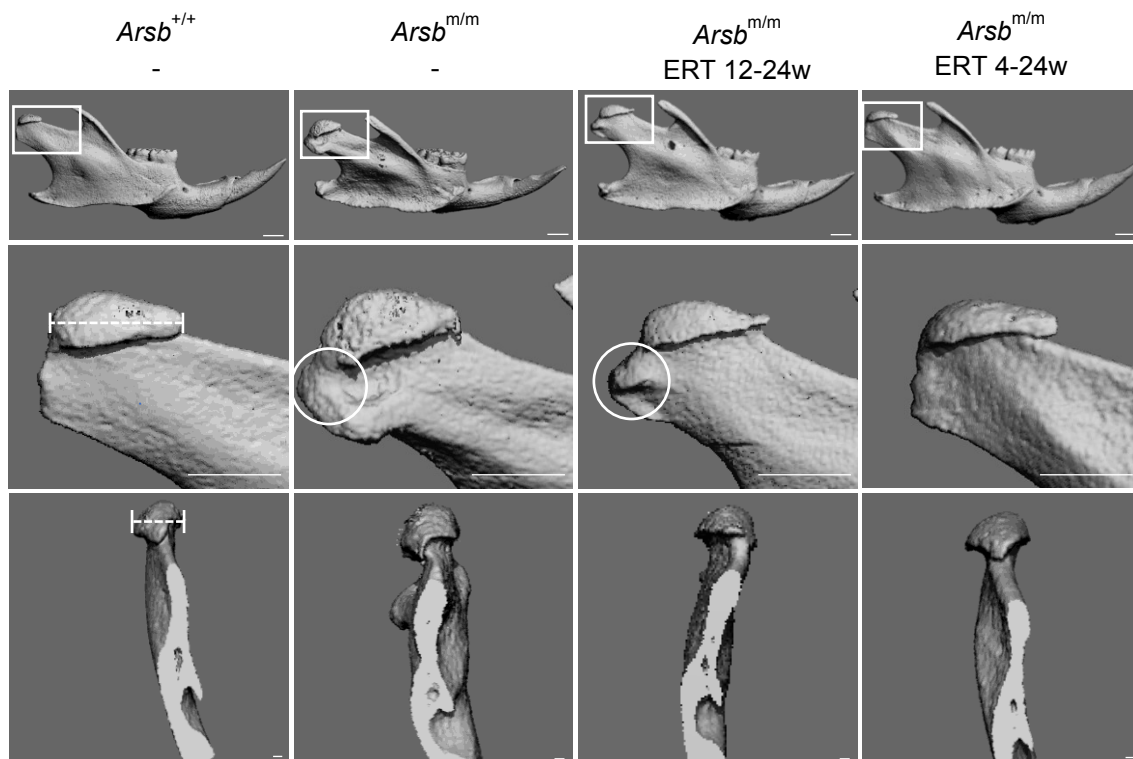


Abbildung 13: Dreidimensionale μ CT-Rekonstruktion des Unterkiefers von 24 Wochen alten Wildtyp-, *Arsb*^{m/m}-Mäusen und *Arsb*^{m/m}-Mäusen mit Enzymersatztherapie (*Arsb*^{m/m} ERT 12-24w und *Arsb*^{m/m} ERT 4-24w). Übersichtsaufnahme (oben) der gesamten Mandibula von lateral mit Vergrößerung auf das Kiefergelenkköpfchen und Darstellung der Messgröße „Länge des Caput mandibulae“ (Mitte). Maßstabsbalken: 1mm. Unten ist eine angeschnittene Darstellung auf das Kiefergelenk von Frontal zu sehen mit der Messgröße „Breite des Caput mandibulae“. Maßstabsbalken: 0,1mm. Erkennbar sind hier die Formveränderungen des Kiefergelenkköpfchens bei *Arsb*^{m/m} und *Arsb*^{m/m} ERT 12-24w sowie deren Knochenexostosen distal (Kreis). Außerdem ist eine Verdickung des Proc. coronoideus und die Knochenexostose am Unterrand der Mandibula zu erkennen. *Arsb*^{m/m} ERT 4-24w zeigen lediglich eine gering ausgeprägte Knochenexostose am Unterrand der Mandibula.

Anschließend wurde die Länge und Breite der Gelenkköpfchen vermessen. Bei 12 Wochen alten *Arsb*^{m/m}-Mäusen war das Gelenkköpfchen um 33% länger als bei Wildtypmäusen. In der 24-Wochen alten Gruppe konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Breite des Gelenkköpfchens war bei 12 Wochen alten *Arsb*^{m/m}-Mäusen um 28,2% und bei 24 Wochen alten Wildtypmäusen um 34,3% im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Diese Unterschiede waren bei beiden Altersgruppen signifikant. Die Breite der Gelenkköpfchen war hingegen bei *Arsb*^{m/m}-Mäusen mit später Enzymersatztherapie (12-24 Wochen) und früher Enzymersatztherapie (4-24 Wochen) im Vergleich zu Wildtypmäusen nicht signifikant verändert (Abbildung 14).

Zusätzlich zu den gemessenen Parametern konnte beobachtet werden, dass die Oberfläche des Gelenkköpfchens bei *Arsb*^{m/m}-Mäusen eine höhere Porosität

aufwies als die glatte Gelenkfläche bei Wildtypmäusen. Bei Mäusen mit Enzyersatztherapie war diese Porosität der Oberfläche bei beiden Gruppen weniger stark ausgeprägt. Außerdem war auffällig, dass bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen mit früher ERT keine Exostosen am Gelenk vorhanden waren, sodass diese Kiefergelenke im Vergleich zum Wildtyp keine deutlichen Veränderungen aufwiesen.

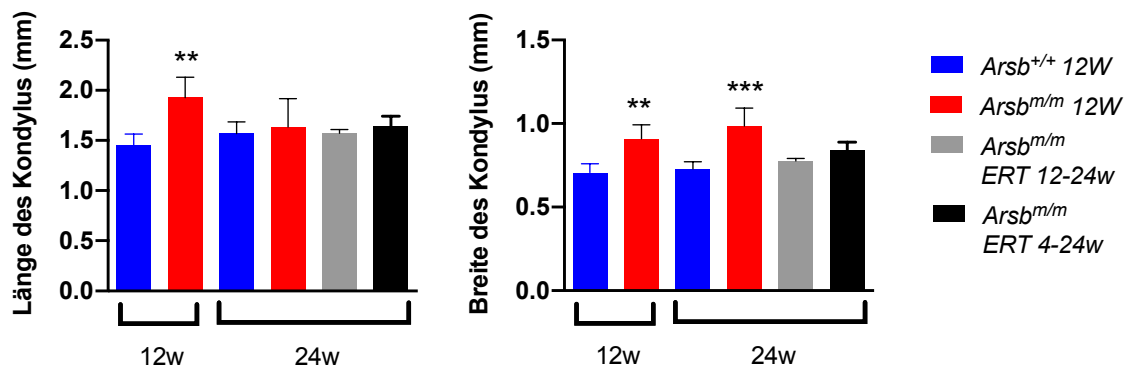


Abbildung 14: Auswertung der Länge und Breite des Kiefergelenkköpfchens von 24 Wochen alten Wildtyp-, *Arsb^{m/m}*-Mäusen und *Arsb^{m/m}*-Mäusen mit Enzyersatztherapie (*Arsb^{m/m}* ERT 12-24w und *Arsb^{m/m}* ERT 4-24w). Die Messstrecken sind in der Abbildung 13 gekennzeichnet.

Für die histologische Untersuchung der Kiefergelenke wurden Schädelhälften von 24 Wochen alten Wildtyp-, *Arsb^{m/m}*-Mäusen und *Arsb^{m/m}*-Mäusen mit Enzyersatztherapie sukzessive in Richtung dorsal geschnitten und Schnitte auf Höhe des rechten Kiefergelenks mit Toluidinblau gefärbt. Es zeigten sich diverse histologische Veränderungen beim Kiefergelenk von *Arsb^{m/m}*-Mäusen ohne Therapie im Vergleich zu Wildtypmäusen. Während der Gelenkknorpel von Wildtypmäusen eine physiologische, intensive blau-violette Färbung aufwies, zeigten *Arsb^{m/m}*- und *Arsb^{m/m}*-Mäuse mit ERT 12-24 eine verblasste und wesentlich hellere Färbung des Knorpels. *Arsb^{m/m}*-Mäuse mit ERT 4-24 Wochen wiesen hingegen wieder eine dem Wildtyp ähnliche physiologische Färbung des Gelenkknorpels auf (Abbildung 15).

Außerdem wurde bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen ohne Therapie und *Arsb^{m/m}*-Mäusen mit spätem Beginn der ERT (12-24 Wochen) eine Abweichung der Form des Gelenkkopfes festgestellt. So besaßen diese Kondylen vorwiegend eine abgeflachte und irreguläre Knochenschicht. *Arsb^{m/m}*-Mäuse mit frühem Beginn der ERT (4-24 Wochen) zeigten eine deutlich gleichmäßigere konvexe Form des Gelenkkopfes. Ebenso zeigte das Kiefergelenk keinen Knick am Gelenkhals auf wie bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen ohne Therapie und mit ERT ab der 12. Woche.

Insgesamt zeigte nur die Gruppe mit frühem Beginn der ERT eine deutliche Ähnlichkeit hinsichtlich der Morphologie des Kondylus zu Wildtypmäusen.

Auf zellulärer Ebene konnten ebenfalls Unterschiede festgestellt werden. Während die Knorpelzellen bei Wildtypmäusen eine normale Größe aufwiesen, waren diese bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen weitaus voluminöser. Die Kern-Plasma-Relation war zum Plasma hin verschoben. Diese Hypertrophie ist besonders gut im Discus articularis (Abbildung 15) sichtbar. In der ersten oberflächlichen fibrösen Bindegewebsschicht sieht man ebenfalls eine deutliche Zunahme der Zellgröße, die sich von der restlichen Oberfläche abhebt und somit eine Unebenheit produziert. In den tieferen Schichten, der Proliferationszone, sind weitere stark hypertrophe Zellen vorzufinden. Die Faserknorpelzone, welche physiologisch hypertrophe Chondroblasten innehat, konnte man nur anhand der kugelrunden Zellen erkennen. Abgesehen von diesem Merkmal konnte man diese kaum von den anderen pathologisch entwickelten hypertrophen Zellen im umliegenden Gewebe unterscheiden.

Arsb^{m/m}-Mäuse, die eine Enzymersatztherapie (12-24 Wochen) erhielten, hatten ebenfalls hypertrophe Zellen im Discus articularis. Allerdings waren diese geringfügig kleiner als bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen ohne entsprechende Enzymersatztherapie. Auch im Gelenkknorpel war eine etwas geringere Vergrößerung der Zellen zu beobachten. In der Proliferationszone waren die Nuclei vergrößert und es war kaum Plasma zu erkennen. Die Zellen der Faserknorpelschicht besaßen Chondroblasten mit einer kugelrunden Form und randständigen Kernen. Bei einer frühen ERT (4-24 Wochen) waren ebenfalls vergrößerte Knorpelzellen vorzufinden. Hierbei wurde allerdings im Gegensatz zu anderen *Arsb^{m/m}*-Gruppen eine hohe Zelldichte festgestellt, ähnlich wie bei Wildtypmäusen. Außerdem zeigten sich im Bereich des Discus articularis zahlreiche kleine flache Zellen, wie man sie auch in der Wildtypgruppe beobachten konnte. Dies war jedoch nur teilweise der Fall. In anderen Bereichen befanden sich zahlreiche hypertrophe Zellen sowie Chondrone.

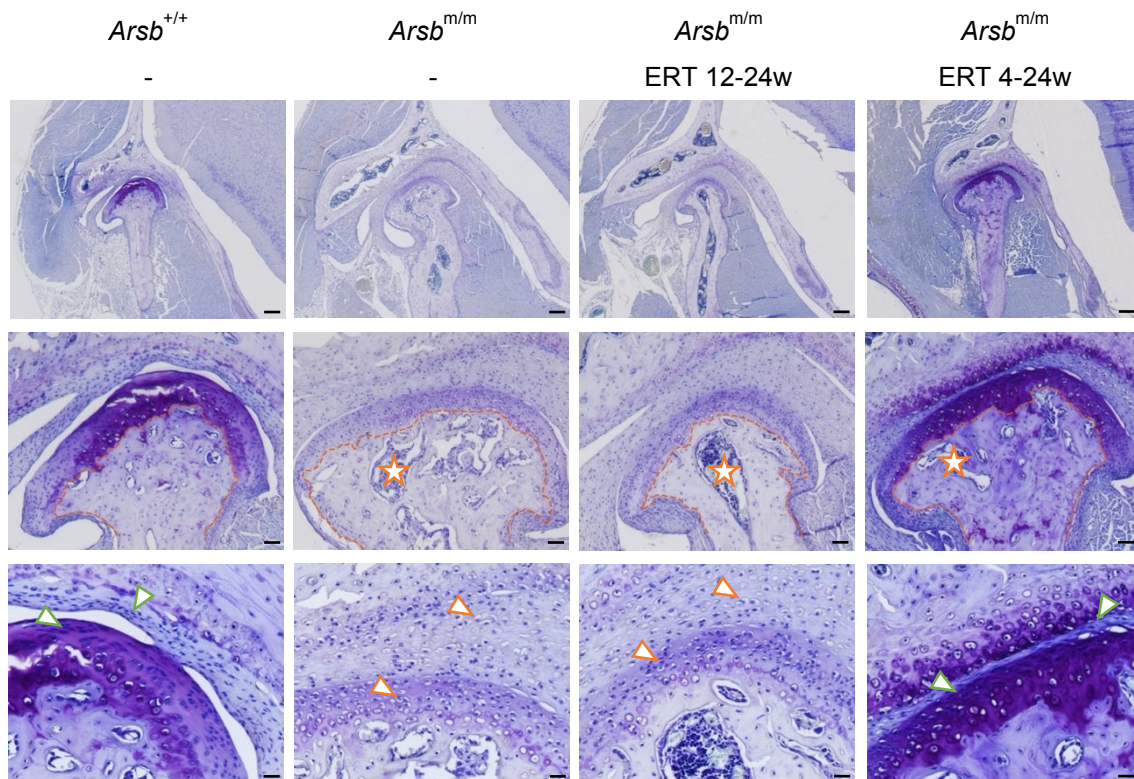


Abbildung 15: Toluidinblau-gefärbte Histologie des rechten Kiefergelenks in frontaler Schnittebene von 24 Wochen alten Wildtyp-, *Arsb*^{m/m}-Mäusen und *Arsb*^{m/m}-Mäusen mit Enzymersatztherapie (*Arsb*^{m/m} ERT 12-24w und *Arsb*^{m/m} ERT 4-24w). Verglichen mit dem Wildtyppräparat links ist eine erhöhte Porosität (Stern) und hyperthrophe Zellen (orangene Pfeile) bei *Arsb*^{m/m} und *Arsb*^{m/m} mit ERT 12-24w erkennbar. *Arsb*^{m/m} ERT 4-24w weisen dagegen eine dem Wildtyp ähnliche Morphologie und Färbung auf. Auch auf zellulärer Ebene ist bei *Arsb*^{m/m} mit ERT 4-24w erkennbar, dass die Knorpelzellen in den superfiziellen Schichten des Gelenkknorpels und im Discus articularis eine hohe Ähnlichkeit zu den Zellen im Kiefergelenk der Wildtypmaus aufweisen (grüne Pfeile). 5-, 10- und 20-fache Vergrößerung mit jeweils 100µm, 50µm und 25µm Maßstabsbalken.

Weitere histologische Präparate des Kiefergelenks wurden mit Safranin O gefärbt. Die Bilder in Abbildung 16 zeigen das rechte Kiefergelenk in gleicher Ansicht wie die vorherigen Abbildungen. Bei der Safranin O-Färbung des Kiefergelenks von Wildtypmäusen war eine typische Rotfärbung des kondylären Knorpels zu erkennen, während das Knochengewebe blau-grün erschien. Die Matrix des Knorpels erschien rötlich-rosa und die Zellkerne leuchtend rot. Im Gegensatz hierzu konnte man bei *Arsb*^{m/m}-Mäusen ohne ERT keine flächendeckende Rotfärbung der Matrix erkennen. Diese war stattdessen eher grau und lediglich die Zellkerne hatten eine geringe rötliche Tendenz aufzuweisen. Bei *Arsb*^{m/m}-Mäusen mit ERT (12-24 Wochen) war ebenfalls keine deutliche Rotfärbung der Knorpelmatrix des Kondylus zu erkennen. Im Vergleich hierzu zeigte die Gruppe der *Arsb*^{m/m}-Mäuse mit frühem Beginn der ERT wieder eine physiologische Färbung der Knorpelmatrix. Wie in der vorigen

histologischen Analyse mit Toluidinblau konnten auch hier typische Veränderungen beobachtet werden. *Arsb^{m/m}*-Mäuse und *Arsb^{m/m}*-Mäuse mit ERT (12-24 Wochen) zeigten eine unregelmäßige Form sowie eine hohe Porosität im Knochen des Condylus und vor allem bei *Arsb^{m/m}* ohne ERT vergrößerte Zellen in allen Schichten des Gelenkknorpels sowie des Discus articularis.

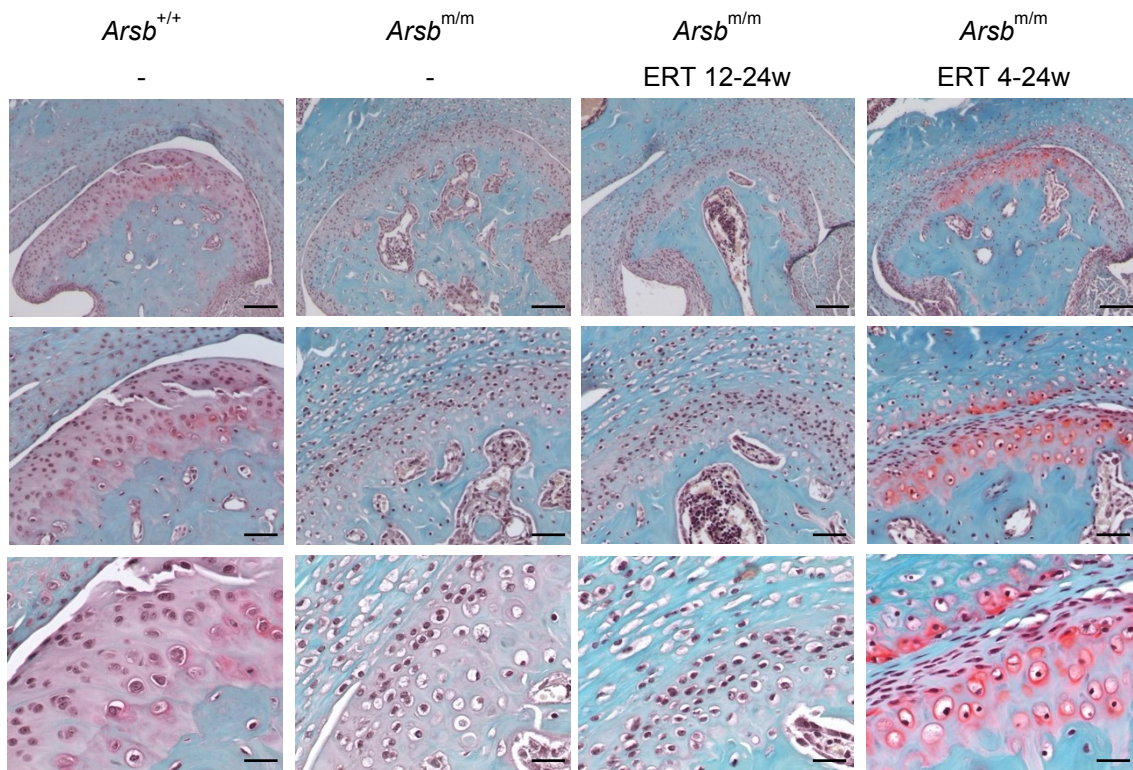


Abbildung 16: Safranin O-Färbung des rechten Kiefergelenks von 24 Wochen alten Wildtyp-, *Arsb^{m/m}*-Mäusen und *Arsb^{m/m}*-Mäusen mit Enzymersatztherapie (*Arsb^{m/m}* ERT 12-24w und *Arsb^{m/m}* ERT 4-24w). Das Kiefergelenk einer Wildtypmaus (links) stellt sich bei dieser Färbung in den Farben Rot und Grün dar. Die Knorpelmatrix und die Zellkerne sind rötlich angefärbt. Das Knochengewebe erscheint bläulich-grün. Bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen ohne Therapie führte die Färbung zu einem Verlust der Rotfärbung der Knorpelmatrix. Stattdessen ist hier die Matrix grau und die Zellkerne sehr dunkel mit einer geringen rötlichen Tendenz. Rechts daneben sieht man das Kiefergelenk einer *Arsb^{m/m}* ERT-Maus (12-24 Wochen). Hier ist ebenfalls keine Rotfärbung der Knorpelmatrix zu erkennen. In der letzten Spalte ist das Kiefergelenk von einer *Arsb^{m/m}*-Maus mit früher ERT (4-24 Wochen) dargestellt. Hier erkennt man wieder eine deutliche Rotfärbung des Knorpels am Caput mandibulae. Somit besitzt diese Gruppe die höchste Ähnlichkeit zum Kiefergelenk der Wildtypmaus. Oben: 10-fache Vergrößerung mit 100µm Maßstabsbalken. Mitte: 20-fache Vergrößerung mit 50µm Maßstabsbalken. Unten: 40-fache Vergrößerung mit 25µm Maßstabsbalken.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse des Kiefergelenks bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen morphologische sowie zelluläre Unterschiede zur Wildtypkontrolle. In der Mikro-Computertomographie weist das Kiefergelenk bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen eine poröse Oberfläche und eine Veränderung der Form auf. *Arsb^{m/m}*-Mäuse mit ERT (12-24 Wochen) zeigten ebenfalls eine poröse Oberfläche mit leichter

Formveränderung. Nur bei einer frühen ERT (4-24 Wochen) zeigte sich eine physiologische Form und Struktur. Bei dieser Gruppe konnte ebenfalls eine hohe Reduktion der Knochenexostosen beobachtet werden. Histologisch zeigt sich bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen eine hochporöse Struktur des Knochengewebes, ein unregelmäßiger Knochen-Knorpel-Übergang, generalisierte Vergrößerung der Zellen mit Vakuolisierung und ein Verlust der charakteristischen Schichtung des Gelenkknorpels. *Arsb^{m/m}*-Mäuse mit ERT (12-24 Wochen) zeigten ebenfalls diese Pathologien. Die Gruppe mit frühem Beginn der ERT (4-24 Wochen) zeigte hingegen eine gleichmäßig physiologische Form des Gelenkkopfes mit regelrechter Morphologie des gesamten Kiefergelenkes. Die Knorpelzellen waren hier nur zum Teil vergrößert und die Zellschichtung zeigte sich für das Kiefergelenk charakteristisch. Besonders auffällig in der Toluidinblau- und Safranin O-Färbung war bei Wildtypmäusen die deutliche Färbung des Gelenkknorpels. Diese ging bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen ohne Therapie sowie *Arsb^{m/m}*-Mäusen mit ERT (12-24 Wochen) verloren. *Arsb^{m/m}*-Mäuse mit früher ERT (4-24 Wochen) wiesen hingegen eine normale Färbung auf. Diese Befunde deuten darauf hin, dass bei MPS VI ein früher Beginn der ERT die Expression von Glykosaminoglykanen auch in der Knorpelschicht normalisieren kann.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde erstmalig das kraniofaziale System und die dentoalveolären Strukturen von *Arsb*-defizienten Mäusen, einem Mausmodell für MPS VI, mittels Kontaktradiographie, Mikro-Computertomographie und Histologie untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Mangel von Arylsulfatase B deutliche Auswirkungen auf das kraniofaziale System hat. Außerdem konnte bewiesen werden, dass eine frühe Gabe von Enzyersatz (*rhARSB*) die Entwicklung der meisten kraniofazialen Pathologien verhindern kann.

5.1 Knochenexostosen hängen bei *Arsb*-defizienten Mäusen mit der muskulären Anatomie zusammen

Bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen mit und ohne Therapie wurden bereits durch Pohl et al. und Hendricks et al. Knochenexostosen am Unterrand des Unterkiefers beschrieben (Hendrickx et al., 2020, Pohl et al., 2018). In dieser Arbeit konnten wir auch an weiteren Stellen des Schädels solche Knochenexostosen entdecken. Diese befanden sich an der Innenseite der Mandibula, dem Proc. coronoideus, Arcus zygomaticus und dem Oberrand der Fossa temporalis. Auffällig war, dass der Knochen an diesen Stellen vergrößert und stark porös erschien. Interessanterweise stellen ebendiese Strukturen Ursprung und Ansatz der murinen Kaumuskel dar (Abbildung 17). Hierzu gehören unter anderem der M. masseter mit Ursprung am Arcus zygomaticus und Ansatz an der lateralen Mandibula mit einem geringen Anteil am medialen Unterrand der Mandibula, M. temporalis mit Ursprung in der Fossa temporalis und Ansatz am Proc. coronoideus und M. pterygoideus medialis mit seinem Ursprung am Proc. pterygoideus an der Schädelbasis und Ansatz im Bereich des medialen Kieferwinkels (Patel, 1978, Baverstock et al., 2013). In Abbildung 17 sieht man einige dieser Muskeln beim Schädel der Maus. An dieser Stelle wird deutlich, wie die Knochenexostosen bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen mit den jeweiligen Muskeln zusammenhängen. Außerdem war in den histologischen Präparaten auffällig, dass das Volumen der Muskeln bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen erhöht war. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Knochenexostosen, welche nur bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen zu beobachten sind, exakt mit den anatomischen Verläufen der Kaumuskulatur

korrelieren. Dies würde die vergrößerten Gesichtszüge und die bilaterale Aufwölbung im Bereich des Unterkiefers bei einigen MPS VI-Patienten erklären, welche man gut in Abbildung 1A anhand der vorgestellten Patientin erkennen kann. Diese Zusammenhänge wurden bisher noch in keiner Studie beschrieben.

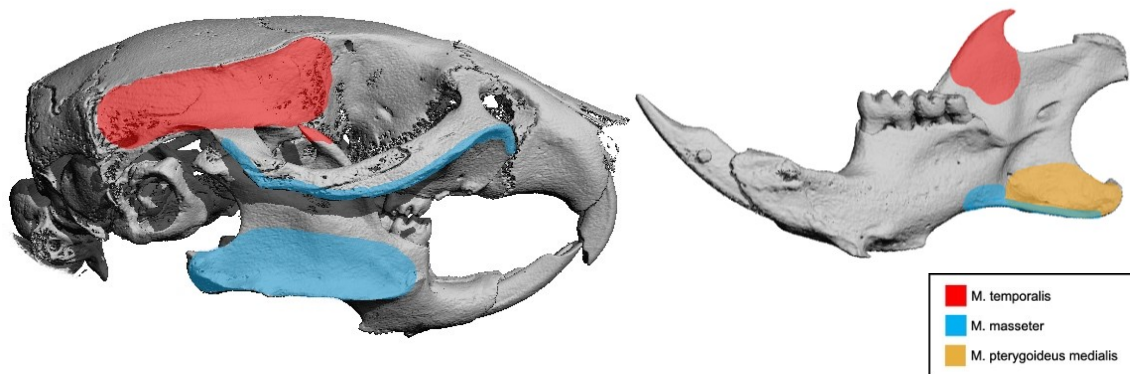


Abbildung 17: Vereinfachte Darstellung der Ursprungs- und Ansatzflächen der Kaumuskeln am Schädel der Maus. Links: Laterale Ansicht des Schädels. Rechts: Mediale Ansicht der Mandibula. Die Ansatzflächen der jeweiligen Muskeln sind mit Farben gekennzeichnet. Bestimmte Muskeln verlaufen zwischen farblich gleichen Flächen. Modifiziert nach Baverstock et al., 2013.

Die Ursache der Knochenexostosen und deren Zusammenhang mit der Muskulatur sowie die Zunahme der Knochengröße und die hohe Porosität ist daher eher durch lokale Faktoren determiniert und nicht im Zusammenhang mit systemischen Veränderungen des Knochenstoffwechsels zu sehen. Laut Pohl et al. zeigten *Arsb^{m/m}*-Mäuse eine hohe trabekuläre Knochenmasse und einen moderaten, der Osteopetrose ähnelnden Phänotyp aufgrund einer eingeschränkten Osteoklastenaktivität (Pohl et al., 2018). Dies würde zwar zu den Kieferexostosen passen, jedoch ist auffällig, dass es beim Kieferknochen zu einer hohen Porosität des spongiösen Knochens kommt, während Tibia und Wirbelkörper eine hohe trabekuläre Knochendichte aufweisen. Es ist daher wahrscheinlicher, dass diese Exostosen durch den Belastungsreiz auf den Knochen, ausgelöst durch vergrößerte Muskeln bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen, entstehen. Eine Enzyersatztherapie konnte diese Exostosen nicht vollständig beseitigen, jedoch zeigte sich insbesondere bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen mit frühem Beginn der Enzyersatztherapie eine deutliche Verbesserung. Dies deutet darauf hin, dass ein früher Beginn der Enzyersatztherapie zu einer normalisierten Entwicklung der Gesichtsphysiognomie beitragen könnte und die Ausbildung von MPS VI-typischen dysmorphen Strukturen vermindern kann (Furujo et al., 2017).

5.2 Ein früher Beginn der ERT kann alveolären Knochenverlust bei *Arsb*-defizienten Mäusen verhindern

Viele Studien beschreiben dentale Pathologien bei MPS-Patienten, die unter anderem gingivale Hyperplasie, verspäteten Zahndurchbruch, retinierte Zähne, follikuläre Zysten aufweisen (Landau et al., 1988, Antunes et al., 2013, de Almeida-Barros et al., 2018). Neben diesen bereits beschriebenen Befunden zeigten die MPS VI-Patienten in unseren Untersuchungen auch einen ausgeprägten parodontalen Knochenabbau (Abbildung 1).

Unsere Untersuchungen von *Arsb^{m/m}*-Mäusen mittels Mikro-Computertomographie konnten diesbezüglich zeigen, dass bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen ohne und mit später ERT (12-24 Wochen) ein deutlicher alveolärer Knochenabbau vorliegt. Dies deckt sich auch mit den klinischen Bildern der vorgestellten Patienten, da bereits im jungen Alter ein deutlicher Knochenabbau zu beobachten war und relativ hohe parodontale Sondierungstiefen gemessen wurden. Anzumerken ist hier, dass die ERT bei keinem dieser Patienten früh begonnen wurde. Diese Befunde stimmen mit unseren Analysen an *Arsb^{m/m}*-Mäusen mit spätem Beginn der Enzyersatztherapie überein, bei denen wir keinen protektiven Effekt der Enzyersatztherapie feststellen konnten. Dagegen konnten wir bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen mit Beginn der Enzyersatztherapie im Alter von 4 Wochen ein physiologisches Knocheniveau feststellen. Unsere Ergebnisse deuten daher darauf hin, dass eine frühe Gabe von rhARSB einen Abbau des alveolären Knochens verhindern kann.

Dieser alveoläre Knochenabbau scheint wiederum eher von lokalen Faktoren determiniert zu sein. So wurde in dieser Arbeit histologisch festgestellt, dass das Saumepithel bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen verändert war. Physiologischerweise reicht das Saumepithel am Zahn nur knapp unterhalb der Schmelz-Zement-Grenze und bildet somit eine dichte Trennung der bakterienbesiedelten Mundhöhle und des Zahnhalteapparates. Bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen ragte dieses weitaus tiefer in Richtung Zahnwurzel hinein. Somit bietet dies eine ideale Nische für Bakterien und könnte aufgrund der für eine gute Mundhygiene unzulänglichen Lage zu parodontalen Entzündungen führen. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass

Proteoglykane wie Dermatansulfat und Chondroitinsulfat im parodontalem Ligament vorzufinden sind und für die Adhäsion des Epithels am Zahn sorgen. Es ist auch anzunehmen, dass diese Glykosaminoglykane für die Aufrechterhaltung der Verbindung zwischen Zahnwurzel und alveolärem Knochen zuständig sind (Fujii and Hirabayashi, 1999). Dies könnte erklären, warum ein Abbau des Knochens um den Zahn herum stattfindet. Denn durch den mangelhaften Verbund zwischen Zahn und Knochen, fehlt jeglicher Belastungsreiz auf den Knochen. Außerdem könnte durch die vergrößerten Zellen und dem somit verdickten parodontalen Ligament der Knochen verdrängt werden. Folglich würde somit die Einleitung resorptiver Prozesse am Alveolarknochen in Gang gesetzt werden.

In einer anderen Studie wurde beschrieben, dass auch Patienten mit anderen MPS-Subtypen parodontale Veränderungen aufweisen (Antunes et al., 2013). Interessant wäre daher die weitere Subtyp-spezifische Untersuchung von parodontalen Krankheiten bei MPS-Patienten und wie sich diese von den klassischen bakteriell-induzierten Parodontitiden unterscheiden lassen, auch im Hinblick einer etwaigen Verbesserung durch Enzymersatz. Im Mausmodell konnten wir feststellen, dass eine frühe ERT zu einer Normalisierung des Saumeithels führt. Würde eine frühe ERT beim Menschen ähnlich positive Resultate liefern, könnten spätere zahnärztliche Behandlungsmaßnahmen vermieden werden. An dieser Stelle muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass wir bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen keine weiteren für MPS VI charakteristischen dentalen Befunde (retinierte Zähne, verspäteter Zahndurchbruch, folliculäre Zysten) beobachten konnten. Dies lässt sich dadurch erklären, dass bei Mäusen kein Zahnwechsel stattfindet und die murinen Molaren bereits im Alter von 2-3 Wochen durchbrechen. Zu diesem frühen Zeitpunkt scheint die Akkumulation von nicht-degradierten GAG bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen noch so niedrig zu sein, dass der Zahndurchbruch dadurch nicht beeinflusst wird. In der Tat scheint dies auch für MPS VI-Patienten zu gelten, da die Milchzähne bei diesen Patienten im Allgemeinen normal durchbrechen.

5.3 Das Kiefergelenk ist bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen verändert

Veränderungen des Kiefergelenks sind charakteristisch für MPS VI-Patienten und manifestieren sich klinisch hauptsächlich durch eine eingeschränkte

Beweglichkeit des Unterkiefers (de Almeida-Barros et al., 2018, dos Santos Cavaleiro et al., 2013, Palmucci et al., 2013).

Es ist zu betonen, dass man bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen aufgrund der klinischen Befunde am Menschen eine Hypoplasie des Gelenkkopfes der Mandibula erwartet hätte. *Arsb^{m/m}*-Mäuse ohne und mit Enzyersatztherapie (12-24 Wochen) wiesen jedoch eher eine irreguläre Form und Oberfläche der Kondylen auf. Breite und Länge des Kondylus waren bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen sogar signifikant höher. Obwohl die *Arsb^{m/m}*-Mäuse damit die Gelenkpathologie der Patienten nicht vollständig phänotypisch widerspiegeln, ist nichtsdestotrotz festzuhalten, dass *Arsb^{m/m}*-Mäuse mit frühem Beginn der Enzyersatztherapie (4-24 Wochen) eine normale Form der Kondylen aufwiesen. Somit bedeutet auch in diesem Bereich ein früherer Beginn der Enzyersatztherapie eine mögliche Prävention von degenerativen Veränderungen. Da sich hier die vorliegenden Entwicklungen von denen beim Menschen unterscheiden, muss überprüft werden, ob eine Hypoplasie des Condylus mandibulae durch einen entsprechenden frühen Therapiebeginn verhindert werden kann.

Auch auf histologischer Ebene wies der Gelenkknorpel von *Arsb^{m/m}*-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp Veränderungen auf. So waren die Knorpelzellen hyperplastisch und unterschieden sich deutlich von normalen Chondrozyten bei Wildtypmäusen. Außerdem konnten wir feststellen, dass die charakteristische Schichtung des Gelenkknorpels bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen verloren gegangen war. Dies steht in Einklang mit dem Ergebnis einer Studie im MPS VI-Katzenmodell (Abreu et al., 1995). Haskins et al. beschrieben, dass ARSB-Defizienz eine schwere Desorganisation in der Epiphysenfuge verursacht, stark vergrößerte Knorpelzellen mit membranösen Einschlüssen beinhaltet und bestätigten, dass es sich hierbei um Anhäufungen von Gylkosaminoglykanen handelt (Haskins et al., 1980). Hendrickx et al. beschrieben im Mausmodell, dass Chondrozyten im artikulärem Knorpel des Kniegelenks vergrößert waren und dass die Aufnahme von rhARSB bei Chondrozyten im Vergleich zu anderen Zellen stark vermindert war (Hendrickx et al., 2020). Dies würde auch erklären, warum in unseren histologischen Analysen von *Arsb^{m/m}*-Mäusen mit Enzyersatztherapie keine vollständige Normalisierung der Zellmorphologie im Gelenkknorpel festgestellt werden konnte. Eine mögliche Ursache könnte die schlechtere Versorgung des

Knorpelgewebes darstellen, da der Knorpel mit Nährstoffen durch Diffusion statt durch Blutgefäße versorgt wird, wie es beim Knochen der Fall ist. Es ist daher bemerkenswert, dass in einem Tierversuch eine deutliche Reduktion der Vergrößerung von Chondrozyten in diversen Gelenken (Knie, Schulter, Ellenbogen) durch intraartikuläre Injektion von rhARSB erzielt werden konnte (Auclair et al., 2006). Ein ähnliche Wirkung wäre auch bei einer intraartikulären Injektion von rhARSB im Kiefergelenk denkbar.

In einer anderen histomorphometrischen Studie beobachtete man, dass Chondrozyten bei MPS VI generell größer und stärker proliferativ waren, was zu weniger Raum in der extrazellulären Matrix führte (Nuttall et al., 1999). Die Erkenntnisse der Knorpelzellen in dieser Studie stimmen somit mit denen an anderen Gelenken überein und zeigen, dass sich der Knorpel im Kiefergelenk bei MPS VI ähnlich wie in anderen Gelenken verhält. Allerdings könnte die alleinige lokale Verabreichung von rhARSB nicht zur vollständigen physiologischen Entwicklung des Gelenkknorpels beitragen, denn neben der bereits durch Pohl et al. beschriebenen schlechteren Versorgung des Knorpelgewebes könnte die schlechtere Aufnahmefähigkeit von ARSB durch die Chondrozyten eine zusätzlich wichtige Rolle spielen (Pohl et al., 2018).

Die Toluidinfärbung zeigte aufgrund ihrer hohen Affinität zu Sulfatgruppen in Proteoglykanen, wie sie in hohem Maß in Knorpelgewebe vorzufinden sind (Bergholt et al., 2019), dass diese Proteoglykane im Kiefergelenk von *Arsb^{m/m}*-Mäusen und *Arsb^{m/m}*-Mäusen mit ERT (12-24 Wochen) in geringer Menge oder strukturell verändert vorliegen. Bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen mit ERT (4-24 Wochen) konnte man jedoch anhand der intensiven Färbung, die auch bei Wildtypmäusen vorzufinden war, einen normalen Gehalt an Proteoglykanen beobachten. Dies bedeutet folglich, dass nur eine frühe Therapie die physiologische Zusammensetzung des Knorpels erzielt.

Des Weiteren konnte interessanterweise durch die Safranin O-Färbung sehr deutlich festgestellt werden, dass im MPS VI-Kiefergelenk, mit und ohne Therapie, ein Verlust der Färbung eintrat, während lediglich die vergrößerten Knorpelzellen eine Rotfärbung hatten. Da die Safranin O-Färbung ebenfalls Proteoglykane und somit auch GAG anfärbt, spricht dies für einen verringerten GAG-Gehalt bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen in der Knorpelmatrix. Durch die Akkumulation

von GAG in den Zellen, schwellen diese an und leiten dann letztendlich den programmierten Zelltod ein. Durch GAG-Akkumulation und der dadurch verminderten Funktionsfähigkeit, könnten die Chondrozyten für den reduzierten Gehalt an GAG in der Matrix verantwortlich sein.

Diese Methode wurde bereits in einem Mausmodell für MPS I, wo es ebenfalls aufgrund eines Enzymmangels zu Akkumulation von GAG in Zellen vorkommt, beim Kiefergelenk angewandt und zeigte den gleichen Verlust von Safranin O an der artikulären Fläche (de Oliveira et al., 2013). Somit stützt das Ergebnis der Safranin O-Färbung die Erkenntnisse, welche durch die Toluidinblau-Färbung entdeckt wurden.

Diese Untersuchungen wären auch für die Ätiologie der Kiefergelenkveränderungen von Interesse, da Glykosaminoglykane auch Entzündungskaskaden bei degenerativen Gelenkerkrankungen (bsp. rheumatoide Arthritis) auslösen können (Wang and Roehrl, 2002). Bei Patienten mit anderen MPS Subtypen konnte in der Tat mittels MRT gezeigt werden, dass die Kondylen zunächst normal ausgebildet sind und dann progressiv resorbiert werden (Koehne et al., 2018). Simonaro et al. bestätigten darüberhinaus, dass GAG auch bei MPS VI entzündliche Prozesse hervorrufen. In dieser Entzündungskaskade, die durch die untergehenden Chondrozyten ausgelöst wird, werden verschiedene Signalmoleküle wie der Tumornekrosefaktor (TNF- α) und weitere Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1) und Metallomatrixproteine (MMP) ausgeschüttet, die dann zu einer Destruktion des Gelenkknorpels führen. Ausgelöst durch diese Moleküle werden auch vermehrt Wachstumsfaktoren wie TGF- β ausgeschüttet, die als Folge den Verlust kompensieren und die Bildung neuer Zellen induzieren. Allerdings sind diese unreifen Chondrozyten nicht in der Lage normales Gewebe zu produzieren (Simonaro et al., 2005). Hierdurch könnten die Glykosaminoglykane aufgrund ihrer Anhäufung in den Zellen für die unregelmäßige Form des Kiefergelenks verantwortlich sein. Da neben TGF- β auch das bone morphogenetic protein (BMP) eine wichtige Rolle bei der Entwicklungen von Knochen und Knorpel spielt, welches maßgeblich in seiner Aktivität von GAG gesteuert wird (Alliston, 2010, Oussoren et al., 2011), müssen zukünftige Studien daher den Gehalt dieser Signalmoleküle und anderer Entzündungsmediatoren im Kiefergelenk bestimmen.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse zeigt sich, dass eine Enzyersatztherapie von 12 bis 24 Wochen im Mausmodell nur einen limitierten Effekt auf Knorpel und somit Gelenke hat. Folglich müssen die zugrundeliegenden Mechanismen in diesem Bereich noch besser untersucht werden, um gezielte lokale Therapiemaßnahmen (bspw. eine intraartikuläre Injektion) zu entwickeln, welche möglicherweise neben einer systemischen Enzyersatztherapie eingesetzt werden könnten. In einer Studie an Ratten konnte beispielsweise durch eine Kombination von ERT und einem antiinflammatorischen Medikament (Anti-TNF- α) eine signifikante Verbesserung von Knorpel und Knochen erreicht werden (Eliyahu et al., 2011). Daher spielen verschiedene Signalmoleküle, welche durch die Anhäufung von GAG aktiviert werden eine geeignete Rolle als Biomarker und könnten Ziele bestimmter Angriffsmöglichkeiten für neue Therapeutika möglich sein. In dieser Arbeit zeigte allerdings ein früher Beginn der Enzyersatztherapie auch im Kiefergelenk eine deutliche protektive Wirkung. Somit ist auch für das Kiefergelenk ein früher Beginn empfehlenswert.

5.4 Fazit

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass *Arsb^{m/m}*-Mäuse hinsichtlich kraniofazialer und dentaler Befunde MPS VI-Patienten ähneln und dass das Mausmodell daher Rückschlüsse für die klinische Behandlung der Patienten erlaubt. Die Ergebnisse im Mausmodell demonstrieren, dass ein relativ später Beginn einer Enzyersatztherapie nur in einigen Bereichen eine geringgradige Verbesserung der kraniofazialen und dentalen Befunde bewirkt. In keinem Falle konnte hierbei eine Restitutio ad integrum erreicht werden.

Dagegen konnte klar gezeigt werden, dass durch eine frühe Einleitung einer Enzyersatztherapie ein vielfach besserer Therapieeffekt erzielt werden kann, teils mit nahezu gänzlichem Ausbleiben einer pathologischen Veränderung. Somit kann auch für das kraniofaziale System eine deutliche Empfehlung für einen frühen Beginn einer Enzyersatztherapie ausgesprochen werden.

6 Zusammenfassung

Mukopolysaccharidose VI ist eine erbliche, lysosomale Speicherkrankheit, die durch die fehlende Funktion des Enzyms Arylsulfatase B (ARSB) gekennzeichnet ist. Da ARSB für die Aufspaltung von Glykosaminoglykanen (GAG) im Lysosom verantwortlich ist, häufen sich diese im Gewebe an. Im kraniofazialen Bereich führt dies unter anderem zu vergrößerten Gesichtszügen, einer Makroglossie, retinierten und verlagerten Zähnen und einer Hypoplasie des Kiefergelenks. Als Therapie ist eine Enzymersatztherapie (ERT) mit rhARSB möglich.

Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt von MPS VI und der ERT auf kraniofaziale Strukturen im Mausmodell zu erforschen. Es wurden 12 und 24 Wochen alte Wildtyp- und *Arsb*-defiziente Mäuse (*Arsb^{m/m}*) vergleichend untersucht. Darüber hinaus wurden 24 Wochen alte *Arsb*-defiziente Mäuse analysiert, die ab dem Alter von 4 bzw. 12 Wochen eine Enzymersatztherapie mit rhARSB erhielten. Mittels Micro-Computer-Tomographie, Kontaktröntgen und Histologie konnte gezeigt werden, dass die Schädel von *Arsb^{m/m}*-Mäusen an Muskelansatzflächen Knochenexostosen aufwiesen. Diese waren bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen mit früher ERT weniger stark ausgeprägt. Außerdem konnte bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen ein stark erhöhter alveolärer Knochenverlust festgestellt werden. Während eine späte ERT (ab 12. Woche) bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen diesbezüglich keinen protektiven Effekt besaß, führte eine frühe ERT (ab 4. Woche) zu einer vollständigen Normalisierung des Alveolarknochenverlaufs. Das Kiefergelenk von *Arsb^{m/m}*-Mäusen war unregelmäßig geformt und wies eine poröse Oberfläche auf. Ein früher Beginn der ERT führte hier ebenfalls zu einer physiologischen Gelenkmorphologie. Histologisch waren bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen hypertrophe Knorpelzellen zu beobachten, wodurch die normale Schichtung des Knorpels verloren ging. Hier konnte ebenfalls nur durch die frühe ERT eine deutliche Verbesserungen erzielt werden.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass bei *Arsb^{m/m}*-Mäusen eine frühe ERT die besten Effekte auf Zähne, Knochen und Kiefergelenk erzielt. Da das MPS VI-Mausmodell in dieser Arbeit eine insgesamt hohe Ähnlichkeit zu den klinischen Befunden bei MPS VI-Patienten aufweist, sollte bei Patienten mit MPS VI auch hinsichtlich der dentalen und kraniofazialen Ausprägung der Erkrankung ein möglichst früher Beginn der Enzymersatztherapie diskutiert werden.

7 Abstract

Mucopolysaccharidosis VI (MPS VI) is a hereditary lysosomal storage disease caused by a lack of the enzyme Arylsulfatase B (ARSB). Since ARSB is responsible for the breakdown of glycosaminoglycans (GAGs) in the lysosome, non-degraded GAGs accumulate in MPS VI in almost all tissues and organs. Craniofacial symptoms of MPS VI are coarsened facial features, macroglossia, retained teeth, and hypoplasia of the temporomandibular joint. MPS VI patients are nowadays more and more treated with enzyme replacement therapy (ERT).

The aim of this study was to investigate the effects of MPS VI and ERT on craniofacial structures in the mouse model. 12 and 24 weeks old wild-type (*Arsb*^{+/+}) and *Arsb*-deficient mice (*Arsb*^{m/m}) were analyzed. Additionally, *Arsb*-deficient mice (*Arsb*^{m/m}) treated with ERT, starting at the age of 4 and 12 weeks, were included in this study. Teeth, jaw, and temporomandibular joint were examined using micro-computed tomography, contact radiography and histology. These analyses revealed that skulls of *Arsb*^{m/m}-mice are characterized by bone exostoses, which may be responsible for the phenotypic characteristic coarse facial features. These exostoses were less pronounced in *Arsb*^{m/m}-mice with early ERT. In addition, *Arsb*^{m/m}-mice displayed a severe alveolar bone loss compared to wild-type mice. While ERT, starting from 12 weeks of age, could not rescue this alveolar bone loss, we observed that early ERT (4-24 weeks) in *Arsb*^{m/m}-mice resulted in physiological bone levels with no alveolar bone loss. The temporomandibular joint of *Arsb*^{m/m}-mice was irregularly deformed and characterized by a porous articular surface. Here, early ERT led to a physiological joint morphology. Histologically, hypertrophic cells and reduced levels of proteoglycans in cartilage were observed in *Arsb*^{m/m}-mice, as well as a loss of physiological layering of cartilage. Again, only an early ERT could achieve clear improvements.

In summary, the results of this work demonstrate that an early ERT of *Arsb*^{m/m}-mice achieves the best therapeutic effects for the development of tooth, bone, and temporomandibular joint. Since the MPS VI mouse model in this study broadly resembled clinical findings in MPS VI patients, our results suggest that enzyme replacement therapy should be initiated as early as possible in these patients.

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
3D	dreidimensional
ARSB	N-Acetylgalaktosamin-4-Sulfatase (Arylsulfatase B)
BMP	bone morphogenetic protein
CS	Chondroitinsulfat
DS	Dermatansulfat
ERT	enzyme replacement therapy / Enzymersatztherapie
et al.	et alii / aliae
GAG	Glykosaminoglykane
h	Stunde / Stunden
HE	Hämatoxylin-Eosin
HS	Heparansulfat
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KS	Keratansulfat
kV	Kilovolt
M.	Musculus
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MPS VI	Mukopolysaccharidose Typ 6
ms	Millisekunden
pH	potentia Hydrogenii

Proc.	Processus / Fortsatz
PSA	Panoramaschichtaufnahme
RANK	Receptor activator of nuclear factor κ B
rhARSB	rekombinantes humanes Arylsulfatase B
TRAP	Tartrat resistant acid phosphatase
VOI	volume of interest
w	Wochen
μ CT	Micro-Computertomograph / Micro-Computer-Tomographie
μ g	Mikrogramm

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Fotos und Röntgenaufnahmen von Mukopolysaccharidose Typ VI – Patienten aus der Poliklinik für Kieferorthopädie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.....	10
Abbildung 2: Darstellung der Messparameter an der Mandibula.....	15
Abbildung 3: Screenshot aus ImageJ bei Messung der Wurzeloberfläche.....	17
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Unterkiefers einer Maus.	19
Abbildung 5: Histologische Schnitte des Kiefergelenks von Mäusen in frontaler Ansicht mit anatomischen Kennzeichnungen.	22
Abbildung 6: Exostosen der Schädelknochen bei Arsb ^{m/m} -Mäusen.....	24
Abbildung 7: Histologien der Mandibula von Wildtyp- (Arb ^{+/+}) , MPS-VI (Arb ^{m/m}) und MPS-VI Mäusen mit Enzyersatztherapie (Arb ^{m/m} ERT 12-24w und Arb ^{m/m} ERT 4-24w) in der Frontalebene.....	26
Abbildung 8: 3D-Rekonstruktion der Zähne aus linguale Ansicht sowie μ CT-Schnittbildansichten von 24 Wochen alten Wildtyp- (Arb ^{+/+}) , MPS-VI (Arb ^{m/m}) und MPS-VI Mäusen mit Enzyersatztherapie (Arb ^{m/m} ERT 12-24w und Arb ^{m/m} ERT 4-24w).....	27
Abbildung 9: Auswertung der freien Wurzeloberfläche von 12 Wochen alten Wildtyp- (Arb ^{+/+}) und Arb ^{m/m} Mäusen sowie von 24 Wochen alten Wildtyp (Arb ^{+/+}), Arb ^{m/m} Mäusen und Arb ^{m/m} Mäusen mit Enzyersatztherapie (Arb ^{m/m} ERT 12-24w und Arb ^{m/m} ERT 4-24w).....	28
Abbildung 10: Histologien der Zähne und des Zahnhalteapparates von 24 Wochen alten Wildtyp- (Arb ^{+/+}), Arb ^{m/m} -Mäusen und Arb ^{m/m} -Mäusen mit Enzyersatztherapie (Arb ^{m/m} ERT 12-24w und Arb ^{m/m} ERT 4-24w)..	30
Abbildung 11: Quantifizierung der Tiefe des Saumepithels bei 24 Wochen alten Wildtyp- (Arb ^{+/+}), Arb ^{m/m} -Mäusen und Arb ^{m/m} -Mäusen mit Enzyersatztherapie (Arb ^{m/m} ERT 12-24w und Arb ^{m/m} ERT 4-24w).	31
Abbildung 12: Kontaktradiographie von Schädelhälften in lateraler Ansicht von 24 Wochen alten Wildtyp-, Arb ^{m/m} -Mäusen und Arb ^{m/m} -Mäusen mit Enzyersatztherapie (Arb ^{m/m} ERT 12-24w und Arb ^{m/m} ERT 4-24w).	32

Abbildung 13: Dreidimensionale μ CT-Rekonstruktion des Unterkiefers von 24 Wochen alten Wildtyp-, Arsb ^{m/m} Mäusen und Arsb ^{m/m} Mäusen mit Enzymersatztherapie (Arsb ^{m/m} ERT 12-24w und Arsb ^{m/m} ERT 4-24w).	33
Abbildung 14: Auswertung der Länge und Breite des Kiefergelenkköpfchens von 24 Wochen alten Wildtyp-, Arsb ^{m/m} Mäusen und Arsb ^{m/m} Mäusen mit Enzymersatztherapie (Arsb ^{m/m} ERT 12-24w und Arsb ^{m/m} ERT 4-24w).	34
Abbildung 15: Toluidinblau-gefärbte Histologie des rechten Kiefergelenks in frontaler Schnittebene von 24 Wochen alten Wildtyp-, Arsb ^{m/m} Mäusen und Arsb ^{m/m} Mäusen mit Enzymersatztherapie (Arsb ^{m/m} ERT 12-24w und Arsb ^{m/m} ERT 4-24w).	36
Abbildung 16: Safranin-O Färbung des rechten Kiefergelenks von 24 Wochen alten Wildtyp-, Arsb ^{m/m} Mäusen und Arsb ^{m/m} Mäusen mit Enzymersatztherapie (Arsb ^{m/m} ERT 12-24w und Arsb ^{m/m} ERT 4-24w.	37
Abbildung 17: Vereinfachte Darstellung der Ursprungs- und Ansatzflächen der Kaumuskeln am Schädel der Maus.....	40

10 Literaturverzeichnis

- ABREU, S., HAYDEN, J., BERTHOLD, P., SHAPIRO, I. M., DECKER, S., PATTERSON, D. & HASKINS, M. 1995. Growth plate pathology in feline mucopolysaccharidosis VI. *Calcif Tissue Int*, 57, 185-90.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., MORGAN, D. M. L., RAFF, M. C., ROBERTS, K., WALTER, P., SCHÄFER, U. & HÄCKER, B. 2017. *Molekularbiologie der Zelle*, Weinheim, Germany, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- ALLISTON, T. 2010. Chondroitin sulfate and growth factor signaling in the skeleton: Possible links to MPS VI. *J Pediatr Rehabil Med*, 3, 129-38.
- ANTUNES, L. A., NOGUEIRA, A. P., CASTRO, G. F., RIBEIRO, M. G. & DE SOUZA, I. P. 2013. Dental findings and oral health status in patients with mucopolysaccharidosis: a case series. *Acta Odontol Scand*, 71, 157-67.
- AUCLAIR, D., HEIN, L. K., HOPWOOD, J. J. & BYERS, S. 2006. Intra-articular enzyme administration for joint disease in feline mucopolysaccharidosis VI: enzyme dose and interval. *Pediatr Res*, 59, 538-43.
- AUCLAIR, D., HOPWOOD, J. J., BROOKS, D. A., LEMONTT, J. F. & CRAWLEY, A. C. 2003. Replacement therapy in Mucopolysaccharidosis type VI: advantages of early onset of therapy. *Mol Genet Metab*, 78, 163-74.
- BAEHNER, F., SCHMIEDESKAMP, C., KRUMMENAUER, F., MIEBACH, E., BAJBOUJ, M., WHYBRA, C., KOHLSCHUTTER, A., KAMPMANN, C. & BECK, M. 2005. Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany. *J Inherit Metab Dis*, 28, 1011-7.
- BAVERSTOCK, H., JEFFERY, N. S. & COBB, S. N. 2013. The morphology of the mouse masticatory musculature. *J Anat*, 223, 46-60.
- BERGHOLT, N. L., LYSDAHL, H., LIND, M. & FOLDAGER, C. B. 2019. A Standardized Method of Applying Toluidine Blue Metachromatic Staining for Assessment of Chondrogenesis. *Cartilage*, 10, 370-374.
- CAMPLEJOHN, K. L. & ALLARD, S. A. 1988. Limitations of safranin 'O' staining in proteoglycan-depleted cartilage demonstrated with monoclonal antibodies. *Histochemistry*, 89, 185-8.
- CRAWLEY, A. C., NIEDZIELSKI, K. H., ISAAC, E. L., DAVEY, R. C., BYERS, S. & HOPWOOD, J. J. 1997. Enzyme replacement therapy from birth in a feline model of mucopolysaccharidosis type VI. *J Clin Invest*, 99, 651-62.
- DE ALMEIDA-BARROS, R. Q., DE MEDEIROS, P. F. V., DE ALMEIDA AZEVEDO, M. Q., DE OLIVEIRA LIRA ORTEGA, A., YAMAMOTO, A. T. A., DORNELAS, S. K. L. & BENTO, P. M. 2018. Evaluation of oral manifestations of patients with mucopolysaccharidosis IV and VI: clinical and imaging study. *Clin Oral Investig*, 22, 201-208.

- DE DUVE, C. 1963. THE LYSOSOME. *Scientific American*, 208, 64-73.
- DE OLIVEIRA, P. G., BALDO, G., MAYER, F. Q., MARTINELLI, B., MEURER, L., GIUGLIANI, R., MATTE, U. & XAVIER, R. M. 2013. Characterization of joint disease in mucopolysaccharidosis type I mice. *Int J Exp Pathol*, 94, 305-11.
- DE SANTANA SARMENTO, D. J., DE CARVALHO, S. H., MELO, S. L., FONSECA, F. R., DINIZ, D. N., BENTO, P. M., MESQUITA GDE, Q. & DE MELO, D. P. 2015. Mucopolysaccharidosis: radiographic findings in a series of 16 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 120, e240-6.
- DOS SANTOS CAVALEIRO, R. M., PINHEIRO, M. D. G. R., PINHEIRO, L. R., TUJI, F. M., FEIO, P. D. S. Q., DE SOUZA, I. C. N., FEIO, R. H. F., DE ALMEIDA, S. C., SCHWARTZ, I. V. D. & GIUGLIANI, R. 2013. Dentomaxillofacial manifestations of mucopolysaccharidosis VI: clinical and imaging findings from two cases, with an emphasis on the temporomandibular joint. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*, 116, e141-e148.
- ELIYAHU, E., WOLFSON, T., GE, Y., JEPSEN, K. J., SCHUCHMAN, E. H. & SIMONARO, C. M. 2011. Anti-TNF-alpha therapy enhances the effects of enzyme replacement therapy in rats with mucopolysaccharidosis type VI. *PLoS One*, 6, e22447.
- FONSECA, F. R., DE SANTANA SARMENTO, D. J., VASCONCELOS MEDEIROS, P. F., DINIZ, D. N. & DOS SANTOS, M. T. 2014. Patients with mucopolysaccharidosis have tendencies towards vertical facial growth. *J Oral Maxillofac Surg*, 72, 2539-46.
- FUJII, T. & HIRABAYASHI, Y. 1999. Histochemical studies of glycosaminoglycans in developing periodontal ligaments of ICR mice. *Anat Rec*, 254, 465-73.
- FURUJO, M., KOSUGA, M. & OKUYAMA, T. 2017. Enzyme replacement therapy attenuates disease progression in two Japanese siblings with mucopolysaccharidosis type VI: 10-Year follow up. *Mol Genet Metab Rep*, 13, 69-75.
- FURUJO, M., KUBO, T., KOSUGA, M. & OKUYAMA, T. 2011. Enzyme replacement therapy attenuates disease progression in two Japanese siblings with mucopolysaccharidosis type VI. *Mol Genet Metab*, 104, 597-602.
- GANDHI, N. S. & MANCERA, R. L. 2008. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem Biol Drug Des*, 72, 455-82.
- GIUGLIANI, R., HARMATZ, P. & WRAITH, J. E. 2007. Management guidelines for mucopolysaccharidosis VI. *Pediatrics*, 120, 405-18.
- HARMATZ, P., GIUGLIANI, R., SCHWARTZ, I., GUFFON, N., TELES, E. L., MIRANDA, M. C., WRAITH, J. E., BECK, M., ARASH, L., SCARPA, M.,

- YU, Z. F., WITTES, J., BERGER, K. I., NEWMAN, M. S., LOWE, A. M., KAKKIS, E., SWIEDLER, S. J. & GROUP, M. V. P. S. 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. *J Pediatr*, 148, 533-539.
- HARMATZ, P. & SHEDIAC, R. 2017. Mucopolysaccharidosis VI: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 22, 385-406.
- HARMATZ, P., WHITLEY, C. B., WABER, L., PAIS, R., STEINER, R., PLECKO, B., KAPLAN, P., SIMON, J., BUTENSKY, E. & HOPWOOD, J. J. 2004. Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). *J Pediatr*, 144, 574-80.
- HARMATZ, P. R., LAMPE, C., PARINI, R., SHARMA, R., TELES, E. L., JOHNSON, J., SIVAM, D. & SISIC, Z. 2019. Enzyme replacement therapy outcomes across the disease spectrum: Findings from the mucopolysaccharidosis VI Clinical Surveillance Program. *J Inherit Metab Dis*, 42, 519-526.
- HASKINS, M., CASAL, M., ELLINWOOD, N. M., MELNICZEK, J., MAZRIER, H. & GIGER, U. 2002. Animal models for mucopolysaccharidoses and their clinical relevance. *Acta Paediatr Suppl*, 91, 88-97.
- HASKINS, M. E., AGUIRRE, G. D., JEZYK, P. F. & PATTERSON, D. F. 1980. The pathology of the feline model of mucopolysaccharidosis VI. *Am J Pathol*, 101, 657-74.
- HENDRICKX, G., DANYUKOVA, T., BARANOWSKY, A., ROLVIEN, T., ANGERMANN, A., SCHWEIZER, M., KELLER, J., SCHRODER, J., MEYER-SCHWESINGER, C., MUSCHOL, N., PAGANINI, C., ROSSI, A., AMLING, M., POHL, S. & SCHINKE, T. 2020. Enzyme replacement therapy in mice lacking arylsulfatase B targets bone-remodeling cells, but not chondrocytes. *Hum Mol Genet*, 29, 803-816.
- HERSKHOVITZ, E., YOUNG, E., RAINER, J., HALL, C. M., LIDCHI, V., CHONG, K. & VELLODI, A. 1999. Bone marrow transplantation for Maroteaux-Lamy syndrome (MPS VI): long-term follow-up. *J Inherit Metab Dis*, 22, 50-62.
- KANTAPUTRA, P. N., KAYSERILI, H., GUVEN, Y., KANTAPUTRA, W., BALCI, M. C., TANPAIBOON, P., UTTARILLI, A. & DALAL, A. 2014. Oral manifestations of 17 patients affected with mucopolysaccharidosis type VI. *J Inherit Metab Dis*, 37, 263-8.
- KHAN, S. A., NELSON, M. S., PAN, C., GAFFNEY, P. M. & GUPTA, P. 2008. Endogenous heparan sulfate and heparin modulate bone morphogenetic protein-4 signaling and activity. *Am J Physiol Cell Physiol*, 294, C1387-97.

- KOEHNE, T., KOHN, A., FRIEDRICH, R. E., KORDES, U., SCHINKE, T., MUSCHOL, N. & KAHL-NIEKE, B. 2018. Differences in maxillomandibular morphology among patients with mucopolysaccharidoses I, II, III, IV and VI: a retrospective MRI study. *Clin Oral Investig*, 22, 1541-1549.
- KRIVIT, W., PIERPONT, M. E., AYAZ, K., TSAI, M., RAMSAY, N. K., KERSEY, J. H., WEISDORF, S., SIBLEY, R., SNOVER, D., MCGOVERN, M. M. & ET AL. 1984. Bone-marrow transplantation in the Maroteaux-Lamy syndrome (mucopolysaccharidosis type VI). Biochemical and clinical status 24 months after transplantation. *N Engl J Med*, 311, 1606-11.
- LANDAU, H., MIETHKE, R. R. & ENTRUP, W. 1988. [Dental and orthodontics findings in patients with mucopolysaccharidosis]. *Fortschr Kieferorthop*, 49, 132-43.
- LITJENS, T., BAKER, E. G., BECKMANN, K. R., MORRIS, C. P., HOPWOOD, J. J. & CALLEN, D. F. 1989. Chromosomal localization of ARSB, the gene for human N-acetylgalactosamine-4-sulphatase. *Hum Genet*, 82, 67-8.
- LODISH, H. F. 2004. *Molecular cell biology*, New York, W. H. Freeman.
- MCGILL, J. J., INWOOD, A. C., COMAN, D. J., LIPKE, M. L., DE LORE, D., SWIEDLER, S. J. & HOPWOOD, J. J. 2010. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI from 8 weeks of age--a sibling control study. *Clin Genet*, 77, 492-8.
- MUENZER, J. 2004. The mucopolysaccharidoses: a heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. *J Pediatr*, 144, S27-34.
- MUENZER, J. 2011. Overview of the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology (Oxford)*, 50 Suppl 5, v4-12.
- NUTTALL, J. D., BRUMFIELD, L. K., FAZZALARI, N. L., HOPWOOD, J. J. & BYERS, S. 1999. Histomorphometric analysis of the tibial growth plate in a feline model of mucopolysaccharidosis type VI. *Calcif Tissue Int*, 65, 47-52.
- O'BRIEN, J. F., CANTZ, M. & SPRANGER, J. 1974. Maroteaux-Lamy disease (mucopolysaccharidosis VI), subtype A: deficiency of a N-acetylgalactosamine-4-sulfatase. *Biochem Biophys Res Commun*, 60, 1170-7.
- OHKUMA, S. & POOLE, B. 1978. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75, 3327-31.
- OUSSOREN, E., BRANDS, M. M., RUIJTER, G. J., DER PLOEG, A. T. & REUSER, A. J. 2011. Bone, joint and tooth development in mucopolysaccharidoses: relevance to therapeutic options. *Biochim Biophys Acta*, 1812, 1542-56.

- PALMUCCI, S., ATTINA, G., LANZA, M. L., BELFIORE, G., CAPPELLO, G., FOTI, P. V., MILONE, P., DI BELLA, D., BARONE, R., FIUMARA, A., SORGE, G. & ETTORE, G. C. 2013. Imaging findings of mucopolysaccharidoses: a pictorial review. *Insights Imaging*, 4, 443-59.
- PATEL, N. 1978. Functional morphology of the masticatory muscles of *Mus musculus* L. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Section B, Animal Sciences*, 87, 51-57.
- POHL, S., ANGERMANN, A., JESCHKE, A., HENDRICKX, G., YORGAN, T. A., MAKRYPIDI-FRAUNE, G., STEIGERT, A., KUEHN, S. C., ROLVIEN, T., SCHWEIZER, M., KOEHNE, T., NEVEN, M., WINTER, O., VELHO, R. V., ALBERS, J., STREICHERT, T., PESTKA, J. M., BALDAUF, C., BREYER, S., STUECKER, R., MUSCHOL, N., COX, T. M., SAFTIG, P., PAGANINI, C., ROSSI, A., AMLING, M., BRAULKE, T. & SCHINKE, T. 2018. The Lysosomal Protein Arylsulfatase B Is a Key Enzyme Involved in Skeletal Turnover. *J Bone Miner Res*, 33, 2186-2201.
- ROBERTS, M. W., BARTON, N. W., CONSTANTOPOULOS, G., BUTLER, D. P. & DONAHUE, A. H. 1984. Occurrence of multiple dentigerous cysts in a patient with the Maroteaux-Lamy syndrome (mucopolysaccharidosis, type VI). *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 58, 169-175.
- SAFTIG, P. & KLUMPERMAN, J. 2009. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 623-35.
- SIMONARO, C. M., D'ANGELO, M., HASKINS, M. E. & SCHUCHMAN, E. H. 2005. Joint and bone disease in mucopolysaccharidoses VI and VII: identification of new therapeutic targets and biomarkers using animal models. *Pediatr Res*, 57, 701-7.
- SLY, W. S., VOGLER, C., GRUBB, J. H., LEVY, B., GALVIN, N., TAN, Y., NISHIOKA, T. & TOMATSU, S. 2006. Enzyme therapy in mannanose receptor-null mucopolysaccharidosis VII mice defines roles for the mannanose 6-phosphate and mannanose receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 15172-15177.
- SWIEDLER, S. J., BECK, M., BAJBOUJ, M., GIUGLIANI, R., SCHWARTZ, I., HARMATZ, P., WRAITH, J. E., ROBERTS, J., KETTERIDGE, D., HOPWOOD, J. J., GUFFON, N., SA MIRANDA, M. C., TELES, E. L., BERGER, K. I. & PISCIA-NICHOLS, C. 2005. Threshold effect of urinary glycosaminoglycans and the walk test as indicators of disease progression in a survey of subjects with Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). *Am J Med Genet A*, 134a, 144-50.
- TAYLOR, M., KHAN, S., STAPLETON, M., WANG, J., CHEN, J., WYNN, R., YABE, H., CHINEN, Y., BOELEN, J. J., MASON, R. W., KUBASKI, F., HOROVITZ, D. D. G., BARTH, A. L., SERAFINI, M., BERNARDO, M. E., KOBAYASHI, H., ORII, K. E., SUZUKI, Y., ORII, T. & TOMATSU, S. 2019. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for

Mucopolysaccharidoses: Past, Present, and Future. *Biol Blood Marrow Transplant*, 25, e226-e246.

TROWBRIDGE, J. M. & GALLO, R. L. 2002. Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. *Glycobiology*, 12, 117R-25R.

TURBEVILLE, S., NICELY, H., RIZZO, J. D., PEDERSEN, T. L., ORCHARD, P. J., HORWITZ, M. E., HORWITZ, E. M., VEYS, P., BONFIM, C. & AL-SERAIHY, A. 2011. Clinical outcomes following hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of mucopolysaccharidosis VI. *Molecular Genetics and Metabolism*, 102, 111-115.

VALAYANNOPOULOS, V., NICELY, H., HARMATZ, P. & TURBEVILLE, S. 2010. Mucopolysaccharidosis VI. *Orphanet J Rare Dis*, 5, 5.

VELLODI, A., YOUNG, E., COOPER, A., LIDCHI, V., WINCHESTER, B. & WRAITH, J. E. 1999. Long-term follow-up following bone marrow transplantation for Hunter disease. *J Inherit Metab Dis*, 22, 638-48.

WANG, J. Y. & ROEHRL, M. H. 2002. Glycosaminoglycans are a potential cause of rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 14362-7.

WANG, Y., LI, L., ZHENG, Y., YUAN, G., YANG, G., HE, F. & CHEN, Y. 2012. BMP activity is required for tooth development from the lamina to bud stage. *J Dent Res*, 91, 690-5.

WINCHESTER, B., VELLODI, A. & YOUNG, E. 2000. The molecular basis of lysosomal storage diseases and their treatment. *Biochem Soc Trans*, 28, 150-4.

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen meinen Dank aussprechen, die mich maßgeblich bei der Realisierung dieser Arbeit unterstützt haben.

An erster Stelle bedanke ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Thorsten Schinke für sein Vertrauen in mir und der Möglichkeit, die herausragende Infrastruktur und wissenschaftliche Exzellenz des Instituts für Osteologie und Biomechanik für die Erarbeitung der Ergebnisse dieser Arbeit nutzen zu können.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Dr. Till Köhne für die hervorragende Betreuung und Unterstützung bei allen Fragen und Problemen und der mir zu jeder Zeit schnell mit Rat und Tat zur Seite stand. Auch danke ich ihm sehr für das Anvertrauen dieses Forschungsprojektes.

Außerdem äußere ich meinen großen Dank dem Laborteam des IOBM in der Lottestraße, vor allem Andrea, Elke, Olga und Annette, die mir stets außergewöhnlich freundlich und uneingeschränkt schnelle und kompetente Hilfe anboten. Ebenso danke ich Dr. Maximilian Decker für seine nette Unterstützung bei jeglichen technischen Fragen.

Nicht zuletzt danke ich Dr. Carmen Schmid für die freundliche Übergabe der Bilder und Informationen der Patienten aus der Poliklinik für Kieferorthopädie.

12 Lebenslauf

Der Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

13 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: