

Knochenstatus im murinen Modell des Niemann-Pick Typ C

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Mattern, Nick
aus Heppenheim

Gießen 2026

Knochenstatus im murinen Modell des Niemann-Pick Typ C

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Mattern, Nick
aus Heppenheim

Gießen 2026

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Aus der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
Labor für experimentelle Unfallchirurgie

Gutachterin: Prof. Dr. Katrin Susanne Lips
Gutachter: Prof. Dr. Andreas Schäffler

Tag der Disputation: 03.02.2026

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Physiologie des Knochens	1
1.2	Sphingolipide	5
1.2.1	Aufbau und Funktion	5
1.2.2	Biosynthese und Abbau	6
1.2.3	Rolle der Sphingolipide bei der Knochenhomöostase	6
1.2.3.1	Auswirkungen von Cholesterin auf den Knochenstatus	10
1.2.4	Rolle der Sphingolipide bei Lipidspeicherkrankheiten	11
1.2.5	Der Knochenstatus bei anderen Sphingolipidosen	12
1.3	Morbus Niemann-Pick	13
1.3.1	Typ A und B	13
1.3.2	Typ C	14
1.3.3	NPC des verwendeten <i>Npc1</i> ^{-/-} -Mausmodells	16
1.3.4	Behandlungsstrategien des Morbus Niemann-Pick Typ C	17
1.3.5	Sphingolipidakkumulation bei NPC	18
1.4	Ziel der Arbeit	20
2	Material und Methode	22
2.1	Materialien	22
2.1.1	Proben	22
2.1.1.1	Proben für das Histologielabor	22
2.1.1.2	Proben für das Molekularbiologielabor	24
2.2	Methodik	25
2.2.1	Fixation	25
2.2.1.1	Fixation der Proben für die histologische Untersuchung	25
2.2.1.2	Fixation der Proben für die molekularbiologische Untersuchung	25
2.2.2	Histologische Färbungen	26
2.2.2.1	Paraffineinbettung	26
2.2.2.2	Technoviteinbettung	28
2.2.2.3	Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung) von Paraffinschnitten	30
2.2.2.4	Toluidinblau-Färbung (TB-Färbung) von Paraffinschnitten	30
2.2.2.5	Giemsa-Färbung von Paraffinschnitten	31
2.2.2.6	Kossa-van-Gieson-Färbung von T9100-Schnitten	31
2.2.2.7	Movat-Pentachrom Färbung von T9100-Schnitten	32
2.2.2.8	Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten	33
2.2.2.9	Enzymhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten	34
2.2.3	Histomorphometrie	35
2.2.4	Mikro-Computertomographie (μ CT)	38
2.2.4.1	Bildbeschaffung und Rekonstruktion	38
2.2.4.2	Bildverarbeitung und Analyse	39
2.2.5	Molekularbiologie	42
2.2.5.1	RNA-Isolation	42
2.2.5.2	cDNA-Synthese	43
2.2.5.3	Real-time reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion	43
2.2.5.4	PCR-Etablierung	45

2.2.6	Klinische Umfrage	47
2.2.7	Statistische Analyse	47
3	Ergebnisse	49
3.1	Histomorphometrie	49
3.2	Deskriptive histologische Untersuchung	56
3.2.1	Toludinblau und Hämatoxylin-Eosin-Färbung	56
3.2.2	ASMA-Färbung	59
3.2.3	Kossa-van-Gieson und Movat-Pentachrom Färbung	61
3.2.4	Giemsa-Färbung	63
3.3	µCT-Untersuchung	63
3.4	Molekularbiologie	70
3.5	Patientenumfrage	75
4	Diskussion	77
4.1	Knochenstatus bei Morbus Niemann-Pick Typ C	77
4.1.1	Interpretation der histologischen und histomorphometrischen Untersuchung	77
4.1.2	Interpretation der µCT-Ergebnisse	81
4.1.3	Interpretation der Umfrageergebnisse	82
4.2	Einfluss der medikamentösen Behandlung auf den Knochenstatus	85
4.3	Einfluss der Sexualhormone auf den Knochenstatus bei NPC	89
4.4	Interpretation der Genexpressionsanalyse	91
4.5	Einfluss der Organschädigungen bei NPC auf den Knochenstatus	94
4.6	Limitationen der Studie	94
4.7	Schlussfolgerung und Ausblick	96
5	Zusammenfassung	97
6	Summary	99
7	Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	100
7.1	Abkürzungsverzeichnis	100
7.2	Abbildungsverzeichnis	103
7.3	Tabellenverzeichnis	105
8	Literaturverzeichnis	106
9	Anhang	125
9.1	Umfrage Knochenstatus bei NPC	125

10	Publikationsverzeichnis	135
10.1	Kongressbeiträge	135
11	Ehrenwörtliche Erklärung	136
12	Danksagung	137

1 EINLEITUNG

1.1 PHYSIOLOGIE DES KNOCHENS

Knochengewebe gehört zu der Gruppe der Binde- und Stützgewebe, wobei es im Speziellen ein festes und hartes Bindegewebe ist [1]. Die spezifischen Eigenschaften des Knochens beruhen vor allem auf der Verkalkung der Knochenmatrix. Diese verleiht dem Knochen eine hohe Zug- und Druckfestigkeit, ermöglicht es ihm aber auch, großen Biege- und Torsionsbelastungen Stand zu halten [2]. Mit seinen besonderen Eigenschaften dient der Knochen dem Organismus sowohl zur Fortbewegung, indem er eine Gerüststruktur für die Muskulatur bereitstellt, als auch zum Schutz innerer Organe [3].

Auch für den Elektrolythaushalt des Körpers ist der Knochen unabdingbar. So dient er als das Depot für Kalzium, wovon er je nach Habitus 1-2 kg speichert. Des Weiteren speichert der Knochen weitere Elektrolyte wie Phosphat, Magnesium und Natrium [4, 1].

Knochen sind aus einer Substantia compacta und einer Substantia spongiosa aufgebaut. Das Skelett eines erwachsenen Menschen besteht insgesamt zu 80 % aus Substantia compacta, auch Kortikalis genannt, und zu 20 % aus Substantia spongiosa, auch Trabekelknochen oder einfach Spongiosa genannt [5]. Das Verhältnis Kortikalis/ Spongiosa unterscheidet sich dabei je nach Knochen stark. Beispielsweise beträgt das Verhältnis im Oberschenkelkopf ungefähr 50:50 [5]. Die Kortikalis besteht aus sehr dichtem, mineralisiertem Gewebe, welches besonders im Schaftbereich der langen Röhrenknochen, mit bis zu 10 mm Schichtdicke beim Menschen, stark ausgeprägt ist [2]. Die Kortikalis hat eine äußere/periostale Oberfläche. Dieser liegt die Knochenhaut, Periost genannt, auf. Nach innen wird die Kortikalis durch die endostale Oberfläche begrenzt, ihr liegt die innere Knochenhaut, das Endost, auf [5].

Röhrenknochen werden anhand drei verschiedener Abschnitte unterschieden (Abbildung 1): Im Schaftbereich, Diaphyse genannt, verdichtet sich die Substantia compacta und bildet eine Röhre. Im Inneren befindet sich die Markhöhle (Cavum medullare), diese enthält das Knochenmark. Der Diaphyse der langen Knochen auf beiden Seiten anliegend folgt die Metaphyse, welche sich als ein aufgeweiteter Bereich darstellt, der die Diaphyse mit der Epiphyse verbindet. Die Epiphyse liegt der Metaphyse durch eine Wachstumsfuge getrennt an, von der das Längenwachstum des Knochens ausgeht [3].

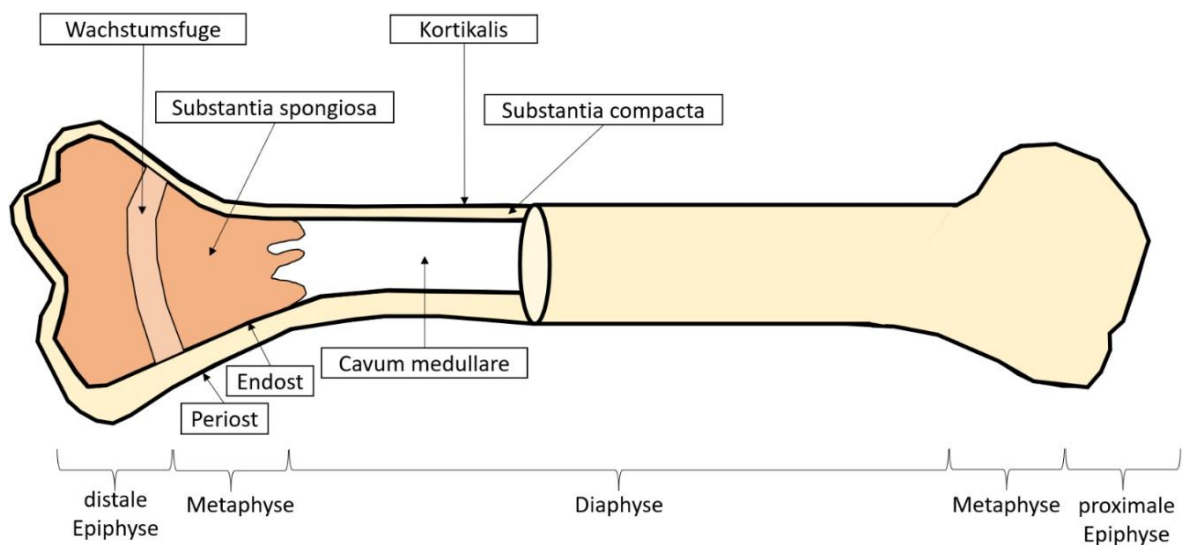


Abbildung 1: Aufbau langer Röhrenknochen.

Im Inneren der Metaphyse und der Epiphyse befindet sich die Substantia spongiosa, die ein Netzwerk aus kleinen Knochensäulen, den Trabekeln, bildet [2]. Die Substantia spongiosa hat trotz ihres geringen Anteils am Gesamtknochen von nur 20 % bei weitem den größten Anteil an Knochenoberfläche [5]. Architektonisch ist die Spongiosa so gebildet, dass die Knochen trabekel Zug- oder Druckbeanspruchung gut standhalten [2].

Die Knochenmatrix besteht zu etwa 30 % aus organischem Material [6]. Den Hauptbestandteil hiervon bildet mit ca. 90 % das Kollagen Typ I. Die restlichen 10 % setzen sich aus Kollagen Typ III und V, sowie nicht fibrillärem Kollagen und anderen Proteinen zusammen. Hierzu zählen unter anderem Osteokalzin, Osteopontin und Sclerostin [7]. Die Funktion dieser Proteine ist allerdings bisher oft nur unvollständig bekannt. Anorganische Materialien machen rund zwei Drittel des Knochens aus [6]. Diese bestehen aus Hydroxylapatit, wobei die Hydroxylgruppe öfter auch durch ein Fluoridion ersetzt wird, das die Härte des Minerals weiter steigert [1]. Die verbleibenden 5-10 % der Bestandteile sind Wasser und Lipide [6].

Die Knochenzellen werden grundsätzlich in Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten unterschieden. Die Osteoblasten und die Osteozyten entstammen dabei einer gemeinsamen Entwicklungsreihe. Osteoblasten sind die Vorläuferzellen der Osteozyten und stammen von mesenchymalen Stammzellen ab, die sich über verschiedene Zwischenstufen (Abbildung 2) ausdifferenziert haben [8, 9]. Ihre Form ist abhängig von ihrer Aktivität: Sie sind in ihrer aktiven Form kubisch, in der weniger aktiven Form erscheinen sie

flach und werden dann als Saumzellen bezeichnet. Ihre Zellmembran ist reich an alkalischer Phosphatase (ALP), welche eine wichtige Rolle bei der Mineralisierung des Knochens spielt.

Die Funktion der Osteoblasten ist es, die vorläufige, nicht verkalkte Knochensubstanz, das Osteoid, zu bilden. Anschließend sorgen die Zellen für die Mineralisierung des Osteoids [10]. Dies geschieht durch Abschnürung kleiner Matrixvesikel, in denen Apatitkristalle gebildet werden. Die Kristalle wachsen in den Vesikeln, bis sie diese aufreißen. Anschließend lagern die Apatitkristalle sich an die Kollagenfasern im Osteoid an und wachsen dort weiter, bis vollständig mineralisierter Knochen vorliegt [11]. Des Weiteren regulieren die Osteoblasten die Osteoklastendifferenzierung und steuern somit indirekt auch die Knochenresorption [10]. Schlussendlich entstehen aus den Osteoblasten Osteozyten, indem sie sich in der Knochenmatrix einmauern, in der sie sich anfangen morphologisch zu verändern.

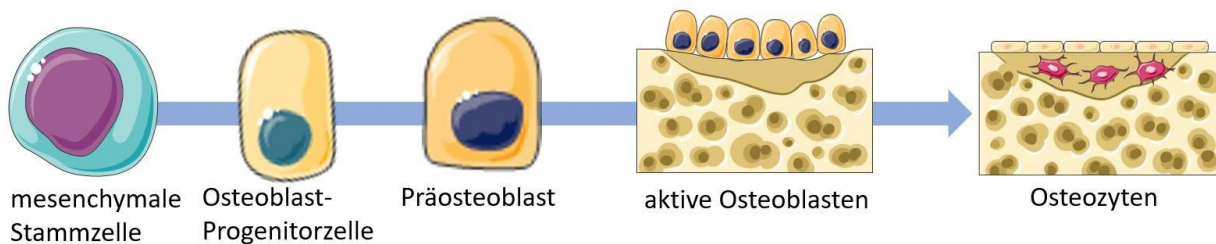


Abbildung 2: Knochenzelllinie von der mesenchymalen Stammzelle bis zum Osteozyten

Osteozyten besitzen lange, schlanke Fortsätze, die in kleinen Knochenkanälen, den sogenannten Canaliculi, liegen. Über diese stehen sie mit anderen Osteozyten in Kontakt. Die Canaliculi der Osteozyten verbinden sich an ihren Kontaktstellen über Gap Junctions. Diese Kanäle bestehen hauptsächlich aus Connexin 43 (Cx43) und dienen dem Austausch von intrazellulären Signalen [12]. Die Osteozyten erfüllen sehr vielfältige Aufgaben. Eine davon ist die Anpassung des Knochens an die Belastung, welche sie mittels mechanosensitiver Membrankanäle (Piezo-Kanäle) wahrnehmen [13]. In Reaktion auf Reize modulieren sie die knochenbildenden Osteoblasten und die knochenabbauenden Osteoklasten. Zum Beispiel schütten die Osteozyten je nach Beanspruchung des Knochens mehr oder weniger Sclerostin aus. Dieses ist in der Lage Osteoblasten und damit die Knochenbildung zu hemmen [1].

Osteoklasten stammen im Gegensatz zu den anderen Knochenzellen von hämatopoetischen Stammzellen ab und sind mit den Makrophagen verwandt (Abbildung 3). Sie sind spezialisierte Polykaryonen, welche für den Knochenabbau verantwortlich sind [14].

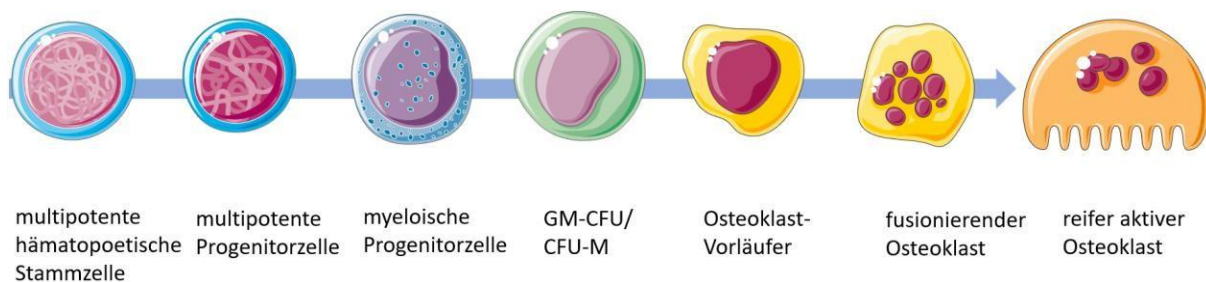


Abbildung 3: Knochenzelllinie von der multipotenten hämatopoetischen Stammzelle bis hin zu einem reifen, aktiven Osteoklasten.

Die Zellen sind reich an Tartrat-resistenter-saurer-Phosphatase (TRAP), welche sie zum Knochenabbau benötigen [15]. Über eine Versiegelungszone, in der Integrine die Membran der Osteoklasten mit den Matrixkomponenten des Knochens verbinden, bilden die Osteoklasten einen abgeschlossenen Raum, die sogenannte Howship-Lakune. In diese sezerniert der Osteoklast unter anderem stark verdünnte Salzsäure, als auch lysosomale und nicht-lysosomale Enzyme, welche dazu dienen, den anliegenden, mineralisierten Knochen abzubauen [1]. Ein wichtiges lysosomales Enzym ist dabei Cathepsin K (CtsK), dessen Funktion es ist, Kollagen und andere Matrixproteine beim Vorgang der Knochenresorption abzubauen [16].

1.2 SPHINGOLIPIDE

1.2.1 Aufbau und Funktion

Beinahe alle Zellen beinhalten Sphingolipide, welche einen wichtigen Baustein aller zellulären Membranen darstellen, sowie auch als Signalmediatoren fungieren [17]. Sphingolipide gehören zu der Gruppe der amphiphilen Lipide. Genauer bedeutet dies, sie besitzen eine hydrophile Kopfgruppe, während ihre Fettsäurereste hydrophobe Alkanreste tragen. Zu der Familie der Sphingolipide gehören Verbindungen des Aminodialkohols Sphingosin [18] (Abbildung 4).

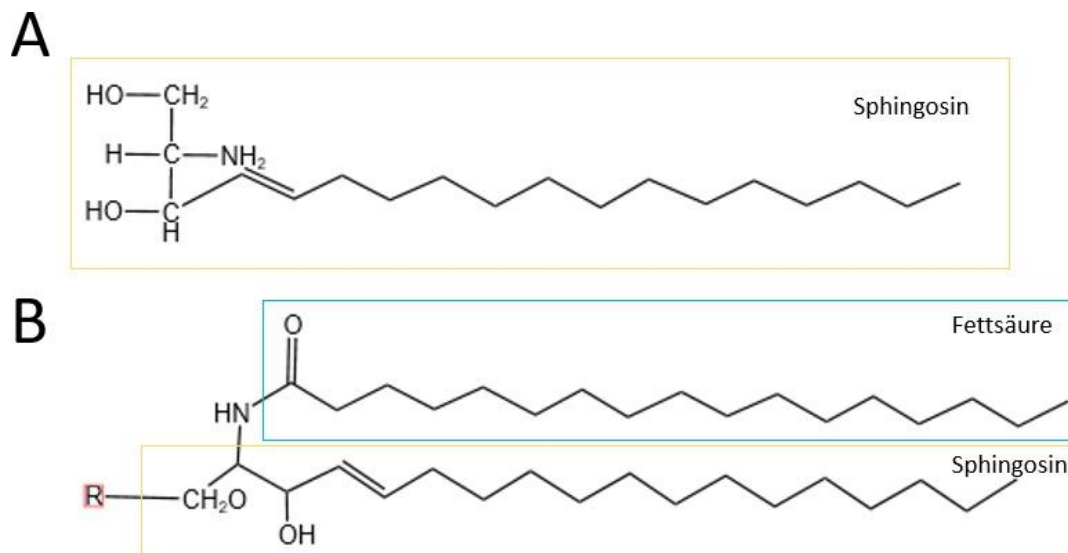


Abbildung 4: Allgemeine Struktur eines Sphingolipids.

A zeigt die chemische Struktur des Sphingosins. B stellt die allgemeine Struktur eines Sphingolipids da. Wird R durch ein Wasserstoffatom ausgetauscht, zeigt Abschnitt B den Aufbau eines Ceramids. (Erstellt mit Kingdraw 3.0)

Der amphiphile Aufbau sorgt dafür, dass sich beim Zusammentreffen mehrerer amphiphiler Lipide die hydrophoben Fettsäurereste aneinanderlagern und sich die hydrophilen Kopfgruppen zur wässrigen Schicht ausrichten. Sphingolipide besitzen wie auch Phosphoglyceride reichlich hydrophobe Anteile, sodass sie in der Lage sind, Doppelschichten zu bilden [18]. Diese Eigenschaft macht sie zu einem wichtigen Bestandteil der zellulären Plasmamembran, sowie intrazellulärer Membranen. Sphingolipide machen etwa 10-20 % der Lipide innerhalb der Zellmembran aus. Auch an Funktionen der Signaltrans-

duktion intra-, sowie extrazellulär, sind sie beteiligt [18, 19]. Am Beispiel des Sphingolipids Sphingosin-1-Phosphat (Sph1P) lassen sich die vielfältigen Funktionen der Sphingolipide gut darstellen. Sph1P wirkt extrazellulär an einem von fünf Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren [18, 20]. Auch intrazelluläre Funktionen des Sph1P werden diskutiert [21]. Durch seinen amphiphilen Aufbau ist es in der Lage, die Plasmamembran zu verlassen und als intrazellulärer, diffusionsfähiger Mediator zu agieren [22, 23]. Sph1P fördert die Proliferation in vielen Zellen und wirkt antiapoptotisch [18]. Des Weiteren fungiert Sph1P auch bei der Regulation der Gefäßintaktheit. Sphingosin-1-Phosphat wirkt zum einen bei der Angiogenese [24], als auch als Regulator der Gefäßpermeabilität bei vasculären Entzündungen [22].

1.2.2 Biosynthese und Abbau

Die de-novo Synthese der Sphingolipide findet intrazellulär am endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat statt. Zunächst wird das Ausgangsprodukt Ceramid am endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Ceramid entsteht durch eine Verknüpfung des Sphingosins mit einem Acyl-CoA [18]. Die weitere Biosynthese der einzelnen Sphingolipide findet im Golgiapparat statt: Hier entstehen eine Vielzahl an verschiedene Subgruppen, wie Sphingomyelin, Ganglioside und verschiedene Glycosphingolipide [18, 25].

Der Abbau wiederum findet in den Lysosomen statt. Hierbei spielen Enzyme, sogenannte Hydrolasen eine Rolle. Bestimmte Glykoproteine binden die abzubauenen Sphingolipide, woraufhin die Hydrolasen die Lipide spalten. Je nach pH-Wert der Umgebung wurden bisher drei verschiedene Arten von Sphingolipid-abbauenden Hydrolasen entdeckt: die neutrale, die saure und die alkalische Sphingomyelinase [17]. Beim Abbau bildet sich erneut das Ausgangsprodukt Ceramid, welches durch Phosphorylierung und anschließender Deacylierung zu Sphingosin umgewandelt werden kann. Sphingosin wirkt als Inhibitor der Proteinkinase C [18]. Aus Sphingosin kann unter Energieaufwand mithilfe der Sphingosinkinase Sph1P gebildet werden. Aber auch das Ceramid selbst ist nicht nur Ausgangsprodukt neuer Sphingolipide, sondern in einigen Zellen auch an der Einleitung der Apoptose beteiligt [18].

1.2.3 Rolle der Sphingolipide bei der Knochenhomöostase

Für diese Arbeit ist die Akkumulation von Sphingolipiden von Interesse, da diese bei der NPC-Krankheit ausschlaggebend für den Phänotyp der Erkrankung sind. Außerdem ist

bekannt, dass Sphingolipide wichtige Regulatoren der Osteoklasten und Osteoblasten darstellen und so einen wichtigen Einfluss auf die Knochenhomöostase haben. Dabei hat Sph1P sowohl intra- als auch extrazellulär verschiedene Funktionen. So fördert beispielsweise Sph1P im Plasma den Eintritt von Osteoklastenvorläufern aus dem Blut in den Knochen. Zudem fördert es die Osteoklastendifferenzierung [26–28]. Des Weiteren fungiert Sph1P in Osteozyten selbst als Messenger zur Veränderung des zellulären Kalzium- und Prostaglandin E2 (PGE2) Spiegels. Hier sind zwei verschiedene Wege bekannt (Abbildung 5): Erstens über intrazellulär gelegenes Sph1P, welches von Osteozyten als Reaktion auf mechanische Belastung produziert wird. Zweitens über G-Protein gekoppelte Rezeptoren an die Sph1P bindet [29, 30]. So spielt die Sph1P-Produktion in den Osteozyten eine wichtige Rolle im parakrinen Osteoblasten-Osteoklasten-Crosstalk. Zudem kann in der Zelle befindliches Sph1P in den Blutkreislauf freigesetzt werden und dort an Sph1P-Rezeptoren auf Osteoblasten binden. Diese Bindung induziert die Zelldifferenzierung und auch die *Receptor Activator of NF- κ B Ligand* (RANKL)-Expression [31]. RANKL wird von den Osteoblasten und Osteozyten produziert und bindet an den RANK-Rezeptor von Osteoklasten, was dazu führt, dass diese aktiviert werden.

Spannenderweise ist ein erhöhter Sph1P-Spiegel im Blut von über 200 nM eng verbunden mit dem Risiko Knochenbrüche zu erleiden und eine niedrige Knochenmineraldichte zu besitzen [32]. Auch konnte gezeigt werden, dass die Synovialflüssigkeit bei Patienten mit rheumatoider Arthritis wesentlich höhere Sph1P-Spiegel aufweist als bei Patienten mit nicht-entzündlicher Osteoarthritis [33].

Es gibt aber auch sowohl in vivo als auch in vitro Hinweise darauf, dass Sph1P die Osteoblasten in ihrer knochenbildenden Funktion beeinflussen kann [34, 35]. Genauer stimuliert Sph1P die Differenzierung und das Überleben, sowie die Osteoblastenfunktion [36–38] (Abbildung 5). Sph1P fungiert dabei als anaboles von Osteoklasten sezerniertes Zytokin. Untersuchungen zeigten, dass eine erhöhte Expression von SphK1 und Sph1P in Osteoklasten, erreicht durch die selektive Deletion von Cathepsin K in Osteoklasten, zu einem Anstieg der Knochenbildungsrate führt [34]. Zudem zeigten Medien mit Cathepsin-K-Knock-out-Osteoklasten, dass sie die Osteoblastendifferenzierung anregen können. Diese Induktion konnte wiederum durch die Unterbindung der Sph1P-Signalwege in den Osteoblasten blockiert werden [34].

Neben Sph1P sind Ceramide wichtig für die Regulation der Knochenhomöostase. Ceramide sind eine Form der Sphingolipide, bestehend aus einem Sphingosin, das über eine Amidbindung an eine Fettsäure gebunden ist [18]. In vielen Studien konnte gezeigt

werden, dass Ceramide in verschiedenen Zelltypen eine pro-apoptotische Rolle einnehmen. Dabei wurde auch die Rolle von Ceramid in der Apoptoseregulation von Knochenzellen *in vitro* untersucht [39]. Es konnte gezeigt werden, dass Ceramide am Mechanismus des Stickstoff-induzierten Zelltods von Osteoblastenzellen beteiligt sind. Genauer konnte in MC3T3-E1-Präosteoblasten, die mit Natriumnitroprussid versetzt wurden, ein Anstieg der Freisetzung langkettiger Ceramide beobachtet werden, der dann wiederum die Cytochrom-C Freisetzung stimulierte. Dies aktiviert den intrinsischen Weg der Apoptose [40]. Auch konnten in MC3TC-E1-Präosteoblasten, die mit Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) behandelt wurden, einen Anstieg der endogenen Ceramide nachgewiesen werden. Dieses von TNF- α generierte Ceramid führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF κ B). Was ebenfalls zur Apoptose der Osteoblasten führt. Auch die exogene Behandlung der Zellen mit synthetischem Ceramid bewirkte einen NF κ B Anstieg [41]. In neueren Studien konnte bestätigt werden, dass C2-Ceramid die Apoptose in Osteoblasten auslösen. Allerdings korrelierte eine Behandlung mit niedriger Dosis C2-Ceramid mit einem erhöhten Zellüberleben. Es scheint im Knochen also sowohl proapoptotische, als auch überlebensfördernde Signalwege zu geben, in denen Ceramide eine Rolle spielen [42].

Osteoklasten werden ebenfalls von Ceramiden beeinflusst. So hemmte die Behandlung von Osteoklasten mit Ceramid im Hasenmodell die Bildung von F-Actin-Ringen in der Versieglungszone der Howship-Lakune (Abbildung 5). Dies sorgte für eine verminderte Resorptionskapazität der Osteoklasten [43]. Entgegen der Erwartung förderte die Hochregulierung der Ceramid-Synthese durch TNF α das Überleben von kultivierten Mäuseosteoklasten [44] (Abbildung 5). Auch in der Osteoklastogenese scheinen Ceramide eine

wichtige Rolle zu spielen. Zum Beispiel induziert ein Caeramidderivat, das Lactosylceramid, die Expression des Rezeptor-Aktivators von NFκB (RANK) in Osteoklasten [45].

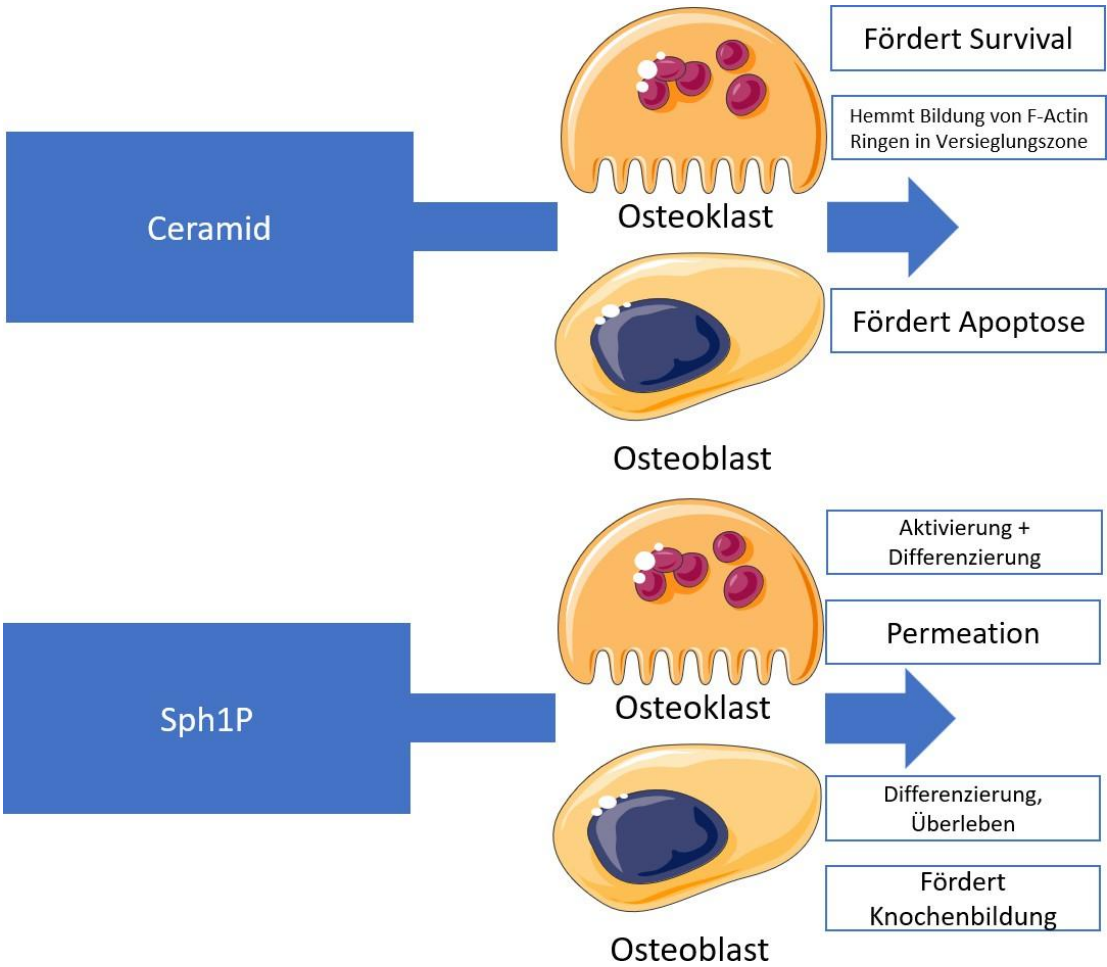


Abbildung 5: Die Effekte von Ceramid und Sphingosin-1-Phosphat auf Osteoblasten und Osteoklasten.

1.2.3.1 Auswirkungen von Cholesterin auf den Knochenstatus

Beim Morbus Niemann-Pick Typ C kommt es zur Cholesterinansammlung in den späten Endosomen und Lysosomen (Kapitel 1.3.2). Die Gesamtcholesterin-konzentration im Plasma sind bei *Npc1*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen erhöht, unabhängig davon, ob fettreiches Futter oder Standardfutter verwendet wird [46]. Bei NPC-betroffenen Menschen sind die Cholesterinwerte sehr variabel. In einer Untersuchung an 32 NPC-Patienten zeigte sich allerdings, dass NPC-Patienten eine höhere Wahrscheinlichkeit für niedrige Blutcholesterinspiegel haben im Vergleich zur Gesamtbevölkerung [47]. Hohe Cholesterinspiegel im Plasma korrelieren ebenfalls positiv mit einem schlechten Knochenstatus [48, 49]. Ursächlich hierfür sind die Auswirkungen von Serumcholesterin, aber auch intrazellulärem Cholesterin auf die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten [50].

1.2.4 Rolle der Sphingolipide bei Lipidspeicherkrankheiten

Einige erbliche Stoffwechseldefekte lassen sich auf pathologische Lipidansammlungen zurückführen. Diese Erkrankungen werden unter den Begriffen Lipidspeicherkrankheiten oder Lipidosen zusammengefasst. Lagern sich vermehrt fehlerhaft zusammengesetzte Sphingolipide in Geweben des Körpers ab, so wird die Lipidose auch als Sphingolipidose bezeichnet [18]. Als Ursache wird heutzutage von genetischen Defekten der lipidabbauenden Hydrolasen ausgegangen. Bekannte Sphingolipidosen sind unter anderem Morbus Gaucher, Morbus Niemann-Pick, Morbus Fabry, die GM1-Gangliosidose, sowie Morbus Sandhoff-Jatzkewitz und weitere.

Morbus Gaucher basiert auf einem Enzymmangel der β -Glucoceramidase, welche physiologisch Glucose von dem Ceramidgerüst abspaltet [18]. Der Mangel der β -Glucoceramidase führt zu einer pathologischen Ablagerung an Glucoceramid in Makrophagen, woraufhin es zu schweren Störungen in verschiedenen Organen und Geweben kommt [51].

Beim Morbus Fabry, einer X-chromosomal vererbten Lipidspeicherkrankheit, kommt es zur Akkumulation von Globotriaosylceramid, einem Glycosphingolipid [52]. Ursächlich ist hierfür ein Defekt der α -Galactosidase A. Diese kann entweder wie bei der klassischen Variante vollständig funktionslos sein oder wie bei der atypischen Variante eine Restaktivität besitzen [53]. Die Symptome der Krankheit sind vielfältig und reichen von renalen, zerebrovaskulären und kardialen Manifestationen [53] bis hin zu fazialen Dysmorphien und Veränderungen an Rumpf und Extremitäten [54]. Frauen sind in der Regel weniger stark betroffen als Männer [55].

Die GM1-Gangliosidose beruht auf einem Defekt im GLB1-Gen, das für die β -Galaktosidase kodiert. Folge ist die Akkumulation eines Monosialogangliosids, dem Monosialotetrahexosylgangliosid (GM1) [56, 57]. Dieses ist ein wichtiger Bestandteil der Nervenzellmembran. Antikörper gegen GM1 sind zum Beispiel auch am Guillain-Barré-Syndrom beteiligt [58]. Es gibt verschiedene Verlaufsformen der GM1-Gangliosidose, die einen unterschiedlich schweren Verlauf aufweisen. Gezeichnet ist die Krankheit durch variable neurologische, skelettale und muskuläre Beteiligung, sowie eine Hepatosplenomegalie, Hyperakusis oder auch eine geschwächte Darmperistaltik [59, 60].

Der Morbus Sandhoff-Jatzkewitz zeigt ebenfalls verschiedene Verlaufsformen. Es treten neurologische plus psychiatrische Symptome, sowie Beteiligungen der inneren Organe

und des muskuloskelettalen Systems auf [61]. Ursächlich ist ein Defekt der Hexosaminidase, die Folge: eine Anreicherung des Tay-Sachs-Gangliosids auch GM2-Gangliosid genannt [62].

1.2.5 Der Knochenstatus bei anderen Sphingolipidosen

Bei anderen Sphingolipidosen prägt der Knochenstatus häufig das klinische Bild mit. Ein Beispiel hierfür ist der Morbus Gaucher, eine der häufigsten Lipidspeicherkrankheiten. Diese durch einen Mangel an Glukocerebrosidase verursachte Erkrankung zeigt sich klinisch unter anderem durch eine verminderte Anzahl an Blutzellen und durch Skelettanomalien [51]. Die beiden wichtigsten Speicherprodukte das Glucosylceramid und das Glucosylsphingosin sind dabei entscheidend für die Entstehung der klinischen Symptomatik [51].

Ebenfalls scheint bei der Niemann-Pick Typ B Krankheit eine Knochenbeteiligung vorhanden zu sein. Eine Umfrage an 59 pädiatrischen und erwachsenen Niemann-Pick Typ B Patienten ergab, dass 39 % über Gelenk- oder Gliederschmerzen klagte [63]. Zudem zeigten Knochenscans an 46 NPB-Patienten im Vergleich zu einer Kohorte gesunder, nicht betroffener Kinder und Erwachsener Auffälligkeiten. Es wurden statistisch signifikante Unterschiede sowohl in Knochenmineralgehalt und -dichte bei pädiatrischen NPB-Patienten gefunden. Erwachsene Probanden zeigten gemäß WHO-Klassifizierung an einer oder mehreren Stellen Zeichen einer Osteopenie oder Osteoporose [64]. Aber auch weitere Sphingolipidosen zeigen einen pathologischen Knochenstatus. Aufgrund der Seltenheit und der oft frühen Sterblichkeit der Erkrankungen ist allerdings hierzu nicht viel bekannt.

1.3 MORBUS NIEMANN-PICK

Die Niemann-Pick-Krankheit ist eine lysosomale Speicherkrankheit. Erstmals beschrieben wurde die Erkrankung 1914 vom deutschen Kinderarzt Albert Niemann [65]. Die Stoffwechselstörung wird heutzutage in die Typen A, B und C eingeteilt. Typ A und B gehören zu den Sphingolipidosen, bei denen die Ursache ein Defekt der sauren Sphingomyelinase ist. Durch diesen Mangel kommt es zur Anhäufung von Sphingomyelin sowie weiteren Lipiden in Zellen, die dem Monozyten-Makrophagen-System angehören [66, 67]. Typ C hingegen gilt als Lipidspeicherkrankheit, bei der es sich pathogenetisch um einen Defekt des Cholesterinstoffwechsels handelt [68].

1.3.1 Typ A und B

Der Morbus Niemann-Pick Typ B (NPB) entsteht, wie auch die Niemann-Pick Typ A (NPA), aufgrund eines Mangels an saurer Sphingomyelinase [67]. Es kommt zur Anhäufung verschiedener Lipide, wie Cholesterin und Ganglioside. Kennzeichnend für diese Typen sind aber die Anhäufung von Sphingomyelin [69, 70].

Die beiden Typen unterscheiden sich in der Ausprägung der Symptomatik [71, 72]. NPA ist die schwere Form des Sphingomyelinase-Mangels, die ungefähr bis zum Alter von drei Jahren zum Tod führt [67]. Die Patienten fallen innerhalb des ersten Lebensjahres aufgrund einer Hepatosplenomegalie, sowie Gedeihstörungen auf. Kennzeichnend für Typ A ist ein rapider, fortschreitender neurodegenerativer Prozess mit ausgeprägter Hypotonie und rezidivierenden Atemwegsinfektionen [67, 73].

NPB ist eine leichtere Subform der Niemann-Pick-Krankheit mit einem variableren Phänotyp. Es kommt hier im Gegensatz zu NPA zu keiner beziehungsweise einer geringen Beteiligung des zentralen Nervensystems. Allerdings wurden häufig Verläufe mit einer ausgeprägten Hepatosplenomegalie und Leberversagen oder schweren Lungenerkrankungen beschrieben [74, 63, 75]. Betroffene ohne neurologische Beteiligungen überleben in der Regel bis ins späte Kindes- oder Erwachsenenalter [63]. Histopathologisch sind bei Typ A und B lipidbeladene, große Schaumzellen in Organen wie Leber und Milz, aber auch in Lungenatemenwegen, Lymphknoten und dem Knochenmark zu finden [72].

1.3.2 Typ C

Der Morbus Niemann-Pick Typ C (NPC) ist eine lysosomale Speicherkrankheit. Sie betrifft etwa 1:100.000-150.000 Lebendgeborene und wird autosomal-rezessiv vererbt. Typ C unterscheidet sich von Typ A und B, da es sich hierbei um einen Cholesterinveresterungsdefekt handelt [68, 76]. Klinisch zeichnet er sich durch verschiedenste Symptome aus, die vor allem Leber, Milz, Motorik und Gehirn betreffen und unweigerlich zum vorzeitigen Tod führen [77]. Die klinische Symptomatik ist äußerst heterogen. So können die Symptome beispielsweise schon in der Perinatalperiode oder erst in einem Alter von 50 oder mehr Lebensjahren beginnen. Die Mehrzahl der Betroffenen sterben zwischen 10 und 25 Jahren [78, 79]. Abbildung 6 veranschaulicht die häufigsten Symptome des Morbus Niemann-Pick Typ C (Abbildung 6).

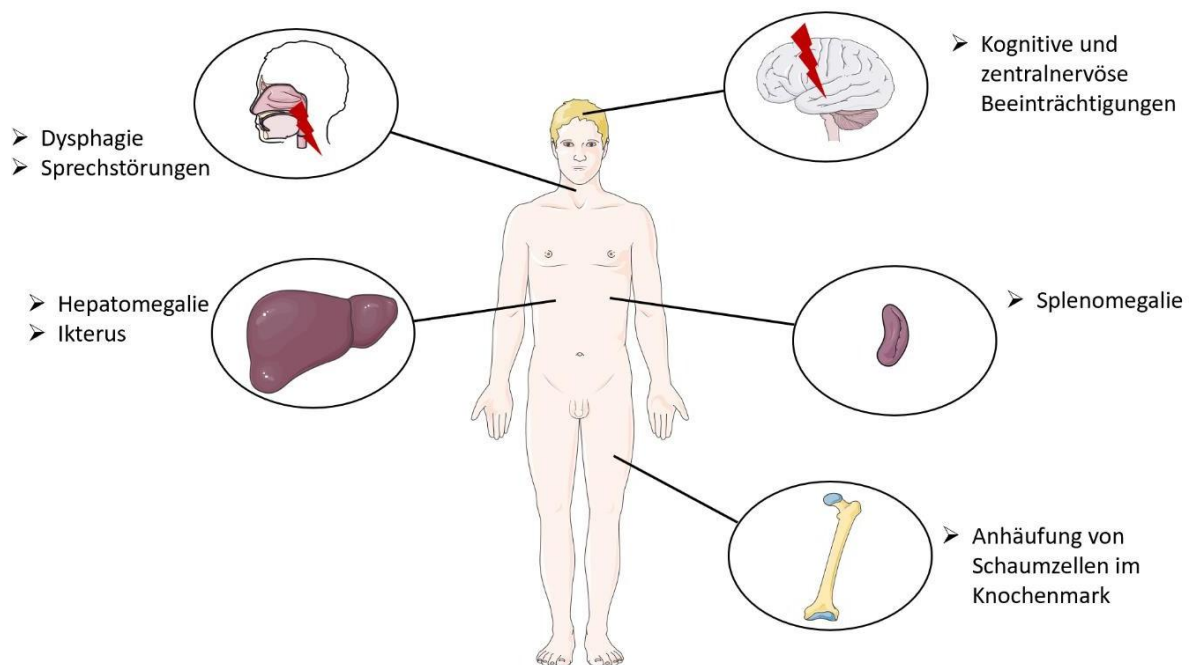


Abbildung 6: Auswahl an häufigen Symptomen des Morbus NPC (Eigenentwurf).

Zusätzlich kommt es häufig zu Ataxien und Anomalien der Bewegungsabläufe, sowie zur Hypo-, bis hin zur Aplasie der Bauchwandmuskulatur. Die psychiatrischen und neurologischen Symptome können sehr vielfältig sein. Häufig zeigen sich zum Beispiel Dysarthrie, Depression, Schizophrenie ähnliche Psychosen, aggressives Verhalten, Spastiken, Apathie und Krampfanfällen oder auch eine Kataplexie [80, 81].

Ursächlich für NPC ist eine Fehlfunktion in einem Gen auf Chromosom 18q11, das für ein Protein in den späten Endosomen/Lysosomen codiert: Das NPC1-Gen [53]. Es kann

aber auch ein weiteres Gen, das NPC2-Gen, bei einer Fehlfunktion pathogenomisch für NPC sein [54].

Die Proteine NPC1 und NPC2 agieren zusammen: So sammelt NPC2 innerhalb des Lysosoms Cholesterin und transportiert es zur N-terminalen Domäne von NPC1, welches in der limitierenden Membran des Lysosoms sitzt [82]. Der Mechanismus mit dem NPC1 dort den Cholesterinexport abschließt, ist nicht vollständig geklärt. Unumstritten ist allerdings, dass mutiertes NPC1 oder mutiertes NPC2 zu einer Akkumulation von Cholesterin in den späten Endosomen und Lysosomen von NPC-Patienten führt (Abbildung 7) [83]. Diese Akkumulation bewirkt eine Verlangsamung des gesamten endozytischen Prozesses [84, 85], da es zur Interaktion des Cholesterins mit Proteinen kommt, was funktionelle Beeinträchtigungen mit sich bringt [86, 87].

Genauer erfahren endolysosomale Proteine wie beispielsweise das Oxysterol-Bindungsprotein (ORP1L) [88] oder die vakuoläre H⁺-Adenosintriphosphatase (vATPase) [89] aufgrund des hohen Cholesteringehalts eine Konformationsänderung. Der erwirkte Funktionsverlust des ORP1L führt zu einer Immobilisation der Mikrotubuli, der Funktionsverlust der vATPase zu einem zu hohen pH-Wert in den Lysosomen [90, 85]. So wurde in Niemann-Pick Typ C-Fibroblasten ein endolysosomaler pH-Wert von $5,4 \pm 0,3$ gemessen. In der Kontrollgruppe betrug der pH-Wert $4,5 \pm 0,1$ [89]. Diese Veränderungen führen letztendlich zu einem Stoppen beziehungsweise Zusammenbruch des gesamten endolysosomalen System [88, 91].

Infolgedessen kommt es aufgrund von mehreren Faktoren auch zur Anhäufung sekundärer Lipide. Diese Faktoren sind zum Beispiel die verringerte Aktivität der lysosomalen sauren Lipase [92], günstige Wechselwirkungen zwischen Lipiden [93, 94] und die verringerte Enzymaktivität aufgrund der eingelagerten Lipide [95].

Es existieren fünf verschiedene Verlaufsformen des Morbus-Niemann Pick Typ C [96]. Sie unterscheiden sich vor allem im Manifestationsalter und in der Ausprägung der neurologischen Symptome:

Der perinatale Typ zeigt sich bereits im Säuglingsalter anhand einer schweren Hepatosplenomegalie [97, 98] und ist bereits während der Schwangerschaft per Sonographie anhand von Leber-, und Gedeihstörungen des Fötus zu erkennen. Auch eine Lungenbeteiligung sowie eine Mikrozephalie treten häufig auf. Diese Patienten versterben meist

im frühen Kindesalter, aufgrund von Leber- oder Lungenversagen. Die Lebenserwartung liegt bei 5-9 Monaten [79].

Beim zweiten Typ, dem früh-infantilen Verlaufstyp, beginnen die ersten Symptome wie eine Vergrößerung von Leber und Milz zwischen zwei und 12 Monaten. Die Kinder sind in ihrer motorischen Entwicklung verzögert und verlieren im Verlauf zuvor erworbene Fähigkeiten [99]. Abzugrenzen hiervon ist die spätinfantile Verlaufsform, welche ähnliche Symptome zeigt, sich aber erst im Alter von etwa 2-5 Jahren entwickelt [100].

Des Weiteren gibt es noch den juvenilen Verlaufstyp. Dieser zeigt sich in der Regel erstmalig im Alter zwischen 6 und 15 Jahren. Die Kinder beziehungsweise Jugendlichen entwickeln sich zunächst normal, fallen aber nach der Grundschulzeit mit progredienten Problemen bei der Aussprache und im Gangbild auf. Es kommt zu supranukleären Sakkaden- und Blicklähmungen und wie auch bei den zuvor genannten Verlaufsformen zur Hepatosplenomegalie. Im Endstadium zeigen die Patienten Symptome der Demenz und eine zunehmende Dysphagie. Betroffene überleben normalerweise bis ins Teenager- oder junge Erwachsenenalter [101, 100]. Die spät-infantile und die juvenile Form des Morbus NPC machen mit 60-70 % der Fälle den größten Anteil an Betroffenen aus [96].

Treten erst im Erwachsenenalter Symptome wie kognitiver Abbau und andere psychiatrische Symptome auf, so liegt die adulte Verlaufsform des Morbus NPC vor. Dieser macht bis zu einem Drittel aller NPC-Patienten aus. Anfangs dominieren Symptome, wie Hörstörungen [100], Psychosen und Depressionen [102, 103], wohingegen im fortgeschrittenen Stadium auch die klassischen Symptome der vorher genannten Subtypen wie Bewegungsstörungen auftreten [101]. Die Lebenserwartung liegt beim adulten Typ bei etwa 10 bis 20 Jahren nach Auftreten der ersten neurologischen Symptome [104].

1.3.3 NPC des verwendeten *Npc1*^{-/-}-Mausmodells

Der für die Untersuchungen verwendete BALB/cNctr-NPC1m1N/-J Jackson [105–108] *Npc1*^{-/-}-Mausstamm ahmt den humanen Morbus Niemann-Pick Typ C näherungsweise nach. Die prominentesten Folgen sind: Gewichtsverlust, Lipidakkumulation, Ataxie und progrediente Neurodegeneration. Die Neurodegeneration zeigt sich vor allem durch eine zerebrale Atrophie, eine Hypomyelinisierung, sensorische Defizite und eine Degeneration der Purkinje-Zellen im Cerebellum [107, 107, 109].

1.3.4 Behandlungsstrategien des Morbus Niemann-Pick Typ C

Es gibt mittlerweile verschiedene Ansätze wie eine Therapie des Morbus Niemann-Pick Typ C aussehen könnte. Bisher wird vor allem ein Medikament für die Behandlung des NPCs am Menschen eingesetzt. Seit Januar 2009 steht der Wirkstoff Miglustat® (MIGLU) zur Therapie progressiver neurologischer Symptome bei NPC-Betroffenen zur Verfügung. Der Imminozucker Miglustat® ist ein Substratreduzierer und wirkt indem er die Glucosylceramid-Synthase hemmt. Die Glucosylceramid-Synthase katalysiert den ersten Schritt in der Herstellung von Glykosphingolipiden [110]. Ihre Hemmung verbessert den Lipidtrafficking-Defekt bei NPC-Betroffenen, da weniger Lipide intrazellulär akkumulieren und der Lipidtransport der B-Lymphozyten ins periphere Blut normalisiert wird [111]. Studien zeigten, dass Miglustat® das Fortschreiten der Erkrankung verzögern und infolgedessen das Überleben der Erkrankten verlängern kann [112]. Allerdings klagen Patienten, die mit Miglustat® behandelt werden, gehäuft über gastrointestinale Nebenwirkungen wie Gewichtsverlust, Bauchmerzen, Blähungen und Durchfall [113].

Ein weiterer vielversprechender Therapieansatz ist die Gabe des Neurosteroids Allopregnanolon (ALLO), ein Metabolit von Progesteron. Dieses ist bei jungen, an NPC erkrankten, Mäusen in geringerer Menge vorhanden, wobei die Konzentration mit dem Alter der Mäuse abnimmt. Als Ursache hierfür wird das bei NPC akkumulierte Cholesterin angenommen, welche die Neurosteroidogenese stört [114]. In murinen Studien konnte gezeigt werden, dass durch die Zugabe von ALLO zum Trinkwasser die Lebenserwartung von *Npc1^{-/-}*-Mäusen erhöht wird [114].

Interessant für die Behandlung des NPCs ist zudem der als Lösungsmittel verwendete Ringzucker 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HP β CD). HP β CD ist eigentlich ein weit verbreitetes Vehikel zur Verabreichung von Arzneimitteln [115, 116]. Es wurde aber beobachtet, dass ALLO, das aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit zusammen mit HP β CD als Träger verabreicht wurde, die selbe Verbesserung bei *Npc1^{-/-}*-Mäusen erzielte, wie die alleinige Gabe von HP β CD [117–119]. HP β CD erhöht bei einfacher oder mehrfacher Applikation die Lebenserwartung im Mausmodell und verbessert sowohl die ZNS-, als auch die Lebermorphologie [117–121]. Die Wirkung beruht laut Ramirez et al. auf der Überwindung des lysosomalen Transportdefekts, welcher die Cholesterinspeicherungen im gesamten Tier nahezu normalisiert [122].

Zu erwähnen sind ebenfalls zwei weitere Medikamente die 2024 - nach Abschluss dieser Arbeit - zur Behandlung des NPCs zugelassen wurden: Arimocloamol (Miplyffa®) und

Acetylleucin (Aqneursa®, Tanganil®). Arimocloamol ist ein Hydroxylamin-Derivat, welches den vorzeitigen Abbau der NPC1- und NPC2-Proteine verhindern soll. Der genaue Wirkmechanismus ist hierbei allerdings nicht bekannt [123]. Acetylleucin ist ein Leucin-Derivat, von dem angenommen wird, dass es sich in die neuronale Zellmembran einlagert und dort eine Normalisierung des Membranpotentials bei NPC Betroffenen bewirkt [124, 125].

1.3.5 Sphingolipidakkumulation bei NPC

Der Morbus Niemann-Pick Typ C ist unter den Sphingolipidosen einzigartig, da keine Mutationen in den für den Sphingolipidabbau verantwortlichen Enzymen vorliegt. Spannenderweise sind gerade Sphingosine aber die Lipide, welche sich bei pharmakologischer Hemmung von NPC1 anreichern [126]. Sie verursachen auch bei Applikation in den Organismus einen Niemann-Pick Typ C-Phänotyp [127]. Dies führte früher zur Annahme, dass der Morbus Niemann-Pick Typ C, wie der Morbus NPA und NPB durch einen Defekt im Sphingolipidkatabolismus verursacht wird und nicht durch einen Defekt im Cholesterintransport. Doch woher kommt die Anhäufung der Sphingosine? Untersuchungen zeigten, dass ursächlich für die erhöhte Konzentration an Sphingoid-Basen und die verringerte Konzentration an Sph1P eine beeinträchtigte Aktivität der Sphingosin-1-Kinase ist [128]. Die Sphingosin-1-Kinase ist ein am Sphingolipid-Abbau beteiligtes Enzym, welches aus den Lysosomen austretendes Sphingosin zu Sph1P phosphoryliert.

Sph1P kann dann durch die Sph1P-Lyase entweder abgebaut oder wieder dephosphoryliert und für die Synthese von komplexeren Sphingolipiden oder Ceramid weiterverwendet werden [129] (Abbildung 7).

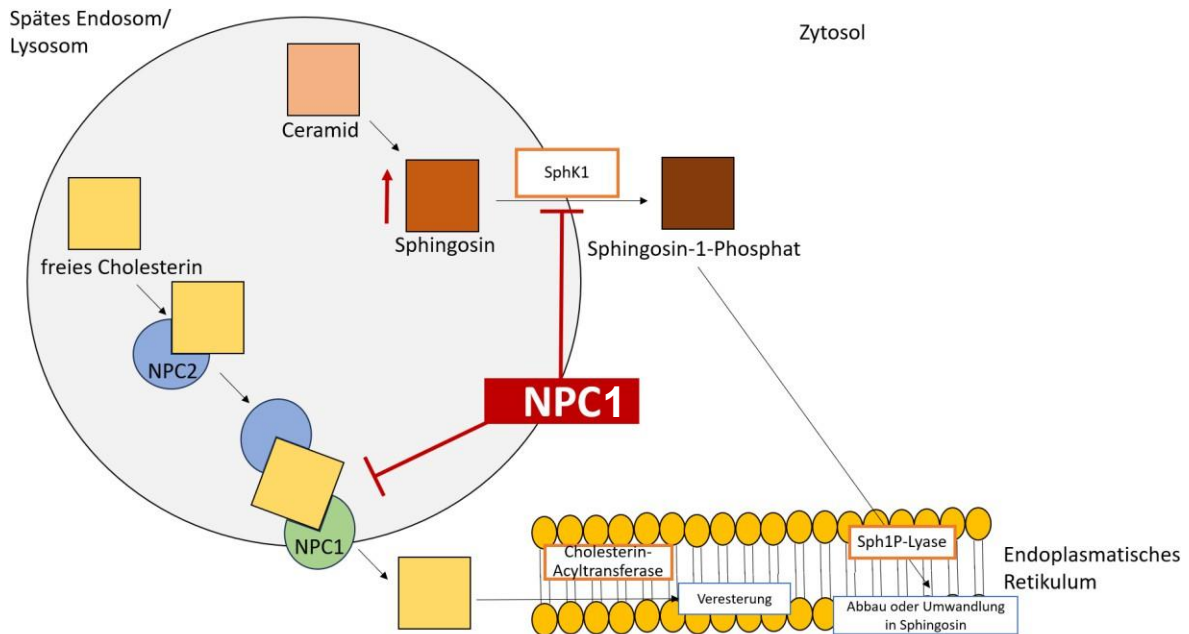


Abbildung 7: Anhäufung von Cholesterin und Sphingosin bei NPC1

(Eigenentwurf modifiziert nach Newton et al. [2018] [130]) Sphingolipide aus der Plasmamembran, die internalisiert wurden und nicht für das Recycling bestimmt sind, werden im Lysosom zunächst zu Ceramid und dann zu Sphingosin abgebaut. Sphingosin wird aus dem Lysosom exportiert und von der SphK zu Sph1P phosphoryliert. Im endoplasmatischen Retikulum wird Sph1P schlussendlich durch die Sph1P-Lyase abgebaut oder wieder in Sphingosin verwandelt. Das Sphingosin kann dann wieder verwendet werden. Bei NPC1 kommt es neben den ebenfalls links gezeigten charakteristischen Cholesterinanhäufungen auch zur Akkumulation von Sphingolipiden [130].

Ursächlich für die sekundäre Verringerung der SphK1 ist wahrscheinlich die Akkumulation von Cholesterin [131]. Das Problem der SphK1 scheint dabei ihre Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) vermittelte Aktivierung zu sein. Normalerweise aktiviert VEGF die SphK1 durch Bindung an den VEGF-Rezeptor 2. Dies ist bei einem NPC1-Mangel gestört, da ein NPC1-Mangel die Expression des VEGF deutlich reduziert [132].

Neben der defekten SphK1 sorgt aber ein zweiter gestörter Stoffwechselweg für die Akkumulation von Sphingolipiden: Der Defekt in der lysosomalen Kalziumaufnahme. Die lysosomale Kalziumaufnahme bei NPC-mutierten Zellen ist stark reduziert. In einem Zellmodell führte die arzneimittelinduzierte Speicherung von Sphingosin im Lysosom/späten Endosom zu einer Verminderung des Kalziumspiegels in diesen Organellen. Das führte

wiederum zur Speicherung von Cholesterin, Ceramid, Sphingomyelin und Glykosphingolipiden in diesen Kompartimenten. Schlussendlich stimuliert Sphingosin also somit seine eigene Speicherung [126]. Insgesamt ist allerdings der Mechanismus, durch den sich Sphingolipide bei NPC1 oder NPC2 Defekten anreichert bis heute noch nicht genauer bekannt. Allerdings ist es offensichtlich, dass die Sphingolipidakkumulation zu einer Störung der Kalzium und Sph1P vermittelten Stoffwechselwege führt, was lebenswichtige zelluläre Prozesse beeinflusst [130].

1.4 ZIEL DER ARBEIT

Es ist bekannt, dass Erkrankungen aus der Gruppe der Sphingolipidosen häufig Störungen im Knochenstoffwechsel aufweisen. Morbus Niemann-Pick Typ C ist eine solche Sphingolipidose auch wenn der zugrunde liegende Pathomechanismus der Sphingolipidakkumulation einzigartig ist. Die Auswirkungen der NPC1 und NPC2 Mutationen auf den Knochenstatus sind bis heute nicht erforscht. Bekannt ist allerdings, dass Sphingolipide, sowie das bei NPC relevante Sphingosin-1-Phosphat, sich auf den Knochenstoffwechsel auswirken. Seit 2009 steht mit Miglustat® ein Wirkstoff für die Behandlung von NPC auf dem Markt zur Verfügung, der das Überleben bei NPC verlängert. Durch das längere Überleben und der erfolgreichen Behandlung der bereits bekannten Symptome könnten weitere Manifestationen des NPC zukünftig klinisch eine Rolle spielen. In dieser Arbeit sollten im murinen *Npc1^{-/-}*-Modell des Morbus NPC die folgenden Fragen behandelt werden:

1. Ist der Knochenstatus bei Morbus Niemann-Pick Typ C verändert? Gibt es Kovariablen, die einen Einfluss nehmen?
2. Hat die medikamentöse Behandlung der an Morbus Niemann-Pick Typ C erkrankten Mäuse einen Einfluss auf den Knochenstatus? Verändern die eingesetzten Medikamente, vor allem HPβCD, den Knochenstatus beim Gesunden?
3. Welche Unterschiede gibt es in der postnatalen Entwicklung bei *Npc1^{-/-}*-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp? Wie verändert sich die Expression von krankheits- und knochen-spezifischen Markern im Zeitraum des Beginns der Symptome?

Die Analyse des Knochenstatus im murinen *Npc1^{-/-}*-Modell soll zur Charakterisierung der Regulation des Knochenstoffwechsels durch Sphingolipide beitragen. Es soll die Hypothese getestet werden, dass die Akkumulation von Sphingolipiden sowie die ebenfalls vorliegende verminderte Sphingosin-1-Phosphat Konzentration, sich bei *Npc1^{-/-}*-Mäusen negativ auf den Knochenstatus auswirkt. Dabei soll der Einfluss bereits bekannter Pathologien auf den Knochenstatus mit betrachtet werden.

Außerdem sollten durch eine klinische Umfrage Informationen zum Knochenstatus bei Menschen mit NPC erfasst werden, um diese Daten anschließend, vergleichend zu den Ergebnissen aus Tierversuchen, zu analysieren.

2 MATERIAL UND METHODE

2.1 MATERIALIEN

2.1.1 Proben

Alle untersuchten Proben stammten aus dem Institut für Anatomie der Universitätsmedizin Rostock unter der Leitung von Prof. Dr. med. Andreas Wree und aus der Fakultät VI Medizin und Gesundheitswissenschaften, Abteilung Anatomie der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg unter der Leitung von Prof. Dr. med. Anja Bräuer. Die Proben wurden dort entnommen und an die Experimentellen Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen gesendet. Jegliche Tierversuche wurden von den dort örtlichen Behörden genehmigt (Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei des Landes Mecklenburg-Vorpommern; Genehmigungs-ID: 7221.3-1.1-030/12, 14. Juni 2012 und Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit; Genehmigungs-ID: 33.19-42502-04-18/2828, 17. Dezember 2018). Die institutionellen Richtlinien für den Tierschutz und die Versuchsdurchführung wurden befolgt, sowie alle Anstrengungen unternommen, um die 3R-Richtlinien des Tierschutzes nach den Grundsätzen der Versuchstechniken von William Russel und Rex Burch umzusetzen [133]. Die weiteren entnommenen Organe der Versuchstiere wurden in Forschungsprojekten in Oldenburg und Rostock untersucht.

2.1.1.1 Proben für das Histologielabor

Heterozygote *Npc1*^{+/-}-Mäuse wurden als Zuchtpaare von *Npc1*-Mäusen der Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA) bezogen, um homozygote *Npc1*^{-/-}-Mäuse und *Npc1*^{+/+}-Mäuse zu erzeugen. Die Mäuse wurden unter Standardbedingungen mit freiem Zugang zu Futter und Wasser, bei einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Zyklus, einer Temperatur von 22 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von etwa 60 % gehalten. Die Genotypen wurden am postnatalen Tag 7 (P7) durch *polymerase chain reaction* (PCR)-Analyse bestimmt. *Npc1*^{-/-}-Mäuse und *Npc1*^{+/+}-Kontrollen beider Geschlechter sind für verschiedene therapeutische Behandlungsschemata verwendet worden. Insgesamt wurden 122 Kontroll- (66 weiblich, 56 männlich), 117 *Npc1*^{-/-}- (62 weiblich, 55 männlich) und 14

Npc1^{+/-}-Proben (8 weiblich, 6 männlich) histologisch und histomorphometrische untersucht. Des Weiteren wurden 146 Knochen (70 *Npc1*^{+/-}, 66 *Npc1*^{+/+}, 10 *Npc1*^{-/-}) mikrocomputertomographisch untersucht. Die Tiere wurden auf sechs verschiedene Behandlungsschemata aufgeteilt (Tabelle 1). Bei der histomorphometrischen Auswertung wurde in 24 Gruppen unterschieden (Tabelle 2). Dabei wurden die Tiere je nach Geschlecht, Genotyp und Behandlung untersucht. Alle Mäuse wurden an Tag 65 postnatal zur Probenentnahme euthanasiert.

Tabelle 1: Behandlungsschemata der sechs verschiedenen Gruppen

Gruppe 1	<i>NONE</i>	Keine Behandlung
Gruppe 2	COMBI	Kombinationstherapie: An P7 und danach wöchentlich wurde den Mäusen HPβCD/ALLO (25 mg/kg ALLO, gelöst in 40 % HPβCD; Sigma-Aldrich, München, Deutschland) injiziert. Zusätzlich erhielten die Mäuse von P10 bis P23 täglich eine Injektion von MIGLU (300 mg/kg, i. p.; Zavesca; Actelion Pharmaceuticals, San Francisco, CA), gelöst in Kochsalzlösung. Ab P23 und bis zum Ende der Experimente erhielten die Mäuse Standardfutter (V1184-000, Ssniff, Soest, Deutschland), das MIGLU in einer täglichen Dosis von 1200 mg/kg enthält.
Gruppe 3	<i>Sham</i>	Scheinbehandlung: Die scheinbehandelten Mäuse wurden nach dem gleichen Schema wie die COMBI-Mäuse behandelt, wobei jedoch die Wirkstoffe weggelassen wurden.
Gruppe 4	HPβCD	HPβCD-Monotherapie: HPβCD wurde ab P7 und danach wöchentlich in der gleichen Menge wie in COMBI (4000 mg/kg, i. p.; Sigma Aldrich) den Mäusen injiziert.
Gruppe 5	MIGLU	MIGLU-Monotherapie: Vergleichbar mit COMBI wurde den Mäusen täglich MIGLU (300 mg/kg, i. p.) an P10 bis P23 injiziert. Ab P23 erhielten die Tiere Standardfutter (V1184-000, Ssniff) mit MIGLU in einer täglichen Dosis von 1200 mg/kg.
Gruppe 6	HPβCDx	HPβCD 1x: Diese Mäuse erhielten nur eine einzige Injektion von HPβCD an P7 (4000 mg/kg).

Tabelle 2: Anzahl der histomorphometrisch untersuchten Versuchstiere unterteilt in die verschiedenen Gruppen

	<i>Npc1</i> ^{+/+}	<i>Npc1</i> ^{-/-}	<i>Npc1</i> ^{+/-}
Gruppe 1 <i>NONE</i>	11 ♀ 8 ♂	8 ♀ 10 ♂	8 ♀ 6 ♂
Gruppe 2 <i>COMBI</i>	6 ♀ 5 ♂	5 ♀ 6 ♂	0 ♀ 0 ♂
Gruppe 3 <i>SHAM</i>	7 ♀ 5 ♂	5 ♀ 7 ♂	0 ♀ 0 ♂
Gruppe 4 <i>HPβCD</i>	5 ♀ 5 ♂	6 ♀ 5 ♂	0 ♀ 0 ♂
Gruppe 5 <i>MIGLU</i>	5 ♀ 6 ♂	7 ♀ 5 ♂	0 ♀ 0 ♂
Gruppe 6 <i>HPβCDx</i>	7 ♀ 0 ♂	6 ♀ 0 ♂	0 ♀ 0 ♂

2.1.1.2 Proben für das Molekularbiologielabor

Die Proben für die molekularbiologischen Untersuchungen stammen ebenfalls aus der oben genannten Zucht. Es fand für diese Untersuchungen keine Behandlung der Versuchstiere statt. Ebenfalls wurden hier keine *Npc1*^{+/-}-Mäuse verwendet. Die Genotypisierung erfolgte ebenfalls mittels PCR-Analyse zwischen P5 und P7. In dieser Arbeit wurden Proben von Tag 30 und Tag 40 untersucht (Tabelle 3).

Tabelle 3: Anzahl der Versuchstiere in den jeweils molekularbiologisch untersuchten Gruppen.

	<i>Npc1</i> ^{+/+}	<i>Npc1</i> ^{-/-}
P30	8 ♀ 6 ♂	12 ♀ 8 ♂
P40	6 ♀ 7 ♂	8 ♀ 10 ♂

2.2 METHODIK

2.2.1 Fixation

2.2.1.1 Fixation der Proben für die histologische Untersuchung

Die linken Femora der Versuchstiere wurden im Institut für Anatomie der Universitätsmedizin Rostock entnommen und auf drei verschiedene Weisen fixiert. Ein Teil der Mäuse wurde nach der Euthanasie und nach Entnahme des Hirns in 4 % Paraformaldehyd (PFA) immersionsfixiert. Der zweite Teil der Tiere wurde nach der Euthanasie mit 4 % PFA perfusionsfixiert und der dritte Teil mit Bodian-Lösung (bestehen aus fünf Teilen 4 %-Formaldehyd, fünf Teilen Eisessig und 90 Teilen 80 %-Ethanol) perfusionsfixiert. Die Proben wurden vom 16.12.2010 bis zum 14.04.2020 gesammelt und dann an die experimentelle Unfallchirurgie Gießen versendet.

2.2.1.2 Fixation der Proben für die molekularbiologische Untersuchung

Die Wirbelkörper für die molekularbiologische Untersuchung wurden nach der Euthanasie der Tiere entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden die Proben versendet und in der Experimentellen Unfallchirurgie Gießen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, bevor sie weiterverwendet wurden.

2.2.2 Histologische Färbungen

2.2.2.1 Paraffineinbettung

Nach der Entnahme der Proben aus dem Fixationsmittel wurden diese sechsmal mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \leftrightarrow \text{Na}_2\text{HPO}_4$; Merck, Darmstadt, Deutschland) gespült. Die Femora der Mäuse wurden anschließend sieben Tage in 10 % Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; bestehend aus 3,4 % Tris (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 10 % Titriplex III (Merck), zwecks Entkalkung der Präparate, eingelegt. Nach sieben Tagen wurde die Konsistenz der Knochen getestet. Waren die Knochen weich genug, erfolgte die Gewebeeinfiltration. Hierzu wurde der automatische Gewebeeinfiltrationsautomat (TP1020, Leica) bestückt. Dort durchliefen die Proben Entwässerungsschritte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (Stockmeier, Bielefeld, Deutschland) und wurden schließlich in Xylol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) überführt. Nach diesem Schritt wurden die Proben in Paraffin (Roth) eingelegt und anschließend aus dem Gewebeeinfiltrationsautomaten entnommen. Zuletzt sind die Proben in der Paraffinausgießstation (HistoCore Arcadia H, Leica) in Blöcke gegossen worden (Abbildung 8), welche anschließend an einem Rotationsmikrotom (RM 2155, Leica, Wetzlar, Deutschland) in 4-5 μm dünne Proben geschnitten wurden. Die Proben wurden auf einen Objektträger aufgezogen.

Tabelle 4: Ablauf der Paraffineinbettung

1. Spülen der fixierten Proben	Sechsmaliges Spülen in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,2-7,4)
2. Entkalkung	7 Tage in 10 % EDTA-Lösung
3. Gewebeeinfiltration	<ol style="list-style-type: none">1. 30 Minuten (min) 70 % Ethanol2. 1 h 70 % Ethanol3. 1 h 30 min 80 % Ethanol4. 1 h 30 min 96 % Ethanol5. Dreimal 1 h 30 min 100 % Ethanol6. Dreimal 1 h 30 min Xylol7. Zweimal 1 h 30 min Paraffin
4. Ausblocken	Eingießen der Proben in Paraffinblöcke



Abbildung 8: Mäusefemur eingebettet in Paraffin.

2.2.2.2 Technoviteinbettung

Für die Untersuchung von mineralisierten Knochenpräparaten wurden weitere Femora in Technovit 9100 eingebettet (Tabelle 5). Dafür wurden die Proben aus ihrem jeweiligen Fixierungsmedium entnommen und anschließend mit Natriumphosphatpuffer, gleich der Paraffineinbettung, abgespült. Anschließend wurde eine Entwässerung der Proben in einer aufsteigenden Ethanolreihe und eine Infiltration mit Xylol durchgeführt. Die Mäusenochen wurden dabei 8 Tage, bei regelmäßigem Austausch der Lösung, auf einen Rüttler gestellt.

Im Anschluss an die Entwässerung erfolgte die Präinfiltration in drei Schritten. Im ersten Schritt wurden die Proben für 4 Tage in stabilisierte Basislösung, bestehend aus Methylmethacrylat (Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) und Xylol (Heraeus Kulzer) in einem Mengenverhältnis von 1:1 eingelegt. Im zweiten Schritt erfolgte die Infiltration für 44 Stunden in stabilisierter Basislösung mit Härter 1 im Mischungsverhältnis 200 ml Basislösung je 1 g Härter 1 (Heraeus Kulzer). Im dritten Schritt die Infiltration für 24 Stunden in entstabilisierter Basislösung und Härter 1 im Mischungsverhältnis von 250 ml Lösung und 1,25 g Härter 1. Die entstabilisierte Basislösung wurde zuvor aus stabilisierter Basislösung, die durch einen Chromatographen mit 30 g Aluminiumhydroxid lief, gewonnen.

An die Präinfiltration schloss sich die Infiltration der Proben ebenfalls in drei Schritten an. Dabei wurden die Proben im ersten Schritt vier Stunden in Infiltrationslösung bestehend aus entstabilisierter Basislösung vermengt mit Polymethylmethacrylat (PMMA; Heraeus Kulzer) und Härter 1 bei 2-8 °C gelagert (Mischungsverhältnis: 400 ml Lösung: 20 g PMMA: 1.2 g Härter 1). Die Infiltrationslösung wurde nach vier Stunden ausgetauscht. Danach verblieben die Proben im zweiten Schritt für einen Tag in Infiltrationslösung bei 2-8 °C, wonach diese wieder ausgetauscht und der Schritt wiederholt wurde. Schlussendlich wurden die Proben ausgeblockt. Hierfür wurde eine Polymerisationslösung bestehend aus Stammlösung A und Stammlösung B (Mengenverhältnis 9:1) angesetzt. Stammlösung A bestand aus entstabilisierter Basislösung, PMMA und Härter 1 (Mengenverhältnis 500 ml Basislösung+ 80 g PMMA + 3 g Härter 1). Stammlösung B aus entstabilisierter Basislösung, Härter 2 (Heraeus, Kulzer) und Regler (Heraeus Kulzer; Mengenverhältnis 44 ml Basislösung+ 4 ml Härter 2 + 2 ml Regler). Die Proben wurden in dieser Lösung ausgeblockt und für zwei Tage zur Polymerisation bei -4 °C gelagert. Die Proben wurden dazu mit Parafilm (Sigma Aldrich) abgedeckt. Gleich der Einbettung in Paraffin wurden die so eingebetteten Proben am Rotationsmikrotom in dünne Proben (4-5 µm) geschnitten und auf einen Objektträger aufgezogen.

Tabelle 5: Ablauf der Technovit 9100 Einbettung.

1. Spülen der fixierten Proben	Sechsmaliges Spülen in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,2-7,4)
2. Entwässerung auf dem Rüttler	1 Tag in 70 % Ethanol 1 Tag in 80 % Ethanol 1 Tag in 96 % Ethanol 5 x 1 Tag in 100 % Ethanol
3. Infiltration mit Xylol auf dem Rüttler	2 x 12 Stunden
4. Präinfiltration I-III	I: 4 Tage in stabilisierter Basislösung mit Xylol im Verhältnis 1:1 II: 44 h in stabilisierter Basislösung mit Härter 1 im Mischungsverhältnis 400 ml und 2 g Härter 1 III: 1 Tag in entstabilisierter Basislösung und Härter 1 im Mischungsverhältnis von 250 ml Lösung und 1,25 g Härter 1
5. Infiltration	I: 4 h in Infiltrationslösung bei 2-8 °C II: 1 Tag in Infiltrationslösung bei 2-8 °C III: 1 Tag in Infiltrationslösung bei 2-8 °C
6. Ausblocken	Ausblocken der Proben für 2 Tage bei -4 °C mit Polymerisationslösung

2.2.2.3 Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung) von Paraffinschnitten

In Paraffin eingebettete Proben wurden zweimal 5 min mit Xylol infiltriert und anschließend mittels einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 96 % und 70 %; jeweils 5 min) hydriert. Danach wurden die Proben zweimal 5 min mit Aqua dest. gespült.

Es folgte die vierminütige Kernfärbung mit Mayers Hämalaunlösung (Merck). Daraufhin das Spülen mit Aqua dest. und anschließend die Bläuung für 10 min unter fließendem Leitungswasser. Zur pH-Neutralisation wurden die Probenkassetten hiernach für 5 min in Aqua dest. gegeben, woraufhin das Bindegewebe durch eine 1 % Eosinlösung (Eosin G; Merck; 1 min) angefärbt wurde. Schlussendlich wurden die Proben, nach Abspülen des Eosins mit Aqua dest., wieder entwässert. Dafür durchliefen die Proben eine aufsteigende Ethanolreihe (70 %, 96 %, 100 %; je 20 Sekunden(s)). Danach erfolgte die Inkubation der Proben mit Xylol (2 x 5 min) und die anschließende Eindeckelung mit Depex (Serva, Heidelberg, Deutschland).

2.2.2.4 Toluidinblau-Färbung (TB-Färbung) von Paraffinschnitten

Die Paraffinschnitte wurden im ersten Schritt entparaffiniert und hydriert. Der Farbstoff Toluidinblau O-Pyronin G wurde aus zwei Lösungen bestehend aus erstens di-Natriumtetraborat (Merck), Toluidinblau O (Chroma, Münster, Deutschland) und Aqua dest. (Mischungsverhältnis 1 g: 1 g: 100 ml), sowie Pyronin G (Merck) und ml Aqua dest. (Merck) (Mischungsverhältnis 1 g: 100 ml) angesetzt. Die beiden Ansätze wurden gemischt (15 min) und anschließend zweimal filtriert. Die entparaffinierten, hydrierten Proben wurden im Anschluss für 90 s in die fertig gemischte Färbelösung gegeben. Danach wurden die Proben dehydriert, durch Xylol gezogen und anschließend mit Depex eingedeckelt.

2.2.2.5 Giemsa-Färbung von Paraffinschnitten

Die fertige Gebrauchslösung wurde aus Giemsa Azur-Eosin-Methylenblau (Merck) und 0,1 M Natriumphosphatpuffer hergestellt (Mischungsverhältnis 1 ml: 19 ml). Danach wurde die Gebrauchslösung filtriert. Die entparaffinierten und hydrierten Proben wurden zum Färben für 20 min in die Gebrauchslösung gestellt. Anschließend wurden die Proben mit Aqua dest. gespült und in aufsteigender Ethanolreihe und Xylol entwässert und mit Depex eingedeckelt.

2.2.2.6 Kossa-van-Gieson-Färbung von T9100-Schnitten

Es wurden im Vorhinein die drei nötigen Färbelösungen angesetzt: Erstens 10 % (0,942 mol/l) Natriumkarbonat-Formaldehyd aus Natriumkarbonat (Roth), 37 % (3,36 mol/l) Formaldehyd (Merck) und Aqua dest. (Mischungsverhältnis 2 g: 5 ml: 20 ml). Zweitens 3 % (0,177 mol/l) Silbernitratlösung aus Silbernitrat (Applichem, Darmstadt, Deutschland) vermengt mit Aqua dest. (Mischungsverhältnis 3 g: 100 ml) und drittens die Hämatoxylin Lösung nach Weigert durch die Vermengung der beiden Gebrauchslösungen (Roth) im Verhältnis 1:1.

Im ersten Schritt erfolgte das Entplasten der Technovitschnitte: Dafür wurden die Schnitte in 2-Methoxyethyl-Acetat (3 x 10 min; Merck) entplastet und anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 96 %, 70 %; 3 x 5 min), sowie mit Aqua dest. (5 min) hydriert. Danach wurde auf die Objektträger 3 % Silbernitrat pipettiert, welches nach 4 min mit Aqua dest. (3 x 2 min) abgewaschen wurde. Zur Reduktion des Silbernitrats erfolgte eine zehnmütige Inkubation mit 10 % Natriumkarbonat-Formaldehyd. Es folgt das Spülen (8 min) unter fließendem Leitungswasser, sowie die Fixierung der Färbung (5 min) mit 5 % Natriumthiosulfat (0,316 mol/l; Merck). Diese Reaktion wurde durch das Spülen der Proben mit Aqua dest. gestoppt (2 x 2 min). Anschließend wurde die Gegenfärbung der Proben mit Methylgrün (Roth) für 8 min durchgeführt. Es folgte erneut das Spülen der Proben mit Aqua dest. (3 x 2 min). Daraufhin die Färbung der Zellkerne in Weigerts-Eisenhämatoxylin Lösung (6 min). Danach das Spülen in Leitungswasser (8 min) und des Versetzten der Objektträger für 5 min mit der Van-Gieson-Färbelösung (Chroma). Zum Schluss wurden die Proben zwecks Dehydrierung in 96 % Ethanol (3 x) und in 100 % Ethanol (1 x), für wenige s und anschließend in Xylol (2 x 5 min) gegeben, sowie mit Depex eingedeckt.

2.2.2.7 Movat-Pentachrom Färbung von T9100-Schnitten

Die notwendigen Gebrauchslösungen, zum Färben von Technovitschnitten mit der Movat-Pentachrom Färbung, wurden hergestellt. Erstens eine 86,4 % (14,8 mol/l) Ethanol-2,5 % (0,65 mol/l) Ammoniumhydroxidlösung (pH > 8), welche aus 96 % (16,4 M) Ethanol und 25 % (7,13 M) Ammoniak (Roth) hergestellt wurde (Mischungsverhältnis 1 ml: 9 ml). Zweitens Hämatoxylinlösung nach Weigert und drittens Saffron du Gâtinais (Chroma), welches in 100 % (17,1 mol/l) Ethanol gelöst (Mischungsverhältnis 6 g: 100 ml) und anschließend bei 50 °C für 48 h inkubiert wurde. Viertens 5 % (0,0345 M) Phosphorwolframsäure aus Wolframatophosphorsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) in Aqua dest. (Mischungsverhältnis 5 g: 100 ml) und zuletzt die benötigte Färbelösung Brillant-Crocein-Säurefuchsin. Diese setzt sich zusammen aus Brilliant Crocein R (Chroma) in Aqua dest. und 0,5 % (0,087 mol/l) Essigsäure (Merck; Mischungsverhältnis 1 g: 995 ml: 5 ml) gemischt im Verhältnis 5:1 mit Säurefuchsin (Chroma) in Aqua dest. und 0,5 % Essigsäure (Verhältnis 1 g: 995 ml: 5 ml).

Die Färbung begann zunächst mit dem Entacrylieren der T9100-Schnitte. Anschließend wurden die Objektträger mit Alcainblau (Chroma) gefärbt (10 min) und danach mit Leitungswasser gespült (5 min). Es folgte die Fixierung der Färbung, indem die Proben eine Stunde in der Ethanol-Ammoniumhydroxidlösung inkubiert wurden. Im Anschluss an die Stabilisation wurden die Objektträger unter fließendem Leitungswasser abgespült (10 min). Zwecks pH-Neutralisation wurden die Proben in Aqua dest. eingetaucht. Es folgte die Kernfärbung mit Weigerts Eisenhämatoxylin (10 min) und die Wässerung der gefärbten Proben in Leitungswasser (15 min). Die Technovitschnitte wurden daraufhin mit der Brillant-Crocein-Säurefuchsin Färbelösung behandelt (12,5 min) und im Anschluss in 0,5 % Essigsäure (20 s) und in 5 % Phosphorwolframsäure (20 min) differenziert. Daraufhin wurden die Proben unter Schwenken in 0,5 % Essigsäure gespült (2 min). Danach in 100 % Ethanol inkubiert (3 x 5 min) und zum Schluss mit Safron die Gâtinais gefärbt (60 min). Die gefärbten Objektträger wurden in 100 % Ethanol (3 x 2 min), sowie in Xylol (2 x 5 min) dehydriert und mit Depex eingedeckelt.

2.2.2.8 Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten

Für diese Arbeit wurden zwei verschiedene Antikörper verwendet: Der anti-smooth-muscle-actin (ASMA) Antikörper (ab124964, Abcam, Cambridge, Großbritannien) und der Sphingosin-1-Phosphat Antikörper (ab233386 Abcam). Zu Beginn mussten die Proben in Xylol (2 x 5 min), Aceton (10 min; Stockmeier, Bielefeld, Deutschland) und 10 min in einem 1:1 Gemisch aus Aceton und Waschpuffer Tris-NaCl (tris buffered saline (TBS), pH 7,4) mit 0,025 % Octoxinol 9/Triton-X 100® (Roth) entparaffiniert werden. Die Proben wurden anschließend in Waschpuffer gespült (2 x 5 min). Danach erfolgte eine 30-minütige Vorbehandlung der Proben in 0,1 M Citratpuffer (pH 6) bei 60 °C. Es folgte ein Kälteschock in Eiswasser (5 min), woran sich die Blockierung der endogenen Peroxidase anschloss. Dazu wurden die Proben in Waschpuffer (2 x 5 min) gespült, 5 min in 3 % (0,882 mol/l) Wasserstoffperoxid (Merck) vermengt mit Waschpuffer (Mengenverhältnis 1 ml: 7 ml) inkubiert und erneut mit Waschpuffer gewaschen (2 x 5 min). Die Präparate wurden nun mit einem PapPen® (Kisker, Steinfurt, Deutschland) eingekreist.

Es folgte eine einstündige Benetzung der Proben mit 10 % Ziegen Serum (Bio&Sell, Feucht, Darmstadt). Anschließend wurde das Ziegen Serum mit Waschpuffer abgespült und der primäre ASMA-Antikörper (1:2000 verdünnt in Verdünnungspuffer; Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) aufgetragen. Die Präparate wurden in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben mit Waschpuffer gespült (3 x 5 min). Es folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Vector, Burlingame, US), wozu eine Gebrauchslösung bestehend aus Ziege-anti-Kaninchen IgG-Antikörper, 1 % *bovine serum albumin* (BSA) in TBS und 12,5 % Mäuseserum (Bio&Sell) hergestellt wurde (Mischungsverhältnis 1 µl: 436,6 µl: 62,5 µl). Nach 30-minütiger Inkubation in einer feuchten Kammer konnte der sekundäre Antikörper mit Waschpuffer abgespült werden (2 x 5 min). Anschließend wurden die Proben in einer feuchten Kammer mit dem Vectastatin Elite ABC-Kit PK-6100 (Vector) gefärbt (30 min). Das Vectastatin Elite ABC-Kit PK-6100 ist vorher aus TBS, Reagenz A und Reagenz B angemischt worden (Mischungsverhältnis 2500 µl: 45µl: 45µl). Es folgte das Abspülen in Waschpuffer (2 x 5 min). Daraufhin wurden die Proben in Aqua dest. (5 min) gegeben und danach in Dunkelheit mit dem Peroxidasesubstrat Nova Red SK-4800 (Vector) gefärbt (5 min). Für die Gegenfärbung wurden die Objektträger mit Aqua dest. abgespült (3 x 5 min). Es folgte die Färbung für 20 s in Shandon Instant-Hämatoxylin (Thermo Fischer Scientific, Walldorf, Deutschland) und das Bläuen in Leitungswasser (10 min). Zum Schluss wurden die Präparate entwässert und eingedeckelt.

Für die immunhistochemische Färbung mit dem Sph1P-Antikörper wurden die Paraffinschnitte entparaffiniert, gespült, mit einem Tris-EDTA Puffer vorbehandelt und ausgekühlt. Anschließend wurden die Proben erneut gespült, mit H₂O₂ blockiert und daraufhin wieder gespült. Die Blockierung mit Ziegenserum erfolgte nur in einem Teil der Versuche (Tabelle 6). Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (1:100; 1:250; 1:500; 1:1000). Am folgenden Tag wurden die Proben gespült und mit dem sekundären Ziegeanti-Kaninchen Antikörper inkubiert. Danach wurden die Proben mit dem Vectastatin Elite ABC-Kit PK-6100 gefärbt, mit Waschpuffer und Aqua dest. gespült und mit dem Nova Red SK-4800 gefärbt. Es folgte die Gegenfärbung mit Shandon Instant-Hämatoxylin, die Dehydratation und das Eindeckeln der Proben.

Tabelle 6: Etablierungsmethoden, mit dem Anti-Sphk1-Antikörper.

	vPAK	VBH	Auskühlen	ZSB	Serumanteil im Sekundärantikörpergemisch
M 1	1:500	2 Stunden bei 60 °C in Tris-EDTA-Puffer, pH 9	30 min bei Raumtemperatur	/	2% Mausserum
M 2	1:500	20 min 100 °C Tris-EDTA Puffer, pH 9	10 min Kälteschock	/	12,5 % Mausserum
M 3	1:500	2 Stunden bei 60 °C in Tris-EDTA- Puffer, pH 9	30 min bei Raumtemperatur	10 % Ziegenserum eine Stunde	2 % Mausserum
M 4	1:100	20 min 100 °C Tris-EDTA Puffer, pH 9	10 min Kälteschock	10 % Ziegenserum eine Stunde	12,5 % Mausserum

Methode (M), Verdünnung Primärantikörper (vPAK), Vorbehandlung (VBH), Ziegenserumblockade (ZSB)

2.2.2.9 Enzymhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten

Für die Färbung der TRAP wurden die Proben anfänglich entparaffiniert und rehydriert. Anschließend wurde ein saures Milieu (pH 5,2) geschaffen, indem die Proben in 0,1 M Natrium-Acetatpuffer gegeben wurden (10 min). Danach wurden die Schnitte auf dem Objektträger mit einem PapPen® eingekreist und die vorher gemischte Färbelösung auf die Objektträger gegeben, welche dann in einer feuchten Kammer bei 37 °C zwei Stunden inkubiert wurden.

Die Färbelösung setzte sich aus zwei Lösungen zusammen: Färbelösung A, bestehend aus Naphtol-AS-TR-Phosphat (Sigma-Aldrich) und N-N-Dimethylformamid (Sigma-Aldrich; Mischungsverhältnis 280 mg: 1 ml) und Färbelösung B, bestehend aus di-Natriumtetrat-Dihydrid (Merck) und Echtrotsalz/ Fast Red TR Salt® (Sigma-Aldrich; Mengenverhältnis 1,64 mg: 1 mg). Nach der Inkubation wurden die Objektträger mit Aqua dest. gespült (3 x 5 min), die Proben mit Shandon Instant-Hämatoxylin gegengefärbt (1 min), mit Aqua dest. abgespült und unter fließendem Leitungswasser gebläut (10 min). Zuletzt wurden die Proben in Aqua dest. gespült (5 min) und anschließend mit Kaisers Glyceringelantine (Merck) eingedeckelt.

Auch für die Färbung der alkalischen Phosphatase (ALP) wurden die Objektträger entparaffiniert, gewässert und die Schnitte mit einem PapPen® eingekreist. Zwecks Erreichen des pH-Optimums wurden die Objektträger in 0,1 M Tris-Puffer (pH 9,4; 10 min) gegeben und anschließend mit fertigem Phosphatase-Substrat (bestehend aus 5-Bromo-4-Chloro-Indolyl-Phosphat und Nitro-Blau-Tetrazoliumsalz (KPL, Gaithersburg, US) beträufelt. Nach der Inkubation bei 37°C in einer feuchten Kammer (120 min) wurde das Phosphatase-Substrat mit Aqua dest. abgespült und die Proben mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat (Roth) gegengefärbt (10 min). Anschließend wurden die Proben mit Aqua dest. gespült und zuletzt entwässert und mit Depex eingedeckelt.

Bei allen durchgeführten enzymhistochemischen Färbungen wurde jeweils eine Positivkontrolle aus einem anderen Projekt des Instituts mitgefärbt, um den Erfolg der Färbung später qualifizieren zu können.

2.2.3 Histomorphometrie

Die Histomorphometrie wurde an den HE-gefärbten Präparaten durchgeführt. Diese wurden mit dem Axiophot-2 Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) und der Digitalkamera Leica DC 500 (Leica) in zehnfacher Vergrößerung fotografiert und mit der Software Leica IM1000 (Version 4.0) akquiriert. Die Bilder wurden unverändert abgespeichert, ein Weißabgleich zur Neutralisierung der Farbtemperatur wurde vor jeder Aufnahme durchgeführt. Die Vermessung der Fotos und die maßstabgerechte Skalierung wurde mit der Freeware Image J (v. 1.51w-v. 1.5.3o) durchgeführt.

Als *Region of Interest* (ROI) wurde der trabekuläre Bereich in der distalen und proximalen Metaphyse der Femora mit einem Abstand von 50 µm zur Endokortikalis definiert.

Dabei wurde darauf geachtet, dass die ROI einen Mindestabstand von 350 μm zum Epiphysenknorpel einhält, damit die subepiphysären Verdichtungen der Trabekel die Messwerte nicht verfälschen (Abbildung 9). Die Präparate wurden auf ihre Knochenfläche und den Trabekelumfang untersucht (Abbildung 10), wobei die Verhältnisse *bone area/tissue area* (BAr.TAR) (*tissue area* = Fläche ROI) und *bone surface/tissue area* (BS.TAR) in den Gruppen vergleichend untersucht wurden. Größere Defekte in den einzelnen Präparaten wurden bei den Messungen von der ROI abgezogen.

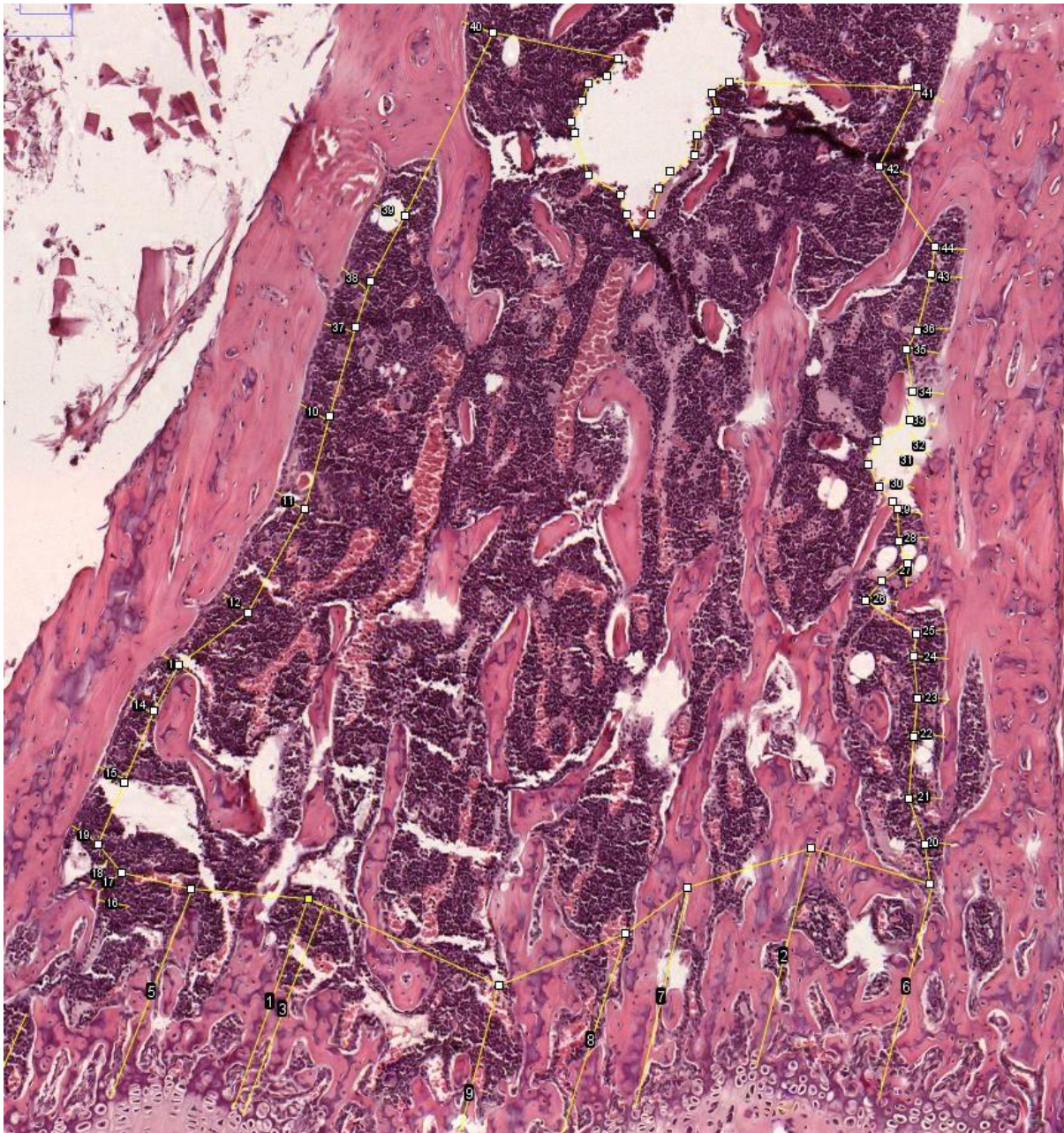


Abbildung 9: Schritt 1: Festlegen der Region of interest (ROI).

Ausmessen der ROI im HE-Präparat mit Abstand zur Endokortikalis und einem Mindestabstand von 350 μm zur Epiphyse. Dabei wurden größere Defekte im Präparat von der ROI abgezogen.

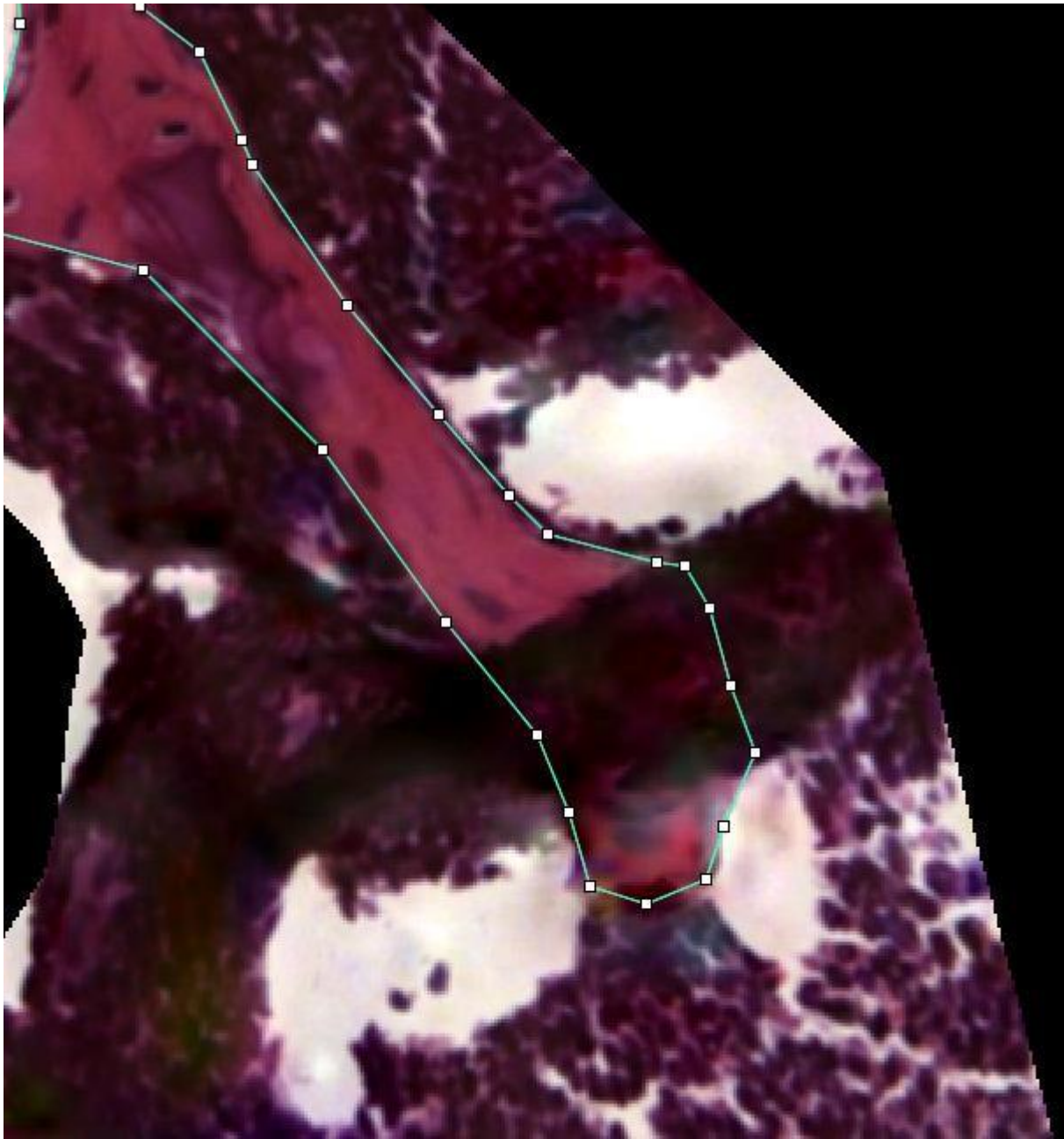


Abbildung 10: Schritt 2: Ausmessen der Knochenfläche und des -umfangs.

Die einzelnen Trabekel wurden mit dem „Polygon-Selection“ Tool vermessen.

2.2.4 Mikro-Computertomographie (μ CT)

Die μ CT–Methodik, die eine hochauflösende 3D-Rekonstruktionen kleiner Objekte im einstelligen Mikrometerbereich erlaubt wurde entsprechend den Empfehlungen der „*Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography*“ durchgeführt [134]. Es wurde im Folgenden die Trabekel der distalen Metaphyse der Mäusefemora der verschiedenen Gruppen untersucht (Tabelle 7)

Tabelle 7: Anzahl der Untersuchten Proben im μ CT

	Gruppe 1 NONE	Gruppe 2 Combi	Gruppe 3 Miglu	Gruppe 4 HP β CD	Gruppe 5 MIGLU	Gruppe 6 HP β CDx
<i>Npc1</i> ^{-/-} , f	6	5	6	5	7	9
<i>Npc1</i> ^{+/+} , f	7	6	6	4	5	7
<i>Npc1</i> ^{+/-} , f	7	0	0	0	0	0
<i>Npc1</i> ^{-/-} , m	7	8	5	4	4	4
<i>Npc1</i> ^{+/+} , m	4	7	6	5	5	4
<i>Npc1</i> ^{+/-} , m	3	0	0	0	0	0

2.2.4.1 Bildbeschaffung und Rekonstruktion

Nach Entfernung des Weichteilgewebes wurden die linken Femora gemeinsam mit fixierten Kalibrierungsphantomen vertikal in einem Trinkstrohalm angeordnet. Die Sonden wurden in einem Probenröhrchen mit Basotect-Schaum (BASF, Ludwigshafen, Deutschland) fixiert. Die Knochendichten wurden anhand von Knochenphantomen mit definierten Calciumhydroxylapatit-Dichten von 250 mg/cm³ und 750 mg/cm³ kalibriert. Es erfolgte die Spülung der Objekte mit 4 % (1,33 M) phosphatgepufferten PFA (Roth) und anschließend der Scan im SkyScan 1173 μ CT (Bruker, Kontich, Belgien). Die elektromagnetischen Wellen wurden bei einer Röhrenspannung von 40 kV und einem Röhrenstrom von 200 μ A erzeugt und durch einen 0,5 mm dünnen Aluminiumfilter gefiltert. Zur Optimierung der Ortsauflösung und zur Reduktion von Rauschartefakten wurden in festgelegten Rotationsschritten von 0,25° vier Einzelbilder jeder Position der Probe mit einer Belichtungszeit von 1700 Millisekunden aufgenommen. Die Probe drehte sich insgesamt 180° um die Röntgenröhre. Die Strahlung, welche durch das Gewebe abgeschwächt worden ist, wurde mit einem CCD-Flachdetektor mit einer Auflösung von 2240 x 2240 Pixeln erfasst. Die isotrope Bild-Pixel-Größe betrug 5,69 μ m und die Farbtiefe lag bei 16 bit.

Die Rekonstruktion der Projektionsbilder in Querschnittsbilder wurde mithilfe der *NRecon Reconstruction Software* (Version 2.2.0.6, Bruker) durchgeführt. Dabei wurden

die in den vielen Rotationsschritten erfassten Projektionen gemäß dem Feldkamp-Algorithmus zu axialen Schnittbildern rekonstruiert, in denen die Absorptionsdichte jedes Voxels durch den entsprechenden Grauwert dargestellt wurde.

2.2.4.2 Bildverarbeitung und Analyse

Nach Rekonstruktion der Daten im Data-Viewer (Version 1.7.0.1, Bruker), erfolgte die Ausrichtung entlang der axialen, frontalen und sagittalen Achse. Mithilfe der CT-Analyser Software (Version 1.23.0.2+, Bruker) und mit dem Programm *Analyze* (Version 12.0, Bruker) wurden die Bilder verarbeitet sowie die dreidimensionale Rekonstruktion durchgeführt. Um die *trabecular thickness* darzustellen, wurden farbkodierte Modelle verwendet. Diese wurden mit *CTvox* (Version 3.3.1 (64bit), Bruker) generiert.

Als Referenzlevel für die Ermittlung des *Volume-of-Interest* (VOI) des Femurs wurde der erste proximale Knorpelsteg der Wachstumsplatte der distalen Femurkondylen festgelegt. Um Verfälschungen der morphologischen Daten durch die primäre Spongiosa an der Wachstumsplatte zu vermeiden, wurde der zu untersuchende Bereich der trabekulären Femurmetaphyse 38 Schichten (entsprechen 0,216 mm) proximal des Referenzbereichs gewählt. Darauffolgenden wurden 308 Schichten (entsprechen 1,753 mm) in die Auswertung einbezogen. Mit Hilfe der axialen Schnittbilder erfolgte die Aufteilung der trabekulären von den kortikalen Knochenabschnitten, um das *Volume-of-Interest* (VOI) zu bestimmen. Zunächst wurde der kortikale Abschnitt der Femurmetaphyse durch die Computersoftware herausgerechnet. Nachfolgend wurde die Trabekel-ROI händisch auf einen kleinen Abstand zur endokortikalen Oberfläche ergänzt (Abbildung 11).

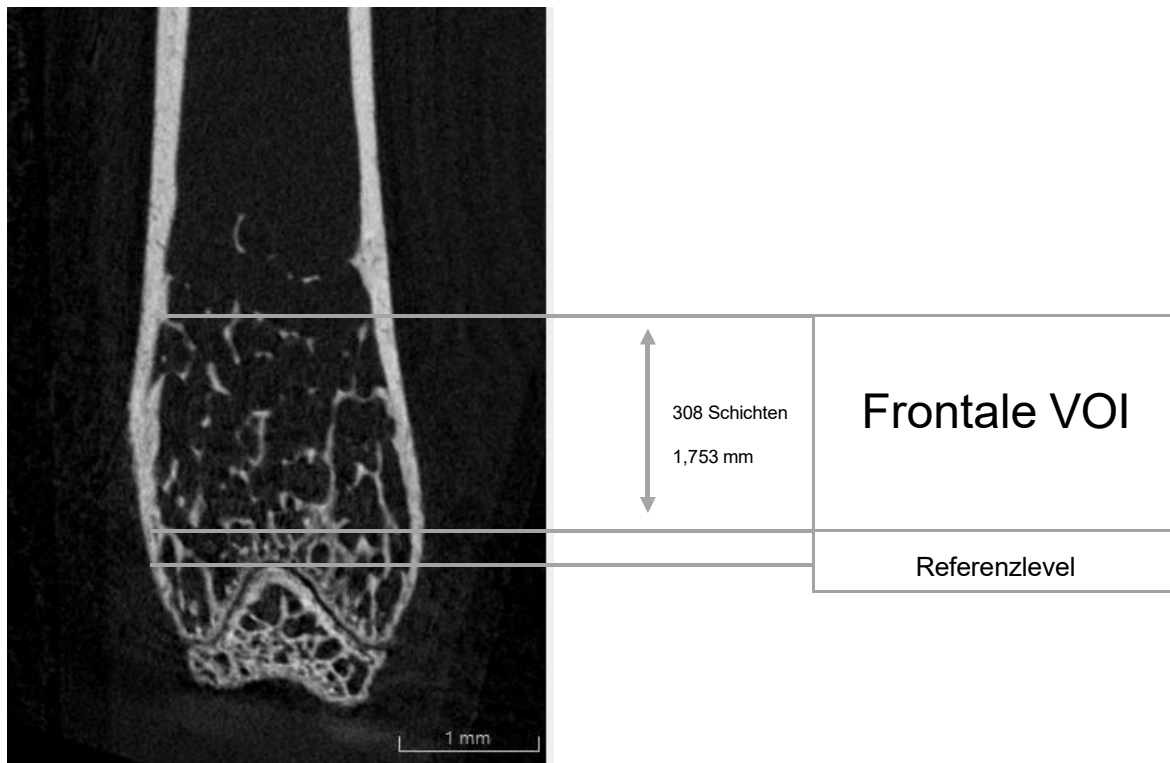


Abbildung 11: Darstellung eines µCT-Schnitts durch das Femur.

Das zu analysierende *Volume-of-Interest* (VOI) des Femurs wurde mit einem Mindestabstand zur distalen Epiphyse (Referenzlevel) und der endostalen Diaphyse gesetzt.

Anschließend erfolgte mittels Binarisierung die Umwandlung des Graustufenbildes in ein Schwarz-Weiß-Bild, dadurch wurde der mineralisierte Knochen vom Hintergrundgewebe differenziert. Die Untersuchung des trabekulären Knochens fand anhand separater Schwellenwerte, sogenannter *Thresholds* statt. Für die trabekulären Zonen des Femurs wurden Grauwerte von 110-225 analysiert. Für die strukturbezogene Analyse der Femurkortikalis Grauwerte zwischen 80-255.

Damit die trabekulären Bereiche der Knochen besser anhand fester Punkte charakterisiert werden konnten, wurden folgende Parameter festgelegt: Die *trabecular number* (Tb.N) wurde als inverse Funktion des mittleren Abstands zwischen der Achse der Platten und der Spongiosastange angegeben, die *trabecular thickness* (Tb.Th) wurde direkt als Mittelwert der lokalen Dicke aller Knochenvoxel in 3D ohne Modellannahmen gemessen. Die *trabecular separation* (Tb.Sp) wurde als Mittelwert der Voxel des Abstands zwischen den Trabekeln berechnet. Die Verhältnisse von *bone volume* zu *tissue volume* (BV/TV) und von *bone surface* zu *bone volume* (BS/BV) wurden gemessen, um den vo-

lometrischen Teil des Knochens im Verhältnis zum Gesamtvolumen und den Trabekelumfang zum volumetrischen Teil des Knochens zu bestimmen. Die Parameter, die zur Beschreibung der Knochenarchitektur verwendet wurden, umfassen den *trabecular pattern factor* (Tb.Pf) und den *structure model index* (SMI). Der SMI ist ein Modellindex, der die strukturelle Verbindung von Platten und Stäben im Verhältnis zu ihrer Anzahl quantifiziert. Der Tb.Pf berechnet die Unterbrechung der Trabekel und ist höher, wenn es weniger Verbindungen gibt.

2.2.5 Molekularbiologie

2.2.5.1 RNA-Isolation

Im ersten Schritt der RNA-Isolation wurden die Wirbelkörper zusammen mit 1000 µl QI-Azol (Qiagen, Venlo, Niederlande) gemischt. Die Wirbelkörper wurden dann für 1 bis 2 min, je nach Größe der Probe, mit Hilfe einer Zirkonoxid Mahlkugel (Kobe, Marburg, Deutschland) in einer Schwingmühle (Type MM400, Retsch, Haan, Deutschland) gemahlen. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform (Sigma-Aldrich) wurde für 15 s gevortext (LLG-unITexer 1, LLG Labware, Meckenheim, Deutschland) und anschließend 2 min inkubiert. Danach fand die Zentrifugation bei 4 °C und 14000 *revolutions per minute* (rpm) statt (15 min). Die abgetrennte wässrige Phase wurde abpipettiert und mit einer Volumeneinheit 70 % (12 mol/l) Ethanol versetzt. Das Gemisch aus RNA und Ethanol wurde anschließend mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) weiterverarbeitet. Zuerst wurde dabei das Gemisch auf eine RNeasy *Mini Spin Column* aufgetragen und für 15 s bei 8000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und der Schritt solange wiederholt, bis das komplette RNA-Ethanol-Gemisch die *Spin Column* durchlaufen hatte. Die in der *Spin Column* gebundene RNA wurde anschließend mit 700 µl RW1 Puffer und zweimal mit 500 µl RPE-Puffer aus dem RNeasy Mini Kit in der Zentrifuge gewaschen. Zuletzt blieb die reine RNA in dem Filter der Säule zurück, die bei einer letzten Zentrifugation mit 30 µl RNase-freiem Wasser (Qiagen) aus dem Filter eluiert wurde. Abschließend wurde spektrometrisch die Reinheit und die Konzentration der RNA, in µg/µl, im Nanodrop-Spectrophotometer (ND-1000, Nanodrop Technologies, Wilmington, US) bestimmt und die Proben bei -80 °C gelagert.

2.2.5.2 cDNA-Synthese

Die RNA wurde mit dem Quantitect® Reverse Transcription Kit (Qiagen) in cDNA umgeschrieben. Dafür wurden im Detail folgende Schritte durchgeführt:

Erstens wurden 3 µl des *Wipeout buffers* (Qiagen) mit 1,5 µg RNA vermengt und mit RNase freiem Wasser auf ein Endvolumen von 21 µl gebracht. Das Gemisch wurde anschließend bei 42 °C im iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Kalifornien, US) inkubiert (5 min). Von dem entstehenden Gemisch wurden 14 µl für die Reverse Transkription (RT+) und 7 µl für die Negativkontrolle (RT-) verwendet.

Anschließend wurden 6 µl des RT+- *mastermix* zu den RT+ beziehungsweise 3 µl des RT- *mastermix* zu den RT- Cups gegeben. Der RT+- *mastermix* für die cDNA-Synthese wurde vorher angesetzt aus 1 µl RT-Primer Mix, 4 µl 5x-Quantiscript RT-Puffer und 1 µl Quantiscript Reverse Transkriptase. Der *mastermix* für die Negativkontrollen wurde in halber Menge, aber dem gleichen Verhältnis angesetzt. Es wurde anstelle von 0,5 µl Quantiscript Reverse Transkriptase 0,5 µl RNase freies Wasser hinzugegeben. Im dritten Schritt fand die Reverse Transkription im iCycler bei 42 °C für 30 min statt. In einem letzten Schritt wurde die Reverse Transkriptase bei einer vierminütigen Inkubation bei 95 °C deaktiviert. Die fertig umgeschriebene cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.5.3 Real-time reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

Für alle Messungen wurden die cDNA 1:10 verdünnt. Die Primer (Tabelle 7) wurden aus je 5 µl *forward* Primer (200 pmol/µl) und 5 µl *reverse* Primer (200 pmol/µl) mit 40 µl RNase-freiem Wasser verdünnt angesetzt. Der für die *real-time* reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) verwendete *mastermix* setzte sich zusammen aus 0,8 µl RNase freiem Wasser, 0,2 µl Primer und 5 µl Qiagenfast SYBR Green *mastermix* (LOT: 166049404, Qiagen). Für den ALP-Primer wurde ein anderer *mastermix* verwendet, bestehend aus 3,8 µl RNase freiem Wasser, 0,2 µl Primer und 2 µl FastStart DNA Master^{Plus} SYBR Green I (Roche, Basel, Schweiz). Diese 6 µl *mastermix* wurden in Glaskapillaren (Roche) pipettiert und mit 4 µl cDNA versetzt. Die Kapillaren wurden anschließend bei 450 rpm für eine Minute zentrifugiert. Im LightCycler 2.0 (Roche) wurden die Proben nun bei 95 °C denaturiert (5 min). Daraufhin folgten 40 Zyklen in denen nach 10 s Denaturierung bei 95 °C das Annealing und die Elongation für 30 s bei 60 °C erfolgten. Am Ende jedes

Zyklus wurde die Fluoreszenz der Proben gemessen. Danach erfolgte das Erstellen einer Schmelzkurve bei kontinuierlicher Temperaturerhöhung um 0,1 °C/s auf 95 °C. Die *real-time* RT-PCRs mit dem Primer ALP verliefen aufgrund des anderen *mastermix* leicht verändert. Hier wurden 10 min bei 95 °C denaturiert und in den 40 Zyklen wurde jeweils für 5 s bei 95 °C denaturiert und 10 s bei 72 °C gehalten, um das Annealing und die Elongation ablaufen zu lassen.

In den *runs* wurden immer jeweils die zu untersuchende cDNA in Doppelbestimmung mit zusätzlich mindestens einer Negativkontrolle verwendet. Bei der Negativkontrolle wurde anstelle von cDNA RNase freies Wasser eingesetzt. Zudem wurden bei jedem Primer RT-Kontrollen in Einfachbestimmung gemessen, bei dem nichtintron-spannenden Cx43 wurden diese bei jeder Probe mitgeführt, bei den anderen Primern exemplarisch. Nach jeder PCR-Amplifikation wurde zwecks Überprüfung der Reinheit und Spezifität der Produkte eine Schmelzkurve angefertigt, indem unter schrittweiser Erhöhung der Temperatur die Fluoreszenzintensität aufgezeichnet wurde.

Mit der LightCycler-Software (Version 4.1, Roche) wurde für jede Probe die Analyse durchgeführt.

Tabelle 8: Verwendete Primer.

Primer	Accessionnummer	Sequenz	Länge (Basenpaare)
β-Actin intronspannend	NM_007431.2	F: TCA-GCT-AAT-GCA-CAA-TAT-CAA-GG R: TCC-ACA-TCA-GTT-CTG-TTC-TTC-G	165
Ctsk intronspannend	NM_007802.3	F: GAG-GCG-GCT-ATA-TGA-CCA-CT R: CTT-TGC-GGT-GGC-GTT-ATA-CA	119
ALP intronspannend	NM_007431.2	F: TCA-GCT-AAT-GCA-CAA-TAT-CAA-GG R: TCC-ACA-TCA-GTT-CTG-TTC-TTC-G	87
Sphk1 intronspannend	NM_025367	F: TGG-TGA-ATG-GGC-TAA-TGG-AAC R: CTT-CAT-TAG-TCA-CCT-GCT-CG	244
Cx43	NM_010288.3	F: TGC-TTC-CTC-TCA-CGT-CCC-AC	127

nicht intronspan- nend		R: CGC-GAT-CCT-TAA-CGC-CCT-TG	
------------------------------	--	-------------------------------	--

(F = *forward*, R= *reverse*)

2.2.5.4 PCR-Etablierung

Die Primer ALP, CtsK, Cx43 und das Referenzgen β -Actin waren im Labor für experimentellen Unfallchirurgie bereits etabliert und wurden nach vorhandenem Protokoll verwendet. Der Primer Sphk1 wurde neu durch eine nested PCR etabliert. Für die Erstellung einer Standardreihe wurde das 1:1.000.000 verdünnte PCR-Produkt eines anderen SPHK1-Primers verwendet (Tabelle 9). Dieses wurde in vier weiteren Schritten 1:10 weiter verdünnt, um am Ende fünf verschiedene Proben unterschiedlicher Konzentrationen zu erhalten. Mit diesen Verdünnungen wurde eine RT-PCR durchgeführt.

Die linear logarithmische Standardkurve ergab für den SPHK1-Primer eine Effizienz von 2,059 (Abbildung 12).

Tabelle 9: Zur Etablierung verwendeter SphK1-Primer

Primer	Accessionnummer	Sequenz	Länge (Basen- paare)
Sphk1 intronspannend	NM_025367.7	F: TAC-TCA-CCG-AAC-GGA AGA-AC R: CAC-CAG-TGT-AGA GGC-GGG	321

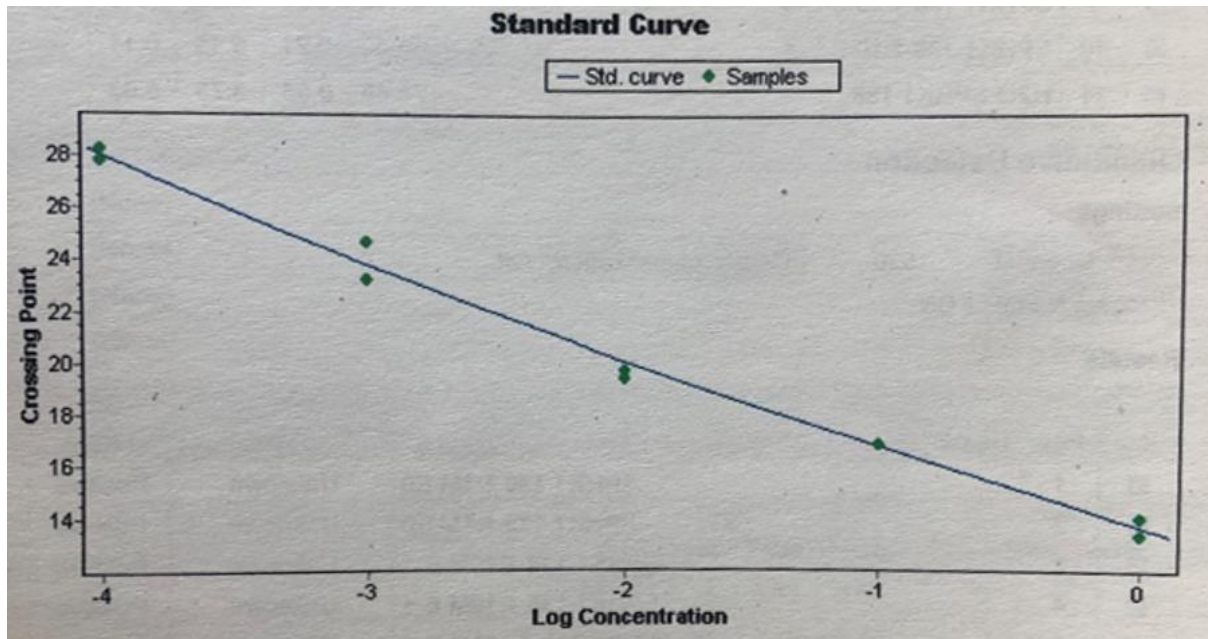


Abbildung 12: Logarithmische Standardkurve SPHK1-Primer.

2.2.6 Klinische Umfrage

Um die Ergebnisse aus den murinen Untersuchungen in Korrelation mit dem Knochenstatus von NPC-Patienten zu setzen, wurde eine Umfrage in den NPC-Selbsthilfegruppen „Niemann-Pick Selbsthilfegruppe Deutschland e.V.“ und „NP Suisse“ durchgeführt. Für die Umfragen existiert ein positives Ethikvotum (AZ 234/21) an der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die Probanden beziehungsweise deren gesetzlicher Vormund bestätigten schriftlich ihr Einverständnis zur Verwendung der Daten zu wissenschaftlichen Zwecken. Es wurden, anhand eines Fragebogens, Daten zum Knochenstatus der NPC-Betroffenen erhoben (siehe Kapitel 9.1). Es wurden die Symptome der Betroffenen und deren Beginn, die Frakturinzidenz, das Vorliegen von Knochen- und Gelenkschmerzen, sowie die Medikamenteneinnahme (insbesondere detailliert die Einnahme, des für die Behandlung von NPC zugelassenen Miglustat®) abgefragt. Des Weiteren wurden mögliche Einflussfaktoren auf den Knochenstatus wie die Menopause, der Nikotinabusus oder Nebenerkrankungen erfragt. Auch sollten die Betroffenen, wenn möglich, Aussagen zu deren Kalzium- und Cholecalciferolwerten machen, wenn bereits Blutuntersuchungen der Werte stattgefunden hatten. Als Kontrollgruppe wurden Alters- und Geschlechts-gematchte Probanden ausgewählt, wobei beim Alter eine Differenz von sechs Monaten toleriert wurde. Da die Mindestzahl an Patienten, die für eine statistische Analyse notwendig wäre in fünf Jahren Laufzeit nicht erreicht werden konnte, erfolgte die Auswertung der Daten ausschließlich deskriptiv.

2.2.7 Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung der Versuche wurde das Programm SPSS (Version 29, SPSS Institute INC., Chicago, US) und die Software R (Version 4.1.1-4.2.2, R Foundation, Wien, Österreich) verwendet. Mittels des Kolmogorov-Smirnov Test wurden die Daten auf eine Normalverteilung untersucht. Anschließend wurden die Daten mithilfe des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests, bei mehr als zwei Proben verglichen und bei Signifikanz mithilfe des Mann-Whitney-U Tests, bei zwei zu vergleichenden Datenblöcken. Zur Veranschaulichung der verschiedenen Versuchsergebnisse wurden Box-Whisker-Plots verwendet. Diese Diagramme repräsentierten die Verteilung der Daten wie folgt: Die rechteckige Box entsprach dem Interquartilbereich, die obere Grenze der

Box wurde durch das 75. Perzentil und die untere Grenze durch das 25. Perzentil festgelegt. Innerhalb der Box ist der Median durch einen schwarzen Strich dargestellt worden. Eventuelle Ausreißer wurden mit einem Punkt gekennzeichnet. Signifikanzniveaus wurden anhand von p-Werten $\leq 0,05$ bestimmt und als Striche oberhalb der Diagramme dargestellt. Um Einflussfaktoren bei der Messung des BAr.TAr und des BS.TAr zu berücksichtigen wurden zudem mehr-faktorielle ANOVAs und post-hoc t-Tests mittels der Software R berechnet. Aufgrund von Wechselwirkungen der Effekte mit dem Geschlecht, wurden Subgruppenanalysen für das Geschlecht durchgeführt. Diese Berechnungen wurden mit Hilfe des Instituts für medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Gießen unter Betreuung von Frau Dr. Windhorst durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 HISTOMORPHOMETRIE

Die HE-gefärbten Präparate wurden auf ihre relative Knochenfläche und auf ihren relativen Trabekelumfang untersucht. Dabei wurden 69 *Npc1^{+/+}*-Mäuse, 70 *Npc1^{-/-}*-Mäuse und 15 *Npc1^{+/-}*-Mäuse einbezogen. Die genaue Aufteilung in die einzelnen Untergruppen ist Tabelle 1 (Kapitel 2.1.1.1) zu entnehmen.

Bei den weiblichen ($p = 0,03$), sowie den männlichen ($p = 0,047$) *Npc1^{-/-}*-Mäusen, die die NPC-Erkrankung widerspiegeln, wurde eine signifikante Reduktion der relativen Knochenfläche (BAr.TAr) im Vergleich zu den gesunden *Npc1^{+/+}*-Mäusen gemessen (Abbildung 13). Dabei wurden nur die Werte der unbehandelten Tiere einbezogen. Die Analyse der relativen Knochenoberfläche ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen *Npc1^{-/-}* und *Npc1^{+/+}* (nicht dargestellt). Ebenso war der Vergleich der *Npc1^{+/-}*- mit den *Npc1^{+/-}*-Mäusen nicht signifikant.

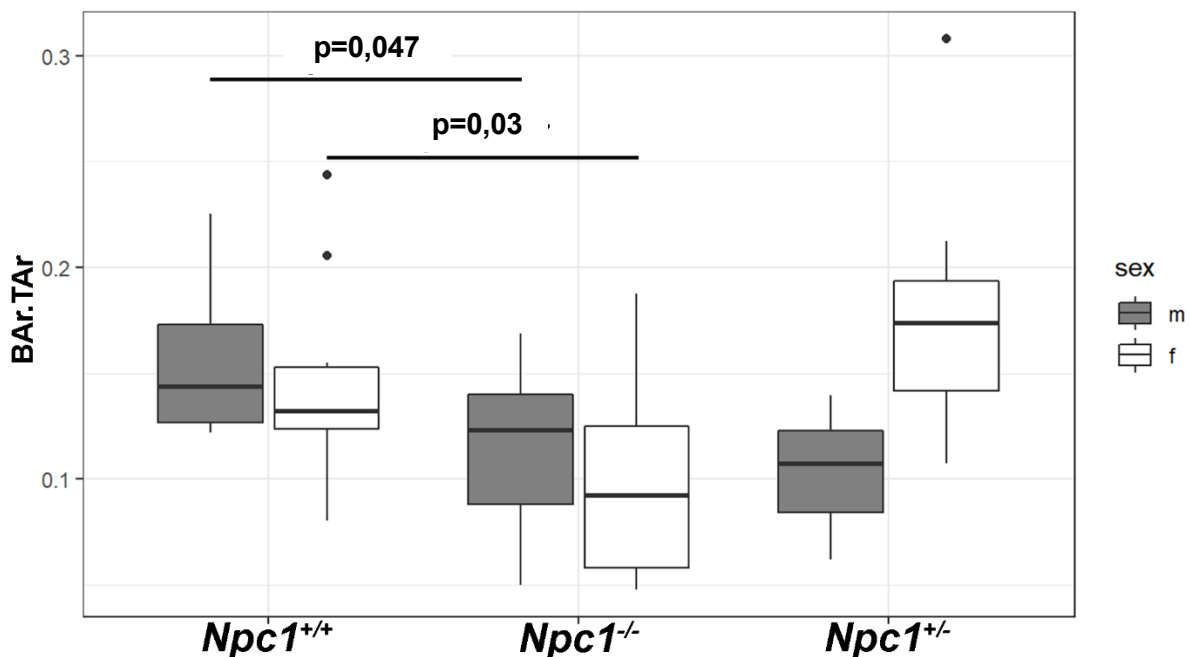


Abbildung 13: Histomorphometrische Untersuchung der relativen Knochenfläche der unbehandelten Mäuse.
(Punkte stellen Ausreiser dar, BAr.TAr = relative Knochenfläche, m = männlich, f = weiblich)

Bei der Untersuchung des Knochenstatus der Tiere unter Betrachtung ihres *Npc1*-Genotyps und ihrer Behandlung, nicht mehr unterschieden nach Geschlecht, zeigte sich in der Gruppe 1 ebenfalls eine signifikante Verringerung der BA_r.TA_r bei den *Npc1*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den *Npc1*^{+/+}-Mäusen ($p = 0,019$). Ebenso zeigte sich die BA_r.TA_r der *Npc1*^{-/-}-Mäuse in der scheinbehandelten Sham-Gruppe signifikant verringert im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtypen ($p = 0,003$; Abbildung 14). Bei der relativen Knochenoberfläche gab es keine signifikanten Unterschiede (nicht dargestellt). Die Werte für die *Npc1*^{+/-}-Mäuse wurden nicht berechnet. Ebenso wurde Gruppe 6 „HPβCDx“ aus der Berechnung herausgenommen, da hier nur weibliche Präparate vorlagen. Beides wurde jedoch dennoch in die Grafik mit aufgenommen (Abbildung 14).

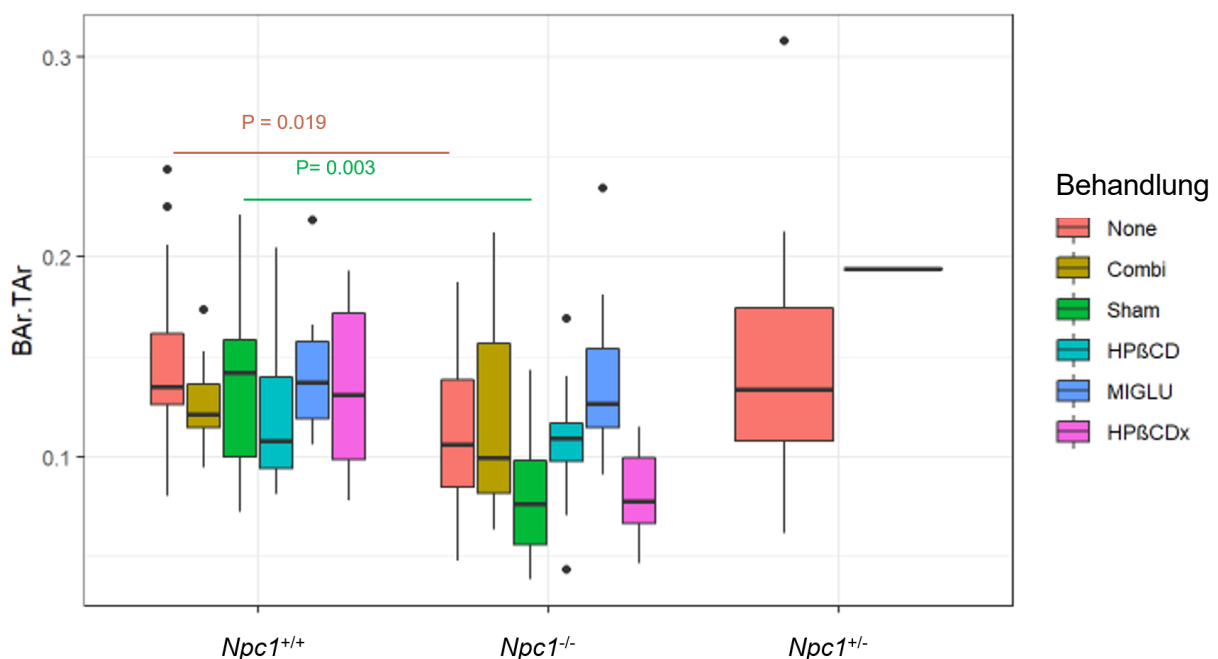


Abbildung 14: Histomorphometrische Untersuchung von *Npc1*^{+/+}-, *Npc1*^{-/-}-, *Npc1*^{+/-}-Mäusen in Abhängigkeit zu ihrer medikamentösen Behandlung.
(Punkte stellen Ausreiser dar, BA_r.TA_r = relative Knochenfläche)

In einer ANOVA-Analyse wurden die BA_r.TA_r (Abbildung 15) sowie BS.TA_r (Abbildung 16) unter Berücksichtigung des Genotyps, der Behandlung und des Geschlechts untersucht. Aufgrund einer potentiell ungleichmäßigen Verteilung der Qualität in den Subgruppen wurde die TA_r als Qualitätsvariable berücksichtigt. Hierbei traten bei den männlichen Tieren sowohl bei der BA_r.TA_r als auch bei der BS.TA_r keine signifikanten Unterschiede auf. In der Gruppe 1 NONE zeigte sich das Konfidenzintervall allerdings nur sehr knapp überlappend ($p = 0,0075$) (Abbildung 17). Bei den weiblichen Tieren fielen in jeder Gruppe eine stark signifikante verringerte BA_r.TA_r auf (gemittelt über die Werte aller

Gruppen $p < 0,0001$). Dabei wurden die Tiere jeweils nur in ihrer jeweiligen Behandlungsgruppe verglichen. Die Werte für die BS.TAr von weiblichen *Npc1^{+/-}*-Mäusen versus *Npc1^{-/-}*-Mäusen waren zwar signifikant verringert für die *Npc1^{-/-}*-Mäuse ($p = 0,0161$; gemittelt über alle Behandlungsgruppen), allerdings überschneidet sich das Konfidenzintervall. Die Werte für die *Npc1^{+/-}*-Mäuse wurden zwar in die Grafik aufgenommen, allerdings nicht mitberechnet.

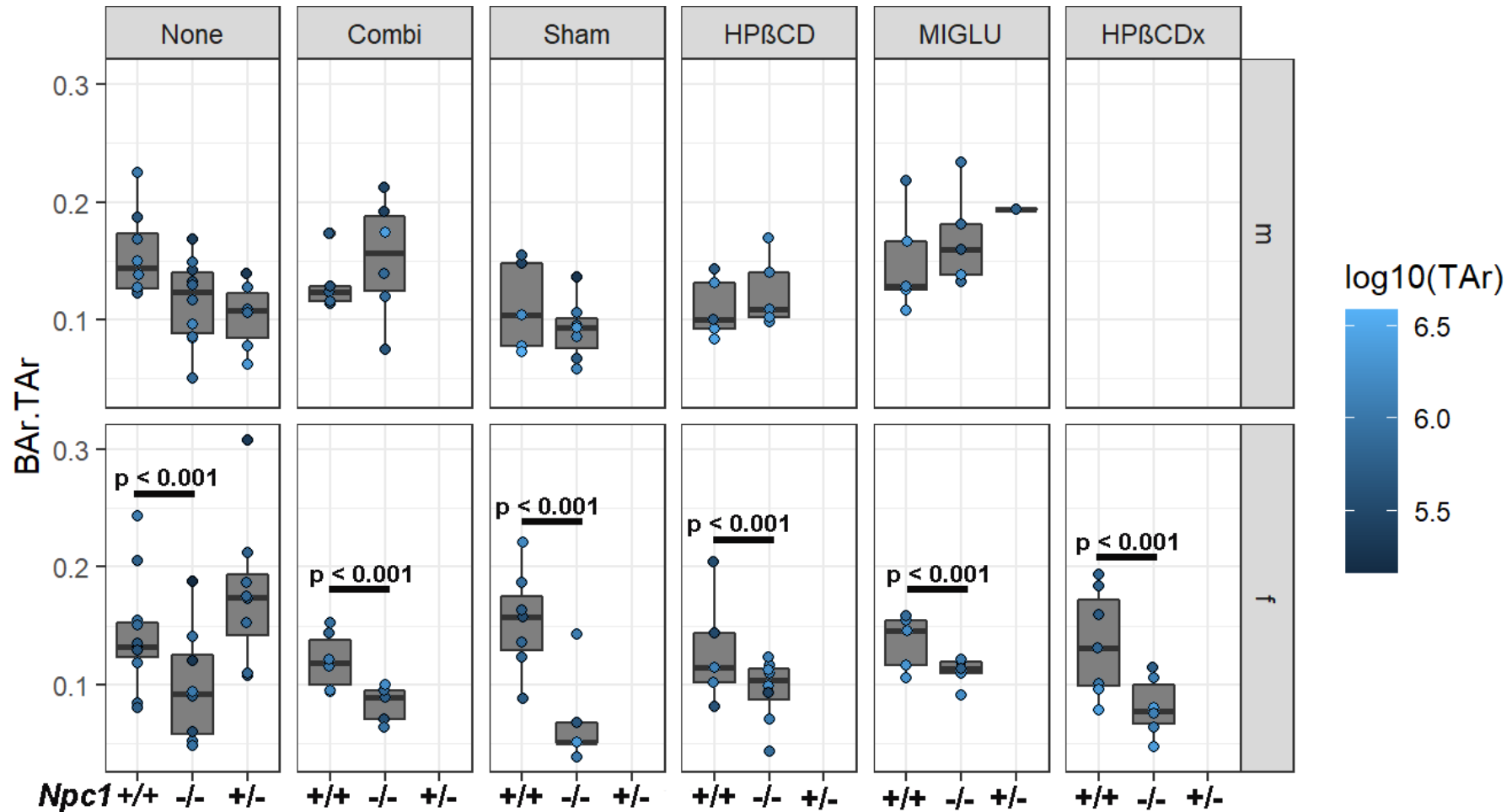


Abbildung 15: ANOVA-Analyse des BAR.TAr unter Berücksichtigung des Genotyps, der Behandlung und des Geschlechts.

Die TAr wurde als Konfunder berücksichtigt, sodass Knochen mit einer größeren auswertbaren Gesamtfläche eine höhere Wertigkeit zugesprochen bekommen. Es zeigt sich bei den männlichen Tieren keine Signifikanz. Bei den weiblichen Tieren zeigt sich gemittelt über alle Behandlungsgruppen ein signifikanter Unterschied ($p < 0.001$) zwischen *Npc1*^{+/+} und *Npc1*^{-/-}. (m = männlich, f = weiblich, BAR.TAr = relative Knochenfläche, TAr = tissue area, Punkte stellen Ausreiser dar).

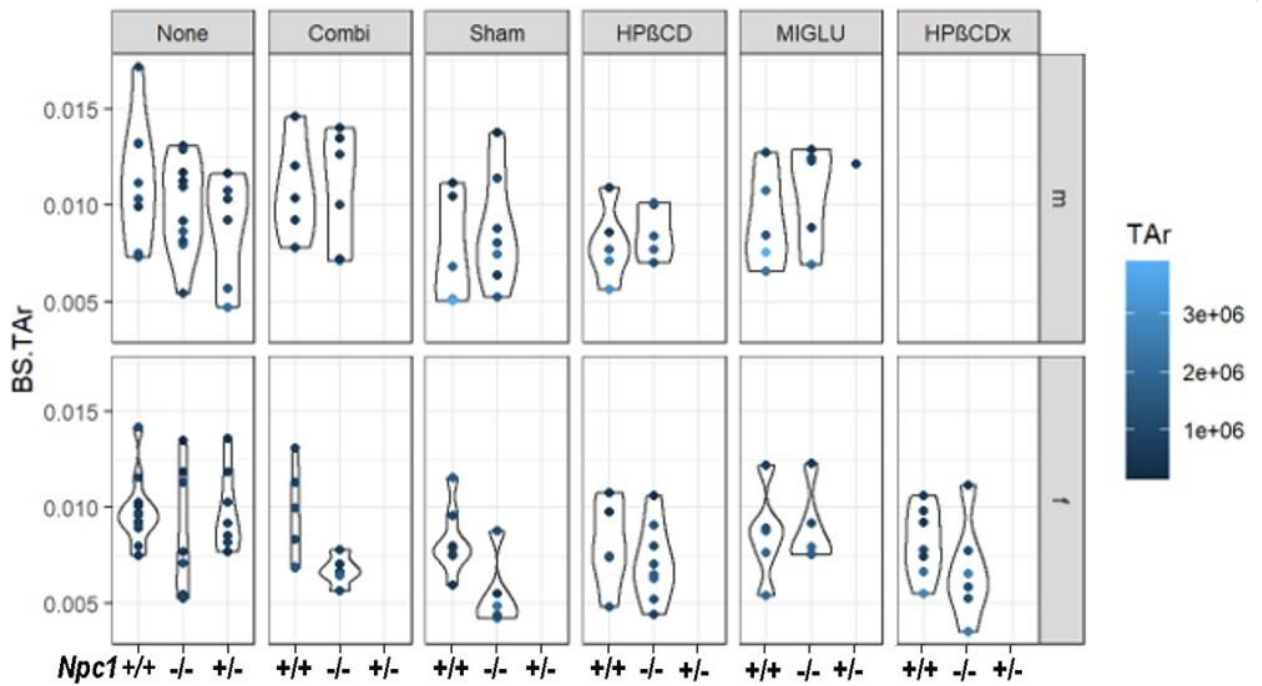


Abbildung 16: ANOVA-Analyse der BS.TAr unter Berücksichtigung des Genotyps, der Behandlung und des Geschlechts.

Die Ergebnisse für die weiblichen *Npc1*^{+/+}- und *Npc1*^{-/-}-Mäuse, gemittelt über die Behandlungen, sind zwar signifikant, allerdings überschneidet sich das Konfidenzintervall. (m = männlich, f = weiblich).

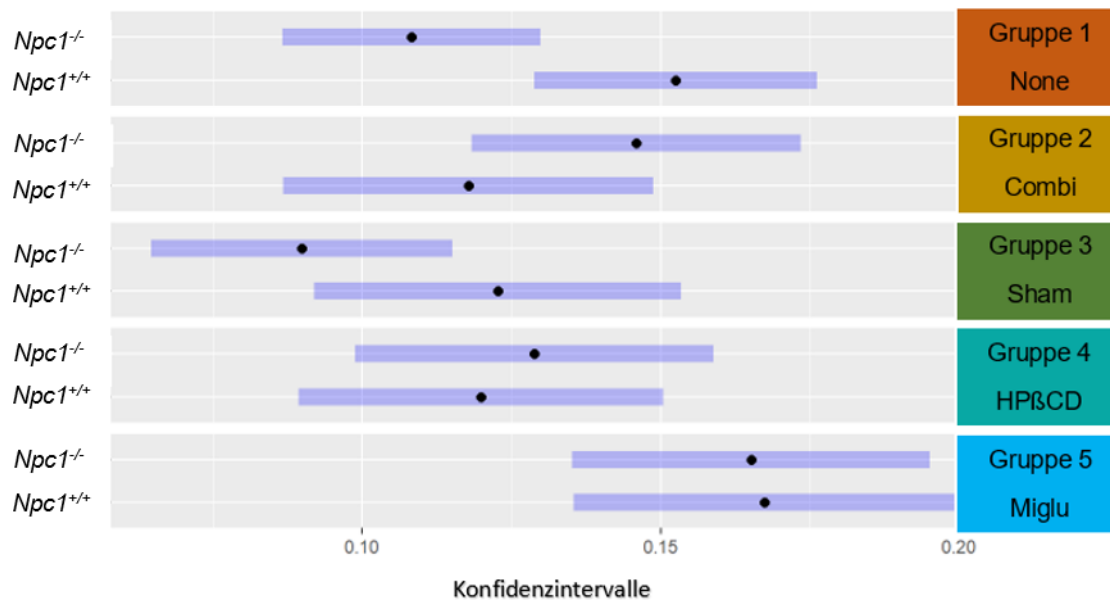


Abbildung 17: Konfidenzintervalle für BAR von männlichen WT- und KO-Mäusen in den jeweiligen Behandlungsgruppen.

Gruppe 1 NONE ist zwar mit einem p von 0,0075 signifikant, allerdings überlappen die Konfidenzintervalle. In den anderen Untergruppen gibt es keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Weiter wurde der Einfluss von HPβCD auf den Knochenstatus der Mäuse untersucht. Dazu wurden die Gruppe *NONE* und die Gruppe „HPβCD“ unter Berücksichtigung des NPC-Status vergleichend betrachtet. Hier zeigte sich für KO-Mäuse keine relevanten Unterschiede bei BAr.TAr ($p = 0,969$) und für BS.TAr ($p = 0,101$). Bei den WT-Mäusen war eine signifikant größere relative Knochenoberfläche in der *NONE*-Gruppe im Vergleich zu der „HPβCD“ zu verzeichnen ($p = 0,016$). Die relative Knochenfläche war mit $p = 0,073$ nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 18 + 19). Es konnten jedoch Varianzen bei den Standardabweichungen vom Mittelwert mit 0.1477 ± 0.0426 für *NONE* und 0.1194 ± 0.0376 für HPβCD festgestellt werden. Ebenfalls lag der Median der HPβCD-Gruppe bei den *Npc1^{+/-}*-Mäusen mit einem Wert von 0,108 unter den Medianwerten der Gruppen *NONE*, *COMBI*, *Sham* und *MIGLU*, die sich in einem Bereich von 0,121 für die Gruppe *COMBI* bis hin zu 0,142 für die *Sham*-Gruppe bewegten.

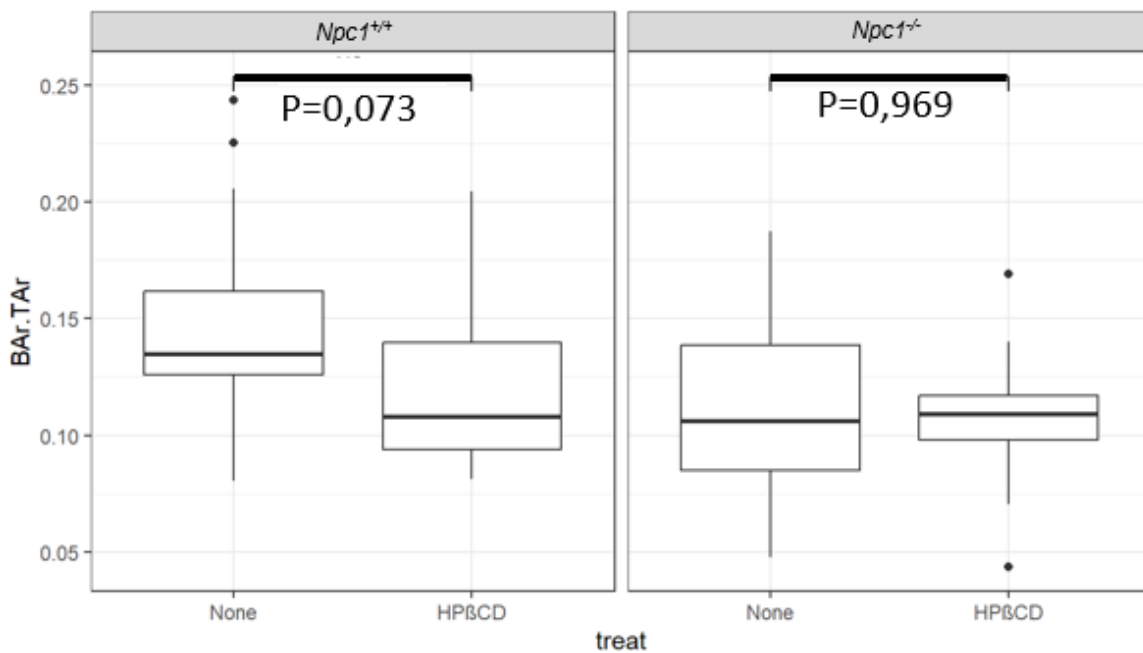


Abbildung 18: BAr.TAr verglichen zwischen den Behandlungsgruppen *NONE* und HPβCD.

Dabei wurde der Genotyp der Mäuse als Variable berücksichtigt. Es zeigen sich sowohl bei den *Npc1^{+/-}*- als auch bei den *Npc1^{-/-}*-Mäusen keine signifikanten Unterschiede. (Punkte stellen Ausreißer dar)

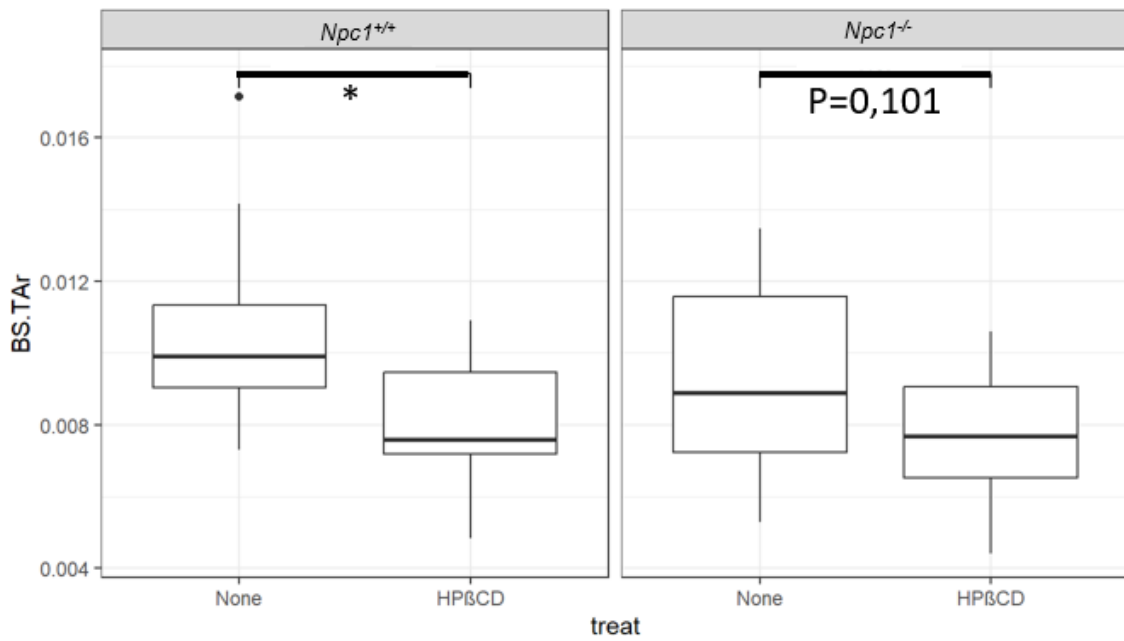


Abbildung 19: Relative Knochenoberfläche (BS.TAr) der *Npc1*^{+/+}- und *Npc1*^{-/-}-Mäuse aus den Behandlungsgruppen *NONE* und HPβCD

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied bei den *Npc1*^{+/+}-Mäusen ($p = 0,016$). Bei den *Npc1*^{-/-}-Mäusen wurden keine Differenzen festgestellt. (* = $p < 0,005$, Punkte stellen Ausreiser dar)

3.2 DESKRIPTIVE HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG

3.2.1 Toludinblau und Hämatoxylin-Eosin-Färbung

50 Präparate der Gruppe 1 *NONE* wurden in sechs Untergruppen unterteilt (Tabelle 10) und lichtmikroskopisch sowohl in HE-Färbung als auch in Toludinblau-Färbung verblindet evaluiert.

Tabelle 10: Unterteilung der Behandlungsgruppe 1 in sechs Gruppen

Gruppe	Genotyp + Geschlecht	Anzahl
1	<i>Npc^{+/+}</i> / männlich	7
2	<i>Npc^{+/+}</i> / weiblich	16
3	<i>Npc^{-/-}</i> / männlich	9
4	<i>Npc^{-/-}</i> / weiblich	9
5	<i>Npc^{+/-}</i> / männlich	4
6	<i>Npc^{+/-}</i> / weiblich	5

Bei der Betrachtung fiel auf, dass in den *Npc^{1-/-}*-Gruppen im Vergleich zu der jeweils demselben Geschlecht angehörigen Wildtypgruppe die Trabekel bei den meisten Präparaten zarter ausgeprägt waren (Abbildung 20). Die Anzahl der Knochenbälkchen schien leicht reduziert zu sein. Dieser Unterschied konnte, sowohl in der Metaphyse der Knochen, als auch in den auswertbaren Epiphysen beobachtet werden. Auffällig war ebenfalls, dass die subepiphysäre Verdichtung der Trabekel bei den *Npc^{1-/-}*-Mäusen weniger ausgeprägt war (Abbildung 20 E). Die *Npc^{1+/-}* Proben zeigten keine Unterschiede zu den *Npc^{1+/+}*-Proben. Die Trabekelqualität bei den *Npc^{1-/-}*-Tieren fiel sehr unterschiedlich aus.

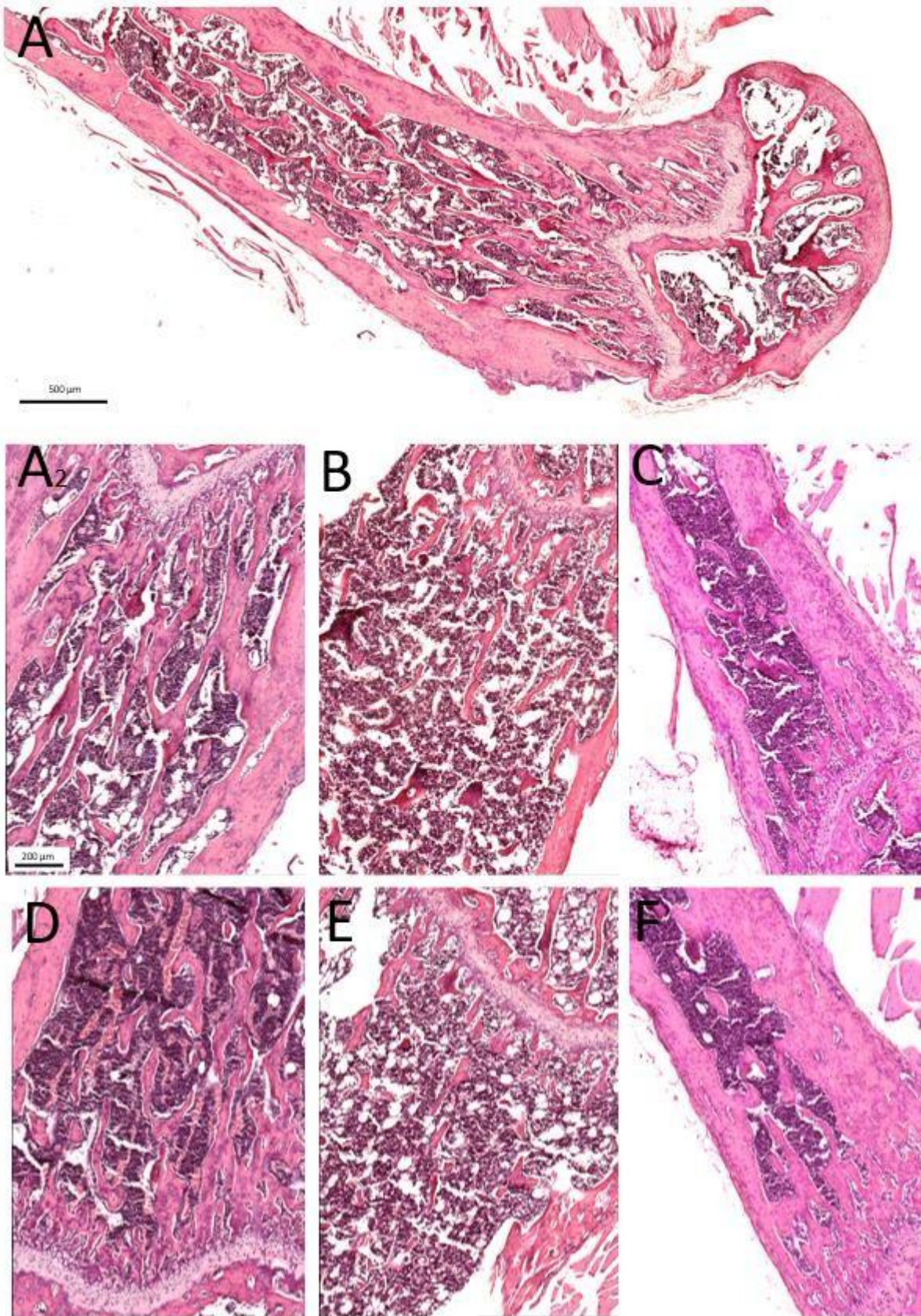


Abbildung 20: HE-Färbung der Trabekel von Gruppe 1.

(A) Männliche WT-Maus (Maßstab 500 µm). (A2) Männliche *Npc1*^{+/+}-Maus aus A mit dem Maßstab 200 µm (Maßstab gilt ebenfalls für B-F). (B) Männliche *Npc1*^{-/-}-Maus mit deutlich schmalen Trabekeln. (C) Männliche, *Npc1*^{+/-}-Maus. (D) Weibliche *Npc1*^{+/+}-Maus mit deutlicher Verdichtung der Trabekel in der Nähe der Epiphysenfuge. (E) Weibliche *Npc1*^{-/-}-Maus mit reduzierter Trabekelanzahl. (F) Weibliche, *Npc1*^{+/-}-Maus.

Ebenfalls zeigte sich, dass das Knochenmark der *Npc1*^{-/-}-Mäuse deutlich weniger dicht war (vergleiche Abbildung 20 A + D mit B + E). Es fiel ein verbleibender, schaumiger Anteil in den ausgewaschenen kleinen Löchern auf (Abbildung 21). Die Löcher an sich waren zu klein, um von ausgewaschenen Adipozyten zu stammen. Außerdem konnten in allen Proben weitere, größere Löcher, welche klar auf ausgewaschene Adipozyten zurückzuführen sind, in gleicher Anzahl beobachtet werden. Die Relikte der Adipozyten unterschieden sich auch zwischen den Proben. Allerdings gab es hier innerhalb der Gruppen eine so große Streuung, dass nicht von einem Unterschied zwischen *Npc1*^{-/-} und *Npc1*^{+/+} gesprochen werden kann.

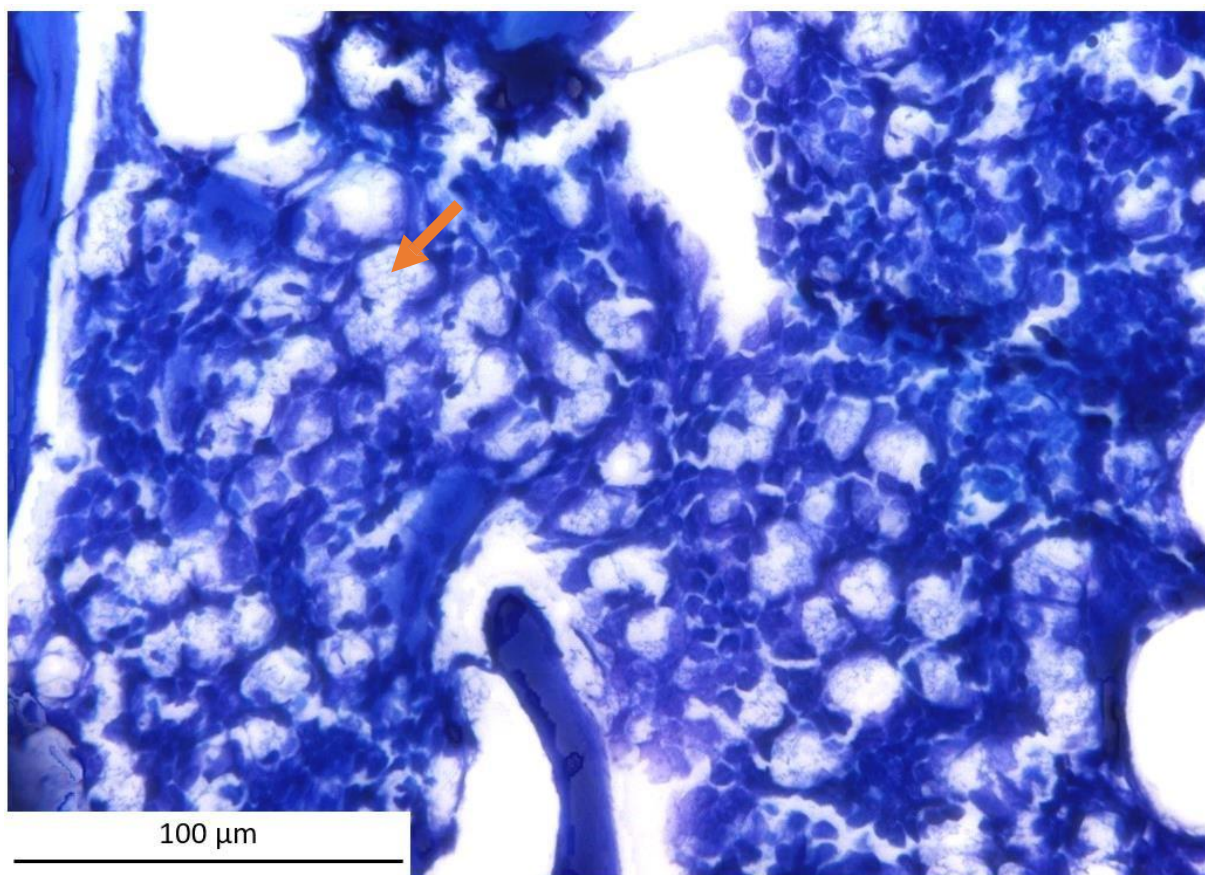
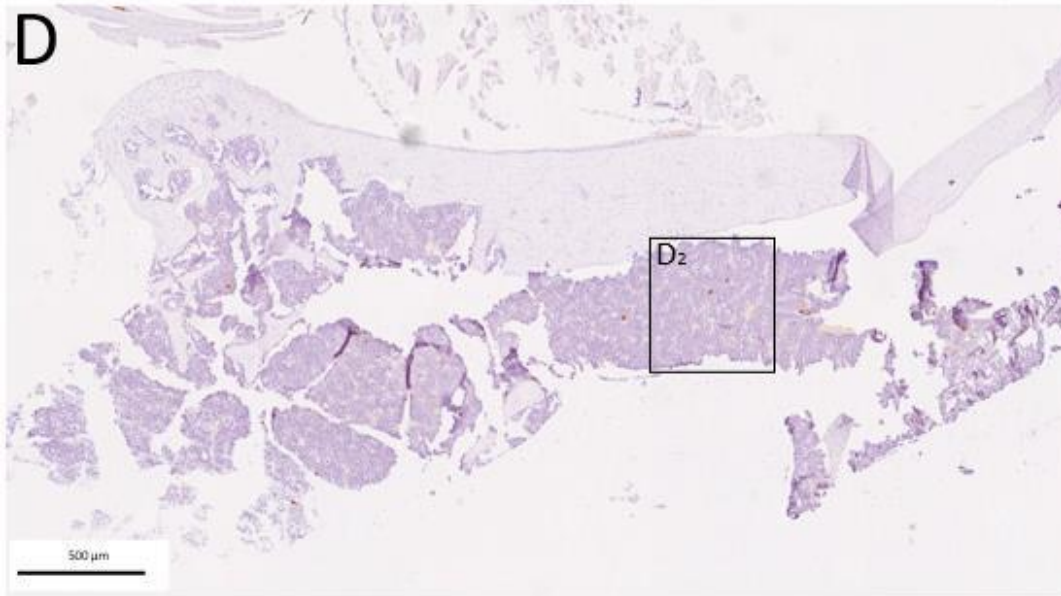


Abbildung 21 Knochenmark einer männlichen *Npc1*^{-/-}-Maus. Ausgewaschene Relikte beispielhaft mit Pfeil markiert.

3.2.2 ASMA-Färbung

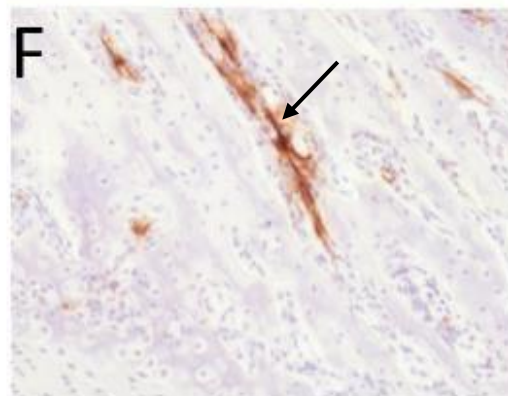
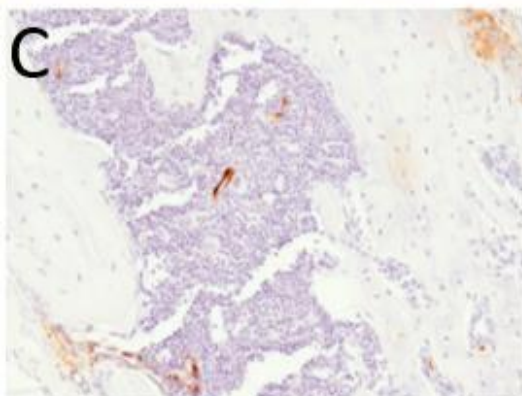
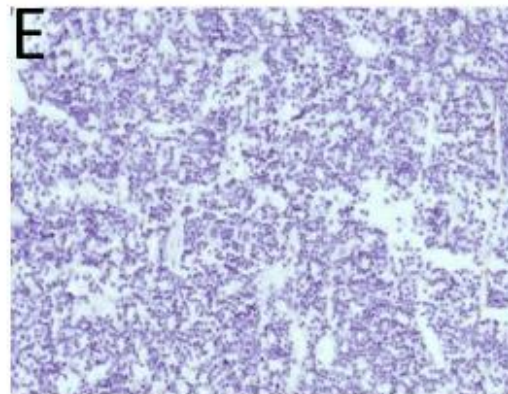
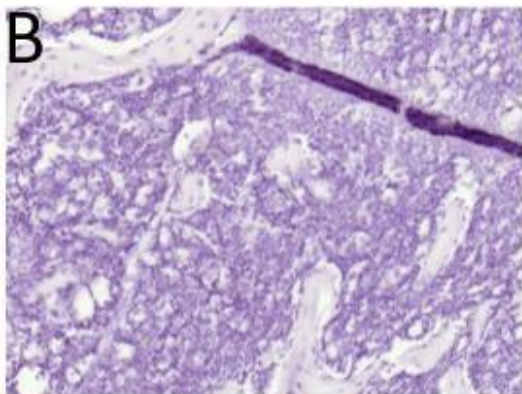
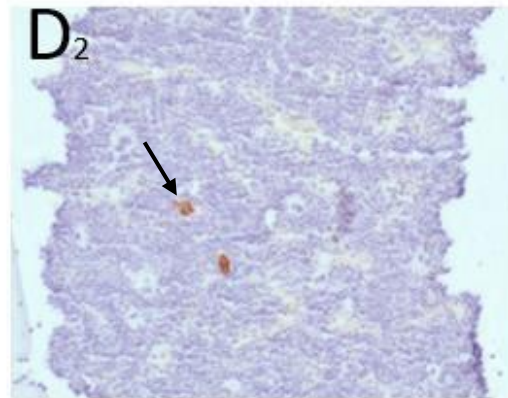
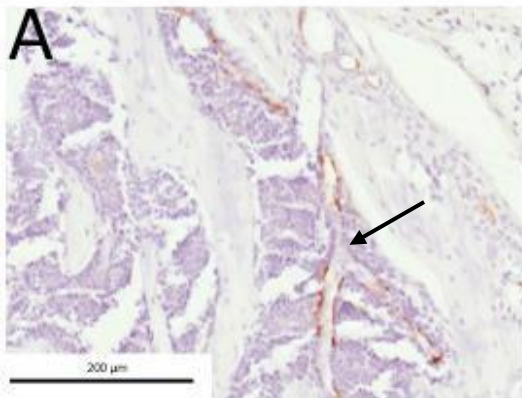
Es wurden ebenfalls 50 Präparate der gleichen Versuchstiere (Tabelle 10), in einer immunhistochemischen Färbung mit dem ASMA-Antikörper verblindet untersucht. Der Fokus lag dabei auf den ASMA-positiven Bereichen, die im Knochen lediglich in den Gefäßwänden vorkommt. Ausgenommen hiervon sind postkapilläre Venolen, Kapillaren und Sinusoide, da diese keine glatte Muskulatur in ihrer Gefäßwand besitzen [135].

Die lichtmikroskopische Evaluierung ergab keinen Unterschied zwischen den Wildtyp- und den *Npc1*^{-/-}-Proben (Abbildung 22). Es ließ sich gut erkennen, dass das Knochenmark der *Npc1*^{+/+}-Mäuse viele ASMA-positive Bereiche enthielt (Bsp. Abbildung 22 B). Bei den *Npc1*^{-/-}-Mäusen lassen sich im Knochenmark äußerst selten vereinzelt ASMA-positive Bereiche finden. Limitierend war bei der Beobachtung die Qualität der Proben, da diese stark schwankte und sich die intakten Bereiche bei den einzelnen Proben stark unterschieden. Eine histomorphometrische Untersuchung war somit ausgeschlossen. Die heterozygoten Versuchstiere wiesen lichtmikroskopisch keinen Unterschied zur Wildtypgruppe auf.



**Abbildung 22: ASMA-
Immunhistochemie
mit Hämatoxylin-Ge-
genfärbung**

(D) Männliche *Npc1*^{+/+}-Maus (Maßstab 500 μm). (A) weibliche *Npc1*^{+/+}-Maus (Maßstab 200 μm; gilt für A, B, C, D2, E, F). (B) Weibliche *Npc1*^{-/-}-Maus. (C) Weibliche *Npc1*^{+/-}-Maus. (D2) Männliche *Npc1*^{+/+}-Maus (E) Männliche *Npc1*^{-/-}-Maus. (F) Heterozygote *Npc1*^{+/-}-Maus. Schwarze Pfeile zeigen ASMA-positive Gefäße.



3.2.3 Kossa-van-Gieson und Movat-Pentachrom Färbung

Die Kossa-van-Gieson- und die Movat-Pentachrom-Färbungen wurden durchgeführt, um in den histologischen Schnitten eventuell vorliegende Unterschiede beim Knochenmineral festzustellen. Bei der Kossa-van-Gieson-Färbung wurden mineralisierte Bereiche des Knochens schwarz, das Osteoid hingegen wird rot angefärbt. Abbildung 23 zeigt Präparate aus Gruppe 1 in der Kossa-Gieson-Färbung. Leider sind die Strukturen weitestgehend destruiert und es können lediglich einzelne Fragmente beobachtet werden (Abbildung 23 A,C,D,G,H,K,L). In der verblindeten lichtmikroskopischen Untersuchung zeigten sich keine Unterschiede zwischen *Npc1^{+/+}*-, *Npc1^{-/-}*- und *Npc1^{+/-}*-Mäuseknochen. Die Färbung war aufgrund der Altersdifferenz der Proben sehr heterogen. Das Osteoid, das durch die rote Anfärbung in der Kossa-van-Gieson Färbung identifiziert wurde, konnte in allen Epiphysenfugen der Proben nachgewiesen werden. Im Bereich der Spongiosa lag nur sehr wenig beziehungsweise oft auch kein rot angefärbtes Osteoid vor. Die Substantia compacta war in allen Proben Großteils ubiquitär schwarz markiert. Allerdings wurden Teilbereiche älterer Proben nicht korrekt gefärbt (blauer Pfeil; Abbildung 23 H). Aufgrund des sehr schlechten Gewebeerhalts wurde auf eine histomorphometrische Auswertung der Färbung verzichtet wurde. Die Movat-Pentachrom stellt mineralisierten Knochen hellgelb, mineralisierten Knorpel blaugrün, nicht-mineralisierter Knorpel gelb und nicht-mineralisierter Knochen, elastische Fasern, und Muskelgewebe hellrot dar. Gleich den Knochenschnitten der Kossa-van-Gieson Färbung zeigten sich allerdings auch die Präparate in der Movat-Pentachrom Färbung weitestgehend destruiert. Die verbliebenen Abschnitte sind in Abbildung 23 (B, E, F, I, J, M, N) dargestellt. Das Färbemuster der Movat-Pentachrom-Färbung war diffus. So war beispielsweise die Epiphysenfuge in manchen Proben stark grün und in anderen gelb angefärbt (Abbildung 23 F versus 23 I). Das Knochenmark war teils rot-, teils braun-, teils gelb-gefärbt. Nach der Entblindung der Untersuchung konnte dabei kein Muster ausgemacht werden.

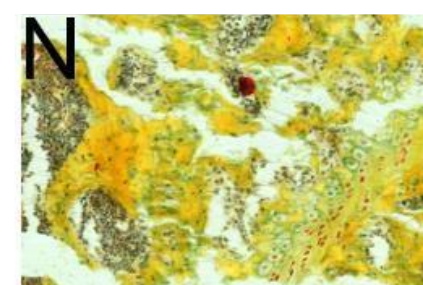
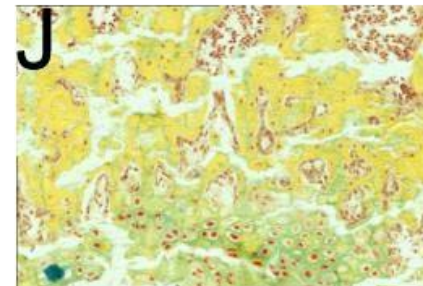
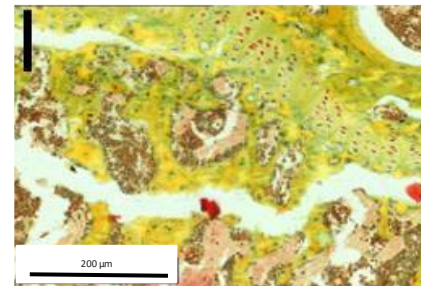
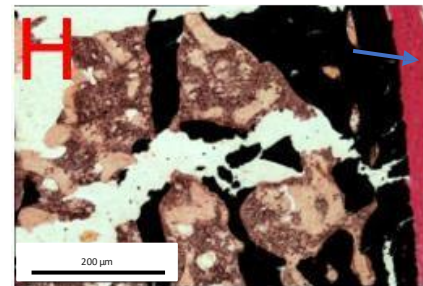
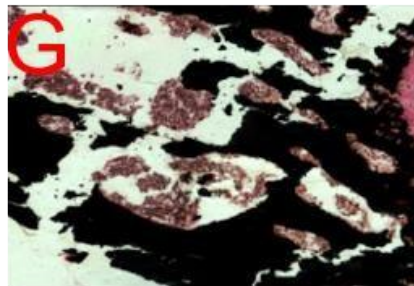
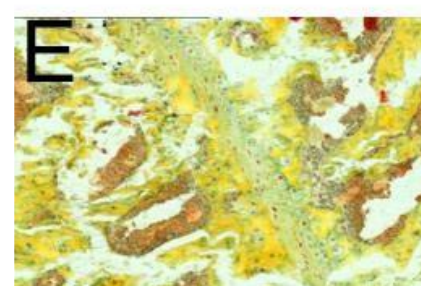
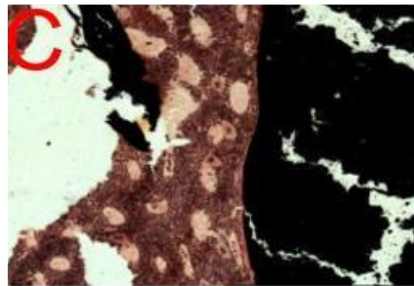
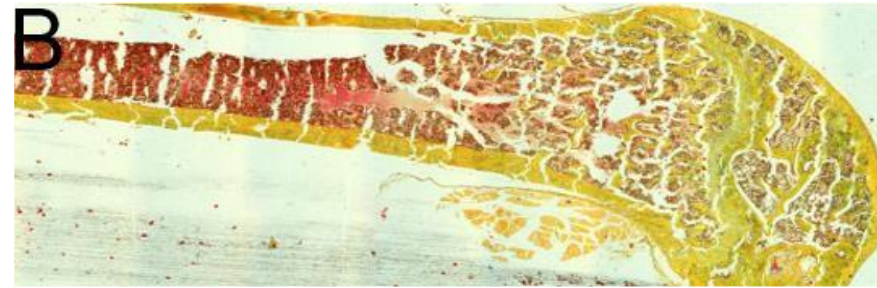
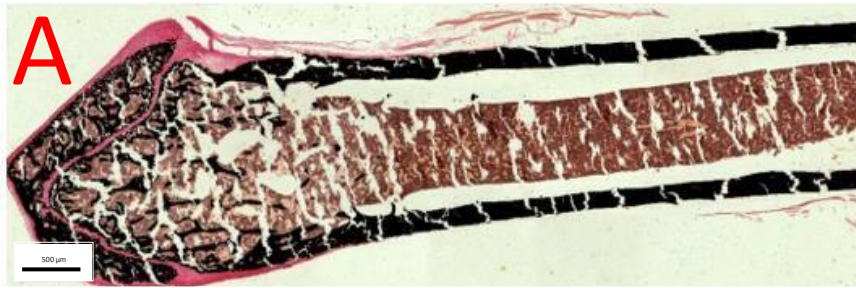


Abbildung 23: Kossa-van-Gieson Färbung (links) und Movat-Pentachrom Färbung. (rechts) (A) Weibliche KO-Maus (Maßstab 500 μ m). (B) männliche KO-Maus (Vergrößerung entsprechend dem Maßstab von A). (C) und (E) männliche WT-Maus. (D) und (F) weibliche WT-Maus. (G) und (I) männliche KO-Maus. (H) und (J) weibliche KO-Maus. (K) und (M) heterozygote, männliche Maus. (L) und (N) heterozygote, weibliche Maus. (C-N Maßstab 200 μ m). Pfeil in H markiert fälschlich rot gefärbte Kortikalis.

3.2.4 Giemsa-Färbung

Die Giemsa-Färbung sollte für die Betrachtung zellulärer Details im Knochenumfeld genutzt werden. NPC-charakteristische Makrophagen mit blau-grauem Zytoplasma, sogenannte *sea-blue*-Histiocyten, die in der Giemsa Färbung besonders gut zu beobachten sind, sollten durch diese Färbemethode detektiert werden. Aufgrund der Fixierung und der Einbettung der Proben konnten die Präparate in der Giemsa-Färbung nicht verwertet werden, da jegliche Lipide bereits aus den Präparaten herausgewaschen waren. Leider war deshalb eine lichtmikroskopische Auswertung der Präparate in der Giemsa-Färbung nicht möglich.

3.3 μ CT-UNTERSUCHUNG

Vor der histologischen Untersuchung wurden die trabekulären Anteile der linken Femora von einem Teil der Versuchstiere im μ CT auf ihre morphologischen und densitometrischen Eigenschaften untersucht. Die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den *Npc1^{-/-}* und *Npc1^{+/+}*-Versuchstieren sind der übersichtlicher in nachfolgender Tabelle (Tabelle 11) dargestellt. Die folgenden Abbildungen 24-26 stellen die signifikanten Unterschiede graphisch dar. Abbildung 27 illustriert am Beispiel einzelner Präparate gemessenen Unterschiede zwischen *Npc1^{-/-}* und *Npc1^{+/+}*. Hier zeigen die Abbildungen 27 A und 27 B die Mikroarchitektur des Knochens an der distalen Metaphyse des rechten Femurs am Beispiel zweier Präparate der Gruppe 1. Abbildung 27 C und 27 D zeigen dieselben Präparate. In diesen Abbildungen wurde die Strukturendickenverteilung der Trabekel mittels *color thresholding* farblich dargestellt. Die Farbe Rot entspricht dünnen Trabekeln im Bereich von 6,89 μ m bis ca. 35 μ m. Blau entspricht dem Bereich von ca. 55 μ m bis 108,1 μ m. Grün entspricht dem Bereich von ca. 35 μ m bis 55 μ m Trabekeldicke. Der Balken in Abbildung 27 C visualisiert den Übergang der Colorierung. 27 E und 27 F ergänzen die Darstellung um Präparate der *Sham*-Gruppe.

Zusätzlich zum Vergleich der *Npc1^{-/-}*- mit den *Npc1^{+/-}*-Proben wurden für die nichtbehandelten Gruppe 1 die Unterschiede zwischen heterozygoten Tieren und Mutanten, beziehungsweise Wildtypen untersucht. Hierbei wiesen die weiblichen *Npc1^{-/-}*-Mäuse im Vergleich zu den weiblichen *Npc1^{+/-}*-Mäusen ein signifikant niedrigeres BV/TV auf ($p = 0,003$). Ebenfalls war die Trabekeldicke bei den weiblichen *Npc1^{-/-}*-Tieren stark signifikant verringert im Vergleich zu den heterozygoten Tieren ($p < 0,001$). Die relative Knochenoberfläche zeigte sich in dieser Gruppe bei den weiblichen *Npc1^{-/-}*-Mäusen signifikant größer im Vergleich mit den weiblichen heterozygoten ($p = 0,001$) Tieren. Des Weiteren zeigte sich eine stark signifikant verringerte *trabecular number* ($p = 0,008$) im Vergleich zwischen den weiblichen *Npc1^{-/-}*-Mäusen und den *Npc1^{+/-}*-Mäusen, sowie stark signifikant erhöhte Werte der *Npc1^{-/-}*- versus den *Npc1^{+/-}*-Mäusen bei den beiden Knochenkonnektivitätsparametern *trabecular pattern factor* ($p = 0,002$) und dem *structure model index* ($p = 0,013$; Abbildung 24).

Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den männlichen *Npc1^{-/-}*-Mäusen und den *Npc1^{+/-}*-Mäusen beobachtet. Ebenso zwischen den Wildtypgruppen und den heterozygoten Tieren zeigte sich kein signifikanter Unterschied in allen gemessenen Parametern bei beiden Geschlechtern.

Tabelle 11: Überblick signifikanter Unterschiede der μ CT-Analyse

Parameter	Gruppe 1 <i>NONE</i>		Gruppe 2 Combi		Gruppe 3 <i>Sham</i>		Gruppe 4 HP β CD		Gruppe 5 Miglu		Gruppe 6 HP β CDx	
	W	M	W	M	W	M	W	M	W	M	W	M
	Signifikante Unterschiede <i>Npc1</i> ^{-/-} -Mäuse vs. <i>Npc1</i> ^{+/+} -Mäuse											
BV/ TV	↓ p=0,027	↓ p=0,012					↓ p= 0,004					↓ p= 0,009
BS/ TV	↑ p=0,007				↑ p=0,02	↑ p=0,004						↑ p=0,005
Tb.Th	↓ p=0,006				↓ p= 0,039	↓ p= 0,004	↓ p=0,01					↓ p=0,007
Tb.Sp	↑ p=0,014					↑ p=0,036						↑ p=0,04
Tb.N	↓ p=0,012	↓ p=0,042			↓ p= 0,041	↓ p= 0,009						↓ p=0,04
Tb.Pf	↑ p=0,009				↑ p=0,05	↑ p=0,009						↑ p=0,005
SMI	↑ p=0,01	↑ p=0,012			↑ p=0,039	↑ p=0,009						↑ p=0,006

Betrachtet werden jeweils die signifikanten Unterschiede der *Npc1*^{-/-}-Mäuse versus den Wildtypen mit dem Geschlecht als Störvariable. Ein Pfeil nach oben (↑) entspricht signifikant höheren Werten der *Npc1*^{-/-}-Kohorte im Vergleich mit den Wildtypen. Ein Pfeil nach unten (↓) vice versa. Leere Checkboxes entsprechen keinem statistisch signifikanten Unterschied.

Verhältnis *bone volume* zu *tissue volume* (BV/TV), *bone surface* zu *bone volume* (BS/BV), *trabecular thickness* (Tb.Th), *trabecular separation* (Tb.Sp), *trabecular number* (Tb.N), *trabecular pattern factor* (Tb.Pf), *structure model index* (SMI). Versus (vs.)

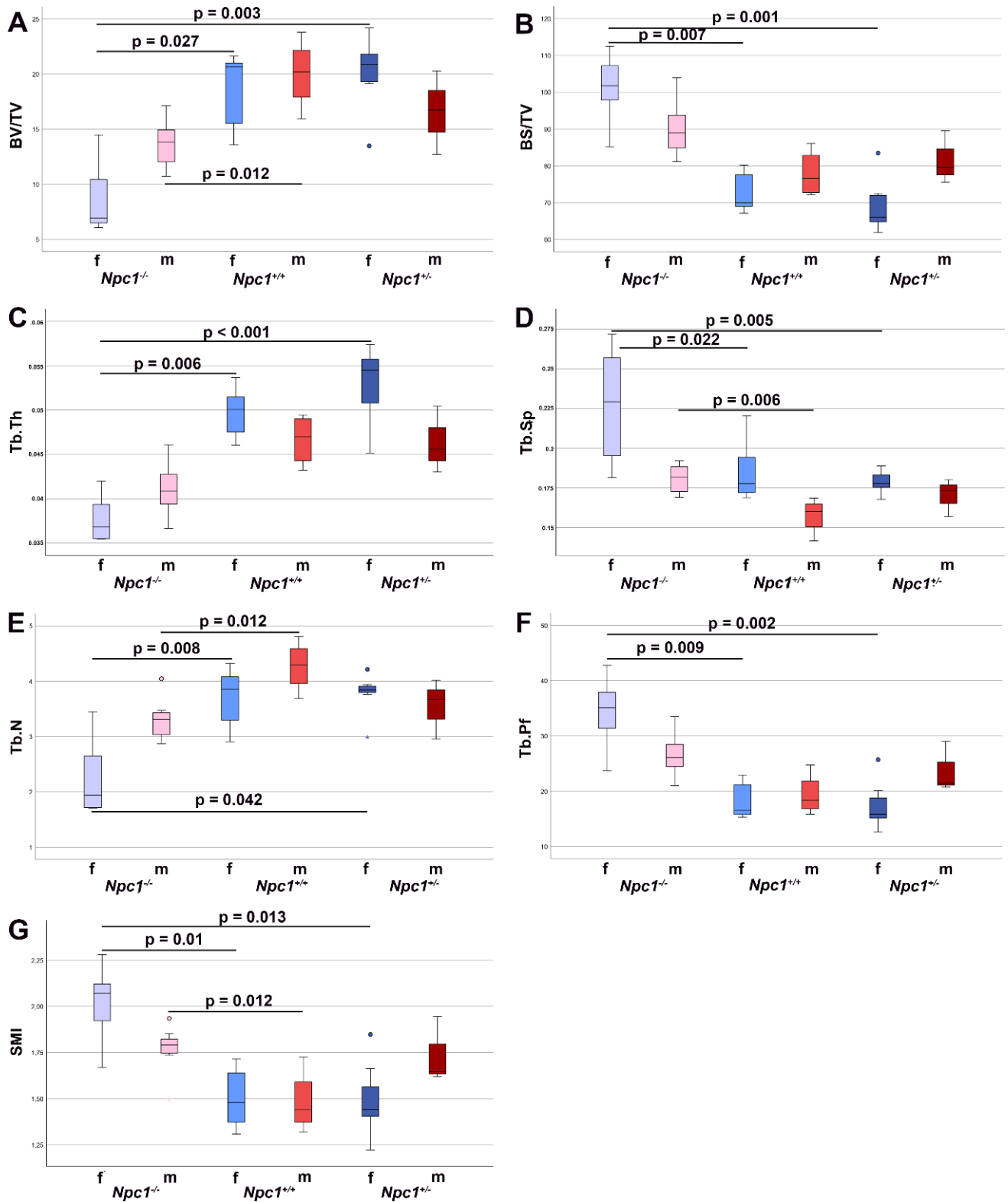


Abbildung 24: Unterschiede im Knochenstatus von $Npc1^{-/-}$ und $Npc1^{+/+}$, sowie heterozygoten Mäusen der Gruppe 1.

Punkte stellen Ausreiser dar.

Verhältnis *bone volume* zu *tissue volume* (BV/TV), *bone surface* zu *bone volume* (BS/BV), *trabecular thickness* (Tb.Th), *trabecular separation* (Tb.Sp), *trabecular number* (Tb.N), *trabecular pattern factor* (Tb.Pf), *structure model index* (SMI), Weiblich (f), Männlich (m).

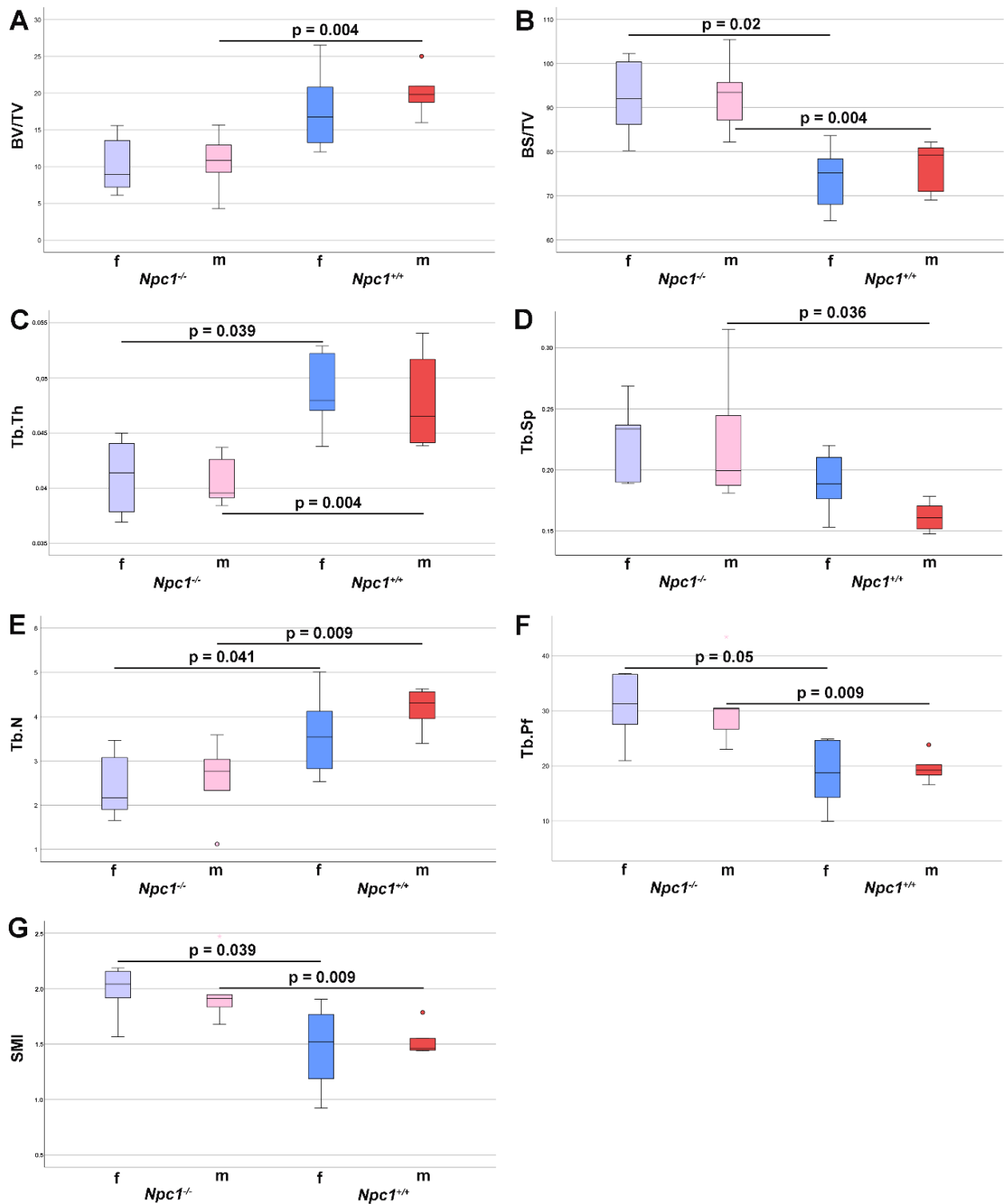


Abbildung 25: Morphometrische Unterschiede zwischen $Npc1^{-/-}$ und $Npc1^{+/+}$ in der scheinbehandelten Gruppe 3 (Sham).

Punkte stellen Ausreiser dar.

Verhältnis *bone volume* zu tissue volume (BV/TV), bone surface zu bone volume (BS/BV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular separation (Tb.Sp), trabecular number (Tb.N), trabecular pattern factor (Tb.Pf), structure model index (SMI), Weiblich (f), Männlich (m).

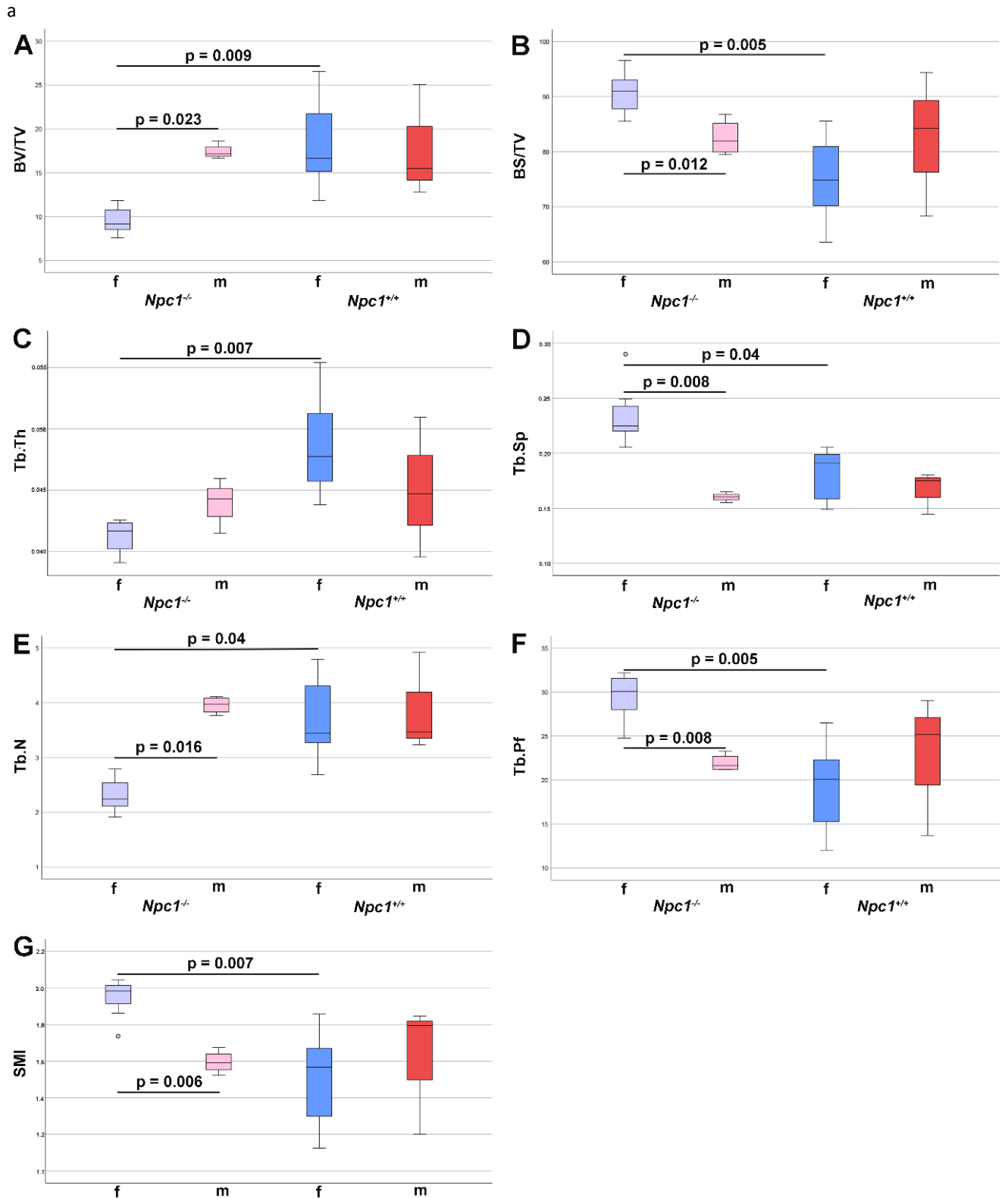


Abbildung 26: Gegenüberstellung der einmalig mit HP β CD behandelten *Npc1*^{-/-}-Mäusen und den nach gleichem Schema behandelten Wildtypen.

Punkte stellen Ausreiser dar.

Verhältnis *bone volume* zu *tissue volume* (BV/TV), *bone surface* zu *bone volume* (BS/BV), *trabecular thickness* (Tb.Th), *trabecular separation* (Tb.Sp), *trabecular number* (Tb.N), *trabecular pattern factor* (Tb.Pf), *structure model index* (SMI), Weiblich (f), Männlich (m).

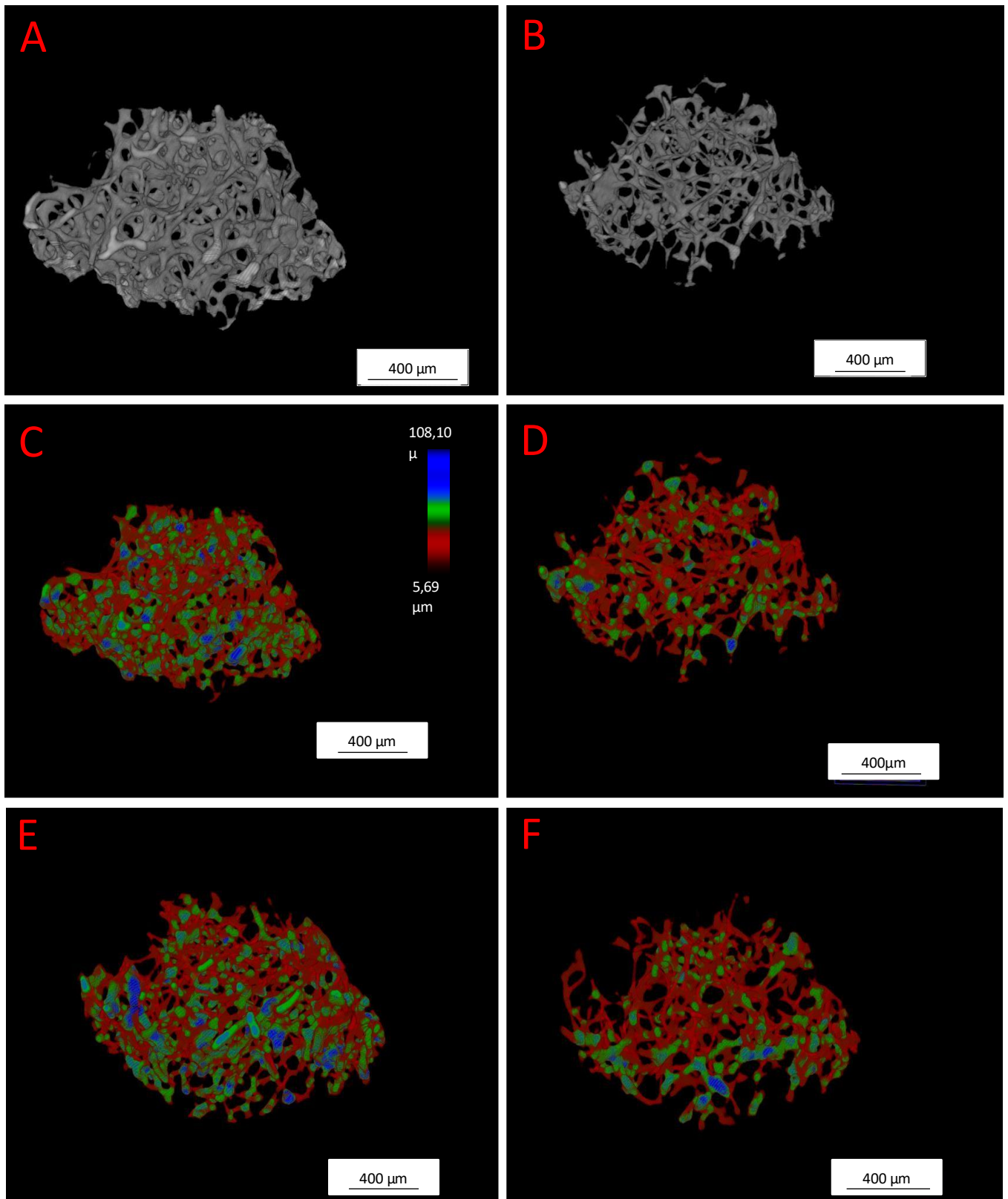


Abbildung 27: Dreidimensionale Knochenarchitektur der *Npc1*^{+/+}- und *Npc1*^{-/-}-Mäuse

(A, C) weibliche, unbehandelte *Npc1*^{+/+}-Maus. (B, D) weibliche, unbehandelte *Npc1*^{-/-}-Maus. (E) weibliche, scheinbehandelte *Npc1*^{+/+}-Maus. (F) weibliche, scheinbehandelte *Npc1*^{+/+}-Maus.

3.4 MOLEKULARBIOLOGIE

Die Proben aus den Wirbelkörpern der 30 beziehungsweise 40-Tage alten Versuchstiere wurden auf die Expression von Cx43, CtsK, ALP und SphK1 untersucht. CtsK wurde in allen Proben exprimiert. Zwischen den Gruppen wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden ($p = 0,72$; Abbildung 28).

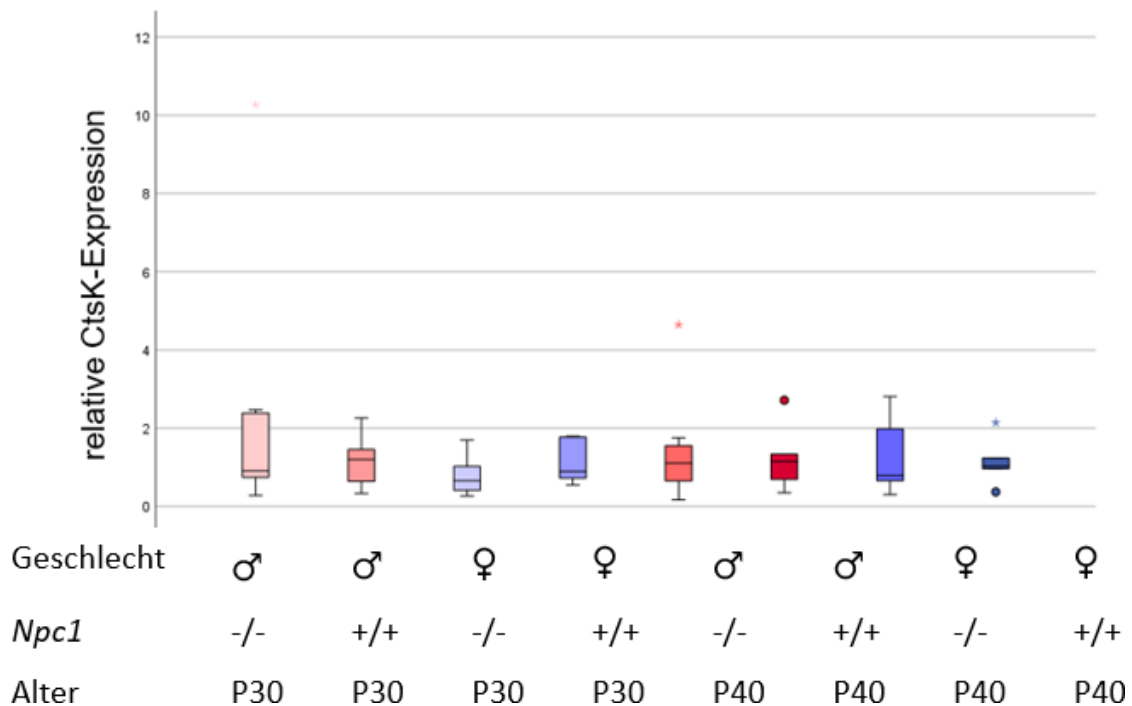


Abbildung 28: relative CtsK-Expression. .

(Px = postnataler Tag x, KO = *Npc1*^{-/-}-Mäuse, WT = *Npc1*^{+/-}-Mäuse, Punkte stehen für Ausreißer)

Eine Cx43 Expression war in jeder untersuchten Probe messbar, allerdings zeigten sich hier ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ($p = 0,988$; Abbildung 29).

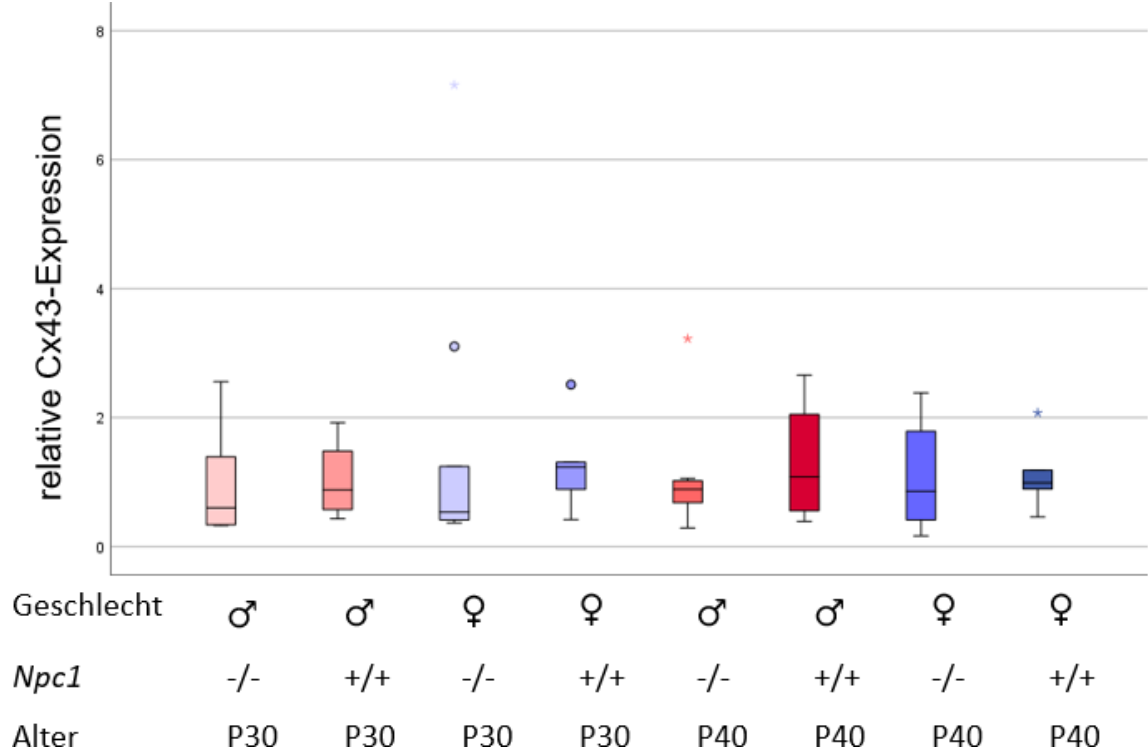


Abbildung 29: relative Cx43-Expression.

(Px = postnataler Tag x, KO= *Npc1*^{-/-}-Mäuse, WT = *Npc1*^{+/-}-Mäuse, Punkte stehen für Ausreißer)

Die relative ALP-Expression war bei den weiblichen *Npc1*^{-/-}-Mäuse signifikant höher als bei den männlichen *Npc1*^{-/-}-Mäusen, sowohl bei den 30-tägigen (p = 0,03; Abbildung 30 A), als auch bei den 40-tägigen Mäusen (p = 0,026; Abbildung 30 B). Bei den *Npc1*^{+/+}-Mäuse wurde kein Unterschied zwischen den Geschlechtern ausgemacht. Auch zeigte der Vergleich der verschiedenen Genotypen, unterschieden nach Geschlecht, keine signifikanten Unterschiede (nicht dargestellt).

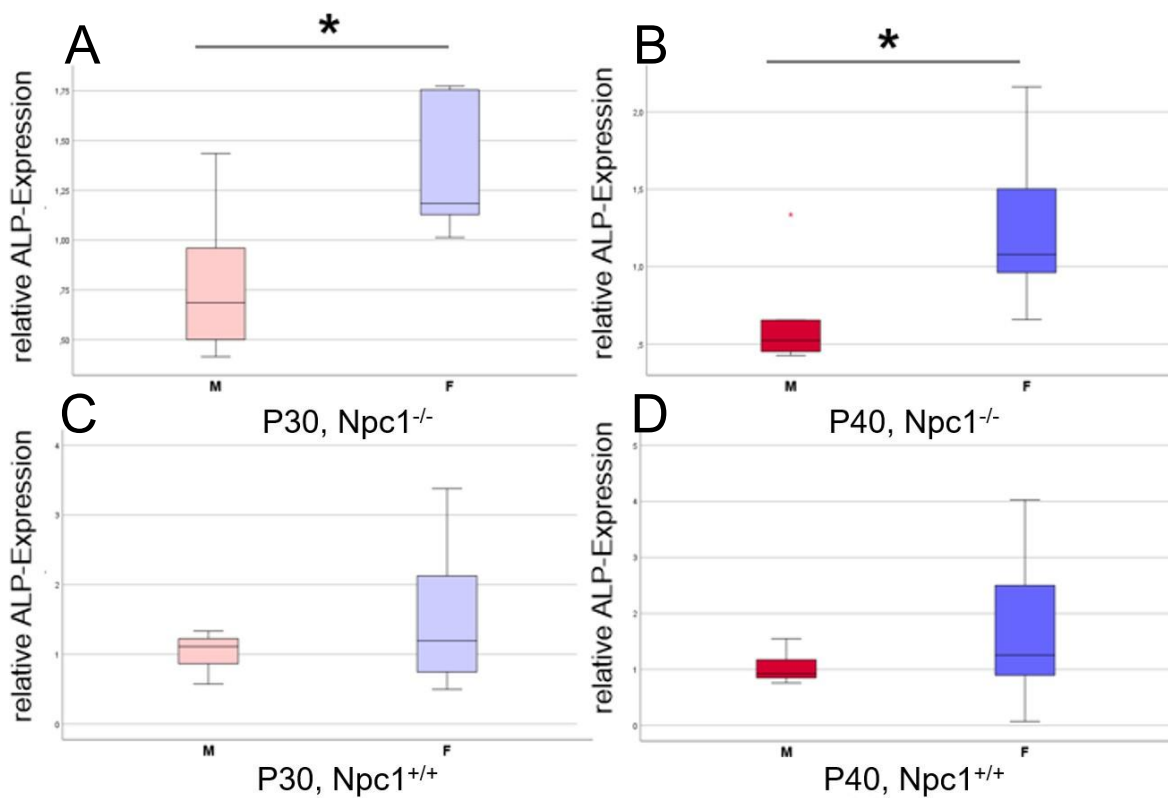


Abbildung 30: relative ALP-Expression.

(M = männlich, F = weiblich, * = p ≤ 0,005, Punkte stehen für Ausreißer)

Bei der Untersuchung der SphK-Expression war am postnatalen Tag 30 die Expression von SphK der weiblichen *Npc1*^{-/-}-Mäusen signifikant erniedrigt im Vergleich zu den männlichen *Npc1*^{-/-}-Mäusen ($p = 0,021$). Bei den *Npc1*^{+/+}-Mäusen deuten die Mittelwerte mit $1,05 \pm 0,14$ bei den männlichen und $0,27 \pm 0,17$ bei den weiblichen Tieren ebenfalls auf einen Unterschied hin. Die statistische Analyse ermittelte mit $p = 0,115$ jedoch keinen signifikanten Unterschied. Die signifikante Reduktion der SphK-Expression an P30 wurde an P40 nicht bestätigt ($p = 0,665$; Abbildung 31). Beim direkten Vergleich der SphK-Expression der weiblichen Mäuse an P30 und P40 wurde ein stark signifikanter Anstieg der Expression bei den *Npc1*^{-/-}-Proben gemessen ($p = 0,01$). Bei den weiblichen *Npc1*^{+/+}-Mäusen war kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen ($p = 0,096$; Abbildung 32). Beim Vergleich der männlichen Mäuse zeigte sich kein Unterschied (nicht dargestellt).

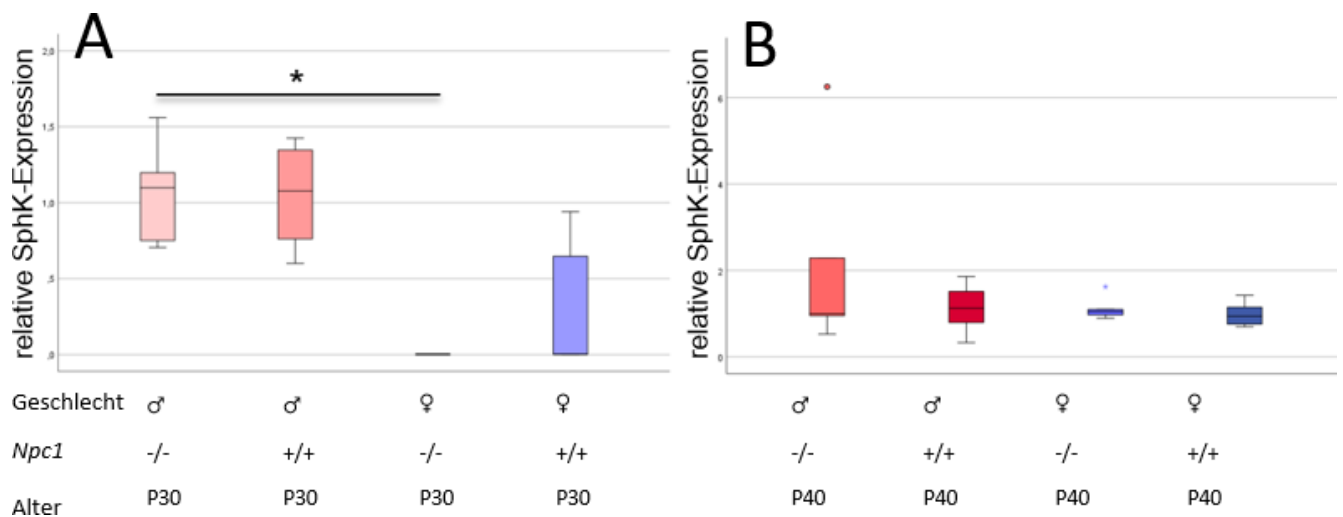


Abbildung 31: relative SphK-Expression.

(KO= *Npc1*^{-/-}-Mäuse, WT = *Npc1*^{+/+}-Mäuse, * = $p < 0,005$, Punkte stehen für Ausreißer)

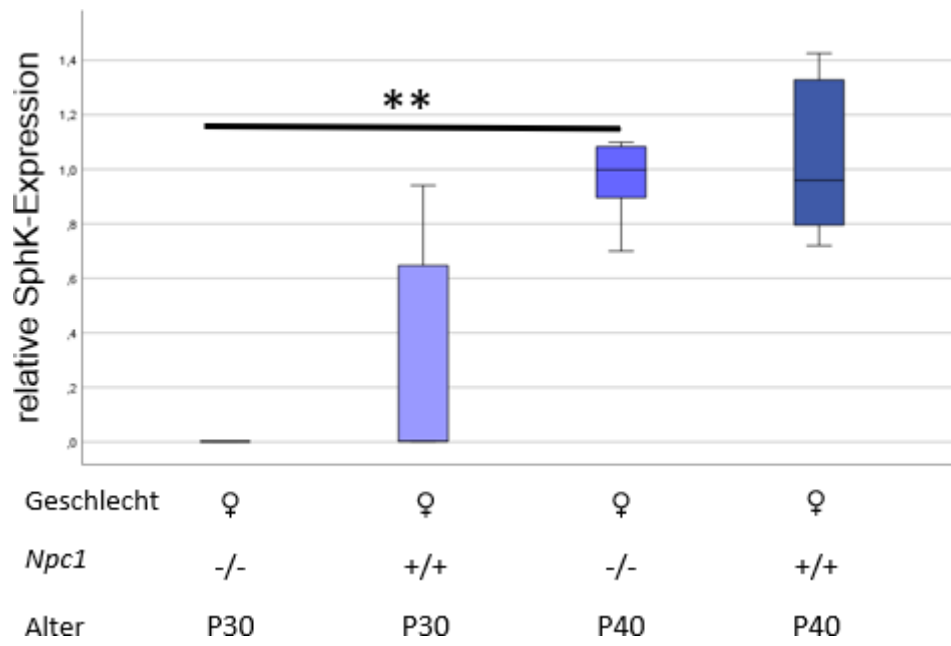


Abbildung 32: SphK-Genexpression

(KO= *Npc1*^{-/-}-Mäuse, WT = *Npc1*^{+/-}-Mäuse, ** = $p \leq 0,001$)

3.5 PATIENTENUMFRAGE

Ergänzend zu der experimentellen Untersuchung wurde eine Umfrage bei NPC-Patienten durchgeführt, die von der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen genehmigt wurde (AZ 234/21). Es wurden 6 Patienten, davon 4 männliche und 2 weibliche, befragt. Zwei der männlichen Patienten waren Brüder. Die Altersspanne lag bei 7 bis 38 Jahren. Die Spanne des Symptombeginns lag bei 2 Jahren bis ca. Mitte 20. Die Symptome wurden vielfältig abgefragt. Unter anderem Organmanifestationen wie eine vergrößerte Milz oder Leber, Lähmungen sowie eine Gelbsucht nach Geburt. Aber auch psychiatrische Symptome der Krankheit wurden einbezogen wie Verhaltensstörungen, intellektuelle Behinderung oder Psychosen. Die vollständige Symptomliste ist dem erstellten Symptomkatalog zu entnehmen (siehe Anhang 9.1). In der Patientengruppe traten keine weiteren Begleiterkrankungen auf. Allerdings litten drei der Betroffenen unter chronischer Diarrhö. Davon gaben zwei an, dass es sich bei der Diarrhö um eine Nebenwirkung des Miglustat® handelt. Alle Patienten nahmen Miglustat® ein, vier Patienten supplementierten Vitamin D, außerdem nahmen vier Patienten Arimoclomol und zwei Patienten regelmäßig Opiate ein. Arimoclomol (Miplyffa®) ist ein 2024 von der FDA zugelassenes Medikament und als Kombinationstherapie mit Miglustat indiziert zur Behandlung der neurologischen Manifestationen des NPC [136].

Die Symptome der Patienten waren recht unterschiedlich. Die zwei verwandten Patienten litten an zwei (Störung der Bewegungskoordination, intellektuelle Behinderung), beziehungsweise vier Symptomen (Hepato-, Splenomegalie, Kataplexie, supranukleäre Blickparese). Die anderen Betroffenen gaben sechs (verzögerte motorische Entwicklung, Splenomegalie, Störung der Bewegungskoordination, supranukleäre Blickparese, Muskelhypotonien, intellektuelle Behinderung), acht (Hepato-, Splenomegalie, supranukleäre Blickparese, intellektuelle Behinderung, Psychosen, progrediente Demenz, Epilepsie), elf (verzögerte motorische Entwicklung, Splenomegalie, Störung der Bewegungskoordination, supranukleäre Blickparesen, Muskelhypotonien, intellektuelle Behinderung, Verhaltensstörungen, Krampfanfälle, Kataplexien, progrediente Demenz, Epilepsie) und 14 (Alle der Abgefragten) plus Schluckstörungen an. Der Patient mit voll ausgeprägter Symptomatik beschrieb in seinem Fragebogen einen schweren Krankheitsverlauf.

In der Kontrollgruppe gab es keine Person, die an einer Vorerkrankung litt. Auch nahm kein Teilnehmer regelmäßig Medikamente zu sich. Eine der befragten Personen aus der Kontrollgruppe war Raucher.

Die Auswertung (Tabelle 12) ergibt, dass es zu mehr Knochenbrüchen im Patientenkollektiv (6) als in der Kontrollgruppe (3) kam. Dabei ist zu beachten, dass die Unfälle, in Folge derer es zu den Verletzungen kam, bei den Erkrankten energetisch vergleichsweise sehr niedrig waren. Bei der Kontrollgruppe hingegen waren zwei Knochenbrüche Folge eines Vollkontaktsports. In der Patientengruppe kam es bei einer der Frakturen zu einer Frakturheilungsstörung. Eine Person in der Patientengruppe klagte über generalisierte Knochen- und Gelenkschmerzen. Drei Patienten litten unter einer eingeschränkten Gehfähigkeit. Diese drei Patienten gaben dabei auch an, dass sie an einer Muskelhypotonie leiden. Die teilnehmende Person, die an generalisierten Knochen- und Gelenkschmerzen litt, gab allein fünf Frakturen an. Diese Person war auch mit 14/14 Symptomen plus einem weiteren angegebenen Symptom aus dem betrachteten Kollektiv am schwersten betroffen. In der Kontrollgruppe gab kein Teilnehmer an, dass generalisierte Knochen- und Gelenkschmerzen vorlägen. Ebenso subventionierte niemand Vitamin D. Frakturheilungsstörungen wurden ebenfalls nicht beschrieben.

Tabelle 12: Auswertung der Patientenumfrage.

	Patientengruppe	Kontrollgruppe
Personen mit Knochenbrüchen	2	3
Anzahl Knochenbrüche (davon Unfallfolge) (Frakturheilungsstörung)	6 (5)(1)	3(3)(0) Davon zwei Kampfsportler
Generalisierte Knochenschmerzen	1	0
Eingeschränkte Gehfähigkeit	3	0
Generalisierte Gelenkschmerzen	1	0
Vitamin D Mangel oder Subvention	4	/

4 DISKUSSION

Das Ziel der Arbeit war es, Erkenntnisse über die Knochenqualität von *Npc1*^{-/-}-Mäusen im Vergleich mit ihren korrespondierenden *Npc1*^{+/+}-Mäusen zu gewinnen. Des Weiteren sollte der Knochenstatus von medikamentös behandelten *Npc1*^{-/-}-Mäusen vergleichend untersucht werden und die Fragestellung beantwortet werden, ob eine heterozygote *Npc1*-Mutation den Knochenstatus beeinflusst. Das Fundament dieser Studie bildeten histologische, histomorphometrische und μ CT-Untersuchungen. Diese wurden an murinen Femora durchgeführt. Hierfür wurden die Mäuse im Alter von 65 Tagen euthanasiert. Ergänzt wurden die Ergebnisse des Mausmodells von *real-time* RT-PCR Untersuchungen an 30 und 40 Tage alten Mäusen, um die Funktion und Aktivität der Knochenzellen auf Genexpressionsebene genauer zu definieren und Veränderungen in der Entwicklung vergleichend zu erfassen. Des Weiteren wurde eine Umfrage bei NPC-Betroffenen durchgeführt, um den Knochenstatus bei Menschen zu evaluieren.

4.1 KNOCHENSTATUS BEI MORBUS NIEMANN-PICK TYP C

4.1.1 Interpretation der histologischen und histomorphometrischen Untersuchung

Die Ergebnisse der histomorphometrischen Untersuchungen lassen erstmalig Aussagen über den Knochenstatus im murinen Modell bei NPC zu. Die *Npc1*^{-/-}-Mäuse besaßen im Gesamten eine signifikant kleinere, relative Knochenfläche als ihre pendanten *Npc1*^{+/+}-Mäuse, wobei die Unterschiede bei den weiblichen Mäusen größer waren als bei den männlichen Mäusen. Bei den medikamentös behandelten *Npc1*^{-/-}-Mäusen zeigte sich kein Unterschied. Interessanterweise war die relative Knochenfläche der *Npc1*^{-/-}-Mäuse in der ohne Wirkstoff behandelten *Sham* Gruppe ebenfalls signifikant schlechter als die der *Npc1*^{-/-}-Mäuse. In der, zur Ausschaltung des limitierenden Faktors der Präparatequalität, durchgeführten ANOVA-Analyse zeigten sich bei den männlichen *Npc1*^{-/-}-Mäusen keine signifikanten Unterschiede in allen Gruppen. Allerdings war das Konfidenzintervall nur sehr knapp überlappend bei den unbehandelten Tieren. Spannenderweise zeigten die weiblichen *Npc1*^{-/-}-Mäuse hier in allen Gruppen stark signifikant reduzierte Trabekelflächen. Bei der relativen Knochenoberfläche zeigten sich keine Unterschiede. Diese Er-

gebnisse werden gestützt von der verblindeten histologischen Untersuchung der Knochenschnitte. Diese zeigte bei einem Teil der *Npc1*^{-/-}-Mäuse eine Dickenabnahme der Trabekel und eine diskonnektierte Trabekelstruktur. Wobei die Trabekelanzahl und der Umfang der Trabekel gleich geblieben zu sein schien. Es fiel auch die starke Divergenz innerhalb der einzelnen Gruppen auf. Vor allem bei den *Npc1*^{-/-}-Mäusen häuften sich die Präparate mit einem schlechten Knochenstatus, in folgender Abbildung nochmals beispielhaft binarisiert und hervorgehoben dargestellt, um die Diskussion anschaulich zu illustrieren (Abbildung 33).

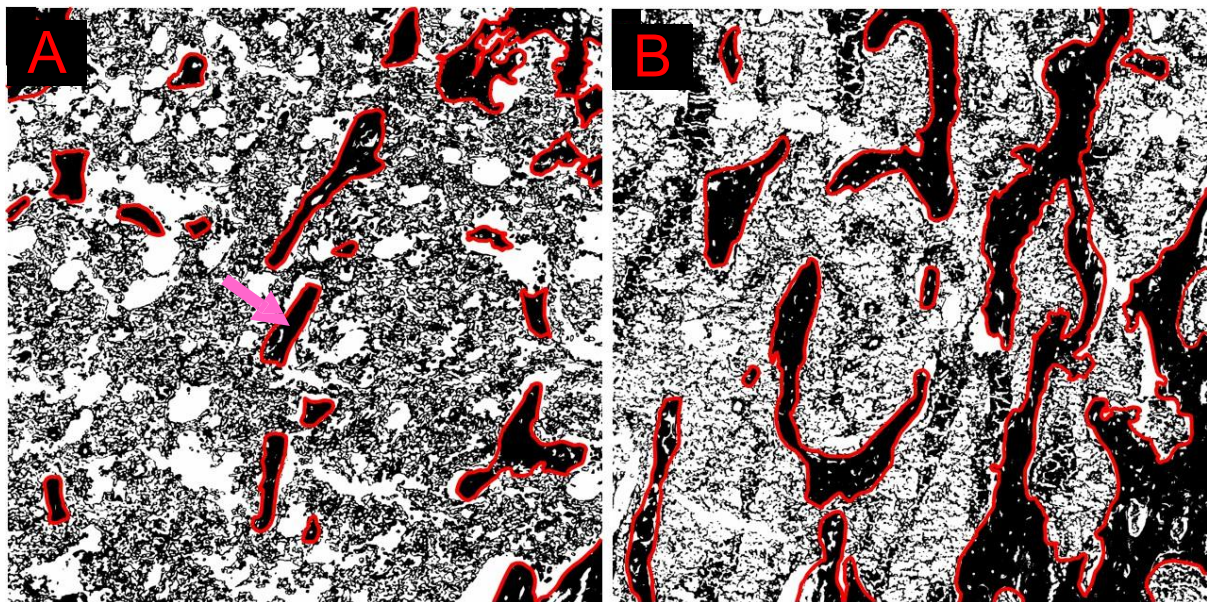


Abbildung 33: Binary mit hervorgehobenen Trabekeln.

((A) weibliche *Npc1*^{-/-}-Maus; (B) weibliche *Npc1*^{+/+} -Maus; Trabekel (pinker Pfeil) in Rot umrandet)

Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Defekt im *Npc1*-Protein den Knochenstatus beeinflusst. Allerdings lassen sich keine klaren Aussagen dazu treffen, ob die Sphingolipidakkumulation im Knochen selbst Ursache für die Verschlechterung des Knochenstatus ist. Das liegt an der Komplexität der Erkrankung, die durch ihre Symptomatik Einflussfaktoren mit sich bringt, die in der Kontrollgruppe nicht nachgestellt werden können. So zeigten frühere Untersuchungen, dass gerade *Npc1*^{-/-}-Mäuse aus der *NONE*- und *Sham*-Gruppe beider Geschlechter in den Punkten motorische Koordination, Gleichgewicht und Ataxie deutlich schlechter abschnitten als die restlichen Gruppen [137]. Interessant ist, dass weibliche *Npc1*^{-/-}-Mäuse ihre motorischen Fähigkeiten länger bewahren konnten,

als die männlichen *Npc1*^{-/-}-Mäuse [138]. Da sich Bewegung positiv auf den Knochenstatus auswirkt, spricht diese Erkenntnis dafür, dass die fehlende Bewegung der *Npc1*^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen nicht die alleinige Ursache für die Verschlechterung des Knochenstatus der Tiere sein kann. Weitere mögliche Einflussfaktoren sind zum Beispiel Sexualhormone oder die Folgen der Schädigung von Organen durch die Krankheit. Spannend ist zudem, dass die Knochenqualität innerhalb der Untergruppen zu schwanken scheint. Als Ursache hierfür kommt eine Diskrepanz in der Qualität der Präparate infrage. Allerdings beschrieben Morris et al. (1982) in ihren Beobachtungen zu den BALB/cNctr-NPC1m1N/-J Mäusen, dass die Symptome in unterschiedlichen Zeiträumen während des Wachstums auftreten und sich ab Beginn fortschreitend entwickeln. Es kommt zum vorzeitigen Tod der Mäuse im Alter zwischen 80 und 120 Tagen [139]. Alle untersuchten Mäuse wurden am 65. Tag nach der Geburt euthanasiert. Das bedeutet, dass trotz identischer genetischer Grundlagen der Mäuse eine erhebliche Varianz in der Krankheitsausprägung am Tag der Tötung wahrscheinlich ist. Weitere Untersuchungen zeigten, dass genetische Drifts das Sterbealter und auch die Leberbeteiligung beeinflussen [140]. Zudem wurde beispielsweise in Untersuchungen an anderen Sphingolipidosen wie dem Morbus Gaucher ebenfalls beobachtet, dass trotz gleicher genetischer Grundlage die Knochenbeteiligung weit gefächert auftreten kann [141].

Zu beachten ist ebenfalls, dass die Mäuse mit 65 Tagen ihr Knochenwachstum noch nicht abgeschlossen haben. Das Längenwachstum der Knochen endet typischerweise zwischen der 12. und 14. Lebenswoche, wenn die Epiphysenfugen verknöchern und keine weitere Verlängerung der Knochen mehr möglich ist. Zu diesem Zeitpunkt erreicht die Knochenmasse ihre maximale Dichte, und das Skelettwachstum der Tiere gilt als abgeschlossen [142]. Die hohe Varianz der vermessenen Proben könnte also ebenfalls darauf zurückzuführen sein, dass die verwendeten Versuchstiere ihr Knochenwachstum noch nicht vollständig abgeschlossen hatten, was die Ergebnisse möglicherweise beeinflusst hat.

Antipova et al. (2022) haben in dem hier verwendeten Modell gezeigt, dass die Femora un behandelter *Npc1*^{-/-}-Mäuse signifikant kürzer waren als die der *Npc1*^{+/-}-Mäuse. Bei weiblichen *Npc1*^{-/-}-Mutanten wurden ebenfalls signifikant kürzere Femora in den medikamentös behandelten Gruppen beobachtet, während bei behandelten männlichen Tieren kein signifikanter Unterschied festzustellen war.

Obwohl eine Korrelation zwischen diesen statistisch signifikanten Unterschieden und unseren Messungen erkennbar ist, liefert die Femurlänge keine Informationen über die Qualität des trabekulären Knochens. Antipova et al. berichtete, dass die Femurlängen

der vier unbehandelten Gruppen (None) in der gleichen absteigenden Reihenfolge wie das jeweilige Körpergewicht folgten: männliche *Npc1^{+/-}*-Mäuse, weibliche *Npc1^{+/-}*-Mäuse, männliche *Npc1^{-/-}*-Mäuse und weibliche *Npc1^{-/-}*-Mäuse. Dies deutet darauf hin, dass die Femurlänge primär durch das Körpergewicht bestimmt wird und keine Rückschlüsse auf die Knochenqualität erlaubt.

Um alle genannten Einflussfaktoren auf die Ergebnisse auszuschalten, wäre es nötig Untersuchungen mit sehr großen Tierzahlen in allen Gruppen durchzuführen.

Bei den immunhistochemischen Untersuchungen wurden Femora der *Npc1^{+/-}*-, *Npc1^{-/-}*- und *Npc1^{+/-}*-Mäuse der Gruppe *NONE* mit dem ASMA-Antikörper untersucht. Der ASMA-Antikörper reagiert spezifisch mit Aktinfilamenten der glatten Muskulatur, den Myofibroblasten und den Myoepithelzellen. Dies ermöglicht es, in den Knochenschnitten die glatte Muskulatur der Gefäßwände anzufärben und anschließend zu untersuchen. Limitierend ist dabei, dass kleinere Gefäße, welche lediglich aus einer Endothelzellschicht bestehen, nicht angefärbt werden [143]. Die lichtmikroskopische Untersuchung der mit dem ASMA-Antikörper gefärbten Präparate sprechen dafür, dass die Vaskularisierung des Knochens bei *Npc1^{-/-}*-Mäusen eingeschränkt ist. Dies kann eine weitere Ursache für den verschlechterten Knochenstatus der Tiere sein. Von Lee et al. (2014) wurde gezeigt, dass niedrige VEGF-Spiegel ursächlich für Einschränkung der SphK sind [132]. VEGF reguliert allerdings nicht nur die SphK, sondern auch mehrere Kinasen und lenkt damit die Angiogenese und Vaskulogenese [144]. In einem murinen Modell wurde bereits gezeigt, dass eine Hemmung des VEGF sich ebenfalls auf den Knochen auswirkt. Eine anti-VEGF Behandlung führte zu einer verringerten Durchblutung und ebenfalls zu einer verringerten Knochenfestigkeit. Allerdings waren die Knochendichte, sowie das Knochenvolumen im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert [145]. Das legt die Vermutung nahe, dass die niedrigen VEGF-Spiegel bei den *Npc1^{-/-}*-Mäusen zu der beobachteten Verminderung der Knochenvaskularisierung geführt haben könnten. Auch ein Einfluss der Vaskularisierung auf den Knochenstatus der Tiere ist wahrscheinlich. Allerdings ist der erniedrigte VEGF-Spiegel als alleinige Ursache für den krankhaften Knochenstatus der *Npc1^{-/-}*-Mäuse, vor allem bei den weiblichen Tieren, unwahrscheinlich, da die beobachteten und gemessenen Veränderung wesentlich gravierender sind als die der anti-VEGF behandelten Mäuse.

4.1.2 Interpretation der μ CT-Ergebnisse

Um die Ergebnisse der histologischen Untersuchung zu verifizieren und um diese mit densitometrischen Messwerten des Knochens zu erweitern, wurde die Methode des μ CTs angewendet. Hierdurch lässt sich noch spezifischer der Einfluss des NPC, sowie der mögliche Einfluss der angewendeten Medikation untersuchen.

Der Vergleich der nichtbehandelten Gruppe 1 *Npc1^{+/+}*- mit *Npc1^{-/-}*-Tieren bestätigte die bereits gewonnenen Ergebnisse der histomorphometrischen Untersuchung. Bei beiden Geschlechtern zeigte sich ein verringertes Knochenvolumen bezogen auf das Gewesvolumen. Dies deutet auf eine weniger dichte und instabilere Knochenstruktur hin. Zudem stieg bei den weiblichen Tieren die BS/TV. Höhere Werte sprechen für eine erhöhte Porosität des Knochengewebes. Dies bestätigt sich in den erniedrigt gemessenen Tb.Th-Werten der Weibchen, welche die Annahme zulassen, die Knochen seien deutlich zerbrechlicher und anfälliger für Frakturen. Auch die Separierung der Trabekel (Tb.Sp) ist deutlich gestiegen, was auf größere Lücken zwischen den Trabekeln oder Hohlräume schließen lässt. Die Tb.N hingegen sank bei beiden Geschlechtern. Die Tb.N gibt die Anzahl der Knochenbälkchen pro Länge an. Ein erniedrigter Wert bedeutet eine geringere Anzahl von Trabekel pro Volumeneinheit, was auf eine porösere und instabilere Knochenstruktur hinweist. Auch der gestiegene Tb.Pf-Wert deutet auf eine fragmentierte und weniger verbundene Struktur hin. Dies bestätigt auch der als gestiegen gemessene SMI, welcher auf eine plättchenartige Struktur hinweist, welche vor allem bei kranken Knochen zu finden ist (12, 118). Auch die scheinhandelte *Sham*-Gruppe schloss sich den bei der unbehandelten Gruppe 1 gemachten Beobachtungen an. Nur die BV/TV und die Tb.Sp bei den *Npc1^{-/-}*-Weibchen zeigte sich hier nicht gleichermaßen signifikant verändert. Ebenso zeigten die weiblichen Tiere der Gruppe 6 in jedem Parameter signifikante Veränderungen, die die Interpretation eines deutlich negativ beeinflussten Knochenstatus zulassen, wohingegen bei den männlichen Tieren dieser Gruppe keine Unterschiede ausgemacht werden konnten. Die aufgetretenen Geschlechtsunterschiede sowie den Einfluss der Medikation werden in den Kapiteln 4.2 und 4.3 diskutiert.

Am Mausmodell ist bereits bei seniler Osteoporose im μ CT ein Anstieg der Werte Tb.Pf und SMI beobachtet worden [146, 147]. Auch eine Reduktion von BV/TV sowie der Tb.N sind typische Merkmale einer osteoporotischen Knochenstruktur [148]. Die Ergebnisse der μ CT-Untersuchung sprechen dafür, dass NPC die Knochenstruktur negativ beein-

flusst und zudem einer Osteoporose ähnliche Strukturveränderungen im Knochen verursacht. Ähnliche Veränderungen der gemessenen Werte konnte die Forschungsgruppe Shim et al. [2022] auch bei Alterungsprozessen der Knochen beobachten [149].

All diese Werte deuten insgesamt auf einen negativen Einfluss auf die Knochen durch eine Mutation des *Npc1*-Gens hin.

Limitierend ist bei der Interpretation der Messungen für die Mineraldichte zu erwähnen, dass das μ CT in Bezug auf Genauigkeit der Knochen- und Gewebedichte Einschränkungen aufweist. Obwohl die μ CT im Vergleich zu herkömmlichen Methoden wie der Mikroradiographie eine schnelle und zerstörungsfreie Technik zur Beurteilung der Knochenmineralisierung darstellt, ist sie anfällig für Artefakte. Diese können unter anderem durch Scan-Parameter, Strahlhärtung, Teilvolumeneffekte, Photonenmangel, Photonenstreuung und unzureichende Probenahme entstehen [134, 150, 151].

4.1.3 Interpretation der Umfrageergebnisse

Ergänzend zu den Untersuchungen im murinen Modell zeigte die Untersuchung des Knochenstatus bei menschlichen NPC-Erkrankten ebenfalls eine Tendenz zur Knochenbeteiligung, wobei aufgrund der geringen Teilnehmerzahl keine statistischen Untermauerungen dieser Aussage möglich waren. Zudem kommt limitierend dazu, dass alle Patienten Miglustat® und weitere Medikamente einnahmen. Dennoch stehen diese Beobachtungen komplementär zu anderen Untersuchungen des menschlichen Knochenstatus bei anderen Sphingolipidosen. Wie zum Beispiel in der bereits zitierten Untersuchung von Wasserstein et al. [2013], die eine Skelettbeteiligung als häufige, zuvor nicht erkannte Manifestation von NPB publizierte [64]. Allerdings ist zu beachten, dass die generelle klinische Präsentation von NPC sich von der von NPA und NPB unterscheidet. NPC zeigt sich klinisch in vielen verschiedenen Phänotypen. Diese weite Variabilität in Symptomatik und *Onset* der Krankheit spiegelt sich in den Untersuchungen dieser Arbeit wider. Die meisten der Teilnehmer sind klinisch tendenziell als leichter betroffen einzustufen. Ein schwer erkrankter Teilnehmer gab allerdings an, dass der Knochenstatus sein Krankheitsbild klinisch mitprägt.

Andere Sphingolipidosen beeinflussen ebenfalls den Knochenstatus. Bei Morbus Gaucher ist die Beteiligung des Skeletts eines der am häufigsten vorkommenden Merkmale

und prägt sogar meist das Krankheitsbild [152]. Bei der, als einzige x-chromosomal vererbten, Sphingolipidose Morbus Fabry kommt es im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung häufiger zu Osteopenien und Osteoporose. Dabei sind Männer mit der Fabry-Krankheit häufiger betroffen [153, 154]. Bei der Sphingolipidose GM1-Gangliosidose treten ebenfalls variable Skeletterkrankungen auf. Neben Skelettanomalien, vor allem der Wirbelkörper, zeigt sich bei Betroffenen ebenfalls eine verringerte Knochendichte. Je nach Subtyp besitzen die Erkrankten allerdings einen anderen Knochenstatus. So lassen sich spät-infantile und juvenile Patienten radiologisch zuordnen [59]. Ebenfalls bei GM2-Gangliosidosen wie dem Morbus Sandhoff-Jatzkewitz werden Beeinträchtigungen des Skelettsystems beschrieben. Aufgrund der Seltenheit und der frühen Sterblichkeit sind die Auswirkungen beim Menschen wenig erforscht, allerdings zeigen Katzen mit Morbus Sandhoff-Jatzkewitz in einer Untersuchung eine signifikante Reduktion des trabekulären Knochens in der Metaphyse und eine abnorme Form und Größe der Epiphysen [155].

Zu beachten ist, dass alle genannten Krankheiten sich als Systemerkrankungen auch durch neurologische und motorische Beteiligungen auszeichnen, weshalb diese als Einflussfaktoren auf den Knochenstatus berücksichtigt werden müssen. Des Weiteren weisen Sphingolipidosen als gemeinsames Symptom auch eine Veränderung der Niere und Leber auf, welche ebenfalls einen Einfluss auf die Knochenmorphologie haben kann. Allerdings zeigen diese Untersuchungen kumuliert, dass Sphingolipidosen in unterschiedlichem Ausmaß den Knochenstatus beeinträchtigen. Spannenderweise scheint es keine Abhängigkeit zu dem krankheitsauslösenden, defekten Protein oder Enzym zu geben, da diese sich bei den genannten Krankheiten unterscheiden (Abbildung 34). So akkumulieren beispielweise bei einem Verlust der NPC1-Funktion in Neuronen GM2- und GM3-Ganglioside [156]. Zudem wurde berichtet, dass die Sphingomyelinase und die Glukocerebrosidase bei *Npc1*^{-/-}-Mäusen in ihrer Aktivität vermindert sind [157]. Des Weiteren reichern sich Sphingosin [126], Sphingomyelin [158], Glykosphingolipide [159], sowie Cholesterin an [83]. In weiteren Forschungen wäre es wichtig, die genaue Auswirkung der einzelnen akkumulierten Substanzen auf den Knochenstatus zu untersuchen, auch um mögliche Störfaktoren zu eliminieren.

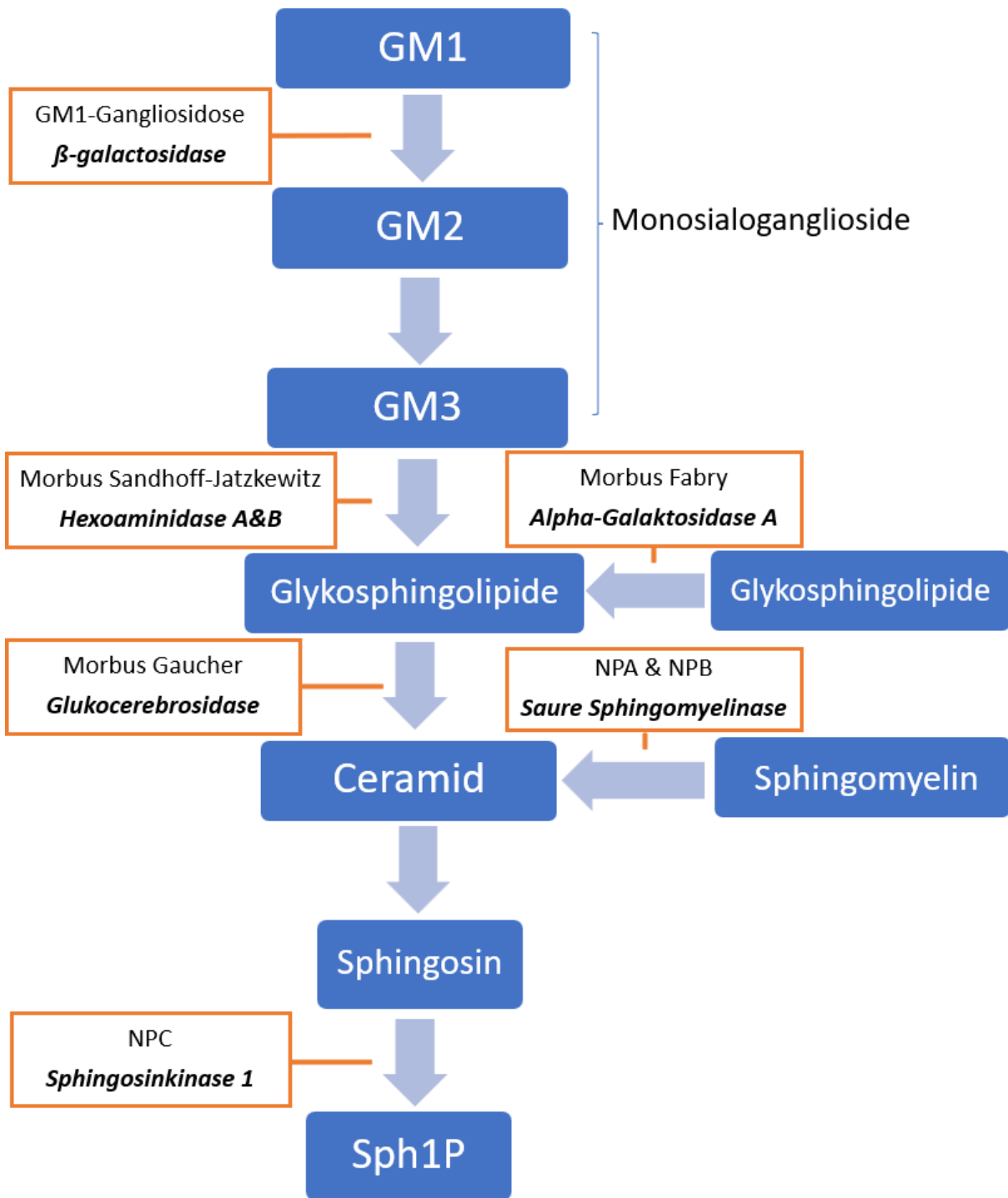


Abbildung 34: Stoffwechselweg der Sphingolipidosen.

(Eigenentwurf modifiziert nach Giulia et al. [2016] [160]) Sphingolipidosen mit beeinträchtigtem Knochenstatus sowie dem dafür verantwortlichen Enzym. Aus Gründen der Überschaubarkeit wurden Substrate der verschiedenen Enzyme vereinfacht beschrieben. (NPA = Morbus Niemann Pick Typ A, NPB = Morbus Niemann Pick Typ B, NPC = Morbus Niemann Pick Typ C)

4.2 EINFLUSS DER MEDIKAMENTÖSEN BEHANDLUNG AUF DEN KNOCHEN-STATUS

Während Miglustat® schon seit 2009 beim Menschen zur Behandlung des Morbus NPC eingesetzt wird, sind die anderen Behandlungsstrategien noch Teil der Forschung. Beim Menschen ermöglicht die Miglustat® Einnahme eine Verlangsamung der Progredienz der Erkrankung. Des Weiteren verbessern sich die Krankheitssymptome, unter anderem die Schluckfähigkeit und die Gehfähigkeit [112]. Bei BALB/cNctr-NPC1m1N/-J-Mäusen zeigt Miglustat® ebenfalls positive Effekte auf den Verlauf der Krankheit. Aber auch die Behandlung mit HPβCD bringt Erfolge [117–119, 137]. Die Forschungsgruppe Holzmann et. al. [2021], welche die Effekte der Behandlung auf die hier verwendeten Mäuse publizierte, beschrieb die therapeutischen Effekte in den hier untersuchten Behandlungsgruppen [137]. Dabei wurde das Körpergewicht als Indikator für den Verlauf der Krankheit verwendet. Es zeigte sich, dass alle mit Medikamenten behandelten Gruppen von *Npc1*^{-/-}-Mäusen ein höheres Körpergewicht aufwiesen als die Tiere der *NONE*- oder *Sham*-Gruppe. Es fiel auf, dass weiblichen *Npc1*^{-/-}-Mäusen ein größerer therapeutischer Nutzen der Therapie zukommt als männlichen *Npc1*^{-/-}-Mäusen (67). Bei den in dieser Arbeit untersuchten Tiere hatte die medikamentöse Behandlung einen positiven Effekt auf den Knochenstatus (Abbildung 14). Es zeigte sich, dass die relative Knochenfläche der *Npc1*^{-/-}-Mäuse in der *NONE* und *Sham* Gruppe signifikant schlechter ist als die der *Npc1*^{+/+}-Mäuse. In den medikamentös behandelten Gruppen COMBI, HPβCD und MIGLU fiel kein Unterschied zwischen *Npc1*^{+/+}- und *Npc1*^{-/-}-Mäusen auf. Dies bestätigte sich auch in der μ-CT Untersuchung. Der negative Einfluss des NPC auf BV/TV, BS/TV, Tb.Sp, Tb.N, Tb.Pf und SMI ließ sich durch Miglustat® vollständig aufheben. Auch die HPβCD behandelten Mäuse zeigten lediglich in der weiblichen Kohorte eine Verschlechterung der Tb.Th. Alle anderen gemessenen Werte waren unter dieser Behandlung stabil. Die HPβCDx Mäuse zeigten einen deutlichen Geschlechtsdimorphismus, auf welchen in Kapitel 4.3 eingegangen wird.

In der ANOVA-Analyse wurde die relative Knochenfläche in Abhängigkeit von Geschlecht und Behandlungsgruppe betrachtet und die Qualität des Präparates als Konfounder berücksichtigt. Hier zeigte sich, dass die BAr.TAr der weiblichen KO-Mäuse in allen Gruppen signifikant verringert war im Gegensatz zu der der WT-Mäuse in der gleichen Gruppe. Bei den männlichen Mäusen gab es hier keine signifikanten Unterschiede. Allerdings überlappte das Konfidenzintervall der Gruppe *NONE* nur sehr knapp. Das

spricht dafür, dass der Einfluss des *Npc1* Defekts sich, je nach Geschlecht des Tieres, unterschiedlich auf den Knochen auswirkt. Männliche *Npc1*^{-/-}-Mäuse scheinen einen besseren Knochenstatus aufrecht erhalten zu können als ihre weiblichen Pendanten. Es ist bereits bekannt, dass Miglustat® bei der Gaucher Krankheit Knochenschmerzen reduziert und die TMD verbessern kann [161, 162]. Die hier vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass Miglustat® auch in der Lage ist, den Knochenstatus bei Morbus NPC zu verbessern. Spannend sind die Auswirkungen von HPβCD auf den Knochen. So wurde in Untersuchungen an Ratten festgestellt, dass die Langzeitverabreichung von HPβCD in der täglichen Dosis von 200 mg/kg zu vermehrtem Knochenabbau und anschließendem Knochenverlust führte. Auch bei einer Dosis von 50 mg/kg wurde eine geringfügige Veränderung im Knochenstoffwechsel beobachtet [163]. Die Mäuse in den Versuchsgruppen wurden in der Gruppe COMBI und in der Gruppe HPβCD mit einer Dosis von 4000 mg/kg ab P7 und danach wöchentlich parenteral therapiert. Es ist also davon auszugehen, dass diese Behandlung einen negativen Effekt auf den Knochenstatus der Tiere gehabt haben wird. Die Untersuchung konnte keine gravierenden Effekte der HPβCD Behandlung auf den Knochenstatus ermitteln. Bei den *Npc1*^{-/-}-Mäusen zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei der BA.r.TAr und BS.TAr zwischen den nicht behandelten und den mit HPβCD behandelten Tieren. Bei den WT-Mäusen zeigte sich ein signifikanter Unterschied bezogen auf die relative Knochenoberfläche. Die Werte für die BA.r.TAr waren zwar nicht signifikant, allerdings konnte eine deutliche Reduktion in den Standardabweichungen für HPβCD im Vergleich zu der Gruppe *NONE* festgestellt werden. Ebenfalls lag der Median der HPβCD-Gruppe bei den *Npc1*^{+/+}-Mäusen weit unter den Medianwerten der Gruppen *NONE*, COMBI, *Sham* und MIGLU. Obwohl die Ergebnisse also kein Signifikanzniveau erreichten, ist dennoch eine klare Tendenz erkennbar. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen somit die Aussagen vorheriger Untersuchungen, wenn auch der Effekt bei den hier untersuchten Tieren nicht so ausgeprägt war. Zwar ist bekannt, dass oral aufgenommene Cyclodextrine nicht in signifikanten Mengen in den Kreislauf gelangen (45), allerdings sollte aufgrund dieser Beobachtung und des sehr breiten Einsatzes von β-Cyclodextrinen zum Beispiel als Lebensmittelzusatzstoff der Nummer E 459 in der EU (41) und der Verbreitung von HPβCD als Vehikel zur Verabreichung von Arzneistoffen (73, 204), der Einfluss von HPβCD auf den Knochenstatus dringender Gegenstand zukünftiger Forschungsarbeiten sein. Vor allem wenn HPβCD als Injektion direkt in den Kreislauf verabreicht wird.

Der Effekt von ALLO auf den Knochenstatus ist bisher nicht bekannt. Da ALLO in dieser Arbeit nur in der Gruppe mit der Kombinationsbehandlung (COMBI) zusammen mit

MIGLU und HP β CD Anwendung fand, war es nicht möglich gezielte Rückschlüsse zu ziehen.

Trotz aller potentiellen Artefakte legen diese Beobachtungen nahe, dass eine pharmakologische Intervention, vor allem mit Miglustat®, den Knochenstatus bei NPC verbessern kann. Die Auswirkungen von HP β CD auf den Knochenstatus muss bei der Behandlung des NPC dieser Studie nach nicht berücksichtigt werden, da bei den KO-Mäusen keine Verschlechterung des Knochenstatus aufgrund der alleinigen Medikation mit HP β CD festgestellt werden konnte. Beim Gesunden sollte diese unerwünschte pharmakologische Nebenwirkung bei langfristiger Applikation von HP β CD allerdings beachtet werden.

Die beobachtete positive Auswirkung von Miglustat® auf den Knochenstatus konnte, wie bereits erwähnt, ebenfalls bei Morbus Gaucher festgestellt werden. Hier ergab eine gepoolte Analyse von drei offenen Studien, dass eine Miglustat®-Monotherapie Knochen Schmerzen reduzieren und die BMD bei Patienten mit Morbus Gaucher Typ 1 verbessern kann [162]. Bei Kindern mit NPB erhöht eine Enzyersatztherapie die Knochendichte und verbessert die Wachstumscores für die Altersperzentilen [164].

Insgesamt lässt dies die Aussage zu, dass eine Manipulation des zugrunde liegenden Transportdefekts in den Zellen der *Npc1*^{-/-}-Mäuse den Knochenstatus dieser verbessern können. Das unterstützt auch die These, dass die Lipidakkumulation mitverantwortlich für die Verschlechterung des Knochenstatus ist.

Auch wenn NPC historisch betrachtet eine Cholesterinspeicherkrankheit ist, weiß man, dass eine reine cholesterinsenkende Therapie, mit beispielsweise Nikotinsäure, Nifedipin, Cholestyramin und anderen, klinisch kein Nutzen für Patienten oder KO-Mäuse hat [165, 166]. Miglustat® wirkt, indem es Glycosphingolipide anreichert, es hat keinen direkten Einfluss auf den Cholesterinstoffwechsel. Laut Lachmann et al. [2004] ist dies dafür beweisend, dass die Akkumulation von Sphingolipiden und nicht die Cholesterinspeicherung das wichtigste pathogenetische Ereignis beim Morbus NPC ist [111]. Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass eine Substratreduktionstherapie mit Miglustat® den Knochenstatus bei *Npc1*^{-/-}-Mäusen verbessert. Die Mäuse in der nur mit Miglustat® behandelten Gruppe hatten mit einem Wert von 0,127 den höchsten Medianwert bei der relativen Knochenfläche. Aufgrund dieser Ergebnisse ist naheliegend, dass die Sphingolipidakkumulation der zentrale Einflussfaktor auf den Knochenstatus ist.

HP β CD bewirkt eine Freisetzung des in Lysosomen gespeicherten Cholesterins ohne den Cholesterinspiegel im Blut zu erhöhen [167]. Ebenso wird durch die Monotherapie mit HP β CD die Speicherung von Sphingolipiden, insbesondere Monosialo-gangliosiden verringert, was die zuvor genannte Vermutung, dass Sphingolipidakkumulationen den Knochenstatus negativ beeinflussen, stützt [117]. Spannend ist, dass ALLO in einem Versuch mit einem anderen Träger als HP β CD keine Veränderung in Krankheitsbeginn und Lebensdauer im Vergleich zur Kontrollgruppe brachte. Auch zeigte die Analyse von Cholesterin und Sphingolipiden keine nachweisbaren Unterschiede [117]. Da die hier untersuchten Mäuse ALLO lediglich in einer Kombinationstherapie erhielten, kann zur alleinigen Behandlung mit diesem Neurosteroid keine Aussagen getroffen werden.

4.3 EINFLUSS DER SEXUALHORMONE AUF DEN KNOCHENSTATUS BEI NPC

Die Geschlechtsunterschiede im Knochenstatus der Mäuse sind eine interessante Beobachtung, da klinisch keine Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Erkrankten auffällt. Auch im BALB/cNctr-Npc1m1N/-J *Npc1*-Mausstamm konnten hierzu keine direkten Beobachtungen angestellt werden. Allerdings gab es auch bei vorherigen Untersuchungen an diesem Mausstamm interessante Auffälligkeiten. So benötigten weibliche *Npc1*^{-/-}-Mäuse mehr Medikamente, um eine Anästhesie einzuleiten als männliche *Npc1*^{-/-}-Mäuse. Zudem fiel in der vergleichenden Untersuchung der motorischen Koordination und des Gleichgewichts auf, dass bei *Npc1*^{-/-}-Mäusen bei den mit Miglustat® behandelten Tieren die Weibchen signifikant besser abschnitten ($p < 0,01$) [137]. Auch die Ergebnisse dieser Studie weisen eindeutig auf Geschlechterunterschiede beim Knochenstatus der *Npc1*^{-/-} Mäuse hin. Vor allem der deutlich schlechtere Knochenstatus der weiblichen Tiere im Vergleich zu den männlichen sticht in der histomorphometrischen Untersuchung ins Auge.

In der μ -CT Untersuchung bestätigte sich dies vor allem in den Gruppen 1 und 6. In Gruppe 1 zeigten die weiblichen Mäuse bei allen gemessenen Werten eine signifikante Veränderung in Richtung eines impaktierten Knochenstatus, wohingegen bei den männlichen Tieren lediglich in BV/TV und Tb.N eine signifikante Verringerung, sowie im SMI eine signifikante Steigerung der Messwerte beobachtet werden konnte. Der SMI bewertet das Verhältnis von Platten zu Stäben im spongiösen Knochen [168]. Mit zunehmendem Alter wandelt sich das plattenartige Netzwerk zunehmend in eine stabartige Struktur um [169]. Ein idealer Plattenaufbau entspricht einem SMI-Wert von 0, ein stabförmiger einem Wert von 3. In realen Trabekelnetzwerken liegt der Wert dazwischen und wird durch die Analyse der triangulierten Knochenoberfläche ermittelt [168]. Ein erhöhter SMI-Wert ist typisch für gealterte oder osteoporotische Knochen [170]. Somit lassen die signifikant höheren SMI-Werte der *Npc1*^{-/-}-Männchen es auch hier zu einen negativ beeinflussten Knochenstatus anzunehmen, wenn auch weniger deutlich als bei den weiblichen Tieren.

Am ausdrücklichsten zeigte sich der Sexualdimorphismus in der Gruppe HP β CDx: Hier wiesen die weiblichen Mäuse in jedem gemessenen Wert eine signifikante Veränderung auf, die mit einem negativ veränderten Knochenstatus einhergeht, doch die männliche Kohorte in keinem. Hingegen in der Gruppe HP β CD zeigte sich bis auf die signifikant verschlechterte Tb.Th der Weibchen bei keinem der Geschlechter eine Verschlechterung des Knochenstatus. Dies ist interessant und könnte daran liegen, dass die HP β CDx- Gruppe nur eine Injektion des Medikaments HP β CD erhielt und damit eine geringere Kumulativdosis HP β CD als die andere Gruppe. Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass aufgrund der geringen Dosis lediglich die männlichen, als weniger schwer betroffenen angenommenen Mäuse ansprachen, wohingegen die häufigere Injektion (Gruppe HP β CD) die Verschlechterung des Knochenstatus bei beiden Geschlechtern verhindern konnte. Das eine relativ hohe Dosis HP β CD notwendig ist, um eine signifikante Verbesserung des NPC bezogen auf die Überlebenszeit zu erreichen konnte die Forschungsgruppe Vite et al. [2015] zeigen. In ihren Untersuchungen konnte erst ab einer Dosis von mehr als 1000 mg/kg HP β CD eine längere Überlebenszeit beobachtet werden[171].

Eine mögliche Erklärung für die Geschlechtsunterschiede wären die Veränderungen des Sterolstoffwechsels aufgrund des fehlerhaften Npc1-Proteins. Npc1 Mutationen beeinflussten die steroidhormonproduzierenden Organe und deren Steroidogenese [172, 173]. Dies zeigt sich in einer unzureichenden Expression renaler und hepatischer Proteine. Auch die sekundären Geschlechtsmerkmale der Mäuse sind beeinträchtigt, sodass weibliche Mäuse unfruchtbar sind [172, 174]. In einer Untersuchung von Gévry et al. [2004] wurde gezeigt, dass es bei weiblichen *Npc1*^{-/-}-Mäusen zu einer Reduktion der Östrogensynthese kommt [175]. Ursache hierfür ist eine erhebliche Beeinträchtigung der Aromatase und des steroidogenen akuten regulatorischen Proteins. Der Östrogengehalt in den Eierstöcken der getesteten BALB/cNctr-Npc1m1N/-J Mäusen lag unter den Nachweisgrenzen des verwendeten Assays [175]. Östrogen ist einer der wichtigsten Regulatoren des Knochenstoffwechsels. Seine Hauptaufgabe besteht darin, den Knochenumbau und die Knochenresorption herunter zu regulieren und gleichzeitig für einen Aufbau von neuem Knochen zu sorgen [176]. Die niedrigen Östrogenlevel der weiblichen *Npc1*^{-/-}-Mäuse könnten also Ursache dafür sein, dass gerade bei den weiblichen Tieren in dieser Arbeit der Knochenstatus so stark verändert war. Für die zukünftige Forschung wird es wichtig sein, dass Studien nicht in geschlechtsübergreifenden Gruppen ausgewertet werden. Auch liegen noch keine Daten vor, die die Sexualhormonkonzentration der *Npc1*^{-/-}-Mäuse unter medikamentöser Therapie untersuchen.

4.4 INTERPRETATION DER GENEXPRESSIONSANALYSE

Die Erkenntnisse der histomorphometrischen Auswertung weiterführend, war es Ziel dieser Arbeit, den Knochenstatus bei NPC auf Genexpressionsebene zu untersuchen. Hierfür wurde die Methode der *real time* RT-PCR verwendet. Als Material dienten zerstoßene Wirbel der Versuchstiere. Diese wurden auf Parameter, die laut aktueller Literatur in Diskussion stehen, den Knochenstatus möglicherweise zu beeinflussen, getestet. Verglichen wurden *Npc1*^{-/-}-Mäuse mit ihrer Wildtypkohorte. Zudem wurden zwei verschiedene Altersgruppen der Versuchstiere (30 und 40 Tage) betrachtet und gegeneinander gemessen, da in vorangegangenen Studien beobachtet werden konnte, dass erste Symptome des Morbus Niemann-Pick Typ C zwischen Tag 30 und 35 auftraten (125). Es war von großem Interesse, an verschiedenen Zeitpunkten Unterschiede in der Genexpression für den Knochenstatus wichtiger mRNA zu erkennen und genauer zu definieren.

Die Cysteinprotease CtsK gilt als die wichtigste spezifische Protease der Osteoklasten und Makrophagen [177]. Hohe CtsK-Werte zeigten sich bereits in vorangegangenen Studien bei einer Vielzahl an Erkrankungen wie Sarkoidose, Tuberkulose oder Granulomatose mit Polyangiitis [178]. Da eine Knochenresorption durch das Unterbinden der CtsK-Aktivität gestoppt werden konnte, ohne die Knochenneubildung zu beeinflussen, ist CtsK momentan ein attraktives Forschungsziel auch in Hinsicht auf die Entwicklung antiresorptiver, knochenprotektiver Medikamente [179–181]. In Bezug auf die hier untersuchte Erkrankung NPC konnte die Forschungsgruppe Sun et al. [2004] bereits an Makrophagen mit einer NPC1-Mutation eine erhöhte Expression von CtsK zeigen [182]. Ob sich die erhöhte CtsK-Expression bei der Untersuchung der Vertebrae widerspiegelt, galt es in dieser Arbeit herauszufinden. Es zeigten sich in der CtsK-Genexpressionsanalyse keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass Morbus Niemann-Pick keinen Einfluss auf die Expression von CtsK im Knochen hat. Allerdings gilt es zu beachten, dass hierbei nur P30 und P40 untersucht wurden. Ein späterer Zeitpunkt sollte in zukünftigen Studien einbezogen werden, um umfassendere Ergebnisse zu generieren.

Ein weiteres für den Knochenumsatz wichtiges Protein ist Cx43. Die Expression dieses Botenstoffs besitzt große Bedeutung für die Knochenentwicklung und Differenzierung [183–185]. Zudem spielt es für das Überleben [186] und die Funktion der Osteoblasten [187, 183] eine große Rolle. Cx43 dient den Osteozyten als Vermittler intrazellulärer Signale [12, 188]. Ein Mangel des Proteins kann zu einer verzögerten Ossifikation führen

[186]. Durch den in den histologischen Präparaten beobachteten, qualitativ geringeren Knochenstatus bei NPC (siehe Kapitel 4.1), war es von Interesse, die Expression von Cx43 diesbezüglich zu untersuchen. Es konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede innerhalb der verschiedenen Gruppen festgestellt werden, woraus sich schließen lässt, dass die Expression von Cx43 höchstwahrscheinlich keine Relevanz für den krankhaften Knochenstatus bei NPC hat.

Das Enzym ALP ist bekannt für seine Funktion bei der Gewebemineralisierung [189]. Ein angeborener Mangel des Enzyms kann zur Stoffwechselstörung Hypophosphatasie führen [190], welche durch schlechte Knochenmineralisierung Symptome wie Knochenschmerzen und -beugung, Frakturen und Mobilitäts-einschränkungen mit sich zieht [191]. Bei Erkrankungen wie Osteoporose oder Osteomalazie zeigen sich erhöhte Werte der ALP im Serum [192, 193]. Literatur zum Einfluss der ALP, auf den in dieser Arbeit beobachteten, schlechteren Knochenstatus bei NPC, lag zu diesem Zeitpunkt nicht vor. Interessanterweise bestätigte sich der bereits in der histologischen Betrachtung gesehene, deutliche Sexualdimorphismus in der Analyse der ALP-Genexpression der *Npc1*^{-/-}-Mäuse: Sowohl bei der Gruppe der 30-tägigen als auch bei den 40-tägigen *Npc1*^{-/-}-Mäusen ließ sich eine signifikant höhere (30 Tage: $p = 0,03$; 40 Tage: $p = 0,026$) ALP-Genexpression der weiblichen Genotypen beobachten. Die Wildtypen zeigten im Gegensatz hierzu keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern in der ALP-Expression. Die ALP ist bereits bei Mineralisierungsstörung wie Osteomalazie in der klinischen Anwendung ein wichtiger Parameter, um den Schweregrad der Erkrankung und die Effektivität der Therapie abzuschätzen (187). Die in dieser Arbeit beobachtete, erhöhte Expression der ALP könnte für einen schlechteren Knochenstatus im Sinne einer Knochemineralisierungsstörung bei Niemann-Pick Typ C sprechen. Angesichts der Veränderungen in den steroidhormonproduzierenden Organen, aufgrund der NPC-Mutation (53, 159), welche bei weiblichen *Npc1*-Mäusen zu einem Rückgang der Östrogensynthese führt (52), könnte die gesteigerte ALP-Expression hier als mögliche Folge einer durch Östrogenmangel bedingten Osteoporose betrachtet werden. Osteoporose ist eine typische Folgeerscheinung der postmenopausal bedingten, verminderten Östrogensynthese von Frauen nach den Wechseljahren (78, 160, 49, 46). Es kommt hierbei zu Knochenschäden im Sinne einer verminderten Knochendichte und Verschlechterung der Knochengewebsarchitektur (137). Grund hierfür ist ein durch Östrogenmangel bedingter verstärkter Knochenumbau, mit einem Ungleichgewicht zwischen Ab- und Aufbau des Knochens (156, 152, 99). Dieser erhöhte Knochenumbau erklärt wiederum die messbare Erhöhung der ALP (127). Inwiefern der schlechtere Knochenstatus bei weiblichen, *Npc1*^{-/-}-Mäusen

in ein bestimmtes Störungsbild einzuordnen ist, gilt es in folgenden Studien herauszufinden. Doch abgesehen von der Einteilung der Knochenschädigung wäre es laut diesen Ergebnissen therapeutisch von großem Wert die ALP bei NPC-Patienten zu bestimmen, um Aussagen über das Fortschreiten der Knochenschädigung treffen zu können. Einschränkung muss allerdings gesagt werden, dass es sich hierbei um murine Gewebeproben handelt und die hier ermittelte, erhöhte ALP-Expression direkt aus Knochengewebe stammt. Hier gilt es in zukünftigen Studien, diese Erkenntnisse in Forschungsmodellen am Patienten, zum Beispiel im Sinne der Untersuchung der ALP in humanen Seren, weiter zu verfolgen.

Die Untersuchung der relativen SphK-Expression zeigte in der KO-Kohorte der 30-tägigen Mäusen einen signifikanten ($p = 0,021$) Unterschied zwischen den beiden Geschlechtern. Die Expression der weiblichen Mäuse war deutlich erniedrigt gegenüber der der männlichen *Npc1^{-/-}*-Artgenossen. Überraschenderweise zeigte sich hierbei, dass sich diese Differenz zwischen den Geschlechtern nicht am 40. Lebensstag reproduzieren ließ. Die weiblichen Mäuse wurden anschließend mit Augenmerk auf die SphK-Genexpression hinsichtlich der Lebenszeit untersucht. Hierbei zeigte sich eine stark signifikante Erhöhung ($p = 0,01$) der SphK-Genexpression von Tag 30 zu Tag 40 der *Npc1^{-/-}*-Mäuse. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass im Mausmodell die *Npc1^{-/-}*-Mutation keinen Einfluss auf die SphK-Expression beim Männchen hat. Die fehlerhafte Aktivität der SphK gilt als ursächlich für den Pathomechanismus der verringerten Konzentration an Sph1P und Akkumulation der Sphingolipide (130). Durch die hier festgestellten Ergebnisse kann diese von Newton et al. [2020] aufgestellte These bestätigt werden, da nicht eine verringerte Expression der SphK ursächlich sein kann.

In Hinsicht auf den Ausbruch der Erkrankung zwischen Tag 30 und 35 [139] sind die hier festgestellten Daten bezüglich der weiblichen Kohorte nicht sinnvoll. Hier benötigt es neue Studien und Forschungsmodelle, um dies weiter abzuklären. Als Ursache der fehlerhaften Aktivität der SphK wurde bereits an Purkinje-Neuronen von *Npc1^{-/-}*-Mäusen eine verminderte Expression des Wachstumsfaktor VEGF festgestellt (94). Hinsichtlich der hier festgestellten Ergebnisse wäre es interessant, die VEGF-Expression im Knochen und Ursachen einer möglichen SphK-Reprimierung bei NPC zu untersuchen.

4.5 EINFLUSS DER ORGANSCHÄDIGUNGEN BEI NPC AUF DEN KNOCHEN-STATUS

Bei *Npc1*^{-/-}-Mäusen sammelt die Leber Cholesterin, was zu einer Hepatomegalie mit Leberschäden, Entzündungen, Apoptosen und Fibrose führt. Auch das Gallengangssystem, sowie die Nieren der Tiere in den verschiedenen Teilen des Tubulussystems sind von erhöhten Cholesterinablagerungen betroffen [174]. Dies legt eine Störung in der endogenen Synthese von Vitamin D nahe, da Cholecalciferol hauptsächlich in der Leber zu 25-Hydroxycholecalciferol hydroxyliert und anschließend in der Niere am C1-Atom zu 1,25-Dihydroxycholecalciferol (= Calcitriol) umgewandelt wird. Untersuchungen, die eine Störung in diesem Stoffwechselweg demonstrieren, haben gezeigt, dass Calcitriol eine herausragende Rolle in der Mineral- und Skeletthomöostase innehat. Verringerte Spiegel an Calcitriol verursachen Wachstums-, Matrixmineralisierungs-, und Knochenbildungsstörungen [194]. Endokrine Störungen stehen bei NPC1-Mutationen zwar nicht im Mittelpunkt der Forschung, dennoch lassen die Schäden an den Vitamin D produzierenden Organen einen Einfluss jener auf den Knochenstatus vermuten. In der hier erfolgten klinischen Untersuchung hatten vier der sechs Befragten NPC-Patienten einen Vitamin D Mangel oder substituieren dieses.

HP β CD senkt den Cholesteringehalt in der Leber und verbessert damit die Lebererkrankung bei NPC [195]. Dies könnte ebenfalls ein Grund für den verbesserten Knochenstatus der mit HP β CD behandelten Tiere sein.

4.6 LIMITATIONEN DER STUDIE

Diese Studie wurde mit über Jahrzehnte gesammelte Mausproben durchgeführt. Daraus resultiert eine teilweise sehr lange Lagerung der untersuchten Knochen in ihrem jeweiligen Fixationsmedium. Es resultierte eine schlechte Probenqualität, was die enzym- und immunhistochemische Untersuchung stark begrenzte. Die Untersuchung der Proben nach einer Einbettung in T-9100 war aufgrund der langen Lagerung nicht mehr möglich, da die Knochen zu fragil waren. Auch die Proben, welche in Paraffin eingebettet wurden, zeigten vereinzelt eine schlechte Probenqualität, weshalb in die Auswertung der histo-

morphometrischen Messungen die untersuchte, intakte Fläche als Konfounder eingeschlossen wurde. Dennoch sind Verfälschungen des Ergebnisses nicht ausgeschlossen. Außerdem konnten die Proben aufgrund der Lagerung nicht in der Giemsa-Färbung auf zelluläre Veränderungen im Knochenmark untersucht werden.

Im Tiermodell mit Mäusen in Käfighaltung gibt es des Weiteren generell das Problem, das die physiologische Aktivität und damit die Belastung der Mäuse verändert sein könnte. Auch führt die Niemann-Pick Typ C Krankheit zu einer Neurodegeneration und Fortbewegungseinschränkungen, was gerade bei den *Npc1*^{-/-}-Mäusen eine verringerte Belastung des Skelettsystems zur Folge haben wird (67). Organspezifische Effekte sind aufgrund von neuralen, hormonellen und humoralen Einflüssen erschwert zu konkretisieren. Generell ist es nicht möglich, bei einer solch komplexen Systemerkrankung auf genaue Ursachen zu schließen. In dieser Arbeit wurde versucht, möglichst viele Einflussfaktoren zu diskutieren. Dennoch ist es nicht möglich, bei der vorliegenden Untersuchung alle möglichen Variablen zu kalkulieren. Auch bei den Untersuchungen des Knochenstatus anderer Sphingolipidosen konnte das Ausmaß, in dem dieses durch die Krankheit im Vergleich zu anderen Faktoren, wie Medikamenten oder Vitamin D, beeinflusst wird, nicht endgültig geklärt werden. Die Bewegungsunfähigkeit oder niedrige Vitamin D-Spiegel wurden früher bereits beim Morbus Fabry als Ursache für die verringerte Knochenmenge diskutiert (101). Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese beiden Faktoren auch die Ergebnisse dieser Arbeit beeinflusst haben.

Bei NPC akkumulieren im Knochenmark sogenannte *sea-blue* Histozyten, sessile Makrophagen mit großen Ansammlungen von Lipiden im Zytoplasma [196, 197]. Der Name *sea-blue* stammt von ihrem typischen Aussehen in der Giemsa-Färbung. Es wurde versucht *sea-blue* Histozyten in den verwendeten Präparaten zu untersuchen. Aufgrund der Fixierung und der Einbettung der Proben konnten die Präparate in der Giemsa-Färbung allerdings nicht bewertet werden. In der lichtmikroskopischen Untersuchung fielen ausgewaschene Bereiche auf (Abbildung 21), die von *sea-blue* Histozyten stammen könnten. Diese beobachteten Relikte kamen nur bei *Npc1*^{-/-}-Tieren vor. Lipidbeladene Makrophagen spielen in der Pathogenese des Morbus Gaucher eine große Rolle (112, 69, 8, 51). Sie verursachen eine chronische Inflammation mit der Produktion diverser Zytokine, die ursächlich sind für den Knochenumbauprozess (51). In zukünftigen Arbeiten zur Knochenbeteiligung bei NPC sollte die Auswirkung der bekannten Akkumulation von *sea-blue* Histozyten im Knochenmark zum Gegenstand der Forschung gemacht werden.

4.7 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Die Beteiligung des Knochens bei NPC scheint von vielen Parametern abzuhängen. In dieser Arbeit wurden einige mögliche Faktoren erörtert. Trotz aller potentiellen Artefakte konnte gezeigt werden, dass ein Defekt des *Npc1*-Proteins bei der Maus negative Effekte auf den Knochenstatus hat. Beim Menschen können aus den hier erhobenen Daten aufgrund der geringen Teilnehmerzahl keine Rückschlüsse gezogen werden. Es zeigt sich aber dennoch die Tendenz, dass mit ansteigender Schwere der Krankheit der Knochenstatus klinisch auffällig wird. Aufgrund des gezeigten Sexualdimorphismus im Mausmodell, sollte in weiteren Forschungsprojekten zum Morbus NPC Rücksicht auf das Geschlecht genommen werden.

Diese Arbeit hat gezeigt, dass die medikamentöse Behandlung des NPC den Knochenstatus positiv beeinflusst. Da die hier eingesetzten Medikamente, vor allem Miglustat®, an den pathologischen Sphingolipidakkumulationen ansetzen, ist davon auszugehen, dass diese Akkumulationen ursächlich für den schlechten Knochenstatus bei NPC sind. Diese Vermutung wird unterstützt von vorherigen Untersuchungen, die einen negativ beeinflussten Knochenstatus bei anderen Sphingolipidspeicher-krankheiten zeigten [152–154, 59, 155]. Hinsichtlich der Medikamente wurde ein Einfluss von HPβCD auf den Knochenstatus bei WT-Mäusen gemessen. In Zukunft wird es wichtig sein, diesen Einfluss von HPβCD auf den Knochen weiter zu untersuchen. Die Genexpressionsanalyse der erkrankten Knochen konnte eine erhöhte Expression von ALP bei weiblichen *Npc1*^{-/-}-Mäusen feststellen. Hier sollte weiter angesetzt werden, die mögliche Präsenz einer Erhöhung auch am Menschen zu untersuchen, da die ALP-Erhöhung ein wichtiger Verlaufsparemeter bezüglich des Knochenstatus im klinischen Alltag sein könnte. Auch sollte im Hinblick auf zukünftige Forschungsvorhaben, bei denen die medikamentöse Therapie des NPC eine Rolle spielt, das 2024 zur Behandlung des humanen NPC zugelassene Medikament Arimoclomol in die Untersuchungen eingeschlossen werden. Arimoclomol war zur Zeit der Beantragung des Tierversuchs noch nicht in Verwendung und wurde deshalb nicht in die Untersuchungen aufgenommen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der Morbus Niemann-Pick (NPC) ist eine autosomal-rezessiv vererbte atypische Sphingolipidose, deren Ursprung ein Gendefekt des Cholesterolfstoffwechsels ist. Bei an NPC erkrankten Patienten reichern sich Lipide wie Cholesterin, Glykolipide und Sphingolipide im endosomalen/lysosomalen System an. Bei anderen Sphingolipidosen führt diese Akkumulation zu Störungen des Knochenstoffwechsels. Vor diesem Hintergrund war es das Ziel der vorliegenden Arbeit die Hypothese zu testen, dass die Akkumulation von Sphingolipiden einen negativen Einfluss auf den Knochenstatus hat. Hierfür wurde der Knochenstatus in einem NPC-Mausmodell, sowie begleitend durch eine klinische Umfrage an NPC-Patienten untersucht. Weiterhin wurde analysiert, inwiefern Medikamente, die zur Behandlung von NPC eingesetzt werden, einen Einfluss auf den Knochenstatus haben. Dazu wurden Femora von weiblichen und männlichen betroffenen *Npc1^{-/-}*, kontroll-*Npc1^{+/+}*- und heterozygoten *Npc1^{+/-}*-Mäusen verwendet, die histologisch, computer-tomographisch, sowie histomorphometrisch untersucht wurden. Um zusätzlich Erkenntnisse über die postnatale Entwicklung (P) bei NPC zu erhalten, wurden Wirbelkörper von Mäusen an P30 und P40 mittels *realtime* RT-PCR untersucht.

Die histomorphometrischen Untersuchungen zeigten eine signifikante Reduktion der relativen Knochenfläche der *Npc1^{-/-}*-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen. Nach der medikamentösen Behandlung der Tiere war dieser Unterschied nicht mehr nachweisbar. Wurde die gesamte untersuchte Fläche als Konfounder berücksichtigt, so waren die signifikanten Unterschiede nur bei den weiblichen Versuchstieren nachzuweisen. Hier war die Knochenfläche bei den medikamentös behandelten weiblichen Mäusen ebenfalls signifikant reduziert. Die μ CT-Untersuchungen komplementierten diese Ergebnisse in Bezug auf das relative Knochenvolumen. Zudem zeigte sich eine verringerte Trabekeldicke und -nummer. Die relative Knochenoberfläche, die *trabecular separation*, der *trabecular pattern factor*, sowie der *structure model index*, zeigte sich bei den unbehandelten *Npc1^{-/-}*-Mäusen deutlich erhöht. Vor allem bei den weiblichen Mäusen zeigen sich die Ergebnisse vergleichbar mit μ CT-Untersuchungen von murinen Proben mit Osteoporose.

Die Ergebnisse der RT-PCR zeigten signifikante Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen *Npc1^{-/-}*-Mäusen für den Primer alkalische Phosphatase. Zudem war die Expression der Sphingosin-Kinase 1 an P30 bei den weiblichen *Npc1^{-/-}*-Mäusen im Vergleich zu den männlichen Mäusen signifikant erniedrigt war.

Zusammenfassend zeigen die *Npc1*^{-/-}-Mäuse in ihrer Gesamtheit einen schlechteren Knochenstatus als der Wildtyp und die heterozygoten Mäuse. Dabei scheint das Geschlecht der Tiere eine Einflussgröße zu sein. Die medikamentöse Behandlung, vor allem das Verhindern der Sphingolipidakkumulation, konnte den Knochenstatus der Tiere verbessern.

6 SUMMARY

Niemann-Pick disease (NPC) is an autosomal recessively inherited atypical sphingolipidosis originating from a genetic defect in cholesterol metabolism. In patients with NPC, lipids such as cholesterol, glycolipids and sphingolipids accumulate in the endosomal/lysosomal system. Other sphingolipidoses show that this accumulation can lead to disturbances in bone metabolism. In this work, bone status was investigated in an NPC-mouse model supplemented with a clinical survey of NPC-patients. The aim was to test the hypothesis that sphingolipid accumulation has a negative effect on bone status in NPC. Furthermore, the influence of drugs used to treat NPC on bone status was analyzed. For this purpose, femora from affected *Npc1*^{-/-}, wildtype *Npc1*^{+/+} and heterozygous *Npc1*^{+/-}-mice were used from the NPC mouse model, which were examined histologically, by computed tomography (μ CT) as well as histomorphometrically. Additionally, to gain insights into the postnatal development (P) in NPC, vertebral bodies from mice at P30 and P40 were analyzed by realtime RT-PCR.

The histomorphometric examinations showed a significant reduction in the relative bone area in samples of the *Npc1*^{-/-}-mice compared to the wild types. After drug treatment of the animals, this difference was no longer detectable. When the total area was considered as a confounder, the significant differences were only detectable in the female *Npc1*^{-/-} animals. Here, the bone area was also significantly reduced in the drug-treated female *Npc1*^{-/-} mice. The μ CT investigations complemented these results regarding the relative bone volume. Additionally, a decreased trabecular thickness and number were observed. The relative bone surface, trabecular separation, trabecular pattern factor, and structure model index were significantly increased in the untreated *Npc1*^{-/-}-mice, especially in the female mice. These results are comparable to μ CT investigations of murine samples with osteoporosis. The results of the RT-PCR showed significant higher expression in male than in female *Npc1*^{-/-}-mice for the primer alkaline phosphatase. In addition, the expression of sphingosine kinase 1 was found to be significantly decreased in the female *Npc1*^{-/-}-mice compared to the male mice at postnatal day 30.

In summary, the *Npc1*^{-/-}-mice showed a decline in bone status compared to *Npc1*^{+/+} and *Npc1*^{+/-}-mice. The gender of the animals seems to be an influencing factor. Drug treatment, especially preventing sphingolipid accumulation, was able to improve the bone status of the animals.

7 ABKÜRZUNGS-, ABBILDUNGS- UND TABELLEN- VERZEICHNIS

7.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALLO	Allopregnanolon
ALP	alkalische Phosphatase
ASMA	<i>anti-smooth-muscle-actin</i>
BAr	<i>bone area</i> , Knochenfläche
BAr.TAr	relative Knochenfläche
BMD	<i>bone mineral densitiy</i> , Knochenmineraldichte
BS	<i>bone surface</i> , Trabekeloberfläche
BS.TAr	relative Knochenoberfläche
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BV	<i>bone volume</i> , Knochenvolumen
Ctsk	Cathepsin K
Cx43	Connexin 43
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	<i>Forward</i>
GM1	Monosialotetrahexosylgangliosid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HP β CD	2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin
MIGLU	Miglustat®
NF κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NPA	Niemann-Pick Typ A
NPB	Niemann-Pick Typ B
NPC	Niemann-Pick Typ C

ORP1L	Oxysterol-Bindungsprotein
PX	postnatalen Tag X
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PGE2	Prostaglandin E2
PMMA	Polymethylmethacrylat (PMMA)
R:	<i>Reverse</i>
RANK	Rezeptor-Aktivator von NFκB
ROI	<i>region of interest</i>
RT-PCR	reverse Transkriptase polymerase chain reaction
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT-	Negativkontrolle der reversen Transkription
RT+	reverse Transkription
s	Sekunden
SMI	<i>structure model index</i> , Struktur-Modell-Index
Sph	Sphingosin
Sph1P	Sphingosin 1 Phosphat
SphK	Sphingosin-Kinase
SphK1	Sphingosin-Kinase-1
TAr	<i>tissue area</i> , Gewebsfläche
TB	Toluidinblau
Tb.Th	<i>trabecular thickness</i> , Tabekeldicke
Tb.Pf	<i>trabecular pattern factor</i> , trabekulärer Musterfaktor
TBS	<i>tris buffered saline</i>
Tb.Sp	<i>trabecular separation</i> , Trabekel Separation
TMD	<i>tissue mineral density</i> , Mineralanteil des Gewebes

TNF α	Tumornekrosefaktor- α
TRAP	Tartrat-resistente-saurer-Phosphatase
TV	<i>tissue volume</i> , Gewebsvolumen
vATPase	vakuoläre H ⁺ -Adenosintriphosphatase
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VOI	<i>Volume of interest</i>
WT	Wildtyp
μ CT	Mikro-Computertomographie

7.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Aufbau langer Röhrenknochen	2
Abbildung 2: Knochenzelllinie von der mesenchymalen Stammzelle bis zum Osteozyten	3
Abbildung 3: Knochenzelllinie von der multipotenten hämatopoetischen Stammzelle bis hin zu einem reifen, aktiven Osteoklasten	4
Abbildung 4: Allgemeine Struktur eines Sphingolipids	5
Abbildung 5: Die Effekte von Ceramid und Sphingosin-1-Phosphat auf Osteoblasten und Osteoklasten	9
Abbildung 6: Auswahl an häufigen Symptomen des Morbus NPC	14
Abbildung 7: Anhäufung von Cholesterin und Sphingosin bei NPC1.....	19
Abbildung 8: Mäusefemur eingebettet in Paraffin	27
Abbildung 9: Schritt 1: Festlegen der Region of interest (ROI)	36
Abbildung 10: Schritt 2: Ausmessen der Knochenfläche und des -umfangs.....	37
Abbildung 11: Darstellung eines μ CT-Schnitts durch das Femur	40
Abbildung 12: Logarithmische Standardkurve SPHK1-Primer.....	46
Abbildung 13: Histomorphometrische Untersuchung der relativen Knochenfläche der unbehandelten Mäuse.....	49
Abbildung 14: Histomorphometrische Untersuchung von <i>Npc1^{+/-}</i> , <i>Npc1^{-/-}</i> , <i>Npc1^{+/-}</i> -Mäusen in Abhängigkeit zu ihrer medikamentösen Behandlung.....	50
Abbildung 15: ANOVA-Analyse des BAr.TAr unter Berücksichtigung des Genotyps, der Behandlung und des Geschlechts	52
Abbildung 16: ANOVA-Analyse der BS.TAr unter Berücksichtigung des Genotyps, der Behandlung und des Geschlechts	53
Abbildung 17: Konfidenzintervalle für BAr von männlichen <i>Npc1^{+/-}</i> - und <i>Npc1^{-/-}</i> -Mäusen in den jeweiligen Behandlungsgruppen	53
Abbildung 18: BAr.TAr verglichen zwischen den Behandlungsgruppen <i>NONE</i> und HP β CG	54
Abbildung 19: Relative Knochenoberfläche (BS.TAr) der <i>Npc1^{+/-}</i> - und <i>Npc1^{-/-}</i> - Mäuse aus den Behandlungsgruppen <i>NONE</i> und HP β CD	55
Abbildung 20: HE-Färbung der Trabekel von Gruppe 1.....	57
Abbildung 21: Knochenmark einer männlichen <i>Npc1^{-/-}</i> -Maus	58
Abbildung 22: ASMA-Immunhistochemie mit Hämatoxylin-Gegenfärbung	60
Abbildung 23: Kossa-van-Gieson Färbung (links) und Movat-Pentachrom-Färbung.....	62
Abbildung 24: Unterschiede im Knochenstatus zwischen <i>Npc1^{-/-}</i> -Mäusen und <i>Npc1^{+/-}</i> -, sowie heterozygoten Mäusen	666

Abbildung 25 Morphometrische Unterschiede zwischen <i>Npc1^{+/-}</i> und <i>Npc1^{-/-}</i> in der Scheinbehandelten Gruppe 3 (Sham).....	67
Abbildung 26: Gegenüberstellung der einmalig mit HPβCD behandelten <i>Npc1^{-/-}</i> -Mäusen und den nach gleichem Schema behandelten Wildtypen	68
Abbildung 27 Dreidimensionale Knochenarchitektur der <i>Npc1^{+/-}</i> - und <i>Npc1^{-/-}</i> -Mäuse	69
Abbildung 28: Relative CtsK-Expression.....	70
Abbildung 29: Relative Cx43-Expression	71
Abbildung 30: Relative ALP-Expression	72
Abbildung 31: Relative SphK-Expression.....	73
Abbildung 32: SphK-Genexpression	74
Abbildung 33: Binary mit hervorgehobenen Trabekeln	78
Abbildung 34: Stoffwechselweg der Sphingolipidosen.....	84

Die Abbildungen 2, 3, 5 und 6 wurden erstellt mit: Servier Medical Art. Lizenziert unter CC BY 4.0. Änderungen wurden vorgenommen. Lizenzdetails: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

7.3 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Behandlungsschemata der sechs verschiedenen Gruppen.....	23
Tabelle 2: Anzahl der histomorphometrisch untersuchten Versuchstiere unterteilt in die verschiedenen Gruppen.....	24
Tabelle 3: Anzahl der Versuchstiere in den jeweils molekularbiologisch untersuchten Gruppen	24
Tabelle 4: Ablauf der Paraffineinbettung.....	27
Tabelle 5: Ablauf der Technovit 9100 Einbettung	29
Tabelle 6: Etablierungsmethoden, mit dem Anti-Sphk1-Antikörper	34
Tabelle 7: Anzahl der Untersuchten Proben im μ CT.....	38
Tabelle 8: Verwendete Primer.....	44
Tabelle 9: Zur Etablierung verwendeter SphK1-Primer.....	46
Tabelle 10: Unterteilung der Behandlungsgruppe 1 in sechs Gruppen	56
Tabelle 11: Überblick signifikanter Unterschiede der μ CT-Analyse.....	65
Tabelle 12: Auswertung der Patientenumfrage.....	76

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Welsch U, Kummer W, Deller T (eds) (2018) Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie: das Lehrbuch, 6. Auflage. Elsevier, München, ISBN 978-3-437-44427-2
2. Lüllmann-Rauch R, Asan E, (2024) Taschenlehrbuch Histologie, 7. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, ISBN 978-3-13-244600-7
3. Aust G, et. al. (2024) Anatomie, 6. Auflage. Thieme, Stuttgart, ISBN 978-3-13-245257-2
4. Datta HK, Ng WF, Walker JA et al. (2008) The cell biology of bone metabolism. *Journal of Clinical Pathology* 61:577–587. <https://doi.org/10.1136/jcp.2007.048868>
5. Clarke B (2008) Normal bone anatomy and physiology | American Society of Nephrology. https://cjasn.asnjournals.org/content/3/Supplement_3/S131.
6. Burr DB, Akkus O (2013) Bone morphology and organization. In: Burr DB, Allen MR (eds) *Basic and Applied Bone Biology*. Elsevier Science, Burlington, pp 3–25, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416015-6.00001-0>
7. Burr DB, Allen MR (eds) (2014) *Basic and applied bone biology*. Academic Press, London, Waltham, MA, <https://doi.org/10.1016/C2016-0-03781-6>
8. Caplan AI (1991) Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9:641–650. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>
9. Silva MJ, Gibson LJ (1997) Modeling the mechanical behavior of vertebral trabecular bone: Effects of age-related changes in microstructure. *Bone* 21:191–199. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(97\)00100-2](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(97)00100-2)
10. Mackie EJ (2003) Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35:1301–1305. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00107-9](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00107-9)
11. Hasegawa T (2018) Ultrastructure and biological function of matrix vesicles in bone mineralization. *Histochem Cell Biol* 149:289–304. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1646-0>

12. Plotkin LI (2014) Connexin 43 hemichannels and intracellular signaling in bone cells. *Front Physiol* 5:131. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00131>
13. Xu X, Liu S, Liu H et al. (2021) Piezo Channels: Awesome mechanosensitive structures in cellular mechanotransduction and their role in bone. *International Journal of Molecular Sciences* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22126429>
14. Loutit JF, Nisbet NW (1982) The origin of osteoclasts. *Immunobiology* 161:193–203. [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(82\)80074-0](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(82)80074-0)
15. Halleen JM, Tiitinen SL, Ylipahkala H et al. (2006) Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. *Clin Lab* 52:499–509, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17078477/>
16. Novinec M, Lenarčič B (2013) Cathepsin K: a unique collagenolytic cysteine peptidase. *Biological chemistry* 394:1163–1179. <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0134>
17. Gault CR, Obeid LM, Hannun YA (2010) An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv Exp Med Biol* 688:1–23. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6741-1_1
18. Heinrich PC, Müller M, Graeve L (eds) (2022) *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, 10. Aufl. Springer-Lehrbuch. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, <https://doi.org/10.1007/978-3-662-60266-9>
19. Hannun YA, Loomis CR, Merrill AH et al. (1986) Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. *Journal of Biological Chemistry* 261:12604–12609, [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(18\)67133-9/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(18)67133-9/pdf)
20. Proia RL, Hla T (2015) Emerging biology of sphingosine-1-phosphate: its role in pathogenesis and therapy. *J Clin Invest* 125:1379–1387. <https://doi.org/10.1172/JCI76369>
21. Alvarez SE, Harikumar KB, Hait NC et al. (2010) Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature* 465:1084–1088. <https://doi.org/10.1038/nature09128>
22. Obinata H, Hla T (2019) Sphingosine 1-phosphate and inflammation. *International Immunology* 31:617–625. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxz037>
23. Hla T, Venkataraman K, Michaud J (2008) The vascular S1P gradient-cellular sources and biological significance. *Biochim Biophys Acta* 1781:477–482. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2008.07.003>

24. Jung B, Obinata H, Galvani S et al. (2012) Flow-regulated endothelial S1P receptor-1 signaling sustains vascular development. *Dev Cell* 23:600–610.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.07.015>
25. Hannun YA, Obeid LM (2011) Many ceramides. *J Biol Chem* 286:27855–27862.
<https://doi.org/10.1074/jbc.R111.254359>
26. Ishii M, Egen JG, Klauschen F et al. (2009) Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature* 458:524–528.
<https://doi.org/10.1038/nature07713>
27. Ishii M, Kikuta J, Shimazu Y et al. (2010) Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling in vivo. *J Exp Med* 207:2793–2798. <https://doi.org/10.1084/jem.20101474>
28. Yao GQ, Zhu M, Walker J et al. (2020) Identification of a 22 bp DNA cis element that plays a critical role in colony stimulating factor 1-dependent transcriptional activation of the SPHK1 gene. *Calcif Tissue Int* 107:52–59.
<https://doi.org/10.1007/s00223-020-00685-4>
29. Meshcheryakova A, Mechtcheriakova D, Pietschmann P (2017) sphingosine 1-phosphate signaling in bone remodeling: multifaceted roles and therapeutic potential. *Expert Opin Ther Targets* 21:725–737.
<https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1332180>
30. Zhang J-N, Zhao Y, Liu C et al. (2015) The role of the sphingosine-1-phosphate signaling pathway in osteocyte mechanotransduction. *Bone* 79:71–78.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.05.017>
31. Dobrosak C, Gooi JH (2017) Increased sphingosine-1-phosphate production in response to osteocyte mechanotransduction. *Bone Rep* 7:114–120.
<https://doi.org/10.1016/j.bonr.2017.10.002>
32. Lee SH, Lee S-Y, Lee Y-S et al. (2012) Higher circulating sphingosine 1-phosphate levels are associated with lower bone mineral density and higher bone resorption marker in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 97:E1421-8.
<https://doi.org/10.1210/jc.2012-1044>
33. Lai W-Q, Chia FL-A, Leung BP (2012) Sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate receptors: novel therapeutic targets of rheumatoid arthritis? *Future Med Chem* 4:727–733. <https://doi.org/10.4155/fmc.12.28>

34. Lotinun S, Kiviranta R, Matsubara T et al. (2013) Osteoclast-specific cathepsin K deletion stimulates S1P-dependent bone formation. *J Clin Invest* 123:666–681. <https://doi.org/10.1172/JCI64840>
35. Keller J, Catala-Lehnen P, Huebner AK et al. (2014) Calcitonin controls bone formation by inhibiting the release of sphingosine 1-phosphate from osteoclasts. *Nat Commun* 5:5215. <https://doi.org/10.1038/ncomms6215>
36. Sato C, Iwasaki T, Kitano S et al. (2012) Sphingosine 1-phosphate receptor activation enhances BMP-2-induced osteoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 423:200–205. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.130>
37. Quint P, Ruan M, Pederson L et al. (2013) Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptors 1 and 2 coordinately induce mesenchymal cell migration through S1P activation of complementary kinase pathways. *J Biol Chem* 288:5398–5406. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.413583>
38. Alvarez SE, Milstien S, Spiegel S (2007) Autocrine and paracrine roles of sphingosine-1-phosphate. *Trends Endocrinol Metab* 18:300–307. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2007.07.005>
39. Khavandgar Z, Murshed M (2015) Sphingolipid metabolism and its role in the skeletal tissues. *Cell Molecular Life Science* 72:959–969. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1778-x>
40. Olivier S, Fillet M, Malaise M et al. (2005) Sodium nitroprusside-induced osteoblast apoptosis is mediated by long chain ceramide and is decreased by raloxifene. *Biochem Pharmacol* 69:891–901. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.11.030>
41. Kitajima I, Soejima Y, Takasaki I et al. (1996) Ceramide-induced nuclear translocation of NF- κ B is a potential mediator of the apoptotic response to TNF- α in murine clonal osteoblasts. *Bone* 19:263–270. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(96\)00181-0](https://doi.org/10.1016/8756-3282(96)00181-0)
42. Hill PA, Tumber A (2010) Ceramide-induced cell death/survival in murine osteoblasts. *J Endocrinol* 206:225–233. <https://doi.org/10.1677/JOE-10-0068>
43. Takeda H, Ozaki K, Yasuda H et al. (1998) Sphingomyelinase and ceramide inhibit formation of F-actin ring in and bone resorption by rabbit mature osteoclasts. *FEBS Letters* 422:255–258. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00005-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00005-2)

44. Lee SE, Chung WJ, Kwak HB et al. (2001) Tumor necrosis factor- α supports the survival of osteoclasts through the activation of Akt and ERK. *Journal of Biological Chemistry* 276:49343–49349. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103642200>
45. Iwamoto T, Fukumoto S, Kanaoka K et al. (2001) Lactosylceramide is essential for the osteoclastogenesis mediated by macrophage-colony-stimulating factor and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand. *Journal of Biological Chemistry* 276:46031–46038. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104464200>
46. Amigo L, Mendoza H, Castro J et al. (2002) Relevance of Niemann-Pick type C1 protein expression in controlling plasma cholesterol and biliary lipid secretion in mice. *Hepatology* 36:819–828. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.35617>
47. Tängemo C, Weber D, Theiss S et al. (2011) Niemann-Pick Type C disease: characterizing lipid levels in patients with variant lysosomal cholesterol storage. *J Lipid Res* 52:813–825. <https://doi.org/10.1194/jlr.P013524>
48. Makovey J, Chen JS, Hayward C et al. (2009) Association between serum cholesterol and bone mineral density. *Bone* 44:208–213. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.09.020>
49. Yamauchi M, Yamaguchi T, Nawata K et al. (2015) Increased low-density lipoprotein cholesterol level is associated with non-vertebral fractures in postmenopausal women. *Endocrine* 48:279–286. <https://doi.org/10.1007/s12020-014-0292-0>
50. Yin W, Li Z, Zhang W (2019) Modulation of bone and marrow niche by cholesterol. *Nutrients* 11. <https://doi.org/10.3390/nu11061394>
51. Lukas J, Cozma C, Yang F et al. (2017) Glucosylsphingosine causes hematological and visceral changes in mice-evidence for a pathophysiological role in gaucher disease. *International Journal of Molecular Sciences* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18102192>
52. Chan B, Adam DN (2018) A review of fabry disease. *Skin Therapy Letter* 23:4–6, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29562089/>
53. Arends M, Wanner C, Hughes D et al. (2017) Characterization of classical and nonclassical fabry disease: A Multicenter Study. *J Am Soc Nephrol* 28:1631–1641. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016090964>
54. Ries M, Moore DF, Robinson CJ et al. (2006) Quantitative dysmorphology assessment in fabry disease. *Genet Med* 8:96–101. <https://doi.org/10.1097/01.gim.0000200950.25118.dd>

55. Lyon MF (2002) X-chromosome inactivation and human genetic disease. *Acta Paediatr Suppl* 91:107–112. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2002.tb03120.x>
56. Lang FM, Korner P, Harnett M et al. (2020) The natural history of type 1 infantile GM1 gangliosidosis: A literature-based meta-analysis. *Mol Genet Metab* 129:228–235. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.12.012>
57. Nicoli E-R, Annunziata I, d'Azzo A et al. (2021) GM1 gangliosidosis-a mini-review. *Front Genet* 12:734878. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.734878>
58. PubChem (2023) Monosialoganglioside GM1. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Monosialoganglioside-GM1>.
59. Ferreira CR, Regier DS, Yoon R et al. (2020) The skeletal phenotype of intermediate GM1 gangliosidosis: clinical, radiographic and densitometric features, and implications for clinical monitoring and intervention. *Bone* 131:115142. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.115142>
60. Rha AK, Maguire AS, Martin DR (2021) GM1 gangliosidosis: mechanisms and management. *Appl Clin Genet* 14:209–233. <https://doi.org/10.2147/TACG.S206076>
61. Xiao C, Tiffit C, Toro C. Sandhoff disease. (2022) In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2025. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579484/>
62. Eguchi I, Wakamatsu N, Nakano R et al. (1993) Lysosome disease--Sandhoff disease. *Nihon Rinsho* 51:2276–2280
63. McGovern MM, Wasserstein MP, Giugliani R et al. (2008) A prospective, cross-sectional survey study of the natural history of Niemann-Pick disease type B. *Pediatrics* 122:e341-9. <https://doi.org/10.1542/peds.2007-3016>
64. Wasserstein M, Godbold J, McGovern MM (2013) Skeletal manifestations in pediatric and adult patients with Niemann Pick disease type B. *J Inherit Metab Dis* 36:123–127. <https://doi.org/10.1007/s10545-012-9503-0>
65. Niemann A. (1914) Ein unbekanntes Krankheitsbild. *Jahrbuch für Kinderheilkunde*. Nr. 79, 1914. S. 1–10
66. Gucev Z, Tasic V, Pop-Jordanova N et al. (2013) Two siblings with Niemann-Pick disease (NPD) type B: clinical findings and novel mutations of the acid sphingomyelinase gene. *Indian J Pediatr* 80:163–164. <https://doi.org/10.1007/s12098-012-0717-9>

67. McGovern MM, Aron A, Brodie SE et al. (2006) Natural history of type A Niemann-Pick disease: possible endpoints for therapeutic trials. *Neurology* 66:228–232. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000194208.08904.0c>
68. Pentchev PG, Comly ME, Kruth HS et al. (1985) A defect in cholesterol esterification in Niemann-Pick disease (type C) patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:8247–8251. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.23.8247>
69. Kirkegaard T, Roth AG, Petersen NHT et al. (2010) Hsp70 stabilizes lysosomes and reverts Niemann-Pick disease-associated lysosomal pathology. *Nature* 463:549–553. <https://doi.org/10.1038/nature08710>
70. Chuang W-L, Pacheco J, Cooper S et al. (2014) Lyso-sphingomyelin is elevated in dried blood spots of Niemann-Pick B patients. *Mol Genet Metab* 111:209–211. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.11.012>
71. Pick L (1927) Über die lipoidzellige splenohepatomegalie typus Niemann-Pick als stoffwechselerkrankung, *Méd. Kline*, 23, 1483.
72. Pick L (1933) Niemann–Pick's disease and other forms of so called xanthomatosis, *The American Journal of the Medical Sciences*, DOI:10.1097/00000441-193305000-00001
73. Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D., Childs, B., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (2001) *The metabolic and molecular bases of inherited disease.*, 8. Auflage., McGraw-Hill, New-York, *Biochemistry (Moscow)* 67, 611–612, <https://doi.org/10.1023/A:1017418800320>
74. Wasserstein MP, Desnick RJ, Schuchman EH et al. (2004) The natural history of type B Niemann-Pick disease: results from a 10-year longitudinal study. *Pediatrics* 114:e672-7. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-0887>
75. Hollak CEM, Sonnaville ESV de, Cassiman D et al. (2012) Acid sphingomyelinase (Asm) deficiency patients in the netherlands and belgium: disease spectrum and natural course in attenuated patients. *Mol Genet Metab* 107:526–533. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.06.015>
76. Van Gool R, et al. (2024) Characterization of central manifestations in patients with Niemann-Pick disease type C. *Genet Med* (3):101053. doi: 10.1016/j.gim.2023.10105377.

77. Wheeler S, Sillence DJ (2020) Niemann-Pick type C disease: cellular pathology and pharmacotherapy. *Journal of Neurochemistry* 153:674–692. <https://doi.org/10.1111/jnc.14895>
78. Cougnoux A, Cluzeau C, Mitra S et al. (2016) Necroptosis in Niemann-Pick disease, type C1: a potential therapeutic target. *Cell Death Dis* 7:e2147. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.16>
79. Spiegel R, Raas-Rothschild A, Reish O et al. (2009) The clinical spectrum of fetal Niemann-Pick type C. *Am J Med Genet A* 149A:446–450. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32642>
80. Orphanet (2025) ORPHA:646 Niemann-Pick-Krankheit Typ C; Klinische Zeichen und Symptome, <https://www.orpha.net/de/disease/sign/646>
81. Bonnot O, Klünemann H-H, Velten C et al. (2019) Systematic review of psychiatric signs in Niemann-Pick disease type C. *World J Biol Psychiatry* 20:320–332. <https://doi.org/10.1080/15622975.2018.1441548>
82. Berzina Z, Solanko LM, Mehadi AS et al. (2018) Niemann-Pick C2 protein regulates sterol transport between plasma membrane and late endosomes in human fibroblasts. *Chemistry and Physics of Lipids* 213:48–61. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2018.03.006>
83. Carstea ED, Morris JA, Coleman KG et al. (1997) Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* 277:228–231. <https://doi.org/10.1126/science.277.5323.228>
84. Choudhury A, Sharma DK, Marks DL et al. (2004) Elevated endosomal cholesterol levels in Niemann-Pick cells inhibit rab4 and perturb membrane recycling. *Molecular Biology of the Cell* 15:4500–4511. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04-05-0432>
85. Tharkeshwar AK, Trekker J, Vermeire W et al. (2017) A novel approach to analyze lysosomal dysfunctions through subcellular proteomics and lipidomics: the case of NPC1 deficiency. *Scientific Reports* 7:41408. <https://doi.org/10.1038/srep41408>
86. Levitan I, Singh DK, Rosenhouse-Dantsker A (2014) Cholesterol binding to ion channels. *Frontiers in Physiology* 5:65. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00065>
87. Wheeler S, Schmid R, Sillence DJ (2019) Lipid-protein interactions in Niemann-Pick type C disease: insights from molecular modeling. *International Journal of Molecular Sciences* 20:717. <https://doi.org/10.3390/ijms20030717>

88. Rocha N, Kuijl C, van der Kant R et al. (2009) Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150 Glued and late endosome positioning. *J Cell Biol* 185:1209–1225. <https://doi.org/10.1083/jcb.200811005>
89. Wheeler S, Haberkant P, Bhardwaj M et al. (2019) Cytosolic glucosylceramide regulates endolysosomal function in Niemann-Pick type C disease. *Neurobiology of Disease* 127:242–252. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.03.005>
90. Chakraborty K, Leung K, Krishnan Y (2017) High luminal chloride in the lysosome is critical for lysosome function. *eLife* 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.28862>
91. Lebrand C, Corti M, Goodson H et al. (2002) Late endosome motility depends on lipids via the small GTPase Rab7. *The EMBO Journal* 21:1289–1300. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.6.1289>
92. van der Poel S, Wolthoorn J, van den Heuvel D et al. (2011) Hyperacidification of trans-Golgi network and endo/lysosomes in melanocytes by glucosylceramide-dependent V-ATPase activity. *Traffic* 12:1634–1647. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01263.x>
93. Engberg O, Yasuda T, Hautala V et al. (2016) Lipid interactions and organization in complex bilayer membranes. *Biophysical Journal* 110:1563–1573. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.12.043>
94. Picas L, Gaits-Iacovoni F, Goud B (2016) The emerging role of phosphoinositide clustering in intracellular trafficking and signal transduction. *F1000Research* 5:422. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7537.1>
95. Sandhoff R, Sandhoff K (2018) Emerging concepts of ganglioside metabolism. *FEBS Letters* 592:3835–3864. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13114>
96. Las Heras M, Szenfeld B, Ballout RA et al. (2023) Understanding the phenotypic variability in Niemann-Pick disease type C (NPC): a need for precision medicine. *NPJ Genom Med* 8:21. <https://doi.org/10.1038/s41525-023-00365-w>
97. Yerushalmi B, Sokol RJ, Narkewicz MR et al. (2002) Niemann-pick disease type C in neonatal cholestasis at a North American Center. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 35:44–50. <https://doi.org/10.1097/00005176-200207000-00011>
98. Kelly DA, Portmann B, Mowat AP et al. (1993) Niemann-Pick disease type C: diagnosis and outcome in children, with particular reference to liver disease. *J Pediatr* 123:242–247. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(05\)81695-6](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(05)81695-6)

99. Seker Yilmaz B, Baruteau J, Rahim AA et al. (2020) Clinical and molecular features of early infantile Niemann Pick Type C disease. *International Journal of Molecular Sciences* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21145059>
100. Bolton SC, Soran V, Marfa MP et al. (2022) Clinical disease characteristics of patients with Niemann-Pick Disease Type C: findings from the international Niemann-Pick disease registry (INPDR). *Orphanet J Rare Dis* 17:51. <https://doi.org/10.1186/s13023-022-02200-4>
101. Vanier MT (2010) Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis* 5:16. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-16>
102. Lee S-Y, Lee HJ, Kim SH et al. (2016) Two siblings with adolescent/adult onset Niemann-Pick Disease type C in Korea. *J Korean Med Sci* 31:1168–1172. <https://doi.org/10.3346/jkms.2016.31.7.1168>
103. Maubert A, Hanon C, Metton J-P (2013) Maladie de Niemann-Pick de type C chez l'adulte et troubles psychiatriques : revue de littérature (Adult onset Niemann-Pick type C disease and psychosis: literature review). *Encephale* 39:315–319. <https://doi.org/10.1016/j.encep.2013.04.013>
104. Typ C – Niemann-Pick Selbsthilfegruppe e.V. (2022) <https://niemann-pick-selbsthilfegruppe.de/krankheitsbild/typ-c/#tab-1473>.
105. Ohara S, Ukita Y, Ninomiya H et al. (2004) Degeneration of cholecystinin-immunoreactive afferents to the VPL thalamus in a mouse model of Niemann-Pick disease type C. *Brain Res* 1022:244–246. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.06.037>
106. Loftus SK, Erickson RP, Walkley SU et al. (2002) Rescue of neurodegeneration in Niemann-Pick C mice by a prion-promoter-driven *Npc1* cDNA transgene. *Hum Mol Genet* 11:3107–3114. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.24.3107>
107. Luan Z, Saito Y, Miyata H et al. (2008) Brainstem neuropathology in a mouse model of Niemann-Pick disease type C. *J Neurol Sci* 268:108–116. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.11.018>
108. Sarna JR, Larouche M, Marzban H et al. (2003) Patterned Purkinje cell degeneration in mouse models of Niemann-Pick type C disease. *J Comp Neurol* 456:279–291. <https://doi.org/10.1002/cne.10522>

109. Hovakimyan M, Meyer A, Lukas J et al. (2013) Olfactory deficits in Niemann-Pick type C1 (NPC1) disease. *PLoS One* 8:e82216. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082216>
110. Platt FM, Neises GR, Dwek RA et al. (1994) N-butyldeoxynojirimycin is a novel inhibitor of glycolipid biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 269:8362–8365, [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(17\)37202-2/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(17)37202-2/pdf)
111. Lachmann RH, te Vrugte D, Lloyd-Evans E et al. (2004) Treatment with miglustat reverses the lipid-trafficking defect in Niemann-Pick disease type C. *Neurobiology of Disease* 16:654–658. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.05.002>
112. Patterson MC, Vecchio D, Prady H et al. (2007) Miglustat for treatment of Niemann-Pick C disease: a randomised controlled study. *Lancet Neurol* 6:765–772. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70194-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70194-1)
113. Wraith JE, Vecchio D, Jacklin E et al. (2010) Miglustat in adult and juvenile patients with Niemann-Pick disease type C: long-term data from a clinical trial. *Mol Genet Metab* 99:351–357. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2009.12.006>
114. Griffin LD, Gong W, Verot L et al. (2004) Niemann-Pick type C disease involves disrupted neurosteroidogenesis and responds to allopregnanolone. *Nat Med* 10:704–711. <https://doi.org/10.1038/nm1073>
115. Jang J, Yaksh TL, Hill HF (1992) Use of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin as an intrathecal drug vehicle with opioids. *J Pharmacol Exp Ther* 261:592–600, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1349642/>
116. Yaksh TL, Jang JD, Nishiuchi Y et al. (1991) The utility of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin as a vehicle for the intracerebral and intrathecal administration of drugs. *Life Sci* 48:623–633. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(91\)90537-I](https://doi.org/10.1016/0024-3205(91)90537-I)
117. Davidson CD, Ali NF, Micsenyi MC et al. (2009) Chronic cyclodextrin treatment of murine Niemann-Pick C disease ameliorates neuronal cholesterol and glycosphingolipid storage and disease progression. *PLoS One* 4:e6951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006951>
118. Liu B, Li H, Repa JJ et al. (2008) Genetic variations and treatments that affect the lifespan of the NPC1 mouse. *J Lipid Res* 49:663–669. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700525-JLR200>
119. Liu B, Turley SD, Burns DK et al. (2009) Reversal of defective lysosomal transport in NPC disease ameliorates liver dysfunction and neurodegeneration in the npc1-/-

- mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:2377–2382.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0810895106>
120. Liu B, Ramirez CM, Miller AM et al. (2010) Cyclodextrin overcomes the transport defect in nearly every organ of NPC1 mice leading to excretion of sequestered cholesterol as bile acid. *J Lipid Res* 51:933–944.
<https://doi.org/10.1194/jlr.M000257>
121. Tanaka Y, Yamada Y, Ishitsuka Y et al. (2015) Efficacy of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in Niemann-Pick disease type C model mice and its pharmacokinetic analysis in a patient with the disease. *Biol Pharm Bull* 38:844–851.
<https://doi.org/10.1248/bpb.b14-00726>
122. Ramirez CM, Liu B, Taylor AM et al. (2010) Weekly cyclodextrin administration normalizes cholesterol metabolism in nearly every organ of the Niemann-Pick type C1 mouse and markedly prolongs life. *Pediatr Res* 68:309–315.
<https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181ee4dd2>
123. Mengel E, Patterson MC, Da Riol RM et al. (2021) Efficacy and safety of arimoclomol in Niemann-Pick disease type C: Results from a double-blind, randomised, placebo-controlled, multinational phase 2/3 trial of a novel treatment. *J Inherit Metab Dis* 44:1463–1480. <https://doi.org/10.1002/jimd.12428>
124. Tiff CJ (2024) N-Acetyl-L-Leucine and neurodegenerative disease. *The New England journal of medicine* 390:467–470. <https://doi.org/10.1056/NEJMe2313791>
125. Strupp M, Teufel J, Habs M et al. (2013) Effects of acetyl-DL-leucine in patients with cerebellar ataxia: a case series. *Journal of neurology* 260:2556–2561.
<https://doi.org/10.1007/s00415-013-7016-x>
126. Lloyd-Evans E, Morgan AJ, He X et al. (2008) Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nat Med* 14:1247–1255. <https://doi.org/10.1038/nm.1876>
127. Lloyd-Evans E, Platt FM (2010) Lipids on trial: the search for the offending metabolite in Niemann-Pick type C disease. *Traffic* 11:419–428.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01032.x>
128. Newton J, Palladino END, Weigel C et al. (2020) Targeting defective sphingosine kinase 1 in Niemann-Pick type C disease with an activator mitigates cholesterol accumulation. *J Biol Chem* 295:9121–9133.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.012659>

129. Maceyka M, Spiegel S (2014) Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature* 510:58–67. <https://doi.org/10.1038/nature13475>
130. Newton J, Milstien S, Spiegel S (2018) Niemann-Pick type C disease: The atypical sphingolipidosis. *Adv Biol Regul* 70:82–88. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2018.08.001>
131. Oninla VO, Breiden B, Babalola JO et al. (2014) Acid sphingomyelinase activity is regulated by membrane lipids and facilitates cholesterol transfer by NPC2. *J Lipid Res* 55:2606–2619. <https://doi.org/10.1194/jlr.M054528>
132. Lee H, Lee JK, Park MH et al. (2014) Pathological roles of the VEGF/SphK pathway in Niemann-Pick type C neurons. *Nat Commun* 5:5514. <https://doi.org/10.1038/ncomms6514>
133. W. M. S. Russell, R. L. Burch (1959) *The principles of humane experimental technique*. London: Methuen & Co. Limited, Disponível em: <<https://caat.jhsph.edu/wp-content/uploads/2024/01/addendum.docx>>.
134. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldborg RE, Jepsen KJ, Müller R. (2010) Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010 Jul;25(7):1468-86. <https://doi.org/10.1002/jbmr.141>
135. Taylor AM, Bordoni B. (2023) Histology, blood vascular system. 2023 May 1. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan–. PMID: 31985998. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553217/>
136. U.S. Food and Drug Administration (2024) Miplyffa (arimoclomol) prescribing information. Silver Spring (MD). Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drug-satfda_docs/label/2024/214927s000lbl.pdf
137. Holzmann C, Witt M, Rolfs A et al. (2021) Gender-specific effects of two treatment strategies in a mouse model of Niemann-Pick disease type C1. *International Journal of Molecular Sciences* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22052539>
138. Vöikar V, Rauvala H, Ikonen E (2002) Cognitive deficit and development of motor impairment in a mouse model of Niemann-Pick type C disease. *Behav Brain Res* 132:1–10. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(01\)00380-1](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(01)00380-1)
139. Morris MD, Bhuvaneshwaran C, Shio H et al. (1982) Lysosome lipid storage disorder in NCTR-BALB/c mice. I. Description of the disease and genetics. *Am J Pathol* 108:140–149. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1916082/>

140. Roderick TH, Wimer RE, Wimer CC et al. (1973) Genetic and phenotypic variation in weight of brain and spinal cord between inbred strains of mice. *Brain Res* 64:345–353. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(73\)90188-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(73)90188-1)
141. Goker-Alpan O (2011) Therapeutic approaches to bone pathology in Gaucher disease: past, present and future. *Mol Genet Metab* 104:438–447. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.08.004>
142. Jilka RL (2013) The relevance of mouse models for investigating age-related bone loss in humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 68:1209–1217. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt046>
143. Jones H, Steart PV, Du Boulay CE et al. (1990) Alpha-smooth muscle actin as a marker for soft tissue tumours: a comparison with desmin. *J Pathol* 162:29–33. <https://doi.org/10.1002/path.1711620107>
144. Apte RS, Chen DS, Ferrara N (2019) VEGF in signaling and disease: beyond discovery and development. *Cell* 176:1248–1264. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.021>
145. Lane NE, Nyman JS, Uppuganti S et al. (2019) Inhibition of vascular endothelial growth factor in young adult mice causes low bone blood flow and bone strength with no effect on bone mass in trabecular regions. *Bone Rep* 10:100210. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2019.100210>
146. Chen H, Kubo K (2012) Segmental variations in trabecular bone density and microstructure of the spine in senescence-accelerated mouse (SAMP6): a murine model for senile osteoporosis. *Experimental gerontology* 47:317–322. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2012.01.005>
147. Chen H, Zhou X, Emura S et al. (2009) Site-specific bone loss in senescence-accelerated mouse (SAMP6): a murine model for senile osteoporosis. *Experimental gerontology* 44:792–798. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2009.09.009>
148. Wehrli FW, Gomberg BR, Saha PK et al. (2001) Digital topological analysis of in vivo magnetic resonance microimages of trabecular bone reveals structural implications of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 16:1520–1531. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.8.1520>
149. Shim J, Iwaya C, Ambrose CG et al. (2022) Micro-computed tomography assessment of bone structure in aging mice. *Scientific Reports* 12:8117. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11965-4>

150. Mashiatulla M, Ross RD, Sumner DR (2017) Validation of cortical bone mineral density distribution using micro-computed tomography. *Bone* 99:53–61. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.03.049>
151. Tan J, Labrinidis A, Williams R et al. (2022) Micro-CT-based bone microarchitecture analysis of the murine skull. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2403:129–145. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1847-9_10
152. Hughes D, Mikosch P, Belmatoug N et al. (2019) Gaucher disease in bone: from pathophysiology to practice. *J Bone Miner Res* 34:996–1013. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3734>
153. Germain DP, Benistan K, Boutouyrie P et al. (2005) Osteopenia and osteoporosis: previously unrecognized manifestations of Fabry disease. *Clin Genet* 68:93–95. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2005.00457.x>
154. Talbot A, Ghali JR, Nicholls K (2014) Antiepileptic medications increase osteoporosis risk in male fabry patients: bone mineral density in an Australian cohort. *JIMD Rep* 17:29–36. https://doi.org/10.1007/8904_2014_328
155. McNulty MA, Prevatt PB, Nussbaum ER et al. (2020) Abnormal epiphyseal development in a feline model of Sandhoff disease. *J Orthop Res* 38:2580–2591. <https://doi.org/10.1002/jor.24803>
156. Zervas M, Dobrenis K, Walkley SU (2001) Neurons in Niemann-Pick disease type C accumulate gangliosides as well as unesterified cholesterol and undergo dendritic and axonal alterations. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:49–64. <https://doi.org/10.1093/jnen/60.1.49>
157. Pentchev PG, Gal AE, Booth AD et al. (1980) A lysosomal storage disorder in mice characterized by a dual deficiency of sphingomyelinase and glucocerebrosidase. *Biochim Biophys Acta* 619:669–679. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(80\)90116-2](https://doi.org/10.1016/0005-2760(80)90116-2)
158. Vanier MT (1983) Biochemical studies in niemann-pick disease I. Major sphingolipids of liver and spleen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 750:178–184. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(83\)90218-7](https://doi.org/10.1016/0005-2760(83)90218-7)
159. te Vruchte D, Lloyd-Evans E, Veldman RJ et al. (2004) Accumulation of glycosphingolipids in Niemann-Pick C disease disrupts endosomal transport. *Journal of Biological Chemistry* 279:26167–26175. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311591200>

160. Polo G, Burlina AP, Kolamunnage TB et al. (2017) Diagnosis of sphingolipidoses: a new simultaneous measurement of lysosphingolipids by LC-MS/MS. *Clin Chem Lab Med* 55:403–414. <https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0340>
161. Elstein D, Hollak C, Aerts JMFG et al. (2004) Sustained therapeutic effects of oral miglustat (Zavesca, N-butyldeoxynojirimycin, OGT 918) in type I Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis* 27:757–766. <https://doi.org/10.1023/B:BOLI.0000045756.54006.17>
162. Pastores GM, Elstein D, Hrebíček M et al. (2007) Effect of miglustat on bone disease in adults with type 1 Gaucher disease: a pooled analysis of three multinational, open-label studies. *Clin Ther* 29:1645–1654. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2007.08.006>
163. Kantner I, Erben RG (2012) Long-term parenteral administration of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin causes bone loss. *Toxicol Pathol* 40:742–750. <https://doi.org/10.1177/0192623312441405>
164. Diaz GA, Giugliani R, Guffon N et al. (2022) Long-term safety and clinical outcomes of olipudase alfa enzyme replacement therapy in pediatric patients with acid sphingomyelinase deficiency: two-year results. *Orphanet J Rare Dis* 17:437. <https://doi.org/10.1186/s13023-022-02587-0>
165. Erickson RP, Garver WS, Camargo F et al. (2000) Pharmacological and genetic modifications of somatic cholesterol do not substantially alter the course of CNS disease in Niemann-Pick C mice. *J Inherit Metab Dis* 23:54–62. <https://doi.org/10.1023/a:1005650930330>
166. Patterson MC, Di Bisceglie AM, Higgins JJ et al. (1993) The effect of cholesterol-lowering agents on hepatic and plasma cholesterol in Niemann-Pick disease type C. *Neurology* 43:61–64. https://doi.org/10.1212/wnl.43.1_part_1.61
167. Taylor AM, Liu B, Mari Y et al. (2012) Cyclodextrin mediates rapid changes in lipid balance in *Npc1*^{-/-} mice without carrying cholesterol through the bloodstream. *J Lipid Res* 53:2331–2342. <https://doi.org/10.1194/jlr.M028241>
168. Hildebrand TO, Rügsegger P (1997) Quantification of bone microarchitecture with the structure model index. *Comput Methods Biomech Biomed Engin* 1:15–23. <https://doi.org/10.1080/01495739708936692>

169. Chen H, Zhou X, Fujita H et al. (2013) Age-related changes in trabecular and cortical bone microstructure. *Int J Endocrinol* 2013:213234.
<https://doi.org/10.1155/2013/213234>
170. Ding M, Hvid I (2000) Quantification of age-related changes in the structure model type and trabecular thickness of human tibial cancellous bone. *Bone* 26:291–295.
[https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(99\)00281-1](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(99)00281-1)
171. Vite CH, Bagel JH, Swain GP et al. (2015) Intracisternal cyclodextrin prevents cerebellar dysfunction and Purkinje cell death in feline Niemann-Pick type C1 disease. *Sci Transl Med* 7:276ra26. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3010101>
172. Roff CF, Strauss JF, Goldin E et al. (1993) The murine Niemann-Pick type C lesion affects testosterone production. *Endocrinology* 133:2913–2923.
<https://doi.org/10.1210/endo.133.6.8243319>
173. Gérvy NY, Murphy BD (2002) The role and regulation of the Niemann-Pick C1 gene in adrenal steroidogenesis. *Endocr Res* 28:403–412.
<https://doi.org/10.1081/erc-120016815>
174. Bräuer AU, Kuhla A, Holzmann C et al. (2019) Current challenges in understanding the cellular and molecular mechanisms in Niemann-Pick Disease Type C1. *International Journal of Molecular Sciences* 20.
<https://doi.org/10.3390/ijms20184392>
175. Gérvy NY, Lopes FL, Ledoux S et al. (2004) Aberrant intracellular cholesterol transport disrupts pituitary and ovarian function. *Mol Endocrinol* 18:1778–1786.
<https://doi.org/10.1210/me.2003-0323>
176. Cauley JA (2015) Estrogen and bone health in men and women. *Steroids* 99:11–15. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.12.010>
177. Bühling F, Röcken C, Brasch F et al. (2004) Pivotal role of cathepsin K in lung fibrosis. *Am J Pathol* 164:2203–2216. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63777-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63777-7)
178. Lecaille F, Brömme D, Lalmanach G (2008) Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. *Biochimie* 90:208–226. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.08.011>
179. Brömme D, Lecaille F (2009) Cathepsin K inhibitors for osteoporosis and potential off-target effects. *Expert Opin Investig Drugs* 18:585–600.
<https://doi.org/10.1517/13543780902832661>

180. Garber K (2016) Two pioneering osteoporosis drugs finally approach approval. *Nat Rev Drug Discov* 15:445–446. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.132>
181. Costa AG, Cusano NE, Silva BC et al. (2011) Cathepsin K: its skeletal actions and role as a therapeutic target in osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol* 7:447–456. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.77>
182. Sun Y, Ishibashi M, Seimon T et al. (2009) Free cholesterol accumulation in macrophage membranes activates Toll-like receptors and p38 mitogen-activated protein kinase and induces cathepsin K. *Circ Res* 104:455–465. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.182568>
183. Li Z, Zhou Z, Saunders MM et al. (2006) Modulation of connexin43 alters expression of osteoblastic differentiation markers. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:C1248-55. <https://doi.org/10.1152/ajpccell.00428.2005>
184. Lecanda F, Towler DA, Ziambaras K et al. (1998) Gap junctional communication modulates gene expression in osteoblastic cells. *Molecular Biology of the Cell* 9:2249–2258. <https://doi.org/10.1091/mbc.9.8.2249>
185. Lecanda F, Warlow PM, Sheikh S et al. (2000) Connexin43 deficiency causes delayed ossification, craniofacial abnormalities, and osteoblast dysfunction. *Journal of Cell Biology* 151:931–944. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.4.931>
186. Lecanda F, Warlow PM, Sheikh S et al. (2000) Connexin43 deficiency causes delayed ossification, craniofacial abnormalities, and osteoblast dysfunction. *Journal of Cell Biology* 151:931–944. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.4.931>
187. Zhang YW, Morita I, Ikeda M et al. (2001) Connexin43 suppresses proliferation of osteosarcoma U2OS cells through post-transcriptional regulation of p27. *Oncogene* 20:4138–4149. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204563>
188. Gramsch B, Gabriel HD, Wiemann M et al. (2001) Enhancement of connexin 43 expression increases proliferation and differentiation of an osteoblast-like cell line. *Exp Cell Res* 264:397–407. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.5145>
189. Johnson KA, Hesse L, Vaingankar S et al. (2000) Osteoblast tissue-nonspecific alkaline phosphatase antagonizes and regulates PC-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R1365-77. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.4.R1365>
190. Fraser D (1957) Hypophosphatasia. *Am J Med* 22:730–746. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(57\)90124-9](https://doi.org/10.1016/0002-9343(57)90124-9)

191. Whyte MP, Wenkert D, Zhang F (2016) Hypophosphatasia: Natural history study of 101 affected children investigated at one research center. *Bone* 93:125–138. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.08.019>
192. Nawawi HM, Yazid TN, Ismail NM et al. (2001) Serum bone specific alkaline phosphatase and urinary deoxypyridinoline in postmenopausal osteoporosis. *The Malaysian journal of pathology* 23:79–88, https://mjpath.org.my/past_issue/MJP2001.2/postmenopausal-osteoporosis.pdf
193. Ludwig J, Mechtersheimer G, Haberkorn U et al. (2005) Onkogene Osteomalazie bei einer 49-jährigen Patientin (Oncogenic osteomalacia in a 49-year-old female patient). *Deutsche medizinische Wochenschrift* (1946) 130:206–209. <https://doi.org/10.1055/s-2005-837403>
194. Goltzman D (2018) Functions of vitamin D in bone. *Histochem Cell Biol* 149:305–312. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1648-y>
195. Ebner L, Gläser A, Bräuer A et al. (2018) Evaluation of two liver treatment strategies in a mouse model of Niemann-Pick-disease type C1. *International Journal of Molecular Sciences* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19040972>
196. Fenomanana J, Harzallah I, Martzloff L et al. (2020) Sea-blue histiocytes in the bone marrow of a patient with Niemann-Pick disease type C2. *Ann Biol Clin (Paris)* 78:463–464. <https://doi.org/10.1684/abc.2020.1569>
197. Wang L, Sun J, Xu X et al. (2020) A progressive neurological condition with acquired sea-blue histiocytosis further the diagnosis of Niemann-Pick type C1 in a 10-year-old boy. *Indian J Pathol Microbiol* 63:312–314. https://doi.org/10.4103/IJPM.IJPM_728_19

9 ANHANG

9.1 UMFRAGE KNOCHENSTATUS BEI NPC

Experimentelle Unfallchirurgie, Aulweg 128, 35392 Gießen

apl Prof. Dr. Katrin Susanne Lips
Experimentelle Unfallchirurgie
Medizinisches Forschungszentrum (ForMED)
Aulweg 128, 35392 Gießen
Fon: +49 641 99-30580 | Fax: +49 641 99-30589
Katrin.S.Lips@chiru.med.uni-giessen.de
www.uni-giessen.de/fbz/fb11/institute/klinik/chirurgie/uch/forschung/KSLips

03. November. 2021

Patienteninformation und Einwilligung zum Forschungsvorhaben „Untersuchung des Knochenstatus bei Morbus Niemann-Pick Typ C“

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient, sehr geehrte Studienteilnehmer*innen,

wir von der experimentellen Unfallchirurgie Gießen führen derzeit eine Studie durch, bei der wir den Knochenstatus bei Patienten mit Morbus Niemann-Pick-Typ C untersuchen. Daher würden wir Sie um Ihre Einwilligung zur Teilnahme an dieser wissenschaftlichen Untersuchung bitten.

Die experimentelle Unfallchirurgie ist eine nach ISO 9001:2015 zertifizierte Forschungseinrichtung der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des Universitätsklinikum Gießen. Die seit 1995 bestehende Experimentelle Unfallchirurgie wird von Prof. Dr. Katrin Susanne Lips geleitet. Derzeit werden dort auf einer Gesamtfläche von 500 m² ca. 8 wissenschaftliche Angestellte, sowie mehrere ärztliche Mitarbeiter*innen der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, und Wiederherstellungschirurgie beschäftigt sowie eine Vielzahl von medizinischen Doktoranden ausgebildet.

Ausführlichere Informationen zur Studie erhalten Sie im Folgenden.

Für Ihre Rückmeldung ist lediglich der beiliegende Fragebogen auszufüllen und mit Hilfe des beiliegenden frankierten Rückumschlags zurückzusenden.

Die Studie wird von Frau Prof. Dr. Lips und Herrn Nick Mattern durchgeführt. Frau Prof. Dr. Lips ist die Leiterin der Experimentellen Unfallchirurgie. Sie leitet eine Vielzahl an Projekten in den Fachgebieten Unfallchirurgie, Regeneration, Osteologie, Zellbiologie, Anatomie, Materialwissenschaften und Toxikologie und konnte bereits eine Reihe wissenschaftlicher Publikationen veröffentlichen. Der Schwerpunkt ihrer Arbeiten liegt auf der Identifizierung molekularer und zellulärer Mechanismen von Erkrankungen, bei denen das muskuloskeletale

System mitbetroffen ist. Herr Nick Mattern ist Student und Doktorand der Humanmedizin an der Justus-Liebig Universität Gießen und beschäftigt sich in seiner Dissertation mit den Auswirkungen der bei Morbus Niemann-Pick Typ C anfallenden Lipiden auf den Knochenstatus. Hierbei untersucht er die molekularen Mechanismen des Morbus Niemann-Pick Typ C in einem Mausmodell. Die Befunde dieser experimentellen Untersuchung möchten wir nun mit Daten von Patienten mit Morbus Niemann-Pick Typ C korrelieren und möchten deshalb um Ihre Mitarbeit bei der hier vorliegenden Umfrage bitten.

Sollten Sie weitere Fragen zu der Untersuchung haben, steht Ihnen als Ansprechpartner Herr Nick Mattern unter folgender E-Mail-Adresse zur Verfügung:

E-Mail: [REDACTED]

Telefon: 0170-3711882

Wir bedanken uns für Ihre wertvoll investierte Zeit, die uns bei der Erforschung des Morbus Niemann-Pick-Typ C Hilft

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. Katrin Lips

Leiterin experimentelle Unfallchirurgie

Nick Mattern

Doktorand experimentelle Unfallchirurgie

Patienteninformation:

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient, sehr geehrte Studienteilnehmer*innen,

Wir von der experimentellen Unfallchirurgie beschäftigen uns in unseren momentan laufenden Forschungsprojekten mit dem Knochenstatus bei Niemann-Pick-Typ C. Unser Projekt befindet sich gerade in der Phase, in der es um Knochenveränderungen bei NPC Erkrankten und nicht-Erkrankten geht. Hierbei liegt auch ein wichtiges Augenmerk auf dem Knochenstatus unter dem Einfluss verschiedener Medikamente, die zur Therapie eingesetzt werden. Ebenso interessant ist es für unsere Forschung, wie sich der Knochenstatus klinisch bei den Betroffenen manifestiert.

Ziel ist es in den Forschungsarbeiten Erkenntnisse über die Auswirkung des Morbus Niemann-Pick Typ C auf den Knochen zu gewinnen. Dabei sollen der individuelle Symptomkomplex und die persönliche Medikation mit in die Auswertung einbezogen werden. Neben der genaueren Erforschung der Krankheit sollen durch die Studie gegebenenfalls weitere Ansätze zur Behandlung und Therapie der Erkrankung gewonnen werden. Dafür benötigen wir bei dieser seltenen Erkrankung Ihre Mitarbeit, indem Sie die beiliegenden Fragebögen ausfüllen und an uns zurücksenden. Ihre Daten werden nach Eingang pseudonymisiert und auch nur in pseudonymisierter Form (d.h. Ihr Name wird durch eine Kenn-Nummer ersetzt) gespeichert, sowie ausschließlich in dieser ausgewertet. Die Daten werden im Tresor der Experimentellen Unfallchirurgie vor fremden Zugriff geschützt. Zugang zu Ihren Daten haben nur Mitarbeiter der Studie. Diese Personen sind zur Verschwiegenheit verpflichtet.

Die personenbezogenen Daten werden nach Ende des Forschungsvorhabens, spätestens jedoch nach 10 Jahren, gelöscht. Die Studienergebnisse werden ohne Bezug zu Ihrer Person (anonymisiert) veröffentlicht.

Ihre Teilnahme an dem Forschungsvorhaben ist ganz und gar freiwillig. Sie können jederzeit und ohne Angabe von Gründen ihr Einverständnis zur Teilnahme zurücknehmen, ohne dass Ihnen hieraus irgendwelche Nachteile entstehen. Sollte Sie Ihre Teilnahme erst dann widerrufen, wenn die statistischen Analysen bereits durchgeführt wurden, wird es nicht mehr möglich sein Ihre bereits verarbeiteten Daten zu löschen. Alle anderen Daten werden natürlich sofort nach Widerruf gelöscht. Die statistischen Analysen und die wissenschaftliche Veröffentlichung (internationale Publikationen, Dissertation) der Ergebnisse erfolgt ausschließlich anonymisiert.

Einwilligungserklärung:

Name des Patienten in Druckbuchstaben

geb. am _____

Ich bin ausführlich und verständlich über die geplante Umfrage und die Bedeutung und Tragweite der klinischen Studien aufgeklärt worden. Ich habe darüber hinaus den Text der Patienteninformation, sowie die darin enthaltene Datenschutzerklärung gelesen und verstanden.

Ich hatte ausreichend Zeit, mich zu entscheiden.

Möglichkeit zu Dokumentation zusätzlicher Fragen seitens des Patienten sind jederzeit schriftlich unter der oben angegebenen Emailadresse oder telefonisch gegeben.

Mir ist bekannt, dass ich jederzeit ohne Angabe von Gründen meine Einwilligung zu Teilnahme an der Umfrage zurückziehen kann (mündlich oder schriftlich), ohne dass mir daraus Nachteile entstehen.

Zusatz zur Studienteilnahme nicht einwilligungsfähiger Personen:

Bitte beachten Sie:

- Hat der Patient, als er noch zustimmungsfähig war, eine Studienteilnahme pauschal abgelehnt so ist diesem Willen selbstverständlich nachzukommen.
- Angehörige können nur über die Studienteilnahme bestimmen, wenn sie zu Betreuern bestellt worden sind.

Fragebogen zu „Knochenstatus bei Morbus Niemann-Pick Typ C

Alter: _____ Geschlecht: _____

Gewicht: _____ Körpergröße: _____

Wann war der Beginn Ihrer Symptome (Bitte ungefähres Datum angeben)?

Unter welchen Symptomen leiden/litten Sie? Zutreffendes bitte ankreuzen:	Ja	Nein	Keine Angabe
Gelbsucht nach der Geburt:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Verzögerte motorische Entwicklung:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vergrößerte Milz:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vergrößerte Leber:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ataxie/Störung der Bewegungskoordination	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vertikale supranukleäre Blickparese/Lähmung der Augenmuskulatur:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Muskelhypotonie/ Mangel an Muskelspannung:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Intellektuelle Behinderung:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Verhaltensstörung:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Krampfanfälle	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kataplexie/Emotionsbedingter Verlust des Muskeltonus:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Psychosen:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Progrediente Demenz:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Epilepsie:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Weitere:			

	Ja	Nein	Keine Angabe
Ist Ihre Gehfähigkeit eingeschränkt?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Leiden Sie unter Gelenkschmerzen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Leiden Sie unter generalisierten Knochenschmerzen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hatten Sie schon einmal einen Knochenbruch?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Wenn ja:			
wie viele?	_____		
Waren die Frakturen die Folge eines Unfalls?	_____		
Gab es bei Probleme bei der Frakturheilung?			
Wenn ja:			
Welche? (z.B.: verzögerte Heilung oder Pseudarthrose)			

Wurde bei Ihnen bereits in Blutuntersuchungen der Calcium- und/oder der Vitamin D-Wert bestimmt?

Wenn ja:

Was waren die Ergebnisse der Untersuchung?

Wenn Frakturen vorlagen, wäre es für unsere Forschung relevant genaueres zur Krankengeschichte zu wissen. Dafür würden wir Sie bitten, uns mitzuteilen wer die behandelnde unfallchirurgische Abteilung war. Des Weiteren wären wir Ihnen sehr verbunden, von Ihnen eine Erlaubnis zu bekommen die Einrichtung zu kontaktieren, um genaueres über die Behandlung zu erfahren.

Behandelnde Unfallchirurgie: _____

Anschrift: _____

Ich willige ein, dass die experimentelle Unfallchirurgie Gießen den Krankheitsverlauf und weitere Daten zum Knochenstatus bei der genannten behandelnden Institution erfragt und die Daten für seine Tätigkeiten im Bereich der Erforschung des Knochenstatus bei Niemann-Pick-Typ C nutzt.

Ort, Datum: _____ Unterschrift: _____

8

Nehmen Sie Miglustatpräparate (z.B. Zavesca®) ein?

Wenn ja:

Seit wann?

Wurde die Behandlung seit Beginn schon unterbrochen?

Sind Ihnen Nebenwirkungen aufgefallen?

Zum Beispiel:

Ja Nein Keine Angabe

Thrombozytopenie/ Blutplättchenarmut

Gewichtsverlust:

Verminderter Appetit:

Magen-Darm-Störungen (insb. Durchfall):

Tremor/Muskelzittern:

Weitere:

Nehmen Sie weitere Medikamente?

Wenn ja welche?

Rauchen Sie?

Ja Nein Keine Angabe

Für Frauen:

Befinden Sie sich in der Menopause?

Leiden Sie an einer weiteren Erkrankung neben Morbus Niemann-Pick Typ C?

Zum Beispiel:

Schilddrüsenerkrankung?

Chronischer Durchfall?

Rheumatische Erkrankungen?

Sonstige:

9

10 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

10.1 KONGRESSBEITRÄGE

N. Mattern, A. Bräuer, A. Wree, C. Heiß, A. Windhorst, K. Lips

Untersuchung des Knochenstatus im murinen Modell bei Niemann-Pick Typ C (NPC).
Vortragspräsentation Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, Sitzung
AB49 Osteologie am 24.10.2023: German Medical Science GMS Publishing House;
2023, DocAB49-2018; doi: 10.3205/23dkou229

N. Mattern, J. Scherberich, A. Bräuer, A. Wree, G. Krombach, C. Heiß, K. Lips

Mikrocomputertomographische Analyse des Knochens im murinen Modell des Niemann-
Pick Typ C1 (NPC). Vortragspräsentation Deutscher Kongress für Orthopädie und Un-
fallchirurgie, Sitzung AB91 Osteoporose am 28.10.2025: German Medical Science GMS
Publishing House; 2025, DocAB91-2047; doi: 10.3205/25dkou568

11 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

12 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, die mich beim Erstellen dieser Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Katrin Lips, für die Betreuung, die fachliche Expertise und die unermüdliche Unterstützung in allen Phasen meiner Arbeit. Ohne Ihr Vertrauen und Ihre Anregungen und Verbesserungsvorschläge wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Weiterhin danke ich meinem gesamten Forschungsteam, insbesondere Herrn Dr. Jan Scherberich, Frau Dr. Anita Windhorst, Frau Ida Oberst, Herrn Rainer Braun und Frau Jessica Steinbart für die wertvollen Diskussionen, die kritische Auseinandersetzung mit meinen Ideen und die kollegiale Zusammenarbeit. Ihre Unterstützung und Ihr Engagement haben maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Ein großer Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Anja Bräuer und Herrn Prof. Andreas Wree, die mir die nötigen Proben für meine Forschungsarbeiten bereitgestellt haben und bei Rückfragen stets bereit waren zu jeder Zeit Abhilfe zu schaffen.

Nicht zuletzt möchte ich Familie und Freunden danken, die mir während dieser herausfordernden Zeit stets zur Seite gestanden haben. Besonders meiner Frau Leonie Mattern, meinem Vater und Schwiegervater Dr. Markus Mattern und Dr. Bernd Schweitzer, sowie meiner Mutter und Schwiegermutter Petra Herold-Mattern und Annette Schweitzer. Des Weiteren meinem Großvater Gerhard Mattern, der den Grundstein gelegt hat und meinem besten Freund und Trauzeugen David Jelin der seit Anbeginn an meiner Seite steht. Auch möchte ich Phil Mattern, Hans-Peter Mattern und Leander Schweitzer danken, die alle drei im gleichen Maße ihr Bestes zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Die Geduld, Motivation und Unterstützung meiner Familie hat mir stets die nötige Kraft gegeben, auch in schwierigen Phasen durchzuhalten.

Diese Dissertation widme ich meiner Frau Leonie, die immer an mich geglaubt und mich auf meinem Weg begleitet hat. Ohne dich wäre ich nicht da, wo ich jetzt stehe.