

DISSERTATION

Reproduzierbarkeit von Tiermodellen
Fallbeispiel eines Modells für Diabetische Retinopathie (DR)
in transgenen TetO-Ratten

Reproducibility of animal models
Case report of a model for diabetic retinopathy (DR) in
transgenic TetO rats

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Inga-Marie Pompös

Erstbetreuer*in: PD Dr. rer. nat. Susanne Wolf

Datum der Promotion: 30.06.2024

Inhalt

Abbildungen	4
Tabellen	4
Abkürzungen	6
1 Abstract	9
2 Wissenschaftlicher Hintergrund	11
2.1 Einsatz von Versuchstieren in Deutschland	11
2.2 Konstruktvalidität von Tiermodellen	12
2.2.1 Induzierte Modelle	13
2.2.2 Spontane Modelle	14
2.2.3 Gentechnisch veränderte Modelle	15
2.2.4 Multifaktorielle Modelle	16
2.3 Einfluss des genetischen Hintergrundes auf die externe Validität	17
2.3.1 Inzuchtstämme	18
2.3.2 Auszuchtstämme	21
2.4 Beeinträchtigung der Reproduzierbarkeit durch haltungsbedingte Faktoren	23
2.4.1 Transport	23
2.4.2 Haltung	24
2.4.3 Enrichment	26
3 Fallbeispiel	28
3.1 Das Krankheitsbild der DR und die gängigsten Tiermodelle	28
3.2 Transgene TetO-Ratten als Modell für Typ 2 Diabetes und DR	34
4 Material und Methoden	37
4.1 Tiere	39
4.2 Probenentnahme für <i>ex vivo</i> Analysen	43
4.3 Immunhistochemie	45
4.3.1 TUNEL Apoptose Assay in Sagittalschnitten	45

4.3.2 HE-Färbung in Sagittalschnitten	46
4.3.3 Färbung mit anti-Nox4 und anti-GFAP in Sagittalschnitten.....	46
4.3.4 DHE-Färbung in Gefrierschnitten	48
4.3.5 Färbung mit anti-Iba1 und Isolectin in Flatmount-Präparaten	49
4.4 Proteinmessung mittels ELISA	50
4.5 Statistik.....	52
5 Ergebnisse	53
5.1 Äußerliche Merkmale systemischer Pathologien	53
5.2 Inflammation	58
5.3 Gefäßpathologie	62
5.4 Degeneration	67
5.5 Proliferation.....	75
5.6 Oxidativer Stress	77
6 Diskussion	83
6.1 Variationen im Versuchsprotokoll	83
6.2. Bakterielle Belastung und Belastungen durch weitere Stressoren	86
6.2.1 Systemischer Nachweis.....	87
6.2.2 Beeinflussung okulärer Befunde	90
6.3 Genetisch bedingte Pathologien	100
7 Zusammenfassung	105
Literatur	114
Eidesstattliche Versicherung	122
Lebenslauf	124
Publikationsliste	125
Danksagung	126
Bescheinigung des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie	128

Abbildungen

Abbildung 1: Experimenteller Ablauf Induktionsphase.	422
Abbildung 2: Experimenteller Ablauf Diabeteszeitraum.....	433
Abbildung 3: Blutspuren im Käfig	544
Abbildung 4: Sektionsbilder der ausgeprägtesten Auffälligkeiten	555
Abbildung 5: Sektionsbilder weiterer Befunde.....	566
Abbildung 6: Auswertung Iba1-positive Zellen.....	59
Abbildung 7: Flatmount-Präparate mit Iba1-positiven Zellen.	600
Abbildung 8: Färbung mit anti-GFAP.	622
Abbildung 9: Überdurchschnittlich weites Gefäß.....	633
Abbildung 10: Vaskularisation retinaler Gefäße in den Glaskörper.	644
Abbildung 11: Retinale Hämorrhagie in der Ganglienzellschicht..	655
Abbildung 12: Isolectin-gefärbte Gefäße im tiefen Gefäßplexus.	666
Abbildung 13: Gefäßassoziierte Isolectin-positive Verdichtung.	677
Abbildung 14: Auswertung apoptotische Zellen (TUNEL-positiv).	688
Abbildung 15: Retinale Sagittalschnitte aus dem TUNEL-Assay.	69
Abbildung 16: Ausreißer TUNEL-Assay.	700
Abbildung 17: Apoptotische Zellen (TUNEL-positiv) unterteilt in Ganglienzellschicht, innere nukleäre Schicht und äußere nukleäre Schicht.	711
Abbildung 18: HE gefärbte retinale Sagittalschnitte.	722
Abbildung 19: Auszählung der retinalen Ganglienzellen.	733
Abbildung 20: Dicke der äußeren nukleären Ebene.	744
Abbildung 21: Degenerative Photorezeptor-Außensegmente..	755
Abbildung 22: Präparate mit ektopen Zellansammlungen.....	766
Abbildung 23: Auftreibungen innerhalb der Ganglienzellschicht.	777
Abbildung 24: ELISA-Messergebnisse Nox4.....	788
Abbildung 25: ELISA-Messergebnisse Nox4 gepoolt.....	79
Abbildung 26: Ganglienzelle mit Nox4-Expression im Zytoplasma.	79
Abbildung 27: Färbung mit anti-Nox4.	800
Abbildung 28: Färbung von ROS (über DHE) in Gefrierschnitten.....	811
Abbildung 29: Auswertung der DHE-Fluoreszenz als IntDen/Zelle.....	822

Tabellen

Tabelle 1: Alphabetische Auflistung der verwendeten Materialien, Geräte und Programme.	377
Tabelle 2: rTdT Inkubations Puffer TUNEL Assay.	455
Tabelle 3: Verwendete Puffer für immunhistochemische Färbung.	477
Tabelle 4: Verwendete Antikörper für die immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten.	488
Tabelle 5: Verwendete Antikörper für die immunhistochemische Färbung von Flatmount-Präparaten.	500
Tabelle 6: Verwendete Lösungen ELISA Assay.	511
Tabelle 7: Untersuchungsprotokoll GIM.	577
Tabelle 8: Qualitative Beurteilung der GFAP-Färbung.	611
Tabelle 9: Qualitative Beurteilung der Nox4-Färbung.	811

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AF	Alexa Fluor
AG	Arbeitsgruppe
ARVO	Association for Research in Vision and Ophthalmology
BASF	Badische Anilin- & Sodafabrik
BB Ratten	Biobreeding Ratten
BCA	Bicinchoninsäure
Bf3R	Deutsches Zentrum zum Schutz von Versuchstieren
BfR	Bundesinstitutes für Risikobewertung
bit	Binary Digit
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
BRB	Blut-Retina-Barriere
BSA	Bovine serum albumin
C57BL/6	Der am häufigsten verwendete Maus-Inzuchtstamm
CBF	Campus Benjamin Franklin
CCL2	C-C motif ligand 2, Chemokin
CCO	Charité Crossover Centers
CD	Cluster of differentiation
Cre-loxP	Cre = causes recombination loxP = locus of crossover (X) des Bakteriophagen P1
CVK	Campus Virchow Klinikum
DNA	Deoxyribonucleic acid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dB	Dezibel
db/db Maus	Diabetische (diabetic) Maus; Mutation des Leptinrezeptor-Genes
DHE	Dihydroethidium
dl	Deziliter
DM	Diabetes Mellitus
DME	Diabetic macular edema
DMSO	Dimethylsulfoxid
DR	Diabetische Retinopathie
dUTP	Deoxyuridine Triphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure or ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERG	Elektroretinographie
ETS	European Treaty Series
EU	Europäische Union
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
FEM	Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin
Fx	Filialgeneration
g	Relative Zentrifugalbeschleunigung
GCL	Ganglion cell layer, Ganglienzellschicht
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GIM	Gesellschaft für innovative Mikroökologie mbH

GS Isolectin	Griffonia simplicifolia Isolectin
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde, Society for Laboratory Animal Science
HE	Hämatoxylin-Eosin
HFD	High fat diet (hochkalorischen Nahrung)
HRP	Horseradish peroxidase
Iba1	Ionisiertes Calcium-bindendes Adaptermolekül 1
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IDF	International Diabetes Federation
IL	Interleukin
INL	Inner nuclear layer, Innere nukleäre Zellschicht
IntDen	Integrated Density
iPATH	Immunpathologie für Experimentelle Modelle, Core Unit
ITCN	Image-based Tool for Counting Nuclei
IVC	Individually ventilated cage
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
Kir4	Kalium inwardly rectifying channel
ko	Gen knock-out
Konz.	Konzentration
LAGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales
Lux	Lichtintensität/Fläche
M/S	Meter pro Sekunde
MCP	Makrophagen-Chemoattraktorprotein
MDC	Max Delbrück Center
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, major histocompatibility complex
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
n	Größe der Stichprobe
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
neg	Negativ
NF-κB	Transkriptionsfaktor 'kappa-light-chain-enhancer' aktivierter B-Zellen
nm	Nanometer
NOD Mäuse	Nonobese diabetic Mäuse
NOX	NADPH-Oxidasen
NPDR	Nicht-proliferative DR
ob/ob Maus	Fettleibige (obese) Maus; Mutation des Leptin-Gens
ONL	Outer nuclear layer, Äußere nukleäre Zellschicht
p	Probability
pAB	Primärantikörper
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDR	Proliferative DR
PFA	Paraformaldehyd
pH	Pondus Hydrogenii
pos	Positiv

PyRAT	Python based Relational Animal Tracking
rd-Allel	Retina-Degenerations-Allel
RGC	Retinale Ganglienzellen
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region of interest
ROP	Retinopathy of prematurity
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies
RPE	Retinales Pigmentepithel
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
rTdT	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, Recombinant
sAB	Sekundärantikörper
SD	Sprague–Dawley Ratte
SET	Stiftung zur Förderung der Erforschung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Einschränkung von Tierversuchen
shRNA	Small hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
SNP	Single nucleotide polymorphism
spp.	Species pluralis
STZ	Streptozotocin
TBS	Tris-buffered saline
TetO	Tetracycline-Controlled Transactivator (Tet-On/Off)
TLR	Toll-like receptor
TMB	3,3',5,5'-3,3,5,5-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor
W	Wochen
ZDF Ratten	Zucker diabetic fatty Ratten
ZEBET	Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz-und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch

1 Abstract

Im Rahmen dieser Arbeit sollte oxidativer Stress als pathologische Komponente der diabetischen Retinopathie (DR) untersucht werden. Im Fokus stand dabei die Frage, ob eine erhöhte Expression von Nox4 (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) - Oxidase 4), durch die Stoffwechsellage eines Typ 2 Diabetes, die Pathogenese der DR initiiert. Zur Testung der Arbeitshypothese wurde ein Modell gewählt, welches einige Jahre zuvor für Untersuchungen der DR charakterisiert wurde¹. Bei dem sogenannten TetO-Modell handelt es sich um transgene Ratten² deren Name sich von dem Tetrazyklin-induzierbaren Knockdown des Insulinrezeptors ableitet (Tetracycline-controlled transactivator, Tet-Off). Die 2017 publizierten ophthalmologischen Ergebnisse¹ sprachen dafür, dass es sich bei dieser transgenen Rattenlinie um ein vielversprechendes neues Modell für DR bei Typ 2 Diabetes handelt.

Im Gegensatz zu bisherigen Anwendungen des Modelles, wurden die Tiere für meine Arbeit erstmals aus verschiedenen Substämmen unterschiedlicher Herkunft importiert. Dabei zeigten die Tiere, die den weitesten Importweg hatten und aus einem Zuchtbereich mit einem höheren Hygienestandard stammten, in unserer experimentellen Haltung eine erhöhte Anfälligkeit für die infektiöse Besiedlung mit Opportunisten. Für diese Gruppe, die überwiegend aus den normoglykämische Kontrolltiere bestand, ergaben die Analysen von oxidativem Stress, Inflammation und Apoptose vielfach einen erhöhten pathologischen Wert gegenüber den hyperglykämischen TetO-Tieren. Darüber hinaus häuften sich Befunde anatomischer Retinaanomalien in den histologischen Proben. Für dieses Modell publizierte Ergebnisse bezüglich einer DR ließen sich nicht reproduzieren und die Arbeitshypothese konnte anhand der gewonnenen Daten nicht getestet werden.

In der vorliegenden Arbeit sollen daher die Aspekte dargelegt werden, die allgemein ein Risiko für die Reproduzierbarkeit und Translation von Tierversuchen darstellen. Dabei wird insbesondere auf die Genetik von Versuchstierlinien eingegangen. Für das beschriebene Fallbeispiel wird diskutiert, ob sich die anatomischen Auffälligkeiten und die beobachtete Immunsuppression möglicherweise auch auf einen Gendrift innerhalb der verwendeten Rattenlinien zurückführen lässt. Die veröffentlichte Arbeit soll dazu beitragen, das Problembewusstsein für die Beeinflussung experimenteller Ergebnisse durch Genetik, Herkunft und Haltung von Versuchstieren zu erhöhen.

This work aimed to investigate oxidative stress as a pathological component of diabetic retinopathy (DR). The focus was on whether increased expression of Nox4 (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase 4) initiates the pathogenesis of DR, due to the metabolic state of type 2 diabetes. To test the hypothesis, a model was chosen that had been characterized several years earlier for studies of DR¹. The so-called TetO model is based on transgenic rats² whose name derives from the tetracycline-inducible knockdown of the insulin receptor (tetracycline-controlled transactivator, Tet-Off). Ophthalmological results published in 2017¹ suggested that this transgenic rat line is a promising new model for DR in type 2 diabetes.

In contrast to previous applications of the model, the animals for my work were imported from different sub-strains of different origins. In this regard, the animals that had the furthest import route and came from breeding with a higher standard of hygiene showed an increased susceptibility to infectious colonization with opportunists in our experimental husbandry. For this group, which consisted predominantly of the normoglycemic control animals, analyses of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in most cases revealed increased pathological levels compared with the hyperglycemic TetO animals. In addition, findings of anatomic retinal abnormalities accumulated in the histologic samples. Results published for this model regarding DR could not be reproduced in my experiments and my working hypothesis could not be tested based on the obtained data.

Therefore, the present work will outline the aspects that generally pose a risk to the reproducibility and translation of animal experiments. In particular, the genetics of experimental animal strains will be addressed. For the case study described, it will be discussed if the anatomical abnormalities and the observed immunosuppression may also be due to gene drift within the used rat strains. My intention in publishing this work is to contribute to increasing awareness of the impact due to genetics, origin, and husbandry of experimental animals on our experimental results.

2 Wissenschaftlicher Hintergrund

Um in das Thema der Reproduzierbarkeit von Tiermodellen einzuleiten, werde ich in dem Kapitel des wissenschaftlichen Hintergrundes zunächst auf den Einsatz von Versuchstieren in Deutschland eingehen, bevor ich versuchstierrelevante Aspekte der Konstruktvalidität, der externen Validität und der Reproduzierbarkeit erläutere.

2.1 Einsatz von Versuchstieren in Deutschland

In Deutschland werden jährlich rund 2 Millionen Tiere für wissenschaftliche Zwecke eingesetzt^{3,4}. Eine sehr hohe Zahl, die nur bei Verwendung von Tiermodellen mit einer hohen Konstruktvalidität, als Grundvoraussetzung für einen Wissensgewinn, gerechtfertigt werden kann. Die Grundlage für die Erhebung der verwendeten Versuchstiere bilden die Angaben der Wissenschaftler*innen, die entsprechend der Versuchstiermeldeverordnung bei den zuständigen Landesbehörden eingehen. In den Jahren 2009 bis 2020 war das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) für die Auswertung dieser gesammelten Daten verantwortlich⁴. Der Jahresbericht für das Jahr 2020 ist die erste Erhebung unter der Verantwortung des Bundesinstitutes für Risikobewertung (BfR), dem die Zuständigkeit 2021 übertragen wurde^{3,4}.

Die Mitgliedsstaaten der Europäischen Union sind seit 1986 (durch die EU-Richtlinie 86/609/Europäische Wirtschaftsgemeinschaft EWG) verpflichtet, den Einsatz von Alternativmethoden zu fördern. In der Bundesrepublik Deutschland wurden zu diesem Zweck verschiedene Maßnahmen ergriffen. Um den Ersatz von Tierversuchen durch alternative Methoden voranzutreiben, wurde beispielsweise die Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET) und das Deutsche Zentrum zum Schutz von Versuchstieren (Bf3R) gegründet. Darüber hinaus werden vom Bund Initiativen wie die Stiftung zur Förderung der Erforschung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Einschränkung von Tierversuchen (SET) oder die jährliche Vergabe des Tierschutzforschungspreises (durch das BMEL) gefördert⁵.

Grundlage dieser Bemühungen ist das 3R-Prinzip, welches 1959 von W.M.S. Russell und R.L. Burch publiziert wurde. In diesem Grundsatz stehen die drei R für *replacement* (die Bemühung, Tierversuche durch tierversuchsfreie Verfahren zu ersetzen), *reduction* (die Anzahl der Versuchstiere zu reduzieren) und *refinement* (Leiden und Schmerzen der Versuchstiere zu vermindern)⁶.

In diesem Sinne gelten beispielsweise Computersimulationen, *in-vitro*-Versuche oder andere Verfahren, die eines oder mehrere der R-Kriterien erfüllen, als Alternativmethoden. Ein breites Spektrum anerkannter Alternativmethoden wurde bereits in dem Bereich sicherheitstoxikologischer Prüfungen implementiert⁵.

In anderen wissenschaftlichen Bereichen, insbesondere in der Grundlagenforschung, ist der vollständige Ersatz von Tierversuchen durch Alternativmethoden deutlich schwieriger und in absehbarer Zukunft kaum umsetzbar. Im Jahr 2020 lag der Verwendungsschwerpunkt für Versuchstiere in der Grundlagenforschung (wie in den Vorjahren) bei der Erforschung systemischer Krankheiten. Die meisten Versuchstiere wurden für die Forschung am Immunsystem (17%), am Nervensystem (17%), Multisystemisch (13%) und am kardiovaskulären System (10%) verwendet³.

Die hohe Komplexität bei System- oder Multisystemerkrankungen lässt sich bislang ausschließlich im Tiermodell untersuchen. Dementsprechend argumentieren auch Wissenschaftler*innen bei der Antragsstellung von Tierversuchsvorhaben. So waren laut einer Analyse von 110 Projektanträgen, die 2017 bis 2019 in den Niederlanden eingereicht wurden, die drei Hauptargumente, die aus Sicht der Wissenschaftler*innen für ein Tiermodell und gegen Alternativmethoden sprachen:

1. „Die Gegebenheit der komplexen Interaktion zwischen Zellen, Gewebe und deren Umgebung“ (Hauptargument für 47 % der Antragsteller)
2. „Ein intaktes und funktionstüchtiges (Organ-)System“ (Hauptargument für 30 % der Antragsteller)
3. „Die Möglichkeit Biodistributionsanalysen durchzuführen“ (Hauptargument für 15 % der Antragsteller).

Die Autoren der Studie sahen nach ihrer Auswertung jedoch großen Handlungsbedarf, für eine fundiertere Auswahl des jeweiligen Tiermodells⁷.

Um in diesem Bereich eine qualitative Umgestaltung anzuregen, wurde von der Arbeitsgruppe ein Bewertungsbogen für Tiermodelle entworfen. Nach dem Test in zwei Pilotstudien wurde dieser in PLOS ONE veröffentlicht, um dadurch allgemein eine standardisierte und validierte Auswahl des richtigen Tiermodells für die jeweilige Fragestellung zu erleichtern⁸.

2.2 Konstruktvalidität von Tiermodellen

Für viele humane Krankheiten wurden bereits mehrere Tiermodelle etabliert, welche in unterschiedlichem Ausmaß Analogien des Zielphänomens aufweisen⁹. Den Umfang dieser

Analogien beschreibt die Konstruktvalidität, die von der spezifischen Krankheit abhängt¹⁰. Die Modelle lassen sich nach dem Grad der Analogie als homolog, isomorph oder partiell bezeichnen, erreichen jedoch nie eine völlige Identität mit dem humanen Krankheitsbild⁹.

Homologe Tiermodelle, von denen es nur sehr wenige gibt, besitzen das größte Maß an Analogien. Denn, um ein Tiermodell als homolog bezeichnen zu können, müssen physiologisch/anatomische Grundstrukturen, der Krankheitsverlauf und die ausgeprägten Symptome im Tier, mit denen im Menschen möglichst übereinstimmen¹¹.

Viel häufiger handelt es sich bei den angewandten Tiermodellen um isomorphe Modelle, bei denen die Symptome im Tier den menschlichen Symptomen zwar ähneln, diese aber auf andere Weise hervorgerufen wurden. Denn viele für den Menschen relevante Erkrankungen entstehen erst in einem lang andauernden Alterungsprozess, welcher im Tiermodell nicht reproduziert werden kann. Zudem zeigen Tiermodelle häufig nur eine partielle Ausprägung des Gesamtspektrums der krankheitsbezogenen Symptomatik. Am häufigsten vertreten sind somit partielle Tiermodelle, welche eingesetzt werden können, um einzelne Teilaspekte der Krankheiten zu untersuchen, die sich in dem jeweiligen partiellen Modell nachahmen lassen⁹.

Die geläufigste Klassifikation von Tiermodellen berücksichtigt die Induktionsweise, die den Analogien zugrunde liegt. So lassen sich, nach Jann Hau (2008), die drei häufigsten Modellarten anhand der Induktionsweise der entsprechenden pathologischen Merkmale und Symptome als: induzierte, spontane und gentechnisch veränderte Modelle klassifizieren⁹.

2.2.1 Induzierte Modelle

Induzierte Modelle basieren auf gesunden Tieren, bei denen Krankheitsmerkmale experimentell herbeigeführt (induziert) werden. Somit liegt diesen Modellen (zumeist) eine abweichende Ätiologie zugrunde und sie sind in der Regel nur partiell oder isomorph in ihrer Analogie⁹.

Ein Teil dieser Modelle lässt sich zum Beispiel diätetisch induzieren; etwa durch einen hohen Fett- und/oder Zuckergehalt im Futter, um eine Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes hervorzurufen^{12, 13}. Eine weitere häufig genutzte Induktionsmethode im Kontext des Diabetes ist die Verabreichung toxischer chemischer Verbindungen, wie beispielsweise die Injektion von Streptozotocin (STZ), welches die insulinproduzierenden Betazellen der Bauchspeicheldrüse zerstört und als analoges Modell für den Typ 1 Diabetes gilt^{13, 14}. Eine Vielzahl an Tiermodellen wird darüber hinaus durch chirurgische Eingriffe induziert. So lassen sich etwa chronische Nierenerkrankungen durch die operative Reduktion der Nierenmasse oder durch zeitweise

Unterbindung der Blutversorgung (Ischämie-Reperfusion-Modell) induzieren, welches zu Symptomen führt, die einer akuten Nierenschädigung beim Menschen ähneln¹⁵. Die verschiedenen Induktionsmethoden lassen sich theoretisch in jeder Spezies anwenden, was ein potenzieller Vorteil ist, den induzierte Modelle, gegenüber anderen Modellen, gemein haben⁹.

2.2.2 Spontane Modelle

Bei spontanen Modellen tritt die Pathologie durch eine spontane Mutation auf. Wenn erkannt wird, dass es in einer Versuchstierlinie zu solch einer Mutation kam, wird diese zunächst charakterisiert. Stellt sich heraus, dass sich die neue genetische Variante für die Erforschung menschlicher Krankheitsbilder eignet, wird die Mutation durch selektive Zuchtstrategie in einem Inzuchtstamm homozygot als neue Versuchstierlinie konserviert, um sie als Tiermodell der entsprechenden Krankheit zu nutzen¹⁶.

Auf diese Weise entwickelte spontane Modelle eignen sich nur manchmal für die Ursachenforschung der Ätiologie einer Krankheit. Die Eignung besteht dann, wenn für das Auftreten der Erkrankung beim Menschen die gleichen Gene mit Veränderungen in Form von Polymorphismen beteiligt sind. Die spontanen Modelle besitzen häufig eine hohe phänotypische Ähnlichkeit des auftretenden Symptomkomplexes und dem Ansprechen auf Behandlungsinterventionen. Ein weiterer Vorteil bietet die Möglichkeit, Tiere der ursprünglichen Linie (ohne die spontane Genmutation) als Kontrollreferenz mit ähnlichem genetischem Hintergrund nutzen zu können. Zu beachten sind in diesen Modellen jedoch mögliche Kompensationsmechanismen, die häufig durch geänderte Gensequenzen während der Embryonalentwicklung ausgelöst werden, und sich zwischen den verschiedenen Spezies unterscheiden können. In ihrer Analogie zu der modellierten Krankheit sind spontane Tiermodelle größtenteils isomorph⁹.

Das wohl bekannteste spontane Modell ist die *ob/ob* Maus, basierend auf einer Mutation des Leptin-Gens, die eine Hypoleptinämie mit sich bringt. Diese spontane Mutation wurde 1949 von Jackson Laboratories entdeckt und in dem C57BL/6.Cg-Lep^{ob}/J Inzuchtstamm konserviert. Die so entstandene homozygote Versuchstierlinie, zeichnet sich durch Hyperphagie aus und entwickelt innerhalb der ersten vier Lebenswochen eine Fettleibigkeit, die mit 14 Wochen zu der fast dreifachen Körpermasse gegenüber den Wildtyp C57BL/6J Kontrollen führt. Zudem sind die *ob/ob* Mäuse durch Hyperinsulinämie, Insulinresistenz, vorübergehende Hyperglykämie, erhöhte Cholesterol-Werte und eine verzögerte Wundheilung gekennzeichnet¹⁷⁻¹⁹.

Anhand dieses Modells wurde Leptin im Jahr 1994 als entscheidendes Adipokin bei der Entstehung von Adipositas identifiziert und in den darauffolgenden Jahrzehnten charakterisiert. Beim Menschen hat eine genetisch bedingte Änderung der Freisetzung (Hyperleptinämie als auch Hypoleptinämie) oder der Signalübertragung von Leptin, ähnliche Auswirkungen wie sie im Tiermodell beobachtet werden können. In den meisten Fällen ist beim Menschen jedoch eine Leptinresistenz, als Folge dauerhaft erhöhter Leptinspiegel, hervorgerufen durch eine anhaltend positive Energiebilanz, die Ursache für die Entstehung einer Adipositas²⁰.

2.2.3 Gentechnisch veränderte Modelle

Bei gentechnisch veränderten Modellen wird eine neue genetische Variante gezielt durch Gentechnik herbeigeführt. Den so gewonnenen Tiermodellen liegt meist der genbasierte Ansatz zugrunde, bei dem die Funktion einer definierten, versuchszweckspezifischen Genomsequenz modifiziert wird, um anschließend die Veränderungen auf den Phänotyp experimentell zu untersuchen²¹.

Dieser Ansatz wird häufig zur Identifikation der funktionellen Rolle eines Genproduktes oder der Erzeugung von Tiermodellen zur Erforschung genetisch bedingter Erkrankungen genutzt. Neben dem Ausschalten von Genen (Gen knock-out oder knock-down), können Gen-Modifikationen implementiert werden (Gen knock-in). Technologien der Modifizierung ermöglichen auch die Erzeugung sogenannten Reporterlinien, bei denen, durch die Verknüpfung bestimmter Gene mit fluoreszierenden Proteinen/Enzymen, Zellaktivitäten aufgezeichnet werden können. Eine Methode, um genetische Modifikation vorzunehmen, ist die Veränderung von embryonalen Stammzellen. Des Weiteren können Vektoren (wie virale Vektoren aus Adeno-, Lenti- oder Herpes Simplex Viren) mit genetischem Material in das adulte Tier eingebracht werden, wodurch häufig eine höhere räumliche und zeitliche Spezifität, als bei der Modifikation embryonaler Stammzellen, erzielt werden kann^{21, 22}.

Neben genomischen Modifikationen, besteht auch die Möglichkeit Genexpression post-transkriptionell zu modifizieren, etwa durch die Injektion von siRNA (small interfering RNA) oder shRNA (small hairpin RNA). Im Zuge steter Weiterentwicklung der herkömmlichen Methoden, wurden inzwischen etliche induzierbare, hoch zellspezifische Modifikationsmethoden entwickelt. Eine häufig genutzte Methode ist das Cre-loxP System (Cre = causes recombination, loxP = locus of crossover (X) des Bakteriophagen P1). Eine in ihrer Spezifität noch weiter optimierte Technologie stellt das Genom-Editing dar. Durch Methoden wie CRISPR-Cas9 können sogar Änderungen vorgenommen werden, die spezifisch für einzelne Basenpaare sind. Neben den noch relativ neuen Verfahren, um zell- und

zeitspezifische dauerhafte Manipulationen vorzunehmen, wurden auch Methoden entwickelt, um reversible Modifikationen vorzunehmen, wie beispielsweise durch das Tetrazyklin sensitive „Tet-On/Tet-Off“ System^{21, 22}.

In Deutschland waren im Jahr 2020 fast 50% der verwendeten Versuchstiere genetisch verändert. Mäuse machten dabei mit 89% den Hauptanteil aus³.

Das vollständig entschlüsselte Mausgenom, verknüpft mit dem Wissen über das Humangenom, ermöglicht unter anderem auch die Erforschung der genetischen Komponente humaner Krankheiten. Die generierten transgenen Modelle ähneln in vielen Aspekten den spontanen Modellen. Durch die optimierten Technologien der gezielten transgenen Veränderung besteht jedoch die Möglichkeit neue homologe Tiermodelle zu generieren, die eine hohe Konstruktvalidität (Homologie Tiermodell/Mensch) bezüglich des Geno- und Phänotyps besitzen⁹.

2.2.4 Multifaktorielle Modelle

Da viele Krankheiten, insbesondere systemische Krankheiten, multifaktoriell bedingt sind, finden auch multifaktorielle Modelle Anwendung. Berücksichtigt man die Häufigkeit und damit die Bedeutung multifaktorieller Erkrankungen für das Gesundheitswesen, spielen solche Tiermodelle eine besondere Rolle in der translationalen Forschung. Um den translationalen Wert der Forschungen zu erhöhen, werden mehrere der beschriebenen Induktionsweisen genutzt. So lassen sich zum Beispiel mehrere Pathologien in naiven Wildtyptieren induzieren.

Ein häufig angewandtes Beispiel eines solchen multifaktoriell induzierten Modells, ist die niedrigdosierte Injektion von STZ, bei Mäusen oder Ratten, die durch Fütterung einer hochkalorischen Nahrung (HFD) zuvor Übergewicht entwickelt haben. Durch diese kombinierte Induktion kann im Tiermodell das Krankheitsbild der humanen Pathologien, die bei einer Erkrankung am Typ 2 Diabetes auftritt, vollständig modelliert werden. Nachdem die Tiere durch die HFD Übergewicht, Dyslipidämie und Insulinresistenz entwickelt haben, werden hyperglykämische Zustände durch das zusätzliche, STZ induzierte, Abtöten von Langerhans-Zellen verstärkt¹³.

Ein etabliertes multifaktorielles Modell, welches den induzierten und den gentechnisch veränderten Ansatz in sich vereint, ist die STZ-Injektion bei transgenen hypertensiven Ratten. Dadurch wird im Tiermodell eine weitere Komponente berücksichtigt, die bei Menschen als häufige Komorbidität zum Diabetes auftritt und mitursächlich für die Entwicklung von Endorganschäden ist^{23, 24, 25}.

Ein weiteres multifaktorielles Modell, was dies berücksichtigt, aber ausschließlich auf der Verwendung von transgenen Tieren basiert, sind die sogenannten „mRen27/tetO-shIR“ Ratten. Dabei handelt es sich um Tiere, die aus der Kreuzung zwei bereits bestehender transgener Linien hervorgehen. Die transgenen hypertensiven Ratten, die mit transgenen TetO Ratten verpaart wurden, bei denen der Insulinrezeptor über Doxycyclin induzierte shRNA abgebaut wird, was zu reversibler Insulinresistenz und zum Typ 2 Diabetes führt²⁶.

Allgemein verbessert sich die Konstruktvalidität eines Tiermodells mit steigendem Wissen über die spezifische Krankheit, die es modelliert¹⁰. Demzufolge ist sie abhängig vom Erkenntnisgewinn durch die Interaktion zwischen klinischer und prä-klinischer Forschung. Durch den Einsatz transgener Versuchstiere in Kombination mit multifaktoriellen Ansätzen, kann heutzutage ein hohes Maß an Homologie des pathophysiologischen Phänotyps und der Konstruktvalidität des Modells erreicht werden. Dass die Aussagekraft der Modelle durch Faktoren der Zucht und der Haltung dennoch eingeschränkt werden kann, soll in den folgenden Kapiteln dargelegt werden.

2.3 Einfluss des genetischen Hintergrundes auf die externe Validität

Um eine möglichst hohe Testsensitivität zu erreichen, sind interne Validität und damit verbundene standardisierte Versuchsbedingungen von großer Bedeutung. Aus diesem Grund, werden bevorzugt genetisch definierte Versuchstiere nur eines Alters und eines Geschlechts verwendet. Zusätzliche Rückschlüsse auf die Übertragbarkeit können jedoch nur gezogen werden, wenn neben interner Validität und hoher Konstruktvalidität des Modells auch eine hohe externe Validität gegeben ist. Die externe Validität beschreibt das Ausmaß, in dem sich Forschungsergebnisse, die in einem Umfeld, einer Population oder Art gewonnen wurden, zuverlässig auf andere Umfelder, Populationen und Arten übertragen lassen¹⁰.

Bei der Translation präklinischer Studien ist zu beachten, dass Speziesunterschiede immer auch eine Auswirkung auf die externe Validität haben²⁷. Der phylogenetische Verwandtschaftsgrad oder die anatomische Ähnlichkeit zwischen Modell- und Zielspezies impliziert noch keine Übereinstimmung der biochemischen und physiologischen Mechanismen. Säugetiere haben zwar allgemein ähnliche Organgrößen in ihrem prozentualen Verhältnis zum Körpergewicht, doch mit abnehmender Körpergröße steigt die Kapillardichte im Verhältnis zum Organgewicht und die Stoffwechselrate im Verhältnis zum Körpergewicht. Dadurch ist bei Kleintieren (wie den am häufigsten als Modellspezies genutzten Mäusen und Ratten) für eine ausreichende Sauerstoffversorgung, bei prozentual gleichem Blutvolumen (~7% des Körpergewichtes) und

gleicher Herzgröße (~0,5% des Körpergewichtes), eine Herzschlagfrequenz bis über 500 Schlägen pro Minute notwendig⁹.

Abgesehen von den allgemeinen physiologischen Unterschieden zwischen Modellspezies und Mensch, können Modelltiere unterschiedliche Resistenzen oder auch Anfälligkeiten für einzelne pathologische Zustände aufweisen. Dadurch besitzen bestimmte Spezies, oder auch nur einzelne Linien, für manch eine Fragestellungen keinen (bzw. einen beschränkten) oder aber auch erhöhten translationalen Wert. So gibt es beispielsweise Mauslinien die Allele für Netzhautdegenerationen tragen, wodurch sie nur für spezifische ophthalmologische Fragestellung geeignet sind. Das erste dieser Retina-Degenerations-Allele (rd1) wurde 1966 entdeckt. Mittlerweile sind fünfzehn weitere natürlich vorkommende Mausmutanten bekannt, die aufgrund eines rd-Allels eine genetisch bedingte Photorezeptor-Degeneration aufweisen. Das bekannteste unter den rd-Allelen ist das rd1, welches zu einer besonders früh einsetzenden, schweren Degeneration der Photorezeptoren führt²⁸. Mithilfe dieser Mausmutante konnte eines der ersten Retinitis pigmentosa Gene des Menschen identifiziert werden²⁹.

Der genetische Hintergrund ist demzufolge ein wichtiger Faktor der externen Validität. Die Verwendung möglichst homogener Studienpopulationen, als Strategie gesteigerter Standardisierung, setzt die externe Validität jedoch zwangsläufig herab¹⁰. Dirnagel formulierte diese Problematik 2016 folgendermaßen zugespitzt: Wenn ausschließlich junge Nagetiere einer Inzuchtlinie verwendet werden, die unter spezifisch Pathogen-freien Bedingungen angereichertes Futter erhalten, so lassen sich die Ergebnisse bestenfalls auf eine menschliche Kohorte übertragen, die aus „gesunden pubertären Zwillingen, die in 6 m² großen Isolierzelten mit einer angereicherten Müsli diät aufgezogen werden“ besteht³⁰.

Es gibt wohl kein Modell, welches die gesamte Heterogenität einer Kohorte von Patienten und Patientinnen abbilden kann und damit eine optimale externe Validität besitzt, aber bei der Verwendung von Inzuchtstämmen, findet der Aspekt der externen Validität die geringste Berücksichtigung.

2.3.1 Inzuchtstämme

Der entscheidende Vorteil genetischer Homozygotie besteht in der Möglichkeit, experimentell erzielte Ergebnisse auf eine einzige, definierte Variable im Genom zurückzuführen. Zudem werden Inzuchtstämme häufig eingesetzt, um die Varianz der Versuchsergebnisse möglichst klein zu halten, um bei der Analyse kleiner Stichproben die statistische Power zu erhöhen^{31, 32}.

Der tatsächlich vorliegende Grad der Isogenität wird bei Inzuchtstämmen jedoch oftmals überschätzt. Die Reproduzierbarkeit wird durch unbemerkten Gendrift innerhalb der verwendeten Population herabgesetzt. Selektion und Mutation sind biologische Phänomene, von denen auch Inzuchtstämme nicht ausgenommen sind. Und so kann selbst innerhalb einer Inzuchtlinie keine vollkommene Isogenität und genetische Stabilität erreicht werden. Laut Definition (des Komitees für standardisierte Nomenklatur von Maus-Inzuchtstämmen) muss ein Inzuchtstamm die folgenden Kriterien erfüllen: 1. Die Kolonie wurde mit einem einzigen Zuchtpaar gegründet, 2. Es werden über 20 (oder mehr) Generationen hinweg nur Vollgeschwister miteinander verpaart^{33, 34}. Werden diese beiden Kriterien erfüllt, gilt laut Bailey (1982) ein Inzucht-Mindestgrad von 98,6% als gesichert³⁵. Demzufolge ist die genetische Variabilität schon per Definition zwar gering, aber nicht gleich Null³⁶. Wie einige Studien nahelegen, ist anzunehmen, dass die Heterogenität von Inzuchtstämmen teilweise ein weit höheres Maß erreicht³⁷. Ungeachtet dessen, und obwohl viel genutzte Modelle spontaner Mutationen als Substamm aus Inzuchtstämmen hervorgegangen sind (wie beispielsweise die *db/db* Mäuse), werden Inzuchtstämme häufig als vollkommen isogen und stabil betrachtet.

Basierend auf Spontanmutationsraten, muss innerhalb einer Kolonie von einem gewissen Risiko für einen genetischen Drift ausgegangen werden. Bei Mäusen beispielsweise, mit einer Generationszeit von 3 bis 4 Monaten, tritt gut in jeder 2. Generation eine Mutation auf. Das Risiko, dass sich solch eine auftretende Spontanmutation in der Keimbahn eines Zuchttieres homozygot über die Kolonie ausbreitet, beträgt für Inzuchtlinien 25% und steigt mit abnehmender Größe der Kolonie: nach den Mendelschen Regeln bekommt etwa die Hälfte der F1 Nachkommen eine auftretende Spontanmutation heterozygot vererbt³⁸. Werden aus der F1 Generation nun zufälliger zwei dieser heterozygoten Tiere miteinander verpaart, so tragen in der F2 Generation bereits 25% der Tiere die Spontanmutation homozygot in sich (weitere 50% heterozygot und nur noch 25% der Tiere besitzen das ursprüngliche Genom). Dies kann sich fortführen, bis die Mutation in der gesamten Kolonie homozygot fixiert ist. Unter ungünstigen Umständen kann die Wahl der jeweils wieder verpaarten Tiere so ausfallen, dass dies bereits in der F4 Generation der Fall ist³⁹.

Durch das Auftreten von Spontanmutationen bildet sich innerhalb der Kolonien im Laufe der Generationen eine additive Mutationsvarianz, die man als Mutationslast des Inzuchtstammes bezeichnet. Die Mutationslast beschreibt dabei einzelne Polymorphismen mit vernachlässigbar kleinem Effekt (oder noch ohne Effekt), die sich jedoch von Generation zu Generation

akkumulieren und so additiv über polygene Mutation eine Änderung des Phänotyps der Linie bewirken können^{40,41}.

Damit die Mutationslast möglichst geringgehalten wird, sollten Kolonien regelmäßig aufgefrischt werden (Charles River empfiehlt in Mauskolonien dies nach jeder 5. bis 10. Inzuchtgeneration zu tun). Der genetische Hintergrund kann dafür durch Rückkreuzen, dem Zukauf qualitätsgesicherter Zuchttiere oder durch kryokonserviertes Material aufgefrischt werden³⁹. Um darüber hinaus das Risiko für Änderungen der genetischen Authentizität isogener Tierstämme gering zu halten und das Auftreten von Spontanmutationen möglichst früh zu erkennen, müssen strenge Qualitätsstandards eingehalten werden. Die Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS Society for Laboratory Animal Science) empfiehlt dafür eine definierte Koloniestruktur (in Nukleuskolonie, Erweiterungskolonie(n) und ggf. Produktionskolonie(n)), ein festgelegtes Zuchtprogramm (wie das Einlinien- oder Parallelliniensystem), konsequente Zuchtdokumentation und genetische Überwachungsstrategien⁴². Hinweise für polygen vererbte Änderungen des Phänotyps können durch geschultes Personal anhand der Pigmentierung, der Wurfgröße (dem sogenannten Kolonieindex), geändertes Verhalten oder den Verlust pathophysiologischer Stammeigenschaften erkannt werden⁴³. Doch nicht alle Spontanmutationen, die sich homozygot in der Kolonie fixiert haben, führen zu einer offensichtlichen Änderung des Phänotyps. Ein Stamm kann jahrelang eine Mutation tragen, bevor diese entdeckt wird. Absolute Gewissheit bringt nur die Sequenzierung der Kolonie und der Vergleich mit dem Referenzgenom der Ursprungskolonie³⁹.

Zu den Werkzeugen der genetischen Überwachung gehört die Testung der Histokompatibilitäts (H) Loci innerhalb des Stammes. Innerhalb eines isogenen Stammes sollten diese identisch sein, sodass Hauttransplantation zu keinerlei Abstoßungsreaktionen über den Haupthistokompatibilitätskomplex, (MHC, major histocompatibility complex) führen. Darüber hinaus wird der Einsatz von Markersets empfohlen, um die Authentizität des genetischen Profils eines Stammes fortlaufend zu verifizieren. Hier können beispielsweise biochemische Marker, immunologische Marker, DNA-Marker, Mikrosatelliten und SNP-basierte Authentizitätsprogramme (single nucleotide polymorphisms) zum Einsatz kommen. Handelt es sich um einen Inzuchtstamm mit Tieren, die durch transgene Veränderung ein Differentialallel tragen, so muss zusätzlich ein Genotypisierungsprotokoll etabliert sein, über welches der Erhalt des Differentialallels mittels PCR-Amplifikation verifiziert werden kann⁴³.

Werden bei der genetischen Überwachung Abweichungen zu der Ausgangskolonie festgestellt, muss ein neuer Substamm gebildet werden, der nun unter neuem Namen als züchterischer Seitenast getrennt geführt werden muss. Dies gilt auch für Tiere eines Inzuchtstammes, die zwischen der 20. und 40. Generation vom Ausgangsstamm getrennt gehalten werden, oder solche, die ab der Generation F40 über 10 Generationen hinweg von der Ausgangskolonie getrennt sind. Laut Definition der GV-SOLAS gilt als Substamm *„ein Seitenast im Stammbaum eines Inzuchtstammes, der sich nachweislich oder mit großer Wahrscheinlichkeit genetisch von dem ursprünglichen Inzuchtstamm unterscheidet.“* Da Substämme in der Regel nicht aufgrund ihres Äußeren erkannt werden können, ist die Einhaltung der vorgeschriebenen Nomenklatur von besonderer Bedeutung. Denn im Gegensatz zum äußeren Erscheinen können die genetischen Unterschiede zwischen Substämmen und deren Ausgangs-Inzuchtstamm gravierend sein⁴⁴.

Um hohe Varianzen zu vermeiden, wird geraten, Tiere für ein experimentelles Modell (innerhalb einer Versuchsreihe), wenn möglich, aus nur einer Zucht zu beziehen⁴⁵. Für die Reproduzierbarkeit mindestens genauso wichtig, sei es, dass der genutzte Substamm mit publiziert wird³⁹. Diese Strategie der Erzeugung signifikanter Ergebnisse konkurriert allerdings mit der externen Validität und der Translation auf eine heterogene Kohorte von Patienten und Patientinnen. Translationalen Wert besitzen vor allem die experimentellen Effekte, die sich auch auf einem variablen Background durchsetzen können^{30, 46}.

2.3.2 Auszuchtstämme

Ein Modell, welches sich der Heterogenität von Kohorten theoretisch besser annähert, ist die Verwendung sogenannter Auszuchtstämme (zu denen beispielsweise auch Sprague Dawley (SD) Ratten zählen). Auszuchtstämme haben das genaue Gegenteil von Inzuchtstämmen zum Ziel. Sie sollen eine definierte genetische Variabilität abbilden.

Für die Erstellung einer Auszuchtpopulation werden mindestens 200 Zuchtpaare benötigt, die innerhalb einer geschlossenen Population mit möglichst großem genetischem Abstand verpaart werden, um genetische Variation zu gewährleisten. Das Einkreuzen stammfremder Gene ist nach der siebten Generation nicht mehr erlaubt. Damit sich der Verwandtschaftsgrad über die Generationen hinweg minimiert und trotzdem ein stabiler, standardisierter Phänotyp erhalten bleibt, muss die Population in Blöcke unterteilt und für die Verpaarung ein Zuchtsystem mit definiertem Rotationsschemata angewendet werden. Unterlaufen dabei Fehler, können diese nicht korrigiert werden und führen mit hoher Wahrscheinlichkeit zu Fehlinterpretationen im Versuch⁴⁷.

Änderung des definierten Phänotyps lassen sich bei Auszuchtlinien schwieriger als bei Inzuchtlinien identifizieren³⁹. Erschwerend kommt hinzu, dass es, im Gegensatz zu Inzuchtstämmen, für das genetische Monitoring von Auszuchtpopulationen bisher keine standardisierten Monitoring Programme gibt. Laut GV-SOLAS weisen viele der aktuellen Auszuchtstämme keine ausreichende genetische Qualität auf, was auf die folgenden drei Hauptgründe zurückzuführen ist; die Gründerpopulationen bestanden aus zu wenigen (teilweise sogar verwandten) Tieren, Einengung der ursprünglich vorhandenen genetischen Variabilität durch genetische Flaschenhalse (beispielsweise durch hygienische Sanierungen in den Haltungsbereichen) und eine meist unbewusste Selektion bei der Auswahl der Zuchttiere⁴⁷.

Die genetische Vielfalt einzelner Auszuchtstämme kann von Anbieter zu Anbieter deutlich variieren. Wie ein Versuch mit SD-Ratten von Harlan und Charles River zeigte, weisen sogar einzelne Kolonien desselben Anbieters, die in unterschiedlichen Barrierebereichen gehalten werden, signifikante Unterschiede der genetisch bedingten Phänotypen auf⁴⁸.

Unterschiede im genetisch bedingten Phänotyp einer Auszuchtlinie können auf Populationsengpässe innerhalb der Zucht hinweisen oder durch zufälligen genetischen Drift zustande kommen. Denn selbst bei einer qualitativ hochwertigen, standardisierten Zucht, kann sich auch die genetische Identität eines Auszuchtstammes mit der Zeit ändern. Spontane Mutationen können sich etablieren oder genetische Eigenschaften durch natürliche Selektion aus der Population verschwinden⁴⁹.

Eine Datenanalyse des Chemiekonzerns BASF zeigte, dass dies auch zu einer genetisch bedingt steigenden Tumorprädisposition (Tumordrift) innerhalb eines Stammes führen kann. Für die von BASF in Auftrag gegebenen Studien wurden als Kontrolltiere die Rattenstämme Han Wistar, BASF Wistar, F344 Ratten und 2 SD-Rattenlinien verwendet. Bei der Auswertung aller Befunde spontaner Neoplasien, die bei diesen Kontrolltieren innerhalb von 20 Jahren erhoben wurden, zeichnete sich ab, dass es bei Auszuchtstämmen häufiger als bei Inzuchtstämmen zu einem Tumordrift kommt⁵⁰.

Alles in allem setzt jedoch nicht nur die Zucht von Auszuchtstämmen ein besonderes Fachwissen voraus. Auch wenn in Betracht gezogen wird, eine Auszuchtlinie zu verwenden, sollte man sich (genau wie bei anderen Modellarten) vorab eingehend mit den Einschränkungen der Modelltiere auseinandersetzen. Denn ein weiteres Risiko bei der Nutzung von Auszuchtlinien birgt die übliche Verwendung sehr kleiner Stichproben, häufig sogar noch determiniert durch ein bestimmtes Gewicht. Eine repräsentative Zufallsverteilung der Genotypen aus der Grundgesamtheit kann hier oft nicht gewährleistet werden. Und so wird

durch Unwissenheit das eigentliche Ziel bei der Verwendung einer Auszuchtlinie, eine ausgeglichene, definierte Varianz zu untersuchen, häufig verfehlt⁴⁷.

2.4 Beeinträchtigung der Reproduzierbarkeit durch haltungsbedingte Faktoren

Grundvoraussetzungen für reproduzierbare Versuchsergebnisse sind, den erläuterten Aspekten zufolge, Versuchstiere aus Zuchten mit hohen qualitativen Standards. Die sich daran anschließende Haltung, vor und während des Versuches, kann die Versuchsergebnisse jedoch mindestens in gleichem Maße kritisch beeinflussen. Denn Maßnahmen der gesteigerten Standardisierung setzen nicht nur die externe Validität herab, sie machen die Modelle auch anfälliger gegenüber Einflüssen der Testbedingungen (einschließlich der Umgebungsbedingungen) und erschweren demzufolge die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse¹⁰. Welche Faktoren daher während der Haltung von Mäusen und Ratten Beachtung finden müssen, soll im Folgenden ausgeführt werden.

2.4.1 Transport

Das erste potenzielle Risiko birgt der Import der Versuchstiere in den eigenen Haltungsbereich. Denn laut der GV-SOLAS können bei jedem Tierimport auch unerwünschte Viren, Bakterien, Pilze und Protozoen mit eingebracht werden. Versuchstiere aus kommerziellen Zuchten werden in einem definierten hygienischen Zustand verkauft. Für die Definition des jeweiligen hygienischen Status, in Form eines Gesundheitszeugnisses, wird jedoch nicht zwangsläufig auf opportunistische Mikroorganismen (wie beispielsweise einige Protozoen, Staphylokokken und Streptokokken) getestet, was zu Problemen führen kann, wenn sich die Hygienestandards der Tierhaltungen voneinander unterscheiden. Kommerzielle Zuchten verfügen üblicherweise über sehr hohe Hygienestandards. Aber es kommt vor, dass der hygienische Status der Tiere zwischen den verschiedenen Standorten und Zuchteinheiten eines Zuchtbetriebes variiert⁵¹.

Laut der GV-SOLAS erhöht sich das Risiko Infektionserreger einzuschleppen, wenn die Tiere aus Haltungsbereichen stammen, die kein Gesundheitszeugnis bereitstellen, oder wenn die Tiere über weite Strecken transportiert werden. Je länger sich die Tiere für den Transport außerhalb der Haltungsbereiche befinden, desto mehr potenziellen Quellen einer mikrobiellen Kontamination sind sie ausgesetzt⁵¹. Zudem steigt mit der Transportdauer der Stress für die Tiere, was neben einer reduzierten Immunantwort⁵² auch die Reproduzierbarkeit induzierter modellspezifischer Phänotypen beeinflussen kann⁵³. Sind die Transportboxen oder deren Filter bei der Ankunft beschädigt, so müssen die importierten Tiere als potenziell kontaminiert angesehen werden⁵¹.

Die GV-SOLAS empfiehlt, importierte Tiere zunächst in eine räumlich getrennte Quarantäneeinheit der neuen Haltung aufzunehmen, in der keine Bestandstiere untergebracht sind und in der ein anderes Pflegepersonal als in der restlichen Haltung arbeitet. Mikrobiologische Untersuchungen und anschließende Unterbringung in den regulären Haltungsbereich sollte erst nach einer Quarantäne stattfinden, die lang genug ist, dass durch die hausinternen Tests auch Infektionen, zu denen es möglicherweise während des Transportes kam, festgestellt werden können. Bei immunsuppressiven Tieren ist des Weiteren zu bedenken, dass diese nicht nur anfälliger für Infektionen sind. Eine reduzierte Immunantwort kann auch zu falsch-negativen Ergebnissen der serologischen Untersuchungen führen. Zu den Erregern, die aufgrund eines erschwerten Nachweises ein erhöhtes Risiko der Einschleppung mit sich bringen, zählen unter anderem Parvoviren, Oxyuren, Protozoen, *Pasteurellaceae* und *Helicobacter* spp. Um das Risiko der Einschleppung solcher Mikroorganismen zu minimieren, wird empfohlen, den Import von Embryonen oder Spermien dem von lebenden Tieren möglichst vorzuziehen⁵¹.

2.4.2 Haltung

Erhöhter Stress für die Versuchstiere sollte aus Gründen des Tierschutzes und in Bezug auf die Validität der Versuchsergebnisse vermieden werden. Dies gilt für Transportwege und für die Zeit in der Haltung. Unter diesem Gesichtspunkt ist es kritisch zu betrachten, dass die normierten Grundanforderungen der Haltungsbedingungen von Labor-Nagetieren lediglich die essentiellen Grundbedürfnisse der Tiere decken und nicht alle Voraussetzungen für artgemäßes Verhalten erfüllen. Laut dem Ausschuss für Tiergerechte Labortierhaltung der GV-SOLAS, gilt die Zielsetzung, die biologischen Bedürfnisse *möglichst wenig einzuschränken*. Die daraus abgeleiteten Empfehlungen und Vorschriften beruhen allerdings auf praktischen Haltungserfahrungen und sind nicht wissenschaftlich begründet⁵⁴.

Das seit 2007 in der EU vorgeschriebene Mindestplatzangebot der Grundfläche für eine Maus (von 20 - 25 g) beträgt lediglich 70 cm² (mit einer Mindestkäfighöhe von 12 cm) und entspricht demnach gerade einmal der halben Fläche einer Postkarte. Als Mindestplatzangebot für eine Ratte (von 200 - 300 g) sind 250 cm² (mit einer Mindesthöhe von 18 cm) vorgeschrieben⁵⁵. Die ETS No. 123 (aus den European Treaty Series) schreibt für Nager zudem Nistmaterial und Unterschlupf vor und erlaubt Nagehölzer in der Haltung, was sich bisher, laut GV-SOLAS, jedoch kaum durchgesetzt hat⁵⁴. Des Weiteren sind durch den Anhang A, der ETS No. 123 die Klimadaten wie die Luftfeuchtigkeit (45 – 65%), die Luftwechselrate (15 – 20-fach pro Stunde) und die Raumtemperatur (20 – 24 °C) vorgeschrieben⁵⁵. Bei Abweichungen dieser

Normbereiche, können sich morphologische, physiologische und Verhaltensauffälligkeiten manifestieren^{54, 56}. Maloney et al. fassten 2014 in ihrem Review zusammen, dass die Stoffwechselaktivität von Mäusen bei der üblichen Raumtemperatur in Haltungsbereichen (die bei 22 °C liegt) um 50% höher gegenüber ihrer thermoneutralen Zone (die bei ≥ 30 °C liegt). Pro Grad unterhalb der thermoneutralen Zone (< 30 °C), steigt bei Mäusen die Ruheherzfrequenz um 25 Schläge/Minute und der Blutdruck um 2 mmHg. Die Tiere schlafen weniger und die Nahrungsaufnahme, während der eigentlichen Ruhephase, ist deutlich erhöht. Die Körpermasse und der Anteil von braunem Fettgewebe steigen, um den Wärmeverlust zu reduzieren und die Organgröße von Leber, Niere und Herz nimmt zu, damit der erhöhte Nahrungsbedarf verarbeitet werden kann. Dies, und weitere sich daraus ergebende Auswirkungen auf beispielsweise den Fettstoffwechsel und das Immunsystem, kann laut Maloney et al. zu fehlerhaften Schlussfolgerungen der eigentlichen Experimente führen⁵⁷. Um dies zu vermeiden, ist es (nicht nur aus Tierschutzgründen) wichtig, den Tieren durch Gruppentierhaltung und ausreichend Nestbaumaterial die Schaffung thermoneutraler Bereiche zu ermöglichen.

Für weitere kritische Umgebungsparameter, wie die Beleuchtung und den Geräuschpegel, sind in den EST keine regulatorischen Maximalwerte festgelegt. Es wird jedoch ausdrücklich darauf hingewiesen, dass wildlebende Nager dämmerungs- und nachtaktiv (also lichtsensibel) sind und dementsprechend hochentwickelte akustische Sinne besitzen⁵⁵. Um in der Haltung den circadianen Rhythmus metabolischer, endokriner, immunologischer Parameter und die Parameter des Verhaltens bei den Modelltieren zu synchronisieren, ist es üblich, sie an einen konstanten Hell-Dunkel-Rhythmus, mit einer Hellphase von 10 bis 14 Stunden zu adaptieren. (Als Standard für ophthalmologische Experimente hat sich die Nutzung einer zwölfstündigen Hellphase etabliert.) In den Richtlinien der GV-SOLAS wird dabei für die Hellphase in Ratten-Haltungsräumen 130 – 325 Lux, im Käfig < 60 Lux und am Ruheplatz < 25 Lux als optimal angeführt. Für die Maushaltung gibt es lediglich einen empfohlenen Maximalwert für den Haltungsraum, der bei 200 Lux liegt (gemessen in 1,2 m über dem Boden)⁵⁸. Des Weiteren wird angeführt, das Arbeitslicht bis 400 Lux auf die Dauer der Anwesenheit von Personal beschränkt werden sollte^{54, 56}. Wie ein Experiment mit Ratten zeigte, ist die Aktivität von Albino-Ratten jedoch schon bei 75 Lux deutlich eingeschränkt, gegenüber dem Aktivitätslevel pigmentierter Labor-Ratten⁵⁹. Darüber hinaus verlieren Gegenstände, die im Käfig von Albino-Ratten deren Aktivitätslevel positiv beeinflussen, ihren aktivitätssteigernden Effekt bei starker Beleuchtung⁶⁰. Dass es keine strikte Vorschrift für die maximale Lichtintensität gibt, ist bei der Haltung dunkelaktiver Nager, insbesondere bei Albinotieren, möglicherweise mit einem

erhöhten Risiko für Retinadegeneration verbunden⁶¹. Im Anhang A der EST No. 123 wird daher angeraten, Käfige mit abdunkelnden Hauben zu versehen. Bezüglich des Geräuschpegels in den Haltungsräumen, wird empfohlen, ihn möglichst gering zu halten und regelmäßig zu messen⁵⁵. Auf einen erhöhten Lärmpegel können Nagetiere mit deutlichen Stresssymptomen reagieren. Von der GV-SOLAS wird daher die Empfehlung ausgesprochen, den Geräuschpegel unter 60 dB zu halten (was in etwa einem Einzelgespräch entsprechen würde). Lärmspitzen sollten möglichst vermieden werden, genau wie Ultraschallwellen, auf die Nagetiere besonders sensibel reagieren^{54, 56}.

2.4.3 Enrichment

Es ist davon auszugehen, dass unsere Labortiere in den üblichen Haltungsbereichen einigen potenziellen Stressquellen ausgesetzt sind, die im Laufe der experimentellen Zeiträume in unterschiedlichem Umfang auf sie einwirken und so die Ergebnisse beeinflussen können.

Unter Enrichment versteht man eine Verbesserung der Haltung durch „Anreicherung“. Eine allgemein gültige und präzise Definition dieser Anreicherung fehlt bisher jedoch, sodass Art und Umfang bei der Umsetzung von Enrichmentmaßnahmen stark variieren. Allgemein sollen durch die Anreicherung, welche die vorgeschriebenen Mindestumweltanforderungen übertrifft, artgerechtere Haltungsbedingungen geschaffen und so das Tierwohl gesteigert werden. Für Labornager kommen dafür häufig Nistmaterial, Versteckmöglichkeiten und Nagestäbe zum Einsatz⁶².

Wie experimentell gezeigt werden konnte, lassen sich negative Auswirkungen von induziertem Stress durch Enrichmentmaßnahmen bei der Käfigausstattung kompensieren⁶³. Durch solche kompensatorischen Maßnahmen ließe sich demnach die Reproduzierbarkeit von Forschungsergebnissen erhöhen. Studienergebnisse, welche zeigen konnten, dass mit artgerechterer Käfigausstattung der Schweregrad für induzierte Krankheiten (wie Depression, Angst, Krebs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Schlaganfall) geringer ausfällt und die Gesamtmortalitätsrate (ohne experimentell herbei geführte Krankheit) sinkt, sprechen dafür, dass die aktuell üblichen Haltungsbedingungen optimierungsbedürftig sind⁶⁴. Es gibt Hinweise, dass diese Haltungsform an sich schon solch eine Belastung für die Modelltiere darstellt, dass sie als „Stress-Modell“ angesehen werden muss, da so gehaltene Tiere keinen gesunden Modellorganismus verkörpern. Gegenteiliges unkritisch anzunehmen könnte die Ergebnisse, die Reproduzierbarkeit und die Translation von Studien negativ beeinflussen. Daher wird gefordert, die Enrichment-Haltung als Standardhaltung einzuführen, da sie weniger etwas mit Anreicherung zu tun hat als mit einer besseren Modellierung des Normalzustandes^{57, 64, 65}.

Mit steigendem Bewusstsein für diese Problematik findet aktuell ein Umdenken statt, deren Umsetzung jedoch nur schleppend vorangeht. Schon 2006 einigte man sich im Europarat darauf, zusätzliches Enrichment für Labor-Nagetiere dringend zu empfehlen⁵⁵. Aus Sorge, durch Variationen bei der Käfigausstattung die Varianz der Untersuchungsergebnisse zu erhöhen, werden jedoch weiterhin größtenteils keine Enrichmentmaßnahmen ergriffen, welche die standardisierten Mindestanforderungen übersteigen. Studien, die den Effekt von Enrichment für die Modelltiere auf die Varianzen der Versuchsergebnisse untersucht haben, zeigen allerdings, dass sich diese Sorge nicht bewahrheitet^{64, 65}.

Werden Maßnahmen ergriffen, um die Modelltiere durch artgerechtere Haltung widerstandsfähiger gegenüber experimentunabhängigen belastenden Umweltbedingungen zu machen, ist mit einer besseren Reproduzierbarkeit innerhalb der Versuchsreihen zu rechnen, vorausgesetzt, die Verbesserung der Umgebungsbedingungen kommt innerhalb der Versuchsreihen allen Kontroll- und Behandlungsgruppen über den experimentellen Verlauf hinweg in gleichem Umfang zugute.

Ein Hindernis, welches jedoch der standardisierten Implementierung von Enrichment-Maßnahmen im Studiendesign im Wege steht, ist die mangelhafte Dokumentation der bisher angewendeten Maßnahmen. Bei nur etwa einem Drittel der experimentellen Untersuchungen des Einflusses einer verbesserten Käfigausstattung wurden die dafür ergriffenen Maßnahmen detailliert beschrieben. Das ist zum einen eine verpasste Chance, zeigt andererseits aber die hohe Robustheit der Effekte und lässt auf eine gute Reproduzierbarkeit schließen⁶⁴. Ein weiterer Grund der Ablehnung einer Änderung der aktuell üblichen, und vielfach auch als bewährt empfundenen, Haltungsbedingungen, ist der scheinbar damit verbundene finanzielle und personelle Mehraufwand. Es bedarf jedoch keiner „extravaganten“ Ausstattung, um verbesserte Bedingungen für die Tiere herbeizuführen. Langfristig würde dies die Robustheit der Experimente erhöhen, wodurch der Nutzen den Mehraufwand überträfe⁶⁵.

3 Fallbeispiel

Grundlage meiner Arbeit ist ein Projekt zur Erforschung der Pathomechanismen im Anfangsstadium der diabetischen Retinopathie (DR). Daher werde ich im folgenden Kapitel das Krankheitsbild der DR im Menschen, die gängigsten Nagetiermodelle dieser Erkrankung, sowie das verwendete Modell erläutern, bevor ich im Methoden- und Ergebnisteil näher auf das konkrete Projekt eingehe.

3.1 Das Krankheitsbild der DR und die gängigsten Tiermodelle

Die DR ist eine Mikroangiopathie der retinalen Blutgefäße und stellt eine der häufigsten Komplikationen des Diabetes Mellitus (DM) dar. Laut der International Diabetes Federation (IDF) lebten im Jahr 2021 weltweit 537 Millionen Menschen zwischen 20 und 79 Jahren mit DM. In mehr als 90% aller Fälle wird Typ 2 Diabetes diagnostiziert, wodurch Typ 2 Diabetes die mit Abstand am häufigsten vertretene Form des DM ist⁶⁶.

Die weltweite Prävalenz der DR liegt unter Diabetikern bei rund 22%, wodurch weltweit über 100 Millionen Menschen betroffen sind. Somit ist die DR die Hauptursache für vermeidbare Erblindung bei Erwachsenen im erwerbsfähigen Alter⁶⁷. Laut der Deutschen Diabetes Gesellschaft beträgt die Prävalenz einer DR bei Typ 1 Diabetes 24 – 27%, wobei sie bei Kindern mit Typ 1 Diabetes vor der Pubertät nur selten auftritt. Bei Menschen mit Typ 2 Diabetes kann bei 2 – 16% eine DR festgestellt werden, häufig (in 9 – 16% der Fälle) schon bei Diagnosestellung des DM⁶⁸. Daraus ergibt sich unter Jugendlichen eine höhere Prävalenz für DR (2,24-fach höher) bei Typ 2 Diabetes, gegenüber Typ 1 Diabetes⁶⁹. Die Tatsache, dass mikrovaskuläre Komplikationen bei Typ 2 Diabetes insgesamt früher und häufiger als bei Typ 1 Diabetes auftreten, wird auf die Komorbidität mit Bluthochdruck, Fettleibigkeit und Dyslipidämie zurückgeführt⁷⁰. Auch das Risiko eine DR zu entwickeln, steigt durch Hypertonie und Dyslipidämie. Weitere Risikofaktoren sind eine schlechte glykämische Kontrolle und die Dauer einer bestehenden Hyperglykämie⁷¹.

Nach aktuellem Kenntnisstand führen erhöhte Glucose- und Fettsäurekonzentrationen in Endothelzellen zu einer übermäßigen Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), was den Beginn mikrovaskulärer Verletzungen einer DR einleitet. Durch die DNA-schädigende Wirkung anhaltend erhöhter ROS-Konzentration kommt es zu einer Änderung der Stoffwechselwege, wodurch unter anderem Methylglyoxal freigesetzt wird und verschiedene Isoformen der Proteinkinase C aktiviert werden⁷⁰. Dies steigert den oxidativen Stress und begünstigt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB (Transkriptionsfaktor 'kappa-light-chain-enhancer' von aktivierten B-Zellen), was zu einer erhöhten Synthese pro-

inflammatorischer Moleküle führt^{70, 72}. Die Endothelzellen exprimieren verschiedenen Zytokine (wie TNF α (Tumornekrosefaktor α) IL-1 β (Interleukin 1 β) und IL-6 (Interleukin 6), Chemokine (wie MCP-1 (Makrophagen-Chemoattraktorprotein 1) und Adhäsionsmoleküle (wie ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule 1) und VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule 1)), damit der Zellschaden durch rekrutierte Immunzellen begrenzt werden kann. Infolgedessen kommt es zur Leukozytenadhäsion und zu einer erhöhten Permeabilität der inneren Blut-Retina-Barriere (BRB), um die Diapedese der rekrutierten Zellen zu ermöglichen. Bedingt durch die Leukostase kommt es dabei jedoch auch zu einem Verlust von Endothelzellen und dem fortschreitenden Zusammenbruch der inneren BRB⁷².

Die Änderung des retinalen Blutflusses, der Verlust von Perizyten, die Bildung azellulärer Kapillaren und eine erhöhte vaskuläre Permeabilität, führen zu ersten klinisch sichtbaren Läsionen während des frühen Stadiums der nicht-proliferativen DR (NPDR). In diesem Stadium können Okklusionen der Kapillaren, Mikroaneurysmen, Blutungen und harte Exsudate festgestellt werden^{73,74}. Zudem lassen sich im Stadium der frühen NPDR bereits nichtregenerierbare neurodegenerative Veränderungen nachweisen⁷⁵. Der Verlust von Perizyten, der als eine mögliche Ursache der Neurodegeneration diskutiert wird⁷⁶, ist ursächlich für die Okklusionen retinaler Gefäße, wodurch sich ischämische Areale bilden, was eine lokale Erhöhung des „vascular endothelial growth factors“ (VEGF) induziert⁷⁷. Durch diese Prozesse erreicht die DR das fortgeschrittene Stadium der proliferativen DR (PDR), welches sich mit zunehmender Ischämie durch Neovaskularisation, Fibrose, Glaskörperblutung und Netzhautablösung manifestiert. Der Übergang zwischen den beiden Stadien der DR ist fließend und das Risiko zu erblinden, besteht auch in der Phase einer NPDR. Denn wenn es zu einer Störung der inneren BRB kommt, führt dies zu intra-retinalen und sub-retinalen Flüssigkeitsansammlungen, wodurch die Makula ödematös anschwillt. Der Endpunkt, das diabetische Makulaödem (DME), ist neben der Neovaskularisation die Hauptursache für den Sehverlust durch die DR^{74, 78}.

Bei Personen mit Typ 1 Diabetes kommt es häufiger zur Proliferation als zum DME (23% PDR, 11% DME) wohingegen bei Menschen mit Typ 2 Diabetes ödematische Komplikationen häufiger auftreten (6% PDR, 8% DME)⁷⁹. Da die Symptome für Betroffene erst im späten Krankheitsverlauf einer DR spürbar werden, müssen die Betroffenen mit diagnostiziertem Diabetes regelmäßig ophthalmologisch untersucht werden. Sofern noch keine Retinopathie vorliegt und neben dem Diabetes keine weiteren Risikofaktoren bestehen, soll dies im Intervall von zwei Jahren geschehen. Liegen ein oder mehrere Risikofaktoren vor, verkürzt sich das

Intervall auf ein Jahr. Ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung einer DR, muss das Kontrollintervall der Ausprägung und dem Therapiebedarf der DR angepasst werden. Bei der Diagnostik wird die Sehschärfe gemessen und der vordere Augenabschnitt sowie der Augenhintergrund untersucht. Ein neovaskulärer Krankheitsverlauf kann zudem die Überwachung des Augendrucks und Untersuchungen mittels Fluoreszenzangiographie erforderlich machen. Für die Überwachung ödematischer Veränderungen sind Untersuchungen mittels optischer Kohärenztomografie bedeutend⁶⁸.

Als Therapiemaßnahmen können intravitreale Injektionen von VEGF-Hemmern oder Kortikosteroiden verabreicht werden sowie Laserbehandlungen angewandt werden. Kortikosteroide, wie Dexamethason, kommen vor allem bei Personen mit Kontraindikationen oder ausbleibendem Erfolg einer anti-VEGF Therapie zum Einsatz. Wobei die Hemmung der pro-inflammatorischen Prozesse einer DR über Kortikosteroide auch indirekt die VEGF-Spiegel senkt⁸⁰. Durch die Laser-Photokoagulierung avaskulärer Areale wird der Sauerstoffbedarf der Netzhaut verringert, wodurch sich der VEGF-Spiegel ebenfalls senken und Neovaskularisation verringern lässt^{81,82}. Jedoch sind die Pathomechanismen der DR noch nicht vollständig erforscht, sodass die zur Verfügung stehenden Therapieansätze den Krankheitsverlauf zwar verlangsamen, aber nicht aufhalten können.

Für die Erforschung der DR gibt es mehrere etablierte Tiermodelle, welche die Hauptpathologien in unterschiedlichem Umfang abbilden, Nagetiermodelle spielen dabei die bedeutendste Rolle⁸³.

Um die DR als Folge von Hyperglykämie zu erforschen, ist das STZ induzierte Modell für Typ 1 Diabetes das mit Abstand am häufigsten verwendete Modell (s. Kapitel 2.2.1 und 2.2.4). Je nach genutzter Spezies, verabreichter Dosis des STZ und anschließender Dauer der Aufrechterhaltung des hyperglykämischen Zustandes, ist der Phänotyp im Nagetiermodell in unterschiedlichem Ausmaß geprägt von retinaler Inflammation, Zellverlust, neurologischen Funktionsstörungen in der Elektroretinographie (ERG; verringerte Amplituden der a-, b-, c-Welle und/oder des oszillatorischen Potentials) sowie vaskulären Veränderungen⁸⁴. Bei den Induktionsprotokollen gibt es jedoch große Variationen. Mäuse entwickeln in der Regel ein bis vier Wochen nach der Injektion eine Hyperglykämie. Ohne Insulinkompensation wird für Mäuse eine hochdosierte intraperitoneale Einzelinjektion von 150 mg STZ pro kg Körpergewicht oder fünf aufeinanderfolgende niedrige Dosen von 50 mg STZ pro kg Körpergewicht empfohlen^{85, 86}. Wobei es zu berücksichtigen gilt, dass weibliche C57BL/6J-Mäuse eine höhere Toleranz gegenüber STZ aufweisen und dementsprechend eine höhere

Dosis benötigen, um ein Ergebnis zu erzielen, das äquivalent zu dem bei männlichen Tieren ist⁸³. Übersichtsarbeiten beschreiben eine hohe Varianz beim zeitlichen Auftreten einzelner Pathologien der DR im STZ-Mausmodell, welche sich auf Unterschiede zwischen den Mausstämmen, Variationen bei der STZ-Dosierung und die unterschiedlichen Untersuchungszeiträume zurückführen lassen könnte. Da nicht jedes Tier in gleicher Weise auf die STZ-Injektion reagiert und üblicherweise nur das Erreichen eines vorher festgesetzten Grenzwertes (i.R. ≥ 250 mg/dl) dokumentiert wird, ist nicht klar, inwieweit die Blutglucosespiegel diabetischer Versuchstiere zwischen einzelnen Studien variieren. Zu den Pathologien, die im STZ-Mausmodell beschrieben wurden, gehören zelluläre Reaktionen auf erhöhten oxidativen Stress und Inflammation (wie die Zunahme und Aktivierung von Astrozyten und die Entwicklung einer reaktiven Gliose), degenerativer Prozesse (wie der Verlust retinaler Ganglienzellen (RGC) und Zellen der inneren und äußeren nukleären Schicht), vaskuläre Pathologien (wie eine Leukostase, der Verlust von Perizyten, azelluläre und undichte Gefäße), Funktionsverluste im ERG und Neovaskularisation. Die hohe Varianz beim Auftreten dieser Pathologien in verschiedenen Studien, wird besonders deutlich, bei dem Verlust von RGC. Hier gibt es Studien, die von einem signifikanten Zellverlust nach sechs Wochen Hyperglykämie berichten, während in anderen Studien auch nach zehnmonatiger Hyperglykämie noch kein signifikanter Zellverlust festgestellt werden kann⁸⁷. Da Ratten auf die Toxizität von STZ anfälliger als Mäuse reagieren, wird nach der Induktion die Gabe von Insulin erforderlich, auch wenn für die Induktion eine geringere Dosis eingesetzt wird. Die STZ-Dosis bei der Induktion über eine Einzelinjektion variiert überwiegend in dem Bereich von 55 mg bis 65 mg STZ pro kg Körpergewicht. Die anschließend ausgeprägten Pathologien treten tendenziell eher als bei Mäusen auf, das Einsetzen und die Ausprägung der pathologischen Merkmale variieren allerdings auch hier stark zwischen den unterschiedlichen Studien^{83, 87}.

Neben dem STZ-induzierten Modell des Typ 1 Diabetes, spielen nahrungsinduzierte Modelle des Typ 2 Diabetes eine Rolle bei Untersuchungen der DR. Da die Induktion hyperglykämischer Zustände in diesen Modellen jedoch langwieriger ist, sind sie besonders zeit- und kostenaufwändig. Die Induktion erfolgt durch hochkalorische Diäten mit hohem Fett oder Zuckergehalt, auf den die verschiedenen Spezies und Geschlechter in unterschiedlichem Umfang reagieren. So kommt es bei C57BL/6J-Mäusen durch Fütterung mit hohem Fettgehalt zwar zu adipösem Gewicht, Glucoseintoleranz und leichter Insulinresistenz, eine Hyperglykämie entwickeln sie aber nur äußerst selten. Der nah verwandte Stamm der C57BL/6N-Mäusen zeigt dahingegen bereits nach drei Wochen Fett-lastiger Diät eine

Hyperglykämie und Hyperinsulinämie. Darüber hinaus entwickeln männliche Mäuse früher und ausgeprägter eine Fettleibigkeit als weibliche Mäuse¹⁸. Unter Anwendung einer Fütterung mit 45%igem bis 60%igem Fettanteil, lassen sich bei C57BL/6J-Mäusen nach vier bis fünf Monaten eine funktionelle Störung der RGC feststellen und erhöhte Level an VEGF und inflammatorischen Zytokinen messen. Eine erhöhte Gefäßpermeabilität tritt erst nach elf Monaten auf¹³. Wird eine Hyperglykämie bei Mäusen durch die Fütterung von Galaktose induziert, verläuft die Pathogenese einer Retinopathie noch langsamer. Hier tritt ein Endothelzellverlust erst nach fünfzehn Monaten bestehender Hyperglykämie auf und nach weiteren sechs Monaten entwickeln sich Mikroaneurysmen. Ähnliche Unterschiede gibt es zwischen den Rattenstämmen. Der Geschlechterunterschied kommt hier jedoch nicht so stark zum Tragen¹⁸. Ratten sind gegenüber einer Galaktose-induzierten Hyperglykämie, genau wie gegenüber einer STZ-induzierten Hyperglykämie, anfälliger als Mäuse. Bei ihnen können bereits nach sechs bis zwölf Monaten der Verlust von Endothelzellen, Perizytenverlust und azelluläre Gefäße beobachtet werden. Zu einer reaktive Gliose, Zelltod in der inneren und äußeren nukleären Schicht und Mikroaneurysmen kommt es in diesem Modell allerdings erst bei Langzeitstudien, in denen 28 Monate Galaktose gefüttert wird⁸⁷. Um, unter Berücksichtigung der Hauptrisikofaktoren des Typ 2 Diabetes, die Ausprägung der einzelnen Pathologien zu beschleunigen, kann, zusätzlich zu einer Fett-lastigen Diät, STZ verabreicht (und dem Futter wahlweise zusätzlich Fructose zugesetzt) werden¹³.

Zur Erforschung der DR gibt es neben den induzierten Modellen auch spontane Nagetiermodelle für den DM Typ 1 und Typ 2. Hier ist die (in Kapitel 2.2.2 bereits erwähnte) *ob/ob* Maus auf dem genetischen Hintergrund von C57BL/6J am geläufigsten. Aufgrund des genetisch bedingten Leptinmangels ist der Phänotyp auf dem genetischen Hintergrund C57BL/6J im Alter von etwa zwei Monaten von Fettleibigkeit, Hyperinsulinämie, Insulinresistenz, vorübergehende Hyperglykämie und erhöhten Cholesteroll-Werten geprägt. Dementsprechend gilt die *ob/ob* Maus als Modell für Typ 2 Diabetes, wobei sie einen ausgeprägten DM nur auf dem genetischen Hintergrund der C57BLKS/J Linie entwickelt. Allerdings führt der diabetische Phänotyp der *ob/ob* Mäuse auf diesem genetischen Hintergrund zum vorzeitigen Tod, noch bevor es zu pathologischen Anzeichen einer DR kommt. Aus diesem Grund kommt die *ob/ob* Maus als C57BLKS/J Linie für die Erforschung der DR nicht in Frage¹⁸. Auf dem genetischen Hintergrund C57BL/6J kann bei *ob/ob* Mäusen hingegen nach sechswöchiger Hyperglykämie eine Abnahme der RGC und der Dicke der inneren und äußeren nukleären Schicht festgestellt werden. Eine reaktive Gliose, der Verlust von Perizyten oder vaskuläre Pathologien treten in diesem Modell erst nach mehreren Monaten auf, wobei der

Zeitpunkt zwischen einzelnen Studien sehr variiert⁸⁷. Zu solchen pathologischen Veränderungen der DR kommt es unter Hyperglykämie bei NOD (non-obese diabetic) Mäusen deutlich früher. Bei diesen Mäusen werden die β -Zellen der Bauchspeicheldrüse durch Autoimmunprozesse zerstört, wodurch sie als Modell mit hoher Analogie zu Typ 1 Diabetes genutzt werden können. Nachteilig an diesem Modell ist allerdings, dass nur 20% der Männchen und 80% der Weibchen überhaupt eine Hyperglykämie entwickeln⁸⁷. Analog zu den Mausmodellen gibt es auch spontane Mutationen in Rattenlinien, die sie als Modell für Typ 1 und Typ 2 Diabetes geeignet machen. Ein Beispiel für ein Modell des Typ 2 Diabetes in Ratten ist die ZDF (Zucker diabetic fatty) Ratte. Diese Linie entstand aus der selektiven Zucht von übergewichtigen Ratten mit spontaner Mutation des Leptin Rezeptors die zusätzlich einen autosomal-rezessiven Defekt der β -Zell-Transkription aufwiesen und dadurch hyperglykämisch waren. Das resultierende Modell der ZDF-Ratten ist gekennzeichnet durch früh einsetzende Hyperglykämie, bei dem der fortschreitende Tod der β -Zellen jedoch zu Hypoinsulinämie und verkürzter Lebenszeit führt¹⁸. Nach sechs Monaten Hyperglykämie können bei diesen Ratten pathologische Veränderungen der Gefäße, wie die Apoptose von Endothelzellen und der Verlust von Perizyten, beobachtet werden⁸⁷. Die BB (biobreeding) Rattenlinie entwickelt dagegen einen spontanen Autoimmundiabetes. In diesem Modell ist die Inzidenz mit 90%, ohne Geschlechterunterschied, wesentlich höher als bei den NOD-Mäusen. Der entstehende diabetische Phänotyp ist dabei sehr extrem, was eine sofortige Behandlung mit Insulin überlebensnotwendig macht⁸⁸. In diesem Modell können nach viermonatiger Hyperglykämie pathologische Veränderungen des retinalen Pigmentepithels (RPE) sowie erste mikrovaskuläre Läsionen festgestellt werden. Nach weiteren vier Monaten ist der Verlust von Perizyten messbar⁸⁷.

Was die Modellierung der Hauptpathologien einer DR betrifft, sind Nagetiermodelle stark begrenzt. Im Gegensatz zu Primaten besitzen Nagetiere keine Makula sondern eine „area centralis“ in der die Dichte der Stäbchen und Zapfen am höchsten ist und zur Peripherie hin abfällt⁸⁹. Daher lässt sich ein DME als Endpunkt der DR im Nagetiermodell nicht abbilden und die vaskuläre Hauptpathologie der DR tritt in den beschriebenen Modellen erst sehr spät auf, ohne dass es zu einer ausgeprägten Neovaskularisation kommt.

Für die vaskulären Pathomechanismen der DR wird ersatzweise die Induktion einer Frühgeborenen Retinopathie (retinopathy of prematurity, ROP) als Modell genutzt, welches die Ischämie als Auslöser neoangiogener Prozesse als pathologische Analogie beinhaltet. Durch den Wechsel zwischen hochkonzentriertem Sauerstoff und Raumluft in der frühen postnatalen

Phase, lässt sich in diesem Modell durch relative hypoxische Zustände ein retinaler Anstieg von VEGF induzieren. Dies führt zu einer vaskulären Neogenese, bei der sich missgebildete und undichte Gefäße entwickeln, die der vaskulären Pathologie einer DR ähneln⁸³. Werden genetische Modelle einer ROP unterzogen, lassen sich präzise Schlussfolgerungen über molekulare Aspekte der Pathologie ziehen. Zudem wurden gentechnisch veränderte Nagetiermodelle entwickelt, in denen sich, bedingt durch eine retinale Überexpression von VEGF, der Einfluss neuer Medikamente auf pathologische Neovaskularisation untersuchen lässt¹³. Doch ebenso wie im ROP-Modell, fehlen in solchen Modellen die Hyperglykämie bedingten metabolischen Veränderungen, die der Gefäßpathologie der DR zugrunde liegen. Die Ätiologie und Progression einer DR können in diesen partiellen Modellen nicht untersucht werden.

3.2 Transgene TetO-Ratten als Modell für Typ 2 Diabetes und DR

Aus den angeführten Gründen wurde 2017 ein neues Modell des Typ 2 Diabetes für die Untersuchung der DR in Ratten publiziert. Ziel der Studie war es, ein Modell des Typ 2 Diabetes zu finden, in dem sich der retinale vaskuläre Phänotyp der DR stärker ausgeprägt und reproduzierbarer als in den bereits vorhandenen Modellen untersucht werden kann¹. Dafür wurde eine transgene Rattenlinie phänotypisiert, die 2009 am Max-Delbrück-Center (MDC) von der Arbeitsgruppe um Professor Michael Bader generiert wurde. Bei diesen Ratten induziert die Gabe des Tetracyclins Doxycyclin eine shRNA-Expression, die ubiquitär zu einer reversiblen Reduktion der Insulinrezeptor-Expression und dessen Signalübertragung führt. Der dadurch resultierende Anstieg des Blutglucosegehalts ist dosisabhängig von der verabreichten Konzentration des Tetracyclins. Der entstehende Phänotyp ist gekennzeichnet durch Hyperglykämie, erhöhte Insulinspiegel, erhöhten Trinkbedarf, Gewichtsverlust, Polyurie und Proteinurie, ohne toxikologische Nebenwirkung des Doxycyclins (wie der unveränderte Fettsäurestoffwechsel der Leber und das Ausbleiben einer Interferon-Antwort zeigte)². Die transgenen Ratten, die über diesen induzierbaren Knockdown des Insulinrezeptors nach nur einer Woche der Doxycyclin-Gabe Typ 2 Diabetes entwickeln, werden nach dem zugrundeliegenden Mechanismus als TetO-Ratten bezeichnet (Tetracycline-controlled transactivator, Tet-On/Off)¹. Von der Arbeitsgruppe Bader, welche diese TetO-Ratten entwickelt hat, wurde das Modell bereits vielseitig eingesetzt. So untersuchte man den Einfluss eines therapeutischen Ansatzes über das Renin-Angiotensin-Systems auf Typ 2 Diabetes⁹⁰, den Einfluss einer Schwangerschaft auf die zirkadianen Schwankungen von Blutglucosewerten⁹¹ sowie die Auswirkungen die Typ 2 Diabetes während der Schwangerschaft auf die Föten⁹² und die spätere Gesundheit der Nachkommen von diabetisch schwangeren TetO-Ratten hat^{93,94}.

Zudem konnte die TetO-Linie erfolgreich dafür eingesetzt werden, die therapeutische Wirkung eines Natrium-Glucose-Cotransporter-2-Hemmers zur Vermeidung von Endorganschäden bei kombiniertem Bluthochdruck und Diabetes zu untersuchen. Zu diesem Zweck, wurde die TetO-Linie mit einer hypertensiven transgenen Rattenlinie gekreuzt.²⁶

Als das TetO-Modell 2016 erstmals von unserer Forschungsgruppe an der Charité, in Kooperation mit der AG Bader am MDC, für Untersuchungen der DR eingesetzt wurde, schien es darüber hinaus auch ein vielversprechendes neues Modell für die DR darzustellen. Unsere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass die Gabe von Doxycyclin auch in der Retina zu einer signifikanten Reduktion der Insulin-Rezeptor Expression führte. Dies bewirkte, dass die TetO-Ratten, bereits nach vier bis fünf Wochen aufrechterhaltener Hyperglykämie, vaskuläre, inflammatorische und degenerative Symptome einer DR zeigten¹. Die Gefäßmorphologie der TetO-Ratten wies zwei pathologische Hauptmerkmale auf; sie zeigten signifikant mehr stenotische Gefäße und mehr markante Venen mit abnormal großem Gefäßkaliber im tiefen mikrovaskulären Plexus. Zudem war ein signifikanter Verlust von Perizyten messbar. Als Resultat einer gestörten inneren BRB traten charakteristische undichte Gefäße in der peripheren Netzhaut auf und Unregelmäßigkeiten der Tight-Junction-Proteine im RPE wiesen auf Störungen der äußeren BRB hin¹. Untersuchungen des inflammatorischen Status zeigten eine signifikant erhöhte Expression des Zytokins TNF α , des Leukozyten-Integrins CD18 (clusters of differentiation 18), des Chemokins CCL2 (C-C motif ligand 2) und des Zelladhäsionsmoleküls ICAM-1. Zudem war die Rate aktivierter mononukleärer Phagozyten bei den TetO-Ratten signifikant erhöht und die Müllerzellen zeigten Anzeichen einer reaktiven Gliose sowie eine fehlregulierte Expression des Kalium-Kanal-Proteins Kir4.1¹.

Kir4.1, ein einwärts gerichteter Kaliumkanal auf den Müllerzellen, reguliert über die Kaliumhomöostase, den Wasserhaushalt und die Glutamat-Clearance, die retinale Mikroumgebung der Retina. Das so geschaffene Gleichgewicht bildet die Grundlage für die physiologische Funktion der retinalen Zellen. Kommt es zu einer Fehlregulation der Expression des Kir4.1 Kalium-Kanal-Proteins, bildet sich durch das Anschwellen und Absterben der Müllerzellen und einer Anreicherung von Glutamat ein neurotoxisches Milieu⁹⁵.

Der beschriebene pathologische Phänotyp im TetO-Modell, mit ausgeprägtem Schwerpunkt auf neurovaskuläre Veränderungen, konnte zuvor in keinem Rattenmodell des Typ 2 Diabetes nach nur vier bis fünfwöchiger Hyperglykämie gezeigt werden. Somit schienen die TetO-Ratten ein vielversprechendes neues Modell der DR darzustellen, welches sich ebenfalls gut für translationale Interventionsstudien eignet¹.

Aufgrund der hervorgehobenen Vorzüge der TetO-Ratten, die für die Nutzung als Modell der DR bei Typ 2 Diabetes sprachen, haben wir das TetO-Modell erneut angewandt. Die Grundannahme meiner Arbeit war, dass sich der pathologische Phänotyp der DR in dem inzwischen etablierten TetO-Rattenmodell reproduzieren lässt und dass sich in diesem Modell auch oxidativer Stress als pathologische Komponente der DR untersuchen lässt.

Die Haupthypothese, die unter Verwendung des TetO-Modells in meiner Arbeit untersucht werden sollte, lautete, dass Hyperglykämie und Hyperinsulinämie bei retinalen Zellen eine erhöhte Expression von Nox4 induzieren.

Es sollte festgestellt werden, ob die Erhöhung der von Nox4 abgeleiteten ROS den pathologischen retinalen Veränderungen einer DR vorangeht und somit für die Pathogenese verantwortlich sein könnte. Es bestand das langfristige Ziel, zu untersuchen, ob eine spezifische Hemmung von Nox4 ein therapeutisches Potential gegen die ursächliche Pathogenese einer DR besitzt. Für die Testung dieser Arbeitshypothesen habe ich Nox4 nach zwei, vier und acht Wochen Hyperglykämie auf Proteinexpressionsebene gemessen. Nox4, ROS und Inflammationsmarker sowie das zeitliche Auftreten assoziierter Pathomechanismen habe ich mit immunhistochemischen Methoden in Sagittalschnitten und Flatmount-Präparaten der Retina evaluiert.

4 Material und Methoden

Die in dieser Arbeit beschriebenen Tierexperimente wurde durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) geprüft und unter den amtlichen Genehmigungsnummern G0056/18 (Genehmigungsdatum 27.06.2018) und G0325/18 (Genehmigungsdatum 13.02.2019) durchgeführt. Alle Experimente fanden in Übereinstimmung mit dem ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research und den lokalen Vorgaben durch das LAGeSo statt.

Tabelle 1 listet alle Materialien, die ich bei der Durchführung der anschließend beschriebenen Methoden verwendet habe.

Tabelle 1: Alphabetische Auflistung der verwendeten Materialien, Geräte und verwendeten Programme.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller/Lieferant	Katalognummer
1xScalpell, Fig.10	neoLab, Heidelberg	1-1565
24 Well Platte	Sarstedt, Nümbrecht	833.922
AF488	Dianova, Hamburg	711-545-152
AF568	Thermo Fisher Scientific, Eugene (OR)	A11075
anti-Iba1	Abcam, Cambridge (UK)	ab178847
anti-GFAP	Synaptic Systems, Göttingen	173 004
anti-Ki67	Abcam	ab281847
anti-Nox4	Abcam	ab133303
Bovine Serum Albumin BSA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	A9647-100G
CONTOUR® NEXT Sensoren	Ascensia Diabetes Care Deutschland, Basel	84167836
Dako Fluorescence Mounting Medium	Agilent Dako, Santa Clara (CA)	S3023
Dako-Pen/hydrophober Stift RT	Agilent Dako, Santa Clara (CA)	S2002
DAPI	Roche Diagnostics, Basel	10236276001
DeadEnd™ Fluorometric TUNEL Assay	Promega, Madison (WI)	G3250
Deckgläser (24x60 mm)	Carl ROTH, Karlsruhe	H878
DHE Dihydroethidium	Thermo Fisher Scientific, Eugene (OR)	D23107
Doxycyclin hyclate	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	D9891-10G
DPBS Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Corning, New York (NY)	21-031-CM
EDTA III	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	E5134-100G
Eppis/Reaktionsgefäße 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg	30.121.023
Eppis/Reaktionsgefäße 1,5 ml Safe Lock	Eppendorf, Hamburg	30.121.589
Eppis/Reaktionsgefäße 2 ml	Ratiolab, Dreieich	5615108
ESwab regular	Copan Italia, Brescia (IT)	480CFA
Ethanol, abs.	Merck, Darmstadt	1.009.832.500
Ethanol, abs.	Serva, Heidelberg	39556.02
Fast Prep Reaktionsgefäßdeckel (grün)	MP Biomedicals, Santa Ana (CA)	5067002
Fast Prep Reaktionsgefäße	MP Biomedicals, Santa Ana (CA)	5076-200
Haltungstriät	Ssniff, Soest	V1534-000

Haltungsdiaät Ratten/Mäuse	Altromin, Lage	1328
Haltungsdiaät als Hybridpellets	Altromin, Lage	1328
Isofluran, 1ml/ml	cp-pharma, Burgdorf	Ch.B: G135K21A
Isolectin B4	Thermo Fisher Scientific, Eugene (OR)	I32450
Isopropanol/2-Propanol	Thermo Fisher Scientific, Eugene (OR)	364400010
Isopropanol/2-Propanol	Honeywell/Riedel-deHaen, Seelze	190764-500ML
Keramikkugeln, 1.4 mm	Qiagen, Hilden	1103955
Ketamin, 100 mg/ml	cp-pharma, Burgdorf	E3309-S.0921
Methanol, > 99.9%	Carl ROTH, Karlsruhe	0082.2
MICROLET® Lanzetten	Ascensia Diabetes Care Deutschland, Basel	82224638
NaCl	Carl ROTH, Karlsruhe	3957.1
NOX4 ELISA Kit Rat	AVIVA SYSTEMS BIOLOGY, San Diego (CA)	OKEH01057
Paraformaldehyd 16%, EM Grad	Electron Microscopy Sciences, Hatfield (PA)	15710
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Eugene (OR)	23227
Proteinase K	Dako, Agilent Technologies, Santa Clara (CA)	S3020
Spritze für Narkose, 21G	B Braun, Melsungen	4657527
Starfrost Objektträger	Knittel Glas, Braunschweig	ISO Norm 8037/1
Tissue-Tek® Cryomold® 10x10x5 mm	SAKURA Finetek, Umkirch	94-4565
Tissue-Tek® O.C.T. Compound	SAKURA Finetek, Umkirch	94-4583
Tris Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	T1503-1KG
Tris HCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	1.082.191.000
Triton-X 100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	T8787
Xylavet	cp-pharma, Burgdorf	E2954-S.1116
Xylol, > 97%	Carl ROTH, Karlsruhe	9713.1
Zuchtfutter	Ssniff, Soest	V1324-000
Geräte	Hersteller/Lieferant	Seriennummer
Binokular	Carl Zeiss, Oberkochen	STEMI SV11
Blutzuckermessgerät CONTOUR® NEXT ONE	Ascensia Diabetes Care Deutschland, Basel	84664758
Fadenpinzette	Geuder, Heidelberg	G-19030
Fadenpinzette	Geuder, Heidelberg	G-19035
Fast Präp-24	MP Biomedicals LLC, Irvine (CA)	SN: 22084650
Federschere	Geuder, Heidelberg	G-19765
Federschere	Geuder, Heidelberg	G-19600
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen	Axio Imager.M2
IVC, Optirat Plus Käfige, 1181 cm ²	Animal Care Systems, Centennial (CO)	CP79B100P
Inkubator (37°)	Binder, Tuttlingen	9010-0078
Inkubator (60°)	Binder, Tuttlingen	9010-0153
Käfige Typ 4, 1815 cm ²	Zoonlab, Castrop-Rauxel	Auf Anfrage
Konfokales Fluoreszenzmikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar	TCS SPE
Luxmeter	PCE Instruments, Meschede	PCE-LED 20
MULTISKAN Sky Reader	Thermo Fisher Scientific, Eugene (OR)	51119500
Nanodrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Eugene (OR)	SE: K622
Zentrifuge groß	Thermo Fisher Scientific, Eugene (OR)	Megafuge 1.0R
Zentrifuge klein	Eppendorf, Hamburg	5417R

Zentrifuge klein	Eppendorf, Hamburg	5424
Programme	Hersteller	Version
GraphPad Prism	Graphpad Software, Boston (MA).	Version 9.4.1
ImageJ	National Institutes of Health (USA)	Version win64
Leica Application Suite X	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar	3.7.4.23463
Mikroskopsoftware ZEN	Carl Zeiss, Oberkochen	3.3 blue edition
Software ELISA Reader	Thermo Fisher Scientific, Eugene (OR)	Skscanit 6.0.1 Research Edition

4.1 Tiere

Wir haben TetO-Ratten (NTac:SD-Tg(H1/tetO-RNAi:Insr)29Bdr aus der homozygot gehaltenen Linie L8429) aus der Zucht der Arbeitsgruppe von Professor Michael Bader (MDC) genutzt. Zu Beginn des Projektes (ab März 2019 bis Februar 2020) wurden ausschließlich Tiere aus der Gründerpopulation vom MDC bezogen.

Um parallel eine eigene TetO-Zucht aufzubauen, wurden aus der Gründerpopulation vom MDC (im September 2018) neun männlichen und fünfzehn weiblichen Ratten in den Quarantänebereich der Charité-internen Zucht der Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin (FEM) transportiert. Durch die dortige Verpaarung, konnten (im April 2019) von fünf Weibchen Embryonen gewonnen werden. Aus dem anschließenden Embryotransfer gingen (im Mai 2019) drei Nachkommen hervor, mit denen von der FEM eine neue Zucht aufgebaut wurde. Aus diesem neuen TetO-Substamm der FEM wurden (ab Februar 2020) zusätzlich Tiere für die Experimente bezogen. Da der Zuchtbereich der FEM schon bald darauf in andere Räumlichkeiten umziehen musste, wurde die Zucht des neuen FEM-Substammes zu JANVIER LABS nach Frankreich verlagert. Um die Zucht dort neu aufzubauen, wurden vom FEM (im Mai 2020) zwei Männchen und sieben Weibchen zu JANVIER LABS nach Frankreich gesendet. Fortan (ab Oktober 2020) wurden, je nach Verfügbarkeit, TetO-Tiere vom MDC oder von JANVIER LABS bezogen.

Anfang 2021 traten in beiden Zuchten Engpässe auf. Die Wurfgrößen waren dezimiert und die Nachkommen hatten ein geringeres Geburtsgewicht (zudem schienen sie eine schlechtere gesundheitliche Kondition zu haben; die erreichten diabetischen Glucose-Werte waren sehr schwankend und setzten den Tieren mehr zu). Aus diesem Grund entschieden wir uns (im August 2021), die Zucht bei JANVIER LABS durch Rückkreuzung aufzufrischen. Die TetO Tiere wurden dafür mit Tieren eines von JANVIER LABS gehaltenen SD-Substammes verpaart, um heterozygote F1 Nachkommen erneut zu verpaaren und deren homozygote F2 Nachkommen weiter zu züchten. Da die histologischen Präparate der Retina dieser Tiere jedoch gehäuft morphologische Anomalien wie eine Desorganisation der nukleären Schichten mit

Rosetten und Faltenbildung aufwiesen, entschieden wir uns, nach der Begutachtung von Augenpräparaten der so aufgefrischten Linie, die Zucht des neuen JANVIER LABS TetO-Stammes im Sommer 2022 einzustellen. Für das Projekt, zur Erforschung der DR, kamen diese Tiere daher nicht zum Einsatz.

Als Wildtyp-Kontrollen dienten SD-Ratten, die von Projektbeginn bis Projektende von JANVIER LABS aus Frankreich bezogen wurden. Sie stammten somit aus einem anderen Substamm als die Gründertiere der TetO-Linie.

Alle für meine Arbeit verwendeten Tiere wurden an der Charité, Campus Virchow Klinikum (CVK), in der Tierhaltung Forum IV gehalten (abgesehen von zwei Kohorten, die von September bis November 2020 in der Tierhaltung des Charité Crossover Centers, CCO, am Campus Mitte untergebracht wurden). Die Grundversorgung der Tiere (d.h. Auffüllen von normalem Trinkwasser und Futter, sowie ein bis maximal drei Käfigwechsel pro Woche) wurde durch das geschulte Tierpflege-Personal der FEM sichergestellt, alle weiteren Maßnahmen wurden von mir durchgeführt. Es herrschte ein Hell-Dunkel-Rhythmus von zwölf Stunden, mit einer Beleuchtungsstärke in den Haltungsräumen von 380 bis 800 Lux (gemessen auf einer Höhe von 150 cm über dem Boden). Futter und Tränke standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Bei Projektstart bekamen die Tiere eine gängige Haltungsdiät von Ssniff, nach einem Jahr wurde auf angereichertes Zuchtfutter gewechselt (ebenfalls von Ssniff), bevor schließlich Hybridpellets von Altromin, mit einer leichteren Verfügbarkeit der Nährstoffe, gefüttert wurden. Hauptgrund war der Versuch, dem Gewichtsverlust, der nach Diabetesinduktion auftrat, entgegenzuwirken. Die Käfige waren mit je einer Unterschlupfmöglichkeit, Nestbaumaterial und einem Stück Holz zum Nagen ausgestattet. Nachdem ich bei der Obduktion eines verstorbenen diabetischen Tieres einen Darmverschluss, durch hochgradige Ansammlung von Nestbaumaterial im Darminneren, festgestellt hatte, verzichteten wir bei der Käfigausstattung der diabetischen TetO-Tiere teilweise auf Nestbaumaterial. Bis zum Versuchsbeginn wurden die TetO-Tiere und SD-Tiere in Gruppen mit bis zu sechs Tieren pro Käfig gehalten. Verwendet wurden dabei konventionelle Typ 4 Käfige, mit einer Grundfläche von 1815 cm². Die Tiere wurden in einer Altersspanne von vier bis dreizehn Lebenswochen aus den verschiedenen Zuchtbereichen in den Haltungsbereich am CVK geliefert. Dort hatten sie, bis Experimentbeginn, eine Eingewöhnungsphase von mindestens zwei Wochen. Da jedoch das Ankunftsalter und die altersabhängige Gewichtsentwicklung der Tiere über die Projektdauer hinweg sehr variierte, variierte auch die Haltungsdauer der einzelnen Kohorten bis Experimentbeginn.

Mit der Diabetesinduktion begann ich bei einem erreichten Körpergewicht von mindestens 250 g bei weiblichen TetO-Ratten (welches im Alter zwischen acht und zwölf Wochen erreicht wurde). Unter der Doxycyclin-Gabe teilten sich je zwei Tiere einen Käfig, um ein besseres Monitoring und eine genauere Anpassung der Doxycyclin-Dosis zu gewährleisten. Bei dem dafür eingesetzte Doxycyclin handelt es sich um ein Antibiotikum aus der Klasse der Tetracycline, welche als CMR-Stoffe gelten (cancerogen, mutagen oder reproduktionstoxisch wirkende Stoffe). Demzufolge mussten die Tiere während der Behandlung, aus arbeitssicherheitstechnischen Gründen, in separat ventilierten Käfigen untergebracht und die Einstreu dem zytotoxischen Abfall zugeführt werden. Um dies zu gewährleisten, saßen die Tiere (für die Zeit der Doxycyclin-Verabreichung) entweder in einem Rondell mit IVC-Käfigen (individual ventilated cages, Optirat Plus Käfige aus getöntem Polysulfon mit einer Grundfläche von 1181 cm²) oder in einem Haltungsschrank, der über ein eigenes Abluftsystem verfügte (ein sogenannter Scantainer, in den bei Vollbelegung zwölf konventionelle Typ 4 Käfige Platz haben). Das Doxycyclin wurde über das Trinkwasser so zugeführt, dass jedes Tier pro Tag die Induktionsdosis von 2 mg Doxycyclin pro kg Körpergewicht (KG) aufnahm. Um dies exakt zu berechnen, verifizierte ich alle zwei Tage das Gewicht und die Trinkmenge und passte die Konzentration der Trinklösung entsprechend an. Aufgrund der geringen Stabilität des gelösten Doxycyclins bei Raumtemperatur, wurden die Trinkflaschen mit Doxycyclin alle zwei bis drei Tage ausgewechselt. Nach fünf Tagen prüfte ich zusätzlich den möglichen Anstieg des Blutglucose-Spiegels. Alle Gewichtskontrollen, sowie Blutglucose-Messungen führte ich an einer ventilierten Sicherheitswerkbank durch. Die Messungen erfolgten mit dem Blutzuckermessgerät CONTOUR® NEXT ONE über einen Blutropfen aus der Schwanzspitze.

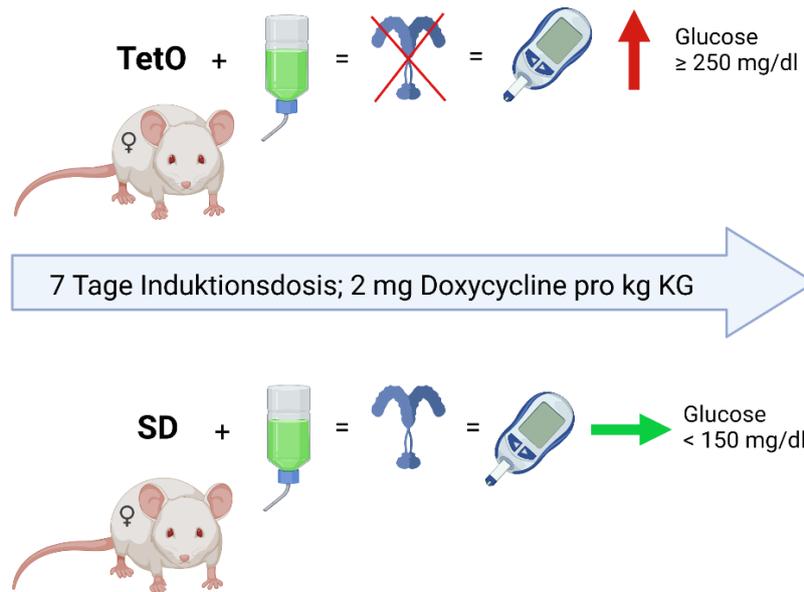


Abbildung 1: Experimenteller Ablauf Induktionsphase (erstellt mit BioRender.com). Das über das Trinkwasser verabreichte Doxycyclin (2 mg/kg KG) führte bei den transgenen TetO-Ratten innerhalb von sieben Tagen zu einem Anstieg des Blutglucose-Spiegels infolge eines Insulinrezeptor-Knock-downs, während der Blutglucose-Spiegel der Wildtyp-SD-Ratten unverändert blieb.

Ab einer erreichten Glucose-Konzentration von ≥ 250 mg/dl reduzierte ich die Doxycyclin-Dosis auf 0,2 mg/kg KG, um den Blutzuckerspiegel bei den TetO-Ratten konstant im diabetischen Bereich zu halten. Je nach Gesundheitszustand der Tiere, kontrollierte ich das Gewicht, den Blutzucker, den Pflegezustand und das Verhalten der Tiere drei bis sieben Mal pro Woche und führte Score-Sheet-Protokolle. In gleicher Frequenz wurden bei den Kontrollen die Käfige gewechselt. Hauptkriterium für einen frühzeitigen Abbruch des Versuches war ein Gewichtsverlust von ≥ 20 % des Ausgangsgewichtes sowie äußerliche Anzeichen, die für einen erhöhten Leidensdruck der Tiere sprachen (festgelegt in den Score Sheets, welche auf Rückfrage hin eingesehen werden können). Die untersuchten Diabeteszeiträume betragen zwei, vier und acht Wochen, ab dem Erreichen des Blutglucose-Spiegels von ≥ 250 mg/dl.

Die SD-Kontrolltiere wurden, nach zweiwöchiger Eingewöhnungsphase, zum Experimentbeginn einer Blutglucose-Messung unterzogen, bevor sie eine Woche die Induktionsdosis Doxycyclin bekamen (2 mg/kg KG, unter gleichen Haltungsbedingungen wie die TetO-Ratten). Nachdem ich durch die anschließende Messung des Blutglucose-Spiegels verifizierte, dass es bei diesen Tieren zu keiner Änderung der Blutglucose-Konzentration durch die Doxycyclin-Gabe kam, wurden sie bis zu der Finalisierung mit Wasser getränkt und nicht weiter behandelt (während dieser Zeit wurden ihre Käfige aus Platzgründen zurück in die regulären Haltungsregale gestellt).

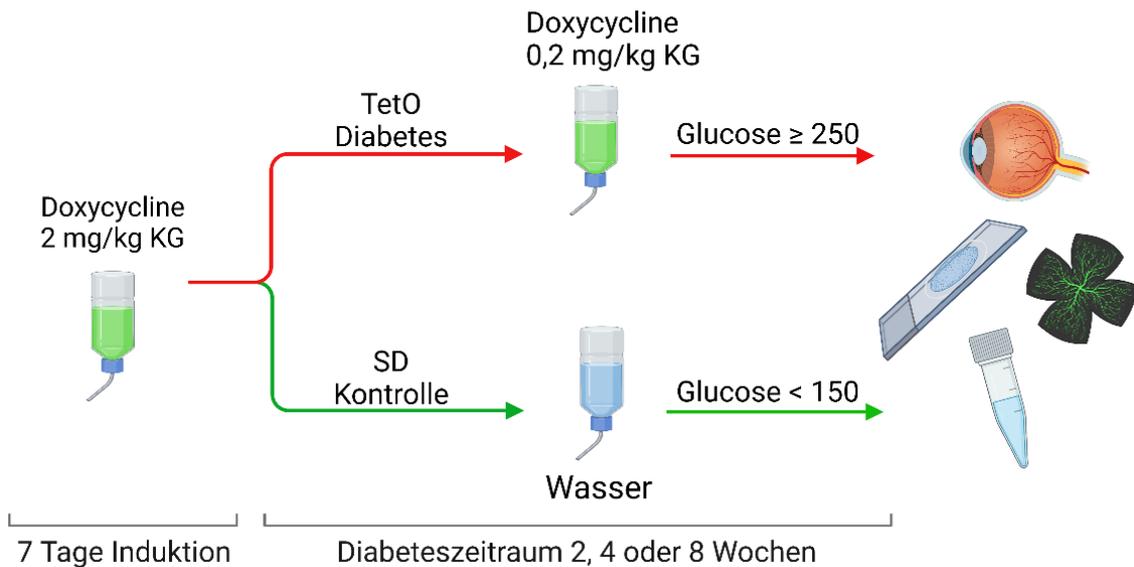


Abbildung 2: Experimenteller Ablauf Diabeteszeitraum (erstellt mit BioRender.com). Im Anschluss an die Induktionsphase bekamen die transgenen TetO-Ratten eine Erhaltung-Dosis Doxycyclin verabreicht (0,2 mg/kg KG), um ihren Blutglucose-Spiegel dauerhaft im hyperglykämischen Bereich (≥ 250 mg/dl) zu halten, während die Wildtyp-SD-Ratten für denselben experimentellen Zeitraum Wasser ohne Doxycyclin bekamen.

4.2 Probenentnahme für *ex vivo* Analysen

Vor der Tötung wurden die Tiere von mir mit Isofluran narkotisiert, bevor sie eine letale Dosis (letal \geq doppelte Menge der für chirurgische Toleranz erforderlichen Dosis⁹⁶) aus Ketamin und Xylavet (2:1) intraperitoneal injiziert bekamen. Sobald nach der Injektion des Narkosemittels der Test des Zwischenzehenreflexes negativ ausfiel, erfolgte die Euthanasie mittels zervikaler Dislokation oder Dekapitation in tiefer Narkose, ohne dem Tier Schmerz oder Leid zuzufügen. *Post mortem* entnahm ich die Augen, um sie für Immunhistochemische Färbungen von Schnittpräparaten oder Flatmounts (Flachpräparate der Retina) sowie für die Protein-Bestimmung weiter zu bearbeiten.

Bei Tieren, die während des Experimentes verstarben oder die vorzeitig getötet werden mussten, eröffnete ich den Bauch- und Brustraum, um den Zustand der inneren Organe zu begutachten und zu dokumentieren. Teilweise entnahm ich bei diesen Sektionen zusätzlich Abstrichproben (mit eSwab Tupfern), welche ich für eine Mikrobiologische Untersuchung an das Labor der Gesellschaft für innovative Mikroökologie (GIM mbH) sendete.

Für die Präparation der Paraffinschnitte, fixierte ich die Augen für 48 Stunden bei 4 °C in 4% PFA, bevor ich sie in 70% Ethanol bei RT an das Labor der Augenklinik am Campus Benjamin Franklin (CBF) versendete. Am CBF wurden die Proben von der technischen Assistentin Frau Oberländer in Paraffin gebettet und sagittal geschnitten. Pro Auge stellte sie ~20 Objektträger mit je drei 5 μm dicken Paraffinschnitten aus dem Bereich des Sehnerv-Kopfes her. Die

Schnitte auf dem jeweils ersten, mittleren und letzten Objektträger einer Schnittserie färbte Frau Oberländer mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung), bevor sie die Proben zurück an das CVK sendete.

Augen, die für Gefrierschnitte vorgesehen waren, habe ich nach der Entnahme in einem Cryomold in OCT Compound (Tissue Teck) eingebettet und für 3 Minuten bei RT stehen gelassen, damit es vor dem Einfrieren zu einer gleichmäßigen Diffusion in das Gewebe kommen konnte. Für eine schnelle und gleichzeitig schonende Methode der Präparat Fixierung kamen die Cryomolds im Anschluss auf ein Gemisch aus Ethanol und Trockeneisgranulat. Die Präparate wurden bis zum Schnitt bei -80 °C gelagert und, ohne die Kühlkette zu unterbrechen, zur Weiterverarbeitung an iPATH Berlin (Core Unit Immunpathologie für Experimentelle Modelle, Campus Benjamin Franklin) versendet, wo sie bei -25 °C in 4 µm dicke Präparate geschnitten und einzeln auf einen Objektträger gezogen wurden. Die Schnittserien der Cryo Präparate umfasste jeweils 10 aufeinanderfolgende Schnitte aus dem Bereich des Sehnerv-Kopfes. Fertige Schnitte lagerten bis zum Färben bei -80 °C.

Um an einem Binokular (STEMI SV11, Zeiss) Flatmount-Präparate anzufertigen, habe ich die entnommenen Augen zunächst 13 Minuten in 4% PFA fixiert und anschließend für einen 15-minütigen Waschschrift in PBS überführt. Für die darauffolgende Präparation entfernte ich anhaftendes Fett- und Muskelgewebe, bevor ich durch einen kreisrunden Schnitt um die Cornea die Linse freigelegt und den darunterliegenden Glaskörper aus dem Auge entnahm. Durch die anschließende Applikation von vier Schnitten in den Augenkeln, bestehend aus Sklera, Chorioidea und Retina, ließ sich die namensgebende Form eines flach ausgebreiteten Präparates erzielen. Dies ermöglichte die Durchtrennung des Sehnervs und die anschließende Separierung der Retina, von dem darunterliegenden Chorioidea-Gewebe. In dieser Weise präparierte Retina Flatmounts wurden bis zu der Färbung bei -20 °C in Methanol fixiert gelagert.

Für die Proteinbestimmungen über den ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay) habe ich die Augen nach der Eukleation in PBS auf Eis gelagert, bis am Binokular (STEMI SV11, Zeiss) die Retina entnommen wurde. Ohne vorherige Fixierung wurde bei der Präparation, wie zuvor beschrieben, Linse und Glaskörpers aus dem Auge entnommen, um dann, unter Fixation des Sehnervs, die Retina durch Druck auf den Augenkeln zu trennen. Die so erhaltenen Präparate wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, um sie anschließend bis zu den Analysen bei -80 °C zu lagern.

4.3 Immunhistochemie

Ex vivo habe ich verschiedene Methoden angewendet, die auf dem Prinzip der Immunhistochemie beruhen. So konnten, durch die spezifische Bindung markierter Antikörper, pathologische Änderungen auf Zell- und Proteinebene bildlich dargestellt werden. Wie Paraffinschnitte, Gefrierschnitte und Flatmount-Präparate immunhistochemisch behandelt wurden, um qualitativ und quantitativ auswertbare Ergebnisse zu erhalten, erläutere ich den folgenden fünf Absätzen.

4.3.1 TUNEL Apoptose Assay in Sagittalschnitten

Die Apoptose-Rate von retinalen Zellen wurde in Paraffin-Schnitten, mittels DeadEnd™ Fluorometric TUNEL Assay, nachgewiesen. Bei dieser Methode werden, durch den katalytischen Einbau von Fluorescein-12-dUTP, DNA-Fragmente markiert, wodurch Zellen im apoptotischen Stadium identifiziert werden können. Für den TUNEL Apoptose Assay mussten die in Paraffin eingebetteten Schnitte zunächst deparaffinisiert werden. Zu diesem Zweck habe ich die Objektträger 5 Minuten bei RT in Xylol gewaschen und die Gewebe anschließend mittels einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Beginnend mit einem 5-minütigen Bad in 100% Ethanol wurden die Schnitte jeweils 3 Minuten in 100%, 95%, 85%, 70% und 50% Ethanol getaucht. Im Anschluss wurden die Schnitte 5 Minuten in 0,85% NaCl und 5 Minuten in PBS gewaschen, bevor sie zum Fixieren für 15 Minuten in 4% PFA kamen. Die Fixierung erforderte 2 weitere 5-minütige Waschungen mit PBS, bevor die Gewebe permeabilisiert werden konnten. Um die Diffusion von Fluorescein-12-dUTP in die Zellkerne zu ermöglichen, habe ich die Schnitte 10 Minuten mit je einem Tropfen Proteinase K inkubiert. Dieser Vorgang wurde nach Ablauf der Inkubationszeit durch ein 5-minütiges Bad in PBS gestoppt, bevor die Gewebe für eine weitere Fixierung 5 Minuten in 4% PFA und zum Waschen anschließend weitere 5 Minuten in PBS kamen. Um die Schnitte für die Inkubation mit dem rTdT-Puffer vorzubereiten, mussten sie nun 10 Minuten mit dem dafür vorgesehenen, im Kit enthaltenen, Äquilibrierungs-Puffer bedeckt werden. In dieser Zeit habe ich den rTdT-Inkubations-Puffer wie folgt angesetzt:

Tabelle 2: rTdT Inkubations Puffer. Pro Reaktion wurde ein Volumen von 51 µl Puffer frisch angesetzt.

Äquilibrierungs-Puffer	45 µl
Nukleotid-Mix	5 µl
rTdT Enzym	1 µl

Für die Inkubation mit diesem Puffer, wurden auf jeden Schnitt 50 µl pipettiert und die Objektträger anschließend mit einer Plastikfolie bedeckt für 60 Minuten bei 37 °C gehalten. Die Reaktion wurde im Anschluss durch ein 15-minütiges Bad in 2xSSC Lösung bei RT gestoppt und überschüssiges fluorescein-12-dUTP durch 3-maliges Waschen in PBS entfernt. Um Zellkerne zu färben, wurden die Schnitte im letzten Schritt mit einem glycerinhaltigen Einbettmedium (Mountingmedium) benetzt, welches DAPI enthält. Die mit Deckgläsern versehenen Gewebe habe ich bis zu der Anfertigung von 20-fach vergrößerten Aufnahmen der Retina, am Fluoreszenzmikroskop Axio Imager.M2 (Carl Zeiss), lichtgeschützt bei 4 °C gelagert. Von jeder Probe habe ich anschließend (verblindet) die apoptotischen, TUNEL-positiven, Zellen in drei Sagittalschnitten der kompletten Retina manuell in der Mikroskopsoftware ZEN (3.3 blue edition, Carl Zeiss) ausgezählt und gemittelt.

4.3.2 HE-Färbung in Sagittalschnitten

Die HE-Färbung wurde von Frau Oberländer, direkt nach dem Anfertigen der Paraffinschnitte, durchgeführt. Um von den zugesendeten HE-gefärbten Sagittalschnitten an einem Axio Imager.M2 (Carl Zeiss) eine Aufnahme der Präparate im Ganzen anzufertigen, habe ich die Kachelscan-Funktion genutzt und eine 20-fache Vergrößerung gewählt. Auf diese Weise generierte Bilddateien können in der Mikroskopsoftware ZEN (3.3 blue edition, Carl Zeiss) so weit vergrößert werden, dass die Ganglienzellen und Photorezeptorzellen in einzelnen Teilabschnitten gezählt werden können. Diese manuelle Auszählung der Zellen wurde von mir nach Verblindung der Proben durchgeführt. Ich erfasste das gesamte Längenmaß in µm und die Anzahl der Ganglienzellen in horizontaler Ebene. Die Anzahl übereinanderliegender Zellkerne in vertikaler Ebene innerhalb der äußeren nukleären Zellkernschicht, zählte ich an je 4 Messpunkten rechts und links vom Sehnervenkopf. Aus den auf diese Weise erfassten Rohdaten ermittelte ich die Anzahl der Ganglienzellen pro 100 µm, sowie die Dicke der äußeren nukleären Zellkernschicht in ihrer Anzahl der übereinanderliegenden Zellkerne (als Mittelwert der entsprechenden Messpunkte beider Seiten in 600, 1200, 1800 und 2400 µm Entfernung vom Sehnerv).

4.3.3 Färbung mit anti-Nox4 und anti-GFAP in Sagittalschnitten

Für die immunhistochemische Färbungen des sauren Gliafaserproteins (Glial fibrillary acidic proteins, GFAP), des Nox4 und des Proliferationsmarkers Ki67 verwendete ich als Pufferlösung TBS, welches ich folgendermaßen ansetzte:

Tabelle 3: Verwendete Puffer für immunhistochemische Färbung. TBS: Die in der Tabelle angeführte Zusammensetzung entspricht der 10-fachen Konzentration des verwendeten Puffers als 1xLösung. EDTA: Nach Lösung der Komponenten wurde am pH-Meter der pH eingestellt.

10xTBS pH 7,4		EDTA Puffer pH 9	
TRIS-HCl	24 g	TRIS-Base	1,21 g
TRIS-Base	5.6 g	EDTA III	0,37 g
NaCl	88 g	dH ₂ O	1 L
dH ₂ O	1 L		

Die Deparaffinierung der Sagittalschnitte erfolgte über eine 20-minütige Wärmeinkubation bei 57 °C mit anschließendem Waschen in Xylol. Nachdem die Präparate 2-mal für 10 Minuten in Xylol gewaschen wurden, habe ich das Gewebe in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Dafür kamen die Objektträger nacheinander zweimal 10 Minuten in Isopropanol und daraufhin je 5 Minuten in 96%, 90%, 70% und 50% Ethanol. Nach einem Waschschrift in dH₂O wurden die Antigene in den Gewebepreparaten demaskiert, um die Antikörperbindung zu erleichtern. Die jeweiligen, den Antikörpern angepassten, Verfahren (Tabelle 4) der Antigen-Demaskierung, habe ich mit 5-minütigem Waschen der Objektträger, in einer mit 1xTBS gefüllten Küvette, gestoppt. Für die im Anschluss folgenden Arbeitsschritte, umrandete ich die Schnitte mit einem hydrophoben Stift. Um die Gewebe zu permeabilisieren, benetzte ich sie für 10 Minuten mit je einem Tropfen 0,5% Triton-X 100 in 1xTBS. Nach drei 5-minütigen Waschschriften mit je einem Tropfen 1xTBS, wurden die Präparate bei RT für eine Stunde 5-prozentigem BSA ausgesetzt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Die primären Antikörper, mit denen ich die Proben über Nacht bei 4 °C inkubierte, sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Verwendete primäre Antikörper (pAB) und sekundäre Antikörper (sAB) für die immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten.

Demaskierung	pAB	Spezies	Konz.	sAB	Spezies	Konz.
7 Minuten Proteinase K	anti-GFAP Synaptic Systems 173 004	Meer- schweinchen	1:100	anti Meerschweinchen IgG konjugiert mit AF568 Thermo Fisher A11075	Ziege	1:2000
EDTA Puffer 2x4 Minuten 600 Watt	anti-Nox4 Abcam ab133303	Kaninchen	1:600	Anti Kaninchen IgG konjugiert mit AF488 Dianova 711-545-152	Esel	1:800
EDTA Puffer 2x4 Minuten 600 Watt	anti-Ki67 konjugiert mit AF488 Abcam ab281847	Kaninchen	1:50			

Am nächsten Tag wurde mit drei 5-minütigen Waschschritten, mit je einem Tropfen 1xTBS, begonnen, bevor die Gewebeschnitte für eine Stunde, bei RT, mit einer Lösung aus den sekundären Antikörpern (Tabelle 4) und 300 nM DAPI in 1xTBS inkubiert wurden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde ein letztes Mal, in drei 5-minütigen Schritten, gewaschen, bevor die Sagittalschnitte mit Dako Mountingmedium und einem Deckglas bedeckt und bis zum Mikroskopieren bei 4 °C, dunkel, gelagert wurden. Um die Fluoreszenzintensität qualitativ zu bewerten, wurden die gefärbten Gewebeschnitte von mir ebenfalls in 20-facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop Axio Imager.M2 (Carl Zeiss) aufgenommen.

4.3.4 DHE-Färbung in Gefrierschnitten

Aufgrund der besonders geringen Halbwertszeit von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS), können diese nicht in Paraffinschnitten nachgewiesen werden. Aufgrund dessen ließ ich (von iPATH Berlin) Gefrierschnitte der Augen anfertigen, um den Superoxid-Indikator Dihydroethidium (DHE) anzuwenden, der bei Oxidation im Zellkern in die DNA interkaliert und sich dann über seine rote Fluoreszenz nachweisen lässt. Für diese Färbung inkubierte ich die Schnittpräparate direkt nach der Entnahme aus -80 °C mit DHE. Die anwendungsfertige Stocklösung (5 mM DHE (D23107) in DMSO) wurde für die Färbung auf 2,5 µM in PBS verdünnt. Jeder, mit 80 µl DHE-Lösung versehene Schnitt, wurde 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Schnitte bei Raumtemperatur drei Mal mit PBS gewaschen, 10 Minuten mit 4 % PFA fixiert und erneut drei Mal gewaschen, bevor sie mit Mountingmedium und einem Deckglas versehen wurden. Das Mikroskopieren erfolgte

zeitnah, bis dahin wurden die Präparate lichtgeschützt bei 4 °C gelagert. Die Aufnahmen fertigte ich am Axio Imager.M2 (Carl Zeiss) in 20-facher Vergrößerung, mit einer Belichtungszeit von 150 ms (ex:548/em:561) an. Die Auswertung der Fluoreszenzstärke erfolgte in ImageJ (Version win64). Da das Schneideverfahren in den Gefrierschnitten jedoch zu starken Artefakten im Bereich der Retina führten und die Zellkerne großflächig zerstört waren, konnte die Fluoreszenzstärke des DHEs nur in der Zellschicht der Photorezeptoren gemessen werden. Um dabei Unterschiede der möglicherweise durch den Schnitt beeinflussten Zelldichte mit zu berücksichtigen, evaluierte ich die mittlere Fluoreszenz pro Zellkern (anstelle der üblicherweise gemessenen Fluoreszenz der gesamten Fläche der Präparat-Bereiche). Für die standardisierte Erfassung dieser Rohdaten wurde zunächst eine Fläche der *Region Of Interest* (ROI) festgelegt und gespeichert. Anschließend wurde der durchschnittliche Zellkerndurchmesser und die Distanz zwischen den Zellkernen in Pixel ermittelt, um diese Werte später in dem *Image-based Tool for Counting Nuclei* (ITCN) einzugeben. Der Bilddateityp wurde in 8 bit geändert und Helligkeit sowie Kontrast optimiert, um dann die ROI in gleichen Abständen, in drei Bereichen ohne Artefakte, zu positionieren. Von diesen standardisierten Flächen wurde nun nacheinander die *Integrated Density* (IntDen, als Produkt aus Fläche und mittlerem Grauwert) und die Zellzahl gemessen, um daraus die mittlere Fluoreszenzstärke pro Zellkern zu berechnen.

4.3.5 Färbung mit anti-Iba1 und Isolectin in Flatmount-Präparaten

Für meine Färbung des Ionisierten Calcium-bindenden Adaptermoleküls 1 (Iba1) und der retinalen Gefäße mit Isolectin, wurden die bei -20 °C in Methanol fixierten Präparate, in je eine Kammer einer 24-Well Platte überführt und drei Mal 10 Minuten lang mit 1 ml 1xTBS (pH 7,4, s. Abschnitt 4.3.3, Tabelle 3) gewaschen. Es folgte ein Inkubationsschritt, bei 4 °C über Nacht, mit je 500 µl 5% Triton-X-100 in 1xTBS, um das Gewebe für die Antikörperbindung zu permeabilisieren. Am folgenden Tag ersetzte ich die Triton-Lösung durch 5% BSA in 1xTBS, um die Präparate erneut über Nacht bei 4 °C zu inkubieren und dadurch unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Nach diesen vorbereitenden Schritten wurden die Präparate mit dem primären Antikörper und dem konjugierten GS Isolectin-B4 (Tabelle 5) versehen, um sie damit 3 Tage bei 4 °C zu inkubieren.

Tabelle 5: Verwendete primäre Antikörper (pAB) und sekundäre Antikörper (sAB) für die immunhistochemische Färbung von Flatmount-Präparaten.

pAB	Spezies	Konz.	sAB	Spezies	Konz.
anti-Iba1 Abcam ab178847	Kaninchen	1:500	Anti Kaninchen konjugiert mit AF488 Dianova 711-545-152	Esel	1:1000
Isolectin B4 konjugiert mit AF647 Thermo Fisher I32450	Griffonia simplicifolia	1:500			

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben vier Mal 10 Minuten mit einer Lösung aus 1% Tween in 1xTBS gewaschen, bevor sie eine Stunde mit dem sekundären Antikörper (1:500 in 1xTBS) inkubiert wurden. Abschließend wusch ich die Präparate erneut, bevor ich sie auf einen Glasobjektträger überführte, eben positionierte und mit einem Tropfen Dako Fluorescence Mounting Medium versah. Mit einem Deckglas (24 x 40 mm) abgedeckt, wurden die gefärbten Präparate bis zu der Anfertigung von Aufnahmen lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt. Für die Bildgebung scannte ich die Präparate am konfokalen Mikroskop (Leica TCS SPE).

4.4 Proteinmessung mittels ELISA

Für die Lyse der Proteine überführte ich je zwei Retinae (à 24 – 28 mg), zusammen mit 300 µl PBS, in ein Fast Prep Reaktionsgefäß, um sie, mit je 6 Keramikperlen versehen, für 20 Sekunden bei 4.0 M/S zu homogenisieren. Das Homogenat wurde anschließend über Nacht bei -20 °C eingefroren. Am Folgetag wurden die Proben zwei Gefrier-Auftau-Zyklen unterzogen, um die Zellmembrane vollständig aufzuschließen und so membranständige Proteine zu lösen. Im Anschluss wurden die Proben bei 4 °C fünf Minuten lang mit 5000 g zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand mit den Proteinen, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um für den ELISA von jeder Probe die gleiche Menge an Protein einzusetzen, wurde nach der Protein-Lyse ein Bicinchoninsäure (BCA) Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration durchgeführt.

Für die Durchführung des BCA Assays wurde zunächst BSA seriell mit PBS zu einer Standardreihe von 2000 µl/ml bis 25 µl/ml verdünnt und die benötigte Menge der alkalischen BCA-Arbeitslösung aus Reagens A und B (50:1) angesetzt. Anschließend wurden 25 µl der Standardreihe und der zu testenden Proteinproben als Duplikat in die Reaktionskammern einer Mikroplatte pipettiert, mit 200 µl der BCA-Arbeitslösung gemischt und eine halbe Stunde bei

37 °C inkubiert. In Folge des durch Reagens A alkalischen Milieus, kam es während der Inkubationszeit zu einer Biuretreaktion zwischen den Peptiden der Proteinproben und dem in Reagens B enthaltenen Kupfer. Die Kupferionen der so entstandenen Reaktionsprodukte bildeten wiederum Chelatkomplexe mit der in Reagens A enthaltenen Bicinchoninsäure. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben auf Eis gestellt, um auf Raumtemperatur herunter zu kühlen, bevor von dem entstandenen BCA-Kupfer-Protein-Komplex am Plate Reader die Absorption bei 562 nm gemessen wurde, deren Extinktion mit zunehmender Proteinkonzentration linear zunimmt. Der Messwert einer mitgeführten Leerprobe wurde von den Ergebnissen der Standardreihe und der Proteinproben subtrahiert, bevor über die Standardkurve des Proteinstandards, mit bekannter Konzentration, die in den Proben enthaltenen Proteinkonzentrationen berechnet werden konnten.

Für den Proteinnachweis des Nox4 mittels ELISA Messungen nutzte ich das NOX4 ELISA Kit Rat (AVIVA SYSTEMS BIOLOGIE). Vor der Durchführung des ELISAs wurden, aus den im Kit mitgelieferten Komponenten, ein seriell verdünnter Nox4-Standard sowie folgende Lösungen frisch angesetzt:

Tabelle 6: Verwendete Lösungen ELISA Assay.

1x Biotinylated Nox4 Detector Antibody	100x Biotinylated Nox4 Detector Antibody: Detector Antibody Diluent	1:100	1 ml/8-wells
1x Avidin-HRP Conjugate	100x Avidin-HRP Conjugate: Conjugate Diluent	1:100	1 ml/8-wells
1x Wash Buffer	25x Wash Buffer: ultra-pure water	1:24	

Die nach der Lyse erhaltenen Proteinproben lagerte ich bis zu der Durchführung des Assays bei -80 °C und zentrifugierte sie vor Gebrauch erneut bei 4 °C, fünf Minuten lang, mit 5000 g. Bei Raumtemperatur wurden anschließend die Proteinproben, die Proben der Standardreihe sowie eine Leerprobe als Duplikat von je 100 µl in die Mikroplatte pipettiert, mit einer Folie (die für alle Inkubationsschritte verwendet wurde) abgedeckt und für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden alle in den Proben enthaltenen Nox4 Proteine an die Nox4 spezifischen Antikörper, der vorbeschichteten Reaktionskammern, der im Kit enthaltene Mikroplatte, gebunden. Die Probenlösungen wurden anschließend verworfen und die entleerten Mikroplattenreaktionskammern mit je 100 µl 1x Biotinylated Nox4 Detector Antibody versehen, um sie damit eine Stunde bei 37 °C zu inkubieren, sodass es zu einer Bindung der Nox4 Detector Antikörper an die, bereits in der Reaktionskammer gebundenen,

Nox4 Proteine kommen konnte. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Mikroplatte erneut entleert und nun jede Reaktionskammer mit je 300 µl 1x Waschpuffer, drei Mal, für eine Minute gewaschen. Es wurde mit dem 1x Avidin-HRP Conjugate fortgefahren, von dem nun 100 µl in jede Reaktionskammer pipettiert wurden, um sie damit für eine Stunde bei 37 °C zu inkubieren. Das dabei an den Nox4 Detector Antikörpern gebundene HRP (horseradish peroxidase) Konjugat, dient der Aktivierung von später zugegebenen Chromogenen, um die Konzentration an Nox4 Proteinen pro Probe, anhand einer Extinktion zu quantifizieren. Die Reaktionskammern wurden entleert und ungebundenes Konjugat durch fünfmaliges Waschen entfernt, bevor die Reaktionskammern mit je 90 µl TMB-Substrat aufgefüllt wurden. Das in dieser Lösung enthaltene 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin führte durch Oxidation, während der Inkubation bei 37 °C, zu einem blauen Farbumschlag der Proben, welcher mit dem Reaktionsprodukt der Peroxidase Aktivität korrelierte. Der Prozess wurde nach 15 Minuten, durch die Zugabe von je 50 µl Stopplösung beendet. Die Farbe der Proben wechselte durch den sauren pH der Stopplösung nach gelb, mit maximaler Extinktion bei 450 nm, welche ich nach exakt 5 Minuten am MULTISKAN Sky Reader (Thermo Fisher Scientific) gemessen habe.

4.5 Statistik

Alle Rohdaten wurden von mir (nach meiner Aufbereitung in Excel und Zuordnung der Ergebnisse zu den Gruppen) mit GraphPad Prism (Version 9.4.1) deskriptiv ausgewertet. Aufgrund der geringen Fallzahlen ($n < 10$) wurden dabei alle Daten berücksichtigt (ohne Ausreißer zu entfernen) und auf konfirmatorische Tests verzichtet. Die Ergebnisse wurden als Box-Plot dargestellt. Die Boxen dieser Abbildungen markieren den Bereich vom 1. bis 3. Quartil aller Datenpunkte, deren Median sich auf Höhe der Linie innerhalb der Box befindet. Werte außerhalb des gewählten Quartilbereiches wurden als Maximum und Minimum durch Whiskers dargestellt.

5 Ergebnisse

Bevor ich auf die Daten eingehe, die ich für die Überprüfung der Versuchshypothesen erhoben habe, werde ich zunächst einige äußerliche Auffälligkeiten und Anzeichen systemischer Pathologien (unabhängig von dem induzierten Diabetes) beschreiben, die ich bei den Versuchstieren festgestellt habe.

5.1 Äußerliche Merkmale systemischer Pathologien

Retrospektiv konnte ich (über die interne Datenbank PyRat) nachverfolgen, dass es bei den TetO-Tieren die aus der über Embryotransfer in die Haltung des FEM eingeschleuste Population stammten, ein erhöhtes Aufkommen von Tumoren gab. So mussten in den ersten neuen Monaten nach dem Embryotransfer mehrfach Jungtiere getötet werden, weil sie so große Tumore aufwiesen, dass sie bei der bloßen Haltung im Zuchtbereich auffällig wurden. Betroffen waren drei von 40 Tieren und zusätzlich starb eines der Wurfgeschwister dieser Tiere aus ungeklärten Gründen. Die Vorfälle ereigneten sich bei TetO-Tieren, die zwischen zwölf und 22 Lebenswochen alt waren. Zum Ende dieser Zuchtaufbau-Periode, wurden die ersten TetO-Tiere aus dieser Population in den Experimentellen Haltungsbereich exportiert, wo es zu einem Anstieg der Mortalitätsrate unter den Versuchstieren kam. Der Zuchtbereich am FEM wurde kurz darauf (zwei Monate später) geschlossen und die Züchtung der TetO-Linie wurde zu JANVIER LABS verlegt.

Die Sterblichkeitsrate in der Zucht von JANVIER LABS konnte ich retrospektiv nicht abrufen. Die Tiere, die nach der dortigen Zuchtaufbau-Phase in den experimentellen Haltungsbereich importiert wurden, wiesen jedoch, wie die Tiere aus der Zuchtpopulation am FEM, eine erhöhte Ausfallrate im Vergleich zu den Tieren aus der Ursprungspopulation am MDC auf. Zudem zeigten die von JANVIER LABS importierten Tiere ein deutlich ängstlicheres und nervöseres Verhalten. Dadurch war es erheblich schwieriger sie zu wiegen und den Blutzuckergehalt zu messen.

Ein Jahr nach Projektstart (im März 2020, nachdem die ersten Tiere aus dem Zuchtbereich vom FEM bezogen wurden) kam es zu schwerwiegenden Zwischenfällen, die sich ereigneten, bevor die importierten Tiere in den Versuch aufgenommen wurden. So waren bei den Tieren Blutspuren in den Käfigen zu beobachten (Abbildung 3), bevor sie der experimentellen Doxycyclin-Behandlung unterzogen werden konnten. Dies tauchte erstmals bei TetO-Ratten auf, breitete sich dann aber auf andere Kohorten aus und war fortan auch bei SD-Ratten zu beobachten. Dabei wurden die Tiere zumeist in den ersten vierzehn Tagen nach Lieferung auffällig, noch bevor experimentbezogenes Handling stattfand. Bei Tieren mit leichten

Blutspuren, die ich teilweise in den Versuch mit aufnehmen sollte, reduzierten sich die Blutspuren während der Gabe von Doxycyclin oder verschwanden ganz.

Eine weiteres in diesem Zeitraum neu aufgetretenes Merkmal bei einer Vielzahl der Versuchstiere, waren verkrustete Augen durch gesteigerte Sekret Absonderung aus den Harradschen Drüsen. Auf diese Symptomatik hatte die Gabe von Doxycyclin keinen merklichen Einfluss.



Abbildung 3: Blutspuren im Käfig, die vor allem am Nageholz und Nestbaumaterial auszumachen waren.

Bei vorzeitiger Tötung und Sektion von Tieren mit augenfälligen Blutspuren im Käfig, konnte ich jeweils einen eindeutigen Manifestationsschwerpunkt der Pathologie an der Lunge oder am Urogenitaltrakt ausmachen (Abbildung 4).

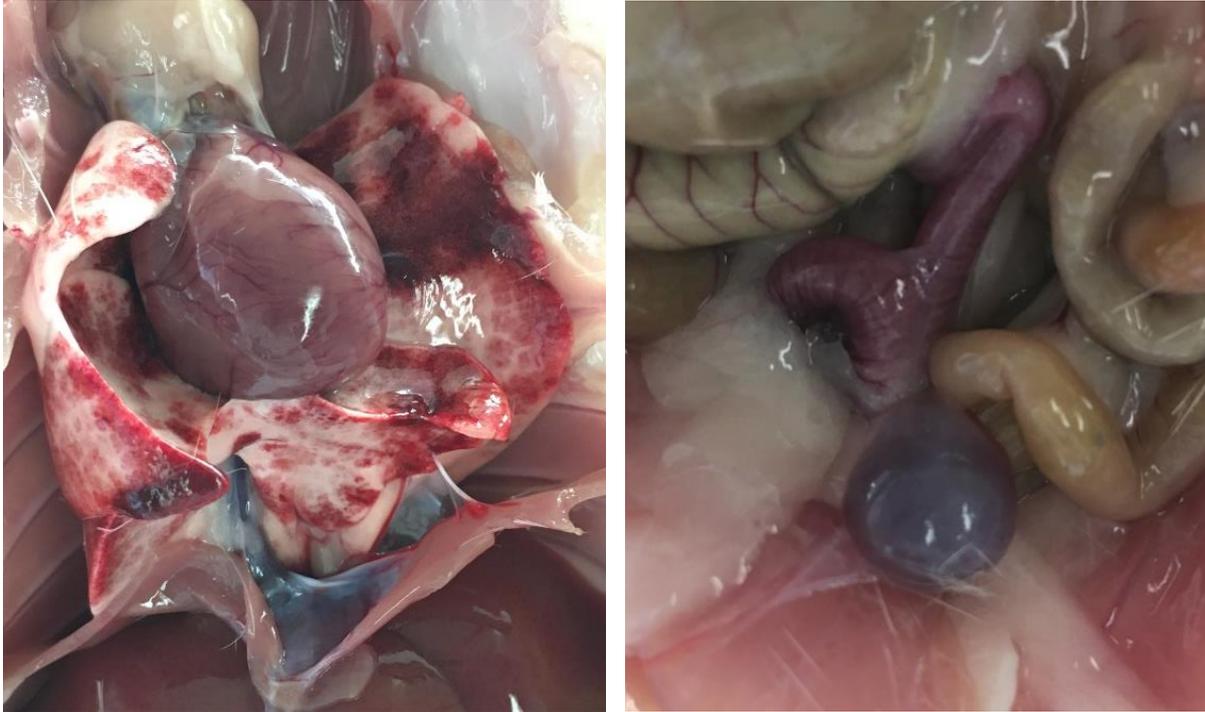


Abbildung 4: Sektionsbilder der ausgeprägtesten Auffälligkeiten bei Tieren mit Blutspuren im Käfig. **Links:** großflächige Einblutung im Lungengewebe. **Rechts:** Urogenitaltrakt, Blase gefüllt mit blutigem Sekret.

Darüber hinaus konnte makroskopisch häufig festgestellt werden, dass die Leber und Niere eine ungleichmäßige Farbe aufwiesen. Die Organe waren schachbrettartig hell und dunkel gesprenkelt (Abbildung 5 oben), was ich als Durchblutungsstörung deute. Zudem konnte ich bei fast allen der betroffenen Tiere stark vergrößerte, häufig vorgewölbte, Peyer-Plaques nachweisen. Als Peyer-Plaques werden die in der Darmschleimhaut befindlichen Ansammlungen an Lymphfollikel bezeichnet. Die beobachtete Schwellung dieser Lymphfollikel wurde begleitet von unterschiedlich starken entzündlichen Veränderungen der Magen- und Darmschleimhaut (Abbildung 5 unten).

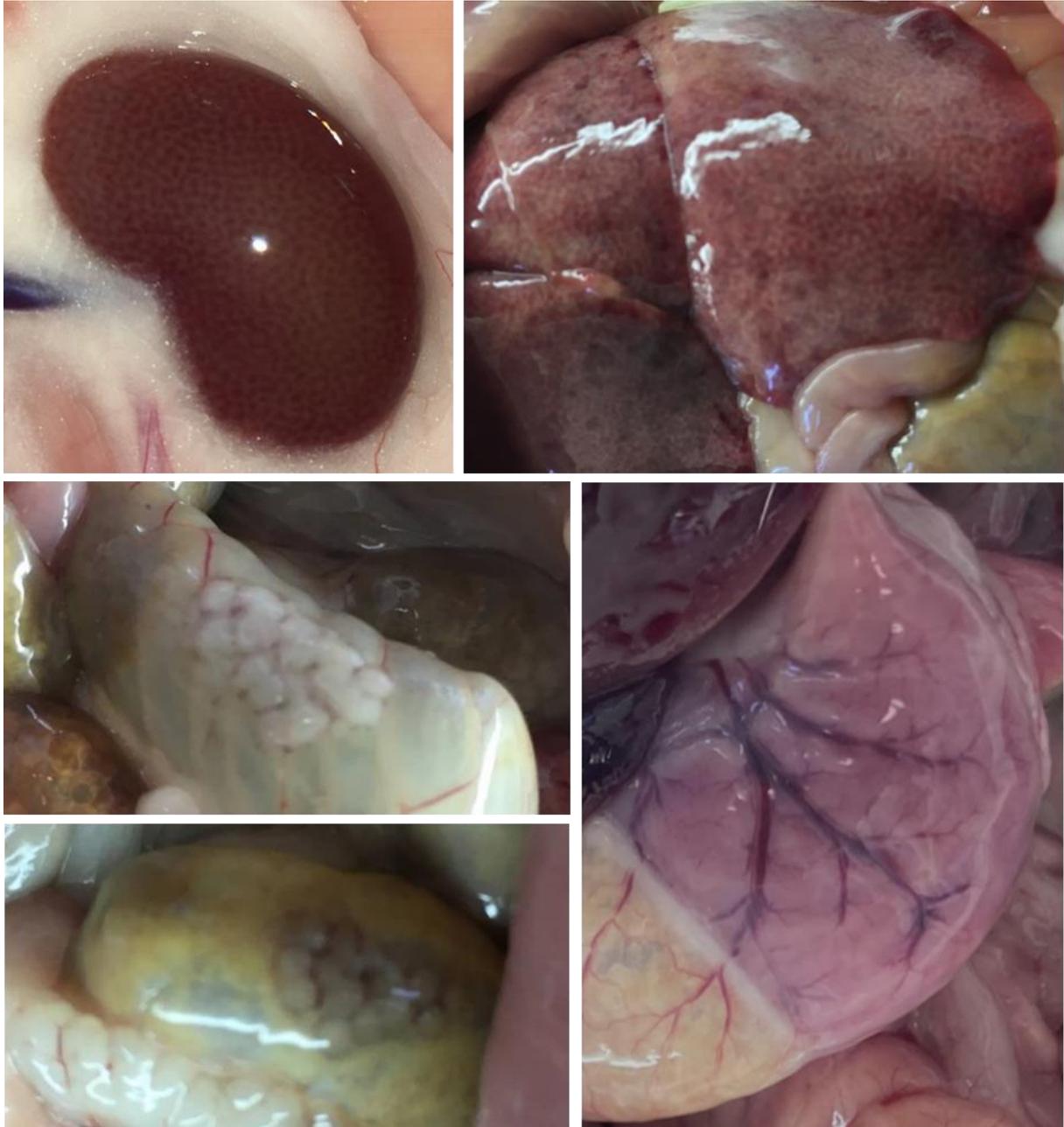


Abbildung 5: Sektionsbilder weiterer Befunde bei Tieren mit Blutspuren im Käfig. **Oben:** mangelhafte Blutversorgung der Organe, **links:** Niere, **rechts:** Leber. **Unten:** entzündliche Veränderungen des Magen-Darm-Trakts, **links:** vergrößerte Peyser-Plaques, **rechts:** stark geröteter Magen.

Zur Klärung der Ursache dieser Pathologien sendete ich bei den Sektionen genommene Abstrichproben von der Lunge und aus der Blase an das Untersuchungslabor der GIM. Aus den Abstrichproben (von insgesamt über 30 Tieren) ließen sich *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus warneri*, *Weissella spp.*, *Bacillus cereus* und Aerobier isolieren (die vollständigen Untersuchungsergebnisse können auf Rückfrage hin eingesehen werden), wobei nicht völlig ausgeschlossen werden konnte, dass diese Nachweise durch Verunreinigungen bei der Probenentnahme beeinflusst wurden. Um ein valideres Ergebnis zu bekommen, sendete ich

deshalb zusätzlich auffällige Tiere auch lebend an die GIM, damit dort unter sterilen Bedingungen Proben entnommen werden konnten. Die bereits nachgewiesene pathologische Anreicherung von opportunistischen Bakterien konnte durch die Probenentnahme unter sterilen Bedingungen bei GIM bestätigt werden. So ließen sich bei zwei lebend eingesendeten SD-Tieren die nur leichte Blutspuren im Käfig aufwiesen, aus Nasopharynx und Präputium hochgradig *Proteus mirabilis* und *Escherichia coli* Bakterien isolieren (Tabelle 7.A). Bei zwei unbehandelten TetO-Tieren, die ich lebend eingesandte, nachdem ich bei ihnen deutliche Blutspuren im Käfig festgestellt hatte, konnten aus dem Caecuminhalt *Klebsiella oxytoca* isoliert werden (Tabelle 7.B). Zudem wurde anhand einer eingesendeten Darmprobe mit vergrößerten Peyer-Plaques durch GIM bestätigt, dass das Spendertier an einer subkutanen Enteritis mit nodulärer Hyperplasie des Darm-assoziierten lymphatischen Gewebes litt, welche als Sekundärpathologie infolge eines Antigenkontakts auftrat.

Tabelle 7: Untersuchungsprotokoll GIM. Auszug aus den Untersuchungsberichten vier lebend eingesendeter Tiere (die Untersuchungsberichte in voller Länge können auf Rückfrage hin eingesehen werden).

untersuchte Spezies: Ratte				untersuchte Spezies: Ratte			
Test auf	Tier-ID	Ergebnisse		Test auf	Tier-ID	Ergebnisse	
	Einsender	Probennr.			Einsender	Probennr.	
			412, 413				
		weiß/weiß			weiß/weiß		
		♂/♂			♂/♂		
	GIM	A			GIM	B	
	Methode				Methode		
Opportunisten				Opportunisten			
Escherichia coli	kult./ MALDI TOF	pos.		Escherichia coli	kult./ MALDI TOF	neg.	
Klebsiella oxytoca	kult./ MALDI TOF	neg.		Klebsiella oxytoca	kult./ MALDI TOF	pos.	
Klebsiella pneumoniae	kult./ MALDI TOF	neg.		Klebsiella pneumoniae	kult./ MALDI TOF	neg.	
Proteus mirabilis	kult./ MALDI TOF	pos.		Proteus mirabilis	kult./ MALDI TOF	neg.	
Pseudomonas aeruginosa	kult./ MALDI TOF	neg.		Pseudomonas aeruginosa	kult./ MALDI TOF	neg.	
Staphylococcus aureus	kult./ MALDI TOF	neg.		Staphylococcus aureus	kult./ MALDI TOF	neg.	

Insgesamt musste ich im Jahr 2020 drei Kohorten der TetO-Ratten (32 Tiere) und zwei Kohorten der SD-Ratten (40 Tiere) vorzeitig töten, da sie aufgrund schwer ausgeprägter Symptomatik das Abbruchkriterium (den humanen Endpunkt) erreicht hatten. Die Auffälligkeiten und die erhöhte Mortalität meldete ich umgehend an den Tierschutzverantwortlichen und die Leiterin des Tierversuchsvorhabens. Daraufhin gab es mehrfach gemeinsame Gespräche, um Lösungsansätze zu finden, wobei eine Problematik in der Haltung der Tiere (am CVK) zunächst ausgeschlossen wurde. Die Zwischenfälle wurden zusätzlich an die in Berlin für den Tierschutz zuständigen Behörde LaGeSo gemeldet, um auch hier Rücksprache zu halten. Es wurde ausprobiert, ob die Tiere in einem anderen Tierstall gehalten werden können, was sich leider als nicht praktikabel herausstellte. Abhängig von der Verfügbarkeit, wurden im weiteren Verlauf bevorzugt TetO-Tiere aus der Zucht vom MDC

verwendet. Ab dem Auftreten der Auffälligkeiten, bis zum Ende des Projektes, standen alle Beteiligten im Austausch, um eine Lösung zu finden, während die Experimente (in Absprachen mit der Tierversuchsleitung, den Tierschutzbeauftragten, dem LaGeSo und meinen Betreuerinnen) weitergeführt wurden. Die Ursache für die nachweisliche Vermehrung der fakultativ pathogenen Erreger konnten durch die zahlreichen Untersuchungen und Gespräche nicht geklärt und verhindert werden. Auch im weiteren Projektverlauf tauchten immer wieder Blutspuren in den Käfigen auf, sodass bei den verbleibenden Proben unklar bleibt, inwieweit die Ergebnisse durch diese Zwischenfälle beeinflusst wurden.

In den folgenden Unterkapiteln werde ich die Ergebnisse zeigen, die ich anhand der SD- und TetO-Ratten im Rahmen des Projektes gewonnen habe.

5.2 Inflammation

Mittels anti-Iba1 lassen sich mononukleäre Phagozyten immunhistochemisch färben. Retinal können so residente Mikrogliazellen und migrierte Monozyten nachgewiesen werden. Als unsere Arbeitsgruppe das TetO-Modell erstmals für ophthalmologische Untersuchungen nutzte (publiziert 2017), konnte anhand einer Steigerung der Dichte und des Aktivierungszustand dieser Zellen nachgewiesen werden, dass es unter Hyperglykämie bereits früh zu einem proinflammatorischen Zustand kommt¹.

Die verblindete Auswertung meiner Iba1 gefärbten Flatmount-Präparate zeigte hingegen, dass die Retinae der SD-Kontrolltiere im Vergleich zu den diabetischen TetO-Tieren nach vier und acht Wochen Diabetes mehr Iba1-positive Zellen aufwiesen (Abbildung 6 A und 7). Zudem war innerhalb dieser Zellpopulation der Anteil an Zellen ohne Ramifikationen (Monozyten und amöboide aktivierte Mikrogliazellen) bei den SD-Kontrolltieren größer als in den Retinae der TetO-Ratten nach vier und acht Wochen Diabetes (Abbildung 6 B und 7).

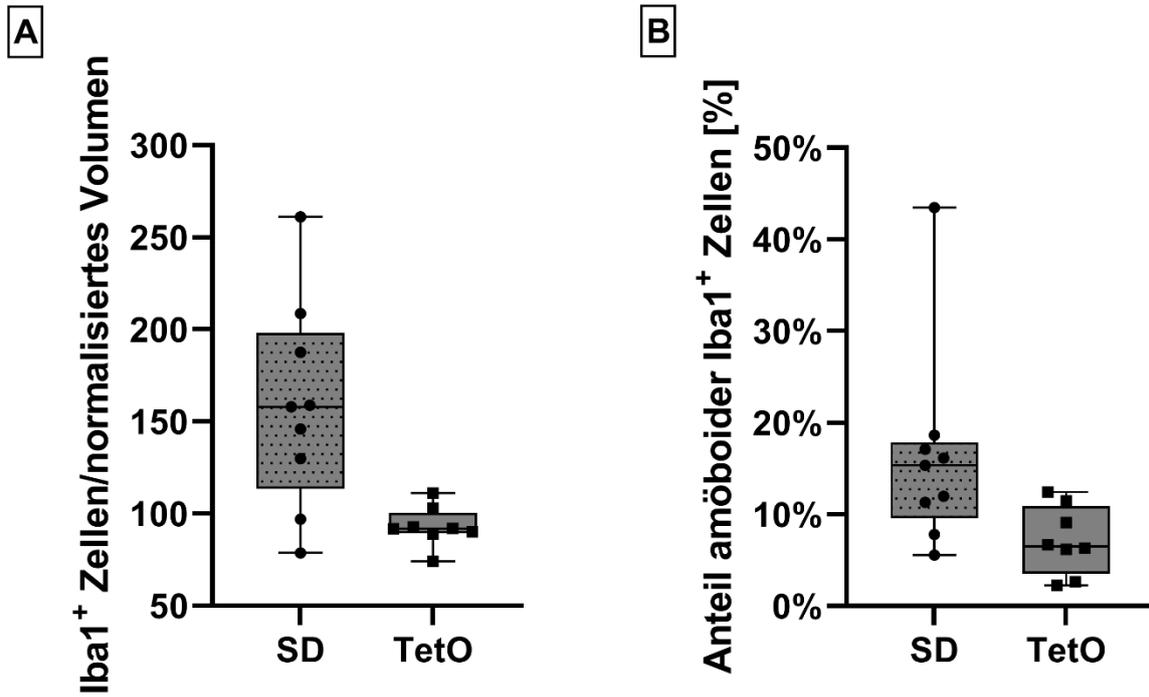


Abbildung 6: **A)** Gezählte Iba1-positive Zellen, normalisiert auf das mittlere gescannte Volumen aller ausgewerteten Proben (20,6 z Ebenen = 10141098,9705882 μm^3). SD: n = 9 (4W = 4, 8W = 5), Median = 157,9. TetO: n = 8 (4W = 2, 8W = 6) Median = 91,84. **B)** Prozentualer Anteil der amöboiden Iba1-positiven Zellen innerhalb aller gezählten Iba1-positiven Zellen/Probe. SD: n = 9 (4W = 4, 8W = 5), Median = 15,36. TetO: n = 8 (4W = 2, 8W = 6), Median = 6,506. Abgebildet sind alle Werte, die Boxen markieren den Bereich vom 1. bis 3. Quartil, die Whiskers stellen das Minimum und Maximum dar.

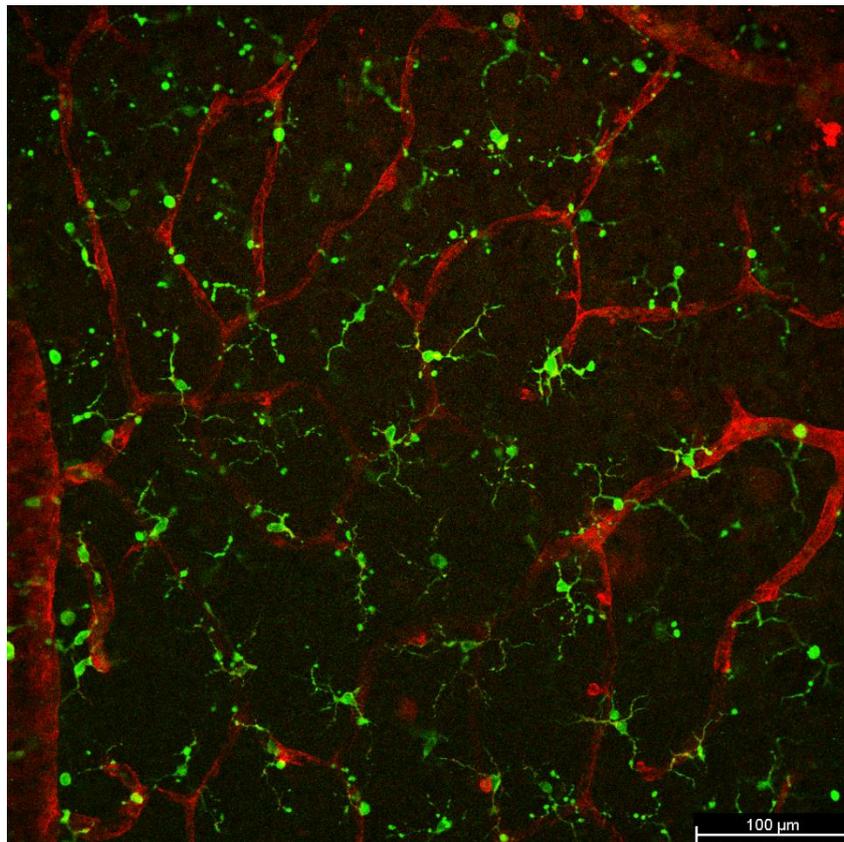
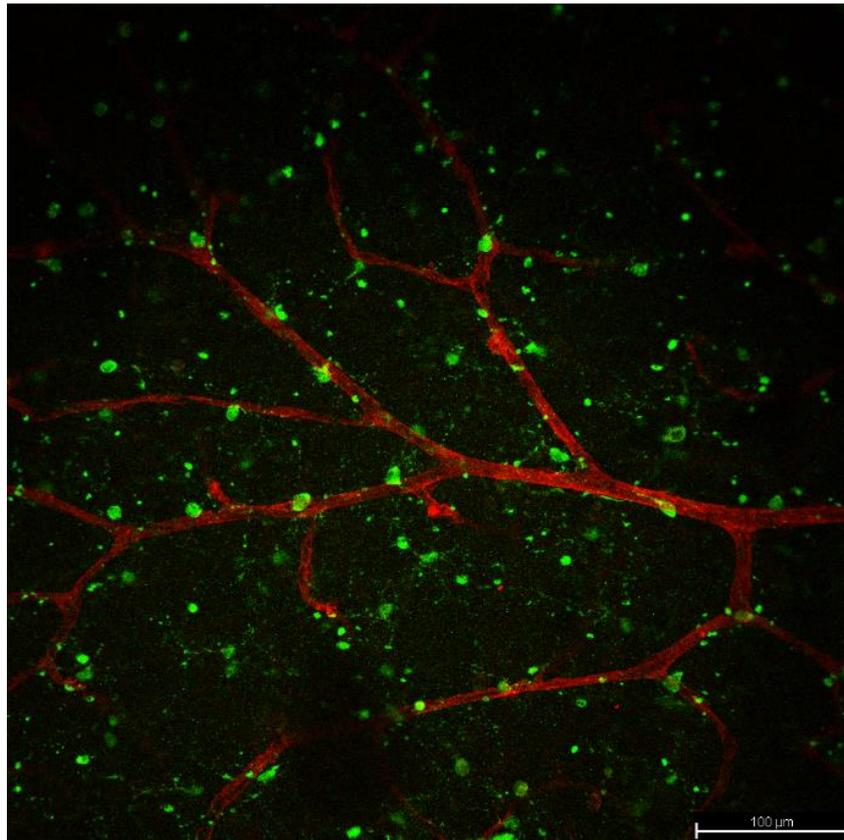


Abbildung 7: Flatmount-Präparate mit Iba1-positiven Zellen (grün). **Oben:** erhöhter Anteil Iba1-positiver Zellen ohne Ramifikationen bei SD-Kontrolltieren **unten:** Iba1-positive Zellen überwiegend ramifiziert bei diabetischen TetO-Tieren. Repräsentative Aufnahmen aus der Gefäßebene des oberen Gefäßplexus mit großen Gefäßen im Bereich der Ganglienzellebene. Die abgebildeten Maßstabsbalken markieren 100 µm.

Ein weiterer früher Befund der DR ist eine Überexpression des sauren Gliafaserproteins GFAP¹, welches in der Retina durch Müllerzellen und Astrozyten exprimiert wird⁹⁷.

Die qualitative Beurteilung der immunhistochemischen Färbung von Sagittalschnitten der Retinae mit anti-GFAP, ließ bei den SD-Kontrolltiere, mit zunehmender Haltungsdauer nach der einwöchigen Induktionsgabe des Doxycyclins, eine zunehmende Intensität der GFAP-Färbung vermuten (Tabelle 8 und Abbildung 8 A links verglichen mit 8 B links). Bei den Proben der diabetischen TetO-Tiere zeichnete sich ein gegenläufiger Trend ab (Tabelle 8 und Abbildung 8 A rechts verglichen mit 8 B rechts). Diese abschließende Beurteilung der Proben fand zu einem Zeitpunkt statt, als die Proben bereits den Gruppen zugeordnet und somit nicht mehr verblindet waren.

Tabelle 8: Qualitative Beurteilung der GFAP-Färbung; Einteilung der jeweils 5 Stichproben/Gruppe in positiv = starke Färbeergebnis, schwach = schwach positive Signale oder negativ = Färbungen die sich nur unwesentlich von den Negativkontrollen unterschieden.

Zeitraum	GFAP					
	SD			TetO		
	pos	schwach	neg	pos	schwach	neg
2 Wochen	1	1	3	3	2	0
4 Wochen	2	1	2	1	2	2
8 Wochen	2	1	2	1	2	2

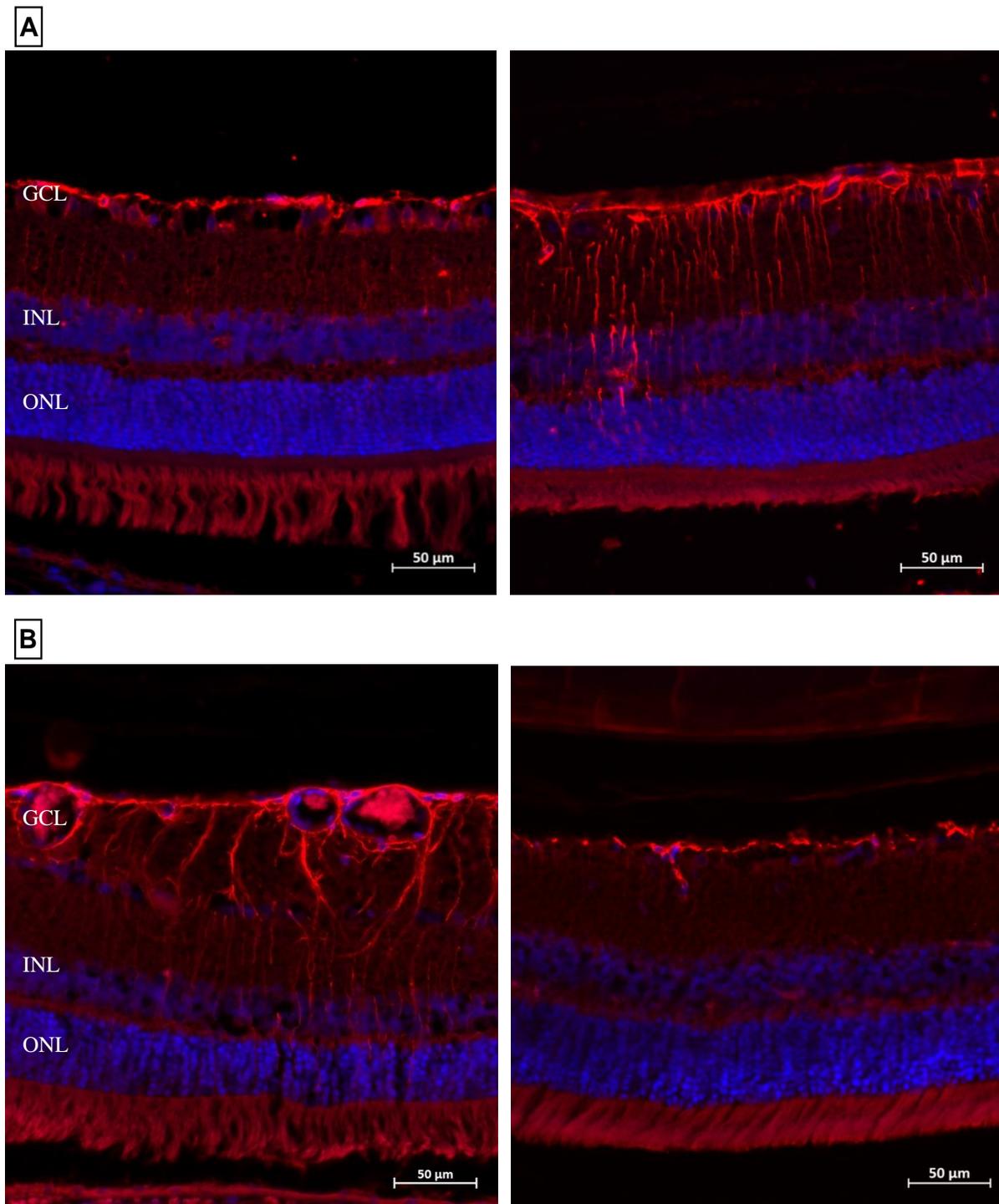


Abbildung 8: Repräsentative Bilder der Färbung mit anti-GFAP (rot). Stichprobengröße/Gruppe n = 5. **A) links:** SD 2 Wochen Kontrolle, **rechts:** TetO nach 2 Wochen Diabetes. **B) links:** SD 8 Wochen Kontrolle, **rechts:** TetO nach 8 Wochen Diabetes. Die abgebildeten Maßstabsbalken markieren 50 µm.

5.3 Gefäßpathologie

Wie beispielhaft links in der Abbildung 8 B zu sehen ist, zeigten die Proben der SD-Kontrolltiere erweiterte Gefäße (gefüllt mit auto-fluoreszenten Erythrozyten), die häufig von GFAP-positiven Zellen umgeben waren. Diese Gefäßveränderungen konnten im oberen Gefäßplexus, innerhalb der Ganglienzellschicht beobachtet werden. Die Sagittalschnitte von

diabetischen TetO-Tieren zeigten im Bereich nahe dem optischen Sehnerv ebenfalls überdurchschnittlich große Gefäße innerhalb der Ganglienzellschicht. Im Gegensatz zu den Proben der SD-Kontrolltiere, zeigte die anti-GFAP-Färbung bei den TetO-Tieren jedoch keine erhöhte Aktivierung von Astrozyten oder Müllerzellen im Bereich dieser Gefäße (Abbildung 9).

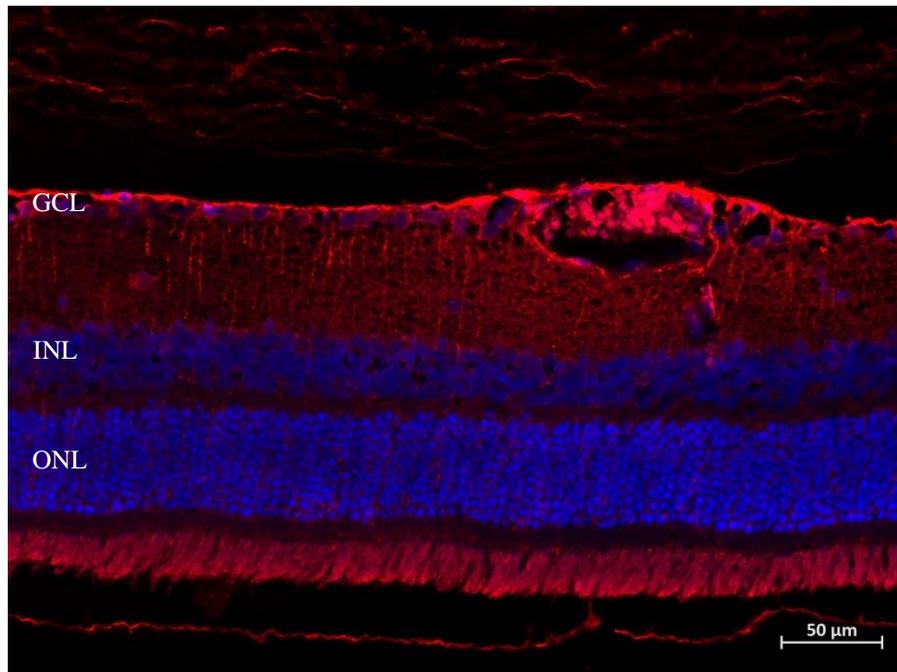


Abbildung 9: Überdurchschnittlich weites Gefäß bei einem TetO-Tier nach 4 Wochen Diabetes, ohne Auffälligkeiten der GFAP-Färbung. Der abgebildete Maßstabsbalken markiert 50 µm.

In den HE gefärbten Sagittalschnitten von SD-Kontrolltieren und diabetischen TetO-Tieren, in denen die großkalibrigen Gefäße innerhalb der GCL ebenfalls sichtbar waren, konnten weitere morphologische Änderungen am Gefäßsystem ausgemacht werden. Eine Vielzahl der Proben wies Gefäße auf, die im Bereich des optischen Sehnervenkopfes aus der Retina, in den Glaskörper wuchsen (Abbildung 10). Die Häufigkeit für diese Anomalie war bei den Proben der SD-Kontrolltieren höher als in den Proben von diabetischen TetO-Tieren. So konnten derartige Gefäße in zehn von fünfzehn Proben von SD-Tieren und in sechs von fünfzehn Proben von TetO-Tieren ausgemacht werden.

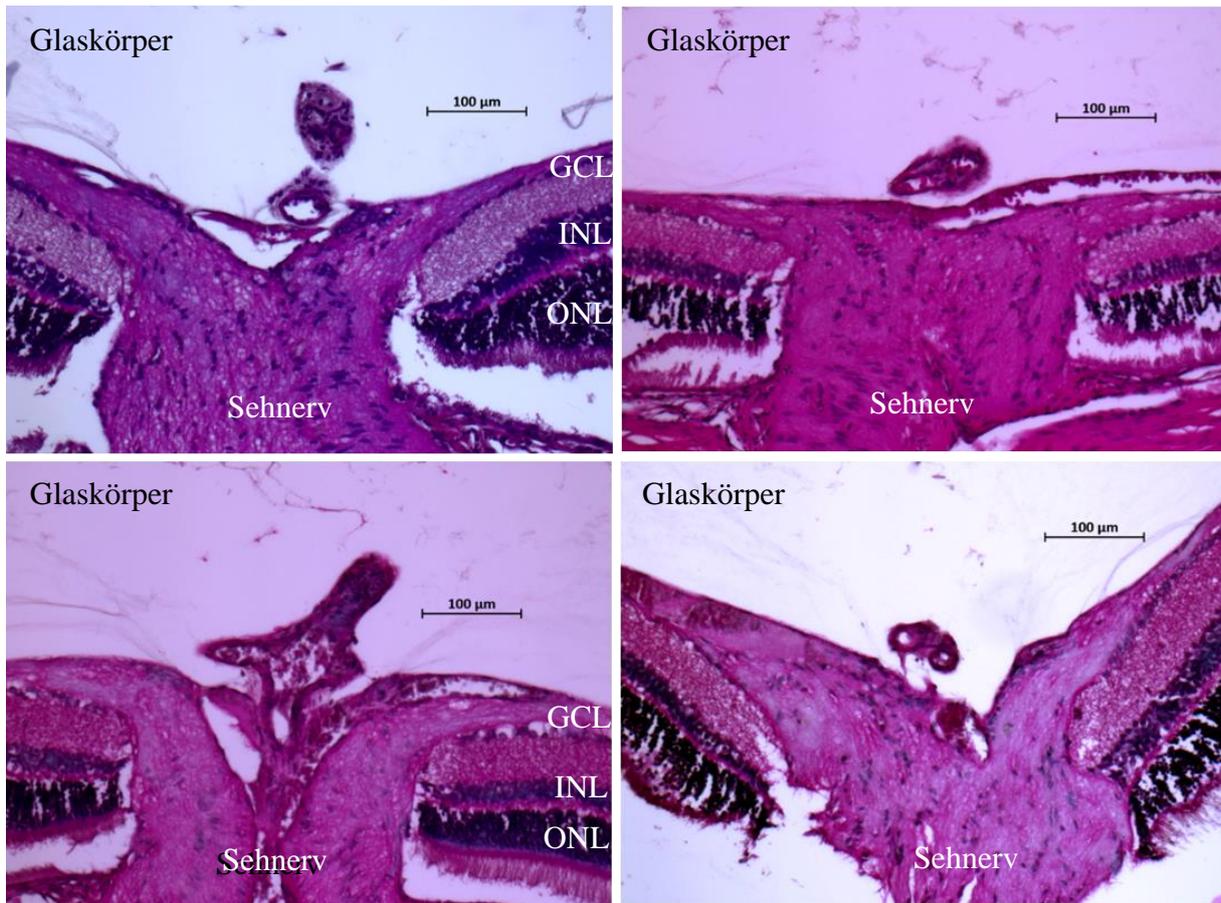


Abbildung 10: Vaskularisation retinaler Gefäße in den Glaskörper. Die abgebildeten Maßstabsbalken markieren 100 µm.

Darüber hinaus wurden in den HE-Färbungen der Sagittalschnitte von SD-Kontrolltieren und diabetischen TetO-Tieren gefäßausfüllende Erythrozyten-Agglomerate sowie Ansammlungen freier Erythrozyten im Gewebe (wie in der vergrößerten Ansicht aus Abbildung 11) sichtbar. Wobei dieses Phänomen bei der Begutachtung der Proben von diabetischen TetO-Tieren in einer etwas höheren Anzahl gefunden werden konnte.

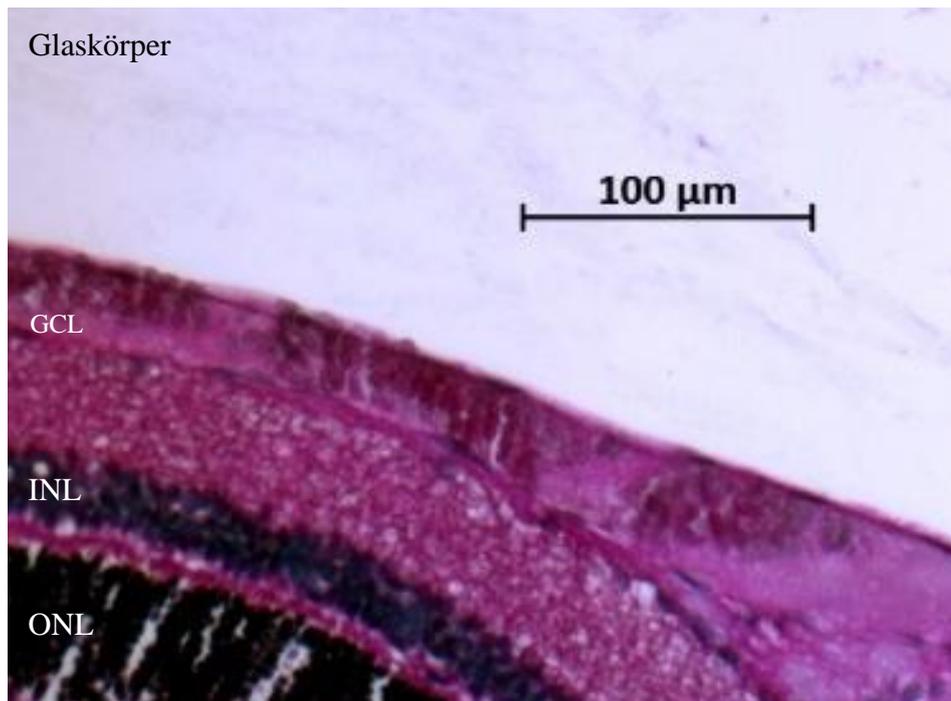


Abbildung 11: Retinale Hämorrhagie (in der GCL). Der abgebildete Maßstabsbalken markiert 100 μm.

Weitere Anomalitäten die sich als Änderung der Gefäßstruktur manifestierten, traten bei der Begutachtung der Co-Färbung von anti-Iba1 mit Isolectin in den Flatmount-Präparaten zutage. Die Isolectin-Färbung sollte hier als Orientierungshilfe dienen, um bei der Auswertung Iba1-positiver Zellen zwischen oberem und tiefem Gefäßplexus zu unterscheiden. Anhand dieser Endothelzellfärbung wurde deutlich, dass die Gefäße bei den SD-Kontrolltieren im tiefen Gefäßplexus einen auffällig schmalen Durchmesser hatten. In den Proben der TetO-Tiere konnte solch ein reduzierter Gefäßdurchmesser im tiefen Gefäßplexus nur vereinzelt und erst nach achtwöchiger Diabetesdauer ausgemacht werden (Abbildung 12).

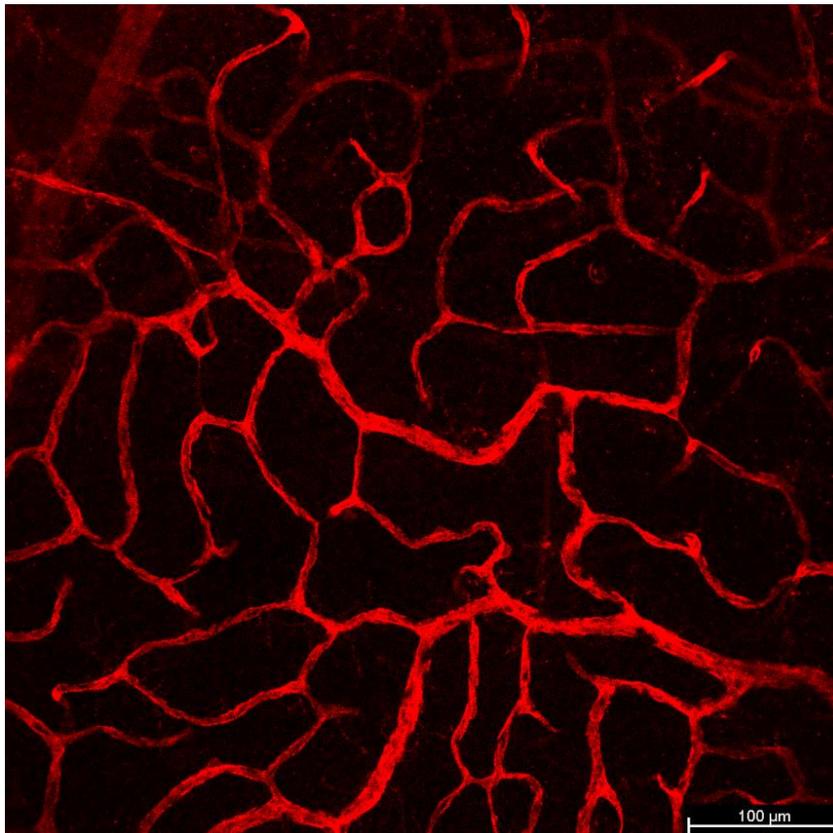
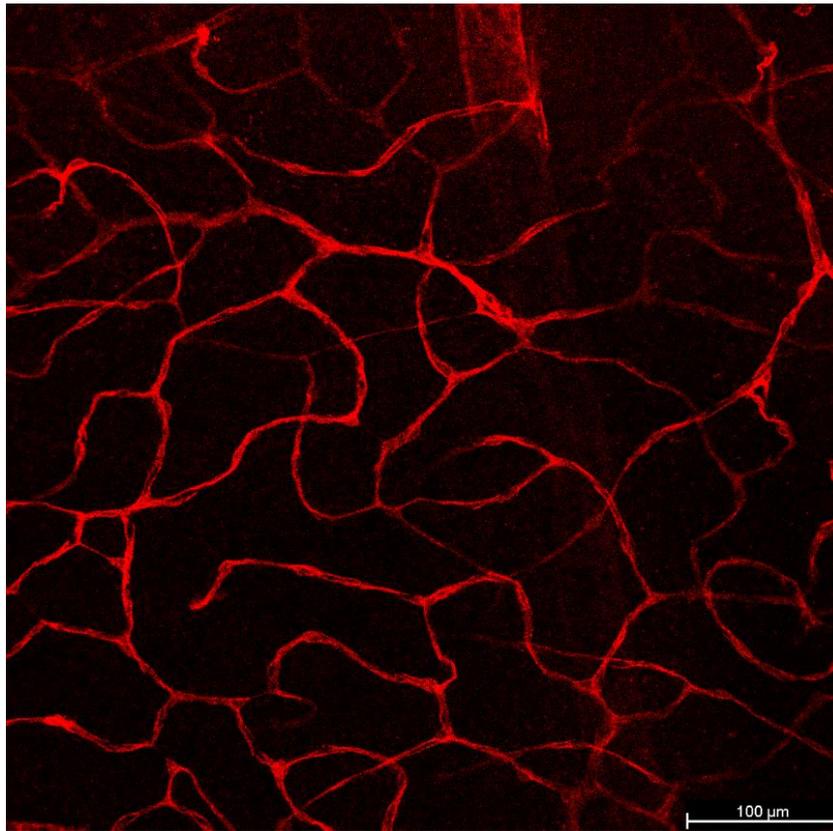


Abbildung 12: Isoelectin-gefärbte Gefäße im tiefen Gefäßplexus, die den verringerten Gefäßdurchmesser bei SD-Tieren zeigt. **Oben:** SD-Kontroll-Tier 4 Wochen Kohorte, **unten:** TetO-Tier nach 4 Wochen Diabetes. Die abgebildeten Maßstabsbalken markieren 100 μm .

Eine andere Auffälligkeit, die sich im Gegensatz zu den ausgedünnten Gefäßen vor allem in den Gruppen der diabetischen TetO-Tiere häufte, waren signalintense amorphe Aggregate der Isolectin-Färbung. Diese Isolectin-positiven Strukturen waren zwischen dem oberen und tiefen Gefäßplexus lokalisiert und stark gefäßassoziiert (Abbildung 13).

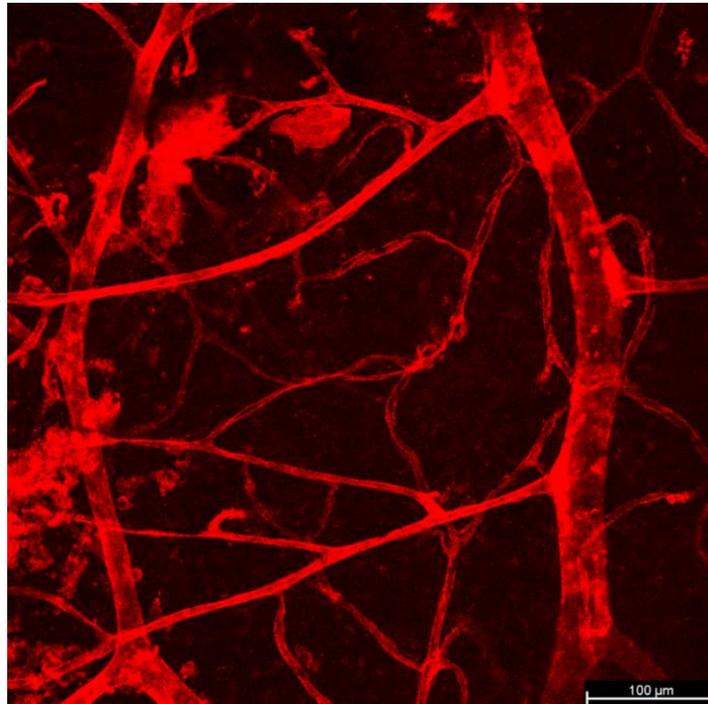


Abbildung 13: Gefäßassoziierte Isolectin-positiv Verdichtung (rot) im Flatmount-Präparat eines TetO-Tieres. Der abgebildete Maßstabsbalken markiert 100 µm.

5.4 Degeneration

Degenerative Prozesse, durch Hyperglykämie bedingte inflammatorische und oxidative Vorgänge, können als Merkmal der DR in verschiedenen Tiermodellen untersucht werden. Und auch im TetO-Modell ließen sich bereits derartige Befunde zeigen. Bei den Versuchen bis 2017 konnte ein signifikanter Zellverlust von Ganglienzellen in den Retinae-Proben von TetO-Ratten (die vier bis fünf Wochen diabetisch waren) im Vergleich zu nicht-diabetischen Kontrolltieren nachgewiesen werden¹.

Bei meiner erneuten Anwendung des TetO-Modelles, ergab die verblindete Auszählung apoptotischer Zellen im TUNEL Assay, ebenfalls mehr apoptotische Zellen bei TetO-Tieren, verglichen mit den SD-Kontrolltieren. Die Apoptoserate aller retinaler Zellen war bei den TetO-Tieren nach zwei, vier und acht Wochen Diabetes erhöht, im Vergleich zu der Menge apoptotischer Zellen bei den SD-Kontrolltieren (Abbildung 14). Allerdings zeigte die Auswertung in der vier Wochen Kohorte bei den SD-Kontrolltieren eine breite Streuung, mit

einem Maximum, welches die Anzahl apoptotischer Zellen aller TetO-Proben übertraf (Abbildung 14 mittig).

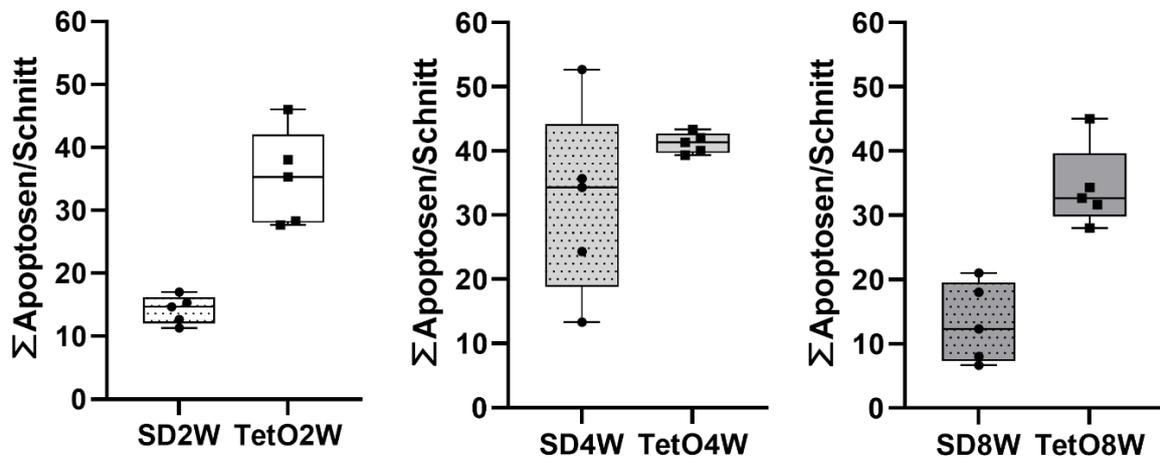


Abbildung 14: Auszählung aller apoptotischer Zellen (TUNEL-positiv) pro retinalem Sagittalschnitt. Diabetische TetO-Tiere verglichen mit SD-Kontrolltieren. Von **links nach rechts**: 2 Wochen (SD: n = 5, Median = 14,67, TetO: n = 5, Median = 35,33), 4 Wochen (SD: n = 5, Median = 34,33, TetO: n = 5, Median = 41,33) und 8 Wochen (SD: n = 5, Median = 12,33, TetO: n = 5, Median = 32,67). Abgebildet sind alle Werte, die Boxen markieren den Bereich vom 1. bis 3. Quartil, die Whiskers stellen das Minimum und Maximum dar.

Abbildung 15 zeigt Bilder der Färbungen aus der zwei Wochen Kohorte. Hier sieht man in der Probe des TetO-Tieres nach zwei Wochen Hyperglykämie (unten) deutlich mehr TUNEL-positive Zellen in grün fluoreszieren als in der Probe des SD-Kontrolltieres (oben).

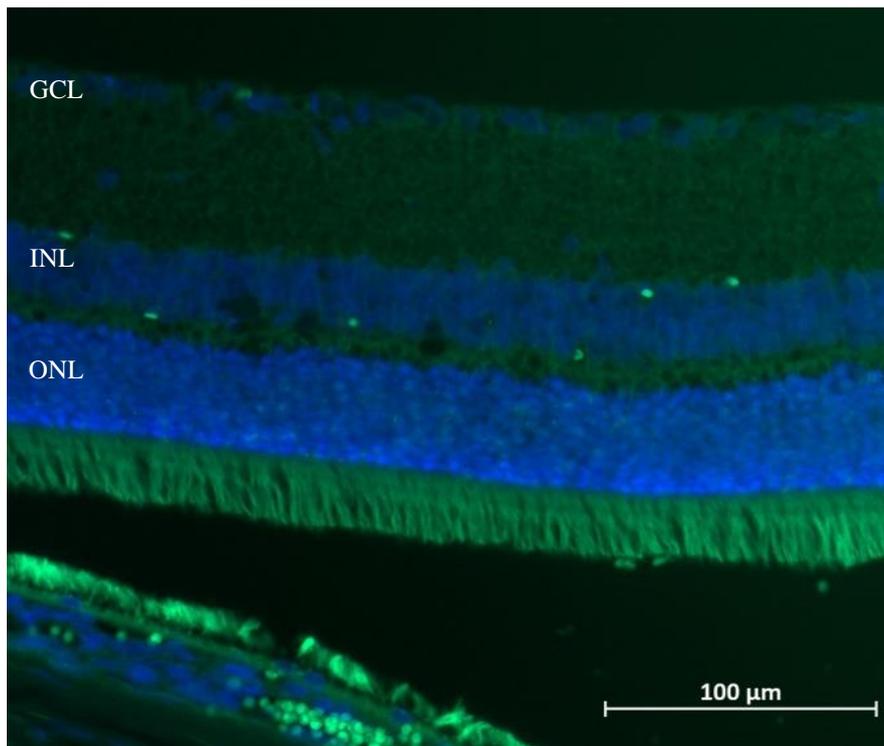
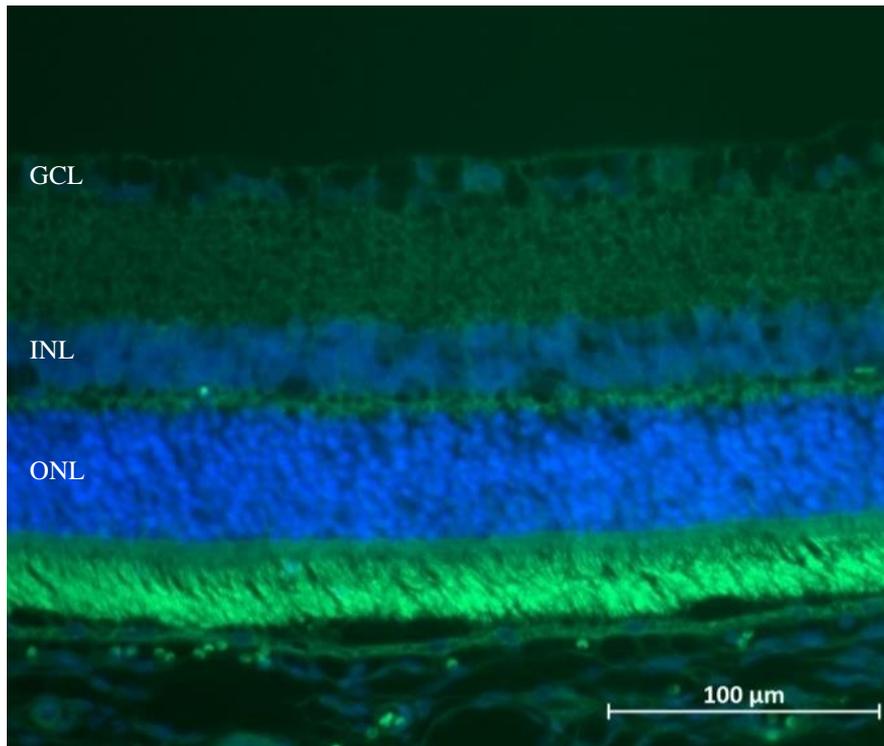


Abbildung 15: Retinale Sagittalschnitte aus dem TUNEL Assay (TUNEL-positive, apoptotische Zellen in grün). **Oben:** SD 2 Wochen, **unten:** TetO 2 Wochen. Die abgebildeten Maßstabsbalken markieren 100 μm .

Von einigen Proben gab es jedoch auch Aufnahmen, die nicht ausgezählt werden konnten, weil nahezu alle Zellen TUNEL-positiv waren. Als die Proben nach der Rohdatenerhebung den Gruppen zugeordnet wurden, zeigte sich, dass solche Bereiche insbesondere in der vier Wochen SD-Kontrollgruppe gehäuft vorkamen (Abbildung 16). Wie bereits in Abbildung 14 gezeigt

wurde, ergaben die auswertbaren Proben für diese Gruppe das Ergebnis mit der größten Streuung.

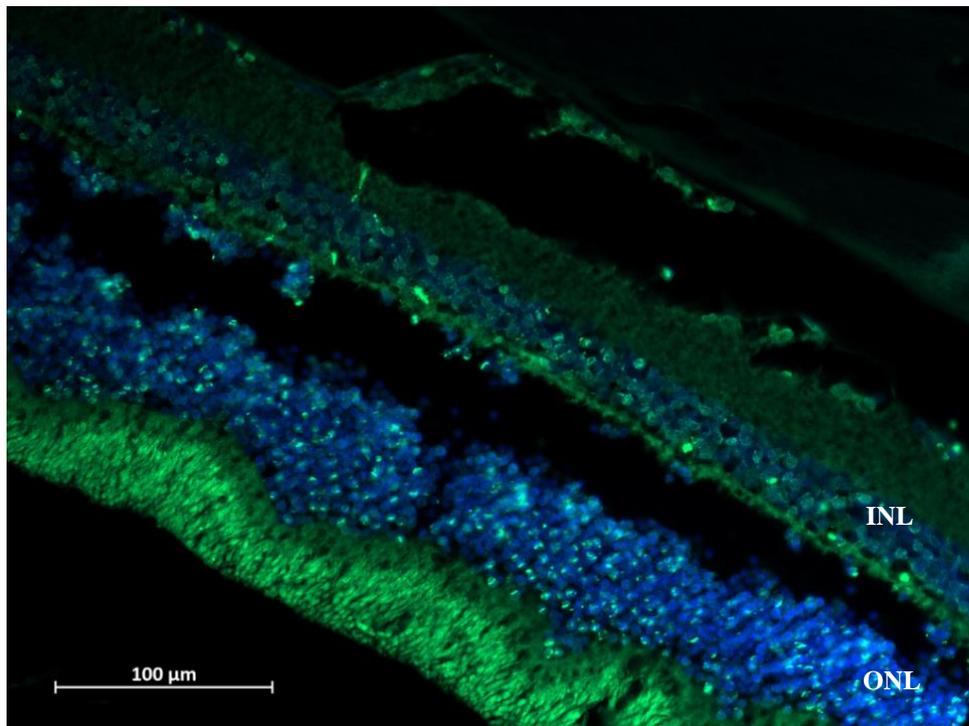


Abbildung 16: Aufnahme aus der 4 Wochen SD-Kontrollgruppe, die als Ausreißer nicht ausgezählt werden konnte, da nahezu alle Zellen TUNEL-positiv waren. Der abgebildete Maßstabsbalken markiert 100 μm .

Die Verteilung apoptotischer Zellen in den Ebenen der Ganglienzellschicht (GCL), der inneren sowie der äußeren nukleären Schicht (INL und ONL) zeigt bei den TetO-Tieren mit zunehmender Diabetesdauer eine zunehmende Anzahl apoptotischer Zellen in der GCL (Abbildung 17 A). Bei der Anzahl apoptotischer Zellen innerhalb der INL gibt es keinen klaren Trend mit zunehmender Diabetesdauer (Abbildung 17 B) und in der ONL befanden sich nach acht Wochen Diabetes bei den TetO-Tieren deutlich weniger Zellen in Apoptose als nach zwei und vier Wochen Diabetes (Abbildung 17 C). Verglichen mit den jeweiligen Kontrollgruppen, ist die Anzahl apoptotischer Zellen bei den TetO-Tieren nach zwei und acht Wochen Diabetes deutlich erhöht (ausgenommen von der Anzahl apoptotischer Zellen in der ONL nach acht Wochen Diabetes; Abbildung 17 A, B und C). Bei den Messwerten nach vier Wochen, fällt die große Streuung der Kontrollgruppe ins Gewicht und führt zu dem geringsten Unterschied im Vergleich zu den TetO-Tieren. Hier ist zu erkennen, dass der Median apoptotischer Zellen in der GCL und INL der SD-Kontrollgruppe gut doppelt so hoch liegt, wie in den SD-Kontrollgruppen in denen nach zwei und acht Wochen apoptotische Zellen ausgezählt wurden (Abbildung 17 A und B). Innerhalb der ONL fällt die Änderung des Median apoptotischer Zellen bei SD-Kontrolltieren zwischen den Zeiträumen weniger stark aus (Abbildung 17 A bis C).

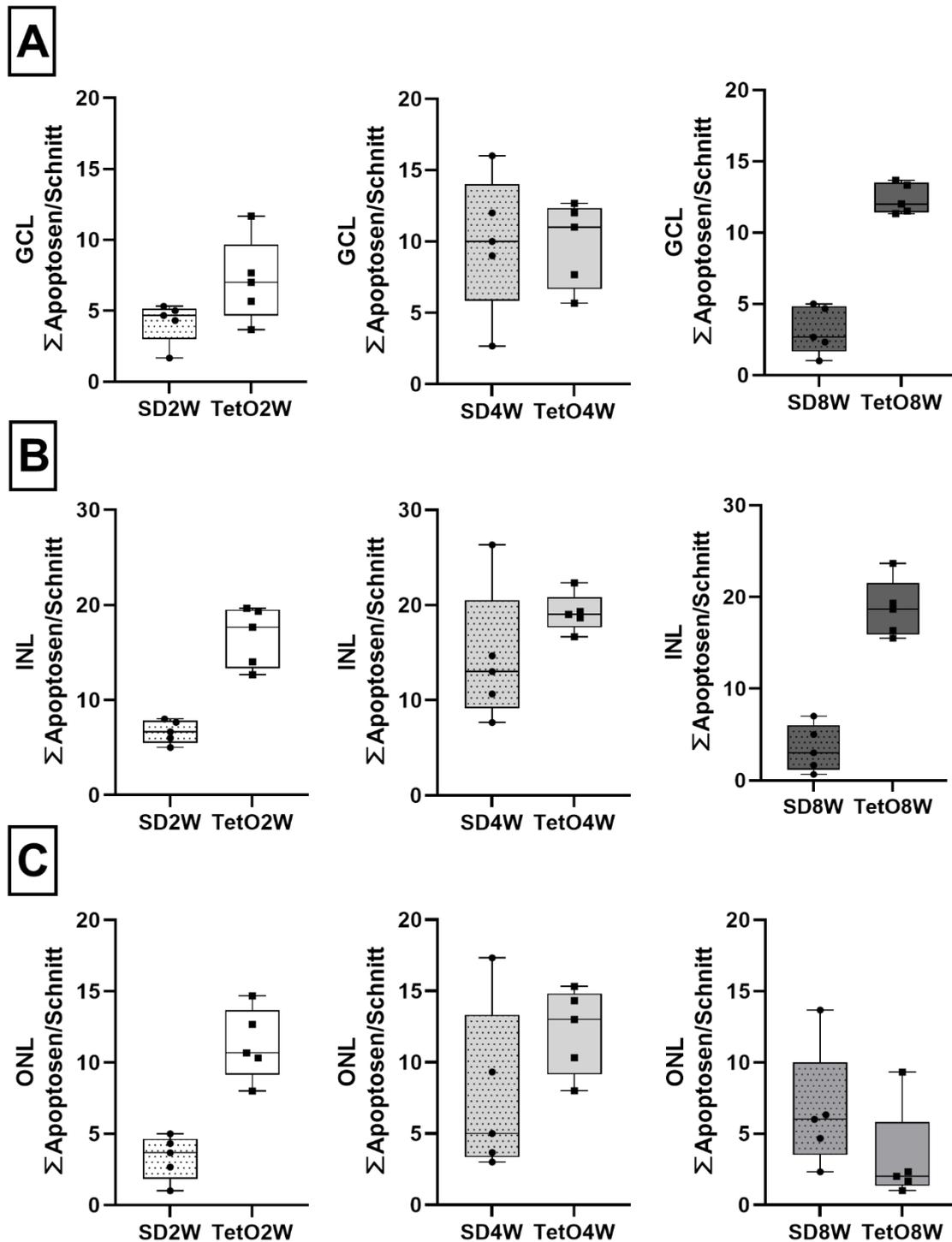


Abbildung 17: Auszählung apoptotischer Zellen (TUNEL-positiv) pro retinalem Sagittalschnitt, unterteilt in **A) Ganglienzellschicht (GCL)**, **B) innere nukleäre Schicht (INL)** und **C) äußere nukleäre Schicht (ONL)**. Verglichen wurden diabetische TetO-Tiere mit SD-Kontrolltieren nach unterschiedlichen Zeiträumen; links nach 2 Wochen, mittig nach 4 Wochen und rechts nach 8 Wochen. **A)** SD2W: n = 5, Median = 4,667, TetO2W: n = 5, Median = 7. SD4W: n = 5, Median = 10, TetO4W: n = 5, Median = 11. SD8W: n = 5, Median = 2,667, TetO8W: n = 5, Median = 12. **B)** SD2W: n = 5, Median = 6,667, TetO2W n = 5, Median = 17,67. SD4W: n = 5, Median = 13, TetO4W: n = 5, Median = 19. SD8W: n = 5, Median = 3, TetO8W: n = 5, Median = 18,67. **C)** SD2W: n = 5, Median = 3,667, TetO2W: n = 5, Median = 10,67. SD4W: n = 5, Median = 5, TetO4W: n = 5, Median = 13. SD8W: n = 4, Median = 6, TetO8W: n = 4, Median = 2. Abgebildet sind alle Werte, die Boxen markieren den Bereich vom 1. bis 3. Quartil, die Whiskers stellen das Minimum und Maximum dar.

Zusätzlich, zu der Momentaufnahme apoptotischer Zellen im TUNEL Assay, wurden HE gefärbten Sagittalschnitte auf manifestierten Zellverlust überprüft.

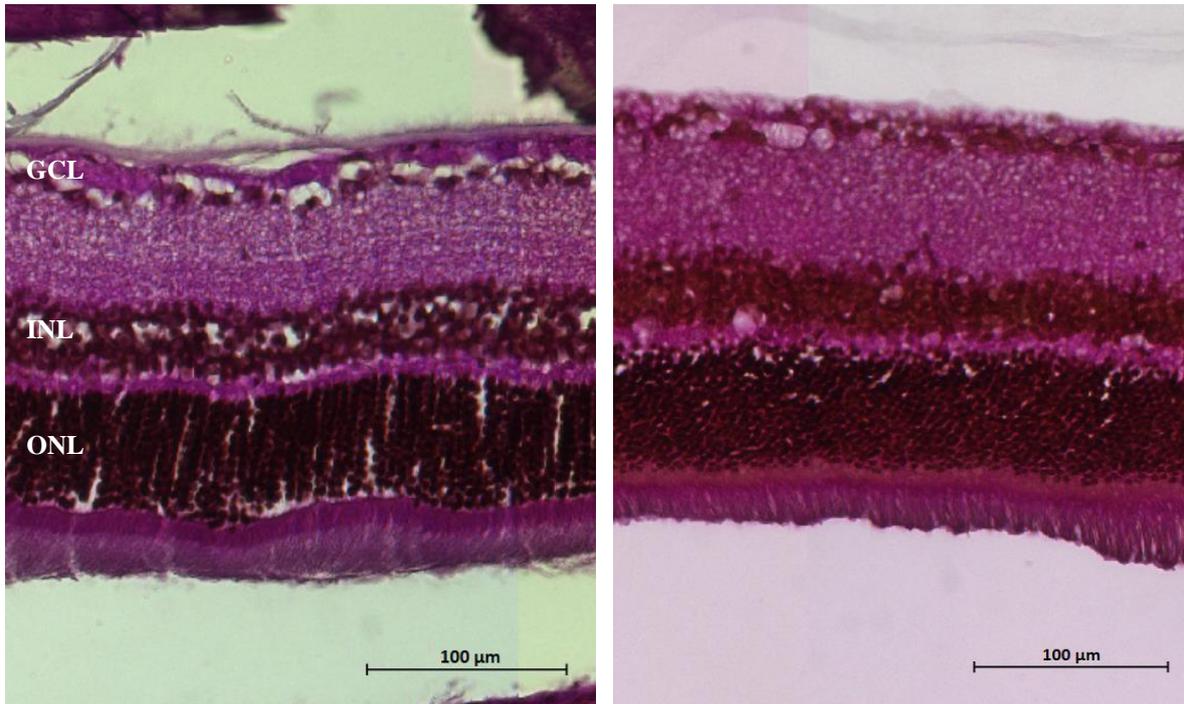


Abbildung 18: HE gefärbte retinale Sagittalschnitte. **Links:** 8 Wochen SD-Kontrolltiere, **rechts:** 8 Wochen diabetische TetO-Tiere. Aufgenommen im Kachelscan, die abgebildeten Maßstabsbalken markieren 100 µm.

Die Anzahl aller Ganglienzellen wurde pro retinalem Schnitt (auf Höhe des Sehnervenkopfes) verblindet ausgezählt (durchschnittlich 7582 μm) und anschließend der Mittelwert an Ganglienzellen pro 100 μm gebildet. Diese Auswertung ergab eine geringere Anzahl retinaler Ganglienzellen bei den SD-Kontrolltieren (Abbildung 18 und 19). In der vier Wochen Gruppe wurde bei den SD-Kontrolltieren pro 100 μm ein Median mit 0,5 Zellen weniger und in der acht Wochen Gruppe pro 100 μm mit 0,7 Zellen weniger als bei den diabetischen TetO-Tieren gezählt (Abbildung 19). Prozentual ergäbe dieser Unterschied im Median eine Differenz von durchschnittlich 8% weniger Ganglienzellen bei SD-Tieren aus der vier Wochen Gruppe und rund 11% weniger Ganglienzellen bei SD-Tieren aus der acht Wochen Gruppe. Über die Fläche der gesamten Retina entspricht dies einem Zellverlust von mehreren tausend Zellen.

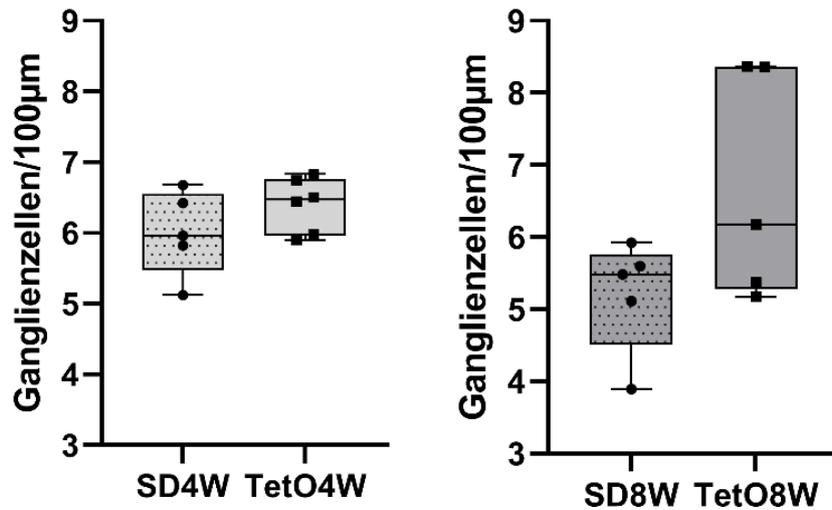


Abbildung 19: Auszählung der retinalen Ganglienzellen, als mittlere Anzahl an Zellen pro 100 µm. Diabetische TetO-Tiere verglichen mit SD-Kontrolltieren, **links:** 4 Wochen (SD4W: n = 5, Median = 5,960, TetO4W: n = 6, Median = 6,470), **rechts:** 8 Wochen (SD8W: n = 5, Median = 5,480, TetO8W: n = 5, Median = 6,180). Abgebildet sind alle Werte, die Boxen markieren den Bereich vom 1. bis 3. Quartil, die Whiskers stellen das Minimum und Maximum dar.

Neben dem Zellverlust in der Ganglienzellebene wurden die Proben auch auf einen möglichen Zellverlust in der äußeren nukleären Schicht (ONL) überprüft. Zu diesem Zweck wurden in den HE gefärbten Sagittalschnitten rechts und links vom Sehnervkopf gleichverteilt vier Messpunkte (in 600 µm Abständen) festgelegt und die Anzahl der übereinanderliegenden Photorezeptorzellkerne ausgezählt. Für die deskriptive Darstellung wurden die Ergebnisse von der rechten und linken Seite pro Retina gemittelt (da die *in vivo* Positionierung bei der Entnahme der Augen nicht markiert wurde). Die Ergebnisse zeigten eine starke Varianz, ohne deutlichen Unterschied zwischen den Kontrolltieren und den diabetischen Tieren (Abbildung 20 A). Sowohl bei den diabetischen TetO-Tieren als auch bei den SD-Kontrolltieren, war die Zellschichtdicke der ONL nach acht Wochen reduziert, im Vergleich zu der Auswertung nach vier Wochen (Abbildung 20 B).

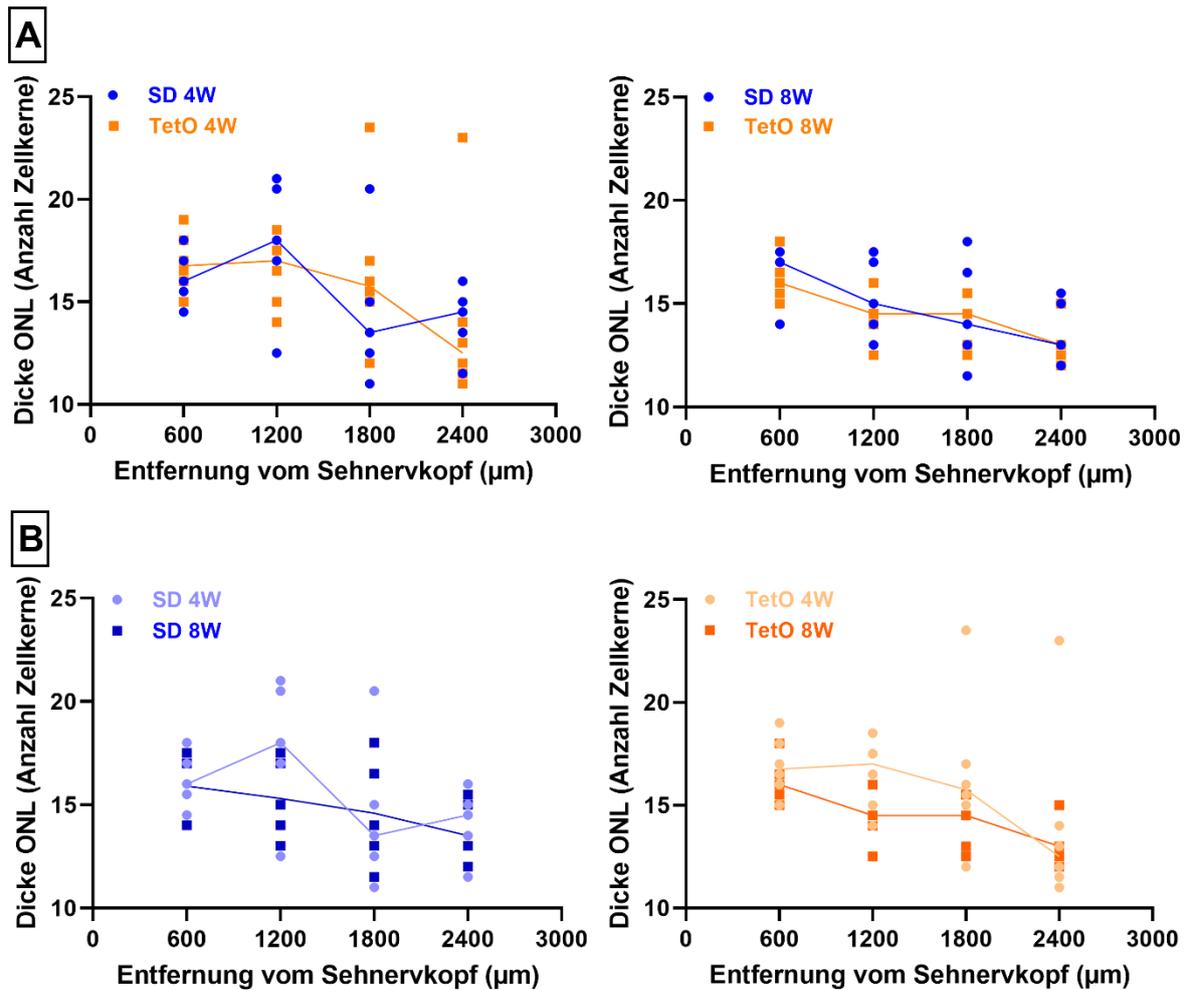


Abbildung 20: Dicke der äußeren nukleären Ebene (ONL) als Anzahl der übereinanderliegenden Zellreihen an 4 Messpunkten (in 600 µm Abständen) zwischen Sehnervkopf und Iris. SD4W: n = 5, TetO4W: n = 6. SD8W: n = 5, TetO8W: n = 5 **A**) SD im Vergleich zu diabetischen TetO Tieren (links 4 Wochen, rechts 8 Wochen) **B**) Proben aus der 4 Wochen Gruppe im Vergleich zu Proben aus der 8 Wochen Gruppe (links: SD, rechts: TetO). Es werden alle Messpunkte dargestellt, die Linie zeigt jeweils den Median der Gruppe.

Bei der Auswertung verschiedener immunhistochemischer Färbungen der Sagittalschnitte, war unerwartet ein weiteres Zeichen für Degeneration auffällig. In den Photorezeptor-Außensegmenten hatten sich „kreisrunde Löcher“ gebildet, die durch die Vacuolisierung von Membranlipiden bei der Degeneration von Photorezeptor-Außensegmenten entstanden sein könnten. Dieses Merkmal konnte in Proben von diabetischen TetO-Tieren festgestellt werden, trat aber noch häufiger bei den Proben der SD-Kontrolltiere auf (Abbildung 21).

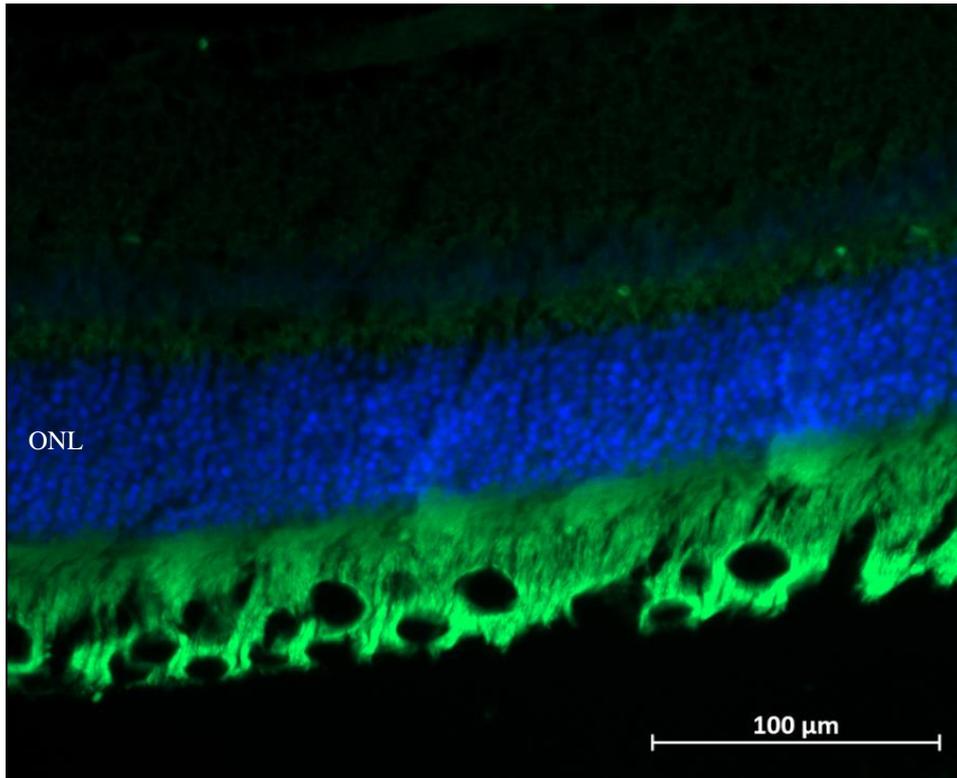


Abbildung 21: SD-Kontrollprobe mit degenerativen Photorezeptor-Außensegmenten. Der abgebildete Maßstabsbalken markiert 100 μm .

5.5 Proliferation

Bei den SD- und TetO-Tieren konnten jedoch nicht nur degenerative Prozesse beobachtet werden. In den immunhistochemisch gefärbten Präparaten traten ebenfalls ektopische Ansammlungen überzähliger Zellen auf, die innerhalb der Photorezeptor-Außensegmente, zwischen der INL und ONL oder zwischen der INL und GCL Zellhaufen oder zusätzliche Zellebenen bildeten (Abbildung 22). Durch die Färbung mit dem Proliferationsmarker anti-Ki67 konnte in diesen Bereichen keine aktive Proliferation nachgewiesen werden. Bei den Schnitten solcher Bereiche, die zufällig für die GFAP-Färbung verwendet wurden, sieht man allerdings GFAP-positive Zellen an den entsprechenden Stellen (Abbildung 22).

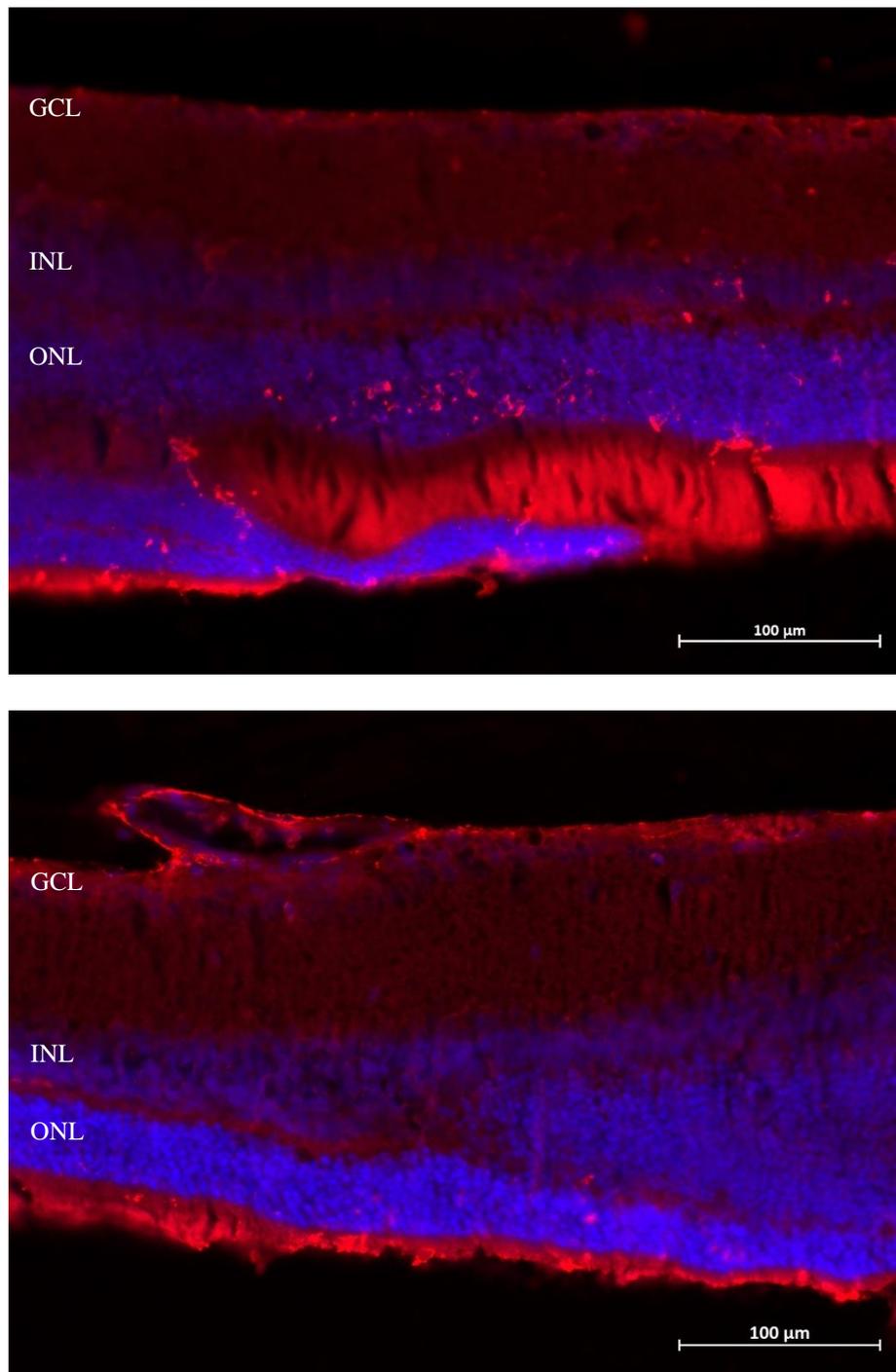


Abbildung 22: Präparate mit ektopen Zellansammlungen (**oben:** innerhalb der Photorezeptor-Außensegmente, **unten:** zwischen INL und ONL) aus der Kohorte der 2 Wochen SD-Kontrolltiere. Durch die Färbung mit anti-GFAP sieht man in den entsprechenden Bereichen (v.a. im oberen Bild) zusätzlich GFAP-positive Zellen. Die abgebildeten Maßstabsbalken markieren 100 µm.

Ein experimentunabhängiges pathologisches Merkmal, das bei den TetO-Tieren festgestellt werden musste, war das Auftreten von tumorartigen Gebilden in der Ganglienzellschicht (Abbildung 23). Für eine nachträgliche Färbung mit anti-Ki67 zur Detektion proliferierender Zellen, waren nach Projektabschluss keine Proben verfügbar.

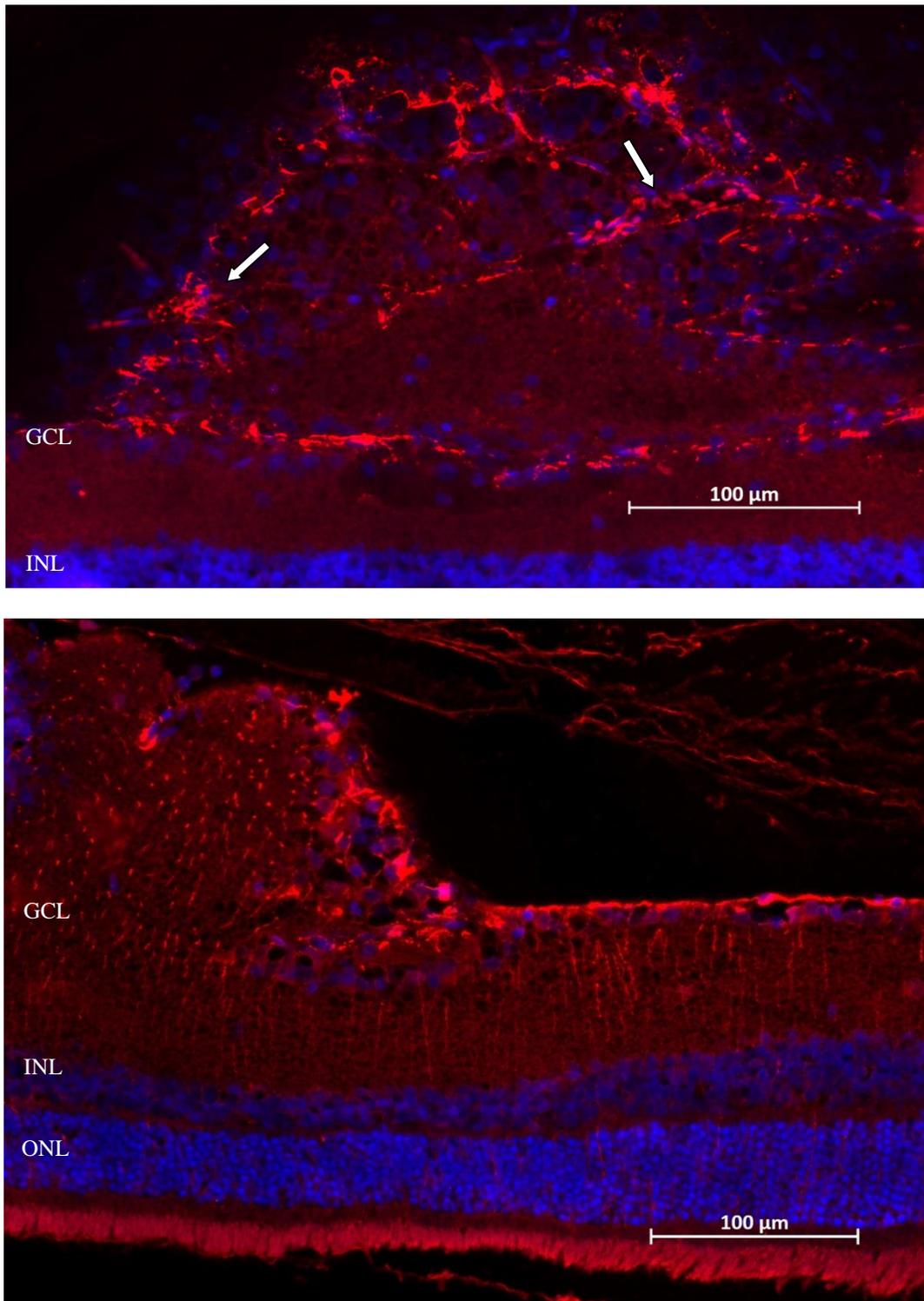


Abbildung 23: Auftreibungen innerhalb der Ganglienzellschicht (GCL) bei diabetischen TetO-Tieren. Beispielbilder von 2 Tieren aus der 4 Wochen Kohorte, gefärbt mit anti-GFAP. **Oben:** vergrößerter Ausschnitt, in dem Blutgefäße mit Erythrozyten zu erkennen sind (markiert durch weiße Pfeile), **unten:** Übersicht, in der die Relation zu der Retinadicke zu erkennen ist. Die abgebildeten Maßstabsbalken markieren 100 µm.

5.6 Oxidativer Stress

Die Regulation und Rolle von Nox4 bei DR zu untersuchen, war das ursprüngliche Projektziel. Und so habe ich nach zwei, vier und acht Wochen Diabetes die Konzentration an Nox4 über

ELISA, die Lokalisation von Nox4 über immunhistochemische Färbung und eine durch Nox4 mögliche Erhöhung an ROS im Vergleich zu Kontrolltieren gemessen.

Da die Proben für die Messung im ELISA gepoolt werden mussten (zwei Retinae pro Probe; um Nox4 Konzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze zu erhalten), waren die Stichproben dieser Analyse besonders klein. Im ELISA Assay konnten dabei kein wesentlicher Unterschied, für die Menge an Nox4, zwischen den Gruppen nachgewiesen werden (Abbildung 24). Doch im Einklang der Auswertungen anderer pathologischer Merkmale, lag der Median der gemessenen Menge an Nox4 in der vier Wochen SD-Kontrollgruppe am höchsten, während die Menge an Nox4 in den Proben der TetO Tiere mit zunehmender Diabetesdauer eine abnehmende Tendenz zu haben schien. Den geringsten Median wies die Gruppe der acht Wochen diabetischen TetO-Tiere auf. (Abbildung 24 von links nach rechts).

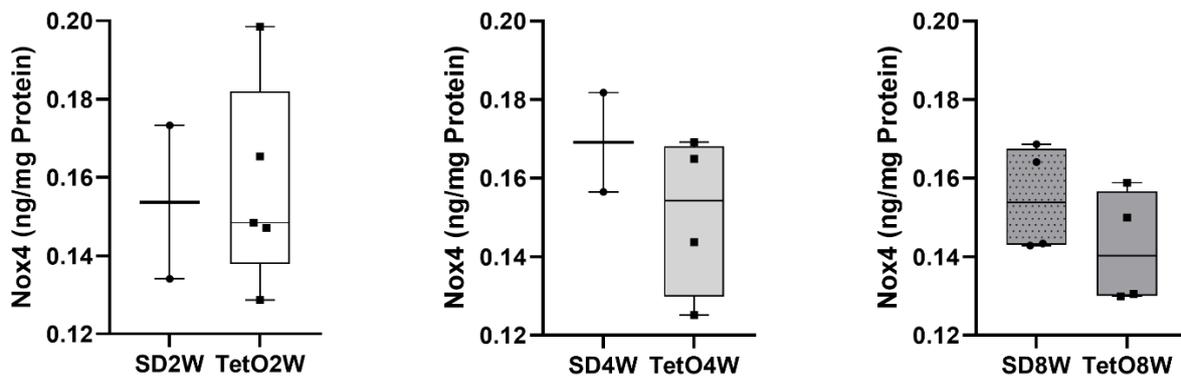


Abbildung 24: ELISA-Messergebnisse der Menge an Nox4 in ng pro mg Protein, diabetische TetO-Tiere im Vergleich zu SD-Kontrolltieren, Messung von gepoolten Proben aus je 2 Retinae. **Links:** SD 2 Wochen Kontrolltiere und 2 Wochen diabetische TetO-Tiere (SD2W: n = 2, Median = 0,1537, TetO2W: n = 5, Median = 0,1485) **mittig:** SD 4 Wochen Kontrolltiere und 4 Wochen diabetische TetO-Tiere (SD4W: n = 2, Median = 0,1691, TetO4W: n = 4, Median = 0,1543) **rechts:** SD 8 Wochen Kontrolltiere und 8 Wochen diabetische TetO-Tiere (SD8W: n = 4, Median = 0,1537, TetO8W: n = 4, Median = 0,1403). Abgebildet sind alle Werte, die Boxen markieren den Bereich vom 1. bis 3. Quartil, die Whiskers stellen das Minimum und Maximum dar.

Aufgrund der geringen Fallzahl für die einzelnen Zeiträume (durch das Poolen der Proben), wird in Abbildung 25 auch die deskriptive Gegenüberstellung der Werte aller SD-Kontrolltiere (acht Proben von insgesamt sechzehn Tieren) und aller TetO-Tiere (dreizehn Proben von insgesamt 26 Tieren) gezeigt. Die Abbildung zeigt ebenfalls den tendenziell höheren Nachweis von Nox4 innerhalb der SD-Kontrollgruppen, verdeutlicht aber auch, dass sich aufgrund der hohen Varianz der Messwerte, durch confirmatorische Testung, kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachweisen ließe.

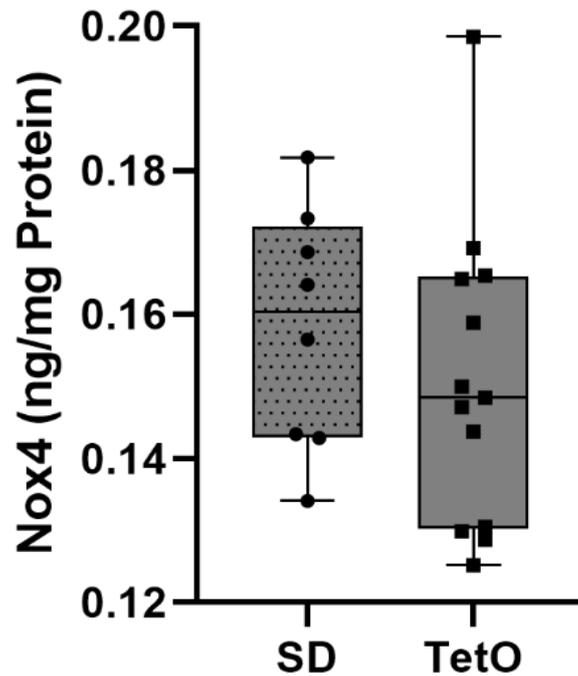


Abbildung 25: ELISA-Messergebnisse der Menge an Nox4 in ng pro mg Protein, Messung von gepoolten Proben aus je 2 Retinae. Zusammengefasst SD 2, 4 und 8 Wochen Kontrolltiere im Vergleich zu 2, 4 und 8 Wochen diabetischen TetO-Tieren (SD: n = 8, Median = 0,1603, TetO: n = 13, Median = 0,1485). Abgebildet sind alle Werte, die Boxen markieren den Bereich vom 1. bis 3. Quartil, die Whiskers stellen das Minimum und Maximum dar.

Über die immunhistochemische Färbung konnte nachgewiesen werden, dass das Nox4 überwiegend im Zytoplasma exprimiert wurde (Abbildung 26). Dabei konnte kein Unterschied zwischen SD-Kontrolltieren und TetO-Tieren oder den verschiedenen Zeiträumen festgestellt werden.

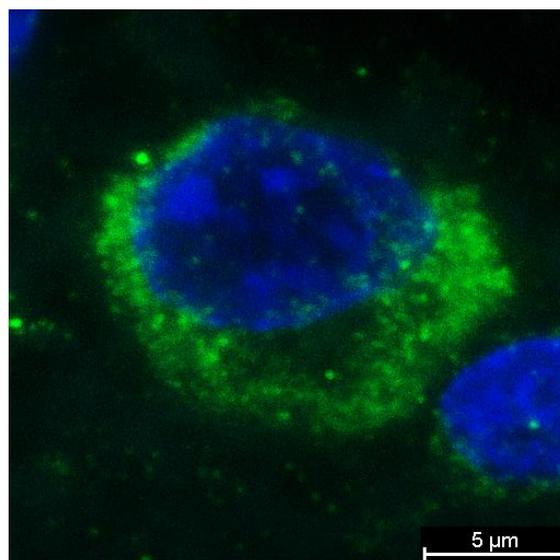


Abbildung 26: Vergrößerte Ganglienzelle mit Nox4-Expression (grün) im Zytoplasma. Der abgebildete Maßstabsbalken markiert 5 μ m.

Für die qualitative Beurteilung von Nox4, wurden die Aufnahmen der immunhistochemischen Färbung (Abbildung 27), von je fünf Proben pro Gruppe, in die drei Kategorien „stark positiv“, „schwach positiv“ und „negativ“ eingeteilt (was, wie bei der Beurteilung der GFAP-Färbung, nicht verblindet durchgeführt werden konnte).

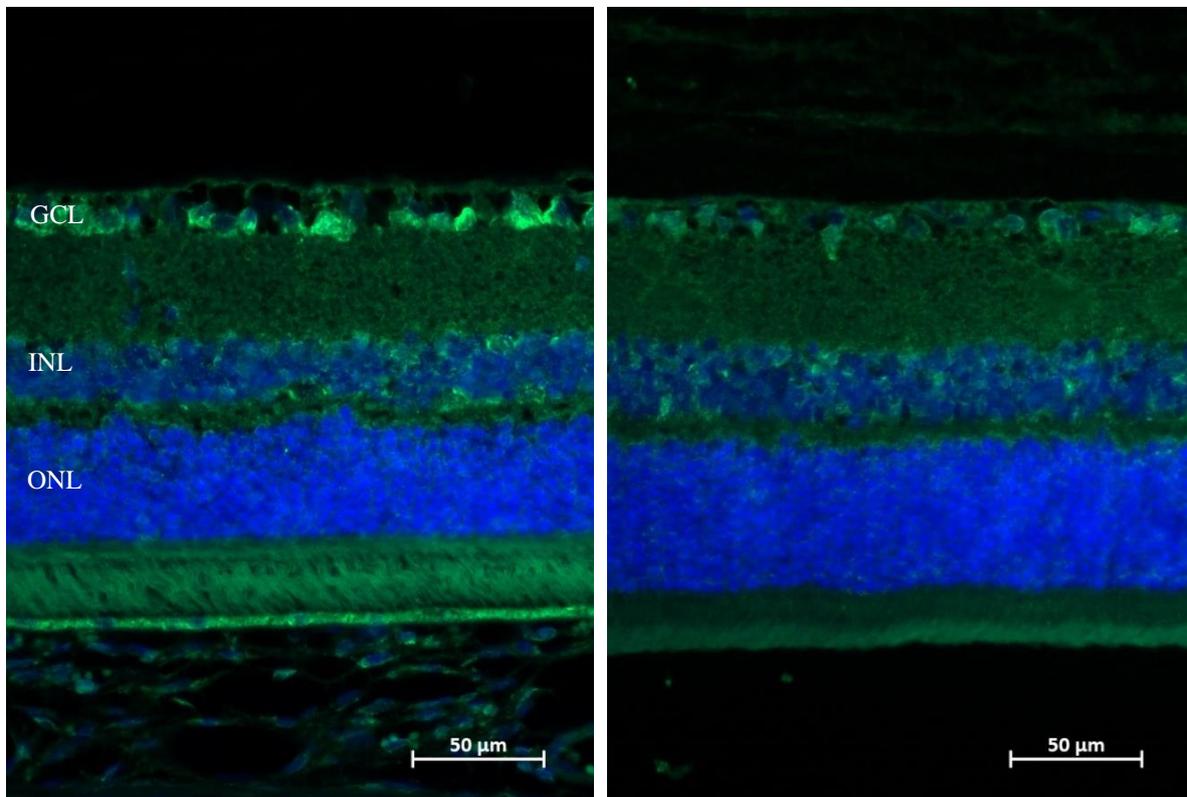


Abbildung 27: Färbung mit anti-Nox4 (grün). **Links:** Probe eines SD-Kontrolltieres, **rechts:** Probe eines diabetischen TetO-Tieres. Die abgebildeten Maßstabsbalken markieren 50 µm.

Die Beurteilung der immunhistochemischen Färbung von Nox4, stimmte mit den Tendenzen die sich bei der ELISA Messung abzeichneten (Abbildung 24) überein. Bei den Kontrolltieren zeigte sich die höchste Fluoreszenz in den Proben aus der vier Wochen Gruppe und von den Gruppen der diabetischen TetO-Tiere waren die Färbungen der acht Wochen Gruppe am schwächsten Nox4 positiv (Tabelle 9).

Tabelle 9: Qualitative Beurteilung der Nox4-Färbung; Einteilung der jeweils 5 Stichproben/Gruppe in positiv = starke Färbeargebnis, schwach = schwach positive Signale oder negativ = Färbungen die sich nur unwesentlich von den Negativkontrollen unterschieden.

Zeitraum	Nox4					
	SD			TetO		
	pos	schwach	neg	pos	schwach	neg
2 Wochen	3	1	1	4	1	0
4 Wochen	3	2	0	1	2	2
8 Wochen	2	2	1	0	2	3

Anhand DHE-gefärbter Gefrierschnitte sollte untersucht werden, inwieweit eine mögliche Steigerung von Nox4 mit einer Steigerung von ROS korreliert. Da die Anfertigung der Gefrierschnitte jedoch zu einigen Artefakten in den Präparaten führte, konnte ich nur die äußere nukleäre Schicht (ONL) auswerten. Zudem blieben nur von der vier Wochen Untersuchungsgruppe ausreichend große Stichproben übrig, um das Färbeargebnis der SD-Kontrolltiere mit dem der diabetischen TetO-Tiere zu vergleichen (Abbildung 28).

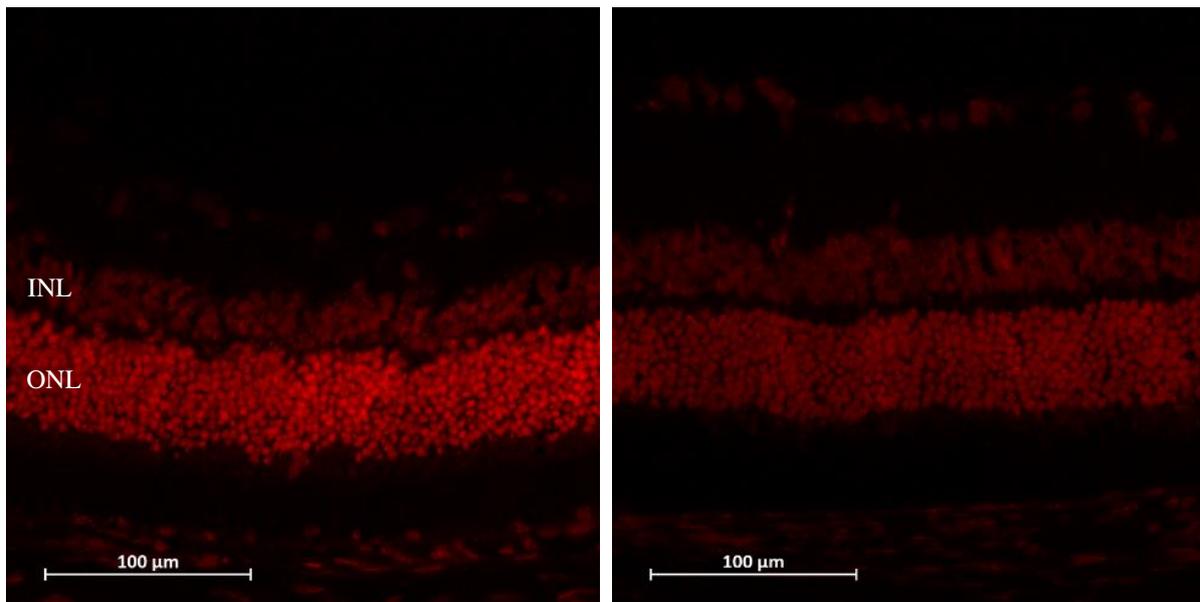


Abbildung 28: Färbung von ROS in Gefrierschnitten (über DHE: rot). **Links:** 4 Wochen SD-Kontrolltier, **rechts:** 4 Wochen diabetisches TetO-Tier. Die abgebildeten Maßstabsbalken markieren 100 µm.

Die deskriptive Darstellung der Messwerte steht im Einklang mit den Ergebnissen der Nox4 Analysen. Trotz der hohen Varianz zeigt sich in der vier Wochen Kohorte eine höhere Menge an ROS in den Zellen der ONL bei den SD-Kontrolltieren, verglichen mit den vier Wochen diabetischen TetO-Tieren (Abbildung 29).

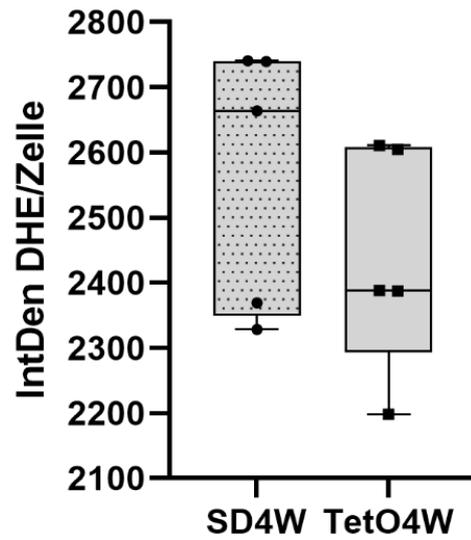


Abbildung 29: Auswertung der DHE-Fluoreszenz als IntDen/Zelle. SD4W: n = 5 Median = 2664, TetO4W: n = 5, Median = 2388. Abgebildet sind alle Werte, die Boxen markieren den Bereich vom 1. bis 3. Quartil, die Whiskers stellen das Minimum und Maximum dar.

6 Diskussion

Das Modell der transgenen TetO-Ratten sollte in diesem Projekt erneut als Modell der DR im Diabetes Typ 2 eingesetzt werden. Nach erstmaliger und erfolgreicher Verwendung der TetO-Linie als Modell der DR (publiziert 2017)¹, sollte in meinem Projekt Nox4 im Zusammenhang der Pathogenese einer DR mit dem TetO-Modell erforscht werden. Die erneute Verwendung des Modells ließ sich allerdings nur unter Änderungen in der praktischen Durchführung vornehmen. Dadurch bedingt traten Einflussfaktoren auf, welche sich negativ auf die Ergebnisse auswirkten. Im folgenden Kapitel werde ich diese Beeinflussung der Ergebnisse diskutiert.

6.1 Variationen im Versuchsprotokoll

Bei der erneuten Anwendung der transgenen TetO-Ratten als ein Modell der DR gab es grundlegende Unterschiede gegenüber dem Versuchsprotokoll, das 2017 publiziert wurde. So wurden für die Versuche bis 2017 die transgenen Ratten ausschließlich aus der hausinternen Zucht am MDC verwendet, bei denen im Alter von sechzehn Wochen mit der Induktion des Diabetes begonnen wurde. Als Kontrolltiere dienten dabei gleichalte SD-Ratten, welche aus demselben Zuchtbereich stammten und dem genetischen Hintergrund der transgenen Ratten entsprachen. Das bedeutet, dass alle Versuchstiere von der Geburt bis zum Exitus in demselben Haltungsbereich verblieben¹.

Im Gegensatz dazu, mussten für die in meiner Arbeit beschriebenen Versuche, alle Tiere erst in den experimentellen Haltungsbereich des CVKs importiert werden. Parallel zu meiner Arbeit, wurde von unserer Arbeitsgruppe ein weiteres Projekt zur Erforschung der DR im TetO-Modell durchgeführt. Da die Tierversuchsleiterin der beiden Projekte geplant hatte, die neuen Experimente mit einer größeren Anzahl an Tieren durchzuführen, waren für die Versuche mehr transgene TetO-Ratten erforderlich, als aus der Ursprungszucht vom MDC bezogen werden konnten.

Ich war zuständig für die Tiere, Probenentnahme und teilweise -Aufbereitung beider Projekte, beschreibe in meiner Arbeit aber ausschließlich die Methoden und Ergebnisse meiner Untersuchung zu der Rolle des Nox4 bei DR. Um den Bedarf beider Projekte zu decken, wurde aus drei Nachkommen eines Embryotransfers, ein neuer Substamm in dem Zuchtbereich der FEM generiert. Bedingt durch Baumaßnahmen, musste dieser TetO-Stamm nach einem Jahr in einen wiederum neuen Zuchtbereich verlegt werden. Dafür wurden neun Tiere zu JANVIER LABS nach Frankreich exportiert, aus denen eine dritte Zucht aufgebaut wurde. So wurden im Zeitverlauf der Versuche, neben der ursprünglichen Zucht am MDC, Tiere aus zwei weiteren

Zuchten genutzt. Dadurch, dass die Tiere allesamt importiert werden mussten, unterlagen sie einem gewissen Transportstress und mussten sich an ein neues mikrobielles Umgebungsklima anpassen. Was auch die Kontrolltiere betraf, welche ausschließlich aus der Zucht von JANVIER LABS aus Frankreich bezogen wurden. Im Fall der Kontrolltiere bedeutet dies zusätzlich einen Wechsel des genutzten SD-Substammes (gegenüber den Experimenten bis 2017) und demzufolge die Verwendung einer Linie, die nichtmehr exakt dem genetischen Hintergrund der Gründerpopulation der transgenen TetO-Tiere aus der Zucht am MDC entsprach. Im Laufe meiner Arbeit wurde deutlich, dass der genetische Hintergrund des neu verwendeten SD-Stammes von JANVIER LABS die Ergebnisse mit beeinflusst hat.

Eine weitere Änderung, die im Versuchsprotokoll vorgenommen wurde, betraf das Alter der eingesetzten Tiere. Die Diabetesinduktion in dem TetO-Modell erfolgte ursprünglich bei vier Monate alten Versuchstieren. Für meine Versuche wurde der Diabetes dagegen bei zwei Monate alten TetO-Tieren induziert. Im späteren Projektverlauf wurde bei Tieren aus der Zucht von JANVIER LABS mit der Induktion teilweise gewartet, bis ein höheres Startgewicht erreicht wurde. Bei diesen Tieren erfolgte die Diabetesinduktion im Alter von neun bis zwölf Wochen, was immer noch einen Monat vor dem Induktionsalter von sechzehn Wochen liegt. Nach erfolgreicher Diabetesinduktion wurden in dem aktuellen Projekt zusätzliche Endpunkte untersucht. So erfolgten die Probennahmen nicht nur nach vier Wochen, sondern auch nach zwei und acht Wochen Diabetesdauer. Vermutlich kamen dadurch systematische Unterschiede zwischen den diabetischen TetO-Tieren und den SD-Kontrolltieren unterschiedlich zum Tragen. Denn, wie im Folgenden noch einmal dargelegt wird, wirkten auf die Tiere verschiedene Einflussfaktoren, je nachdem ob sie der diabetischen Gruppe oder der Kontrollgruppe angehörten.

Abgesehen von den genannten Abweichungen im Versuchsprotokoll gegenüber der ersten Anwendung 2017¹, gab es über den Zeitverlauf des Projektes von 2019 bis 2022 haltungsbedingte Faktoren, die zwischen den einzelnen Kohorten variierten.

Zu Projektbeginn standen die Tiere gut ein Jahr am Fenster eines nicht verdunkelten Haltungsraumes, in dem die volle Deckenbeleuchtung eingeschaltet war. Demzufolge waren sie einer weit höheren Lichtintensität ausgesetzt, als für Albinotiere günstig wäre. Eigene Messungen, die ich mit einem Luxmeter durchgeführt habe, ergaben, dass unter diesen Bedingungen während der Hellphase im Haltungsraum eine Lichtintensität von ~ 800 Lux herrschte, anstelle der von der GV-SOLAS empfohlenen maximalen Helligkeit von < 325 Lux (zu der die Gesellschaft anmerkt, dass Albinotiere zusätzlich abgeschirmt werden sollten).

Während dieser Zeit wurden die Versuchstiere für die Dauer der Doxycyclin-Gabe überwiegend in einem Rondell mit IVC-Käfigen untergebracht. Als die ersten Blutspuren in den Käfigen der Tiere auffielen, konnte bei der Suche nach auslösenden Faktoren festgestellt werden, dass die Luftfeuchtigkeit in diesem Haltungsraum deutlich unter dem empfohlenen Mindestwert von 45% lag. Dieses Problem konnte von der FEM über mehrere Monate hinweg nicht behoben werden, da ein besseres Raumklima Bauarbeiten am Belüftungssystem erforderte.

Im Laufe des Projektes wurde für die Unterbringung zusätzlich ein Scantainer genutzt. Aufgrund von baulichen Maßnahmen in der Tierhaltung, mussten die Tiere in einen neuen Haltungsraum umziehen, in dem sie während der Gabe von Doxycyclin ausschließlich im Scantainer untergebracht waren, da es in diesem Raum keinen Anschluss für die Belüftung eines Rondells mit IVC-Käfigen gab. Die Baumaßnahmen dauerten mehrere Monate an, wodurch alle Kohorten, die während dieses Zeitraumes gehalten wurden, einem erhöhten Lärm- und Vibrationspegel (durch zum Beispiel Stemmarbeiten) und somit einem zusätzlichen Stressfaktor ausgesetzt waren. Die Helligkeit war in dem neuen Haltungsraum deutlich niedriger, erreichte aber, trotz abgedunkelter Fenster und der Nutzung von nur einer der beiden Deckenlampen, (nach meinen Messungen) immer noch eine Lichtintensität, die über dem maximalen Wert für Tiere mit pigmentierter Iris lag (~ 380 Lux, anstelle < 325 Lux; wobei für Albinotiere zusätzliche Verdunklungshauben empfohlen werden). Neben den Variablen, denen die Kohorten über den Verlauf des Projektes in unterschiedlichem Umfang ausgesetzt waren, existierten für die diabetischen TetO-Tiere und die SD-Kontrolltiere systematisch unterschiedliche Bedingungen.

Da alle SD-Kontrolltiere, aber nur 18% der transgenen TetO-Tiere, von JANVIER LABS aus Frankreich bezogen wurden, war für die Kontrollgruppe die potenzielle Belastung durch Transportstress höher. Von den verwendeten TetO-Tieren kamen 82% aus einer Zucht innerhalb von Berlin und mussten, im Gegensatz zu den Kontrolltieren, nur einen sehr kurzen Transportweg zurücklegen (vom FEM oder MDC zum CVK). Weitere systematische Unterschiede ergaben sich durch die Gabe des (für TetO-Tiere) diabetesinduzierenden Doxycyclins. Denn wie durch die mikrobiologischen Analysen deutlich wurde, waren die Versuchstiere übermäßig stark mit verschiedensten Opportunisten besiedelt. Wie in Kapitel 6.2.1 diskutiert wird, ist eine Beeinflussung dieser Belastung durch das experimentell verabreichte Antibiotikum Doxycyclin nicht auszuschließen. Hinsichtlich der bakteriellen Problematik ist dies ein entscheidend beeinflussender Faktor, der bei den TetO-Tieren

durchgehend und bei den SD-Kontrolltieren nur eine Woche wirkte. Denn während die diabetischen TetO-Tiere nach der Induktionsphase weiter Doxycyclin bekamen, wurde den Kontrolltieren, nach der einwöchigen Gabe von Doxycyclin, bis zum experimentellen Ende Wasser verabreicht. Dadurch, dass die Tiere während der Verabreichung von Doxycyclin im Scantainer oder Rondell untergebracht wurden, waren die TetO-Tiere über die gesamte Dauer des Experimentes zusätzlich besser vor der zu hellen Raumbelichtung geschützt.

Zusammengenommen konnten Variationen in der Durchführung identifiziert werden, welche die Ergebnisse potenziell kritisch beeinflusst haben. Als Hauptfaktor kam allerdings die unterschiedliche Herkunft der Versuchstiere zum Tragen, für die ich einen entscheidenden Einfluss auf die Anfälligkeit für einen pathologischen Befall mit Opportunisten zeigen konnte. Eine solche Immunsuppression könnte, zusammen mit einer beobachteten auffälligen Verhaltensänderung und einem erhöhten Tumoraufkommen, ebenso für einen Gendrift innerhalb der transgenen TetO-Linie sprechen. Da zudem auch die Retinae der SD-Kontrolltiere pathologische Merkmale aufwiesen, die teilweise genetisch bedingt sein könnten, wurde nach intensiver Diskussion mit meinen Betreuerinnen gemeinsam entschieden, dass die TetO-Linie sowie die SD-Linie im *status quo* nicht genutzt werden kann, um die Pathomechanismen einer DR zu untersuchen. Dies war keine leichte Entscheidung, da es bedeutet, dass die über drei Jahre gesammelten Daten nicht für die Beantwortung der Ursprungshypothese verwendet werden können. Um die Aufmerksamkeit für den unter Umständen dramatischen Einfluss von Herkunft und Haltung auf die Experimente und Daten in der medizinischen Grundlagenforschung zu erhöhen, habe ich mich entschlossen, unsere Ergebnisse unter dem Gesichtspunkt der bakteriellen Belastung (und anderer Stressoren) sowie mögliche genetische Einflüsse in den Fokus meiner Arbeit zu stellen. Zusätzlich ist geplant, auch durch eine Publikation auf die möglichen Problematiken durch Zucht und Haltung aufmerksam zu machen.

6.2. Bakterielle Belastung und Belastungen durch weitere Stressoren

Wie in dem vorherigen Kapitel geschildert, waren die Tiere im Laufe des Projektes verschiedenen haltungsbedingten, nicht experimentell induzierten Stressfaktoren (durch Licht, Lärm und Raumklima) ausgesetzt. Zusätzlich wurde durch den Wechsel des experimentellen Haltungsbereiches (vom MDC an die Charité) der Import von Tieren aus externen Zuchtbereichen erforderlich, wodurch ein neuer potenzieller Stressfaktor hinzukam. Ein äußerliches Merkmal, das für diese nicht experimentell induzierte Belastung der Kohorten spricht, war ein gehäuftes Auftreten von verkrusteten Augen bei den Tieren. Dieses Symptom,

durch erhöhte Absonderung von Sekret aus den Harradschen Drüsen, trat unabhängig von versuchsbedingten Belastungen sowohl bei den diabetischen TetO-Ratten als auch bei den SD-Kontrollratten auf. In der Leitlinie der GV-SOLAS über Möglichkeiten der Belastungsbeurteilung im Tierversuch wird dies für Ratten als Merkmal von Stress und Krankheit als mögliches Beurteilungskriterium gelistet⁹⁸. Welche Anzeichen für eine nicht experimentell induzierte Belastung darüber hinaus systemisch gefunden werden konnten und wie sich deren okuläre Manifestation in den Ergebnissen widerspiegelt, diskutiere ich in den nächsten beiden Kapiteln.

6.2.1 Systemischer Nachweis

Ein Jahr nach Projektstart, zeitgleich mit dem Import der ersten TetO-Tiere aus der neu aufgebauten Zucht von der FEM, fielen mir erstmals Blutspuren in den Käfigen von Ratten im experimentellen Haltungsbereich am CVK auf (Abbildung 3). Im ersten Jahr des Projektes, als die TetO-Tiere noch ausschließlich vom MDC (einem experimentellen Haltungsbereich mit ähnlichem hygienischem Standard wie im experimentellen Haltungsbereich am CVK) bezogen wurden, gab es solche Zwischenfälle nicht. Die Vorfälle konnten nicht auf versuchsbedingte Belastungen zurückgeführt werden, da sich die betroffenen Tiere noch in der Eingewöhnungsphase (Tag 0 bis 14 nach Ankunft) befanden, sodass an ihnen keine Intervention und keinerlei experimentbezogenes Handling vollzogen wurde. Bei den Sektionen dieser Tiere stellte ich vordergründig starke Einblutungen in die Lunge und ein blutiges, dickflüssiges Sekret in der Blase fest. Bei histopathologischen Untersuchungen des Darmgewebes wurde durch GIM eine subakute Enteritis mit nodulärer Hyperplasie des Darmassoziierten lymphatischen Gewebes diagnostiziert, zu der es mutmaßlich als Sekundärpathologie in Folge eines Antigenkontakts kam. Mikrobiologische Untersuchungen der Abstrichproben innerer Organe, deuteten auf eine infektiöse Vermehrung opportunistischer Bakterien hin. Aus Proben von lebend eingesendeten Tieren ließen sich dementsprechend auch unter sterilen Entnahmebedingungen (durch GIM) hochgradig *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* und *Klebsiella oxytoca* isolieren.

Proteus mirabilis, *Escherichia coli* und *Klebsiella oxytoca* gehören der Familie der Enterobacteriaceae an. Sie lassen sich als kommensale Bakterien mitunter auch im Magen-Darm-Trakt, den Atemwegen und auf der Haut gesunder Personen und Tiere nachweisen. Allerdings gelten sie als opportunistische Erreger, die fakultativ pathologisch wirken⁹⁹.

Können diese Bakterien, wie in unseren Stichproben, hochgradig isoliert werden, spricht dies für ein pathologisches Geschehen und ein massiv gestörtes Gleichgewicht der physiologischen

Besiedlung. Wie mir Frau Dr. Barbara Hueber (Geschäftsführerin der GIM) zudem mitteilte, sind die Befunde, die aus dem Darmgewebe der Tiere gewonnen werden konnten, ein eindeutiges Krankheitszeichen, welches in direktem Zusammenhang dieser Dysbalance steht.

In der Humanmedizin sind diese Opportunisten hauptverantwortlich für nosokomiale Infektionen, von denen vor allem immunkomprimierte Menschen betroffen sind⁹⁹. Das Bild, welches sich bei den Sektionen erkrankter Tiere zeigte (Abbildung 4), entspricht den pathologischen Manifestationsschwerpunkten, wie sie durch Infektionen dieser Bakterien beim Menschen hervorgerufen werden. So sind beispielsweise Infektionen mit *Escherichia coli* weltweit der häufigste Grund für Blasenentzündungen^{100, 101}. Eine Infektion durch *Proteus mirabilis* betrifft ebenso überwiegend den Urogenitaltrakt⁹⁹, wohingegen Infektionen mit *Klebsiella oxytoca* auch Bronchopneumonien verursachen können¹⁰².

In Versuchstierhaltungen, wo belastete Tiere mit experimentell induzierten Primärpathologien gehalten werden, ist die Vermehrung solcher fakultativ pathogenen Bakterien unerwünscht. Die GV-SOLAS warnt ausdrücklich vor der Gefahr des Einschleppens dieser Bakterien durch Tierimporte. Neben Enterobacteriaceae werden hier auch Staphylokokken genannt, von denen sich diverse Arten in den untersuchten Abstrichproben der Tierorgane nachweisen ließen⁵¹.

Der Hygienestandard (vor allem in kommerziellen Zuchtbereichen) ist heutzutage generell sehr hoch. Doch im Gegensatz zu pathogenen Mikroorganismen, werden Tiere nur selten auf Opportunisten getestet und es ist nicht üblich, diesen Status im Gesundheitszeugnis anzuführen, da Opportunisten in geringer Konzentration, bei Tieren mit immunologisch guter Konstitution, keine Infektionen hervorrufen. Allerdings können die hygienischen Bedingungen zwischen verschiedenen Zucht- und Haltungseinheiten erheblich variieren. Dadurch besteht die Gefahr des Einschleppens unerwünschter Organismen durch den Import von Tieren aus weniger sterilen Haltungen. Darüber hinaus ergibt sich daraus aber auch eine potenzielle Belastung für Tiere, die durch einen Export mit einer ungewohnten Erhöhung der bakteriellen Vielfalt konfrontiert werden. Denn das Immunsystem von Tieren, die in einem besonders sterilen Bereich geboren und aufgewachsen sind, ist nicht ausreichend entwickelt, um sich bei Export in einen weniger sterilen Bereich an die neue Umgebung zu adaptieren. Darüber hinaus steigt mit der Dauer des Transportes der Transportstress für die Tiere, was sich hemmend auf die Immunantwort der Tiere auswirkt. Um die mit einem Tierimport verbundenen Risiken zu minimieren, ist aus Sicht der GV-SOLAS eine strenge Quarantäne die Grundvoraussetzung, um neue Tiere in eine Versuchstierhaltung einzuführen. So heißt es in der Leitlinie zum Thema

des Hygienierisikos beim Import von Nagetieren, dass ein Import von lebenden Tieren nur in Betracht gezogen werden soll, wenn das Gesundheitszeugnis den allgemeinen Qualitätsstandards entspricht, beim Empfänger eine Quarantäneeinheit vorhanden ist und der Hygienestatus der Tiere nach Ankunft im eigenen Haus erneut überprüft wird. Die Quarantäneeinheit sollte dabei bestenfalls räumlich getrennt vom restlichen Haltungsbereich eingerichtet sein. Ankommende Tiere sollten in diesem separaten Bereich vorzugsweise in IVC-Systemen untergebracht werden und von Personal versorgt werden, welches nicht im regulären Haltungsbetrieb tätig ist. Um das Risiko einer Einschleppung zu minimieren, sollten die importierte Tiere aus diesem Quarantänebereich erst nach Überprüfung des mikrobiologischen Status (Serologie, Bakteriologie, Parasitologie) in den regulären Haltungsbereich aufgenommen werden⁵¹.

In dem genutzten experimentellen Haltungsbereich am CVK, herrscht ein Hygienestandard frei von spezifischen pathogenen Erregern. Um diese SPF-Haltung (specific pathogen free) aufrecht zu erhalten, werden die Gesundheitszeugnisse vor einem Import überprüft. Die empfohlene Quarantäne von importierten Tieren ist nicht vorgesehen. So wurden die Versuchstiere aus den Transportboxen direkt in den Haltungsraum gesetzt (zu dem Bestand schon vorhandener Tiere aus dem Projekt und weiteren Tieren aus anderen Projekten). Der Zeitpunkt, zu dem daraufhin (sieben bis vierzehn Tage nach Ankunft) bei unseren importierten Tieren erster Krankheitssymptome auftraten, spricht laut den Aussagen von Frau Dr. Barbara Hueber (GIM), eindeutig für eine Immunsuppression der Tiere, als Auslöser einer Infektion durch erstmaligen Antigenkontakt in unserer Haltung.

Insbesondere *Escherichia coli* und *Klebsiella oxytoca* gelten als antibiotikaresistent^{100, 103}. Bei Kindern und immunkomprimierten Menschen kann eine Antibiotikabehandlung die intestinale Überwucherung mit *Klebsiella oxytoca* begünstigen, was durch die damit einhergehende Freisetzung von Zytotoxinen eine antibiotikaassoziierte hämorrhagische Kolitis verursacht¹⁰³. Der Ausschuss für Hygiene der GV-SOLAS nennt dies in seinen Empfehlungen zum Thema Antibiotika-Gabe bei Labornagern sogar als wichtigen Grund, der gegen den Einsatz von Antibiotika in der Versuchstierhaltung spricht. So heißt es hier: „Darüber hinaus kann eine antibiotische Behandlung das natürliche Gleichgewicht der vorhandenen Mikroorganismen stören. Beim antagonistischen Verhalten der Keime können einzelne Mikroorganismen bevorzugt werden. So sind Beispiele bekannt, bei denen die antibiotische Bekämpfung von Pasteurellen das Wachstum von Klebsiellen begünstigt hat.“¹⁰⁴.

Möglicherweise führte die experimentelle Behandlung mit dem Breitbandantibiotikum Doxycyclin zu einer intestinalen Vermehrung der resistenten Bakterien und infolgedessen zu einem vermehrten Aufkommen dieser Bakterien im Haltungsraum. Wie sich das eingesetzte Doxycyclin allerdings tatsächlich auf die beschriebene Situation auswirkte, lässt sich im Nachhinein nicht mehr feststellen. Tatsache ist, dass die angewendete Dosis nur einem Bruchteil der therapeutisch wirksamen Dosis entsprach, welche für Tetracyclin 5 mg/ml Trinkwasser (über mindestens fünf Tage) beträgt. Laut dem Hygieneausschuss der GV-SOLAS sollte eine wirksame Dosis generell nicht unterschritten werden, da andernfalls die Gefahr des Auftretens von Resistenzen gegenüber eingesetzter Antibiotika besteht¹⁰⁴. Anhand der durch GIM vorgenommenen Untersuchungen lässt sich mit Sicherheit sagen, dass das Immunsystem der auffällig gewordenen Tiere, der neuen mikrobiellen Umgebung unserer Haltung nicht gewachsen war (was auf importierte Tiere von der FEM und von JANVIER LABS zutrifft; also auf Tiere, die aus mutmaßlich sterileren Hygienebedingungen stammten). Diese Immunsuppression könnte durch Transportstress oder bisher unbemerkte genetische Änderungen der Linien verstärkt worden sein.

6.2.2 Beeinflussung okulärer Befunde

Für ophthalmologische Untersuchungen ist es von Relevanz, dass Bakterien weltweit Hauptverursacher von Augeninfektionen sind. So sind Bakterien beispielsweise mit Augeninfektionen wie Konjunktivitis, Keratitis, Endophthalmitis, Blepharitis, orbitaler Zellulitis und Manifestationen von Dakryozystitis assoziiert. Je nach Infektionsweg, werden diese Augeninfektionen als exogen oder endogen bezeichnet, wobei in der Humanmedizin exogene Infektionen, als Komplikation nach einem Primärkontakt, zahlenmäßig von größerer Bedeutung sind. Zu den exogenen Infektionsfaktoren zählen etwa Kontaktlinsen, intraokulare Injektionen oder chirurgische Eingriffe, wohingegen endogene Augeninfektionen auf eine systemische Bakteriose und deren Ausbreitung über die Blutbahn zurückzuführen sind¹⁰⁵. Neben *Streptococcus* und *Staphylococcus* Spezies sind *Klebsiella* spp. und *Escherichia coli* die häufigsten Verursacher bakterieller endogener Augeninfektionen¹⁰⁵. Wird eine bakterielle Augeninfektion wie eine Endophthalmitis diagnostiziert, sind systemisch verabreichte Antibiotika nicht wirksam, sondern müssen intravitreal verabreicht werden¹⁰⁶. Diabetes bedingte Augenveränderungen gelten als Hauptrisikofaktor, was, wie im Tiermodell gezeigt werden konnte, mit einer zunehmenden Permeabilität der äußeren Blut-Retina-Barriere zusammenhängt¹⁰⁷. Allerdings gibt es neben diabetischen Veränderungen weitere Faktoren, welche zu einer erhöhten Durchlässigkeit der BRB führen. Dazu zählen auch Toxine, zu deren Freisetzung einige Bakterienarten befähigt sind. Im Tiermodell konnte nachgewiesen werden,

dass solch Toxin-produzierende Bakterien die BRB in ausreichendem Maße schädigen, um sie auch ohne zusätzlich experimentell induzierte Erhöhung der Durchlässigkeit passieren zu können^{108,109}. Die im Rahmen des Projektes aus den Versuchstieren isolierten Bakterien *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* und *Klebsiella oxytoca* zählen zu eben diesen Toxin-produzierenden Arten¹¹⁰⁻¹¹².

Gelangen Bakterien durch die BRB in das immunprivilegierte Auge, werden deren Oberflächenproteine durch Toll-like-Rezeptoren (TLRs) erkannt und rufen eine Immunreaktion hervor. TLRs, die für das angeborene Immunsystem eine entscheidende Rolle spielen, werden von Zellen im gesamten Auge exprimiert. Zu den retinalen Zellen, die diesen Rezeptor exprimieren, zählen RPE-Zellen, Astrozyten, Müllerzellen und Mikrogliazellen. Die über eine Aktivierung dieser Rezeptoren induzierten Signalwege, führen zu einer gesteigerten Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine welche die Rekrutierung von systemischen Immunzellen bewirken^{113, 114}. Das Ausmaß der hervorgerufenen Reaktion ist abhängig von verschiedenen Faktoren (wie beispielsweise der Bakterienlast, der Expression von Virulenzfaktoren oder einer möglichen Produktion von Toxinen) und reicht von einer leichten oder vorübergehenden Entzündung bis hin zu irreversiblen Degenerationen der Retina¹¹³. Bei diesen indirekt gewebeschädigenden Immunreaktionen spielen insbesondere die Freisetzung von ROS über NADPH-Oxidasen (einschließlich Nox4), Signalwege erhöhten Stresses des Endoplasmatischen Retikulums (ER-Stress) und die Aktivierung von Caspase-Signalwegen eine Rolle¹¹⁵⁻¹¹⁸.

Eine ausgeprägte bakterielle Infektion der Augen konnte bei den Versuchstieren nicht festgestellt werden. Allerdings kann bei einer systemisch inflammatorischen Belastung, wie sie bei den Versuchstieren festgestellt wurde, davon ausgegangen werden, dass es unter diesen Umständen auch zu einer okulären Beteiligung kam.

Für die Prüfung der Ursprungshypothese, war die Erfassung der proinflammatorischen Auswirkung der induzierten Hyperglykämie ein wesentlicher Bestandteil. Bei der erstmaligen Verwendung der transgenen TetO-Ratten als Modell der DR am MDC, konnte diesbezüglich nach vier bis fünf Wochen Diabetes, eine signifikant höhere Rate aktivierter mononukleärer Phagozyten verglichen mit nicht-diabetischen Wildtyp-Ratten nachgewiesen werden. Während die Rate aller mononukleärer Phagozyten in beiden Gruppen in etwa gleich war¹. Bei meiner Verwendung des Modells an der Charité, zeigte sich ein gegenteiliges Ergebnis. Die Retinae-Proben der nicht-diabetischen SD-Ratten wiesen einen deutlich höheren Anteil aktivierter mononukleärer Phagozyten auf (Abbildung 6 B und Abbildung 7). Und auch die Gesamtzahl

Iba1-positiver Phagozyten war bei den Kontrolltieren stark erhöht, im Vergleich zu den Proben von TetO-Ratten nach vier und acht Wochen Diabetes (Abbildung 6 A). Dieses Ergebnis spricht für eine Rekrutierung systemischer Monozyten bei den SD-Kontrolltieren.

Die Proben der Diabetesgruppen stammten von Tieren, die in der Haltung am CVK saßen, noch bevor die ersten Blutspuren in den Tierkäfigen auffällig wurden. Von den Proben der Kontrollgruppen stammte hingegen nur 45% aus dieser Zeit und 55% des Probenmaterials wurde von Tieren entnommen, als das Problem in der Tierhaltung bereits bekannt war. Zudem stammten die für diese Analyse verwendeten Proben der diabetischen Tiere alle von transgenen TetO-Ratten aus der Ursprungs-Zucht von Bader (MDC), während die Kontrolltiere der gesamten Studie aus einem SD-Substamm von JANVIER LABS aus Frankreich importiert wurden. Das Ergebnis, welches sich in diesem Versuch zeigte, deutet auf einen höheren proinflammatorischen Einfluss durch den Import, als durch die experimentell induzierte Diabetesdauer von vier und acht Wochen. Eine mögliche Erklärung dafür, könnten die bereits diskutierten Probleme bei der Anpassung an die mikrobielle Umgebung unserer experimentellen Haltung sein.

Neben den Mikrogliazellen, welche als mononukleärer Phagozyten über die Iba1-Färbung identifiziert und quantifiziert wurden, spielen bei dem Nachweis früher inflammatorischer Prozesse weitere retinale Gliazellen eine Rolle. Müllerzellen und Astrozyten reagieren auf Veränderungen innerhalb des retinalen Milieus mit einer erhöhten Expression von GFAP. Dieser neuroprotektive Mechanismus wird als Gliose bezeichnet^{119, 120} und sollte als weiterer früher proinflammatorischer Befund der DR in diesem Projekt untersucht werden.

Bei der erstmaligen Verwendung des Modells mit Tieren am MDC, wurden dahingehend Proben nach einer Diabetesdauer von vier bis fünf Wochen analysiert. Dabei konnte in Proben von Kontrolltieren und von diabetischen Tieren ein GFAP-Signal der Astrozyten nachgewiesen werden, die Müllerzellen zeigten jedoch nur durch den induzierten Diabetes eine anti-GFAP-Reaktivität¹.

Bei meiner diskutierten Wiederholung konnten bei der Analyse von Proben nach zwei, vier und acht Wochen Diabetes in beiden Gruppen sowohl GFAP-Signale von Astrozyten als auch von Müllerzellen festgestellt werden. Nach einer Experimentdauer von zwei Wochen, wirkten diese Signale in der Gruppe der diabetischen Tiere qualitativ stärker, als bei den nicht-diabetischen Kontrolltieren (Abbildung 8 A) und schien nach vier und acht Wochen Diabetes schwächer zu sein, während die GFAP-Signale bei den Kontrolltieren dieser beiden Zeiträume eher vermehrt auftraten (Abbildung 8 B).

Im Gegensatz zu den Flatmount-Präparaten (in denen mononukleäre Phagozyten mit Iba1 gefärbt und ausgewertet wurden), stammten bei den Sagittalschnitten nicht alle Präparate der transgenen TetO-Tiere aus der Ursprungszucht vom MDC. Die Proben der zwei Wochen Kohorte (in denen das GFAP Signal am höchsten schien) stammten von Tieren aus der neuen Zucht, die bei JANVIER LABS aufgezogen wurde. Zudem wurden sie, zeitgleich mit den Kontrolltieren, in die Haltung des CVKs importiert, als bereits ein vermehrtes Auskommen an opportunistischen Bakterien nachgewiesen wurde. Die Tiere waren also demselben Transportstress ausgesetzt und mussten sich ebenso wie die Kontrolltiere an die mikrobielle Umgebung der experimentellen Haltung neu anpassen. Bezüglich der pathologischen Merkmale einer DR kann zwischen den verschiedenen, nicht experimentell beabsichtigten, Einflussfaktoren kaum eine valide Aussage getroffen werden. Nichtsdestotrotz sieht es so aus, als wäre in dieser Gruppe der diabetische Zustand, der als einziger zusätzlicher (extrinsisch induzierter) Einfluss auf die TetO-Tiere gewirkt hat, ursächlich für die erhöhte GFAP-Expression der Astrozyten und Müllerzellen. Die Proben der TetO-Tiere die vier und acht Wochen diabetisch waren (und eine geringere GFAP-Expression durch Astrozyten und Müllerzellen aufwiesen), stammten aus der Ursprungszucht vom MDC. Sie mussten nur einen kurzen Transportweg innerhalb von Berlin zurück legen und waren zuvor am MDC unter vergleichbaren hygienischen Standards gehalten worden. Darüber hinaus waren sie zu Projektbeginn (Mai 2019) am CVK untergebracht, lange bevor im Haltungsbereich Blutspuren festgestellt wurden. Die Kontrolltiere, mit denen sie verglichen wurden und bei denen das GFAP-Signal mit der experimentellen Haltungsdauer zuzunehmen schien, stammten dagegen aus der kommerziellen Zucht aus Frankreich und wurden überwiegend in den Haltungsbereich importiert, als das Problem mit experimentell unabhängig erkrankten Tieren bereits bestand (Oktober 2020).

Eine anhaltende reaktive Gliose hat neben neurodegenerativen auch gefäßschädigende Auswirkungen, da Gliazellen neben ihrer neuroprotektiven Funktion auch von entscheidender Bedeutung für die Integrität der inneren Blut-Retina-Barriere sind. Denn Astrozyten und Müllerzellen, die mit ihren Endfußfortsätzen die retinalen Gefäße umgeben, bilden zusammen mit Perizyten und Endothelzellen funktionell die neurovaskuläre Einheit. Hier interagieren sie mit Perizyten und beeinflussen die Struktur und Funktion von Endothelzellen. Sie reagieren auf Änderungen des Sauerstoffgehaltes und können eine Vasokonstriktion oder auch eine Vasodilatation bewirken. Zudem wirken sie als Initiatoren inflammatorischer Kaskaden und können durch die Expression proinflammatorischer Zytokine und angiogener Faktoren wie VEGF eine pathologische Gefäßleckage induzieren¹²¹.

In diesem Zusammenhang deutet das vorhandene Probenmaterial darauf hin, dass Gliazellen bei den Änderungen der Gefäßmorphologie involviert sein könnten (Abbildung 8 B). In den Sagittalschnitten der Augen von SD-Kontrolltieren und diabetischen TetO-Tieren aller Untersuchungszeiträume, fand ich innerhalb der GCL Gefäße mit auffällig großem Kaliber (Abbildung 8 B und Abbildung 9), so wie sie unter hypoxischen Zuständen oder Bluthochdruck beobachtet werden können^{122, 123}. In den Proben, in denen solche Gefäße angeschnitten waren und immunhistochemisch mit anti-GFAP gefärbt wurden, waren die großkalibrigen Gefäße der Kontrolltiere umgeben von GFAP-positiven Zellen. Ein Phänomen, welches ich in der GCL der diabetischen TetO-Tiere nicht beobachten konnte (Abbildung 8 B und Abbildung 9). In HE gefärbten Sagittalschnitten, in denen die großkalibrigen Gefäße innerhalb der GCL ebenfalls sichtbar waren, dokumentiert ich des Weiteren Gefäße, die über die GCL hinauswuchsen (Abbildung 10). Derartige Gefäßstrukturen innerhalb des Glaskörpers hatten sich häufiger über dem Sehnerv von SD-Kontrolltieren gebildet, waren jedoch auch in einigen Proben von TetO-Tieren auszumachen. In dem Bereich, in dem die Gefäße über die Retinae hinauswuchsen, verläuft, während der Embryonalphase, die Arteria hyaloidea, welche die Versorgung der Linse und des Glaskörpers sichert. Bei Ratten bilden sich diese hyaloiden Gefäße postnatal zurück. Es wurde gezeigt, dass es bei ihnen zwischen dem zehnten und zwanzigsten postnatalen Tag zu einer steigenden Anzahl von Makrophagen und zu einer verstärkten Apoptose im Bereich des Restgefäßes kommt¹²⁴. Es konnte keine Literatur darüber gefunden werden, wieviel von der Arteria hyaloidea bei dreizehn bis zwanzig Wochen alten Ratten im natürlichen Zustand noch sichtbar ist. Allerdings wurde im Modell einer Hypoxie-bedingten Retinopathie nachgewiesen, dass die Rückbildung des Restgefäßes durch Hypoxie verzögert wird und dass persistierende hyaloide Gefäßsysteme mit einer Verzögerung der zugrundeliegenden retinalen Gefäßentwicklung einhergehen¹²⁵. Eine erhöhte Persistenz der Hyaloidarterie konnte ebenfalls infolge eines Netrin 4 Knockouts in Mäusen beobachtet werden. Die Unterbindung der endothelialen Expression dieses extrazellulären Matrixmoleküls wurde in Netrin4-ko-Mäusen von Gefäßleckagen und Torsionen sowie einer erhöhten Anzahl amöboider mononukleärer Phagozyten begleitet¹²⁶. Im Zusammenhang mit den Befunden der Sektionen, die Blutungen im Lungengewebe zeigten (Abbildung 4), sei angemerkt, dass angiogene Prozesse in der Retina auch infolge systemischer Hypoxie durch Lungenerkrankungen auftreten können¹²⁷. Da die TetO-Tiere aus der Zucht vom MDC zu keinem Zeitpunkt Auffälligkeiten des Respirationstraktes zeigten, jedoch auch in diesen Proben extraretinale Gefäße vorzufinden waren, scheint eine systemische Hypoxie als Auslöser für die mutmaßliche Angiogenese der retinalen Gefäße eher unwahrscheinlich.

Einen weiteren Befund, den ich im Zusammenhang mit den Gefäßpathologien anhand der HE gefärbten Sagittalschnitte machte, waren Erythrozyten-Konglomerate innerhalb retinaler Gefäße sowie Ansammlungen ausgetretener Erythrozyten im retinalen Gewebe bei SD-Kontrolltieren und diabetischer TetO-Tiere. Ob es sich dabei tatsächlich um Gefäßverschlüsse gehandelt hat, kann nicht sichergestellt werden. Eine erhöhte Bildung von Thromben könnte allerdings bei der Verursachung von ischämischen und hypoxischen Zuständen eine Rolle gespielt haben.

Die Gefäßmorphologie begutachtete ich, neben der Begutachtung von Sagittalschnitten, auch qualitativ anhand Isolectin-gefärbter Flatmount-Präparate. Dabei wurde sichtbar, dass sich die Gefäße des tiefen mikrovaskulären Plexus bei SD-Kontrolltieren und diabetischen TetO-Tieren voneinander unterschieden. Diese Gefäße, welche die INL versorgen, schienen in den Proben der Kontrolltiere einen geringeren Durchmesser aufzuweisen als die Gefäße aus der entsprechenden Ebene bei diabetischen TetO-Tieren (Abbildung 12). Im Gegensatz zu der starken Dilatation der Gefäße innerhalb der GCL (Abbildung 8 und 9), ist bei dem Kaliberunterschied innerhalb des tiefen mikrovaskulären Plexus jedoch schwer auszumachen, ob es sich hierbei um eine Gefäßdegeneration bei den Kontrolltieren oder eine Gefäßdilatation bei den diabetischen Tieren handelt. Um dies eindeutig zu beantworten, wären Proben von nachweislich gesunden Tieren und weitere immunhistochemische Färbungen erforderlich (beispielsweise mit dem Perizytenmarker NG2 (neurales/gliales Antigen 2), einen spezifischen Marker für Gefäßdifferenzierung wie CD31 (cluster of differentiation 31) oder durch die Färbung apoptotischer Endothelzellen über Propidiumiodid).

Bei den Kontrolltieren war nicht nur zu beobachten, dass erweiterte Gefäße innerhalb der GCL von aktivierten (GFAP-positiven) Müllerzellen und Astrozyten umgeben waren (Abbildung 8 B), in den Flatmount-Präparaten ließen sich auch deutlich mehr aktivierte Mikrogliazellen nachweisen (Abbildung 6 B und Abbildung 7). Diese, bei den Kontrolltieren ebenfalls vermehrt in aktiviertem Zustand befindlichen Gliazellen, sind (wie Müllerzellen und Astrozyten) ebenfalls in der Lage vasoaktive und proinflammatorische Faktoren zu sezernieren^{121, 128}. Ein Zusammenhang zwischen den aktivierten Gliazellen und den Gefäßpathologien könnte demnach insbesondere bei den Kontrolltieren vorliegen. Als Bestandteil der neurovaskulären Einheit, könnte eine gesteigerte Aktivierung dieser Zellen zudem bei der Bildung von Hämorrhagien im retinalen Gewebe bei SD-Kontrolltieren und diabetischen TetO-Tieren eine Rolle gespielt haben (Abbildung 11).

Das Hauptziel meines Projektes bestand darin, in dem TetO-Modell erstmals die Rolle von Nox4 bei DR näher zu erforschen. Eine gesteigerte Expression von Nox4 und erhöhter oxidativer Stress sind jedoch nicht ausschließlich mit geänderten Stoffwechselwegen unter Hyperglykämie assoziiert. Auch proinflammatorische Zytokine sind an der Regulation von Nox4 beteiligt. Zudem fungiert die gesteigerte Expression von Nox4 als zellulärer Mechanismus zur bakteriellen Clearance¹¹⁵.

Meine Messung von Nox4 im ELISA Assay zeigte keinen wesentlichen Unterschied zwischen den Retinae-Proben von diabetischen TetO-Tieren und nicht-diabetischen SD-Kontrolltieren (Abbildung 24 und 25). Bei der Messung nach zwei Wochen, unterscheidet sich der Median der Nox4-Menge von diabetischen TetO-Tieren und SD-Kontrolltieren am geringsten. In den vier und acht Wochen Untersuchungsgruppen, zeichnete sich bei den Kontrolltieren eine höhere Konzentration als bei den TetO-Tieren ab. Diese Erhöhung im Vergleich zu den TetO-Tieren war in der vier Wochen Gruppe am größten.

Betrachtet man die Herkunft der Proben, fügen sich die Ergebnisse in das Gesamtbild. Denn für die Messung von Nox4 mittels ELISA, kamen für die Kontrollgruppen Proben von Tieren zum Einsatz, die aus denselben Kohorten stammten, wie die Tiere der verwendeten Sagittalschnitte und Flatmount-Präparate. Gleiches galt für die Proben der TetO-Tiere, welche zwei Wochen diabetisch waren. Die Proben der vier und acht Wochen diabetischen Gruppen, stammten hingegen aus Kohorten, die erst im späteren Projektverlauf gehalten wurden (im Unterschied zu den verwendeten Proben für Analysen im Sagittalschnitt). Demnach herrschten für die Tiere, von denen das Probenmaterial für die Nox4-Messung stammte, ebenfalls in dem zweiwöchigen Untersuchungszeitraums die ähnlichsten Bedingungen (TetO- und SD-Tiere wurden 2021 von JANVIER LABS importiert). Die Hyperglykämie, als zusätzlich wirkender Faktor, zeigt nach zwei Wochen keine zusätzlich steigernde Wirkung auf die Nox4-Konzentration bei diabetischen TetO-Tiere. In den Gruppen, in denen eine höhere Nox4-Konzentration in den Kontrollproben gegenüber den diabetischen Proben gemessen wurden, stammten die Proben der diabetischen TetO-Tiere aus der Zucht vom MDC. Sie mussten keinen langen Transportweg zurück legen und stammten aus einer experimentellen Haltung, von der bekannt ist, dass dort ein mit unserer Haltung vergleichbarer hygienischer Standard herrscht. In den Proben dieser Tiere ist die Nox4 Konzentrationen trotz vier und achtwöchiger Diabetesdauer im Median geringer, als bei Tieren aus der Zucht von JANVIER LABS, welche nicht diabetisch waren (oder, im Fall der TetO-Tiere, zwei Wochen diabetisch gehalten wurden). Das ist ein weiteres Indiz dafür, dass es den TetO-Tieren aus der Zucht vom MDC

immunologisch keine Probleme bereitete, adäquat auf opportunistische Bakterien in unserer Haltung zu reagieren. Dies wird durch die Tatsache bekräftigt, dass JANVIER LABS die Tiere zeitgleich in demselben Haltungsraum standen, wie die Tiere aus der Zucht von JANVIER LABS, bei denen schwere Organschäden nachgewiesen wurden, welche mit einer infektiösen Belastung opportunistischer Bakterien assoziiert war.

Für die immunhistochemische Färbung von Nox4 im Sagittalschnitt, setzte ich Schnitte derselben Proben ein, wie für die Färbung von GFAP und die Auswertung degenerativer Prozesse. Diese Proben stammten größtenteils von Tieren aus denselben Kohorten, aus denen auch die Proben für die ELISA-Messung verwendet wurden. Die stärkste Nox4-Expression zeigte sich im Zytoplasma von Ganglienzellen (Abbildung 26), gefolgt von einer starken Expression in der INL (Abbildung 27). Meine qualitative Beurteilung der Intensität dieser Färbungen, spiegelten das Ergebnis wider, welches sich in der Nox4-Konzentrationsmessung im ELISA Assay abzeichnete (Abbildung 24, 25 und 27 sowie Tabelle 9). Das Ergebnis der zwei Wochen diabetischen TetO-Tieren und der entsprechenden Kontrolltiere, schien auch hier die größte Übereinstimmung zu zeigen, wohingegen die Färbung in den Gruppen der vier und acht Wochen diabetischen Tiere schwächer ausfiel, als in den Kontrollgruppen (Tabelle 9).

Durch frühere Arbeiten konnten gezeigt werden, dass Nox4 beispielsweise im *db/db* Mausmodell hochreguliert und mit einem erhöhten Level an ROS und VEGF assoziiert ist. So bewirkte die Hemmung von Nox4 eine Reduktion der ROS und VEGF Level und reduzierte die vaskuläre Permeabilität bei entsprechender Behandlung von *db/db* Mäusen¹²⁹. Doch wie bereits erwähnt¹¹⁵, ist eine erhöhte Expression von Nox4 kein Mechanismus, der ausschließlich durch Diabetes induziert werden kann. Auf die verwendeten Versuchstiere wirkten weitere Faktoren, die an der Regulation von Nox4 beteiligt sind, sodass sich keine Aussage treffen lässt wodurch die Nox4 Expression am stärksten beeinflusst wurde. Da die genaue Beteiligung von Nox4 an der Pathogenese einer DR noch nicht vollständig erforscht ist, kann man zu diesem Zeitpunkt nicht ausschließen, dass sich die ausbleibende Erhöhung von Nox4, in den Proben diabetischer TetO-Tiere gegenüber den verwendeten SD-Kontrolltieren, möglicherweise sogar auf eine untergeordnete Bedeutung von Nox4 bei DR zurückführen lässt.

Um in meiner Arbeit zu prüfen, ob die von Nox4 abgeleiteten ROS quantitativ und räumlich mit den Zellen der höchsten Nox4-Expression korrelieren, wurden ROS mit DHE in Cryoschnitten gefärbt. Die TetO-Tiere kamen vom MDC und die Kontrolltiere von JANVIER LABS. In beiden Gruppen stammten 60% der Proben von Tieren, welche in dem Zeitraum gehalten wurden, der nach dem ersten Nachweis des vermehrten Aufkommens von

Opportunisten lag. Entsprechend der Ergebnisse, die aus diesen Proben durch andere Methoden generiert wurden, zeigte sich auch bei der Intensitätsmessung der Färbung von ROS ein geringerer Wert bei den vier Wochen diabetischen TetO-Tieren ab, welche aus der Zucht vom MDC und nicht von JANVIER LABS stammten (Abbildung 28 und 29). Eine Kolo-kalisation der erhöhten ROS mit der erhöhten Expression von Nox4 konnte in den Cryoschnitten nicht beurteilt werden (Abbildung 27 und 29).

Retinaler Zelltod, durch Hyperglykämie bedingte inflammatorische und oxidative Prozesse, ist ein weiteres Merkmal welches sich in Tiermodellen der DR nachahmen lässt und auch im TetO-Modell nachgewiesen werden konnte. So wiesen in dem Versuch bis 2017 die Retinae-Proben von TetO-Ratten (die vier bis fünf Wochen diabetisch waren) im Vergleich zu nicht-diabetischen Kontrolltieren, eine signifikant geringere Zahl an Ganglienzellen auf¹.

Bei der wiederholten Nutzung des TetO-Modells sollte, auf Basis dieses stationären Befundes, die vulnerable Phase des Zellverlustes zusätzlich durch ein Apoptose Assay eingegrenzt werden. Meine Auswertung der Anzahl apoptotischer Signale nach zwei Wochen zeigte, dem Modell entsprechend, bei den diabetischen TetO-Tieren mehr apoptotische Ganglienzellen und mehr apoptotische Zellen innerhalb der INL und ONL (Abbildung 17 A).

Da ich für die Analyse der apoptotischen Zellen Sagittalschnitte derselben Proben verwendete, die für die Analyse der GFAP-Expression von Astrozyten und Müllerzellen und der Nox4-Expression eingesetzt wurden, sind Schlussfolgerungen bezüglich experiment unabhängiger Einflussfaktoren (durch das Zusammenspiel von Transport, mikrobiellen und physikalischen Umwelteinflüssen) auch hier naheliegend. Ebenso wie bei der Intensität GFAP- und Nox4-positiver Zellen, war auch hier der Diabetes einziger und somit wahrscheinlich ursächlicher Unterschied zwischen diabetischen Tieren und SD-Kontrolltieren der zweiwöchigen Untersuchungsgruppe. Anders in den Gruppen der vier und acht Wochen Untersuchungszeiträume. Hier stammten die Proben der Diabetes-Gruppe wiederum aus der Ursprungszucht vom MDC und wurde vor dem Nachweis erhöhter Belastung durch Opportunisten an der Charité gehalten (Mai 2019), wohingegen die SD-Kontrolltiere von JANVIER LABS importiert wurden und überwiegend der ungeklärten mikrobiellen Situation im Haltungsbereich ausgesetzt waren. Der Analyse apoptotischer Zellen zufolge, scheint es dadurch vor allem für die vier Wochen Kontrollgruppe zu einer erhöhten Belastung gekommen zu sein. Die TUNEL-Signale sind in dieser Gruppe in allen drei Zellebenen (GCL, INL und ONL) gut doppelt so hoch wie in den anderen beiden Kontrollgruppen, sodass es für den

vierwöchigen Zeitraum keinen eindeutigen Unterschied zu den diabetischen Tieren gibt (Abbildung 16 und 17 A bis C).

Da mit der TUNEL-Analyse jedoch nur Zellen detektiert werden können, die sich zum Zeitpunkt der Präparatfixierung in Apoptose befanden, handelt es sich dabei um eine Momentaufnahme. Bereits manifestierter Zellverlust wurde aufgrunddessen zusätzlich in HE gefärbten Sagittalschnitten untersucht. In den dafür analysierten vier und acht Wochen Gruppen zeigt sich bei den Kontrolltieren in der GCL und der ONL eine ähnlich geringe Zelldichte wie bei den diabetischen Tieren (Abbildung 18 bis 20). Tendenziell war der Zellverlust in den Kontrollgruppen sogar höher. Für die Ganglienzellen ergab sich ein Unterschied von immerhin 11% weniger Zellen im Sagittalschnitt von nicht-diabetischen Kontrolltieren, verglichen mit acht Wochen diabetischen TetO-Tieren (Abbildung 19); was auf die gesamte Retina hochgerechnet einen wesentlichen Verlust bedeutet.

Wie bereits bei der Beschreibung vaskulärer Pathologien erwähnt, unterschieden sich die mikrovaskulären Gefäße im tiefen Plexus der SD-Kontrolltiere von denen der diabetischen TetO-Tiere im Durchmesser (Abbildung 12). Dieser, nicht quantifizierte, qualitative Befund aus den Flatmount-Präparaten, könnte ein weiterer Hinweis auf retinal degenerative Veränderungen sein. Verglichen mit den Proben der TetO-Tiere, wirkten die Gefäße bei den SD-Kontrolltieren der vier und acht Wochen Untersuchungszeiträume einen auffällig schmaleren Durchmesser zu haben. In den Proben der TetO-Tiere konnte ein vergleichbar geringer Gefäßdurchmesser im tiefen Gefäßplexus nur vereinzelt und erst nach achtwöchiger Diabetesdauer ausgemacht werden. Da es sich hierbei jedoch um einen Zufallsbefund handelt, fehlt eine spezifische Färbung die einen zugrundeliegenden Perizyten- und Endothelzellverlust hätte verifizieren können (sinnvoll wäre hierfür die Färbung mit dem Perizytenmarker NG2 oder die Färbung apoptotischer Endothelzellen über Propidiumiodid).

Einen weiteren Zufallsbefund lieferten die Sagittalschnitte, die für die verschiedenen immunhistochemischen Färbungen verwendet wurden. Hier konnte ich in den Präparaten von Kontrolltieren besonders viele Stellen ausmachen, in denen sich zwischen den Photorezeptor-Außensegmenten runde Löcher gebildet hatten (Abbildung 21). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen, ist die Vacuolisierung von Membranlipiden, wenn es zu einer vermehrten Degeneration von Photorezeptor-Außensegmenten kommt.

Die Ergebnisse der Beurteilung von degenerativen Merkmalen, fügt sich in den Kontext der bisher diskutierten Ergebnisse und steht im Einklang mit dem Wissenstand über das Zusammenspiel inflammatorischer, oxidativer und apoptotischer Prozesse.

Ein weiterer Faktor, der bei den Kontrolltieren zu einer stärkeren Akzentuierung der Faktoren beigetragen hat, die zu einer Retinadegeneration geführt haben, könnte der geringere Schutz vor hellem Licht gewesen sein. Denn wie bereits geschildert, lag die einwirkende Lichtintensität im Haltungsbereich über dem empfohlenen Wert und es ist bekannt, dass Albinotiere wegen fehlender Pigmentierung (auch im Referenzbereich) zusätzlich vor Licht geschützt werden müssen. Da die Verabreichung von Doxycyclin die Unterbringung in IVC-Käfigen oder im Scantainer erforderte, waren die diabetischen Tiere unbeabsichtigt besser vor Licht geschützt. Erhöhter Zellverlust durch erhöhten photooxidativen Stress bei den Kontrollgruppen wäre denkbar, da sie (aus Platzgründen) nahezu über die gesamte experimentelle Dauer im offenen Regal standen. Meinen Messungen zufolge waren sie dadurch, je nach Regalposition, der Raumbeleuchtung von 380 – 800 Lux ausgesetzt.

In Präferenz- und Vermeidungstests wurde gezeigt, dass Albinoratten schon Bereiche ab einer Helligkeit von 25 Lux meiden. Hohe Lichtintensitäten schränken ihre Aktivitätsmuster ein und bedeuten demzufolge Stress für die Tiere. Für Lichtintensitäten über 60 Lux, wurden schädigende Auswirkungen auf die Retinae von Albinoratten nachgewiesen^{130, 131}.

Allerdings scheint bei der Frage nach dem Grenzwert der Lichtintensität, die einen Schaden hervorrufen kann, entscheidend zu sein, unter welchen Lichtverhältnissen die Ratten aufwachsen¹³². Ein Argument, das dafürspricht, die experimentellen Bedingungen aller experimentellen Gruppen von der Geburt bis zum experimentellen Ende gleich zu halten. Um zu beurteilen, ob und in welchem Ausmaß sich dieser systematische Unterschied zwischen den diabetischen Tieren und den entsprechenden Kontrolltieren ausgewirkt hat, wären vor allem zusätzliche Informationen über die Beleuchtungssituation bei JANVIER LABS erforderlich. Sollten die Tiere im Zuchtbereich bei JANVIER LABS besser vor Licht geschützt aufgezogen worden sein, ist durch den Wechsel in einen helleren Haltungsbereich von einem größeren Schaden auszugehen, als wenn die Tiere seit ihrer Geburt hellem Licht ausgesetzt waren.

6.3 Genetisch bedingte Pathologien

Die transgene TetO-Rattenlinie wurde 2009 am MDC generiert und wird seitdem in diesem Zuchtbereich geführt. Dabei verbleiben die Zuchttiere des Stammes bis zu einem Alter von sechs Monaten im Haltungsbereich. Meinen Recherchen zufolge gab es dabei seit Bestehen der Linie, bis heute (Dezember 2022), kein Tier, bei dem ein Tumor aufgefallen ist. Wie ich jedoch im Nachhinein (über die Charité interne Datenbank PyRat) feststellen konnte, entwickelten die Jungtiere der TetO-Linie nach dem Embryotransfer, in der Zucht der FEM, überdurchschnittlich häufig Tumore (mit einer Häufigkeit von mindestens 7,5%, was, laut dem

Tierschutzbeauftragten, über der festgelegten Grenze liegt). Im Zuchtbereich der FEM blieb diese Häufigkeit allerdings unbemerkt und so wurde, auch auf Rückfrage, über keine Auffälligkeiten berichtet. Andernfalls hätte sich aus diesem gehäuften Auftreten von Tumoren schon 2019 ein erster Hinweis auf einen Gendrift ableiten lassen.

Aus Studien wie der Datenanalyse zu spontanen Neoplasien bei Kontroll-Versuchstieren von BASF ist bekannt, dass Auszuchtstämme wie SD-Ratten (die den genetischen Hintergrund der TetO-Linie bildeten) anfällig für einen sogenannten Tumordrift sind und es dadurch innerhalb dieser Stämme zu einer steigenden genetisch bedingte Tumorprädisposition kommen kann⁵⁰.

Wie sich die Häufigkeit des Auftretens von Tumoren innerhalb der TetO-Linie entwickelte, als aus einigen der TetO-Tiere vom FEM bei JANVIER LABS ein neuer Substamm aufgebaut wurden, lässt sich rückblickend nicht mehr nachverfolgen. Allerdings konnte ich feststellen, dass die TetO-Tiere, die aus der Zucht bei JANVIER LABS hervorgingen, ein deutlich nervöseres Verhalten zeigten. Sie waren auffallend ängstlich und schreckhaft, was das Handling im Versuch erschwerte. Dass diese Änderung des Phänotyps stressbedingt durch den Transport induziert wurde, kann ich mit großer Wahrscheinlichkeit ausschließen, da die importierten SD-Tiere aus derselben Zuchtanlage diese Auffälligkeit nicht zeigten, obwohl sie zeitgleich denselben Weg zurückgelegt hatten. Dass ein geändertes Angstverhalten genetisch bedingt und somit ein Hinweis auf einen Gendrift innerhalb eines Stammes sein kann, darauf verweist der Ausschuss für Genetik und Labortierzucht der GV-SOLAS. Neben genetischer Kontamination und differenzieller Fixierung residualer heterozygoter Gene, kann hier eine spontane Mutation im Genom inzüchtiger Stämme vorliegen.⁴³ Der Fachinformation über Substämme von Inzuchtstämmen, die der Ausschuss für Genetik und Labortierzucht veröffentlicht hat, ist darüber hinaus zu entnehmen, dass es nicht selten vorkommt, dass *„verschiedene Mutationen unter Vernachlässigung der Stamm- oder Substammzugehörigkeit der Ausgangsvarianten in einer Linie zusammengekreuzt werden, sodass die neu entstehenden Mehrfach-Mutanten über keinen definierten und standardisierten genetischen Hintergrund mehr verfügen.“* In diesem Zusammenhang wird deshalb auf die enorme Wichtigkeit einer korrekten Stamm- und Substamm-Nomenklatur sowie einer akkuraten Zuchtdokumentation hingewiesen⁴⁴. Für die verwendete TetO-Linie und deren Substämme kann ich diesbezüglich weder in PyRat, noch in den vorliegenden Dokumenten eine entsprechende Änderung der Nomenklatur feststellen (für die Linie wurde sowohl nach dem Embryotransfer, als auch nach der Umsiedlung zu JANVIER LABS und der späteren Rückkreuzung auf einen neuen SD-Substamm durchgehend der Name der Ursprungszucht vom MDC verwendet).

Okulär wiesen die Versuchstiere verschiedene Anomalitäten auf, die sich nur schwer durch den induzierten Diabetes, durch eine erhöhte bakterielle Belastung oder als Präparationsartefakt erklären lassen. So tauchten in den Sagittalschnitten von den SD-Kontrolltieren und den diabetischen TetO-Tieren auffällig häufig Stellen mit einer desorganisierten Struktur der nukleären Schichten auf (Abbildung 22). Auch ohne eine statistische Auswertung, wurde deutlich, dass diese Anomalien mit einer überdurchschnittlichen Häufigkeit auftraten. Da es sich bei SD-Ratten auch um die meistverwendete Linie handelt, die als Kontrolltiere für Toxizitätsstudien eingesetzt wird, ist aus Erhebungen bei tausenden SD-Tiere die Inzidenz bekannt, mit der spontane mikroskopische Läsionen in den Augen dieser Linie auftreten. Laut einem dazu veröffentlichten Übersichtsartikel von Charles River, treten nicht-neoplastische Hintergrundbefunde wie Falten oder Rosettenbildung der Retina bei SD-Ratten mit einer Inzidenz von 1,64% nur sehr selten auf¹³³. Eine nicht in dieser Arbeit enthaltene Studie kam zu dem Ergebnis, dass es bei SD-Weibchen am häufigsten zu solchen Missbildungen kommt. Aber auch hier traten Auffälligkeiten wie Falten oder Rosettenbildung der Retina nur mit einer maximalen Häufigkeit von 2,7% auf¹³⁴.

Für die verschiedenen immunhistochemischen Färbungen innerhalb des Projektes wurden von mir insgesamt nur 30 Augen verwendet. Zudem habe ich pro Tier nur eines der beiden Augen als Sagittalschnitt begutachtet. Trotzdem häuften sich Ansammlungen ektopter Zellen und andere Missbildungen der Zellkernebenen, die (wenn man von einer maximal 2,7%igen Inzidenz ausgeht) bei der Untersuchung beider Augen von insgesamt mindestens 37 Tieren, höchstens einmal hätten auffällig werden dürfen.

Wodurch es zu dem gehäuften Auftreten solcher Netzhautdysplasien kam, konnte nicht geklärt werden. Der Proliferationsmarker Ki67 ließ sich in den betroffenen Arealen nicht nachweisen, was gegen neoplastische Veränderungen spricht. Auch konnte ich in den betroffenen Arealen keine erhöhte Apoptose im TUNEL Assay beobachten. GFAP gefärbte Sagittalschnitte lieferten allerdings Hinweise darauf, dass eine Migration GFAP-positiver Zellen innerhalb dieser Bereiche stattgefunden hatte. In den Zufallsbefunden, in denen ich so etwas beobachten konnte, zeigten sich überzählige Zellebenen über und unterhalb der ONL und stark verkürzte Photorezeptor-Außensegmente (Abbildung 22). Anhand der Ausschnitte dieser Färbungen war für mich schwer zu beurteilen, ob es, unter Umständen bedingt durch die ektopten Zellen, in diesen Arealen zu einer Netzhautablösung gekommen war. Die, nur noch als Fragmente vorhandenen, Photorezeptor-Außensegmente erinnerten jedoch stark an histologische Bilder solcher Befunde¹³⁵⁻¹³⁷. Es wäre möglich, dass es sich bei den GFAP-positiven Zellen um

Müllerzellen handelte, welche auf die starke Schädigung der Photorezeptor-Außensegmente reagierten¹³⁸. Bezüglich auslösender Faktoren ließen sich in der Literatur wenige Anhaltspunkte finden. Es gibt Mauslinien (wie beispielsweise die *rd7* mutierte Linie), bei denen ähnliche Befund als vererbbarer genetischer Defekt auftreten können und bei Ratten ließen sich derartige Veränderungen durch Nährstoffmangel während der fötalen Periode oder durch perinatale Verabreichung von Toxinen induzieren. In den meisten Fällen bleibt die Ursache für derartige Netzhautdysplasien jedoch unbekannt¹³⁹.

Neben der Auflösung der physiologischen Struktur der retinalen Zellkernebenen bei SD- und TetO-Tieren, konnte ich in den Proben der TetO-Tiere vereinzelt tumorähnliche Auftreibungen der GCL feststellen, in denen Gefäße ausgemacht werden konnten (Abbildung 23). Zudem zeigten einige Flatmount-Präparaten der TetO-Tiere, korrelierend mit den Gefäßen des oberen Gefäßplexus, in der Ebene der GCL, signalintensive Aggregate der Isolectin-Färbung (Abbildung 13). Zu dem Zeitpunkt, als ich diese Zufallsbefunde machte, waren bereits alle Sagittalschnitte dieser Areale anderweitig verbraucht, sodass ich keine dieser Anomalitäten auf den Proliferationsmarker Ki67 testen konnte.

Wie bereits erwähnt, stellte ich bei der TetO-Linie, für die dokumentierte Zeit nach dem Embryotransfer, eine erhöhte Tumorrage fest. Ob die Befunde aus den Sagittalschnitten in Verbindung mit denen der Flatmount-Präparate stehen und ob es sich bei diesen retinalen Befunden ebenfalls um Tumore handelt, konnte ich abschließend nicht eindeutig klären. Es lassen sich keine Modelle mit Beschreibungen derartigen Änderungen der GCL finden. Aus der Klinik beschriebene Tumore, wie beispielsweise Hamartome, können allerdings die Gefäße oder das Gliagewebe der Retina betreffen¹⁴⁰. Hier lassen sich Fallberichte finden, in denen die Läsionen in der Bildgebung optischer Kohärenztomografien Ähnlichkeiten aufweisen¹⁴¹⁻¹⁴⁵.

Da die Anomalien der GCL von mir nur in den Proben der diabetischen TetO-Tiere ausgemacht werden konnten, wäre eine weitere mögliche Erklärung, dass es sich dabei um sogenannte Cotton-wool Spots handelt. Ihr Name leitet sich von watteartigen Verschattungen des Fundus ab, die häufig bei Menschen mit Diabetes oder Bluthochdruck diagnostiziert werden können. Ursache isolierter Cotton-wool Spots ist eine Ischämie der Nervenfaserschicht, nachdem die Durchblutung der INL durch einen akuten fokalen Verschluss einer retinalen Arteriole gestört wurde.^{146, 147} Wie ich im vorherigen Kapitel beschrieben habe, ließen sich in den Proben diverse pathologische Veränderungen des retinalen Gefäßsystems finden, welche auch eine Ischämie der Nervenfaserschicht hervorgerufen haben könnten. Für Cotton-wool Spots im Tiermodell lassen sich (genau wie für Hamartome) keine Beschreibung finden. Verfügbar sind hier

histopathologischen Bilder aus Sagittalschnitten von humanen Proben, welche Ähnlichkeit mit den Befunden aus den diabetischen TetO-Tieren aufweisen¹⁴⁸⁻¹⁵¹. Cotton-wool Spots sind in der Klinik ein mögliches Symptom der frühen DR, welches nach spontaner Auflösung atrophes Gewebe hinterlässt¹⁴⁷. Die Befunde möglicher Cotton-wool Spots aus dem Projekt, stammen von zwei und vier Wochen lang diabetisch gehaltenen TetO-Tieren. Dabei handelte es sich um die Untersuchungszeitpunkte, welche als Modell der frühen DR in diesem Projekt neu gewählt wurden. Als die diabetischen TetO-Tiere erstmals als Modell der DR eingesetzt und nach vier bis fünf Wochen Diabetes untersucht wurden, ließen sich solche Veränderungen der GCL nicht nachweisen. Es wurde festgestellt, dass die Anzahl der GC signifikant reduziert war. Darüber hinaus wiesen die TetO-Tiere signifikant mehr stenotische Gefäße und markante Venen mit abnormal großem Gefäßkaliber im tiefen mikrovaskulären Plexus auf¹. Diese pathologischen Merkmale der Gefäßmorphologie und atrophen Veränderungen der GCL, könnten im Zusammenhang mit einer fortgeschrittenen Pathologie zurückgebildeter Cotton-wool Spots stehen, die sich nur zu den Untersuchungszeitpunkten einer frühen DR nachweisen ließen.

7 Zusammenfassung

Der Ausgangspunkt meiner Arbeit war ein Projekt, das einen Teilaspekt der Pathomechanismen im Anfangsstadium der DR aufklären sollte. Die Haupthypothese lautete, dass die Stoffwechsellage des Typ 2 Diabetes bei retinalen Zellen die erhöhte Expression von Nox4 induziert. Für die Testung der Hypothese sollte untersucht werden, ob ein Anstieg der Nox4 Aktivität den pathologischen Veränderungen einer DR vorangeht und somit die Pathogenese verursacht.

Als Modell des Typ 2 Diabetes dienten transgene TetO-Ratten. Dass sich dieses Modell für Untersuchungen der DR eignet, wurde gut sechs Jahre zuvor (2017) in einer engen Kooperation unserer AG und der AG Bader vom MDC gezeigt. Für diese Charakterisierung wurden damals die Augen von TetO-Ratten untersucht, welche aus der Zucht des MDCs stammten. Dafür wurden die Tiere am MDC gehalten und als Kontrollen gleichaltrige SD-Ratten verwendet, welche aus demselben Zuchtbereich stammten und dem genetischen Hintergrund der transgenen Rattenlinie entsprachen. Demzufolge verblieben bei dem Projekt alle Versuchstiere von der Geburt bis zum Exitus in demselben Haltungsbereich, bevor die Augen für die Untersuchungen an das CVK geholt wurden. Die Ergebnisse, die 2017 durch diese Kooperation publiziert werden konnten, sprachen dafür, dass es sich bei den TetO-Ratten um ein vielversprechendes neues Modell der DR handelt. Denn wie unsere AG damals nachweisen konnte, führte die Gabe von Doxycyclin auch in der Retina zu einem signifikanten Knockdown des Insulin-Rezeptors, wodurch sich nach vier bis fünf Wochen aufrechterhaltener Hyperglykämie, vaskuläre, inflammatorische und degenerative Symptome einer DR ausgeprägt hatten.

Die Vorzüge des Modells sollten genutzt werden, um nun die Rolle von Nox4 bei der Pathogenese einer DR zu erforschen. Für dieses Vorhaben wurde eine eigene TetO-Zucht aufgebaut. Dafür wurden aus der Gründerpopulation vom MDC, Tiere in den Quarantänebereich der Charité-internen Zucht der FEM transportiert. Nach der dortigen Verpaarung konnte, über den Embryotransfer von drei Nachkommen, eine neue Population im Zuchtbereich der FEM gegründet werden. Als sich diese neugegründete Kolonie noch in der Aufbauphase befand, wurden für die Versuche TetO-Ratten aus der Gründerpopulation vom MDC genutzt. Im zweiten Jahr des Projektes, konnten parallel auch Tiere aus der neuen TetO-Zucht des FEM abgerufen werden. Dies war jedoch nur für kurze Zeit möglich, da die Kolonie aufgrund von Baumaßnahmen zu JANVIER LABS nach Frankreich verlegt werden musste. Somit wurden über den Verlauf des Projektes TetO-Ratten aus drei unterschiedlichen

Zuchteinheiten genutzt. Als Wildtyp-Kontrollen wurden Tiere aus einem neuen SD-Substamm bezogen. Sie stammten nicht aus dem Substamm vom MDC, aus dem die TetO-Linie hervorging, sondern von JANVIER LABS und entsprachen demnach nicht mehr dem genetischen Hintergrund der TetO-Gründerpopulation.

Die Tiere mussten für die Versuche allesamt importiert werden. Hierbei gab es, durch die Nutzung verschiedener Zuchteinheiten, systematische Unterschiede zwischen den diabetischen TetO-Tieren und den SD-Kontrolltieren, welche sich auf die Versuche auswirkten. Denn während nur 18% der verwendeten TetO-Proben von Tieren aus der Zucht von JANVIER LABS in Frankreich stammten, wurden die Kontrolltiere zu 100% aus dieser Zucht importiert. Da JANVIER LABS zu den größten kommerziellen Zuchtbetrieben in Europa gehört, ist anzunehmen, dass in den Zuchtbereichen besonders hohe Hygienestandards eingehalten werden. Darauf deuten auch die Gesundheitszeugnisse hin, welche keinen einzigen positiven Befund aufweisen. (Die Gesundheitszeugnisse unserer Versuchstiere können auf Rückfrage hin eingesehen werden.) Bei dem Zuchtbereich am MDC handelt es sich hingegen um einen experimentellen Zuchtbereich, welcher ähnliche Hygienestandards aufweist, wie unser experimenteller Haltungsbereich. Demnach dürfte es für die Tiere von JANVIER LABS eine größere Umstellung sein, sich im experimentellen Haltungsbereich der Charité zu akklimatisieren, als für die TetO-Tiere vom MDC, die eine gewisse mikrobiologische Vielfalt gewohnt waren. Hinzu kommt, dass der Transportweg (und somit der Transportstress) für die Tiere von JANVIER LABS aus Frankreich bedeutend länger war als für die TetO-Tiere vom MDC, die lediglich innerhalb von Berlin transportiert wurden.

Im Projektverlauf zeigten die Tiere von JANVIER LABS eine deutlich erhöhte Anfälligkeit für die infektiöse Besiedlung mit Opportunisten, die zu schwerwiegenden Organschäden führten, welche sich vor allem im respiratorischen- und Urogenital-Trakt manifestierten. Bei mikrobiologischen Analysen (durch GIM), wurden hochgradig *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* und *Klebsiella oxytoca* isoliert, was für ein massiv gestörtes Gleichgewicht der physiologischen Besiedlung spricht. Der Abstand von sieben bis vierzehn Tagen, zwischen der Lieferung der Tiere und dem Auftreten erster Krankheitssymptome, spricht dabei eindeutig für eine Immunsuppression der Tiere und Infektionen durch erstmaligen Antigenkontakt in unserer Haltung. Bis zu dem vermehrten Auftreten solcher Erkrankungen bei unseren SD- und TetO-Tieren von JANVIER LABS, zeigten Versuchstiere von JANVIER LABS im Haltungsbereich der Charité keine vergleichbaren Auffälligkeiten. Ein Unterschied zu anderen AGs, welche denselben Haltungsbereich nutzen und ihre Tiere teilweise ebenfalls von JANVIER LABS

beziehen, bestand in der experimentellen Verabreichung eines Antibiotikums, welches bei unseren TetO-Tieren Diabetes induziert. Da dies der einzige ersichtliche Unterschied ist, muss rückblickend in Betracht gezogen werden, dass dies zu einem vermehrten Aufkommen antibiotikaresistenter Bakterien im Haltungsraum führte, der für Tiere von JANVIER LABS das kritische Maß überstieg.

Während des Projektes standen alle Verantwortlichen (die Projektleiterin, die Tierschutzbeauftragten und das LaGeSo) in engem Austausch und waren von Anfang an intensiv um eine Lösung der aufgetretenen Probleme bemüht. Da die experimentelle Gabe von Doxycyclin zu einer scheinbaren Besserung der Symptome führte, einigte man sich, dass meine Experimente unter Vorbehalt fortgeführt werden sollten, bis weitere Lösungen gefunden werden. Doch wie die projektbezogenen Analysen später zeigten, wirkte sich die systemische bakterielle Belastung bei Tieren von JANVIER LABS (100% der SD, 18% der TetO) auf die Augen aus, wodurch sich die Pathomechanismen einer DR in den gewonnenen Proben nicht untersuchen ließen.

Darüber hinaus waren in den Augenpräparaten Anomalien sichtbar, welche die Frage aufwarfen, ob sich der genetische Phänotyp der TetO-Linie, seit der letzten Verwendung für ophthalmologische Untersuchungen, möglicherweise geändert hat. Erstes Indiz, war die überdurchschnittliche Häufigkeit von Stellen in den Sagittalschnitten, welche eine desorganisierte Struktur der nukleären Schichten aufwiesen. Die Häufigkeit, mit der ich nicht-neoplastische Hintergrundbefunde wie Falten oder Rosettenbildung finden konnte, betrug dabei ein Vielfaches der üblichen Inzidenz, die für SD-Tiere mit 1,64% bis maximal 2,7% angegeben wird. Als die TetO-Linie gegen Ende der Projektlaufzeit bei JANVIER LABS auf deren SD-Substamm (aus dem unsere Kontrolltiere stammten) zurück gekreuzt wurde, verstärkte sich der Umfang der retinalen Missbildungen bei den TetO-Tieren. (Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Zucht bei JANVIER LABS Ende 2022 eingestellt, Tiere aus rückgekreuzten Zuchtpopulation kamen für das Projekt nicht zum Einsatz.) Die Ursache einzeln auftretender Netzhautdysplasien kann häufig nicht geklärt werden. Es gibt jedoch Versuchstier-Linien (wie beispielsweise die rd7 mutierte Mauslinie), bei denen ähnliche Befunde wie bei unseren Versuchstieren als vererbbarer genetischer Defekt auftreten. Neben der gehäuften Auflösung der physiologischen Struktur der retinalen Zellkernebenen (bei unseren SD- und TetO-Tieren), konnte ich in den Proben der TetO-Tiere vereinzelt tumorähnliche Auftreibungen der GCL feststellen. Räumlich korrelierend, zeigten einige Flatmount-Präparaten der TetO-Tiere, entlang der Gefäße des oberen Gefäßplexus innerhalb der GCL, signalintensive Aggregate der

Isolectin-Färbung. Ob es sich bei diesen Befunden um Tumore handelte (wie beispielsweise Astrozytäre Hamartome) konnte ich abschließend nicht klären.

Als ich aufgrund der Befunde Recherchen anstellte, konnte ich jedoch feststellen, dass die Jungtiere unserer TetO-Linie, nach dem Embryotransfer in den Zuchtbereich der FEM, mit einer Häufigkeit von mindestens 7,5%, überdurchschnittlich häufig Tumore entwickelten. Diese Häufigkeit liegt über der festgelegten Grenze der FEM und ist für die TetO-Linie, aus denen unser Substamm hervorging, untypisch. In den dreizehn Jahren zuvor, in denen die Gründerpopulation ausschließlich am MDC gezüchtet wurde, ist laut Aussagen des Pflegepersonals kein einziges TetO-Tier durch einen Tumor auffällig geworden. Da dieser Anstieg der Tumorzahligkeit während meines Projektes unbemerkt blieb, gab es erst sehr viel später erste Anhaltspunkte für einen möglichen Gendrift innerhalb der TetO-Linie. Wie sich die Tumorzahligkeit der TetO-Linie weiterentwickelte, als die Zucht von der FEM zu JANVIER LABS ausgelagert wurde, lässt sich nicht nachvollziehen. Als jedoch die ersten TetO-Tiere aus der neu hochgezogenen Zuchtkolonie von JANVIER LABS bezogen wurden, konnte ich feststellen, dass diese TetO-Tiere auffallend ängstlich und schreckhaft waren. Der Ausschuss für Genetik und Labortierzucht der GV-SOLAS verweist darauf, dass ein geändertes Angstverhalten genetisch bedingt und somit ein Hinweis auf einen Gendrift innerhalb eines Stammes sein kann. Da die Zuchtkolonie für die Umsiedlung abermals aus wenigen Tieren neu hochgezogen werden musste, erhöhte sich das Risiko, dass sich während dieser Zeit eine spontane Mutation im Stamm-Genom fixieren konnte.

Dass die steigende Mutationslast mit der Zeit zu einer Änderung des Phänotyps von Inzuchtstämmen führen kann, wird bei der Verwendung von Inzuchtstämmen leicht unterschätzt. Da sich nicht alle homozygot in einer Kolonie fixierten Spontanmutationen als eine augenscheinliche Änderung des Phänotyps äußern, kann die genetische Stabilität nur durch die Sequenzierung der Kolonie und den Vergleich mit dem Referenzgenom der Ursprungskolonie verifiziert werden. Ohne eine solche Sequenzanalyse können Änderungen im Genom der Kolonie unerkannt gravierende Auswirkungen haben. Um Abweichungen des genetischen Phänotyps im Laufe eines Projektes auszuschließen, wird deshalb (neben züchterischen Präventionsmaßnahmen und Kontrollen) auch von der Verwendung mehrerer Substämme einer Inzuchtlinie abgeraten (zu denen auch Populationen zählen, die zwischen der 20. und 40. Generation von der Ausgangspopulation räumlich getrennt gehalten werden). In Auszuchtstämmen, zu denen die verwendeten SD-Tiere zählen, können sich auftretende

Spontanmutationen ebenfalls etablieren. Zudem ist in diesen Linien das Risiko einer genetisch bedingt steigenden Tumorprädisposition höher als bei Inzuchtstämmen.

Meine Arbeit basierte auf der Annahme, dass sich in dem TetO-Modell der pathologische Phänotyp der DR reproduzieren lässt und dass sich das Modell auch dazu eignet, oxidativen Stress als pathologische Komponente der DR zu untersuchen. Um meine Arbeitshypothese zu testen, dass unter Hyperglykämie und Hyperinsulinämie die Überexpression von Nox4 die Pathomechanismen einer DR induziert, habe ich Nox4 nach zwei, vier und acht Wochen Hyperglykämie auf Proteinexpressionsebene gemessen und Nox4, ROS und Inflammationsmarker sowie das zeitliche Auftreten assoziierter Pathomechanismen mit immunhistochemischen Methoden in Sagittalschnitten und Flatmount-Präparaten der Retina evaluiert. Die Untersuchungsergebnisse, die ich im Rahmen dessen erhoben habe, zeigen bei den nichtdiabetischen SD-Kontrolltieren von JANVIER LABS, stärkere Pathologien, wenn sie mit Proben diabetischer TetO-Tiere aus der Zucht vom MDC verglichen wurden. Hinweise auf einen höheren pathologischen Wert bei diabetischen TetO-Tieren, entsprechend einer DR, konnte ich nur dann finden, wenn nicht nur die SD-Kontrolltiere, sondern auch die TetO-Tiere aus der Zucht von JANVIER LABS importiert wurden.

Meine Auswertungen, bei denen ich, entsprechend dem Modell und der Arbeitshypothese, ein höheres Level oxidativen Stresses bei diabetischen TetO-Ratten erwartet hatte, zeigten keinen wesentlichen Unterschied zwischen diabetischen TetO-Tieren und nicht-diabetischen SD-Kontrolltieren. Bei der Messung der Menge an Nox4 über ein ELISA Assay, gab es die größte Übereinstimmung in der Gruppe, in der sowohl die Kontrolltiere als auch die diabetischen TetO-Tiere aus der Zucht von JANVIER LABS importiert wurden und nach zweiwöchiger Experimentdauer untersucht wurden. Für den Untersuchungszeitraum vier und acht Wochen Diabetes, stammten die TetO-Tiere aus der Zucht vom MDC. Bei ihnen zeichnete sich eine abfallende Menge an Nox4, mit zunehmender Dauer der Doxycyclin-Verabreichung und Diabetesdauer ab. Bei den SD-Kontrolltieren, mit denen die diabetischen Tiere verglichen wurden, zeichnete sich eine gegenläufige Tendenz ab. Hier stieg die Konzentration an Nox4, je länger die Tiere nach dem Absetzen des Doxycyclins weiter im Haltungsraum saßen. In diesen SD-Kontrollgruppen lag die im ELISA gemessene Menge an Nox4 höher als bei den diabetischen TetO-Tieren. Die immunhistochemischen Färbung von Nox4, bei denen die Proben des zweiwöchigen Untersuchungszeitraumes ebenfalls allesamt von JANVIER LABS, für die vier und acht Wochen Untersuchungszeiträume aber lediglich die SD-Kontrolltiere von JANVIER LABS stammten, bekräftigten die Befunde der ELISA-Messung. Die

Intensitätsmessung der Färbung von ROS, zeigte in Übereinstimmung mit dem Nachweis an Nox4 ebenfalls bei den SD-Kontrolltieren für den vierwöchigen Untersuchungszeitraum höhere Werte, im Vergleich zu vier Wochen diabetischen TetO-Tieren aus der Zucht am MDC.

Diese Bild, zog sich durch alle weiteren geplanten Untersuchungsparameter der DR. Die in dem Modell gezeigten proinflammatorischen Merkmale einer DR, die bei TetO-Tieren nach vier bis fünfwöchiger Hyperglykämie im Vergleich zu SD-Kontrolltieren am MDC erhöht waren, konnten nicht reproduziert werden. Bei meiner erneuten Anwendung des Modells, mit Tieren, die in die Haltung der Charité importiert wurden, wiesen die Flatmount-Präparate von nichtdiabetischen SD-Kontrolltieren von JANVIER LABS, im Vergleich zu vier und acht Wochen diabetischen TetO-Tieren die vom MDC importiert wurden, eine deutlich höhere Anzahl Iba1-positiver Phagozyten auf. Innerhalb dieser Zellpopulation fand ich bei den SD-Kontrolltieren zudem einen wesentlich höheren Anteil aktivierter mononukleärer Phagozyten, was für eine Rekrutierung systemischer Monozyten spricht. Müllerzellen und Astrozyten, die neben den Phagozyten früh inflammatorische Prozesse anzeigen, wurden in Sagittalschnitten gefärbt. Hierfür standen für den zweiwöchigen Untersuchungszeitraum Proben von TetO-Tieren aus der Zucht von JANVIER LABS zur Verfügung, die im Vergleich zu den Proben von SD-Kontrolltieren aus derselben Zucht, eine qualitativ stärkere GFAP-Reaktivität zeigten. Bei den Proben längerer Diabeteszeiträume, die von TetO-Tieren aus der Zucht am MDC stammten und mit den Kontrolltieren-Proben von JANVIER LABS verglichen wurden, zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei der Färbung von Nox4; bei den TetO-Tieren schwächte das GFAP-Signal mit der Doxycyclin-Gabe und Diabetesdauer ab, während es sich bei den Kontrolltieren intensivierte, je länger die Tiere nach Absetzen des Doxycyclins in unserem Haltungsraum saßen. Zusammengefasst sprechen diese Ergebnisse für einen von der Herkunft und Importstrecke abhängigen proinflammatorischen Einfluss, der sich stärker auswirkte als die experimentell induzierte Hyperglykämie über einen vier bis achtwöchigen Zeitraum.

Da Astrozyten und Müllerzellen mit ihren Endfußfortsätzen die retinalen Gefäße umgeben und zusammen mit Perizyten und Endothelzellen funktionell die neurovaskuläre Einheit bilden, hat ihr Aktivitätsstatus direkte Auswirkungen auf das mikrovaskuläre System der Retina. Dies spiegelt sich bei der Betrachtung der Gefäßmorphologie in meinem Probenmaterial wider. In den Sagittalschnitten der Augen von SD-Kontrolltieren und diabetischen TetO-Tieren aller Untersuchungszeiträume, fand ich innerhalb der GCL Gefäße mit auffällig großem Kaliber, die über dem Sehnerv häufig auch über die GCL hinaus in den Glaskörper wuchsen. Bei Proben von SD-Kontrolltieren waren die großkalibrigen Gefäße innerhalb der GCL von GFAP-

positiven Zellen umgeben und die Gefäßstrukturen im Glaskörper hatten sich, im Vergleich zu den Proben von TetO-Tieren, mit einer größeren Häufigkeit gebildet. Meiner Einschätzung nach, handelt es sich bei diesen Befunden um eine hypoxisch bedingte Gefäßdilatation innerhalb der GCL, welche entweder die Persistenz hyaloider Gefäße oder eine Neovaskularisation in den Glaskörper hervorgerufen hat. Diese These wird durch meinen Nachweis von Erythrozyten-Konglomeraten innerhalb retinaler Gefäße und Ansammlungen ausgetretener Erythrozyten im Gewebe gestützt. Anhand Isolectin gefärbter Gefäße in Flatmount-Präparaten zeigte sich ein weiterer Unterschied der Gefäßmorphologie von SD-Kontrolltieren und diabetischen TetO-Tieren. Die Gefäße, welche die INL versorgen, hatten bei den SD-Kontrolltieren einen deutlich geringeren Durchmesser. Da Gliazellen an der sauerstoffabhängigen Regulation des Gefäßdurchmessers beteiligt sind, und für diese Zellen bei den SD-Tieren ein höherer Aktivierungszustand nachgewiesen wurde, ist es wahrscheinlich, dass dieser Kaliberunterschied die Vasokonstriktion innerhalb der INL von SD-Kontrolltieren abbildet. Zusammengefasst konnte ich auch die phänotypische Gefäßmorphologie der DR in dem TetO-Modell nicht reproduzieren. Im Gegensatz dazu fand ich bei den SD-Kontrolltieren, die wir von JANVIER LABS importierten, eine stärkere Ausprägung pathologischer Veränderungen der mikrovaskulären Strukturen.

Bei der erneuten Anwendung des TetO-Modells bestand ferner das Ziel, auch die über Hyperglykämie erhöhte Apoptose retinaler Zellen bei TetO-Tieren zu reproduzieren. Denn bei den zuvor durchgeführten Versuchen am MDC, konnte gezeigt werden, dass die TetO-Tiere nach ca. vier Wochen Diabetes signifikant weniger Ganglienzellen als nicht-diabetische SD-Tiere aufweisen. Da jedoch oxidative und inflammatorische Prozesse jeglichen Ursprungs Apoptose induzieren, wurde auch dieser Teilaspekt während meiner Versuche nicht ausschließlich durch Hyperglykämie und Hyperinsulinämie geprägt. Die beobachteten apoptotischen Veränderungen wurden mutmaßlich durch die Konstellation anderer Faktoren stark beeinflusst.

Mein Apoptose Assay in Sagittalschnitten zeigte zwar teilweise mehr apoptotische Zellen bei diabetischen TetO-Tieren, dieser Unterschied war aber hauptsächlich in der Untersuchungsgruppe auszumachen, in der sowohl die SD-Tiere als auch die TetO-Tiere aus der Zucht von JANVIER LABS importiert wurden. TetO-Tiere, die vom MDC importiert und mit nicht-diabetischen SD-Tieren von JANVIER LABS verglichen wurden, zeigen nach vier Wochen Hyperglykämie keine eindeutige Erhöhung apoptotischer Zellen im Vergleich zu ihren Kontrollen. Im Gegensatz dazu waren unter den Proben der SD-Tiere dieser Gruppe auffällig

viele Präparate, die aufgrund flächenhafter Apoptose nicht ausgewertet werden konnten. Die letztendlich auswertbare Apoptoserate bei diesen Tieren, war innerhalb aller Zellebenen doppelt so hoch wie in den anderen Kontrollgruppen. Nach achtwöchiger Hyperglykämie befanden sich bei den TetO-Tieren vom MDC mehr Zellen in der GCL und der INL in Apoptose, im Vergleich zu ihren Kontrollen, die aus der Zucht von JANVIER LABS importiert wurden.

Die Auswertung des manifestierten Zellverlustes in HE-gefärbten Schnitten zeigte, dass bei den Kontrolltieren der vier und acht Wochen Kohorte weniger Ganglienzellen erhalten waren. Das Defizit gegenüber diabetischen TetO-Tieren vom MDC betrug nach vier Wochen 8% und nach acht Wochen 11%. In der der ONL zeigten die SD-Tiere einen ähnlichen manifestierten Verlust an Photorezeptorzellen wie die diabetischen TetO-Tiere vom MDC, der mit zunehmender Haltungsdauer in unserem Tierstall stieg. Diese Befunde weisen darauf hin, dass im TUNEL Assay weniger apoptotische Zellen detektiert werden konnten, weil es bereits vor dieser Momentaufnahme zu einem größeren Zellverlust bei den SD-Kontrolltieren gekommen sein muss.

In Anbetracht der Steigerung apoptotischer Prozesse, wäre es auch denkbar, dass die Gefäße innerhalb der INL von SD-Kontrolltieren nicht verengt, sondern azellulär waren. Da es sich um einen Zufallsbefund handelte, konnten dies nicht mehr durch spezifische Färbungen verifiziert werden. Ein weiterer Zufallsbefund, der aus meiner Sicht auch ohne spezifischere Färbung auf eine gesteigerte Degeneration zurückzuführen ist, waren kreisrunde Löcher, die sich innerhalb der Photorezeptor-Außensegmenten von vor allem SD-Tieren gebildet hatten. Ein Erklärungsansatz für dieses Phänomen, ist die Vacuolisierung von Membranlipiden, wenn es zu einer vermehrten Degeneration von Photorezeptor-Außensegmenten kommt.

Die Tatsache, dass vermehrt Anzeichen für degenerative Prozesse bei den SD-Tieren gegenüber den diabetischen TetO-Tieren zu beobachten waren, hat mich dazu veranlasst, die Lichtverhältnisse in unseren Haltungsräumen zu messen. Denn bei diesem Aspekt, birgt (insbesondere bei der Arbeit mit Albinotieren) dieser haltungsbedingte Faktor ein besonderes Risikopotenzial, die Ergebnisse durch eine lichtinduzierte Erhöhung des photooxidativen Stresses zu beeinflussen. Die für Haltungen maximal zulässige Lichtintensität (≤ 325 Lux), liegt weit über dem Präferenzbereich von Nagetieren (welcher für Albinotieren bei nur unter 25 Lux liegt). Laut meinen Messungen wurde der maximal zulässige Grenzwert deutlich überschritten, ohne dass für die Tiere zusätzliche Schutzvorkehrungen getroffen wurden. Aus Platzgründen gab es bei diesem Risikofaktor einen systematischen Fehler zwischen den diabetischen

Gruppen und den Kontrollgruppen. Denn aus arbeitssicherheitstechnischen Gründen, durfte die Doxycyclin-Gabe nur in IVC-Käfigen oder Scantainern erfolgen. Dadurch, dass bei den SD-Tieren das Doxycyclin nach einer Woche wieder abgesetzt wurde und sie anschließend wieder umgesetzt werden mussten, waren die diabetischen Tiere, welche über die gesamte experimentelle Phase Doxycyclin verabreicht bekamen, besser vor der zu hellen Lichteinwirkung im Haltungsraum geschützt. Für die Tiere in den üblichen Haltungsregalen, lag die Lichteinwirkung, je nach Regalposition in einem Bereich zwischen 380 und 800 Lux. Ob die SD-Kontrollgruppe des vier Wochen Untersuchungszeitraumes möglicherweise an einem ungünstigen Platz mit besonders hoher Lichteinwirkung stand, lässt sich rückwirkend nicht nachvollziehen, bezogen auf die Ergebnisse im Apoptose Assay wäre es jedoch eine mögliche Erklärung.

Die üblichen Haltungsbedingungen, die auf die normierte Erfüllung der Grundbedürfnisse ausgerichtet sind, gewähren den Tieren wenig Ressourcen für Resilienz. Daher ist es umso wichtiger, zusätzliche Stressfaktoren in der Haltung zu vermeiden. Bei der Durchführung meiner Arbeit konnten zusätzliche Stressfaktoren, wie ein ungünstiges Raumklima, zu hohe Lärm- und Schallpegel und eine zu hohe Lichtintensität, nicht vermieden werden. Die Tiere waren in unterschiedlichem Umfang Bedingungen ausgesetzt, auf die sie sensibel reagieren. Da es diesbezüglich auch systematische Unterschiede zwischen den Gruppen gab, ist eine zusätzliche Verzerrung der Ergebnisse durch solche nicht experimentell induzierten Stressfaktoren nicht auszuschließen. Verbesserte Haltungsbedingungen, die den Modelltieren aller Untersuchungsgruppen im gleichen Umfang zugutekommen, könnten die interne Validität und die Reproduzierbarkeit der Experimente erhöhen.

Das Hauptfazit meiner Arbeit lautet, dass sich das TetO-Modell bei den von mir beschriebenen Änderungen der experimentellen Durchführung nicht nutzen lässt. Im Gegensatz zu einer unproblematischen Anwendung mit diabetischen TetO-Tieren und nicht-diabetischen SD-Kontrolltieren, die aus dem gleichen Zuchtbereich kommen und diesen Bereich nicht verlassen, entwickelten importierte Tiere aus Bereichen mit unterschiedlichen Hygienestandards in Kombination mit der nicht-therapeutischen Verabreichung von Antibiotika, schwerwiegende systemische Bakteriosen. Darüber hinaus kann die TetO-Linie sowie die SD-Linie von JANVIER LABS aufgrund ihres phänotypischen Zustandes für ophthalmologische Untersuchungen bis auf Weiteres nicht genutzt werden. Durch die Veröffentlichung meiner Arbeit möchte ich das Problembewusstsein für Einflussfaktoren durch Genetik, Herkunft und Haltung von Versuchstieren erhöhen.

Literatur

1. Reichhart N, Crespo-Garcia S, Haase N, Golic M, Skosyrski S, Rübsam A, Herrspiegel C, Kociok N, Alenina N, Bader M, Dechend R, Strauss O, Jousen AM. The TetO rat as a new translational model for type 2 diabetic retinopathy by inducible insulin receptor knockdown. *Diabetologia*. 2017;60(1):202-11.
2. Kotnik K, Popova E, Todiras M, Mori MA, Alenina N, Seibler J, Bader M. Inducible transgenic rat model for diabetes mellitus based on shRNA-mediated gene knockdown. *PLoS One*. 2009;4(4):e5124.
3. BfR. Zahlen zu den im Jahr 2020 verwendeten Versuchstieren. Available from: https://www.bf3r.de/de/verwendung_von_versuchstieren_im_jahr_2020-288932.html. Accessed July-07 2023.
4. BMEL. Verwendung von Versuchstieren im Jahr 2019 Available from: <https://www.bmel.de/DE/themen/tiere/tierschutz/versuchstierzahlen2019.html>. Accessed July-07 2023.
5. BfR. Fragen und Antworten zu Tierversuchen, Alternativmethoden und Versuchstierzahlen. Available from: <https://www.bfr.bund.de/cm/343/fragen-und-antworten-zu-tierversuchen-alternativmethoden-und-versuchstierzahlen.pdf>. Accessed July-07 2023.
6. Russel WMS, Burch RL. The Principles of Humane Experimental Technique 2023. Available from: <https://caat.jhsph.edu/principles/the-principles-of-humane-experimental-technique>. Accessed July-07 2023.
7. Veening-Griffioen DH, Ferreira GS, Boon WPC, Gispén-de Wied CC, Schellekens H, Moors EHM, Van Meer PJK. Tradition, not science, is the basis of animal model selection in translational and applied research. *ALTEX*. 2021;38(1):49-62.
8. Ferreira GS, Veening-Griffioen DH, Boon WPC, Moors EHM, Gispén-de Wied CC, Schellekens H, van Meer PJK. A standardised framework to identify optimal animal models for efficacy assessment in drug development. *PLoS One*. 2019;14(6):e0218014.
9. Hau J. Animal Models for Human Diseases. In: Conn PM, editor. *Sourcebook of Models for Biomedical Research*. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 2008.
10. Bailoo JD, Reichlin TS, Würbel H. Refinement of Experimental Design and Conduct in Laboratory Animal Research. *ILAR Journal*. 2014;55(3):383-91.
11. Kornetsky C. Animal Models: Promises and Problems. In: Koob GF, Ehlers CL, Kupfer DJ, editors. *Animal Models of Depression*. Boston, MA: Birkhäuser Boston; 1989. p. 18-29.
12. Clarkson-Townsend DA, Douglass AJ, Singh A, Allen RS, Uwaifo IN, Pardue MT. Impacts of high fat diet on ocular outcomes in rodent models of visual disease. *Exp Eye Res*. 2021;204:108440.
13. Preguiça I, Alves A, Nunes S, Gomes P, Fernandes R, Viana SD, Reis F. Diet-Induced Rodent Models of Diabetic Peripheral Neuropathy, Retinopathy and Nephropathy. *Nutrients*. 2020;12(1):250.
14. Eleazu CO, Eleazu KC, Chukwuma S, Essien UN. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *J Diabetes Metab Disord*. 2013;12(1):60.
15. Bao YW, Yuan Y, Chen JH, Lin WQ. Kidney disease models: tools to identify mechanisms and potential therapeutic targets. *Zool Res*. 2018;39(2):72-86.
16. Spontaneous Craniofacial Mutation Strains. Available from: <https://www.jax.org/research-and-faculty/resources/mouse-resource-for-craniofacial-research/craniofacial-mutants-spontaneous>. Accessed July-07 2023.
17. da Silva Xavier G, Hodson DJ. Mouse models of peripheral metabolic disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2018;32(3):299-315.
18. Kleinert M, Clemmensen C, Hofmann SM, Moore MC, Renner S, Woods SC, Huypens P, Beckers J, de Angelis MH, Schürmann A, Bakhti M, Klingenspor M, Heiman M, Cherrington AD, Ristow M, Lickert H, Wolf E, Havel PJ, Müller TD, Tschöp MH. Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14(3):140-62.

19. Phenotype Information for B6-OB (000632). Available from: <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/solutions-by-therapeutic-area/metabolic-diseases/featured-mice-for-type-2-and-obesity/phenotype-information-for-000632>. Accessed July-07 2023.
20. Obradovic M, Sudar-Milovanovic E, Soskic S, Essack M, Arya S, Stewart AJ, Gojobori T, Isenovic ER. Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication. *Frontiers in Endocrinology*. 2021;12.
21. Renner-Müller I, Schenkel J, Aigner B. Typen von mit gentechnischen Methoden veränderten Tieren. GV-SOLAS; 2017.
22. Navabpour S, Kwapis JL, Jarome TJ. A neuroscientist's guide to transgenic mice and other genetic tools. *Neurosci Biobehav Rev*. 2020;108:732-48.
23. Kelly DJ, Wilkinson-Berka JL, Allen TJ, Cooper ME, Skinner SL. A new model of diabetic nephropathy with progressive renal impairment in the transgenic (mRen-2)27 rat (TGR). *Kidney Int*. 1998;54(2):343-52.
24. Moravski CJ, Skinner SL, Stubbs AJ, Sarlos S, Kelly DJ, Cooper ME, Gilbert RE, Wilkinson-Berka JL. The renin-angiotensin system influences ocular endothelial cell proliferation in diabetes: transgenic and interventional studies. *Am J Pathol*. 2003;162(1):151-60.
25. Deliyanti D, Zhang Y, Khong F, Berka DR, Stapleton DI, Kelly DJ, Wilkinson-Berka JL. FT011, a Novel Cardiorenal Protective Drug, Reduces Inflammation, Gliosis and Vascular Injury in Rats with Diabetic Retinopathy. *PLoS One*. 2015;10(7):e0134392.
26. Kräker K, Herse F, Golic M, Reichhart N, Crespo-Garcia S, Strauß O, Grune J, Kintscher U, Ebrahim M, Bader M, Alenina N, Heuser A, Luft FC, Müller DN, Dechend R, Haase N. Effects of empagliflozin and target-organ damage in a novel rodent model of heart failure induced by combined hypertension and diabetes. *Sci Rep*. 2020;10(1):14061.
27. Pound P, Ritskes-Hoitinga M. Is it possible to overcome issues of external validity in preclinical animal research? Why most animal models are bound to fail. *Journal of Translational Medicine*. 2018;16(1):304.
28. Chang B, Hawes NL, Hurd RE, Davisson MT, Nusinowitz S, Heckenlively JR. Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Research*. 2002;42(4):517-25.
29. Bowes C, Li T, Danciger M, Baxter LC, Applebury ML, Farber DB. Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the beta subunit of rod cGMP-phosphodiesterase. *Nature*. 1990;347(6294):677-80.
30. Dirnagl U. Thomas Willis Lecture. *Stroke*. 2016;47(8):2148-53.
31. Brekke TD, Steele KA, Mulley JF. Inbred or Outbred? Genetic Diversity in Laboratory Rodent Colonies. *G3 (Bethesda)*. 2018;8(2):679-86.
32. Festing MF. Warning: the use of heterogeneous mice may seriously damage your research. *Neurobiol Aging*. 1999;20(2):237-44; discussion 45-6.
33. Nomenclature of Inbred Mice. Available from: <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/customer-support/technical-support/genetics-and-nomenclature/inbred-mice>. Accessed July-07 2023.
34. COMMITTEE on Standardized Nomenclature for Inbred Strains of Mice. *Cancer Res*. 1952;12(8):602-13.
35. Bailey DW. How pure are inbred strains of mice? *Immunol Today*. 1982;3(8):210-4.
36. Deol MS, Grüneberg H, Searle AG, Truslove GM. How pure are our inbred strains of mice? *Genet res Camb*. 1960;1:50-8.
37. Smits BM, van Zutphen BF, Plasterk RH, Cuppen E. Genetic variation in coding regions between and within commonly used inbred rat strains. *Genome Res*. 2004;14(7):1285-90.
38. Mendel JG. Versuche über Pflanzenhybriden. *Verhandlungen des Naturforschenden Vereins Brünn*. 1865;4:3-47.
39. Low-Marchelli J. Strategies to Minimize Genetic Drift and Maximize Experimental Reproducibility in Mouse Research. Available from: <https://p.widencdn.net/26bl5m/RM-CS-strategies-to-minimize-genetic-drift-and-maximize-experimental-reproducibility-in-mouse-research>. Accessed July-07 2023.

40. Casellas J, Medrano JF. Within-generation mutation variance for litter size in inbred mice. *Genetics*. 2008;179(4):2147-55.
41. Casellas J. Inbred mouse strains and genetic stability: a review. *Animal*. 2011;5(1):1-7.
42. Wedekind D, Reifenberg K, Hedrich H. Definition und Zucht isogener Maus- und Rattenstämme. Ausschuss für Genetik und Labortierzucht [Internet]. [9 p.]. Available from: <https://www.gv-solas.de/wp-content/uploads/2021/08/gen-isogen.pdf>. Accessed July-07 2023.
43. Reifenberg K, Hedrich H, Wedekind D. Zielsetzung und Methoden des genetischen Monitoring isogener Maus- und Rattenstämme:[18 p.]. Available from: https://www.gv-solas.de/wp-content/uploads/2021/08/gen_zielsetzung.pdf. Accessed July-07 2023.
44. Peters HC, Reifenberg K, Wedekind D. Substämme von Inzuchtstämmen. Fachinformation aus dem Ausschuss für Genetik und Labortierzucht [Internet]. [9 p.]. Available from: https://www.gv-solas.de/wp-content/uploads/2021/08/20181217gen_Substaemme.pdf. Accessed July-07 2023.
45. Callicott RJ, Ballard ST, Womack JE. Genomic Comparison of Lewis and Wistar-Furth Rat Substrains by Use of Microsatellite Markers. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2007;46(2):25-9.
46. Crespo-Garcia S, Reichhart N, Skosyrski S, Foddis M, Wu J, Figura A, Herrspiegel C, Fuchtemeier M, Sassi C, Dirnagl U, Jousen AM, Strauss O. Individual and temporal variability of the retina after chronic bilateral common carotid artery occlusion (BCCAO). *PLOS ONE*. 2018;13(3):e0193961.
47. Kluge R, Wedekind D. Auszuchtstämme Zuchtmethoden und genetische Eigenschaften. Fachinformation aus dem Ausschuss für Genetik und Labortierzucht [Internet]. Available from: https://www.gv-solas.de/wp-content/uploads/2021/08/201605Auszuchtstaemme_.pdf. Accessed July-07 2023.
48. Fitzpatrick CJ, Gopalakrishnan S, Cogan ES, Yager LM, Meyer PJ, Lovic V, Saunders BT, Parker CC, Gonzales NM, Aryee E, Fligel SB, Palmer AA, Robinson TE, Morrow JD. Variation in the form of Pavlovian conditioned approach behavior among outbred male Sprague-Dawley rats from different vendors and colonies: sign-tracking vs. goal-tracking. *PLoS One*. 2013;8(10):e75042.
49. Groen A, Lagerwerf AJ. Genic heterogeneity and genetic monitoring of mouse outbred stocks. *Lab Anim*. 1979;13(2):81-5.
50. Tennekens H, Kaufmann W, Dammann M, Ravenzwaay Bv. The stability of historical control data for common neoplasms in laboratory rats and the implications for carcinogenic risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2004;40(3):293-304.
51. Bleich A, Illgen-Wilcke B, Jacobi K, Kirsch P, Kolbe T, Kränzlin B, Leblanc R, Mahabir-Brenner E, Mähler M, Nicklas W, Seidel K, Tiemann B. Hygienerisiko beim Import von Nagetieren - Sanierungsstrategien. Fachinformation Aus dem Ausschuss für Hygiene [Internet]. Available from: https://www.gv-solas.de/wp-content/uploads/2021/08/2020_10Hygienerisik_b_Import_Maeusen_Ratten.pdf. Accessed July-07 2023.
52. Aguila HN, Pakes SP, Lai WC, Lu YS. The effect of transportation stress on splenic natural killer cell activity in C57BL/6J mice. *Lab Anim Sci*. 1988;38(2):148-51.
53. Wenzel A, Grimm C, Seeliger MW, Jaissle G, Hafezi F, Kretschmer R, Zrenner E, Remé CE. Prevention of Photoreceptor Apoptosis by Activation of the Glucocorticoid Receptor. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2001;42(7):1653-9.
54. Busch M, Chourbaji S, Dammann P, Gerold s, Haemisch A, Jirkof P, Oehlert P, Osterkamp A, Ott S, Peters S, Spekl K, Tsai PP, Langen B. Tiergerechte Haltung von Labormäusen. Ausschuss für Tiergerechte Labortierhaltung [Internet]. Accessed July-07 2023.
55. Guidelines for Accomodation and Care of Animals (Article 5 of the Convention) Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other scientific Purposes (ETS NO. 123). European Treaty Series [Internet]. Available from: <https://rm.coe.int/168007a445>. Accessed July-07 2023.
56. Busch M, Chourbaji S, Dammann P, Finger-Baier K, Gerold S, Haemisch A, Jirkof P, Osterkamp A, Ott S, Peters S, Spekl K. Tiergerechte Haltung von Laborratten. Fachinformation aus dem Ausschuss

- für Tiergerechte Labortierhaltung [Internet]. Available from: <https://www.gv-solas.de/wp-content/uploads/2021/08/2017Rattenhaltung.pdf>. Accessed July-07 2023.
57. Maloney SK, Fuller A, Mitchell D, Gordon C, Overton JM. Translating animal model research: does it matter that our rodents are cold? *Physiology* (Bethesda). 2014;29(6):413-20.
 58. Leitfaden zur DIN EN 12464-1 Beleuchtung von Arbeitsstätten Teil 1: Arbeitsstätten von Innenräumen. (2. korrigierte Auflage):[42 p.]. Available from: https://www.trilux.com/fileadmin/Downloads/Leitfaden_DIN_2.Auflage_Lichtwissen.pdf. Accessed July-07 2023.
 59. Stryjek R, Modlińska K, Turlejski K, Pisula W. Circadian rhythm of outside-nest activity in wild (WWCPS), albino and pigmented laboratory rats. *PLoS One*. 2013;8(6):e66055.
 60. Xie H, Wu Y, Jia J, Liu G, Zhang Q, Yu K, Guo Z, Shen L, Hu R. Enrichment-induced exercise to quantify the effect of different housing conditions: A tool to standardize enriched environment protocols. *Behavioural Brain Research*. 2013;249:81-9.
 61. Bellhorn RW. Lighting in the animal environment. *Lab Anim Sci*. 1980;30(2 Pt 2):440-50.
 62. Ratuski AS, Weary DM. Environmental Enrichment for Rats and Mice Housed in Laboratories: A Metareview. *Animals* (Basel). 2022;12(4).
 63. Macartney EL, Lagisz M, Nakagawa S. The relative benefits of environmental enrichment on learning and memory are greater when stressed: A meta-analysis of interactions in rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2022;135:104554.
 64. Cait J, Cait A, Scott RW, Winder CB, Mason GJ. Conventional laboratory housing increases morbidity and mortality in research rodents: results of a meta-analysis. *BMC Biol*. 2022;20(1):15.
 65. Kentner AC, Speno AV, Doucette J, Roderick RC. The Contribution of Environmental Enrichment to Phenotypic Variation in Mice and Rats. *eNeuro*. 2021;8(2).
 66. IDF Diabetes Atlas. Brussels, Belgium 2021 July-07 2023]. Available from: <https://www.diabetesatlas.org>. Accessed July-07 2023.
 67. Teo ZL, Tham YC, Yu M, Chee ML, Rim TH, Cheung N, Bikbov MM, Wang YX, Tang Y, Lu Y, Wong IY, Ting DSW, Tan GSW, Jonas JB, Sabanayagam C, Wong TY, Cheng CY. Global Prevalence of Diabetic Retinopathy and Projection of Burden through 2045: Systematic Review and Meta-analysis. *Ophthalmology*. 2021;128(11):1580-91.
 68. Hammes H-P, Lemmen K, Bertram B. Diabetische Retinopathie und Makulopathie. *Diabetologie*. 2020;15:S175-S80.
 69. Tommerdahl KL, Shapiro ALB, Nehus EJ, Bjornstad P. Early microvascular complications in type 1 and type 2 diabetes: recent developments and updates. *Pediatric Nephrology*. 2022;37(1):79-93.
 70. Horton WB, Barrett EJ. Microvascular Dysfunction in Diabetes Mellitus and Cardiometabolic Disease. *Endocrine Reviews*. 2020;42(1):29-55.
 71. Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, Lamoureux EL, Kowalski JW, Bek T, Chen SJ, Dekker JM, Fletcher A, Grauslund J, Haffner S, Hamman RF, Ikram MK, Kayama T, Klein BE, Klein R, Krishnaiah S, Mayurasakorn K, O'Hare JP, Orchard TJ, Porta M, Rema M, Roy MS, Sharma T, Shaw J, Taylor H, Tielsch JM, Varma R, Wang JJ, Wang N, West S, Xu L, Yasuda M, Zhang X, Mitchell P, Wong TY. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2012;35(3):556-64.
 72. Yue T, Shi Y, Luo S, Weng J, Wu Y, Zheng X. The role of inflammation in immune system of diabetic retinopathy: Molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications. *Frontiers in Immunology*. 2022;13.
 73. Antonetti DA, Silva PS, Stitt AW. Current understanding of the molecular and cellular pathology of diabetic retinopathy. *Nature Reviews Endocrinology*. 2021;17(4):195-206.
 74. Wang W, Lo ACY. Diabetic Retinopathy: Pathophysiology and Treatments. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(6):1816.
 75. Sohn EH, van Dijk HW, Jiao C, Kok PH, Jeong W, Demirkaya N, Garmager A, Wit F, Kucukevcilioglu M, van Velthoven ME, DeVries JH, Mullins RF, Kuehn MH, Schlingemann RO, Sonka M, Verbraak FD, Abràmoff MD. Retinal neurodegeneration may precede microvascular changes characteristic of diabetic retinopathy in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(19):E2655-64.

76. Trost A, Lange S, Schroedl F, Bruckner D, Motloch KA, Bogner B, Kaser-Eichberger A, Strohmaier C, Runge C, Aigner L, Rivera FJ, Reitsamer HA. Brain and Retinal Pericytes: Origin, Function and Role. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2016;10.
77. Warmke N, Griffin KJ, Cubbon RM. Pericytes in diabetes-associated vascular disease. *J Diabetes Complications*. 2016;30(8):1643-50.
78. Wei L, Sun X, Fan C, Li R, Zhou S, Yu H. The pathophysiological mechanisms underlying diabetic retinopathy. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:963615.
79. Klein R, Klein B. Epidemiology of Ocular Functions and Diseases in Persons With Diabetes. 2018. In: *Diabetes in America* [Internet]. Bethesda (MA): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (US). 3. [cited July-07 2023]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK567971/>.
80. Gonzalez-Cortes JH, Martinez-Pacheco VA, Gonzalez-Cantu JE, Bilgic A, de Ribot FM, Sudhalkar A, Mohamed-Hamsho J, Kodjikian L, Mathis T. Current Treatments and Innovations in Diabetic Retinopathy and Diabetic Macular Edema. *Pharmaceutics*. 2023;15(1):122.
81. Pande GS, Tidake P. Laser Treatment Modalities for Diabetic Retinopathy. *Cureus*. 2022;14(10):e30024.
82. Tomita Y, Lee D, Tsubota K, Negishi K, Kurihara T. Updates on the Current Treatments for Diabetic Retinopathy and Possibility of Future Oral Therapy. *Journal of Clinical Medicine*. 2021;10(20):4666.
83. Choi JSY, de Haan JB, Sharma A. Animal models of diabetes-associated vascular diseases: an update on available models and experimental analysis. *Br J Pharmacol*. 2022;179(5):748-69.
84. Lelyte I, Ahmed Z, Kaja S, Kalesnykas G. Structure-Function Relationships in the Rodent Streptozotocin-Induced Model for Diabetic Retinopathy: A Systematic Review. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2022;38(4):271-86.
85. Brosius F. High-Dose Streptozotocin Induction Protocol (Mouse). *DiacComp Protocols: The University of Michigan Medical Center*; 2015.
86. Brosius F. Low-Dose Streptozotocin Induction Protocol (Mouse). *DiacComp Protocols: The University of Michigan Medical Center* 2015.
87. Lai AK, Lo AC. Animal models of diabetic retinopathy: summary and comparison. *J Diabetes Res*. 2013;2013:106594.
88. Pandey S, Dvorakova MC. Future Perspective of Diabetic Animal Models. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2020;20(1):25-38.
89. Drager UC, Olsen JF. Origins of crossed and uncrossed retinal projections in pigmented and albino mice. *J Comp Neurol*. 1980;191(3):383-412.
90. Santos SH, Giani JF, Burghi V, Miquet JG, Qadri F, Braga JF, Todiras M, Kotnik K, Alenina N, Dominici FP, Santos RA, Bader M. Oral administration of angiotensin-(1-7) ameliorates type 2 diabetes in rats. *J Mol Med (Berl)*. 2014;92(3):255-65.
91. Golic M, Kräker K, Fischer C, Alenina N, Haase N, Herse F, Schütte T, Henrich W, Müller DN, Busjahn A, Bader M, Dechend R. Continuous Blood Glucose Monitoring Reveals Enormous Circadian Variations in Pregnant Diabetic Rats. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:271.
92. Golic M, Stojanovska V, Bendix I, Wehner A, Herse F, Haase N, Kräker K, Fischer C, Alenina N, Bader M, Schütte T, Schuchardt M, van der Giet M, Henrich W, Muller DN, Felderhoff-Müser U, Scherjon S, Plösch T, Dechend R. Diabetes Mellitus in Pregnancy Leads to Growth Restriction and Epigenetic Modification of the Srebf2 Gene in Rat Fetuses. *Hypertension*. 2018;71(5):911-20.
93. Schütte T, Kedziora SM, Haase N, Herse F, Busjahn A, Birukov A, Alenina N, Müller DN, Bader M, Schupp M, Dechend R, Kräker K, Golic M. Intrauterine Exposure to Diabetic Milieu Does Not Induce Diabetes and Obesity in Male Adulthood in a Novel Rat Model. *Hypertension*. 2021;77(1):202-15.
94. Schütte T, Kedziora SM, Haase N, Herse F, Alenina N, Müller DN, Bader M, Schupp M, Dechend R, Golic M, Kräker K. Diabetic pregnancy as a novel risk factor for cardiac dysfunction in the offspring—the heart as a target for fetal programming in rats. *Diabetologia*. 2021;64(12):2829-42.
95. Li X, Lv J, Li J, Ren X. Kir4.1 may represent a novel therapeutic target for diabetic retinopathy (Review). *Exp Ther Med*. 2021;22(3):1021.

96. Heitz A. Zum Einfluss der vollständigen Antagonisierung der Anästhesie mit Medetomidin/Midazolam/Fentanyl auf die Hämodynamik, die Atmung und den Glukosestoffwechsel von Ratten im Volumenmangelschock [Inaugural Dissertation]. München: Ludwig-Maximilians-Universität München; 2005.
97. Sarthy PV, Fu M, Huang J. Developmental expression of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) gene in the mouse retina. *Cell Mol Neurobiol.* 1991;11(6):623-37.
98. Dülsner A, Greweling-Pils M, Hack R, Krüger C, Manthey T, Paulin N, Scherer K, Schmelting B, Schmidt M, Siegeler K, Weinert H, Wißmann A. Möglichkeiten der Belastungsbeurteilung im Tierversuch. Stellungnahme aus dem Ausschuss für Tierschutzbeauftragte [Internet]. [35 p.]. Available from: https://www.gv-solas.de/wp-content/uploads/2020/02/Moeglichkeiten-der-Belastungsbeurteilung-im-Tierversuch_2020.pdf. Accessed July-07 2023.
99. Jamil R, Foris L, Snowden J. *Proteus Mirabilis* Infections. [Updated 2022 Oct 25]. 2022. Treasure Island (FL): StatPearls [Internet]. , [cited July-07 2023]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442017/>.
100. Lee DS, Lee S-J, Choe H-S. Community-Acquired Urinary Tract Infection by *Escherichia coli* in the Era of Antibiotic Resistance. *BioMed Research International.* 2018;2018:7656752.
101. Lupo F, Ingersoll MA, Pineda MA. The glycobiology of uropathogenic *E. coli* infection: the sweet and bitter role of sugars in urinary tract immunity. *Immunology.* 2021;164(1):3-14.
102. Singh L, Cariappa MP, Kaur M. *Klebsiella oxytoca*: An emerging pathogen? *Medical Journal Armed Forces India.* 2016;72:S59-S61.
103. Herridge WP, Shibu P, O'Shea J, Brook TC, Hoyles L. Bacteriophages of *Klebsiella* spp., their diversity and potential therapeutic uses. *Journal of Medical Microbiology.* 2020;69(2):176-94.
104. Prophylaktische und therapeutische Maßnahmen bei ausgewählten Infektionen von Labornagern und Kaninchen. Available from: https://www.gv-solas.de/wp-content/uploads/2021/08/hyg-prophylak_0313.pdf. Accessed July-07 2023.
105. Teweldemedhin M, Gebreyesus H, Atsbaha AH, Asgedom SW, Saravanan M. Bacterial profile of ocular infections: a systematic review. *BMC Ophthalmology.* 2017;17(1):212.
106. Durand ML. Endophthalmitis. *Clinical Microbiology and Infection.* 2013;19(3):227-34.
107. Coburn PS, Wiskur BJ, Christy E, Callegan MC. The diabetic ocular environment facilitates the development of endogenous bacterial endophthalmitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(12):7426-31.
108. Coburn PS, Wiskur BJ, Miller FC, Lagrow AL, Astley RA, Elliott MH, Callegan MC. Bloodstream-To-Eye Infections Are Facilitated by Outer Blood-Retinal Barrier Dysfunction. *PLOS ONE.* 2016;11(5):e0154560.
109. Moyer AL, Ramadan RT, Novosad BD, Astley R, Callegan MC. *Bacillus cereus*-Induced Permeability of the Blood-Ocular Barrier during Experimental Endophthalmitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2009;50(8):3783.
110. Joainig MM, Gorkiewicz G, Leitner E, Weberhofer P, Zollner-Schwetz I, Lippe I, Feierl G, Krause R, Hinterleitner T, Zechner EL, Högenauer C. Zytotoxinproduktion von *Klebsiella oxytoca*-Stämmen, die bei Kolitis und extraintestinalen Infektionen isoliert wurden. *Z Gastroenterol.* 2010;48(05):P7.
111. Yokoyama K, Horii T, Yamashino T, Hashikawa S, Barua S, Hasegawa T, Watanabe H, Ohta M. Production of Shiga toxin by *Escherichia coli* measured with reference to the membrane vesicle-associated toxins. *FEMS Microbiology Letters.* 2000;192(1):139-44.
112. Armbruster CE, Mobley HLT, Pearson MM. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. *EcoSal Plus.* 2018;8(1).
113. Miller FC, Coburn PS, Huzzatul MM, LaGrow AL, Livingston E, Callegan MC. Targets of immunomodulation in bacterial endophthalmitis. *Prog Retin Eye Res.* 2019;73:100763.
114. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology.* 2004;4(7):499-511.
115. Zeng MY, Miralda I, Armstrong CL, Uriarte SM, Bagaitkar J. The roles of NADPH oxidase in modulating neutrophil effector responses. *Molecular Oral Microbiology.* 2019;34(2):27-38.

116. Jiang Y, Xu L, Yu L, Xu X, Feng C, Li J. NOX4 inhibition protects enteric glial cells against Clostridium difficile toxin B toxicity via attenuating oxidative and Endoplasmic reticulum stresses. *Free Radic Res.* 2019;53(8):932-40.
117. Singh PK, Kumar A. Mitochondria mediates caspase-dependent and independent retinal cell death in Staphylococcus aureus endophthalmitis. *Cell Death Discovery.* 2016;2(1):16034.
118. Park J-Y, Jeong Y-J, Park S-K, Yoon S-J, Choi S, Jeong DG, Chung SW, Lee BJ, Kim JH, Tesh VL, Lee M-S, Park Y-J. Shiga Toxins Induce Apoptosis and ER Stress in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Toxins.* 2017;9(10):319.
119. Sanchez MC, Chiabrando GA. Multitarget Activities of Müller Glial Cells and Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 in Proliferative Retinopathies. *ASN Neuro.* 2022;14.
120. de Hoz R, Rojas B, Ramírez AI, Salazar JJ, Gallego BI, Triviño A, Ramírez JM. Retinal Macroglial Responses in Health and Disease. *BioMed Research International.* 2016;2016:2954721.
121. Kugler EC, Greenwood J, MacDonald RB. The "Neuro-Glial-Vascular" Unit: The Role of Glia in Neurovascular Unit Formation and Dysfunction. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:732820.
122. Sousa DC, Leal I, Moreira S, Dionísio P, Abegão Pinto L, Marques-Neves C. Hypoxia challenge test and retinal circulation changes - a study using ocular coherence tomography angiography. *Acta Ophthalmologica.* 2018;96(3):e315-e9.
123. Blair NP, Wanek J, Teng P-Y, Shahidi M. The effect of intravitreal vascular endothelial growth factor on inner retinal oxygen delivery and metabolism in rats. *Experimental Eye Research.* 2016;143:141-7.
124. Taniguchi H, Kitaoka T, Gong H, Amemiya T. Apoptosis of the hyaloid artery in the rat eye. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger.* 1999;181(6):555-60.
125. Kim Y, Park JR, Hong HK, Han M, Lee J, Kim P, Woo SJ, Park KH, Oh W-Y. In vivo imaging of the hyaloid vascular regression and retinal and choroidal vascular development in rat eyes using optical coherence tomography angiography. *Scientific Reports.* 2020;10(1):12901.
126. Crespo-Garcia S, Reichhart N, Wigdahl J, Skosyrski S, Kociok N, Strauß O, Jousen AM. Lack of netrin-4 alters vascular remodeling in the retina. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology.* 2019;257(10):2179-84.
127. Shortt AJ, Howell K, O'Brien C, McLoughlin P. Chronic systemic hypoxia causes intra-retinal angiogenesis. *J Anat.* 2004;205(5):349-56.
128. Mills SA, Jobling AI, Dixon MA, Bui BV, Vessey KA, Phipps JA, Greferath U, Venables G, Wong VHY, Wong CHY, He Z, Hui F, Young JC, Tonc J, Ivanova E, Sagdullaev BT, Fletcher EL. Fractalkine-induced microglial vasoregulation occurs within the retina and is altered early in diabetic retinopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2021;118(51):e2112561118.
129. Li J, Wang JJ, Yu Q, Chen K, Mahadev K, Zhang SX. Inhibition of reactive oxygen species by Lovastatin downregulates vascular endothelial growth factor expression and ameliorates blood-retinal barrier breakdown in db/db mice: role of NADPH oxidase 4. *Diabetes.* 2010;59(6):1528-38.
130. Castelhana-Carlos MJ, Baumans V. The impact of light, noise, cage cleaning and in-house transport on welfare and stress of laboratory rats. *Laboratory Animals.* 2009;43(4):311-27.
131. Rao GN. Light Intensity-Associated Eye Lesions of Fischer 344 Rats in Long-Term Studies. *Toxicologic Pathology.* 1991;19(2):148-55.
132. Tanito M. Retinal Photooxidative Stress and Its Modifiers. In: Nakazawa T, Kitaoka Y, Harada T, editors. *Neuroprotection and Neuroregeneration for Retinal Diseases.* Tokyo: Springer Japan; 2014. p. 205-26.
133. Stein L, Nelson K. Non-Neoplastic Ocular Histologic Background findings in Sprague-Dawley Rats at MPI Research. Available from: <https://www.criver.com/sites/default/files/resource-files/SP-MPI-non-neoplastic-ocular-histologic-background-sd-rat.pdf>. Accessed July-07 2023.
134. Cloup E, Romao P, Taylor I, Mowat V, Mukaratirwa S. Incidences and Range of Spontaneous Microscopic Lesions in the Eye of Sprague-Dawley Rats and Han Wistar Rats Used in Toxicity Studies. *Toxicologic Pathology.* 2020;49(3):581-9.

135. Sørensen NB, Christiansen AT, Kjær TW, Klemp K, Cour MI, Heegaard S, Warfvinge K, Kiilgaard JF. Loss of retinal tension and permanent decrease in retinal function: a new porcine model of rhegmatogenous retinal detachment. *Acta Ophthalmologica*. 2020;98(2):145-52.
136. Matsumoto H, Miller JW, Vavvas DG. Retinal detachment model in rodents by subretinal injection of sodium hyaluronate. *J Vis Exp*. 2013(79):50660.
137. Zeng R, Zhang Y, Shi F, Kong F. A Novel Experimental Mouse Model of Retinal Detachment: Complete Functional and Histologic Recovery of the Retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2012;53(3):1685-95.
138. Tackenberg MA, Tucker BA, Swift JS, Jiang C, Redenti S, Greenberg KP, Flannery JG, Reichenbach A, Young MJ. Müller cell activation, proliferation and migration following laser injury. *Mol Vis*. 2009;15:1886-96.
139. Gruebbl MM. Eye, Retina - Dysplasia. 2014. In: *Nonneoplastic Lesion Atlas, A guide for standardizing terminology in toxicologic pathology for rodents* [Internet]. National Toxicology Program, [cited July-07 2023]. Available from: https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/special_senses/eye/rtdyspl/index.htm.
140. Mirzayev I, Gündüz AK. Hamartomas of the Retina and Optic Disc. *Turk J Ophthalmol*. 2022;52(6):421-31.
141. Ali SA, Mulita F. Hamartoma. 2023. In: *StatPearls* [Internet] [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, [cited July-07 2023]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32965969/>.
142. Shields JA. Tumors and pseudotumors of the optic disc. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*. 2000;78(2):156-63.
143. Chae B, Dhrami-Gavazi E, Dansingani KK, Freund KB, Lee W, Yannuzzi LA. Multimodal imaging of combined hamartoma of the retina and retinal pigment epithelium associated with an acquired vitelliform lesion. *International Journal of Retina and Vitreous*. 2015;1(1):23.
144. Kaprinis K, Bobat H, De Salvo G. MultiColor(TM) imaging in combined hamartoma of the retina and retinal pigment epithelium. *Eye (Lond)*. 2018;32(9):1478-82.
145. Ramtohul P, Chehaibou I, Bonnin S. Retinal astrocytic hamartoma vascular network on swept-source optical coherence tomography angiography. *Can J Ophthalmol*. 2022;57(6):e201.
146. Chui TY, Thibos LN, Bradley A, Burns SA. The mechanisms of vision loss associated with a cotton wool spot. *Vision Res*. 2009;49(23):2826-34.
147. Mahdjoubi A, Bousnina Y, Barrande G, Bensmaine F, Chahed S, Ghezzaz A. Features of cotton wool spots in diabetic retinopathy: a spectral-domain optical coherence tomography angiography study. *International Ophthalmology*. 2020;40(7):1625-40.
148. Core M. Retina & RPE Histopathology2022. Available from: <https://morancore.utah.edu/section-04-ophthalmic-pathology/retina/>. Accessed July-07 2023.
149. Roberts F, Thum CK. Retinal Vascular Disease. 2021 2021//. In: *Lee's Ophthalmic Histopathology* [Internet]. Cham: Springer International Publishing, [cited July-07 2023]; [89-123]. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-030-76525-5_4.
150. Bhatt A, Nguyen C, Mosaed S, Minckler D. Clinical and pathological correlation of cotton wool spots in secondary angle closure glaucoma. *Am J Ophthalmol Case Rep*. 2018;10:192-5.
151. Retina. 9. Available from: <https://entokey.com/retina-3/>. Accessed July-07 2023.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Inga-Marie Pompös, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Reproduzierbarkeit von Tiermodellen Fallbeispiel eines Modells für Diabetische Retinopathie (DR) in transgenen TetO-Ratten“ (Reproducibility of animal models Case report of a model for diabetic retinopathy (DR) in transgenic TetO rats) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Künzel, S.E., Pompös, I.M., Flesch, L.T.M., Frentzel, D.P., Knecht, V.A., Skosyrski, S., Rübsam, R., Dreher, F., Kociok, N., Schütte, M., Dubrac, A., Lange, B., Yaspo, M.L., Lehrach, H., Strauß, O., Joussen, A.M., Zeitz, O.: **Exploring the Impact of Saccharin on Neovascular Age-Related Macular Degeneration: A Comprehensive Study in Patients and Mice.** Invest Ophthalmol Vis Sci. 2024 Apr 1;65(4):5. DOI: [10.1167/iov.65.4.5](https://doi.org/10.1167/iov.65.4.5)

Alfaar, A.S., Stürzbecher, L., Diedrichs-Möhring, M., Lam, M., Roubex, C., Ritter, J., Schumann, K., Annamalai, B., Pompös, I.M., Rohrer, B., Sennlaub, F., Reichhart, N., Wildner, G., Strauß, O.: **FoxP3 expression by retinal pigment epithelial cells: transcription factor with potential relevance for the pathology of age-related macular degeneration.** J Neuroinflammation. 2022;19(1):260. DOI: [10.1186/s12974-022-02620-w](https://doi.org/10.1186/s12974-022-02620-w)

Boyras, B., Saatz, J., Pompös, I.M., Gad, M., Dervede, J., Maier, A.K.B., Moscovitz, O., Seeberger, P.H., Traub, H., Tauber, R.: **Imaging Keratan Sulfate in Ocular Tissue Sections by Immunofluorescence Microscopy and LA-ICP-MS.** ACS Appl Bio Mater. 2022;5(2):853. DOI: [10.1021/acsabm.1c01240](https://doi.org/10.1021/acsabm.1c01240)

Pahlitzsch, M., Fritsche-Guenther, R., Pompös, I., Pohlmann, D., Maier, A.K.B., Winterhalter, S., Erb, C., Rübsam, A.: **Correlation of NUCB2/Nesfatin-1 with Cytokine Levels in Primary Open-Angle Glaucoma.** Clin Ophthalmol. 2021;15:2505. DOI: [10.2147/OPHTH.S307379](https://doi.org/10.2147/OPHTH.S307379)

Tsang, J.K.W., Wolf, S.A., Pompoes, I.M., Joussen, A.M., Lam, W.C., Yang, D., Lo, A.C.Y.: **Potential Effects of Nutraceuticals in Retinopathy of Prematurity.** Life. 2021;11(2). DOI: [10.3390/life11020079](https://doi.org/10.3390/life11020079)

Danksagung

An dieser Stelle danke ich zunächst Frau PD Dr. rer. nat. Susanne Wolf, meiner Erstbetreuerin. Denn ihr habe ich es zu verdanken, dass ich seit einem Praktikum während des Masterstudiums im Forschungslabor der Klinik für Augenheilkunde am CVK arbeiten darf. Für diese Chance und die damit verbundenen Erfahrungen, die meinen Lebensweg entscheidend geprägt haben, bin ich sehr dankbar. Susanne hat meine Arbeit in all den Jahren stets befürwortet, meinen Ehrgeiz befeuert und mir viel Vertrauen und großen Handlungsraum für die selbstständige Umsetzung entgegengebracht.

Ein herzlicher Dank gilt auch Frau Univ.-Prof. Dr. med. Antonia Joussem, dass sie als Direktorin der Charité-Augenklinik die Zweitbetreuung meiner Arbeit übernommen hat. Ich bedanke mich für die Zustimmung und das positive Feedback, welches sie mir stets entgegengebracht hat und dafür, dass sie sich sogar während kostbarer freier Weihnachtstage die Zeit für Korrekturlesungen und konstruktive Kritik genommen hat.

Ebenso möchte ich mich bei meiner dritten Betreuerin Frau Dr. med. Anne Rübsam bedanken. Ihr unermüdlicher Fleiß und Ehrgeiz waren mir stets ein Vorbild. Ihrem DFG-Antrag verdanke ich das Thema und die Finanzierung meiner Doktorstelle und ich danke Anne herzlichst, dass sie mich, trotz stressigem Klinikalltag, stets nach besten Kräften unterstützt und supportet hat.

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Olaf Strauß, dem Leiter des Labors für experimentelle Ophthalmologie, gebührt mein besonderer Dank dafür, dass er mir mit seinem Fachwissen zur Seite stand und durch zielführende Diskussionen viel positiven Einfluss auf meine Arbeit genommen hat. Professor Strauß hat mich in jeder Hinsicht unterstützt und gefördert. Seine konstruktiven Anregungen waren ausschlaggebend für neue Ansätze der inhaltlichen Ausrichtung meiner Arbeit. Zudem hat die positive Atmosphäre der Zusammenarbeit, die er in seiner Arbeitsgruppe aufrechterhält, mein Durchhaltevermögen beim Fertigstellen dieser Dissertation sehr gekräftigt.

Von meinen geschätzten Kollegen gilt der größte Dank Herrn Dr. rer. nat. Norbert Kociok, dem besten „Büro-Partner“ den man sich wünschen kann. Er hatte stets mehr Geduld mit mir als ich mit ihm und war mir während meiner gesamten Zeit an der Charité ein bedingungslos hilfsbereiter Ansprechpartner, der es einem leicht gemacht hat, Hilfe anzunehmen. Ohne seine Käsebrote, hätte ich manch langen Tag im Labor nicht überlebt; aber mehr als jedes Käsebrot es könnte, haben mich sein Beistand und seine tatkräftige Unterstützung gestärkt.

Für die Unterstützung während meiner Promotion möchte ich mich zudem bei Frau Dr. med. Nadine Reichhart herzlich bedanken, die mehrfach ihre Pausen opferte, um den Fortschritt meiner Arbeit bei einem Kaffee zu diskutieren. Auch haben mich ihre Korrekturlesungen und konstruktiven Vorschläge sehr vorangebracht.

Eine Unterstützung während der letzten Jahre war auch meine „Mitdotorandin“ Andjela Sekulic. Bei ihr möchte ich mich für die gute Laune im Labor und ihr offenes Ohr und Mitgefühl in Krisensituationen bedanken. Ein Dank geht zudem an meinen Kollegen Sergej Skosyrski, für seine helfenden Hände im Labor.

Die Arbeit mit unserem Tiermodell wäre darüber hinaus undenkbar ohne das Tier-Pflegepersonal der FEM, dem ich an dieser Stelle für die gute, verlässliche und freundliche Kommunikation und Zusammenarbeit danken möchte. Dieser Dank gilt insbesondere auch unserem Tierschutzbeauftragten, Dr. vet. André Dülsner, der meine Sorgen stets ernst genommen hat und mir bezüglich der Tierversorgung beratend zur Seite stand.

Fern der Arbeit danke ich meinen geliebten Geschwistern, Nina, Simon und Frederik und meinen geliebten Eltern, Gisela und Klaus, für die gemeinsamen unbeschwerten Zeiten, in denen ich die Arbeit auch mal ruhen lassen konnte. Euere lieben Worte waren mir auch in über 500 Kilometer Entfernung ein wichtiger Halt.

Ein außerordentlicher Dank gilt meinem lieben Freund Dr. Thomas Krüger. Ihm habe ich den Mut, das Selbstvertrauen und die Motivation für solch ein Vorhaben zu verdanken. Neben einem stets offenen Ohr, für all meine Sorgen und Nöte, wusste Thomas in jeder Lebenslage einen hilfreichen Ratschlag. Danke Thomas, dass auf Dich jederzeit Verlass ist und Du mich, wenn es sein muss, auch zu meinem Glück zwingst.

Bescheinigung des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBIKE)

Direktor: Prof. Dr. Frank Konietzschke

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171
frank.konietzschke@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Name, Vorname: **Pompös, Inga-Marie**
Emailadresse: **inga.pompoes@charite.de**
Matrikelnummer: **[REDACTED]** (Personalnr.)
PromotionsbetreuerIn: **Frau PD Dr. rer. nat. Susanne Wolf**
Promotionsinstitution / Klinik: **Klinik für Augenheilkunde CVK**

Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Frau *Inga-Marie Pompös* innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBIKE) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

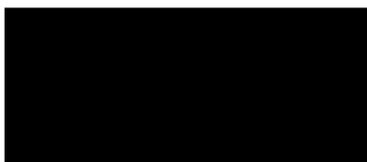
- Termin 1: 8.5.2023
- Termin 2: 30.5.2023

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Auswahl von Hypthesen
- Probleme beim multiplen Testen / explorativer Charakter der Studie
- Umgang mit kleiner Fallzahl und Darstellungsmöglichkeiten

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum:



Name des Beraters\ der Beraterin:

Unterschrift BeraterIn, Institutsstempel


UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN
Institut für Biometrie und
Klinische Epidemiologie
Campus Charité Mitte
Charitéplatz 1 | D-10117 Berlin
Sitz: Reinhardtstr. 58