

**Etablierung von standardisierten  
Probennahmeplänen für Organe und Gewebe  
porziner Tiermodelle in der biomedizinischen  
Forschung**

von

Barbara Alexandra Albl, geb. Hofmann

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

**Etablierung von standardisierten Probennahmeplänen  
für Organe und Gewebe porziner Tiermodelle  
in der biomedizinischen Forschung**

von Barbara Alexandra Abl, geb. Hofmann  
aus Rosenheim

München 2016

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Institut für Tierpathologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Mitbetreuung durch: Dr. Andreas Blutke

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

**Korreferent/en:** Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

**Tag der Promotion: 16. Juli 2016**

*Meiner Familie*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Wissenschaftlicher Hintergrund</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1 Schweine als Tiermodelle in der biomedizinischen Forschung</b> .....	<b>4</b>
2.1.1 Geschichtlicher Überblick .....	4
2.1.2 Vor- und Nachteile porziner Tiermodelle im Vergleich zu anderen Tiermodellspezies.....	5
2.1.3 Verwendung von Hausschweinen und Minipigs in der biomedizinischen Forschung .....	8
2.1.3.1 In der biomedizinischen Forschung verwendete Hausschweinrassen.....	8
2.1.3.2 In der biomedizinischen Forschung verwendete Minipigs .....	8
2.1.4 Gentechnische Modifikationstechniken beim Schwein .....	11
2.1.4.1 DNA-Mikroinjektion.....	11
2.1.4.2 Spermienvermittelter Gentransfer.....	12
2.1.4.3 Lentiviraler Gentransfer .....	13
2.1.4.4 Somatischer Zellkerntransfer.....	13
2.1.4.5 Moderne Verfahren des sogenannten „Genome Editing“ .....	14
2.1.5 Einsatzgebiete porziner Tiermodelle in der biomedizinischen Forschung	16
2.1.5.1 Konventionelle Schweinemodelle .....	16
2.1.5.1.1 Schweinemodelle in der Grundlagenforschung .....	16
2.1.5.1.2 Schweinemodelle in der chirurgischen Forschung .....	16
2.1.5.2 Gentechnisch modifizierte Schweinemodelle .....	17
2.1.5.2.1 Gentechnisch modifizierte Schweinemodelle in der Diabetesforschung .....	17
2.1.5.2.2 Gentechnisch modifizierte Schweinemodelle neurodegenerativer Erkrankungen .....	19
2.1.5.2.3 Gentechnisch modifizierte Schweinemodelle in der Krebsforschung .	20
2.1.5.2.4 Gentechnisch modifizierte Schweinemodelle für seltene, monogenetische Erbkrankheiten des Menschen .....	21
2.1.5.2.5 Gentechnisch modifizierte Schweine in der Xenotransplantationsforschung .....	23
<b>2.2 Organ- und Gewebeprobennahme bei Tiermodellen in der     biomedizinischen Forschung</b> .....	<b>25</b>
2.2.1 Grundlegende Überlegungen zur Organ- und Gewebeprobennahme: Untersuchungsziele, Untersuchungsumfang und Analyseverfahren .....	25

2.2.2 Generelle Anforderungen an Probenmaterial und Probennahmeverfahren in der biomedizinischen Forschung: Repräsentativität, Reproduzierbarkeit und Effizienz.....	27
2.2.3 Konsequenzen der Anforderungen an Proben für die praktische Durchführung einer Probennahme: Probenanzahl, Probengröße, Probenlokalisierung, Reihenfolge der Probenentnahme .....	32
2.2.4 Unterschiedliche Probennahmeverfahren .....	34
2.2.4.1 Nicht-zufällige Probennahme.....	35
2.2.4.2 Einfache zufällige Probennahme (= independent random sampling) ....	36
2.2.4.3 Systematisch zufällige Probennahme (= systematic uniform random sampling).....	38
2.2.5 Verschiedene systematisch zufällige Probennahmeverfahren in der biomedizinischen Forschung .....	39
2.2.6 Etablierte Probennahmepläne für Organ- und Gewebeproben in der biomedizinischen Forschung bei Nagetier- und Nicht-Nager-Versuchstierspezies .....	40
2.2.7 Quantitative Stereologie .....	43
2.2.8 Orientierung der Proben für quantitativ stereologische Untersuchungen: IUR und VUR Proben .....	44
<b>3 Publikation .....</b>	<b>48</b>
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>290</b>
<b>4.1 Grundlagen und Ziele der vorliegenden Arbeit .....</b>	<b>290</b>
<b>4.2 Methodik und Aufbau der Probennahmepläne.....</b>	<b>294</b>
<b>4.3 Optimale Nutzung des von einem Tier generierbaren Probenmaterials für     unterschiedliche Analyseverfahren.....</b>	<b>299</b>
<b>4.4 Entwicklung und praktische Erprobung der Probennahmeprotokolle:     Etablierung der „Munich-MIDY-Pig-Biobank“ .....</b>	<b>300</b>
<b>4.5 Ausblick.....</b>	<b>302</b>
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>303</b>
<b>6 Summary .....</b>	<b>305</b>
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>307</b>
<b>8 Beiträge auf wissenschaftlichen Kongressen .....</b>	<b>317</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>318</b>

### 1 Einleitung

Tiermodelle spielen in der biomedizinischen Forschung seit jeher eine wichtige Rolle. In vielen Bereichen der Wissenschaft werden vor allem „klassische“ murine Tiermodelle genutzt und sind seit langem bestens etabliert (Aigner *et al.*, 2010). Daneben finden aber auch weitere Tiermodellspezies, wie etwa das Schwein, eine immer größere Beachtung. Aufgrund der dem Menschen sehr ähnlichen Physiologie und Körperkondition stellt das Schwein ein ideales Tiermodell für die Grundlagenforschung, die Erforschung der Pathogenese verschiedener Krankheiten sowie für die Entwicklung und Etablierung neuer Therapien und Medikamente dar (Aigner *et al.*, 2010). Fortschritte auf dem Gebiet gentechnischer Methoden ermöglichten die Erstellung vielversprechender Schweinemodelle unter anderem für monogenetische Erbkrankheiten, metabolische und neurodegenerative Erkrankungen, aber auch für die Krebs- und Xenotransplantationsforschung (Aigner *et al.*, 2010, Gun and Kues, 2014, Klymiuk *et al.*, 2010, Prather *et al.*, 2013, Whitelaw *et al.*, 2016).

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung von standardisierten Probennahmeplänen zur Gewinnung von Organ- und Gewebeproben von Schweinen, um der wachsenden Bedeutung porziner Tiermodelle in der biomedizinischen Forschung und der damit verbundenen Anforderung an Repräsentativität und Reproduzierbarkeit bei der Probengewinnung gerecht zu werden. Im Gegensatz zu Nagetiermodellen wurden für das Schwein bisher keine entsprechenden, standardisierten Probennahmeprotokolle etabliert. Um die Probennahme beim Schwein, vergleichbar mit den bereits in der Toxikopathologie vorhandenen Protokollen zur Probennahme bei Mäusen oder Ratten (Kittel *et al.*, 2004, Morawietz *et al.*, 2004, Ruehl-Fehlert *et al.*, 2003) zu standardisieren und



durch systematische Probennahme repräsentatives und vergleichbares Probenmaterial zu generieren, wurden detaillierte Protokolle zur Probengewinnung eines weit gefassten Spektrums verschiedener Organe, Gewebe und Körperflüssigkeiten erstellt und getestet. Da bei porzinen Tiermodellen im Vergleich zu Nagermodellen oft nur geringere Tierzahlen zur Verfügung stehen und Schweine nicht so einfach, schnell und kostengünstig wie Mäuse oder Ratten für zusätzliche Analysen nachgezüchtet werden können, sind die einzelnen Tiere eines Schweinmodelles und die von ihnen stammenden, beziehungsweise die von ihnen zu generierenden Gewebe- und Organproben, besonders wertvoll. Dies ist insbesondere bei solchen Studien der Fall, in denen Tiere fortgeschrittenen Alters, etwa bei der Erforschung prolongierter Krankheitsverläufe, untersucht werden. Bei der Erstellung der Probennahmeprotokolle wurde daher besonderer Wert auf die optimale Ausnutzung des gesamten Spektrums des in einem einzelnen Schwein vorhandenen und damit potentiell nutzbaren Probenmaterials gelegt. Die Probennahmeprotokolle umfassen die Erstellung von Probenmaterial für ein breites Untersuchungsspektrum, welches sowohl für morphologische als auch für molekularbiologische und biochemische Analysen geeignet ist, und berücksichtigen auch die „vorausschauende“ Gewinnung von Probenmaterial für zunächst nicht geplante, aber eventuell im Laufe der Studie notwendig werdende Analyseverfahren und Untersuchungen. Für jedes Organ und Gewebe wurden unterschiedlich umfangreiche Probennahmeprotokolle (Typ-I, Typ-II und Typ-III) erstellt, welche bezüglich der Auswahl, Anzahl und Prozessierung der zu generierenden Proben an die Anforderungen eines jeweiligen Forschungszweckes angepasst werden können. Zusätzlich werden in den vorliegenden Probennahmeprotokollen für jedes Organ und Gewebe relevante anatomische Grundlagen und Präparationstechniken,

grundlegende Untersuchungsparameter sowie der einzukalkulierende Zeit- und Personalaufwand dargelegt.

Die jüngst im Fachjournal *Toxicologic Pathology* veröffentlichten Probennahmepläne (Publikation siehe Kapitel 3) wurden im Zusammenhang mit der Erstellung der „Munich-MIDY-Pig-Biobank“, einer umfangreichen Gewebe- und Organprobensammlung eines gentechnisch modifizierten diabetischen Schweinemodells, am Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München entwickelt sowie praktisch getestet und umgesetzt (Abbott, 2015).

## 2 Wissenschaftlicher Hintergrund

### 2.1 Schweine als Tiermodelle in der biomedizinischen Forschung

#### 2.1.1 Geschichtlicher Überblick

Aufgrund der Ähnlichkeit zum Menschen in Anatomie, Physiologie und Metabolismus spielen Schweine als Tiermodelle in der biomedizinischen Forschung bereits seit einigen Jahrzehnten eine wichtige und stetig bedeutsamer werdende Rolle (Aigner *et al.*, 2010, Lunney, 2007, Swindle *et al.*, 1994). In der Grundlagenforschung, auch als Alternative für den Einsatz von anderen Großtiermodellen wie zum Beispiel Hunde und Primaten, werden Schweine bereits seit etwa Mitte des letzten Jahrhunderts vor allem dazu genutzt, die physiologischen Funktionen einzelner Organsysteme und die Pathogenese verschiedener Erkrankungen beim Menschen besser verstehen zu können (Prather *et al.*, 2013, Swindle *et al.*, 1994). Ein Beispiel hierfür stellen die sogenannten „Göttingen Minipigs“ dar, welche an der Universität Göttingen in den 1960er Jahren speziell zu Versuchszwecken gezüchtet wurden und bis heute vielfältig in der Forschung genutzt werden (Jeppesen and Skydsgaard, 2015). Auch in der chirurgischen Forschung und in der Ausbildung von medizinischem Fachpersonal werden Schweine bereits seit mehreren Jahrzehnten eingesetzt (Lunney, 2007, Swindle *et al.*, 2012, Swindle *et al.*, 1994). Fortschritte auf dem Gebiet der Gentechnik wurden seit etwa Mitte der 80er Jahre, bei Schweinen hauptsächlich in der Landwirtschaft, beispielsweise zur Optimierung der Fleischproduktion oder im Zusammenhang mit der Widerstandsfähigkeit gegen bestimmte Krankheiten, genutzt (Gun and Kues, 2014, Hammer *et al.*, 1985, Whyte and Prather, 2011). Die Weiterentwicklung der gentechnischen Methoden in den letzten dreißig Jahren und die Sequenzierung des gesamten Schweinegenoms durch Groenen *et al.* im Jahr 2011 (Groenen *et al.*, 2012) ermöglichten die Erstellung von

verschiedenen gentechnisch modifizierten Schweinemodellen und ihre Verwendung in der translationalen medizinischen Forschung (Gun and Kues, 2014, Klymiuk *et al.*, 2015). In Ergänzung zu Nagermodellen konnten in den letzten Jahren zahlreiche „maßgeschneiderte“ gentechnisch modifizierte Schweinemodelle für diverse humane Erkrankungen entwickelt werden (siehe Kapitel 2.1.5.2) (Aigner *et al.*, 2010, Gun and Kues, 2014, Klymiuk *et al.*, 2010, Klymiuk *et al.*, 2013, Klymiuk *et al.*, 2012b, Kurome *et al.*, 2015, Lunney, 2007, Luo *et al.*, 2012, Prather *et al.*, 2013, Renner *et al.*, 2013, Renner *et al.*, 2010, Streckel *et al.*, 2015, Wolf *et al.*, 2014). Obwohl in der biomedizinischen Forschung bis heute hauptsächlich Nager als Tiermodell genutzt werden, etablieren sich porzine Tiermodelle stetig weiter. Diese Schweinemodelle und ihre Nutzung in der Erforschung humaner Erkrankungen sowie der damit verbundenen Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten, versprechen in Zukunft weitreichende Erkenntnisse und Fortschritte in der translationalen Medizin zu liefern (Aigner *et al.*, 2010, Luo *et al.*, 2012).

### **2.1.2 Vor- und Nachteile porziner Tiermodelle im Vergleich zu anderen Tiermodellspezies**

Die vorhandene Ähnlichkeit des Schweines zum Menschen in Anatomie, Physiologie und Metabolismus stellt, im Vergleich zu Nagetieren oder anderen Spezies wie Hunde oder Katzen, den Hauptvorteil der porzinen Tiermodelle in der biomedizinischen Forschung dar. Durch die dem Menschen vergleichbare Größe des Schweines, lassen sich in der Humanmedizin zu verwendende Untersuchungsprozeduren und Behandlungstechniken entwickeln und optimieren und machen so das Schwein zu einem geeigneten Tiermodell in der Chirurgie, bei der Entwicklung bildgebender Verfahren und in zahlreichen weiteren Bereichen (Aigner *et al.*, 2010, Swindle *et al.*, 1994). Die Anatomie und Funktion des

Gastrointestinaltraktes des monogastrisch omnivoren Schweines, die Morphologie des Pankreas, des Herzkreislaufsystems, der Nieren, der Haut und weiterer Organsysteme und Gewebe, sowie die Organentwicklung haben große Ähnlichkeit mit dem Menschen (Lunney, 2007, Swindle *et al.*, 2012). Schweine werden vor allem in Gebieten eingesetzt, in denen der Einsatz muriner Tiermodelle aufgrund ihrer geringen Körpergröße, der kurzen Lebensspanne oder der nicht ausreichenden Widerspiegelung von beim Menschen vorkommenden Krankheitsphänotypen nur mit Einschränkungen möglich ist (Aigner *et al.*, 2010, Luo *et al.*, 2012). Schweine weisen bei bestimmten Erkrankungen dem Menschen sehr ähnliche phänotypische Merkmale und molekulare Pathogenesemechanismen auf, welche beispielsweise für die Erforschung und Entwicklung neuer Medikamente und Therapien von Bedeutung sind (Lunney, 2007, Luo *et al.*, 2012). Ein weiterer, nicht zu vernachlässigender Vorteil porziner Tiermodelle sind die weitaus geringeren ethischen Bedenken bei der Verwendung von Schweinen als Versuchstiere, im Gegensatz zu beispielsweise Primaten oder Hunden (Jeppesen and Skydsgaard, 2015, Kemter and Wolf, 2015). Die im Vergleich zu Primaten oder Hunden früh einsetzende sexuelle Reife, das kurze Generationsintervall, hohe Wurfzahlen und die asaisonale Fortpflanzung erleichtern die effiziente Erstellung und Nutzung von porzinen Tiermodellen nicht nur in reproduktionsmedizinischen Studien (Aigner *et al.*, 2010, Lunney, 2007). Ebenso ist die Infrastruktur der Haltung, Fütterung und des Hygienemanagements in der Schweinehaltung sehr gut etabliert. Die gentechnischen Modifikationstechniken wurden in den letzten Jahren beim Schwein, im Gegensatz zu Primaten und Hunden, intensiv weiterentwickelt und erfolgreich eingesetzt (Aigner *et al.*, 2010, Lunney, 2007). Die große Ähnlichkeit des porzinen Genoms zu dem des Menschen stellt eine gute Voraussetzung für die Erforschung genetisch bedingter Erkrankungen des

Menschen im Tiermodell Schwein dar (Groenen *et al.*, 2012, Whyte and Prather, 2011).

Die Nachteile der Verwendung von Schweinen als Tiermodelle gegenüber der von Nagern sind vor allem die höheren Kosten und der höhere Arbeitsaufwand, die bei der Entwicklung sowie bei der Aufzucht und Haltung der Tiere entstehen (Aigner *et al.*, 2010). Während Nager auf vergleichbar geringem Raum in Käfigen gehalten werden können, werden für die Haltung von Schweinen größere Stallungen oder Einrichtungen benötigt, welche zudem auch mit höherem Arbeits-, Zeit- und Kostenaufwand verbunden sind (Swindle *et al.*, 1994) (TierSchG<sup>1</sup>, SchHaltHygV<sup>2</sup>, TierSchNutztV<sup>3</sup>, TierSchVersV<sup>4</sup>).

Die im Vergleich zu Nagern höhere Lebenserwartung der Schweine birgt sowohl Vor- als auch Nachteile. Nager haben zwar nur eine relativ kurze Lebensdauer von wenigen Jahren, sind aber leichter zu halten, zu handhaben und schneller nachzuzüchten. Bestimmte Krankheitserscheinungen lassen sich aber erst mit Zunahme des Alters der Tiere leichter mit denen des Menschen vergleichen und ermöglichen beispielsweise die Untersuchung von Spätfolgen langsam progredient verlaufender Erkrankungen im Schweinemodell (Holm *et al.*, 2016).

---

<sup>1</sup>TierSchG: Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 8 Absatz 13 des Gesetzes vom 3. Dezember 2015 (BGBl. I S. 2178) geändert worden ist. Ausfertigungsdatum: 24.07.1972

<sup>2</sup>SchHaltHygV: Schweinehaltungshygieneverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. April 2014 (BGBl. I S. 326), die zuletzt durch Artikel 5 der Verordnung vom 29. Dezember 2014 (BGBl. I S. 2481) geändert worden ist.

<sup>3</sup>TierSchNutztV: Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 22. August 2006 (BGBl. I S. 2043), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 5. Februar 2014 (BGBl. I S. 94) geändert worden ist.

<sup>4</sup>TierSchVersV: Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 22. August 2006 (BGBl. I S. 2043), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 5. Februar 2014 (BGBl. I S. 94) geändert worden ist.

Die höhere Lebenserwartung von Schweinen (bis zu 15 Jahre) bringt aber im Gegenzug auch erhöhte Haltungskosten mit sich und macht die einzelnen Tiere und das von ihnen gewonnene Probenmaterial sehr wertvoll (Holm *et al.*, 2016). Die Aufzucht und Produktion weiterer Tiere für bestimmte Studienzwecke ist sehr zeitaufwendig und nachgezüchtete Tiere sind nicht wie bei Nagern, schon nach kurzer Zeit wieder verfügbar (Lunney, 2007). Ein weiterer Nachteil von Schweinmodellen im Vergleich zu Nagermodellen stellt zudem der bislang meist nicht genau definierte genetische Hintergrund der verwendeten Schweine-Zuchtlinien dar (siehe auch Kapitel 2.1.3) (Aigner *et al.*, 2010).

### **2.1.3 Verwendung von Hausschweinen und Minipigs in der biomedizinischen Forschung**

#### **2.1.3.1 In der biomedizinischen Forschung verwendete Hausschweinrassen**

Phylogenetisch gehören alle Hausschweinrassen, mit inbegriffen die sogenannten Minipigs, als domestizierte Form des Wildschweins zur Unterart *sus scrofa domestica* (Linnaeus, *Systema Naturae* 1758). Die wichtigsten Hausschweinrassen, welche in der biomedizinischen Forschung eingesetzt werden sind Pietrain, Duroc, Hampshire und Deutsche Landrasse sowie Hybriden und Kreuzungen dieser Rassen (Smith and Swindle, 2006). Im Gegensatz zu „Labormäusen“ ist der genetische Hintergrund von in der biomedizinischen Forschung genutzten Hausschweinen meist nicht genau definiert (Aigner *et al.*, 2010).

#### **2.1.3.2 In der biomedizinischen Forschung verwendete Minipigs**

Minipigs (auch Miniaturschweine genannt) sind speziell auf Kleinwüchsigkeit gezüchtete Hausschweine. Sie werden neben den „normalen“ Hausschweinrassen in der Forschung vielseitig genutzt. Vor allem in der Toxikopathologie werden Minipigs häufiger verwendet als normale Schweinerassen (Aigner *et al.*, 2010, Glerup *et al.*,

2013, Luo *et al.*, 2012). Minipigs weisen gegenüber den großen, schweren Schweinerassen den Vorteil auf langsamer zu wachsen und ein Endgewicht von lediglich 45-100 Kilogramm zu erreichen, was die Sicherheit und den Umgang mit den Tieren und deren Haltung erleichtert und die entstehenden Haltungskosten reduziert (Glerup *et al.*, 2013, Swindle *et al.*, 2012, Swindle *et al.*, 1994). Die Unterschiede zwischen Minipigs und den in der biomedizinischen Forschung verwendeten Hausschweinerassen liegen vor allem in der geringeren Wachstumsrate und der geringeren Größe zu Beginn der sexuellen Reife, nicht jedoch in morphologisch-anatomischen oder physiologischen Unterschieden (Swindle *et al.*, 2012). Minipigs verschiedener Altersstufen und mit definiertem genetischen Hintergrund werden von Firmen kommerziell angeboten und können für verschiedene Studien und Forschungszwecke erworben werden. Hierbei sind auch spezifisch pathogen frei (SPF) gehaltene Minipigs verfügbar (Aigner *et al.*, 2010, Swindle *et al.*, 2012). Die hauptsächlich genutzten Minipig-Rassen sind Yucatan, Hanford, Sinclair und Göttingen Minipigs (Swindle *et al.*, 2012, Swindle *et al.*, 1994). Letztere wurden an der Universität Göttingen in den 1960er Jahren speziell zu Versuchszwecken gezüchtet und verfügen deshalb über einen sehr gut definierten genetischen Hintergrund (Aigner *et al.*, 2010, Glerup *et al.*, 2013, Jeppesen and Skydsgaard, 2015). Minipigs können für Versuchszwecke ähnlich wie Hunde gehalten werden, wachsen aber schneller als diese und eignen sich, aufgrund der frühen Geschlechtsreife im Alter von 4-6 Monaten, sehr gut für Studien, in denen reproduktionstechnische Aspekte im Vordergrund stehen (Swindle *et al.*, 2012). Sie werden aber auch für pharmakologische und toxikologische Forschungszwecke vielseitig eingesetzt (Aigner *et al.*, 2010, Glerup *et al.*, 2013, Swindle *et al.*, 2012). In diesen Studien werden Minipigs, im Gegensatz zu den großen Schweinerassen, unter anderem aufgrund des einfacheren Umgangs, auch in Bezug auf die



verschiedenen Verabreichungswege von Medikamenten, eingesetzt (Glerup *et al.*, 2013, Gun and Kues, 2014). Im Gegensatz zu den Hausschweinen ist die benötigte Wirkstoffmenge bei Medikamententests durch das viel geringere Körpergewicht der Tiere erheblich reduziert, wodurch viele Versuche deutlich kostengünstiger durchzuführen sind (Glerup *et al.*, 2013, Swindle *et al.*, 2012). Von internationalen Zulassungsbehörden wie der European Medicines Agency (EMA), der US Food and Drug Administration (FDA), der International Organisation for Standardisation (ISO), und der Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) sind Minipigs für den Einsatz in toxikologischen und pharmakologischen Studien zugelassen (Aigner *et al.*, 2010, Glerup *et al.*, 2013). Minipigs werden in toxikopathologischen Studien unter anderem für dermale, orale, intravenöse, subkutane, embryofetale und juvenile Toxizitätstests sowie in Wundheilungsstudien verwendet (Glerup *et al.*, 2013). Ein weiteres Beispiel ist das Münchner Miniaturschwein Troll, welches bereits seit mehreren Jahrzehnten in der Melanomforschung genutzt wird. Bei diesen Schweinen konnte eine genetische Komponente bei der Entwicklung von kutanen Pigmentzellanomalien nachgewiesen werden (Müller *et al.*, 1995, Wanke, 2013).

### 2.1.4 Gentechnische Modifikationstechniken beim Schwein

In den letzten Jahrzehnten haben neue Methoden in der Gentechnik die Entwicklung von „maßgeschneiderten“ Schweinemodellen für die Erforschung humaner Erkrankungen ermöglicht und vorangetrieben (siehe Kapitel 2.1.5.2) (Aigner *et al.*, 2010, Gun and Kues, 2014, Klymiuk *et al.*, 2010, Klymiuk *et al.*, 2012a, Klymiuk *et al.*, 2015, Lunney, 2007, Luo *et al.*, 2012, Renner *et al.*, 2013, Wolf *et al.*, 2014). Die folgenden Abschnitte gewähren einen kurzgefassten allgemeinen Überblick über etablierte Methoden zur Erstellung gentechnisch modifizierter Schweinemodelle. Hierzu zählen die DNA-Mikroinjektion, der spermienvermittelte Gentransfer, der lentivirale Gentransfer, der somatische Zellkerntransfer (sog. „Klonen“) und moderne Verfahren des sogenannten „Genome Editing“. Eine umfassende Übersicht gentechnisch modifizierter Schweinemodelle für verschiedene Erkrankungen sowie zu den gentechnischen Modifikationstechniken, mit welchen diese Modelle erstellt wurden, findet sich in der von Luo *et al.* 2012 veröffentlichten Übersichtsarbeit „Genetically modified pigs for biomedical research“ (Luo *et al.*, 2012).

#### 2.1.4.1 DNA-Mikroinjektion

Die ersten Versuche gentechnischer Modifikation an Säugetieren wurden mithilfe pronukleärer DNA-Mikroinjektion in den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts erfolgreich an Mäusen durchgeführt (Aigner *et al.*, 2010, Hammer *et al.*, 1985). Die Erstellung des ersten transgenen Schweines gelang bereits kurze Zeit später mittels Mikroinjektion eines DNA-Konstruktes (Transgenes) in den Vorkern (Pronukleus) einer befruchteten Eizelle (Brem *et al.*, 1985, Hammer *et al.*, 1985, Luo *et al.*, 2012). Bei der Mikroinjektion werden Transgene mithilfe einer dünnen Glaskapillare extrakorporal in den Pronukleus einer befruchteten Eizelle (Zygote) eines hormonell stimulierten, superovulierten Spendertieres übertragen. Im zweiten Schritt werden die

Zygoten dann in den Eileiter synchronisierter Empfängertiere übertragen (Aigner *et al.*, 2010, Luo *et al.*, 2012). Obwohl diese Technik eine relativ geringe Effizienz besitzt, wurden mit ihrer Hilfe viele verschiedene transgene Schweinemodelle entwickelt (Aigner *et al.*, 2010, Luo *et al.*, 2012). Nachteile der Methode sind vor allem eine vergleichsweise geringe Anzahl an transgenen Ferkeln, da das Transgen nicht immer in das Genom integriert wird und die Integration des Transgens bei den transgenen Nachkommen an zufälligen Orten im Genom erfolgt. Ebenso kann es bei den Nachkommen zu einer Mosaikbildung, das heißt zur Integration des Transgens in nur einige Zellen des Organismus, kommen. Bei der Etablierung von Zuchtlinien des gentechnisch modifizierten Tiermodells werden jedoch keimbahntransgene Tiere, also Tiere, welche das Transgen in Ihren Keimzellen (Spermien und Eizellen) tragen und das Transgen an ihre Nachkommenschaft weiter vererben, benötigt (Aigner *et al.*, 2010, Luo *et al.*, 2012, Whyte and Prather, 2011).

### 2.1.4.2 Spermienvermittelter Gentransfer

Der spermienvermittelte Gentransfer beruht auf der Eigenschaft von Spermien, exogene DNA-Moleküle zu binden und diese so bei der Befruchtung in die Eizelle zu übertragen. Spermien werden mit exogenen DNA-Molekülen „geladen“ und dann mittels künstlicher Besamung in den Uterus von geeigneten Empfängertieren übertragen (Aigner *et al.*, 2010, Luo *et al.*, 2012). Ebenso ist eine intrazytoplasmatische Injektion der Spermien (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) in die Eizelle (in vitro) möglich (Kurome *et al.*, 2006). Vorteil des spermienvermittelten Gentransfers ist die relativ kostengünstige Durchführung sowie der Verzicht auf den Umgang mit Embryonen (Luo *et al.*, 2012). Die Nachteile sind mit denen der DNA-Mikroinjektion (siehe Kapitel 2.1.4.1) vergleichbar.

### 2.1.4.3 Lentiviraler Gentransfer

Beim lentiviralen Gentransfer werden Transgene mithilfe von Lentiviren, aus der Familie der Retroviren, in die Zielzellen eingeschleust (Aigner *et al.*, 2010). In den transfizierten Zellen wird die lentivirale RNA revers in DNA transkribiert und dann in das Genom der Zelle integriert. Beim Schwein wird diese Methode häufig eingesetzt und führt zu einer relativ hohen Anzahl an transgenen Ferkeln in einem Wurf (Aigner *et al.*, 2010). Lentiviren können ihr virales Genom auch in nicht teilungsfähige Zellen integrieren, wodurch sich ein breites Anwendungsgebiet ergibt und die Mosaikbildung reduziert wird (Aigner *et al.*, 2010). Die Einschränkungen, die DNA-Mikroinjektion, spermienvermittelter sowie lentiviraler Gentransfer gemeinsam haben, sind vor allem die fehlende Möglichkeit einer Voruntersuchung auf eine erfolgte Integration des Transgens in das Genom und die daraus resultierende relativ geringe Anzahl an transgenen Ferkeln in einem Wurf sowie die zufällige Integration des Transgens an unterschiedlichen Stellen des Genoms und in unterschiedlicher Anzahl (Aigner *et al.*, 2010, Luo *et al.*, 2012, Whyte and Prather, 2011).

### 2.1.4.4 Somatischer Zellkerntransfer

Somatischer Zellkerntransfer (Klonen) ist eine Form der asexuellen Generierung von genetisch identischen Organismen (Kurome *et al.*, 2015, Luo *et al.*, 2012). Die Technik des somatischen Zellkerntransfer in Verbindung mit dem Ziel einer gentechnischen Modifikation in den erzeugten Nachkommen umfasst sechs Schritte: (1) Entkernung (E nukleation) einer Oozyte durch Mikromanipulation, (2) gentechnische Modifizierung von somatischen Spenderzellen (z.B. Fibroblasten), (3) Transfer des Zellkernes der Spenderzelle durch Mikroinjektion in die enukleierte Oozyte, (4) Elektrofusion und Aktivierung der Oozyten *in vitro*, (5) *in vitro* Kultivierung der rekonstruierten Embryonen, (6) Embryotransfer in synchronisierte

Empfängertiere (Aigner *et al.*, 2010, Luo *et al.*, 2012). Somatischer Zellkerntransfer in Verbindung mit der Nutzung von gentechnisch modifizierten Spenderzellen ist die momentan wichtigste Methode um transgene Schweinmodelle für die biomedizinische Forschung zu erstellen (Kurome *et al.*, 2015, Luo *et al.*, 2012). Die Kerne der Spenderzellen werden durch gezielte Veränderungen im Genom, wie zum Beispiel durch das Einfügen von Transgenen, oder das gezielte „Ausschalten“ (knock-out) von bestimmten Genen, gentechnisch modifiziert (Aigner *et al.*, 2010, Prather *et al.*, 2013). Ein großer Vorteil dieser Methode ist es, dass alle generierten Nachkommen/Klone eines gentechnisch modifizierten Schweines dieselbe Genmutation tragen, was durch eine Voruntersuchung der Spenderzellen sichergestellt werden kann. Zusätzlich kommt es beim Klonen nicht zur Mosaikbildung in den Nachkommen (Aigner *et al.*, 2010, Kurome *et al.*, 2015). Das „Klonen“ als asexuelle Vermehrungsmethode von gentechnisch modifizierten Schweinen ist zusätzlich bei nicht auf „natürlichem Wege“ vermehrungsfähigen Tieren, oder bei Tieren, welche vor Erreichen der Fortpflanzungsreife versterben, von großer Bedeutung (Klymiuk *et al.*, 2015).

### 2.1.4.5 Moderne Verfahren des sogenannten „Genome Editing“

„Genome Editing“ bezeichnet gentechnische Modifikationstechniken, bei welchen Restriktionsenzyme (Endonukleasen) zum Einsatz kommen, welche die DNA der Zielzelle an einer vorher bestimmten Zielsequenz schneiden, um so das Genom an dieser Stelle zu verändern (Whitelaw *et al.*, 2016). Die beim „Genome Editing“ verwendeten Systeme bestehen aus einer Domäne, die an einer bestimmten Sequenz der genomischen DNA der Zielzelle bindet, sowie einem Restriktionsenzym, welches die DNA an eben dieser Stelle schneidet. Die Genorte beziehungsweise DNA-Zielsequenzen an denen die Systeme binden, werden dabei im Vorhinein

festgelegt. Die DNA-Doppelstrangbrüche werden mithilfe von zwei natürlichen Reparaturmechanismen, der nicht homologen Endverknüpfung (= non-homologous end joining) und der homologen Rekombination (= homology-directed repair), wieder zusammengefügt. Diese Reparaturmechanismen können dazu genutzt werden, durch gezieltes Ausschalten oder Hinzufügen von DNA-Sequenzen Veränderungen am Schweinegenom vorzunehmen (Klymiuk *et al.*, 2015, Luo *et al.*, 2012, Whitelaw *et al.*, 2016). Die am meisten genutzten „Genome Editing“ Verfahren sind „Clustered regularly interspaced palindromic repeats and CRISPR associated 9 nuclease“ (CRISPR/Cas9), „Transcription activator-like effector nukleasen“ (TALENs), und Zinkfinger nukleasen (Klymiuk *et al.*, 2015, Luo *et al.*, 2012, Whitelaw *et al.*, 2016). Das CRISPR/Cas9-System stammt aus Bakterien, welche dieses zur Abwehr von Viren nutzen (Klymiuk *et al.*, 2015). Das System besteht aus der CRISPR-Komponente, welche mithilfe einer individuell erstellten Primersequenz (vorderer Teil der RNA, der die DNA-Zielsequenz erkennt) an die DNA-Zielsequenz bindet, und aus der Cas9-Endonuklease, welche den DNA-Doppelstrang an der gewünschten Zielsequenz schneidet (Klymiuk *et al.*, 2015, Whitelaw *et al.*, 2016). Während Zinkfinger und TALENs sehr aufwendige Methoden sind, ist die CRISPR/Cas9-Methode relativ einfach, schnell und kostengünstig durchzuführen und stellt das zurzeit am häufigsten genutzte „Genome Editing“ Verfahren dar (Klymiuk *et al.*, 2015, Whitelaw *et al.*, 2016). Mit CRISPR/Cas9 können auch mehrere Mutationen im Genom gleichzeitig und gezielt durchgeführt werden (Klymiuk *et al.*, 2015, Whitelaw *et al.*, 2016).

### 2.1.5 Einsatzgebiete porziner Tiermodelle in der biomedizinischen Forschung

#### 2.1.5.1 Konventionelle Schweinemodelle

##### 2.1.5.1.1 Schweinemodelle in der Grundlagenforschung

Die anatomische und physiologische Ähnlichkeit des Schweines zum Menschen (siehe Kapitel 2.1.2) stellt den relevantesten Vorteil für den Einsatz porziner Tiermodelle in der Grundlagenforschung dar. Gentechnisch nicht modifizierte Schweine spielen in der Erforschung grundlegender physiologischer, aber auch pathologischer Mechanismen eine wichtige Rolle, aus welchen Erkenntnisse für die Entwicklung neuer Therapien und Medikamente sowie auch für die Entwicklung weiterer transgener Schweinemodelle gewonnen werden können (Lunney, 2007, Swindle *et al.*, 2012). Schweine werden beispielsweise in der Erforschung kardiovaskulärer Erkrankungen wie Atherosklerose, Herzkranzgefäßstörungen, sowie auch in Wundheilungsstudien, der Ophthalmologie, der Reproduktionsmedizin, in der Biomechanik, in toxikologischen und pharmakologischen Studien und im Bereich der Krebs- und Diabetesforschung und auch in ernährungswissenschaftlichen Studien genutzt (Lunney, 2007, Prather *et al.*, 2013, Swindle *et al.*, 2012, Swindle *et al.*, 1994).

##### 2.1.5.1.2 Schweinemodelle in der chirurgischen Forschung

Schweine werden bereits seit Jahrzehnten in der chirurgischen Forschung sowie in der chirurgischen Ausbildung eingesetzt (Lunney, 2007, Swindle *et al.*, 2012, Swindle *et al.*, 1994). Hierbei werden Schweine als Modell sowohl in der Diagnostik, zu Ausbildungszwecken in den grundlegenden Operationstechniken, als auch in der Entwicklung neuer Operationsmethoden genutzt (Swindle *et al.*, 2012, Wolf *et al.*, 2014). Weitere chirurgische Gebiete, in denen Schweine eingesetzt werden, sind Wundheilungsstudien, die plastische oder rekonstruktive Chirurgie und die

Transplantationsmedizin (Swindle *et al.*, 1994). In der Herzkreislauf-Chirurgie werden Schweine aufgrund der dem Menschen sehr ähnlichen Anatomie, häufig eingesetzt und dienen hier vor allem zur Optimierung von Verfahren wie Bypass-, Stent- und Katheteroperationen, aber auch als Modell zur Erprobung von Notfallmaßnahmen (Lunney, 2007, Swindle *et al.*, 1994). Ebenso werden Schweine vielfach als Modelltiere in der Knochen- und Gelenkchirurgie sowie in den damit verbundenen bildgebenden Verfahren eingesetzt (Lunney, 2007, Luo *et al.*, 2012).

### **2.1.5.2 Gentechnisch modifizierte Schweinemodelle**

#### **2.1.5.2.1 Gentechnisch modifizierte Schweinemodelle in der Diabetesforschung**

Als Zuckerkrankheit oder Diabetes mellitus wird eine Reihe von Stoffwechselkrankheiten bezeichnet, die durch eine Störung der Regulation des Blutglukosestoffwechsels gekennzeichnet sind (American Diabetes Association, 2014, Gun and Kues, 2014, Wolf *et al.*, 2014). Diese Erkrankungen werden von der American Diabetes Association (ADA) in vier verschiedene Klassen mit weiteren Unterteilungen spezieller Formen gegliedert (American Diabetes Association, 2014, Wolf *et al.*, 2014). Die ersten beiden Klassen werden als Typ-1 und Typ-2 Diabetes mellitus bezeichnet. Typ-1 Diabetes des Menschen führt durch autoimmune oder idiopathische Zerstörung der insulinproduzierenden Betazellen des endokrinen Pankreas zu einem absoluten Insulinmangel. Typ-2 Diabetes ist gekennzeichnet durch eine Insulinresistenz und einen damit verbundenen relativen Insulinmangel (American Diabetes Association, 2014, Luo *et al.*, 2012, Wolf *et al.*, 2014). Klasse 3 bezeichnet weitere spezielle Typen, unter anderem Erkrankungen auf genetischer Grundlage und als Klasse 4 wird der Schwangerschaftsdiabetes (Gestationsdiabetes) bezeichnet (American Diabetes Association, 2014, Wolf *et al.*, 2014). Diabetes mellitus hat sich in den letzten Jahrzehnten in der Humanmedizin zu



einem Gesundheitsproblem mit bereits heute epidemischen Dimensionen entwickelt, dessen Prävalenz weltweit immer weiter steigt. Herz-Kreislaufkrankungen, diabetische Retinopathie, diabetische Nephropathie und diabetische Neuropathie gehören zu den gefürchtetsten Langzeitkomplikationen des Diabetes mellitus (American Diabetes Association, 2014, Wolf *et al.*, 2014).

Das Pankreas des Schweines mit seinen exokrinen und endokrinen Anteilen ähnelt dem des Menschen in Größe, Form, Lage und Blutversorgung (Murakami *et al.*, 1997). Porzines Insulin unterscheidet sich in nur einer Aminosäure vom humanen Insulin und wurde deshalb lange Zeit zur Behandlung von Patienten mit Diabetes mellitus eingesetzt (Bromberg and LeRoith, 2006, Wolf *et al.*, 2014). Das Schwein stellt durch diese physiologische und anatomische Ähnlichkeit einen Modellorganismus dar, der in der Lage ist, die Lücke zwischen den bereits etablierten transgenen Mäusemodellen und dem humanen Patienten zu schließen (Wolf *et al.*, 2014). Für diese Forschungszwecke wurden bereits mehrere transgene Schweinemodelle mit unterschiedlichen Formen des Diabetes mellitus entwickelt und charakterisiert, wie beispielsweise  $INS^{C94Y}$  transgene Schweine (Renner *et al.*, 2013, Wolf *et al.*, 2014). Diese entwickeln durch eine Mutation im Insulingen einen permanenten neonatalen Diabetes, der beim Menschen als MIDY (mutant INS gene-induced diabetes of the youth) bezeichnet wird (Liu *et al.*, 2010). Das genannte Modell und weitere diabetische Schweinemodelle wurden zum Teil bereits erfolgreich in Therapiestudien verwendet und stellen vielversprechende Modelle in der Diabetesforschung dar (Aigner *et al.*, 2010, Renner *et al.*, 2016, Renner *et al.*, 2013, Streckel *et al.*, 2015, Wolf *et al.*, 2014).

### 2.1.5.2.2 Gentechnisch modifizierte Schweinemodelle neurodegenerativer Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen zeichnen sich durch einen langsam fortschreitenden Krankheitsverlauf mit dem Verlust von Nervenzellen in meist anatomisch zusammenhängenden, funktionellen Gebieten des Nervensystems aus. Dies führt zu neurologischen Symptomen, welche sich meist in motorischen und kognitiven Defiziten äußern (Holm *et al.*, 2016). Die anatomische und physiologische Ähnlichkeit des Schweines zum Menschen findet sich auch im Bereich des Nervensystems wieder (Holm *et al.*, 2016, Luo *et al.*, 2012). Für einige neurodegenerative Erkrankungen wurden bereits murine Tiermodelle erstellt, wobei diese die Pathogenitätsmechanismen und Krankheitsphänotypen beim Menschen meist nur ansatzweise widerspiegeln (Holm *et al.*, 2016). Die Lücke zwischen den Nagern und dem Menschen soll mithilfe von Schweinemodellen geschlossen werden, um die Erforschung der Pathogenese, die Diagnostik, die Prävention und die Weiterentwicklung von Therapiemöglichkeiten dieser Erkrankungen weiter voran zu bringen (Holm *et al.*, 2016). Für Krankheiten wie Morbus Alzheimer, Chorea Huntington, Morbus Parkinson und spinale Muskelatrophie wurden bereits transgene Schweinemodelle etabliert (Holm *et al.*, 2016, Luo *et al.*, 2012). Diese sollen die oft multifaktoriellen humanen Erkrankungen bestmöglich rekapitulieren, das heißt sowohl die Symptome als auch die Läsionen des Nervensystems sollen denen des Menschen weitest möglich entsprechen (Holm *et al.*, 2016). Die relativ große Lebensspanne von Schweinen, im Unterschied zu Nagern, kann hierbei eine wichtige Rolle spielen, da sich Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson meist erst im fortgeschrittenen Alter entwickeln. Ziel der Forschung ist es, Schweinemodelle mit multiplen gentechnischen Modifikationen und ausreichend

großer Lebensspanne zu entwickeln, um die Durchführung der notwendigen Untersuchungen über längere Zeiträume hinweg zu ermöglichen (Holm *et al.*, 2016).

### **2.1.5.2.3 Gentechnisch modifizierte Schweinemodelle in der Krebsforschung**

Krebserkrankungen umfassen eine Gruppe von mehr als 100 verschiedenen Erkrankungen, die durch das unkontrollierte Wachstum von Zellen charakterisiert sind (Gun and Kues, 2014, Prather *et al.*, 2013). Ihre frühzeitige Diagnose und Therapie, spielen aufgrund ihrer hohen Morbidität und Mortalität in der Humanmedizin eine herausragende Rolle (Flisikowska *et al.*, 2014, Prather *et al.*, 2013). Während in der Grundlagenforschung Mäuse als Tiermodell einen wichtigen Beitrag leisten und dazu beitragen die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen dieser neoplastischen Erkrankungen zu verstehen, ist es nun Ziel der Forschung mithilfe von Schweinemodellen die vorklinischen Studien und deren Erkenntnisse mit der klinisch angewandten Onkologie zu verbinden (Cheon and Orsulic, 2011). Hierbei können die Schweinemodelle vor allem zur Entwicklung und Validierung von Therapien und Medikamenten beitragen (Flisikowska *et al.*, 2013). Gentechnisch modifizierte porzine Modelle wurden bereits für Brustkrebs, für die familiäre adenomatöse Polyptosis, eine erblich bedingten Form des colorektalen Karzinoms, und für das ebenfalls erblich bedingte Li-Fraumeni-Syndrom entwickelt (Flisikowska *et al.*, 2014, Gun and Kues, 2014, Luo *et al.*, 2012).

### 2.1.5.2.4 Gentechnisch modifizierte Schweinemodelle für seltene, monogenetische Erbkrankheiten des Menschen

Fortschritte der gentechnischen Modifikationstechniken beim Schwein ermöglichten auch die Erstellung von „maßgeschneiderten“ porzinen Modellen für seltene, monogenetische Erbkrankheiten des Menschen, wie zum Beispiel für die zystische Fibrose oder die progressive Muskeldystrophie Duchenne.

Zystische Fibrose bezeichnet eine autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung, der ein durch Mutation bedingter Defekt von Chloridkanälen zugrunde liegt, was unter anderem zu einer veränderten Zusammensetzung von Körpersekreten führt (Gun and Kues, 2014, Klymiuk *et al.*, 2015, Prather *et al.*, 2013). Muköse Sekrete werden zähflüssig und führen so zu Funktionsstörungen der betroffenen Organe (Whyte and Prather, 2011). Bei der zystischen Fibrose handelt es sich um eine multisystemische Erkrankung, die sowohl die Atemwege, den Gastrointestinaltrakt, den Pankreas und die Leber sowie auch den Reproduktionstrakt betreffen kann (Klymiuk *et al.*, 2015). Chronische Infektionen und Entzündungen, vor allem in der Lunge, sind der Hauptgrund für die hohe Sterblichkeitsrate der betroffenen Patienten (Klymiuk *et al.*, 2015, Whyte and Prather, 2011). Im Gegensatz zu den transgenen Mäusen, die als Tiermodell für die zystische Fibrose entwickelt wurden, jedoch keine typischen Symptome zeigen, entwickeln gentechnisch modifizierte Schweine ein dem Menschen in einigen Aspekten sehr ähnliches Krankheitsbild bereits kurz nach der Geburt (Gun and Kues, 2014, Klymiuk *et al.*, 2015, Prather *et al.*, 2013). Aufgrund dieser Ähnlichkeiten zum Menschen, kann das Schwein als Tiermodell der zystischen Fibrose die Erforschung der Pathogenese sowie die damit verbundene Entwicklung von Therapiemöglichkeiten weiter vorantreiben (Aigner *et al.*, 2010, Klymiuk *et al.*, 2015, Prather *et al.*, 2013).

Die progressive Muskeldystrophie Duchenne (DMD) ist eine rezessive X-chromosomale Erbkrankheit, die durch eine Genmutation zu einem Mangel des Muskelproteins Dystrophin führt (Klymiuk *et al.*, 2015). Die betroffenen Patienten leiden unter fortschreitender Muskelschwäche und Muskelschwund. Die Krankheit endet meist im jungen Erwachsenenalter aufgrund des Versagens von Herz- und Atemmuskulatur tödlich (Klymiuk *et al.*, 2015). Um die Erkrankung am Tiermodell weiter zu untersuchen, sind sowohl gentechnisch modifizierte Maus- als auch Schweinemodelle für die Muskeldystrophie Duchenne etabliert worden. Während die etablierten Mausmodelle mit Ausnahme des Zwerchfells keinen mit dem Menschen vergleichbaren Muskelschwund entwickeln und eine fast normale Lebenserwartung besitzen, zeigen gentechnisch modifizierte Schweine, die eine bei humanen Duchenne-Patienten häufig vorkommende Veränderung des DMD Genes tragen, welche zur Ausbildung eines funktionslosen DMD Proteins führt, eine durch Dystrophinmangel bedingte Skelettmuskeldystrophie, welcher mit progredient eingeschränkter Bewegungsfähigkeit und Schwäche einhergeht (Klymiuk *et al.*, 2015). Die pathologischen und histopathologischen Veränderungen entsprechen der humanen Erkrankung, zeigen im Schweinmodell jedoch einen deutlich schnelleren Verlauf (Klymiuk *et al.*, 2015). Das Potential des porzinen DMD-Tiermodells liegt auch hier in der Entwicklung und Erprobung neuer Therapieansätze, wie beispielsweise dem sogenannten Exon skipping, einer posttranskriptionalen Modifikation der defekten DMD-mRNA durch alternatives Splicing, durch Verwendung mutationsspezifischer antisense Oligonukleotide, mit dem Ziel, den Leserahmen des Transkriptes so zu verändern, dass ein verkürztes, aber nicht vollständig funktionsloses Dystrophinprotein gebildet wird (Fairclough *et al.*, 2013, Jirka *et al.*, 2015).

### 2.1.5.2.5 Gentechnisch modifizierte Schweine in der Xenotransplantationsforschung

Der in der Transplantationsmedizin immer gravierender werdende Mangel an geeigneten Spenderorganen und die Zunahme der Anzahl an Patienten, die ein solches Spenderorgan dringend benötigen, könnte mithilfe der sogenannten Xenotransplantation von Schweineorganen in den Menschen reduziert oder sogar behoben werden (Cooper *et al.*, 2016, Gun and Kues, 2014, Klymiuk *et al.*, 2010, Luo *et al.*, 2012, Prather *et al.*, 2013). Minipigs scheinen aufgrund ihrer dem Menschen ähnlichen Organgröße hierbei am besten geeignet zu sein (Klymiuk *et al.*, 2010).

Transplantatabstoßungsreaktionen bei immunologisch vom Empfängerorganismus als fremd erkannten Organen stellen die größte Hürde für die Verwendung von vom Schwein stammenden Xenotransplantaten dar (Cooper *et al.*, 2016, Klymiuk *et al.*, 2010). Um das Problem der Abstoßungsreaktionen zu überwinden, wurden bereits verschiedene gentechnisch veränderte Schweine mit Modifikationen von diversen Faktoren (Antigene, Gerinnungsfaktoren und Rezeptormoleküle), die für die Abstoßungsreaktionen eine wesentliche Rolle spielen, entwickelt (Cooper *et al.*, 2016, Klymiuk *et al.*, 2010, Wunsch *et al.*, 2014). Die Organe gentechnisch modifizierter Schweine, welche beispielsweise Faktoren wie CD46/CD55/CD59 oder hTM überexprimieren beziehungsweise zum Beispiel GGTA1 defizient sind, werden bisher vor allem bei Primaten wie Pavianen eingesetzt und erprobt (Cooper *et al.*, 2016, Klymiuk *et al.*, 2010, Wunsch *et al.*, 2014). Mittlerweile können auch multiple gentechnische Modifikationen in einem einzigen Schweinmodell umgesetzt werden (Klymiuk *et al.*, 2010, Wunsch *et al.*, 2014). Die Herausforderung dabei ist es, die wichtigsten und effizientesten Modifikationen so zu kombinieren, dass überlebensfähige, geeignete Tiermodelle für die klinischen

Xenotransplantationsforschung entstehen (Cooper *et al.*, 2016, Klymiuk *et al.*, 2010). Die Überlebensdauer von Primaten mit transplantierten Schweineorganen konnte dabei bereits von anfangs wenigen Minuten auf bis zu mehrere Monate gesteigert werden (Cooper *et al.*, 2016). Neben der immunologisch bedingten Transplantatabstoßungsreaktion stellen die noch nicht vollständig sichergestellte normale physiologische Funktion des porzinen Xenotransplantates im Menschen und die Sicherheit bezüglich vom Schwein auf den Menschen übertragbarer Erkrankungen wie zum Beispiel das PER-Virus (= porcine endogenous retrovirus) weitere Hürden in der Entwicklung funktionierender Xenotransplantate vom Schwein dar (Cooper *et al.*, 2016, Klymiuk *et al.*, 2010, Luo *et al.*, 2012).

### 2.2 Organ- und Gewebeprobennahme bei Tiermodellen in der biomedizinischen Forschung

#### 2.2.1 Grundlegende Überlegungen zur Organ- und Gewebeprobennahme: Untersuchungsziele, Untersuchungsumfang und Analyseverfahren

Die für eine Studie generierten Proben und damit auch die Probennahme selbst stellen in der Regel die Grundlage aller weiterführenden Untersuchungen dar. Bei der Probennahme müssen das Ziel der Studie (Untersuchungszweck), die geplanten Analyseverfahren, für welche die Proben geeignet sein sollen, und die damit verbundenen Anforderungen an das Probenmaterial sowie eine Reihe weiterer Faktoren berücksichtigt und miteinander in Einklang gebracht werden. Im Hinblick auf den Untersuchungszweck ist zu unterscheiden, ob Probenmaterial für orientierende Untersuchungen, wie beispielsweise zur Identifikation von qualitativen morphologischen Organalterationen oder zur Detektion der Expression verschiedener (Trans-)Genprodukte in Organen/Geweben generiert werden soll, oder ob weiterführende Untersuchungen mit speziellen Analyseverfahren an definiertem Probenmaterial durchgeführt werden sollen. Das Spektrum der prinzipiell möglichen Untersuchungen ist außerordentlich breit gefächert. Dieses umfasst unter anderem morphologische feingewebliche und ultrastrukturelle Analysen mit qualitativen und quantitativen Untersuchungsparametern, Expressionsuntersuchungen von DNA, RNA oder Proteinen mittels in-situ-Hybridisierung (ISH), Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), Immunhistochemie (IHC), Immunfluoreszenz (IF), nasschemische Analysemethoden wie Western-, Southern-, und Northern-Blotting, holistische Genexpressionsanalysen (Proteom- und Transkriptomanalysen), Metabolomanalysen, Mikrobiomanalysen und epigenetische Untersuchungen (Davis *et al.*, 2013, McDorman *et al.*, 2013). Besondere Proben werden für das Anlegen von



Zell- und Gewebekulturen oder zur Gewinnung bestimmter Gewebestrukturen, wie beispielsweise isolierter Glomerula (Blutke *et al.*, 2011) oder Pankreasinseln (van Buerck *et al.*, 2012), sowie für mikrobiologische (bakteriologische, virologische und mykologische) Untersuchungen oder für bildgebende Verfahren benötigt. Entsprechend dem Untersuchungszweck müssen die Anforderungen, welche die geplanten Analyseverfahren an die zu generierenden Proben stellen, sowie die entsprechenden unterschiedlichen, vom Analyseverfahren abhängigen Prozessierungen der Proben bereits bei der Probennahme berücksichtigt werden. In einer Studie muss also eine Vielzahl von Einflussgrößen und Anforderungen bei der Erstellung von geeignetem Probenmaterial beachtet werden. Hierzu gehören die adäquate Probengröße, die benötigte Anzahl und die Orientierung der Proben sowie auch die Zeit-, Temperatur- und pH-Bedingungen vor, während und nach der Probennahme und die weitere Prozessierung der Proben (z.B. Konservierung durch Einfrieren oder Kühlen bei verschiedenen Temperaturen, Fixierung des Gewebes in verschiedenen Fixantien, Einbettung in verschiedenen Medien und das bei unterschiedlichen Einbettungsmedien auftretende unterschiedliche Ausmaß der Gewebeschrumpfung, etc.) (Adams and Crabbs, 2013, Schneider and Ochs, 2014). Des Weiteren ist der Zeitpunkt der Probengewinnung zu beachten, das heißt ob die Organ- oder Gewebeproben *post mortem* gewonnen werden können oder ob die Proben bereits *in vivo* gewonnen werden müssen (z.B. Blut, Serum oder Plasma) (Adams and Crabbs, 2013). Möglicherweise müssen in einem Probennahmedurchgang verschiedene Proben zur Untersuchung mehrerer unterschiedlicher Fragestellungen generiert werden. Hierbei ist die Kombinierbarkeit mehrerer unterschiedlicher Probennahmestrategien für verschiedene Versuche und Untersuchungen, insbesondere im Hinblick auf die Art und den Umfang der zu generierenden Proben sowie die Reihenfolge der Probennahmen von Bedeutung.

Auch der Zeit- und Arbeitsaufwand, der Personaleinsatz, die äußeren Anforderungen und Einflüsse sowie die Geschwindigkeit der Probennahme müssen mit den Untersuchungszielen einer Studie vereinbar sein (Adams and Crabbs, 2013).

### **2.2.2 Generelle Anforderungen an Probenmaterial und Probennahmeverfahren in der biomedizinischen Forschung: Repräsentativität, Reproduzierbarkeit und Effizienz**

Repräsentativität, Reproduzierbarkeit und Effizienz stellen die wichtigsten Anforderungen, welche an Proben respektive Probennahmeverfahren gestellt werden, dar (Boyce *et al.*, 2010, Gundersen *et al.*, 2013, Howard and Reed, 2005). Während bei sehr kleinen Organen, wie beispielsweise der Nebenschilddrüse oder der Zirbeldrüse, oftmals das gesamte Organ als Probe verwendet wird, können bei großen Organen und Geweben (z.B. Leber, Milz, Skelettmuskulatur) lediglich Teile dieser Organe und Gewebe als Proben verwendet werden. Diese Proben repräsentieren somit eine Teilmenge der „Grundgesamtheit“ beziehungsweise eines Referenzkompartiments im Organ oder Gewebe.

**Repräsentativität** der Proben bedeutet, dass mit hinreichender Genauigkeit auf Eigenschaften des gesamten zu untersuchenden Organs oder Gewebes (Grundgesamtheit) geschlossen werden kann, aus dem die Proben gewonnen wurden (Boyce *et al.*, 2010, Howard and Reed, 2005). Zur Gewinnung repräsentativer Proben werden Probennahmestrategien angewandt, in denen (I) jede mögliche Probenahmelokalisation des gesamten zu untersuchenden Organs oder Gewebes die gleiche Wahrscheinlichkeit besitzt beprobt zu werden (zufällige Probennahme siehe Kapitel 2.2.4) und (II) eine ausreichend große Anzahl an Proben gewonnen wird (Boyce *et al.*, 2010). Die Probenanzahl ist unter anderem abhängig von der Streuung der Werte des untersuchten Parameters in unterschiedlichen

Kompartimenten des Organs, hängt aber auch von der Varianz der Werte unterschiedlicher Individuen ab. Letztere kann durch eine Erhöhung der Anzahl der zu untersuchenden Tiere reduziert werden (Howard and Reed, 2005). Bei der Gewinnung von repräsentativen Proben gilt es etwaige Unterschiede in der Verteilung der Zielstrukturen in einem Organ zu berücksichtigen. Ein Beispiel hierfür bildet die Dichte der Inseln im Pankreas. Die Dichte der Inseln im Pankreas und die Verteilung der Betazellen innerhalb der Inseln variieren in den verschiedenen Anteilen des Pankreas (Steiner *et al.*, 2010). Würde lediglich eine einzige Lokalisation innerhalb des Pankreas beprobt werden, wäre die Zusammensetzung der Probe nicht repräsentativ für das gesamte Organ. Um ein repräsentatives Ergebnis zu erhalten ist es deshalb notwendig, eine ausreichend große Probenanzahl aus dem gesamten Pankreasvolumen (Referenzkompartiment) zu gewinnen, um die Verteilung und Dichte im gesamten Referenzkompartiment ausreichend widerzuspiegeln. Ebenso sind weitere Eigenschaften der Zielstrukturen wie Polydispersität, Polymorphie und die Vorzugsrichtung (Anisotropie) im jeweiligen Referenzkompartiment bei der Auswahl der Entnahmestellen der Proben und der Orientierung der Proben zu berücksichtigen (siehe Kapitel 2.2.8).

Die **Reproduzierbarkeit** im Zusammenhang mit der Generierung von Probenmaterial bezieht sich auf die Wiederholbarkeit von Ergebnissen bestimmter Parameter unter gleichen vorgegebenen Probennahmebedingungen. Ziel der Probennahme ist dabei mit gleichen Versuchsaufbauten oder -strategien, beispielsweise in unterschiedlichen Laboren oder mit verschiedenen Probennehmern, annähernd gleiche Ergebnisse zu generieren (Howard and Reed, 2005, Rousseaux and Gad, 2013). Die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen im Rahmen einer Probennahme stellt die Vergleichbarkeit der Untersuchungen und Ergebnisse zwischen und innerhalb von Studien sicher. Ein gewisses Maß an

Abweichung in Bezug auf die Reproduzierbarkeit einer Untersuchung muss immer mit berücksichtigt werden und lässt sich nicht ausschließen (Rousseaux and Gad, 2013).

Statistische Maße und Parameter im Rahmen einer Probennahmestrategie lassen sich mithilfe stochastischer Mittel berechnen (Gundersen *et al.*, 2013, Nyengaard, 1999, Rousseaux and Gad, 2013):

- Die **Standardabweichung SD** (= Standard Deviation) ist die durchschnittliche Abweichung der Einzelwerte einer Messreihe von ihrem Mittelwert ( $\bar{x}$ ). Sie zeigt dabei die Streuung der einzelnen Werte an und gibt Aufschluss über die Repräsentativität des Mittelwerts der Verteilung. Die Standardabweichung besitzt immer die gleiche Einheit wie die zugrundeliegenden Daten, was eine Auswertung und Interpretation vereinfacht.
- Der **relative Standardfehler des Mittelwerts SEM** (= Standard Error of the Mean) gibt die theoretische Abweichung bzw. Streuung der Mittelwerte an.

$$\text{SEM} = \text{SD}/\sqrt{n}$$

SD = Standardabweichung

n = Anzahl der Proben

- Der **Fehlerkoeffizient CE** (= Coefficient of Error), auch relativer Standardfehler genannt, dient zur Bestimmung der Streuung beziehungsweise der Präzision der Ergebnisse in Bezug auf den Mittelwert der Population. Er bestimmt somit die Ungenauigkeit einer Probennahmestrategie. Der Fehlerkoeffizient kann durch Änderungen der Probennahmestrategie, (z.B. durch die Änderung der Anzahl der generierten Proben) verändert werden. (Boyce *et al.*, 2010, Gundersen *et al.*, 2013, Howard and Reed, 2005). Unter Berücksichtigung der jeweiligen Probennahmestrategie ist der CE und damit

verbunden die Effizienz einer Probennahme unterschiedlich zu berechnen (siehe Kapitel 2.2.4).

- Der beobachtete (= observed) Variationskoeffizient ( $CV_{obs}$ ) stellt ein relatives Streuungsmaß, welches die Streuung der Messwerte in Bezug auf den Mittelwert angibt, dar (Boyce *et al.*, 2010, Gundersen *et al.*, 2013).

$$CV_{obs} = SD/\bar{x}$$

$CV_{obs}$  = beobachteter Variationskoeffizient

SD = Standardabweichung

$\bar{x}$  = Mittelwert

Der Variationskoeffizient  $CV_{obs}$  der Messwerte ergibt sich im Weiteren aus der biologischen Variation ( $CV_{biol}$ ) und dem Fehlerkoeffizienten CE (Boyce *et al.*, 2010, Gundersen *et al.*, 2013, Nyengaard, 1999).

$$CV_{obs}^2 = CV_{biol}^2 + CE^2$$

$CV_{obs}$  = beobachteter Variationskoeffizient

$CV_{biol}$  = biologische Variation

CE = Fehlerkoeffizient

- Als **biologische Variation** eines Parameters wird die Streuung seiner Werte innerhalb einer Population bezeichnet. Diese ist in der Regel nicht veränderbar. Ein Beispiel für die biologische Variation ist die Schwankung des Körpergewichts innerhalb einer Versuchsgruppe mit Tieren gleichen Alters und Geschlechts. Je größer die biologische Variation zwischen den einzelnen Tieren, umso mehr Tiere werden für eine Untersuchung oder Studie benötigt, damit der beobachtete Variationskoeffizient  $CV_{obs}$  kleiner wird (Gundersen *et al.*, 2013, Howard and Reed, 2005). Umgekehrt kann ein hoher  $CV_{obs}$  bei

einem Parameter mit einer geringen biologischen Variation nicht durch eine Erhöhung der Anzahl der Proben verringert werden (Nyengaard, 1999).

Ziel einer effizienten Probennahmestrategie sollte die Reduzierung der Anzahl der Probenlokalisationen sein ohne dabei die Präzision des Experiments herabzusetzen (Boyce *et al.*, 2010, Gundersen *et al.*, 2013). In einer Studie sollte ein  $CV_{\text{obs}}$ -Wert von unter 0,2 (= 20%) erreicht werden (Boyce *et al.*, 2010, Ochs and Mühlfeld, 2013). Der Wert des Fehlerkoeffizient CE sollte dabei etwa die Hälfte des Variationskoeffizienten  $CV_{\text{obs}}$  betragen, damit die Effizienz der Probennahme und eine ausreichende Präzision sichergestellt werden kann (Boyce *et al.*, 2010, Ochs and Mühlfeld, 2013). Um mithilfe von  $CV_{\text{biol}}$  und CE die Anzahl der zu untersuchenden Individuen abschätzen zu können, kann vor der Durchführung einer Studie eine Pilotstudie durchgeführt werden, die eine Einschätzung der nicht beeinflussbaren biologischen Variation und dem in der Studie vorliegenden und beeinflussbaren Fehlerkoeffizienten erlaubt. Die Planung der eigentlichen Studie mit einer Anpassung der Probennahmestrategie in Bezug auf die Anzahl Tiere und Anzahl der Probenlokalisationen pro zu untersuchendem Organ erfolgt im Anschluss an die Pilotstudie (Boyce *et al.*, 2010, Gundersen *et al.*, 2013, Ochs and Mühlfeld, 2013).

### 2.2.3 Konsequenzen der Anforderungen an Proben für die praktische Durchführung einer Probennahme: Probenanzahl, Probengröße, Probenlokalisierung, Reihenfolge der Probenentnahme

Für jede Probennahme sind bestimmte Vorgaben, wie beispielsweise die Anzahl und Größe der zu entnehmenden Proben und die Bestimmung der Probenentnahmestellen (Lokalisationen) aus einem Organ oder Gewebe wichtig. Diese Vorgaben sind bei der praktischen Durchführung zu berücksichtigen und ergeben sich aus den generellen Anforderungen an die Probennahme und das Probenmaterial (siehe Kapitel 2.2.2). Die notwendige Probenanzahl, die Probengröße und die Probenlokalisierungen sind somit abhängig von den Eigenschaften des zu untersuchenden Organs oder Gewebes, wie zum Beispiel von seiner Größe und Zusammensetzung (Gewebekomposition), aber auch von den zu untersuchenden Parametern und den Anforderungen der Analyseverfahren, welche mit dem gewonnenen Material durchgeführt werden sollen.

**Die Probengröße** richtet sich grundsätzlich nach der Menge des zur Verfügung stehenden zu beprobenden Organs oder Gewebes und auch nach den Anforderungen des jeweiligen Analyseverfahrens an die Probengröße. Für Letzteres wird die Probengröße beispielsweise durch die unterschiedliche Eindringtiefe verschiedener Fixantien oder die eingeschränkte Kapazität von Einbettungskapseln in der Histologie limitiert. Andererseits kann für bestimmte Untersuchungsverfahren auch ein benötigter Mindestbedarf an Gewebematerial gegeben sein. Ein Beispiel hierfür sind molekularbiologische Analysen.

Die notwendige **Anzahl der zu generierenden Proben**, als ein wichtiges Beurteilungskriterium für die Genauigkeit der Ergebnisse einer Untersuchung, ist abhängig von der Effizienz der Probennahmestrategie und der Repräsentativität des generierten Probenmaterials für das zu untersuchende Organ oder Gewebe (siehe

Kapitel 2.2.2 und Kapitel 2.2.4). Die Anzahl der zu generierenden Proben, um eine aussagekräftige Untersuchung zu gewährleisten, differiert bei unterschiedlichen Probennahmeverfahren. Dabei müssen morphologische Eigenschaften des zu beprobenden Organs oder Gewebes und auch die biologische Variation der untersuchten Parameter innerhalb der zu beprobenden Population berücksichtigt werden.

Bei der Bestimmung der **Probenlokalisationen** sind morphologische Eigenschaften des zu untersuchenden Organs oder Gewebes (Referenzkompartiments) zu berücksichtigen. Hierzu gehören die Form, die Größe, die Vorzugsrichtung (Anisotropie), sowie die Zusammensetzung und Verteilung unterschiedlicher Strukturelemente innerhalb eines Organs oder Gewebes. Etwaige Unterschiede in der Zusammensetzung einer Gewebeart in Abhängigkeit zur Lokalisation im Tierkörper müssen mit berücksichtigt werden. Beispiele hierfür sind die unterschiedliche Zusammensetzung von viszeralem und subkutanem Fettgewebe in den Fettdepots des Körpers oder auch die variierende Hautdicke an verschiedenen Lokalisationen der Körperoberfläche (Ouchi *et al.*, 2011, Turner *et al.*, 2015). Organtropismen und Verabreichungswege bestimmter Substanzen beispielsweise in der Toxikopathologie, aber auch die Prädilektionsstellen bestimmter Erkrankungen grenzen die zu untersuchenden Probenlokalisationen von vorneherein näher ein oder legen diese genau fest (Ruehl-Fehlert *et al.*, 2003).

Die **Reihenfolge der Entnahme** von Probenmaterial ist von mehreren Faktoren abhängig. Hierzu zählen die Analyseverfahren, die mit dem jeweiligen Probenmaterial durchgeführt werden sollen und deren Anforderungen. Dabei muss beispielsweise berücksichtigt werden, ob die Proben sofort auf Trockeneis verbracht und tiefgefroren werden sollen oder ob die Proben in frisch entnommenen Zustand zur weiteren Untersuchung oder Prozessierung benötigt werden. Auch organtypische



Eigenschaften, wie etwa die Geschwindigkeit des Einsetzens postmortaler Alterationen (z.B. die schnell eintretende Autolyse des Pankreas im Vergleich zu beispielsweise Knochen) müssen in diesem Zusammenhang berücksichtigt werden. Organisatorische Notwendigkeiten und Belange im Ablauf einer Sektion, wie etwa die routinemäßige Reihenfolge der Sektion und Organentnahme oder bestimmte spezielle durchzuführende Sektionsmethoden (z.B. die Nierenperfusion, siehe Abschnitt 2.10.6 der Supplemente der Publikation) müssen zusätzlich berücksichtigt werden (Adams and Crabbs, 2013).

### 2.2.4 Unterschiedliche Probennahmeverfahren

Die Generierung von Organ- oder Gewebeproben kann durch unterschiedliche Probennahmeverfahren erfolgen. Prinzipiell werden nicht-zufällige Probennahmeverfahren von zufälligen Probennahmeverfahren unterschieden (Howard and Reed, 2005, Rousseaux and Gad, 2013). Die Repräsentativität der Proben steht bei der Gewinnung von Probenmaterial dabei immer im Vordergrund. Die generierten Stichproben werden als eine unter bestimmten Gesichtspunkten ausgewählte Teilmenge einer Grundgesamtheit definiert. Hierbei werden im Weiteren Zufallsstichproben, systematische Stichproben und systematische Stichproben mit zufälligem Ausgangspunkt unterschieden (Howard and Reed, 2005, Rousseaux and Gad, 2013). In einer optimalen Probennahmestrategie bei zufälligen Probennahmen besitzt jede mögliche Probenahmelokalisation innerhalb eines bestimmten Referenzkompartiments (Organ oder Gewebe) die gleich große zufällige Chance beprobt zu werden (Gundersen *et al.*, 2013, Nyengaard, 1999). Grundlegendes Ziel bei der Generierung von Probenmaterial sollte dabei immer die Reduzierung der Anzahl der Probenlokalisationen sein, ohne dabei die Präzision des Experiments herabzusetzen (Boyce *et al.*, 2010).

### 2.2.4.1 Nicht-zufällige Probennahme

Bei nicht-zufällig, willkürlich (= arbitrarily) gewonnenen Proben sind die Probenahmelokalisationen vom Probennehmer vorher festgelegt und/oder werden von Fall zu Fall neu bestimmt. Ein Beispiel für diese Art der Lokalisationsbestimmung in toxikologischen Studien bei murinen Tiermodellen stellen die "Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice – Part 1-3" dar (Kittel *et al.*, 2004, Morawietz *et al.*, 2004, Ruehl-Fehlert *et al.*, 2003). Die Proben werden immer aus den gleichen vorher definierten Lokalisationen eines bestimmten Organs beziehungsweise Gewebes gewonnen (Ruehl-Fehlert *et al.*, 2003). Der Bestimmung dieser festgelegten Probenlokalisierungen liegen vor allem anatomische und pathologische Kenntnisse sowie das Wissen über eventuelle Prädilektionsstellen oder Organtropismen bestimmter Krankheiten oder Stoffe zu Grunde. Hierbei wird sichergestellt, dass alle Proben einer bestimmten Studie oder eines bestimmten Probennahmeprotokolls aus ein und derselben anatomischen Lokalisation stammen, was die standardisierte Untersuchung und Auswertung der Proben vereinfacht (Gundersen *et al.*, 2013). In diesem Zusammenhang wird oftmals neben der Lokalisation auch die Orientierung, die Größe der Probe sowie die weitere Prozessierung definiert, um die Kohärenz und die Aussagekraft der Daten und Ergebnisse sicherzustellen (Ruehl-Fehlert *et al.*, 2003). Dies ist vor allem auch bei größeren Organen, Organen mit inhomogenem Aufbau oder Hohlorganen von Vorteil, da die Probennehmer davon ausgehen, dass die Proben aus einer definierten Lokalisation mit einer definierten Schnittrichtung eine vergleichbarere histologische Auswertung erlauben (Ruehl-Fehlert *et al.*, 2003). Vor allem in toxikologischen Studien ist die Definition bestimmter Probenlokalisierungen eine Grundlage für den Vergleich innerhalb der Studie und auch zwischen verschiedenen Studien. Hierbei kann jedoch nicht grundsätzlich davon ausgegangen werden, dass auftretende

Veränderungen gleichmäßig im Organ oder Gewebe auftreten (Gundersen *et al.*, 2013). Ebenso können eventuelle Veränderungen in Volumen, Gewicht oder Größe des Organs, welche Einfluss auf die weitere Auswertung und die Ergebnisse nehmen, nicht ausgeschlossen werden (Gundersen *et al.*, 2013). Der Nachteil der nicht-zufälligen Probennahme ist dabei, dass das so gewonnene Probenmaterial nicht selbstverständlich als repräsentativ für das jeweilige gesamte zu untersuchende Organ oder Gewebe angesehen werden kann und im Weiteren nicht für sämtliche weiterführenden Analyse- und Untersuchungsverfahren geeignet ist (Adams and Crabbs, 2013).

### **2.2.4.2 Einfache zufällige Probennahme (= independent random sampling)**

Im Rahmen der einfachen zufälligen, unabhängigen Probennahme (= independent random sampling), auch als einfache Zufallsstichprobe bezeichnet, werden Proben aus einem Organ oder Gewebe streng zufällig, aus beliebigen Lokalisationen, welche durch den jeweiligen Probennehmer, zum Beispiel mithilfe einer Zufallszahlentabelle festgelegt werden, generiert (Howard and Reed, 2005, Nyengaard and Gundersen, 2006, Rousseaux and Gad, 2013). Jede mögliche Lokalisation innerhalb eines bestimmten Referenzkompartiments, beispielsweise einem Organ oder Gewebe, hat hierbei die gleiche Wahrscheinlichkeit beprobt zu werden (Howard and Reed, 2005, Rousseaux and Gad, 2013). Ein einfaches Beispiel für eine einfache zufällige Probennahme ist die Ziehung der ersten Kugel im Lottospiel, hierbei besitzt jede der Lottokugeln die gleiche zufällige Wahrscheinlichkeit aus der Lottotrommel gezogen zu werden. Ein einfaches praktisches Beispiel aus der Pathologie wäre die für weiterführende Untersuchungen zufällige Auswahl eines Organs bei paarig angelegten Organen durch Münzwurf (o.ä.), wie beispielsweise Auge, Niere, Nebenniere oder Schilddrüse.

Die Berechnung der Effizienz dieser Probennahmestrategie erfolgt mittels Berechnung des Fehlerkoeffizienten CE. Die folgenden Formeln gelten hierbei nur für die einfache, unabhängige Zufallsstichprobennahme, nicht jedoch für systematisch zufällige Probennahmeverfahren. Bei unterschiedlichen systematisch zufälligen Probennahmeverfahren erfolgt die Berechnung des Fehlerkoeffizienten mithilfe komplexer Formeln (siehe Kapitel 2.2.4.3).

$$\mathbf{CE = SEM/\bar{x}}$$

SEM = relativer Standardfehler des Mittelwerts

$\bar{x}$  = Mittelwert

Bei einem einfachen, zufälligen und unabhängigen Probennahmeverfahren mit einer Probenanzahl  $n$ , ist der Fehlerkoeffizient CE proportional zum Kehrwert der Quadratwurzel aus der Probenanzahl (Boyce *et al.*, 2010):

$$\mathbf{CE \sim 1/\sqrt{n}}$$

Die **Effizienz** einer Probennahmestrategie wird als Maßstab der Präzision einer Probennahme definiert und wird durch die Streuung der Ergebnisse bestimmt. Die Effizienz einer Probennahmestrategie ist umgekehrt proportional zum Fehlerkoeffizienten CE:

$$\mathbf{\text{Probennahmeeffizienz} \sim 1/CE^2}$$

Im Vergleich zur einfachen zufälligen Probennahme ist die Effizienz bei der systematisch zufälligen Probennahme erheblich höher (siehe Kapitel 2.2.4.3) (Boyce *et al.*, 2010, Gundersen and Jensen, 1987).

### 2.2.4.3 Systematisch zufällige Probennahme (= systematic uniform random sampling)

Unter systematisch zufälliger Probennahme (= systematic uniform random sampling) versteht man eine Probennahmestrategie mit einem systematischen sowie einem zufälligen Anteil (Nyengaard, 1999, Ochs and Mühlfeld, 2013). Die systematisch zufällige Probennahme stellt die bevorzugteste Methode zur zufälligen Bestimmung der zu untersuchenden Lokalisationen für quantitative stereologische Untersuchungen dar (Gundersen *et al.*, 2013). Die erste zu beprobende Lokalisation wird zufällig ausgewählt (zufälliger Anteil der Probennahme) und darauf folgend werden mit konstantem Intervall die weiteren Probenlokalisationen bestimmt (systematischer Anteil der Probennahme) (Gundersen *et al.*, 2013, Nyengaard, 1999). Im Rahmen der systematisch zufälligen Probennahmestrategie besitzt jede mögliche Lokalisation die gleiche zufällige Chance beprobt zu werden (Gundersen *et al.*, 2013, Nyengaard, 1999). In quantitativ-stereologischen Studien werden die Probenahmelokalisationen sowie die Anzahl der zu generierenden Proben mit stochastischen Mitteln, sowie auf der Grundlage der anatomisch-morphologischen und der funktionellen Eigenschaften eines Organs oder Gewebes bestimmt. Die systematisch zufällige Probennahme ist hierbei auf allen Ebenen der Probengewinnung, von der Auswahl der Tiere, der Bestimmung der zu beprobenden Lokalisationen im Organ bis zur Bestimmung der in einem histologischen Schnittpräparat auszuwertenden Areale durchzuführen (Howard and Reed, 2005, Ochs and Mühlfeld, 2013). Die systematisch zufällige Probennahmestrategie vermeidet Fehler bereits bei der Probennahme, reduziert die technisch bedingte Streuung oder Variabilität und steigert effektiv die Präzision des gesamten Experiments (Howard and Reed, 2005).

Die Bestimmung der Präzision in unterschiedlichen systematischen Probennahmeverfahren erfolgt anhand komplexer Formeln (Gundersen and Jensen, 1987, Mattfeldt, 1990).

Bei systematisch zufälliger Probennahme ist der Fehlerkoeffizient CE proportional zum Kehrwert der Probenanzahl (Boyce *et al.*, 2010).

$$CE \sim 1/n$$

Die Effizienz ist damit deutlich höher als bei der einfachen zufälligen Probennahme (siehe Kapitel 2.2.4.2) (Boyce *et al.*, 2010, Gundersen and Jensen, 1987).

### 2.2.5 Verschiedene systematisch zufällige Probennahmeverfahren in der biomedizinischen Forschung

In der biomedizinischen Forschung wird Probenmaterial für viele unterschiedliche Zwecke und Untersuchungen gewonnen. Eine effiziente systematisch zufällige Probennahmestrategie mit der Gewinnung von repräsentativen Proben bereits im Rahmen der Sektion stellt die Voraussetzung für die Durchführbarkeit der daraus folgenden quantitativen stereologischen Analysen dar (Gundersen *et al.*, 2013, Howard and Reed, 2005, Nyengaard, 1999, Ochs and Mühlfeld, 2013). Hierbei werden mehrere systematisch zufällige Probennahmeverfahren unterschieden. Im Rahmen eines **volumengewichteten Probennahmeverfahrens** werden die Proben aus dem gesamten Volumen des zur Verfügung stehenden Organs oder Gewebes gewonnen. Das Volumen des zu beprobenden Organs oder Gewebes stellt dabei die Bezugsgröße (Referenzkompartiment) für die weiteren Untersuchungen dar. Ein solches volumengewichtetes Probennahmeverfahren kann relativ einfach durchgeführt werden. Das Organ wird entlang der Längsachse orthogonal planparallel äquidistant lamelliert und die Scheiben werden auf die immer gleiche Seite abgelegt. Es folgt eine systematisch zufällige Probennahme mithilfe eines

Punktraster auf der Oberfläche dieser Organscheiben (Howard and Reed, 2005). Durch die gleiche Scheibendicke kann eine volumengewichtete Probennahme sichergestellt werden. Eine detaillierte Darstellung der Durchführung dieses Probennahmeverfahrens mit Schemazeichnung und fotografischen Abbildungen findet sich in den Supplementen der Publikation in Fig. S2 und in Abschnitt 2.10.8 am Beispiel der Nebenniere.

Die sogenannte **Fractionator-Methode** und ihre Abwandlungen (z.B. „smooth fractionator“, „fast fractionator“ u.a.) stellen weitere, noch effizientere systematisch zufällige Probennahmeverfahren dar, welche insbesondere zur Schätzung der Gesamtzahl von Strukturelementen in einem Referenzkompartiment (Organ, Zelle u.a.) verwendet werden können. Das Grundprinzip stellt die systematisch zufällige Auswahl eines kleinen festgelegten Anteils (= fraction) des gesamt zu untersuchenden Gewebes dar, aus welchem dann in der weiteren Untersuchung Rückschlüsse auf Parameter im gesamten Organ oder Gewebe gewonnen werden (Gundersen *et al.*, 2013, Howard and Reed, 2005, Nyengaard, 1999). Vorteile dieser Methoden sind die einfache und schnelle Durchführung und die Unabhängigkeit von der Gewebeschrumpfung. Nachteil ist die in der Regel notwendige komplette Zerstückelung des Organs oder Gewebes, was andere zusätzliche Untersuchungen oftmals nicht mehr ermöglicht (Howard and Reed, 2005, Ochs and Mühlfeld, 2013).

### **2.2.6 Etablierte Probennahmepläne für Organ- und Gewebeproben in der biomedizinischen Forschung bei Nagetier- und Nicht-Nager-Versuchstierspezies**

Grundvoraussetzung für die Interpretation und Validierung von wissenschaftlichen Ergebnissen sind unter anderem die Repräsentativität der Proben, die

Vergleichbarkeit und die Eignung des generierten Probenmaterials und die Standardisierung der Probennahme, sowohl bei der Generierung der Proben, als auch bei der weiteren Prozessierung und Auswertung des Probenmaterials (Ruehl-Fehlert *et al.*, 2003). Für die Probennahme bei murinen Tiermodellen existieren bereits unterschiedliche Vorgaben und Richtlinien von nationalen und internationalen Einrichtungen und Arbeitsgruppen, welche dazu dienen sollen, die Anforderungen an die Probennahme und das Probenmaterial in den einzelnen Studien, aber auch zwischen verschiedenen Studien festzulegen. Diese Vorgaben, die für toxikopathologische, pharmazeutische oder histopathologische Forschungs- und Studienzwecke entwickelt wurden, listen für die Gewinnung von Probenmaterial von Versuchstieren meist die jeweiligen Organe, welche beprobt werden sollen, auf. Welche Lokalisationen oder Kompartimente des Organs dabei untersucht werden sollen, ist in den Richtlinien nicht näher definiert. Eine Ausnahme stellen dabei die von den Arbeitsgruppen der RITA (Registry of Industrial Toxicology Animal-data) und der NACAD (North American Controll Animal Database) veröffentlichten "Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice – Part 1-3" (Kittel *et al.*, 2004, Morawietz *et al.*, 2004, Ruehl-Fehlert *et al.*, 2003), dar (Ruehl-Fehlert *et al.*, 2003). Anatomische Kenntnisse bezüglich des Aufbaus und der Zusammensetzung verschiedener Organe sind für die Probennahme und eine standardisierte histopathologische Evaluation notwendig und wurden bei der Erstellung der etablierten Richtlinien für Nager beispielsweise für die Festlegung der Probenlokalisationen und der weiteren Prozessierung zugrunde gelegt (Ruehl-Fehlert *et al.*, 2003). Die Einführung dieser Probennahmeplänen für die standardisierte Probennahme muriner Tiermodelle hat erheblich dazu beigetragen, die Qualität und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse in und zwischen verschiedenen Studien zu erhöhen (Kittel *et al.*, 2004, Morawietz *et al.*, 2004, Ruehl-Fehlert *et al.*,



2003). Diese Protokolle für Mäuse und Ratten stellen detaillierte und standardisierte Anweisungen dar, welche für die einzelnen Organe genaue Probenahmelokalisationen, Probenmenge, Probenanzahl, Orientierung und Prozessierung vorgeben und mit Schemazeichnungen und fotografischen Abbildungen die Probennahme vereinfachen und die Qualität des histologischen Materials steigern sollen (Ruehl-Fehlert *et al.*, 2003). Auch die Society of Toxicologic Pathology (STP) setzt sich in ihren Positionspapieren zu verschiedenen Organsystemen und in den INHAND (International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria) Publikationen mit den Grundlagen der Probennahme in der Toxikopathologie in Bezug auf verschiedene Organsysteme und Studienziele auseinander. Das Positionspapier von Bregman *et al.* (2003) (Recommended tissue list for histopathologic examination in repeat-dose toxicity and carcinogenicity studies: a proposal of the Society of Toxicologic Pathology (STP)) legt eine Basisliste mit Organen und Geweben vor, die für alle Tierarten und toxikologische sowie auch kanzerogene Studienziele angewendet und modifiziert werden kann. Ziel ist es, Pathologen und anderen Wissenschaftlern eine Grundlage für die zu beprobenden Organe und die daraus resultierende Probennahme in der Toxikopathologie darzulegen (Bregman *et al.*, 2003). Auch staatliche Institutionen, wie die FDA (Food and Drug Administration), die EPA (United States Environmental Protection Agency) oder die EMA (European Medicines Agency) legen in ihren jeweiligen Richtlinien für Toxizitätsstudien eine Liste an Organen für die histopathologische Untersuchung vor. Tabelle 1 im Manuskript der vorliegenden Publikation (Kapitel 3 der Dissertation) verschafft einen Überblick über die jeweiligen zu beprobenden Organe in den Richtlinien der oben genannten Organisationen, im direkten Vergleich mit den entwickelten Probennahmeprotokollen für porzine Tiermodelle.

### 2.2.7 Quantitative Stereologie

Die Lehre der Stereologie (von griechisch *stereos* = fest, räumlich, körperlich) befasst sich mit der räumlichen Interpretation von Schnittbildern dreidimensionaler Objekte. Sie wird in verschiedenen Fachgebieten der Wissenschaft, beispielsweise in der Geologie bei Mineralienzusammensetzungen, aber auch bei morphologischen Analysen biologischer Proben eingesetzt. Die Bedeutung von stereologischen Untersuchungsansätzen nimmt in der biomedizinischen Forschung in den letzten Jahrzehnten immer weiter zu. Für morphologische Untersuchungen des gewonnenen Probenmaterials sind quantitativ-stereologische Methoden mittlerweile unverzichtbar geworden. Zahlreiche renommierte Fachjournale verlangen inzwischen bei der Publikation quantitativ-morphologischer Ergebnisse die Verwendung von adäquaten stereologischen Methoden (Madsen, 1999). In der Stereologie werden aus zweidimensionalen Abbildungen Rückschlüsse auf die dreidimensionale Struktur von Objekten gewonnen (Boyce *et al.*, 2010, Gundersen *et al.*, 2013, Nyengaard, 1999). In Abgrenzung zur Stereologie befasst sich die Morphometrie mit allen Verfahren zur quantitativen Erforschung morphologischer Strukturen (Mattfeldt, 1990). Stereologische Analysen stellen somit stets dreidimensionale, aber nicht notwendigerweise quantitative Analysen dar. Morphometrische Untersuchungen sind *per se* quantitativer, aber nicht zwingend räumlicher Natur. In der Histopathologie dient die quantitative Stereologie dazu aus den zweidimensionalen histologischen Schnitten quantitative Rückschlüsse auf die dreidimensionalen zugrunde liegenden Strukturen, wie etwa Organe oder Gewebe, zu ziehen (Gundersen *et al.*, 2013, Mattfeldt, 1990, Nyengaard, 1999). Hierbei stellt die quantitative Stereologie eine Kombination aus statistischen Probennahmeprinzipien und geometrischen Analysen der Mikrostruktur des Gewebes dar (Gundersen *et al.*, 2013). Die Stereologie gründet auf Prinzipien der Statistik. Die Anwendbarkeit stereologischer Methoden hängt

daher von der strikten Einhaltung zufälliger Probennahmestrategien ab (Howard and Reed, 2005). Grundvoraussetzung der stereologischen Methoden ist es, repräsentative Proben zu generieren, die die zu untersuchenden Eigenschaften der Gewebe, Organe oder Organkompartimente ausreichend widerspiegeln und berücksichtigen (Gundersen *et al.*, 2013, Howard and Reed, 2005). Quantitativ-stereologische Methoden können in der Histopathologie durch ihre hohe Sensitivität bereits kleinste morphologische Veränderungen, welche subjektiv nicht als solche vom Untersucher erkannt werden können, feststellen (Boyce *et al.*, 2010, Gundersen *et al.*, 2013, Hoefflich *et al.*, 2002, Nyengaard, 1999). Die Ergebnisse aller stereologischen Untersuchungen stellen dabei mathematische Schätzwerte der zu untersuchenden Parameter dar. Man unterscheidet neben den geometrischen Grundgrößen (Länge, Fläche, Oberfläche, Volumen, Anzahl) klassische stereologische Strukturparameter (z.B. Volumendichte) und Partikelparameter (z.B. mittleres Volumen von bestimmten Strukturelementen) (Gundersen *et al.*, 2013, Howard and Reed, 2005, Mattfeldt, 1990, Weibel, 1979).

### **2.2.8 Orientierung der Proben für quantitativ stereologische Untersuchungen:**

#### **IUR und VUR Proben**

Quantitative morphologische Merkmale können verlässlich und verzerrungsfrei (= unbiased), modellfrei (model independent, auch als design-based bezeichnet) mit quantitativen stereologischen Methoden bestimmt werden (Howard and Reed, 2005). Hierbei müssen die Eigenschaften der untersuchten Gewebe- oder Zellstrukturen, wie Polydispersität, Polymorphie, Inhomogenität und Anisotropie berücksichtigt werden. Daher ist die räumliche Orientierung der Probe für die Bestimmbarkeit quantitativ-morphologischer Parameter, wie beispielsweise mittlere, relative und absolute Anzahl, Länge und Oberfläche verschiedener Zellen, von entscheidender

Bedeutung und beeinflusst die Durchführbarkeit einer quantitativ-stereologischen Analyse maßgeblich (Howard and Reed, 2005). Die Anforderungen an die Orientierung der Proben und die weitere Prozessierung (beispielsweise das Einbettungsmedium) sind deshalb je nach zu untersuchenden Parametern und Geweben unterschiedlich und müssen im Vorhinein festgelegt werden (Gundersen *et al.*, 2013, Howard and Reed, 2005).

In **IUR-Schnitten** (= isotropic uniform random) sind die Schnittebenen, die in einer stereologischen Analyse untersucht werden, in allen Ebenen des Raumes zufällig orientiert. Daher können IUR-Schnitte zur Bestimmung aller stereologischen Parameter verwendet werden. In einer Studie muss eine ausreichend große Anzahl an IUR-Proben quantitativ-stereologisch untersucht werden, damit die Eigenschaften (z.B. Form, Größe, Verteilung u.a.) der zu untersuchenden Strukturelemente ermittelt werden können. Ein Nachteil der Verwendung von IUR-Schnitten ist die oft nicht mehr mögliche Orientierung an der Morphologie innerhalb der Probe, durch die völlig zufällige Schnittrichtung (Gundersen *et al.*, 2013, Howard and Reed, 2005, Nyengaard, 1999). IUR-Schnitte kleiner Objekte oder Gewebeproben lassen sich beispielsweise mit der sogenannten Isektor-Methode anfertigen. Mit der als Orientator-Methode bezeichneten Technik können IUR-Schnitte größerer Objekte oder Gewebeproben erstellt werden. Die Herstellung von IUR-Schnitten mit der Isektor- und der Orientator-Methode wird im Folgenden beschrieben:

Die **Isektor-Methode** zur Herstellung von IUR-Schnitten kleiner Proben oder Gewebestücke beginnt mit der Herstellung einer sphärischen und isotropen Form durch Einbettung (z.B. mit Agar) einer kleinen Probe beziehungsweise eines kleinen Gewebestücks in eine kugelförmige Form. Bei der Isektor-Methode wird die Orientierung der Probe selbst randomisiert, indem die isotrope Kugel in einer zufälligen Position (z.B. zufällig erzeugt durch Rollen auf Unterlage) geschnitten wird.

Durch diese Randomisierung der Lage der Probe im Raum entsteht eine isotrope zufällige Schnittfläche (Nyengaard and Gundersen, 1992).

Die **Orientator-Methode** erweist sich bei anisotropen Strukturen als besonders effizient (Mattfeldt, 1990). Bei dieser Methode wird zur Herstellung von IUR-Schnitten von größeren Organ- oder Gewebeproben die gewonnene Probe zweimal in zufällig orientierter Richtung geschnitten, um eine IUR-Schnittebene zu erhalten. Hierbei wird im Gegensatz zum Isektor die Schnittebene der Probe randomisiert (Mattfeldt *et al.*, 1990). Der Orientator stellt eine einfache und schnelle Methode dar, für die kein spezielles Herstellungsmaterial benötigt wird (Nyengaard, 1999).

**Ortrips** (= orthogonal triplet) sind Schnitte aus drei zueinander rechtwinkligen Schnittflächen, bei der die erste Schnittfläche ein IUR-Schnitt ist. Zuerst wird eine IUR-Schnittfläche einer Gewebeprobe erstellt und dann werden zwei weitere Schnitte im rechten Winkel zueinander und zur ersten Schnittfläche generiert (Mattfeldt *et al.*, 1985).

Für **VUR-Proben** (= vertical uniform random) wird in der gewonnenen Probe eine vertikale Achse durch den Experimentator festgelegt, welche stets wiedererkennbar ist (Baddeley *et al.*, 1986). Dann wird die Probe um diese Achse rotiert und in einem zufälligen Winkel, parallel zu der vertikalen Achse eine Schnittfläche erzeugt. VUR-Proben werden oftmals aus Gewebeproben, welche eine natürliche flache und wiedererkennbare Oberfläche besitzen (z.B. Haut, Schleimhaut), generiert. Hierbei kann eine Achse vertikal zur natürlichen Oberfläche dann bereits als die festgelegte Achse fungieren. Abgesehen von Längendichten können in VUR-Proben alle auch in IUR-Proben bestimmbar Parameter ermittelt werden. Vorteil dieser Methode ist die verbleibende bekannte Ebene in der Probe und die dadurch mögliche Orientierung anhand der Morphologie. VUR-Proben

eigenen sich insbesondere zur Bestimmung von Oberflächendichten (Baddeley *et al.*, 1986).

Für weiterführende anschauliche detaillierte Erklärungen oben genannter Methoden wird auf die in dieser Arbeit enthaltene Publikation (siehe Kapitel 3) und den in den zugehörigen Supplementen enthaltenen Abschnitt 1.6 verwiesen.

### 3 Publikation

Abbl, B., Haesner, S., Braun-Reichhart, C., Streckel, E., Renner, S., Seeliger, F., Wolf, E., Wanke, R., and Blutke A. (2016). Tissue Sampling Guides for Porcine Biomedical Models. Toxicol Pathol. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1177/0192623316631023.

Die Nummerierung der einzelnen Abschnitte und die Seitenzahlen in der Veröffentlichung sind unabhängig von der Kapitelnummerierung und den Seitenzahlen in der vorliegenden Dissertation.

# Tissue Sampling Guides for Porcine Biomedical Models

Toxicologic Pathology  
2016, Vol. 44(3) 414-420  
© The Author(s) 2016  
Reprints and permission:  
sagepub.com/journalsPermissions.nav  
DOI: 10.1177/0192623316631023  
tpx.sagepub.com



Barbara Albl<sup>1,2</sup>, Serena Haesner<sup>1</sup>, Christina Braun-Reichhart<sup>3</sup>,  
Elisabeth Streckel<sup>3</sup>, Simone Renner<sup>3</sup>, Frank Seeliger<sup>4</sup>, Eckhard Wolf<sup>3,5</sup>,  
Rüdiger Wanke<sup>1</sup>, and Andreas Blutke<sup>1</sup>

## Abstract

This article provides guidelines for organ and tissue sampling adapted to porcine animal models in translational medical research. Detailed protocols for the determination of sampling locations and numbers as well as recommendations on the orientation, size, and trimming direction of samples from ~50 different porcine organs and tissues are provided in the Supplementary Material. The proposed sampling protocols include the generation of samples suitable for subsequent qualitative and quantitative analyses, including cryohistology, paraffin, and plastic histology; immunohistochemistry; *in situ* hybridization; electron microscopy; and quantitative stereology as well as molecular analyses of DNA, RNA, proteins, metabolites, and electrolytes. With regard to the planned extent of sampling efforts, time, and personnel expenses, and dependent upon the scheduled analyses, different protocols are provided. These protocols are adjusted for (I) routine screenings, as used in general toxicity studies or in analyses of gene expression patterns or histopathological organ alterations, (II) advanced analyses of single organs/tissues, and (III) large-scale sampling procedures to be applied in biobank projects. Providing a robust reference for studies of porcine models, the described protocols will ensure the efficiency of sampling, the systematic recovery of high-quality samples representing the entire organ or tissue as well as the intra-/interstudy comparability and reproducibility of results.

## Keywords

biobank, biomedical research, minipig, necropsy, organ/specimen collection, pig, systematic random sampling.

## Introduction

Pigs are increasingly being used as disease models in translational medicine and as large animal model systems in surgery, transplantation research, and toxicologic pathology (Aigner et al. 2010; Gun and Kues 2014; Lunney 2007; Wuensch et al. 2014). The growing popularity of porcine models in biomedical research is due to several advantageous similarities between pigs and human beings that cannot be reproduced adequately in classical rodent models (Aigner et al. 2010). Due to the proximity to human anatomy, physiology and body dimensions, the comparably short generation interval (1 year), and high fertility rates, pigs are an ideal model organism for basic research and the study of disease mechanisms as well as model organisms for testing novel surgical and pharmacological therapeutic strategies (Aigner et al. 2010). Moreover, sound molecular biological methods for genetic modification of pigs are currently available, allowing for generation of tailored porcine large animal models for diverse human diseases (Aigner et al. 2010; Klymiuk et al. 2010; Klymiuk et al. 2012a; Kurome et al. 2015; Wu et al. 2013). Such genetically modified pig models have successfully been established for cystic fibrosis, diabetes mellitus, Duchenne muscular dystrophy, and other important human diseases (Aigner

et al. 2010; Gun and Kues 2014; Klymiuk et al. 2013; Klymiuk et al. 2012b; Lunney 2007; Renner et al. 2013; Wolf et al. 2014). The potential of tailored pig models for testing targeted therapies is outlined by Klymiuk et al. in this issue of *Toxicologic Pathology* (Klymiuk et al. 2015).

Deriving optimal benefit from porcine animal models requires experimental study designs and examination protocols that warrant representative samples, reproducible results, and comparable analyses between different studies and

<sup>1</sup> Institute of Veterinary Pathology, Center for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany

<sup>2</sup> Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany

<sup>3</sup> Gene Center and Center for Innovative Medical Models (CiMM), Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany

<sup>4</sup> Pathology Science, DSM, AstraZeneca, Sweden

<sup>5</sup> German Center for Diabetes Research (DZD), Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Germany

## Corresponding Author:

Andreas Blutke, Institute of Veterinary Pathology, Center for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Veterinärstr. 13, 80539 Munich, Germany.

Email: blutke@patho.vetmed.uni-muenchen.de



investigators. Here, the applied mode of selection of biological samples, including the location, size, number, and orientation, is of great importance because it will affect the results of the subsequent investigations, ranging from histological examinations to molecular profiling analyses. In rodent models, the introduction and broad application of guidelines for the standardized generation of samples have greatly contributed to the quality as well as to the intra- and interstudy comparability of results (Kittel et al. 2004; Morawietz et al. 2004; Ruehl-Fehlert et al. 2003). Comparable sampling guidelines have not been established so far for porcine models.

However, rodent sampling protocols cannot be directly adapted to pig models because there are considerable differences in the anatomy and size of porcine and rodent organs/tissues. In addition to physical and anatomic features, several other important aspects have to be considered in the sampling strategies for porcine animal models. The considerably longer generation interval of pigs compared to rodents, as well as the significantly higher costs, time, and personnel efforts required for the generation of porcine models and for pig husbandry, limits the number of available animals.

Therefore, the individual animals of a respective porcine model and the samples generated from these pigs are particularly valuable, especially if genetically modified pigs and/or long-term experimental issues, such as prolonged disease courses, are to be examined. In the course of any study, additional experiments, which had not been scheduled at the beginning, might later turn out to be relevant. If suitable samples for such additional experiments are not available, they have to be generated from additional animals. Particularly, if aged pigs of genetically modified models are examined, the efforts that have to be deployed for the generation of additional animals are considerably higher than in corresponding rodent models.

In light of the steadily growing relevance of pig models in biomedical research and species-specific differences, the implementation of uniform and standardized protocols for sample generation from porcine organs and tissues applicable to a wide range of subsequent types of analyses is urgently needed to take full advantage of the translational value of porcine animal models. The proposed guidelines will allow the generation of comparable and reproducible high-quality specimens and might reduce the number of animals needed in a study by avoiding the unnecessary sacrifice of valuable animals for the repeated generation of samples (Tornqvist et al. 2014).

## Sampling Guides for Porcine Organs and Tissues

In total, sampling protocols for ~50 porcine organs and tissues (see Supplementary Material), adjusted to the expenditures and scopes of the following 3 different study types, are provided:

Type I: Routine screenings for the detection of histopathological organ alterations in new porcine models, studies examining general gene expression patterns in organs/tissues, and general toxicity studies.

Type II: Advanced examinations of distinct organs/tissues, with the generation of a sufficient number of backup samples, suitable for a wide range of diverse analyses, including analyses not specified at the time point of sampling.

Type III: Biobank projects, requiring large-scale sampling procedures to generate high numbers of various different types of samples suitable for as many different types of analyses as possible, taken from a broad spectrum of different organs/tissues.

The respective protocols are designed to fit the demands of the industrial standards of the pharmaceutical industry and toxicologic pathology. They have been developed based on extensive experiences in pig toxicopathology, in pathomorphological characterization of numerous genetically modified pig models, and in porcine animal model biobanking (Abbott 2015; Aigner et al. 2010; Kemter et al. 2012; Klymiuk et al. 2013; Klymiuk et al. 2012a; Klymiuk et al. 2012b; Klymiuk et al. 2012c; Renner et al. 2010, 2012, 2013; Streckel et al. 2015; Wuensch et al. 2014). The proposed sampling protocols are intended as general guidelines but not as requirements for the sampling of tissues in any porcine model. The protocols can generally be applied to the organs/tissues of pigs weighing ~10 to ~400 kg and can be modified accordingly if smaller or younger animals are examined.

In studies of the first type (I) or in experiments that, in addition to a different main experimental task, a broad set of organs/tissues has to be examined in a routine, overview fashion by standard analyses methods, the applied sampling protocols allows for fast, uncomplicated and less elaborate sampling. Therefore, type I study sampling protocols include the collection of a limited number of samples per organ/tissue taken from deliberately defined locations, with uniform sample sizes and predefined orientations/cutting directions of a histological specimen. Type I sampling is considered adequate for the identification of qualitative histopathological changes and general organ-/tissue-specific gene expression patterns in routine studies. If organs/tissues display macroscopically evident pathological alterations, additional samples for histopathology, microbiology, virology, and molecular analyses are taken from the altered sites, as appropriate.

The list of porcine organs and tissues scheduled for routine examination in type I studies and lists of organs/tissues recommended for pathohistological examination in routine toxicity studies in rodent and nonrodent species by the Society of Toxicologic Pathology (STP) and by different public institutions and regulatory authorities are shown in Table 1. Except for rodent-specific organs, all organs and tissues regularly evaluated in other species are also examined in porcine models. Additionally, the generation of samples for histopathology and molecular analyses is scheduled for some porcine organs/tissues, which are not regularly included in established sampling guidelines for routine toxicity studies. These include organs and anatomical structures that are sampled because they are characteristically well developed in pigs, such as the

**Table 1.** List of Organs and Tissues Scheduled for Routine Examination in Type I Studies of Porcine Models and Organ Lists Recommended for Histopathological Examination in Routine Toxicity Studies by the STP and Various Public Institutions and Regulatory Authorities.

Organ System	Organ/Tissue	STP	EMA	EPA	FDA	RITA/ NACAD	Porcine Type I Study	Organ System	Organ/Tissue	STP	EMA	EPA	FDA	RITA/ NACAD	Porcine Type I Study
Nervous	Brain	+	+	+	+	+	+	Gastrointestinal	Tongue	-	-	-	-	+	+
	Spinal cord	+	+	+	+	+	+		Pharynx	-	-	-	-	+	+
	Peripheral nerve	+	+	+	+	+	+		Salivary glands	+	+	+	+	+	+
	Heart	+	+	+	+	+	+		Esophagus	+	+	+	+	+	+
Cardiovascular	Aorta	+	+	+	+	+	+	Stomach	+	+	+	+	+	+	
	Nasal septum	+	+	+	+	+	+	Duodenum	+	+	+	+	+	+	
Respiratory	Conchae	+	+	+	+	+	+	Jejunum	+	+	+	+	+	+	
	Olfactory mucosa	+	+	+	+	+	+	Ileum	+	+	+	+	+	+	
	Larynx	+	+	+	+	+	+	Caecum	+	+	+	+	+	+	
	Trachea	+	+	+	+	+	+	Colon	+	+	+	+	+	+	
Endocrine	Lungs	+	+	+	+	+	+	Rectum	-	-	-	-	+	+	
	Pituitary gland	+	+	+	+	+	+	Hepatobiliary and pancreatic	+	+	+	+	+	+	
	Thyroid gland	+	+	+	+	+	+	Pancreas	+	+	+	+	+	+	
	Parathyroid gland	+	+	+	+	+	+	Liver	+	+	+	+	+	+	
Urinary	Adrenal glands	+	+	+	+	+	+	Gall bladder	+	+	+	+	+	+	
	Kidney	+	+	+	+	+	+	Ovaries	+	+	+	+	+	+	
	Ureter	-	-	-	-	-	-	Fallopian tube	-	-	-	-	+	+	
	Urinary bladder	+	+	+	+	+	+	Uterus	+	+	+	+	+	+	
Immune and hematopoietic	Urethra	-	-	-	-	-	-	Cervix	-	-	-	-	+	+	
	Lymph nodes	+	+	+	+	+	+	Vagina	+	+	+	+	+	+	
	Thymus	+	+	+	+	+	+	Clitoral gland	-	-	-	-	+	+	
	Bone marrow	+	+	+	+	+	+	Testes	+	+	+	+	+	+	
Musculoskeletal	Spleen	+	+	+	+	+	+	Epididymis	+	+	+	+	+	+	
	Tonsil	+	+	+	+	+	+	Prostate	+	+	+	+	+	+	
	Skeletal muscle	+	+	+	+	+	+	Vesicular gland	+	+	+	+	+	+	
	Bones	+	+	+	+	+	+	Spermatric cord	-	-	-	-	-	+	
Integument	Joints	+	+	+	+	+	+	Bulbourethral gland	-	-	-	-	-	+	
	Tendon	+	+	+	+	+	+	Coagulating gland	-	-	-	-	-	+	
	Skin	+	+	+	+	+	+	Penis	-	-	-	-	-	+	
	Mammary gland	+	+	+	+	+	+	Prepuce	-	-	-	-	-	+	
Special senses	Adipose tissue	-	-	-	-	-	-	Preputial gland	-	-	-	-	-	+	
	Eyes	+	+	+	+	+	+	Harderian gland	+	+	+	+	+	+	
	Ear	-	-	-	-	-	-	Zymbal's gland	+	+	+	+	+	+	

Note. STP = The Society of Toxicologic Pathology (STP) recommended tissue lists for histopathologic examination in repeat-dose toxicity and carcinogenicity studies (Bregman et al. 2003). EMA = the guidelines on repeated dose toxicity from the Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) of the European Medicines Agency (EMA) from March 18, 2010 (CPMP/SWP/1042/99 Rev 1). Both the STP and the EMA documents provide a minimum core list of organs/tissues to be examined by histopathology in all types of repeat-dose toxicity and carcinogenicity studies, regardless of the route of administration, species or strain of mammalian laboratory animal, the duration of study, or class of drug being tested. If appropriate, the addition of other tissues relevant to the route of administration is recommended. EPA = The Health Effects Test Guidelines (OPPTS 870.3150) for 90-day oral toxicity in nonrodents from the U.S. Environmental Protection Agency (EPA 712-C-98-200 August 1998). FDA = food and drug administration (FDA) of the U.S. Department of Health and Human Services. Organ list for microscopic examination in toxicity studies. In Redbook 2000: Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients (2003). General Guidelines for Designing and Conducting Toxicity Studies. RITA/NACAD = revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice (parts 1-3) of the Registry of Industrial Toxicology Animal-data (RITA) and the North American Control Animal Database (NACAD) groups (Kittel et al. 2004; Morawietz et al. 2004; Ruehl-Fehlert et al. 2003).

<sup>a</sup>Inhalation studies.  
<sup>b</sup>Urethral tissue is usually present in sections of the prostate gland.  
<sup>c</sup>Nonrodents: bone marrow from either the rib or the sternum. Rodents: the femoral bone marrow.  
<sup>d</sup>Sternum.  
<sup>e</sup>Nonrodents: either the rib or the sternum. Rodents: femur with articular cartilage.  
<sup>f</sup>Femur.  
<sup>g</sup>Knee joint with distal femur and proximal tibia.  
<sup>h</sup>Females only.  
<sup>i</sup>Both sexes.

bulbourethral gland and the palatine tonsil, or because they represent routinely examined predilection sites for pathological alterations in certain porcine diseases, such as the ileal papilla in swine dysentery. Sampling of other tissues and organs included in the type I study sampling list, such as adipose tissue, tendons, middle and inner ear structures, the urethra, the spermatic cord, the penis, and the prepuce, may be skipped in routine toxicity studies if no gross lesions are present at necropsy and no clinical findings support a histopathological examination. However, when genetically modified, “new” porcine models are necropsied for an initial, overall pathological examination, the rare opportunity to collect and examine these “uncommon” tissues/structures should be used.

The sampling protocols designed for type II and III studies are particularly designed for the examination of genetically modified pig models and allow for the generation of samples that are quantitatively and qualitatively suitable for a large(r) range of possible subsequent analyses. Aside from the generation of samples for the analyses actually scheduled in the experimental design of a specific study, sampling protocols for type II and III studies also provide the opportunity to generate sufficient numbers of differentially processed backup samples for additional types of analyses in advance. Furthermore, these protocols allow for the provision of a comprehensive biobank collection of redundant, adequately processed samples from any organ or tissue of potential interest (Abbott 2015). The spectrum of possible downstream analyses may include descriptive and quantitative histopathological analyses, such as histological examinations of differentially fixed samples and samples embedded in different embedding media, including paraffin or plastic resin as well as frozen-section histology, immunohistochemistry, *in situ* hybridization, electron microscopy, and quantitative stereological analyses. Additionally, clinical laboratory diagnostic analyses as well as DNA, RNA, and protein analyses including holistic OMICS profiling of frozen, and of otherwise preserved, sample materials might be performed.

Wherever applicable, type II and III sampling protocols schedule volume-weighted systematic random sampling procedures (Gundersen and Jensen 1987) for several organs, including the liver, spleen, kidneys, adrenal and thyroid glands, pancreas, salivary glands, thymus, and lungs. In this instance, the sampling positions and numbers of samples to be taken are based on stochastic parameters and depend on anatomic–morphological and functional properties of the respective organ/tissue. These sampling regimes ensure sampling of representative specimens, avoid systematic sampling biases, reduce experimental variability, and efficiently increase the precision of the overall experiment (Howard and Reed 2005). From each of the systematically randomly determined sampling positions, multiple samples are harvested and differentially processed according to the respective scheduled subsequent analyses. This time- and labor-saving principle may easily be adjusted to the individual sample-number and sample-type demands of a specific study. An exception to the general systematic random sampling approaches, where the entire organ is sampled, was

made in organs/tissues with numerous and/or complexly structured morphologic components, such as the central nervous system or the heart, where the necessary number of sampling sites determined by systematic random sampling over the total organ would be exceedingly disproportionately high and therefore impractical. Therefore, in these organs, samples are taken from defined locations, such as defined brain areas, or distinct cardiac structures that are of interest in a specific experiment. If appropriate, the excised tissue regions of interest are then subjected to a subsequent random sampling procedure to generate representative subsamples for different downstream analyses. In practice, the workload, the personnel requirements, and the time frame and temperature conditions of a distinct sampling procedure must be compatible with the requirements of the study design and the scheduled analyses. Thus, unless the primary scientific scope of a study necessarily requires systematic random sampling of the entire organ/tissue, taking samples from defined anatomical locations appears sufficient for most qualitative histopathological and molecular–biological analyses in tissues, such as the mammary glands, adipose tissue, skin, and skeletal musculature.

For selected organs, study type II and III sampling protocols additionally present appropriate methods for the determination of the total organ (i.e., the reference compartment) volumes by Cavalieri volumetry or via the determination of the specific density of the tissue (Howard and Reed 2005; Scherle 1970). Moreover, the generation of backup specimens suitable for quantitative histomorphological analyses requiring isotropic uniform random–sectionable and vertical uniform random–sectionable samples is routinely scheduled in type II and type III study sampling protocols for several organs/tissues. These samples enable the assessment of a wide range of quantitative stereological parameters that might yet emerge to be of interest in later courses of a study and could not be adequately determined without the respective specimen (Gundersen et al. 2013; Howard and Reed 2005). Further information on the practical application of systematic random sampling, volumetry, and sample processing for quantitative stereological analyses is provided in the Supplemental Material and in the pertinent literature cited there.

## Sampling Protocol Instructions and Illustrations

The sampling protocols proposed in the Supplemental Material provide detailed descriptions of applicable sampling procedures (type I–III studies) for different organs/tissues and various different downstream analyses, as illustrated by schematic drawings, macroscopic images, and histological images. The initial section presents different sampling strategies applicable to porcine organs and tissues, the determination of the specific density of porcine tissues, organ volumetry, estimation of embedding-related tissue shrinkage, and the generation of samples for quantitative stereological analyses. The sampling guides for the different organs/tissues usually cover particular information on the following topics:

- (1) *Relevant pig-specific anatomic features and practical recommendations regarding the preparation of different organs/tissues.*
- (2) *Cutting directions and orientations of samples for histopathological examinations.* The symbols used to indicate different cutting directions, sample orientations, and section planes in schematic drawings and photo images are explained in Supplemental Figure S14.
- (3) *Sample numbers/locations.* For routine screenings in type I studies, the anatomic location of the samples to be taken from the respective organs/tissues is indicated. The number of samples that has to be taken by systematic random sampling generally depends on the size of the organ/tissue, the size of the tissue sample pieces, the statistical properties of the investigated parameters, such as interindividual/biological and interspecimen variances, as well as the type and extent of the scheduled subsequent analyses. Therefore, the sample numbers indicated in the sampling guidelines merely represent recommended guidance levels, which should generally be sufficient for most analyzed parameters. Depending on the investigated parameter, the actual number of necessary sampling positions per organ/tissue might, thus, be lower for a specific experiment.
- (4) *Individual sample sizes and specific tissue processing methods for different downstream analyses.* The maximal size of an individual sample is limited by different factors, including the size of the respective organ, the number of samples to be harvested, and the specific conditions of the subsequent processing of the sample, such as the maximal penetration depth of fixatives and the size of embedding cassettes and test tubes. The dimension of individual samples designated for molecular analyses is approximately  $3 \times 3 \times 3$  mm. These samples are frozen on dry ice and then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further analysis. The size of samples to be processed for histological examination is usually up to  $2 \times 2 \times 0.5$  cm for paraffin-embedded specimens,  $\sim 1 \times 1 \times 0.5$  cm for plastic resin (glycol methacrylate/methylmethacrylate [GMA/MMA])-embedded specimens,  $\leq 1 \times 1 \times 0.5$  cm for cryohistology samples, and  $\leq 2 \times 2 \times 2$  mm for the glutaraldehyde-fixed specimen. The standard fixatives used in the present guidelines are 10% formalin (4% neutrally buffered formaldehyde solution), fixation for 24 hr at room temperature (RT); methacarn solution (60% absolute methanol, 30% chloroform, 10% glacial acetic acid v/v), fixation for  $\geq 24$  hr at RT, samples are then rinsed in 70% ethanol and tissue processing for paraffin embedding is started in 70% ethanol; and glutaraldehyde solution (2.5% or 6.25% in Sorensen's buffer, as indicated). For cryosectioning, tissue specimens are embedded in Tissue-Tek<sup>®</sup> O.C.T.<sup>™</sup>-blocking medium (Sakura Finetek Europe B.V., the Netherlands), frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until sectioning. Alternatively, the samples can be frozen in dry ice-cooled isopentane without a blocking medium to include methods such as the mass spectrometry imaging in the spectrum of possible downstream analyses (Goodwin et al. 2011). Formalin-fixed bone specimen are decalcified, using a slow-acting, acid-based decalcification solution (DC3; Labonord, Germany) for 3–30 days at RT. The embedding media for samples used for histological and quantitative histopathological analyses are paraffin, glycidyl ether (Epon) resin, and GMA/MMA (Hermanns, Liebig, and Schulz 1981). Non-standard materials used for sampling/tissue processing are specified in the descriptions of the respective sampling protocols. For a simplified presentation, the different downstream analysis types are indicated by pictograms (Supplemental Figure S15).
- (5) *A comparison of the study type I sampling protocols with established recommendations for histopathological examinations in routine toxicity studies in rodents.* For each organ/tissue, the similarities and differences between the type I study sampling protocols for porcine models, standard guidelines for organ sampling and trimming in rats and mice (Kittel et al. 2004; Morawietz et al. 2004; Ruehl-Fehlert et al. 2003), and applicable “Best Practices” guides of Working Groups of the STP are discussed (Bolon et al. 2013; Haley et al. 2005; Reagan et al. 2011).
- (6) *The recommended cross grid sizes for systematic random sampling procedures.*
- (7) *Schematic illustrations* are provided where appropriate and are drawn in gray scales to preserve the recognizability of image details in black and white printouts.
- (8) *Histological images.* In the type I study sampling guidelines, HE-stained histological images of the indicated section planes are provided, with the relevant tissue structures indicated.
- (9) *Estimates of the expected time and personnel efforts for sample collection in type II and III studies.*
- (10) References to the most relevant literature.

## Conclusions

Because of the increasing importance of porcine animal models in biomedical research, the application of consistent and appropriate sampling procedures for tissue evaluation will increase the quality of these studies. The sampling protocols provide a basis for the generation of representative, high-quality samples using standardized procedures, which will contribute to the validity of inter- and intrastudy comparisons in porcine studies. The proposed sampling procedures and indicated sample numbers and sizes are intended as guidelines for sampling organs/



tissues in pigs but not as requirements that must be met in any research project involving porcine animal models. The different sampling protocols for the type I, II, and III studies can be combined and individually adjusted to the protocol-defined objectives of a specific research project. The proposed “forward-looking” sampling strategies ensure that all necessary samples are correctly collected and processed for a given study so that they might contribute to a reduction in the number of animals needed in a study (Tornqvist et al. 2014).

### Acknowledgments

The authors thank L. Pichl, J. Grieser, M. Handl, and A. Hinrichs for excellent technical assistance and Dr. M. Leipig, Dr. B. Keßler, and P. B. Uhl for their conceptual input. LP, JG, MH, and ML are affiliated with the Institute of Veterinary Pathology, Center for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany. AH and BK are affiliated with Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany. PBU is affiliated with the Institute of Animal Physiology, Department of Veterinary Sciences, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany.

### Author Contribution

Authors contributed to conception or design (BA, SH, CB, ES, SR, FS, EW, RW, AB); data acquisition, analysis, or interpretation (BA, SH, CB, ES, SR, FS, EW, RW, AB); and drafting the manuscript (BA, EW, RW, AB). All authors critically revised the manuscript, gave final approval, and agreed to be accountable for all aspects of work in ensuring that questions relating to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. AB crafted the illustrations.

### Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared the following potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article: C.B.-R., E.S., S.R., A.B., R.W., and E.W. declare that they have no competing interests. This study was supported by the Federal Ministry of Education and Research (Leading-Edge Cluster m<sup>4</sup>—Personalized Medicine and Targeted Therapies; German Center for Diabetes Research). B.A. is an employee of Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany. F.S. is an employee of AstraZeneca RD, Mölndal, Sweden. S.H. received a PhD scholarship from the Hanns-Seidel-Stiftung e. V., Munich, Germany. The authors of this study are members of the EU COST Action BM1308 “Sharing advances on large animal models—SALAAM.”

### Funding

The author(s) received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

### Supplemental Material

The online data supplements are available at <http://tpx.sagepub.com/supplemental>.

### References

Abbott, A. (2015). Inside the first pig biobank. *Nature* **519**, 397–98.  
 Aigner, B., Renner, S., Kessler, B., Klymiuk, N., Kurome, M., Wunsch, A., and Wolf, E. (2010). Transgenic pigs as models for translational biomedical research. *J Mol Med (Berl)* **88**, 653–64.

Bolon, B., Garman, R. H., Pardo, I. D., Jensen, K., Sills, R. C., Roulois, A., Radovsky, A., Bradley, A., Andrews-Jones, L., Butt, M., and Gumprecht, L. (2013). STP position paper: Recommended practices for sampling and processing the nervous system (brain, spinal cord, nerve, and eye) during nonclinical general toxicity studies. *Toxicol Pathol* **41**, 1028–48.  
 Bregman, C. L., Adler, R. R., Morton, D. G., Regan, K. S., and Yano, B. L. (2003). Recommended tissue list for histopathologic examination in repeat-dose toxicity and carcinogenicity studies: a proposal of the Society of Toxicologic Pathology (STP). *Toxicol Pathol* **31**, 252–53.  
 Goodwin, R. J., Pitt, A. R., Harrison, D., Weidt, S. K., Langridge-Smith, P. R., Barrett, M. P., and Logan Mackay, C. (2011). Matrix-free mass spectrometric imaging using laser desorption ionisation Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **25**, 969–72.  
 Gun, G., and Kues, W. A. (2014). Current progress of genetically engineered pig models for biomedical research. *Biores Open Access* **3**, 255–64.  
 Gundersen, H. J. G., and Jensen, E. B. (1987). The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* **147**, 229–63.  
 Gundersen, H. J. G., Mirabile, R., Brown, D., and Boyce, R. W. (2013). Stereological principles and sampling procedures for toxicologic pathologists. In *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology* (W. Haschek, C. Rousseaux, and M. Wallig, eds.), 3rd ed., 215–86. London: Academic Press.  
 Haley, P., Perry, R., Ennulat, D., Frame, S., Johnson, C., Lapointe, J. M., Nyska, A., Snyder, P., Walker, D., and Walter, G. (2005). STP position paper: Best practice guideline for the routine pathology evaluation of the immune system. *Toxicol Pathol* **33**, 404–7, discussion 408.  
 Hermanns, W., Liebig, K., and Schulz, L. C. (1981). Postembedding immunohistochemical demonstration of antigen in experimental polyarthritis using plastic embedded whole joints. *Histochemistry* **73**, 439–46.  
 Howard, C. V., and Reed, M. G. (2005). *Unbiased stereology*. QTP Publications, Coleraine, UK.  
 Kemter, E., Lieke, T., Kessler, B., Kurome, M., Wuensch, A., Summerfield, A., Ayares, D., Nagashima, H., Baars, W., Schwinzer, R., and Wolf, E. (2012). Human TNF-related apoptosis-inducing ligand-expressing dendritic cells from transgenic pigs attenuate human xenogeneic T cell responses. *Xenotransplantation* **19**, 40–51.  
 Kittel, B., Ruehl-Fehlert, C., Morawietz, G., Klapwijk, J., Elwell, M. R., Lenz, B., O'Sullivan, M. G., Roth, D. R., Wadsworth, P. F., Group, R., and Group, N. (2004). Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice—Part 2. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp Toxicol Pathol* **55**, 413–31.  
 Klymiuk, N., Aigner, B., Brem, G., and Wolf, E. (2010). Genetic modification of pigs as organ donors for xenotransplantation. *Mol Reprod Dev* **77**, 209–21.  
 Klymiuk, N., Blutke, A., Graf, A., Krause, S., Burkhardt, K., Wuensch, A., Krebs, S., Kessler, B., Zakhartchenko, V., Kurome, M., Kemter, E., Nagashima, H., Schoser, B., Herbach, N., Blum, H., Wanke, R., Aartsma-Rus, A., Thirion, C., Lochmuller, H., Walter, M. C., and Wolf, E. (2013). Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. *Hum Mol Genet* **22**, 4368–82.  
 Klymiuk, N., Bocker, W., Schonitzer, V., Bahr, A., Radic, T., Frohlich, T., Wunsch, A., Kessler, B., Kurome, M., Schilling, E., Herbach, N., Wanke, R., Nagashima, H., Mutschler, W., Arnold, G. J., Schwinzer, R., Schieker, M., and Wolf, E. (2012a). First inducible transgene expression in porcine large animal models. *FASEB J* **26**, 1086–99.  
 Klymiuk, N., Mundhenk, L., Kraeche, K., Wuensch, A., Plog, S., Emrich, D., Langenmayer, M. C., Stehr, M., Holzinger, A., Kroner, C., Richter, A., Kessler, B., Kurome, M., Eddicks, M., Nagashima, H., Heinritz, K., Gruber, A. D., and Wolf, E. (2012b). Sequential targeting of CFTR by BAC vectors generates a novel pig model of cystic fibrosis. *J Mol Med (Berl)* **90**, 597–608.  
 Klymiuk, N., Seeliger, F., Bohlooly, Y. M., Blutke, A., Rudmann, D. G., and Wolf, E. Tailored pig models for preclinical efficacy and safety testing of targeted therapies. *Toxicol Pathol*. Published electronically October 27, 2015. doi:0192623315609688.

- Klymiuk, N., van Buerck, L., Bahr, A., Offers, M., Kessler, B., Wuensch, A., Kurome, M., Thormann, M., Lochner, K., Nagashima, H., Herbach, N., Wanke, R., Seissler, J., and Wolf, E. (2012c). Xenografted islet cell clusters from INSLEA29Y transgenic pigs rescue diabetes and prevent immune rejection in humanized mice. *Diabetes* **61**, 1527–32.
- Kurome, M., Kessler, B., Wuensch, A., Nagashima, H., and Wolf, E. (2015). Nuclear transfer and transgenesis in the pig. *Methods Mol Biol* **1222**, 37–59.
- Lunney, J. K. (2007). Advances in swine biomedical model genomics. *Int J Biol Sci* **3**, 179–84.
- Morawietz, G., Ruehl-Fehlert, C., Kittel, B., Bube, A., Keane, K., Halm, S., Heuser, A., Hellmann, J., Group, R., and Group, N. (2004). Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice—Part 3. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp Toxicol Pathol* **55**, 433–49.
- Reagan, W. J., Irizarry-Rovira, A., Poitout-Belissent, F., Bolliger, A. P., Ramaiah, S. K., Travlos, G., Walker, D., Bounous, D., Walter, G., and Bone Marrow Working Group of, A. S. (2011). Best practices for evaluation of bone marrow in nonclinical toxicity studies. *Vet Clin Pathol* **40**, 119–34.
- Renner, S., Braun-Reichhart, C., Blutke, A., Herbach, N., Emrich, D., Streckel, E., Wunsch, A., Kessler, B., Kurome, M., Bahr, A., Klymiuk, N., Krebs, S., Puk, O., Nagashima, H., Graw, J., Blum, H., Wanke, R., and Wolf, E. (2013). Permanent neonatal diabetes in INS(C94Y) transgenic pigs. *Diabetes* **62**, 1505–11.
- Renner, S., Fehlings, C., Herbach, N., Hofmann, A., von Waldthausen, D. C., Kessler, B., Ulrichs, K., Chodnevskaia, I., Moskalenko, V., Amselgruber, W., Goke, B., Pfeifer, A., Wanke, R., and Wolf, E. (2010). Glucose intolerance and reduced proliferation of pancreatic beta-cells in transgenic pigs with impaired glucose-dependent insulinotropic polypeptide function. *Diabetes* **59**, 1228–38.
- Renner, S., Romisch-Margl, W., Prehn, C., Krebs, S., Adamski, J., Goke, B., Blum, H., Suhre, K., Roscher, A. A., and Wolf, E. (2012). Changing metabolic signatures of amino acids and lipids during the prediabetic period in a pig model with impaired incretin function and reduced beta-cell mass. *Diabetes* **61**, 2166–75.
- Ruehl-Fehlert, C., Kittel, B., Morawietz, G., Deslex, P., Keenan, C., Mahrt, C. R., Nolte, T., Robinson, M., Stuart, B. P., Deschl, U., Group, R., and Group, N. (2003). Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice—Part 1. *Exp Toxicol Pathol* **55**, 91–106.
- Scherle, W. (1970). A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie* **26**, 57–60.
- Streckel, E., Braun-Reichhart, C., Herbach, N., Dahlhoff, M., Kessler, B., Blutke, A., Bahr, A., Ubel, N., Eddicks, M., Ritzmann, M., Krebs, S., Goke, B., Blum, H., Wanke, R., Wolf, E., and Renner, S. (2015). Effects of the glucagon-like peptide-1 receptor agonist liraglutide in juvenile transgenic pigs modeling a pre-diabetic condition. *J Transl Med* **13**, 73.
- Tornqvist, E., Annas, A., Granath, B., Jalkestén, E., Cotgreave, I., and Oberg, M. (2014). Strategic focus on 3R principles reveals major reductions in the use of animals in pharmaceutical toxicity testing. *PLoS One* **9**, e101638.
- Redbook. (2000). *IV.B.1 General Guidelines for Designing and Conducting Toxicity Studies*. U.S. Food and Drug Administration. Last modified November 2003. <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/IngredientsAdditivesGRASPackaging/ucm078315.htm>.
- Wolf, E., Braun-Reichhart, C., Streckel, E., and Renner, S. (2014). Genetically engineered pig models for diabetes research. *Transgenic Res* **23**, 27–38.
- Wu, Z., Xu, Z., Zou, X., Zeng, F., Shi, J., Liu, D., Urschitz, J., Moisyadi, S., and Li, Z. (2013). Pig transgenesis by piggyBac transposition in combination with somatic cell nuclear transfer. *Transgenic Res* **22**, 1107–18.
- Wuensch, A., Baehr, A., Bongoni, A. K., Kemter, E., Blutke, A., Baars, W., Haertle, S., Zakhartchenko, V., Kurome, M., Kessler, B., Faber, C., Abicht, J. M., Reichart, B., Wanke, R., Schwinzer, R., Nagashima, H., Rieben, R., Ayares, D., Wolf, E., and Klymiuk, N. (2014). Regulatory sequences of the porcine THBD gene facilitate endothelial-specific expression of bioactive human thrombomodulin in single- and multitransgenic pigs. *Transplantation* **97**, 138–47.

### 4 Diskussion

#### 4.1 Grundlagen und Ziele der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, standardisierte Sektions- und Probennahmeprotokolle für porcine Tiermodelle in der biomedizinischen Forschung zu etablieren. Die erstellten Probennahmepläne wurden am Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, basierend auf den langjährigen Erfahrungen bei Sektionen sowie in der pathomorphologischen Charakterisierung verschiedener Schweinemodelle und im Zusammenhang mit der Etablierung einer Gewebe- und Organproben-Biobank eines gentechnisch modifizierten diabetischen Schweinemodells erarbeitet (Abbott, 2015, Aigner *et al.*, 2010, Kemter *et al.*, 2012, Klymiuk *et al.*, 2013, Klymiuk *et al.*, 2012a, Klymiuk *et al.*, 2012b, Klymiuk *et al.*, 2012c, Renner *et al.*, 2013, Renner *et al.*, 2010, Renner *et al.*, 2012, Streckel *et al.*, 2015, Wunsch *et al.*, 2014). Hierbei wurde besonderer Wert auf die Berücksichtigung von in der Toxikopathologie und der pharmazeutischen Industrie gebräuchlichen Standards gelegt.

Die Notwendigkeit solcher standardisierter Sektions- und Probennahmeanleitungen liegt in der immer weiter zunehmenden Nutzung porciner Tiermodelle für unterschiedliche Forschungsziele und der damit verbundenen immer größer werdenden Bedeutung der adäquaten Probengewinnung und Nutzung dieser Schweine. Aufgrund ihrer Staffelung in Typ-I bis Typ-III Studien werden die vorliegenden Probennahmeprotokolle für Schweinemodelle unterschiedlichen Anwendungen und Studienzielen gerecht und können individuell an das experimentelle Design der jeweiligen Studien angepasst werden.

Bereits existierende Vorgaben verschiedener internationaler und nationaler Organisationen und Einrichtungen, wie beispielsweise der European Medicines

Agency (EMA), der United States Environmental Protection Agency (EPA), der Food and Drug Administration (FDA), der International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria (INHAND) und der Society of Toxicologic Pathology (STP) für die Probennahme und die Routineprozessierung von Organen und Gewebe bei Nagetiermodellen und Nicht-Nagetiermodellen nennen meist lediglich die zu untersuchenden Organe und Gewebe. Diese Richtlinien spezifizieren aber nicht, welcher Anteil oder welches Kompartiment eines Organs untersucht werden soll, beziehungsweise aus welchen Lokalisationen die erforderlichen Proben mithilfe welcher Probennahmeverfahren gewonnen werden sollen (Gundersen *et al.*, 2013, Ruehl-Fehlert *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu werden in den von der RITA (Registry of Industrial Toxicology Animal-data) und NACAD (North American Control Animal Database) vorgeschlagenen "Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--Part 1-3." für in toxikopathologischen Studien verwendete Nagetiermodelle definierte Entnahmelokalisationen für Proben aus diversen Organen und Geweben definiert (Kittel *et al.*, 2004, Morawietz *et al.*, 2004, Ruehl-Fehlert *et al.*, 2003). Bei den Nagermodellen haben die Etablierung und breite Akzeptanz dieser spezifizierten Probennahmeprotokolle maßgeblich zur Standardisierung und Reproduzierbarkeit bei der Probennahme und damit zur Verbesserung der Qualität des generierten Probenmaterials beigetragen (Ruehl-Fehlert *et al.*, 2003).

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelten Sektions- und Probennahmeprotokolle für porcine Tiermodelle sollen dazu dienen, die Probennahme beim Schwein zu standardisieren und repräsentatives Probenmaterial dieser Tiere für verschiedene Untersuchungsansätze zu gewinnen. Um die Durchführbarkeit eines breit gefächerten Spektrums von verschiedenen Analyseverfahren zu ermöglichen, wird im Gegensatz zu bestehenden Vorgaben, in den Probennahmeplänen für Schweinemodelle routinemäßig Probenmaterial einer weitaus größeren und



umfassenderen Bandbreite, sowohl im Zusammenhang mit der Organ- und Gewebeauswahl, als auch bei der Probenanzahl und der weiteren Prozessierung der Proben, gewonnen. Dies ermöglicht die Etablierung und Anwendung der Probennahmeprotokolle für porcine Tiermodelle in einer Vielzahl unterschiedlicher wissenschaftlicher Gebiete. Da die bestehenden Probennahmepläne für murine Tiermodelle in der Toxikopathologie durch die grundlegenden anatomischen Unterschiede nicht auf das Schwein als Tiermodell übertragen werden können und auch die Gewinnung und Nutzung des vorhandenen Tier- und Probenmaterials im Hinblick auf das Untersuchungsspektrum erheblich erweitert werden sollte, wurden Probennahmepläne für die einzelnen Organe und Gewebe des Schweins konzipiert und detailliert ausgearbeitet. In diesem Zusammenhang wurden für die Entwicklung der Probennahmeprotokolle für Schweine zusätzlich zu den oben erwähnten Nagetierprotokollen weitere bereits bestehende Probennahmeanweisungen berücksichtigt, um auch die Vergleichbarkeit mit bereits bestehenden Forschungsergebnissen zu gewährleisten und die Erfahrungen daraus mit einfließen zu lassen. Im Weiteren werden zu allen Organen und Geweben, die in anderen Studien und Richtlinien (Übersicht siehe Tabelle 1 der Publikation) sowohl bei Nagetiermodellen als auch bei Nicht-Nagetiermodellen beprobt werden, in den vorliegenden Protokollen zusätzlich schweinespezifische Organe beprobt. Auch Organe, welche beim Schwein als Prädilektionsstelle bestimmter Krankheiten gelten, wie beispielsweise die Papilla ilealis bei einer Infektion mit *Brachyspira hyodysenteriae*, werden bei der jeweiligen Probennahme berücksichtigt (Jackson and Cockcroft, 2007).

Die entwickelten Probennahmeprotokolle für mehr als fünfzig Organe und Gewebe sollen somit die Basis für eine adäquate Probennahme darstellen und können sowohl für spezifische Fragestellungen einzelner Studien, als auch für die Etablierung von

umfangreichen Gewebe- und Biobanken angewendet werden. Dem Benutzer soll mit den entwickelten Probennahmeprotokollen eine Grundlage an die Hand gegeben werden, die dazu beiträgt, den routinemäßigen Ablauf und die Organisation der Probennahme bei der Sektion sowie bei der weiteren Probenprozessierung zu vereinfachen, die Qualität des so generierten Probenmaterials sicherzustellen sowie die Effizienz und Reproduzierbarkeit der gesamten Probennahme zu steigern. Um die Sektion und die Probennahme für den Sekanten, vor allem auch in Bezug auf den Zeit- und Arbeitsaufwand, möglichst einfach, übersichtlich und standardisiert zu gestalten, wurden zusätzlich zu den dargestellten und erläuterten anatomischen Hintergrundinformationen detaillierte Sektionsanleitungen zu den jeweiligen Organen und Geweben erstellt.

Die im Zuge einer Sektion basierend auf den vorliegenden Probennahmeprotokollen gewonnenen Proben eignen sich sowohl für quantitative und qualitative morphologische Untersuchungen, eingeschlossen Gefrierschnitt-, Kunststoff- und Paraffinhistologie, Elektronenmikroskopie, Immunhistochemie und In-situ-Hybridisierung, als auch für molekulare Untersuchungen von DNA, RNA, Proteinen sowie Metaboliten und Elektrolyten. Vor allem im Hinblick auf den Umfang des Probenmaterials, welcher an die unterschiedlichen Studiendesigns und Forschungsziele individuell angepasst werden kann, und die Bandbreite verschiedener damit durchführbarer Analyse- und Untersuchungsverfahren, werden die Unterschiede zu den bereits bestehenden Probennahmeprotokollen bei Nagern oder anderen Tiermodellen deutlich.

### 4.2 Methodik und Aufbau der Probennahmepläne

Um die erstellten Probennahmeprotokolle für das Schwein übersichtlich darzustellen, wurde, neben der Aufteilung anhand der einzelnen Organsysteme und Gewebe, eine Staffelung in drei unterschiedlich umfangreiche und ausgestaltete Studientypen (I-III) vorgenommen. Diese Untergliederung in drei verschiedene, unterschiedlich ausführliche Studientypen ermöglicht dabei, die vorliegenden Protokolle in vielen wissenschaftlichen Gebieten für unterschiedliche Studienziele und Versuchsaufbauten zu nutzen und individuell an deren Anforderungen anzupassen. Zur besseren Veranschaulichung der Probennahmeprotokolle und um die Umsetzung in die Praxis so einfach wie möglich zu gestalten, werden detaillierte Empfehlungen zur Probennahme gegeben und mit Schemazeichnungen sowie mit fotografischen Abbildungen der einzelnen Organe und Gewebe und der verschiedenen Versuchsaufbauten während den verschiedenen Sektionsschritten und mit aus der Probennahme resultierenden histologischen Schnitten dargestellt. Für jedes einzelne Organ oder Gewebe werden dabei schweinespezifische anatomische Besonderheiten und praktische Empfehlungen zur Sektion herausgearbeitet. Die Schnittrichtungen und die Orientierung der Gewebeproben für die Histopathologie, aber auch Verfahren zur weiteren Prozessierung der einzelnen Proben werden anhand von unterschiedlichen Symbolen verdeutlicht und sowohl in den Schemazeichnungen, als auch in den fotografischen Abbildungen dargestellt. Vergleichbare Sektionsprotokolle, vor allem im Hinblick auf die Ausführlichkeit und Anschaulichkeit der hier vorliegenden Arbeit, wurden für das Schwein bisher noch nicht erstellt und sollen so eine hilfreiche Grundlage für die Probennahme in der Praxis beim porzinen Tiermodell darstellen.

Um die Repräsentativität, die Reproduzierbarkeit und die Effizienz der Probennahmeverfahren zu gewährleisten, werden Empfehlungen zur Anzahl der

Probenahmelokalisationen, beruhend auf statistischen sowie auf organgrößenspezifischen Parametern, aber auch zur Größe der einzelnen Proben, je nach Verwendungszweck, und die weitere Prozessierung des Probenmaterials (Fixation, Einbettung usw.) dargelegt.

Um Proben schnell, standardisiert und mit möglichst geringem Arbeitsaufwand für Standardscreening und Routineuntersuchungen von morphologischen Alterationen und molekulare Analysen, für Einsatzgebiete in toxikopathologischen Routinestudien zu generieren, werden in Typ-I Protokollen genau definierte Probenahmelokalisationen festgelegt. Die Probennahme beinhaltet in diesem Fall zusätzlich eine festgelegte Anzahl an Proben für jedes Organ oder Gewebe, mit einheitlicher Probengröße und festgelegter Orientierung. Dies kann auch dazu genutzt werden, in Ergänzung zu festgelegten spezifischen Untersuchungszielen zusätzliches standardisiertes Probenmaterial für weiterführende Analyseverfahren zu gewinnen, beziehungsweise um das vorliegende Tiermodell näher zu charakterisieren. Sollten sich makroskopische pathologische Veränderungen an den Organen oder Geweben finden, werden (selbstverständlich) zusätzlich Proben für histopathologische, mikrobiologische und molekularbiologische Untersuchungen aus den veränderten Stellen gewonnen. Am Ende des Abschnitts für Typ-I Studien des jeweiligen Organs findet sich ein detaillierter Vergleich des vorliegenden Probennahmeprotokolls beim Schwein mit den jeweils dazu etablierten Richtlinien für histopathologische Routinestudien in der Toxikopathologie (STP, NACAD/RITA) bei Nagern, um die Unterschiede und Gemeinsamkeiten unter anderem bezüglich der Probenlokalisierung und –orientierung sowie Probenanzahl und Probenprozessierung darzustellen.

Ziel der Typ-II und Typ-III Studienprotokolle ist es, umfangreiches Probenmaterial zu gewinnen, welches für weiterführende und vertiefende Studien mit einer großen

Bandbreite an Untersuchungsarten und Verwendungsmöglichkeiten geeignet ist. Um die Generierung von repräsentativem und reproduzierbarem, für quantitative und qualitative Untersuchungen geeignetem Probenmaterial für diverse Untersuchungsverfahren zu gewährleisten, werden in den Probennahmeprotokollen systematisch zufällige Probennahmetechniken angewendet (Gundersen *et al.*, 2013, Howard and Reed, 2005, Nyengaard, 1999). Diese ausführlichen Studientypen können beispielsweise auch im Rahmen der Erstellung einer Biobank verwendet oder als Möglichkeit zur Generierung von Rückstellproben genutzt werden, welche für eventuell erst im Laufe der weiteren Untersuchungen auftretende Fragestellungen benötigt werden. Im Rahmen von Typ-II und Typ-III Studien wird bei allen Organen eine volumengewichtete systematisch zufällige Probennahme durchgeführt und ausführlich beschrieben. Für eine zielgerichtete, schnelle und arbeitseffektive Probennahme werden aus jeder so bestimmten Probenahmelokalisation im weiteren Verlauf mehrere Einzelproben für unterschiedliche Prozessierungsverfahren gewonnen. Um dem komplexeren Aufbau einiger Organe, wie beispielsweise Herz, Niere oder Gehirn, gerecht zu werden, werden auch in Typ-II und Typ-III Studien routinemäßig gezielt Proben aus definierten Lokalisationen dieser Organe gewonnen. Für weiterführende speziellere Studien können aber auch bei diesen Organen aus definierten Bereichen systematisch zufällige Proben gewonnen werden (Beispiel siehe Supplemente Abschnitt 2.8.1.1, Gehirn).

Bei einigen Organen wurden aufgrund der nur sehr seltenen Erfassung und Untersuchung in Routinestudien oder dem nicht Vorhandensein vergleichbarer Strukturen beim Menschen, keine weiterführenden Typ-II und Typ-III Probennahmeprotokolle erstellt (Beispiel: Hardersche Drüse). Sollten diese Organe und Gewebe Bestandteil intensiverer Studien sein, wird der Anwender auf weiterführende spezielle Literatur verwiesen. Mit dem Zeit- und Arbeitsaufwand

einsparenden unterschiedlichen Probennahmeverfahren wird eine robuste Grundlage für eine effiziente Probennahme mit der Gewinnung von qualitativ hochwertigem Probenmaterial erstellt. Das im Rahmen dieser Probennahmeverfahren generierte und für das jeweilige Organ oder Gewebe repräsentative Probenmaterial, kann somit die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit in einer oder zwischen verschiedenen Studien sicherstellen.

Die Protokolle können für Schweine zwischen 10 und 400 Kilogramm angewendet, modifiziert und kombiniert, und somit an die jeweiligen Anforderungen unterschiedlicher Studien angepasst werden. Hierbei sollte vor Anwendung der dargestellten Sektionsanleitungen genau geprüft werden, welche Proben im Rahmen des vorliegenden Versuchsaufbaus benötigt werden. Bei spezifischen Fragestellungen, die einzelne Organe und deren spezielle Untersuchungen betreffen, sind neben den dargelegten Probennahmetechniken, weiterführende Untersuchungen und Proben, entsprechend der jeweiligen Fragestellung zu generieren. In diesem Fall können die vorliegenden Probennahmetechniken nur als richtungsweisende Grundlage angesehen werden. Bei der Adaptierung der Probennahmeprotokolle an die jeweilige Studie, sollten das Ziel der Studie und die Reihenfolge sowie der Umfang des zu generierenden Probenmaterials im Vorhinein festgelegt und angepasst werden, damit eine strukturierte und zielgerichtete Durchführung der Sektion ermöglicht wird.

Um dem erheblichen Zeit-, Arbeits- und Personalaufwand gerecht zu werden, sollte zu Beginn der Sektionen ein genauer Zeitplan und eine Sektionsanleitung mit Schritt für Schritt dargestellten Arbeitsanweisungen für jedes einzelne Organ oder Gewebe erstellt werden. Diese Anleitung sollte die zeitliche Abfolge der einzelnen Schritte der Sektion im Hinblick auf die Reihenfolge der Entnahme der Organe und Gewebe, sowie die genaue Abfolge der Probennahme für jedes einzelne Organ oder Gewebe

darstellen. Dabei sollen sowohl Anzahl, Lokalisation, Orientierung, Größe der Proben und die weitere Probenprozessierung, sowie gleich zu Beginn zu bestimmende Parameter wie etwa Maße und Gewicht des Organs aufgeführt und beschrieben werden. Hierfür empfiehlt sich die Erstellung von Checklisten mit allen geforderten Parametern und Proben, sowie dem für die Sektion und Probennahme benötigtem Material (verschiedene Fixantien, Probenröhrchen, Kapseln, die jeweilige Beschriftung und weitere spezielle Materialien). Diese Checklisten gewährleisten eine reibungslose Abfolge der Sektion und Probennahme und garantieren die Vollständigkeit der Probennahme und des gewonnenen Probenmaterials.

Vor allem in umfangreichen Biobank-Projekten (Abbott, 2015) mit mehreren Sekanten und Helfern muss die Organisation mit Vor- und Nachbereitung der Proben einen wichtigen Stellenwert einnehmen. Um den Anforderungen der jeweiligen Studie gerecht werden zu können, wird am Ende des jeweiligen Organabschnitts eine ungefähre Einschätzung des Zeit- und Arbeitsaufwands für Typ-II und Typ-III Studien, anhand der zugrundeliegenden Erfahrungen mit porcinen Tiermodellen am Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, angegeben. Zusätzlich werden für jedes Organ relevante, weiterführende Literaturquellen angegeben. Der mit dieser großen Bandbreite des Probenmaterials verbundene erhöhte Aufwand, der bei der Sektion der Tiere, sowie auch bei der Nachbearbeitung und Aufarbeitung des Probenmaterials entsteht, aber auch die logistische Leistung der Probenlagerung und der damit verbundene erhöhte Zeit-, Arbeits- und Kostenfaktor, müssen im Einzelfall abgewogen werden.

### 4.3 Optimale Nutzung des von einem Tier generierbaren Probenmaterials für unterschiedliche Analyseverfahren

Ein weiterer Grund für die Erstellung standardisierter Probennahmeprotokolle für porcine Tiermodelle stellt die optimale Nutzung des vorhandenen Tierkollektivs und Probenmaterials dar. Die im Vergleich zu Nagern Modellen deutlich mehr Zeit beanspruchende Generierung und Etablierung von gentechnisch modifizierten Schweinmodellen verbunden mit höheren Haltungskosten und erhöhten Arbeitsaufwand, die beispielsweise bei der Aufzucht von Tiermodellen mit prolongierten Krankheitsverläufen entstehen, machen das vorhandene Probenmaterial besonders wertvoll und fordern eine vorausschauende und optimierte Probennahme (Aigner *et al.*, 2010). Im Hinblick auf das Auftreten von weiteren, nicht im Rahmen der Versuchsplanung vorhersehbaren Fragestellungen im Verlauf einer Studie, und dem damit verbundenen zusätzlich benötigtem Probenmaterial, welches unter Umständen dann nicht mehr neu verfügbar oder generierbar ist, kann bereits gewonnenes und asserviertes Probenmaterial genutzt werden. In diesem Zusammenhang können die Probennahmepläne in der biomedizinischen Forschung auch zur Umsetzung des 3R-Konzeptes im Hinblick auf die Nutzung von porcinen Tiermodellen in der Wissenschaft beitragen (Replacement – Reduction – Refinement) (Tornqvist *et al.*, 2014). Da das Schwein als Modellorganismus humaner Erkrankungen einen wichtigen Platz in der Grundlagenforschung sowie auch in der Entwicklung und Validierung neuer Therapieansätze und Medikamente einnimmt, kann das vorhandene Tier- und Probenmaterial durch die Anwendung der vorliegenden Probennahmepläne in Verbindung mit einer Optimierung der jeweiligen Studienziele umfangreich und effektiv genutzt und eingesetzt werden. Auf Grundlage einer vorausschauenden Forschungsarbeit mit dem Ziel, möglichst viele



Informationen aus den vorhandenen Tiermodellen zu gewinnen, kann ein Beitrag zur Reduktion der Versuchstierzahlen geleistet werden.

### **4.4 Entwicklung und praktische Erprobung der Probennahmeprotokolle: Etablierung der „Munich-MIDY-Pig-Biobank“**

Die vorliegenden Sektions- und Probennahmeprotokolle wurden im Zusammenhang mit dem Aufbau einer Biobank mit umfangreichem Probenmaterial eines transgenen Schweinmodells entwickelt und dabei bereits in der Praxis angewendet und evaluiert.

Ziel der Zusammenarbeit von Pathologen, Molekularbiologen, Reproduktionsmedizinern, Genetikern und Physiologen der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) sowie der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich (ETH) (Institut für Tierpathologie (AG Wanke), LMU; Institut für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie (AG Wolf), LMU; Genzentrum (AG Wolf), LMU; Institut für Tierphysiologie (AG Deeg), LMU; Institute of Agricultural Sciences (AG Bauersachs), ETH) war es, das für die Diabetesforschung wertvolle und seltene Probenmaterial von langzeitdiabetischen  $INS^{C94Y}$ -Schweinen (> 2 Jahre) optimal auszunutzen und Material für verschiedene Untersuchungen auf molekularer, biochemischer sowie morphologischer Ebene zu gewinnen (Abbott, 2015, Renner *et al.*, 2013). Der Aufbau der Biobank mit Probenmaterial von fünf diabetischen transgenen Sauen und fünf nicht diabetischen Kontrolltieren stellt die effektive Nutzung sowie langfristige Asservierung des wertvollen Probenmaterials sicher. Die vor diesem Hintergrund erstellten Sektions- und Probennahmeprotokolle stellen die dabei notwendige Grundlage für den Aufbau einer solchen Gewebe- und Organprobensammlung dar und wurden in diesem Zusammenhang zum ersten Mal ausführlich in der Praxis angewendet, evaluiert und anhand der dabei gewonnenen

praktischen Erfahrungen weiter optimiert. Durch den in den Probennahmeprotokollen dargelegten Einsatz von unterschiedlichen Probennahmetechniken sowie verschiedenen Fixations- und Konservierungsmethoden, konnte für jedes Organ und Gewebe eine große Bandbreite an Probenmaterial für unterschiedlichste Analysen gewonnen werden. Die erstellten Probennahmeprotokolle wurden an das zur Verfügung stehende porcine Tiermodell und die damit verbundenen Anforderungen im Laufe der Sektionsvorbereitungen adaptiert und mithilfe einer detaillierten Arbeitsanweisung für jedes Organ und das zugehörige Sektionsteam konnte eine strukturierte, umfangreiche Sektion durchgeführt werden. Die Etablierung einer solchen Organ- und Gewebebank von gut charakterisiertem Probenmaterial für eine große Bandbreite an verschiedenen Analysen erlaubt es effizienten und vollen Nutzen aus diesem hier zur Verfügung stehenden Tiermodell zu ziehen und ermöglicht gleichzeitig auch eine erhebliche Einsparung an Zeit- und Kostenaufwand sowie Tiermaterial. Insgesamt wurden bei diesem Biobank-Projekt etwa 2000 Proben verschiedener Körperflüssigkeiten (Urin, Serum, Plasma, Liquor, Synovia) sowie über 12000 Proben von circa fünfzig verschiedenen Organen für qualitative und quantitative morphologische Untersuchungen auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene (Plastik- und Paraffinhistologie, Kryostatschnitte) gewonnen und circa 8000 Proben bei minus 80°Grad Celsius für DNA-, RNA-, Protein- und metabolomische Untersuchungen tiefgefroren. Nicht zu vernachlässigen sind beim Aufbau einer solchen Biobank die logistischen und arbeitsintensiven Leistungen sowohl in der Vor- und Nachbereitung der Sektion, bei der Sektion selbst, bei der circa zwanzig Sekanten und Helfer gleichzeitig tätig sind, sowie die weitere umfangreiche Probenprozessierung im Anschluss an die Sektion und die damit verbundene Probenlagerung und Probenlogistik. Die Munich-MIDY-Pig-Biobank konnte mittlerweile durch zwei weitere transgene diabetische Eber erweitert werden

und soll auch in Zukunft mit umfangreichem Probenmaterial der wissenschaftlichen Fachwelt zur Verfügung stehen und weiter ausgebaut werden (Abbott, 2015).

Die Erstellung der Sektions- und Probennahmepläne verbunden mit der praktischen Erprobung und Evaluation im Zusammenhang mit dem Aufbau der Munich-MIDY-Pig-Biobank erlaubt den Wissenschaftlern eine zielgerichtete, effektive und langfristig nutzbare Probensammlung des vorliegenden porcinen Diabetesmodells zu schaffen und gleichzeitig anderen Wissenschaftlern mit den erstellten Sektions- und Probennahmeplänen eine Grundlage an die Hand zu geben, welche für unterschiedliche porcine Tiermodelle in vielen Bereichen der translationalen Medizin, im Zusammenhang mit der Probengenerierung und -asservierung eingesetzt werden kann.

### **4.5 Ausblick**

Die in der vorliegenden Arbeit etablierten Sektions- und Probennahmeprotokolle für das Schwein als Tiermodell in der biomedizinischen Forschung stellen eine neue robuste Basis zur Gewinnung von standardisierten, repräsentativen und reproduzierbaren Probenmaterial für ein breites Untersuchungs- und Analysenspektrum dar. Um der auch in Zukunft weiter zunehmenden Bedeutung porciner Tiermodelle in der Erforschung humaner Erkrankungen und der damit verbundenen Entwicklung und Validierung von Medikamenten und Therapien gerecht zu werden und um den optimalen Nutzen aus verfügbarem Tier- und Probenmaterial zu ziehen, stellt die Etablierung dieser Probennahmeprotokolle eine wichtige Grundlage für die zukünftige Nutzung und den Einsatz porciner Tiermodelle in der translationalen Medizin und den damit verbundenen Forschungsgebieten dar.

### 5 Zusammenfassung

Porzine Tiermodelle haben in der biomedizinischen Forschung in den letzten Jahren aufgrund der dem Menschen sehr ähnlichen Physiologie und Anatomie des Schweines und Fortschritten auf dem Gebiet der Gentechnik, erheblich an Bedeutung gewonnen. Schweinemodelle werden in verschiedenen Bereichen der translationalen Medizin genutzt. Hierzu zählen die Grundlagenforschung, die Erfassung von Erbkrankheiten des Menschen anhand gentechnisch veränderter „maßgeschneiderter“ porziner Modelle, die Erforschung von Pathogenitätsmechanismen, die toxikopathologische Evaluation neuer Wirkstoffe und die Entwicklung und Erprobung neuer therapeutischer Ansätze. Für diverse Nagetierspezies existieren etablierte Protokolle zur standardisierten Gewinnung von Organ- und Gewebeproben für toxikopathologische Untersuchungen. Für Schweinemodelle hingegen waren derartige Probennahmepläne bislang nicht verfügbar. In der vorliegenden Arbeit wurden standardisierte Probennahmeprotokolle für mehr als fünfzig verschiedene porzine Organe und Gewebe entwickelt und praktisch erprobt. Die Protokolle ermöglichen die reproduzierbare, standardisierte Generierung von repräsentativem Probenmaterial. Die Probennahmepläne beinhalten detaillierte Angaben zur Entnahmestelle, der Anzahl der zu entnehmenden Proben, ihrer Orientierung und weiteren Prozessierung für unterschiedliche qualitative und quantitative morphologische Analyseverfahren sowie molekularbiologische und biochemische Untersuchungen. Neben relevanten anatomischen Besonderheiten des Schweines und Hinweisen zur Sektionstechnik werden die Probennahmeprotokolle für sämtliche Organe und Gewebe durch detaillierte Schemazeichnungen sowie makroskopische und histologische Abbildungen veranschaulicht und durch den zu veranschlagenden Zeit-, Kosten- und

Personalaufwand ergänzt. In Anpassung an unterschiedliche Studienziele werden für die einzelnen Organe und Gewebe unterschiedliche Probennahmeprotokolle (Typ-I – Typ-III) vorgestellt. Diese können frei kombiniert und an das experimentelle Design einer jeweiligen Studie angepasst werden. Typ-I Probennahmeprotokolle sind für Übersichtsuntersuchungen morphologischer Alterationen und molekulare Analysen, beispielweise in toxikopathologischen Studien, vorgesehen. Hierbei erfolgt die Entnahme von Proben für histopathologische Routineuntersuchungen und molekularbiologische Analysen aus definierten Lokalisationen mit festgelegter Orientierung. Typ-II und Typ-III Probennahmeprotokolle wurden zur Generierung von Proben für detaillierte Untersuchungen einzelner Organe und Gewebe mit unterschiedlichen Analyseverfahren (Typ-II), beziehungsweise für die Erstellung von Gewebe-Biobanken (Typ-III) entwickelt. Zur reproduzierbaren Generierung repräsentativer Proben für ein breites Spektrum an quantitativen und qualitativen Untersuchungen werden die Entnahmelokalisationen der Proben in Typ-II und Typ-III Studien durch systematisch zufällige Verfahren bestimmt. Die Gewinnung von für verschiedene Analyseverfahren geeigneten Proben ermöglicht die Durchführung initial nicht geplanter Untersuchungen zur Beantwortung von sich erst im Verlauf einer Studie ergebenden Fragestellungen. Dies kann zur Verringerung der in einer Studie benötigten Tierzahl beitragen.

Die im Februar 2016 im Fachjournal *Toxicologic Pathology* veröffentlichten Probennahmeprotokolle leisten einen Beitrag zur standardisierten Gewinnung von qualitativ hochwertigen, repräsentativen Probenmaterials als Voraussetzung für die Vergleichbarkeit von Ergebnissen unterschiedlicher Studien porziner Tiermodelle in der biomedizinischen Forschung.

## **6 Summary**

During the past decade(s), porcine animal models have gained a steadily growing popularity in biomedical research. This is due to the similar physiology and anatomy of pigs and humans, and the technical advances in genetic modification of the porcine genome. Porcine models are used in diverse areas of translational medicine, including basic research, generation of “tailored”, genetically modified pig models of human diseases, investigations of pathophysiological processes, surgery, transplantation research, toxicity testing of pharmacological substances, as well as development of new therapeutic strategies. For various rodent species used as experimental animal models, standardized sampling guidelines for reproducible collection of organ and tissue specimen exist. For porcine models, however, such guidelines have not been published so far.

In the present work, standardized sampling guidelines for more than 50 porcine organs and tissues were developed to facilitate the reproducible generation of representative specimen. For each organ and tissue, the sampling guidelines indicate the relevant anatomic features, and provide precise advices on the appropriate necropsy techniques and the estimated time and personnel expenses for sampling. Illustrated by detailed schematic drawings, macroscopic pictures and microscopic images of histological slides, the protocols specify the sampling locations and give recommendations on the adequate number of samples, their orientation, and the subsequent processing of the specimen for different qualitative and quantitative morphological investigations, as well as for molecular and biochemical analyses. According to the aims and purposes of different studies, different types of sampling protocols are provided (type I-III), which can be individually combined and adapted to the experimental design of a specific study.

Type-I sampling protocols are designed for studies in which a broad set of organs/tissues is examined in an overview fashion, using routine histopathological techniques and/or standard molecular analyses, as e.g., in general toxicity studies. Here, the samples are collected from deliberately defined locations and in predefined orientations.

Type-II and type-III sampling protocols were developed for advanced, detailed studies of distinct organs and tissues, using a wide range of different analytical methods (type-II), respectively for biobank projects (type-III), where particularly large numbers of different types of samples from a wide range of different organs and tissues are required. To enable the reproducible generation of representative specimen, the sampling locations in type-II and type-III studies are determined by efficient, systematic random sampling strategies. From each of the sampled locations, sub-samples are taken and processed for a broad spectrum of different analysis methods, including analyses not necessarily specified or planned at the time point of sampling. A suchlike “forward-looking” sampling strategy allows to perform additional experiments without a repeated generation of new samples, and might thus contribute to reduce the number of animals in a study.

The sampling protocols presented in this study were published in “*Toxicologic Pathology*” in February 2016. Their broad application will ensure the efficient generation of representative, high-quality samples of porcine organs and tissues, and contribute to the reproducibility of results and the intra-/interstudy comparability of research projects involving pigs as animal models.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abbott, A. (2015). Inside the first pig biobank. *Nature*, **519**, 397-398.
- Adams, E.T. and Crabbs, T.A. (2013). Basic approaches in anatomic toxicologic pathology In *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology* (Haschek, W.M., et al. eds.), pp. 149-173. Academic Press. INC., London.
- Aigner, B., Renner, S., Kessler, B., Klymiuk, N., Kurome, M., Wünsch, A. and Wolf, E. (2010). Transgenic pigs as models for translational biomedical research. *J Mol Med (Berl)*, **88**, 653-664.
- American Diabetes Association. (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, **37 Suppl 1**, S81-90.
- Baddeley, A.J., Gundersen, H.J. and Cruz-Orive, L.M. (1986). Estimation of surface area from vertical sections. *J Microsc*, **142**, 259-276.
- Blutke, A., Block, C., Berendt, F., Herbach, N., Kemter, E., Amann, K., Frohlich, T., Arnold, G.J. and Wanke, R. (2011). Differential glomerular proteome analysis of two murine nephropathy models at onset of albuminuria. *Proteomics Clin Appl*, **5**, 375-381.
- Boyce, R.W., Dorph-Petersen, K.A., Lyck, L. and Gundersen, H.J. (2010). Design-based stereology: introduction to basic concepts and practical approaches for estimation of cell number. *Toxicol Pathol*, **38**, 1011-1025.
- Bregman, C.L., Adler, R.R., Morton, D.G., Regan, K.S. and Yano, B.L. (2003). Recommended tissue list for histopathologic examination in repeat-dose toxicity and carcinogenicity studies: a proposal of the Society of Toxicologic Pathology (STP). *Toxicol Pathol*, **31**, 252-253.
- Brem, G., Brenig, B. and Goodman, H.M. (1985). Production of transgenic mice, rabbits and pigs by microinjection into pronuclei. *Zuchthygiene*, **20**, 251-252.



- Bromberg, J.S. and LeRoith, D. (2006). Diabetes cure--is the glass half full? *N Engl J Med*, **355**, 1372-1374.
- Cheon, D.J. and Orsulic, S. (2011). Mouse models of cancer. *Annu Rev Pathol*, **6**, 95-119.
- Cooper, D.K., Ekser, B., Ramsoondar, J., Phelps, C. and Ayares, D. (2016). The role of genetically engineered pigs in xenotransplantation research. *J Pathol*, **238**, 288-299.
- Davis, M.A., Eldridge, S. and Loudon, C. (2013). Biomarkers: discovery, qualification and application In *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology* (Haschek, W.M., et al. eds.), pp. 317-352. Academic Press. INC., London.
- Fairclough, R.J., Wood, M.J. and Davies, K.E. (2013). Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches. *Nat Rev Genet*, **14**, 373-378.
- Flisikowska, T., Kind, A. and Schnieke, A. (2013). The new pig on the block: modelling cancer in pigs. *Transgenic Res*, **22**, 673-680.
- Flisikowska, T., Kind, A. and Schnieke, A. (2014). Genetically modified pigs to model human diseases. *J Appl Genet*, **55**, 53-64.
- Glerup, P., Grand, N. and Skydsgaard, M. (2013). The use of minipigs in non-clinical research In *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology* (Haschek, W.M., et al. eds.), pp. 461-475. Academic Press. INC., London.
- Groenen, M.A., Archibald, A.L., Uenishi, H., Tuggle, C.K., Takeuchi, Y., Rothschild, M.F., Rogel-Gaillard, C., Park, C., Milan, D., Megens, H.J., Li, S., Larkin, D.M., Kim, H., Frantz, L.A., Caccamo, M., Ahn, H., Aken, B.L., Anselmo, A., Anthon, C., Auvil, L., Badaoui, B., Beattie, C.W., Bendixen, C., Berman, D., Blecha, F., Blomberg, J., Bolund, L., Bosse, M., Botti, S., Bujie, Z., Bystrom, M., Capitanu,

- B., Carvalho-Silva, D., Chardon, P., Chen, C., Cheng, R., Choi, S.H., Chow, W., Clark, R.C., Clee, C., Crooijmans, R.P., Dawson, H.D., Dehais, P., De Sapiro, F., Dibbits, B., Drou, N., Du, Z.Q., Eversole, K., Fadista, J., Fairley, S., Faraut, T., Faulkner, G.J., Fowler, K.E., Fredholm, M., Fritz, E., Gilbert, J.G., Giuffra, E., Gorodkin, J., Griffin, D.K., Harrow, J.L., Hayward, A., Howe, K., Hu, Z.L., Humphray, S.J., Hunt, T., Hornshoj, H., Jeon, J.T., Jern, P., Jones, M., Jurka, J., Kanamori, H., Kapetanovic, R., Kim, J., Kim, J.H., Kim, K.W., Kim, T.H., Larson, G., Lee, K., Lee, K.T., Leggett, R., Lewin, H.A., Li, Y., Liu, W., Loveland, J.E., Lu, Y., Lunney, J.K., Ma, J., Madsen, O., Mann, K., Matthews, L., McLaren, S., Morozumi, T., Murtaugh, M.P., Narayan, J., Nguyen, D.T., Ni, P., Oh, S.J., Onteru, S., Panitz, F., Park, E.W., *et al.* (2012). Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature*, **491**, 393-398.
- Gun, G. and Kues, W.A. (2014). Current progress of genetically engineered pig models for biomedical research. *Biores Open Access*, **3**, 255-264.
- Gundersen, H.J. and Jensen, E.B. (1987). The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc*, **147**, 229-263.
- Gundersen, H.J.G., Mirabile, R., Brown, D. and Boyce, R.W. (2013). Stereological principles and sampling procedures for toxicologic pathologists In *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology* (Haschek, W.M., *et al.* eds.), pp. 215-286. Academic Press. INC., London.
- Hammer, R.E., Pursel, V.G., Rexroad, C.E., Jr., Wall, R.J., Bolt, D.J., Ebert, K.M., Palmiter, R.D. and Brinster, R.L. (1985). Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, **315**, 680-683.

- Hoeflich, A., Weber, M.M., Fisch, T., Nedbal, S., Fottner, C., Elmlinger, M.W.,  
Wanke, R. and Wolf, E. (2002). Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) separates hypertrophic and hyperplastic effects of growth hormone (GH)/IGF-I excess on adrenocortical cells in vivo. *FASEB J*, **16**, 1721-1731.
- Holm, I.E., Alstrup, A.K. and Luo, Y. (2016). Genetically modified pig models for neurodegenerative disorders. *J Pathol*, **238**, 267-287.
- Howard, C.V. and Reed, M.G. (2005). *Unbiased Stereology*, QTP Publications, Coleraine, UK.
- Jackson, P.G.G. and Cockcroft, P.D. (2007). *Handbook of Pig Medicine*, SAUNDERS Elsevier Limited, Edinburgh, UK.
- Jeppesen, G. and Skydsgaard, M. (2015). Spontaneous background pathology in Gottingen minipigs. *Toxicol Pathol*, **43**, 257-266.
- Jirka, S.M., Tanganyika-de Winter, C.L., Boertje-van der Meulen, J.W., van Putten, M., Hiller, M., Vermue, R., de Visser, P.C. and Aartsma-Rus, A. (2015). Evaluation of 2'-Deoxy-2'-fluoro Antisense Oligonucleotides for Exon Skipping in Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol Ther Nucleic Acids*, **4**, e265.
- Kemter, E., Lieke, T., Kessler, B., Kurome, M., Wunsch, A., Summerfield, A., Ayares, D., Nagashima, H., Baars, W., Schwinzer, R. and Wolf, E. (2012). Human TNF-related apoptosis-inducing ligand-expressing dendritic cells from transgenic pigs attenuate human xenogeneic T cell responses. *Xenotransplantation*, **19**, 40-51.
- Kemter, E. and Wolf, E. (2015). Pigs pave a way to de novo formation of functional human kidneys. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **112**, 12905-12906.

- Kittel, B., Ruehl-Fehlert, C., Morawietz, G., Klapwijk, J., Elwell, M.R., Lenz, B., O'Sullivan, M.G., Roth, D.R., Wadsworth, P.F., Group, R. and Group, N. (2004). Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--Part 2. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp Toxicol Pathol*, **55**, 413-431.
- Klymiuk, N., Aigner, B., Brem, G. and Wolf, E. (2010). Genetic modification of pigs as organ donors for xenotransplantation. *Mol Reprod Dev*, **77**, 209-221.
- Klymiuk, N., Blutke, A., Graf, A., Krause, S., Burkhardt, K., Wünsch, A., Krebs, S., Kessler, B., Zakhartchenko, V., Kurome, M., Kemter, E., Nagashima, H., Schoser, B., Herbach, N., Blum, H., Wanke, R., Aartsma-Rus, A., Thirion, C., Lochmuller, H., Walter, M.C. and Wolf, E. (2013). Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. *Hum Mol Genet*, **22**, 4368-4382.
- Klymiuk, N., Bocker, W., Schonitzer, V., Bahr, A., Radic, T., Frohlich, T., Wünsch, A., Kessler, B., Kurome, M., Schilling, E., Herbach, N., Wanke, R., Nagashima, H., Mutschler, W., Arnold, G.J., Schwinzer, R., Schieker, M. and Wolf, E. (2012a). First inducible transgene expression in porcine large animal models. *FASEB J*, **26**, 1086-1099.
- Klymiuk, N., Mundhenk, L., Kraehe, K., Wünsch, A., Plog, S., Emrich, D., Langenmayer, M.C., Stehr, M., Holzinger, A., Kroner, C., Richter, A., Kessler, B., Kurome, M., Eddicks, M., Nagashima, H., Heinritzi, K., Gruber, A.D. and Wolf, E. (2012b). Sequential targeting of CFTR by BAC vectors generates a novel pig model of cystic fibrosis. *J Mol Med (Berl)*, **90**, 597-608.
- Klymiuk, N., Seeliger, F., Bohlooly, Y.M., Blutke, A., Rudmann, D.G. and Wolf, E. (2015). Tailored Pig Models for Preclinical Efficacy and Safety Testing of Targeted Therapies. *Toxicol Pathol*.

- Klymiuk, N., van Buerck, L., Bahr, A., Offers, M., Kessler, B., Wünsch, A., Kurome, M., Thormann, M., Lochner, K., Nagashima, H., Herbach, N., Wanke, R., Seissler, J. and Wolf, E. (2012c). Xenografted islet cell clusters from INSLEA29Y transgenic pigs rescue diabetes and prevent immune rejection in humanized mice. *Diabetes*, **61**, 1527-1532.
- Kurome, M., Kessler, B., Wünsch, A., Nagashima, H. and Wolf, E. (2015). Nuclear transfer and transgenesis in the pig. *Methods Mol Biol*, **1222**, 37-59.
- Kurome, M., Ueda, H., Tomii, R., Naruse, K. and Nagashima, H. (2006). Production of transgenic-clone pigs by the combination of ICSI-mediated gene transfer with somatic cell nuclear transfer. *Transgenic Res*, **15**, 229-240.
- Liu, M., Hodish, I., Haataja, L., Lara-Lemus, R., Rajpal, G., Wright, J. and Arvan, P. (2010). Proinsulin misfolding and diabetes: mutant INS gene-induced diabetes of youth. *Trends Endocrinol Metab*, **21**, 652-659.
- Lunney, J.K. (2007). Advances in swine biomedical model genomics. *Int J Biol Sci*, **3**, 179-184.
- Luo, Y., Lin, L., Bolund, L., Jensen, T.G. and Sorensen, C.B. (2012). Genetically modified pigs for biomedical research. *J Inherit Metab Dis*, **35**, 695-713.
- Madsen, K.M. (1999). The art of counting. *J Am Soc Nephrol*, **10**, 1124-1125.
- Mattfeldt, T. (1990). *Stereologische Methoden in der Pathologie*. Thieme, Stuttgart, New York.
- Mattfeldt, T., Mall, G., Gharehbaghi, H. and Moller, P. (1990). Estimation of surface area and length with the orientator. *J Microsc*, **159**, 301-317.
- Mattfeldt, T., Mobius, H.J. and Mall, G. (1985). Orthogonal triplet probes: an efficient method for unbiased estimation of length and surface of objects with unknown orientation in space. *J Microsc*, **139**, 279-289.

- McDorman, K.S., Chan, C., Rojko, J., Satterwhite, C.M. and Morrison, J.P. (2013). Special techniques in toxicologic pathology In *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology* (Haschek, W.M., et al. eds.), pp. 175-214. Academic Press. INC., London.
- Morawietz, G., Ruehl-Fehlert, C., Kittel, B., Bube, A., Keane, K., Halm, S., Heuser, A., Hellmann, J., Group, R. and Group, N. (2004). Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--Part 3. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp Toxicol Pathol*, **55**, 433-449.
- Müller, S., Wanke, R. and Distl, O. (1995). Segregation of pigment cell anomalies in Munich miniature swine (MMS) Troll crossed with German Landrace. *Dtsch Tierärztl Wochenschr*, **102**, 391-394.
- Murakami, T., Hitomi, S., Ohtsuka, A., Taguchi, T. and Fujita, T. (1997). Pancreatic insulo-acinar portal systems in humans, rats, and some other mammals: scanning electron microscopy of vascular casts. *Microsc Res Tech*, **37**, 478-488.
- Nyengaard, J.R. (1999). Stereologic methods and their application in kidney research. *J Am Soc Nephrol*, **10**, 1100-1123.
- Nyengaard, J.R. and Gundersen, H.J.G. (1992). The isector: a simple and direct method for generating isotropic, uniform random sections from small specimens. *Journal of Microscopy*, **165**, 427-431.
- Nyengaard, J.R. and Gundersen, H.J.G. (2006). Sampling for stereology in lungs. *Eur Respir Rev*, **15**, 107-114.
- Ochs, M. and Mühlfeld, C. (2013). Quantitative microscopy of the lung: a problem-based approach. Part 1: basic principles of lung stereology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **305**, L15-22.

- Ouchi, N., Parker, J.L., Lugus, J.J. and Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*, **11**, 85-97.
- Prather, R.S., Lorson, M., Ross, J.W., Whyte, J.J. and Walters, E. (2013). Genetically engineered pig models for human diseases. *Annu Rev Anim Biosci*, **1**, 203-219.
- Renner, S., Blutke, A., Streckel, E., Wanke, R. and Wolf, E. (2016). Incretin actions and consequences of incretin-based therapies: lessons from complementary animal models. *J Pathol*, **238**, 345-358.
- Renner, S., Braun-Reichhart, C., Blutke, A., Herbach, N., Emrich, D., Streckel, E., Wünsch, A., Kessler, B., Kurome, M., Bahr, A., Klymiuk, N., Krebs, S., Puk, O., Nagashima, H., Graw, J., Blum, H., Wanke, R. and Wolf, E. (2013). Permanent neonatal diabetes in INS(C94Y) transgenic pigs. *Diabetes*, **62**, 1505-1511.
- Renner, S., Fehlings, C., Herbach, N., Hofmann, A., von Waldthausen, D.C., Kessler, B., Ulrichs, K., Chodnevskaia, I., Moskalenko, V., Amselgruber, W., Goke, B., Pfeifer, A., Wanke, R. and Wolf, E. (2010). Glucose intolerance and reduced proliferation of pancreatic beta-cells in transgenic pigs with impaired glucose-dependent insulinotropic polypeptide function. *Diabetes*, **59**, 1228-1238.
- Renner, S., Romisch-Margl, W., Prehn, C., Krebs, S., Adamski, J., Goke, B., Blum, H., Suhre, K., Roscher, A.A. and Wolf, E. (2012). Changing metabolic signatures of amino acids and lipids during the prediabetic period in a pig model with impaired incretin function and reduced beta-cell mass. *Diabetes*, **61**, 2166-2175.
- Rousseaux, C.G. and Gad, S.C. (2013). Statistical assessment of toxicologic pathology studies In *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology* (Haschek, W.M., et al. eds.), pp. 894-988. Academic Press. INC., London.

- Ruehl-Fehlert, C., Kittel, B., Morawietz, G., Deslex, P., Keenan, C., Mahrt, C.R., Nolte, T., Robinson, M., Stuart, B.P., Deschl, U., Group, R. and Group, N. (2003). Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--part 1. *Exp Toxicol Pathol*, **55**, 91-106.
- Schneider, J.P. and Ochs, M. (2014). Alterations of mouse lung tissue dimensions during processing for morphometry: a comparison of methods. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **306**, L341-350.
- Smith, A.C. and Swindle, M.M. (2006). Preparation of swine for the laboratory. *ILAR J*, **47**, 358-363.
- Steiner, D.J., Kim, A., Miller, K. and Hara, M. (2010). Pancreatic islet plasticity: interspecies comparison of islet architecture and composition. *Islets*, **2**, 135-145.
- Streckel, E., Braun-Reichhart, C., Herbach, N., Dahlhoff, M., Kessler, B., Blutke, A., Bahr, A., Ubel, N., Eddicks, M., Ritzmann, M., Krebs, S., Goke, B., Blum, H., Wanke, R., Wolf, E. and Renner, S. (2015a). Effects of the glucagon-like peptide-1 receptor agonist liraglutide in juvenile transgenic pigs modeling a pre-diabetic condition. *J Transl Med*, **13**, 73.
- Swindle, M.M., Makin, A., Herron, A.J., Clubb, F.J., Jr. and Frazier, K.S. (2012). Swine as models in biomedical research and toxicology testing. *Vet Pathol*, **49**, 344-356.
- Swindle, M.M., Smith, A.C., Laber-Laird, K. and Dungan, L. (1994). Swine in biomedical research: Management and models. *ILAR J*, **36**, 1-5.
- Tornqvist, E., Annas, A., Granath, B., Jalkesten, E., Cotgreave, I. and Oberg, M. (2014). Strategic focus on 3R principles reveals major reductions in the use of animals in pharmaceutical toxicity testing. *PLoS One*, **9**, e101638.



- Turner, N.J., Pezzone, D. and Badylak, S.F. (2015). Regional variations in the histology of porcine skin. *Tissue Eng Part C Methods*, **21**, 373-384.
- van Buerck, L., Schuster, M., Rathkolb, B., Sabrautzki, S., Hrabe de Angelis, M., Wolf, E., Aigner, B., Wanke, R. and Herbach, N. (2012). Enhanced oxidative stress and endocrine pancreas alterations are linked to a novel glucokinase missense mutation in ENU-derived Munich Gck(D217V) mutants. *Mol Cell Endocrinol*, **362**, 139-148.
- Wanke, R. (2013). Pigmentzellanomalien beim Münchner Miniaturschwein Troll: Ein porcines Melanommodell In *Das Melanom - der "schwarze Tod" der Neuzeit* (Brem, G. & Stingl, G. eds.). Österreichische Akademie der Wissenschaften, Wien.
- Weibel, E.R. (1979). *Stereological methods. I. Practical methods for biological morphometry*. Academic Press, London.
- Whitelaw, C.B., Sheets, T.P., Lillico, S.G. and Telugu, B.P. (2016). Engineering large animal models of human disease. *J Pathol*, **238**, 247-256.
- Whyte, J.J. and Prather, R.S. (2011). Genetic modifications of pigs for medicine and agriculture. *Mol Reprod Dev*, **78**, 879-891.
- Wolf, E., Braun-Reichhart, C., Streckel, E. and Renner, S. (2014). Genetically engineered pig models for diabetes research. *Transgenic Res*, **23**, 27-38.
- Wünsch, A., Baehr, A., Bongoni, A.K., Kemter, E., Blutke, A., Baars, W., Haertle, S., Zakhartchenko, V., Kurome, M., Kessler, B., Faber, C., Abicht, J.M., Reichart, B., Wanke, R., Schwinzer, R., Nagashima, H., Rieben, R., Ayares, D., Wolf, E. and Klymiuk, N. (2014). Regulatory sequences of the porcine THBD gene facilitate endothelial-specific expression of bioactive human thrombomodulin in single- and multitransgenic pigs. *Transplantation*, **97**, 138-147.

### 8 Beiträge auf wissenschaftlichen Kongressen

Teile der vorliegenden Arbeit in Vorträgen wurden auf wissenschaftlichen Kongressen präsentiert und als Abstracts veröffentlicht.

#### Vorträge auf wissenschaftlichen Tagungen (\*vortragende Person)

Hofmann B\*. Aktueller Stand der APAM Biobank. Pig Biobank Meeting Mini-Symposium. München, Deutschland, 2. Oktober 2014.

Albl B, Haesner S, Braun-Reichhart C, Streckel E, Renner S, Seeliger F, Wanke R, Wolf E, Blutke A\*. Standardized Tissue Sampling in Porcine Biomedical Models. Minipig Workshop. Freising, Deutschland, 23. und 24. September 2015.

#### Abstracts in Tagungsbänden

Blutke A, Braun-Reichhart C, Albl B, Streckel E, Haesner S, Renner S, Wanke R, Wolf E. The Munich MIDY-PIG Biobank: a unique resource for translational diabetes research. Opening Conference of COST Action BM1308 "Sharing Advances on Large Animal Models – SALAAM". München, Deutschland, 15. bis 17. Dezember 2014. Abstract im Tagungsband Seite 32.

Blutke A, Albl B, Haesner S, Braun-Reichhart C, Wolf E, Wanke R. Etablierung einer Gewebe-Biobank eines porcinen Diabetes mellitus Modelles. 58. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft. Fulda, Deutschland, 7. und 8. März 2015. Abstract im Tagungsband Seite 16.

#### Abstracts in „Refereed Journals“

Blutke A, Albl B, Haesner S, Braun-Reichhart C, Wolf E, Wanke R. Etablierung einer Gewebe-Biobank eines porcinen Diabetes mellitus Modelles. Tierärztliche Praxis Kleintiere 3/2015, Seite 4.

### Danksagung

Ich möchte meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Rüdiger Wanke (Institut für Tierpathologie) und Herrn Prof. Dr. Eckhard Wolf (Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie; Genzentrum LMU) für das mir von Anfang an entgegengebrachte Vertrauen im Rahmen der Erstellung der „Munich-MIDY-Pig-Biobank“ und die Möglichkeit diese Dissertation im Zusammenhang mit diesem Projekt zu verwirklichen, danken. Unser gemeinsames Projekt „Biobank“ war von Anfang an eine große Herausforderung und gleichzeitig eine große Chance. Ich möchte diese Erfahrung und alles was ich dabei gelernt und miterlebt habe nicht missen.

Bedanken möchte ich mich bei der Firma Minitüb GmbH in Tiefenbach, allen voran Dr. Christian Simmet, Heike Adler und Johannes Herold, für die Finanzierung meiner Stelle in diesem Projekt sowie die tatkräftige Unterstützung in organisatorischen und fachlichen Belangen während der ganzen Zeit des Biobank-Projekts.

Mein großer Dank gilt auch Dr. Andreas Blutke aus dem Institut für Tierpathologie ohne den dieses Biobank-Projekt und meine Dissertation nicht möglich gewesen wären. Danke für die vielen Stunden und Tage, die wir gemeinsam für die Biobank und den Artikel gearbeitet haben und in denen Du mich immer, bei egal welchen Problemen und Herausforderungen, unterstützt hast.

Ich möchte mich auch bei allen bedanken, die Mitglied unseres „Munich-MIDY-Pig-Biobank-Teams“ waren. Ohne Euch und Eure tatkräftige Unterstützung und Hilfe, sowohl bei den Sektionen, als auch bei den Vor- und Nachbereitungen, wäre unser Projekt „Biobank“ nicht möglich gewesen. Vielen Dank, dass ich so ein großartiges Team hatte!

Hier unser gesamtes „Munich-MIDY-Pig-Biobank“-Team und weitere wichtige Unterstützer unseres Projekts in alphabetischer Reihenfolge: Sabine Arnold<sup>1</sup>, Dr. Stefan Bauersachs<sup>2</sup>, Dr. Andrea Bähr<sup>3</sup>, Dr. Andreas Blutke<sup>1</sup>, Dr. Christina Braun-Reichert<sup>3</sup>, Dr. Andreas Brüschwein<sup>4</sup>, Prof. Dr. Cornelia Deeg<sup>5</sup>, Erica De Monte<sup>3</sup>, Jessica Dietrich<sup>6</sup>, Michaela Dmochewitz<sup>3</sup>, Caroline Eberle<sup>1</sup>, Dr. Daniela Emrich<sup>1</sup>, Christian Erdle<sup>3</sup>, Josef Grieser<sup>1</sup>, Frauke Groth<sup>1</sup>, Sophie Gumbert<sup>1</sup>, Serena Haesner<sup>1</sup>, Iris Hafner-Eichmann<sup>1</sup>, Marold Handl<sup>1</sup>, Antonia Heitmann<sup>1</sup>, Arne Hinrichs<sup>3</sup>, Eva-Maria Jemiller<sup>3</sup>, Prof. Dr. Andreas Jung<sup>6</sup>, Dr. Elisabeth Kemter<sup>3</sup>, Dr. Barbara Keßler<sup>3</sup>, Rita Koch<sup>6</sup>, Dr. Mayuko Kurome<sup>3</sup>, Dr. Miriam Leipig<sup>1</sup>, Claudia Mair<sup>1</sup>, Prof. Dr. Kaspar Matiasek<sup>1</sup>, Doris Merl<sup>1</sup>, Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg<sup>4</sup>, Christina Nellen<sup>1</sup>, Michaela Nützel<sup>1</sup>, Hazal Öztürk<sup>1</sup>, Marjam O’Gorman<sup>1</sup>, Dr. Christiane Otzdorff<sup>4</sup>, Lisa Pichl<sup>1</sup>, Dr. Myriam Reichenbach<sup>3</sup>, Dr. Horst Reichenbach<sup>3</sup>, Dr. Simone Renner<sup>3</sup>, Alexandra Rieger<sup>1</sup>, Birte Rieseberg<sup>1</sup>, Judith Röder<sup>1</sup>, Dr. Marco Rosati<sup>1</sup>, Nicolas Saucedo<sup>3</sup>, Anna Schleicher<sup>3</sup>, Beate Schmidt<sup>1</sup>, PD Dr. Marlon Schneider<sup>3</sup>, Heidrun Schöl<sup>1</sup>, Tatjana Schröter<sup>3</sup>, Kilian Simmet<sup>3</sup>, Karin Stingl<sup>1</sup>, Dr. Elisabeth Streckel<sup>3</sup>, Dr. Patrizia Uhl<sup>5</sup>, Prof. Dr. Rüdiger Wanke<sup>1</sup>, Prof. Dr. Eckhard Wolf<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Institut für Tierpathologie, LMU München; <sup>2</sup>Institute of Agricultural Sciences, ETH Zürich; <sup>3</sup>Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, LMU München; <sup>4</sup>Chirurgische und Gynäkologische Kleintierklinik, LMU München; <sup>5</sup>Lehrstuhl für Tierphysiologie, LMU München; <sup>6</sup>Pathologisches Institut, LMU München).

Mein Dank gilt auch allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Tierpathologie, die mich während der ganzen Zeit meiner Dissertation unterstützt haben.

Der größte Dank gilt abschließend meiner Familie und vor allem meinem Mann Raimund, die von Anfang an an mich und die „Biobank-Herausforderung“ geglaubt haben und mich während der ganzen Zeit immer, sowohl tatkräftig (z.B. beim Kapseln beschriften), als auch mental unterstützt haben.