



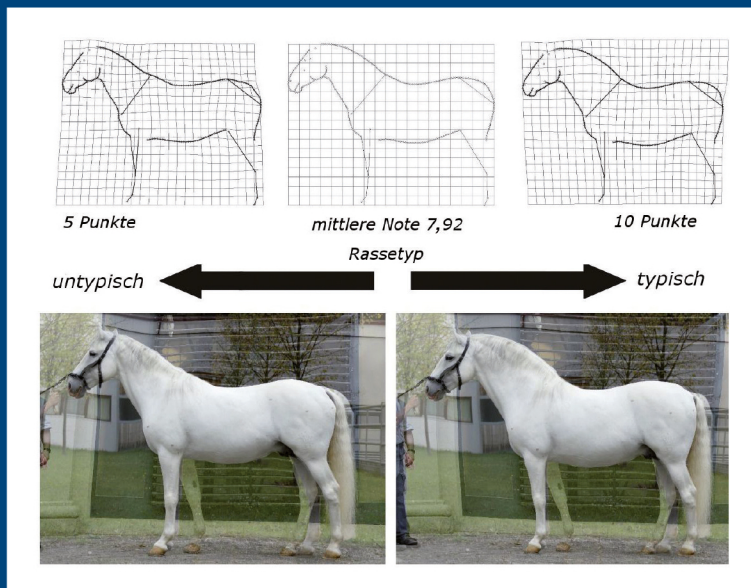
Leopoldina
Nationale Akademie
der Wissenschaften

NOVA ACTA LEOPOLDINA

Neue Folge | Band 121 | Nummer 409

Phänotypisierung – vom Schein zum Sein

Gottfried Brem (Hrsg.)



Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina –
Nationale Akademie der Wissenschaften, Halle (Saale) 2016

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart

NOVA ACTA LEOPOLDINA

Abhandlungen der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina

Herausgegeben von Jörg HACKER, Präsident der Akademie

NEUE FOLGE

NUMMER 409

BAND 121

Phänotypisierung – vom Schein zum Sein

Gemeinsames Symposium der
Österreichischen Akademie der Wissenschaften (ÖAW), der
Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina –
Nationale Akademie der Wissenschaften, und der
Veterinärmedizinischen Universität Wien

am 19. und 20. März 2015 in Wien

Wissenschaftliche Vorbereitung und Organisation:
Gottfried BREM (Wien)
Mitglied der Leopoldina, wirkliches Mitglied der ÖAW



**Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina –
Nationale Akademie der Wissenschaften, Halle (Saale) 2016
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart**

Redaktion: Dr. Michael KAASCH und Dr. Joachim KAASCH

Einbandbild:

Die Entwicklung von Technologien zur automatisierten objektivierten Phänotypisierung von Exterieur- und Bewegungsmerkmalen am Beispiel des Lipizzaners ist die Zielstellung zur Überwindung der Subjektivität von Züchterbeurteilungen und in den Urteilen von Exterieurrichtern in der bisherigen Praxis. Siehe dazu den Beitrag von Thomas DRUML und Gottfried BREM in diesem Band auf den Seiten 127–141.

Die Schriftenreihe Nova Acta Leopoldina erscheint bei der Wissenschaftlichen Verlagsgesellschaft Stuttgart, Birkenwaldstraße 44, 70191 Stuttgart, Bundesrepublik Deutschland.

Die Schriftenreihe wird gefördert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung sowie das Ministerium für Wirtschaft, Wissenschaft und Digitalisierung des Landes Sachsen-Anhalt.

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <https://portal.dnb.de> abrufbar.

Die Abkürzung ML hinter dem Namen der Autoren steht für Mitglied der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina – Nationale Akademie der Wissenschaften. Die Abkürzungen wM ÖAW und kMA ÖAW stehen für wirkliches Mitglied bzw. korrespondierendes Mitglied im Ausland der Österreichischen Akademie der Wissenschaften.

© 2016 Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina e. V. – Nationale Akademie der Wissenschaften

Postadresse: Jägerberg 1, 06108 Halle (Saale), Postfachadresse: 110543, 06019 Halle (Saale)

Hausadresse der Redaktion: Emil-Abderhalden-Straße 37, 06108 Halle (Saale)

Tel.: +49 345 47239134, Fax: +49 345 47239139

Herausgeber: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Jörg HACKER, Präsident der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina – Nationale Akademie der Wissenschaften

Printed in Germany 2016

Gesamtherstellung: Elbe Druckerei Wittenberg GmbH

ISBN: 978-3-8047-3608-5

ISSN: 0369-5034

Gedruckt auf chlorfrei gebleichtem Papier.

Inhalt

BREM, Gottfried: Auch Wesentliches ist für die Augen sichtbar	7
---	---

I. Physikalische Grundlagen bildgebender Verfahren

SCHOLZ, Armin M., KUŠEC, Goran, und BERNAU, Maren: Physikalische Grundlagen der nicht-invasiven Techniken wie Dualenergie-Röntgenabsorptiometrie und Magnetresonanztomographie zur <i>In-vivo</i> -Phänotypisierung	21
KREMER-RÜCKER, Prisca V., BERNAU, Maren, MENDEL, Christian, STEINER, Albert, GRUBER, Esther, und SCHOLZ, Armin M.: Eignung der Magnetresonanztomographie zur Schätzung der Schlachtleistung von Merino-Lämmern <i>in vivo</i>	33

II. Phänotypisierung im zellulären Bereich

BRADE, Wilfried: Phänotypisierung des ruminalen Mikrobioms bei Wiederkäuern – eine aktuelle interdisziplinäre Herausforderung	47
WANKE, Rüdiger: Quantifizierung in der Morphologie – Wozu und wie?	59

III. Phänotypisierung in der Tiermedizin

KNEISSL, Sibylle: Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) in der klinischen Veterinärmedizin: Grundlagen und Anwendungen	85
KROPATSCH, Walter G.: Von digitalen RGBD-Bildern zum Modell – 3D-Bildanalyse zur Phänotypisierung	93

IV. Exterieurbeurteilung und Phänotypisierung bei Tieren

WOLF, Eckhard, BLUTKE, Andreas, WANKE, Rüdiger, und RENNER, Simone: Funktionelle Phänotypisierung von Schweinemodellen für die Diabetesforschung	107
WIMMERS, Klaus, MURANI, Eduard, TRAKOOLJUL, Nares, OSTER, Michael, JAEGER, Alexandra, REYER, Henry, und PONSUKSILI, Siriluck: OMICS: Analyse von Genom, Transkriptom und Endophänotyp – von der genetischen Ausstattung zum Erscheinungsbild	121

DRUML, Thomas, und BREM, Gottfried: Bildgestützte Methoden zur Analyse von Exterieurmerkmalen bei Pferden	127
AIGNER, Bernhard: Standardisierung der Phänotypisierung von Labormäusen	143
MAAS, Paula, GRZEGRZÓŁKA, Beata, OBERLE, Martin, JUDAS, Michael, GAREIS, Manfred, und KREMER-RÜCKER, Prisca: Phänotypisierung des Schlachtkörpermerkmals Rückenfettdicke bei Spiegelkarpfen (<i>Cyprinus carpio</i>) mittels Ultraschall <i>in vivo</i> und Computertomographie <i>post mortem</i>	153
LÜHKEN, Gesine: Phänotypisierung der Krankheitsempfänglichkeit in natürlich infizierten Nutztierpopulationen	163

V. Abendvortrag

LOIDOLT, Sophie: Was zeigt sich in der Erscheinung? Eine philosophische Annäherung an das Verhältnis von Sein und Erscheinen	177
--	-----

Auch Wesentliches ist für die Augen sichtbar

Gottfried BREM ML, WM ÖAW (Wien, Österreich)

Albert SCHWEITZER (1875–1965), sagte: „Vergiss den Anfang nicht, den Dank!“ Daran denkend, beginne ich mit dem Dank an die Österreichische Akademie der Wissenschaften (ÖAW), die Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina und die Veterinärmedizinische Universität Wien, dass sie dieses Symposium gemeinsam veranstalten und finanziell unterstützen. Ich danke den Sponsoren für den Symposiums-Heurigen heute Abend, der ÖAW und dem ÖAW-Event-Management für die Bereitstellung des schönsten Hörsaals Österreichs und die Unterstützung bei der Organisation. Besonders danke ich meiner Mitarbeiterin und Doktorandin Frau Kati SPIESBERGER, die sich um Alles kümmert. Eine ziemliche Arbeit war die Aufbereitung der Tagungsunterlagen. Auch dafür danke ich Frau SPIESBERGER und Frau Bettina KLIMMER.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei Ihnen, den Gästen, die uns die Ehre geben und gekommen sind. Vor allem freut mich sehr, dass so viele Studenten im Auditorium sitzen, und ich denke, dass sie es nicht bereuen werden.

Viele assoziieren den Titel der Einleitung „Auch Wesentliches ist für die Augen sichtbar“ mit dem Zitat von Antoine DE SAINT-EXUPÉRY (1900–1944): „Man sieht nur mit dem Herzen gut. Das Wesentliche ist für die Augen unsichtbar!“¹ Der Autor des *Kleinen Prinzen* hat diesen Satz 1943 sein „einfaches Geheimnis“ genannt. Der Sinn von „Man sieht nur mit dem Herzen gut“ erschließt sich relativ unproblematisch. Der Autor verband damit seine Erkenntnis, dass das menschliche Auge nur einen begrenzten Ausschnitt sieht. Er nahm das Sehen mit dem Herzen als Metapher für die Besonderheit der Liebe, also die Sichtbarmachung des Wesentlichen.

Wilhelm BUSCH (1832–1908) griff zu einer ähnlichen Metapher. Sein lyrisches Werk, das viel weniger bekannt ist, besteht im Vergleich zu seinem epochalen zeichnerisch humoristischen Werk mit Knittelversen nur aus drei kleinen Bändchen. Der dritte, erst nach seinem Tod im Nachlass gefundene und dann publizierte Band mit dem Titel *Schein und Sein* begann 1899 mit folgendem Gedicht:

„Mein Kind, es sind allhier die Dinge,
Gleichviel, ob große, ob geringe,
Im wesentlichen so verpackt,
Daß man sie nicht wie Nüsse knackt.
Wie wolltest du dich unterwinden,
Kurzweg die Menschen zu ergründen,
Du kennst sie nur von außenwärts.
Du siehst die Weste, nicht das Herz.“²

1 SAINT-EXUPÉRY 2006, S. 72.

2 BUSCH 1952, S. 3.

Nun aber vom Sehen des Herzens und dem Sehen mit dem Herzen zum Sehen in das Herz, also zum Erfassen von Phänotypen. Der Titel des Symposiums – Phänotypisierung – ist ein Derivat des Wortes Phänotyp und bedeutet die Bestimmung von Phänotypen.

Der Begriff Phänotyp wurde aus den beiden altgriechischen Worten *phaino* „ich erscheine“ und *týpos* „Gestalt“ zusammengefügt (siehe auch S. 179). Der Phänotyp, die erscheinende Gestalt, das Erscheinungsbild, war in der Tierzucht und Genetik ursprünglich einfach das äußere Erscheinungsbild, also die Summe aller äußerlich feststellbaren Merkmale und Eigenschaften eines Individuums. Später wurden neben den äußerlichen Merkmalen dann auch die Lage und Größe innerer Organe, Verhaltensmerkmale, serologische und molekulare Werte zum Phänotyp gezählt – obwohl sie ja nicht unmittelbar sichtbar sind.

Phänotypisierung ist die spezifische, objektivierbare, standardisierte und systematische Beschreibung, Erfassung und Messung von Bildern der Merkmale, Strukturen, Funktionen und Krankheiten sowie deren grafische Auswertung und/oder quantitative Analyse. Der in diesem Zusammenhang entscheidende Begriff ist „Bilder“! Phänotypisierung erfasst und misst nicht die Wirklichkeit, sondern unsere Bilder von der Wirklichkeit. Das macht es insgesamt nicht einfacher.

Von unseren fünf Grundsinnen verwenden wir bei der Phänotypisierung mehr oder weniger ausschließlich den Gesichtssinn. Die anderen Sinne, hören, schmecken, riechen und tasten, spielen in der klassischen Phänotypisierung keine wesentliche Rolle.

Das Spektrum elektromagnetischer Wellen reicht von der Höhenstrahlung mit einer Wellenlänge von bis zu 10^{-15} m auf der einen bis zu Wechselströmen mit Wellenlängen von bis zu 10^7 m auf der anderen Seite. Der für uns sichtbare Teil des elektromagnetischen Spektrums umfasst Wellenlängen zwischen 380 bis 780 nm, also zwischen 10^{-7} m bis 10^{-6} m. Das ist nur ein winziger Teil des gesamten Spektrums elektromagnetischer Wellen, zu denen – neben dem sichtbaren Licht – auch Radiowellen, Mikrowellen, Infrarotstrahlung, UV-Strahlung, Röntgen- und Gammastrahlung gehören.

Seit der Aufklärung hinterfragt die Wissenschaft die Wirklichkeit, um zu ergründen, was das Leben bestimmt. Fotos suggerieren Wahrheit und Wirklichkeit, aber tatsächlich sind Fotos immer nur gestaltete Abbilder aus zweiter Hand. Nicht zuletzt haben Fotos eine deutliche emotionale Komponente, die nicht der rationalen Auseinandersetzung dient und z. B. medial u. a. genutzt wird, um Gefühle anzusprechen und zu steuern. Auch in den Naturwissenschaften werden vermehrt Bilder genutzt, um komplexe Sachverhalte zu visualisieren und damit verständlicher zu machen. Die Wirkung von Bildern beruht auf der Natur der visuellen Wahrnehmung. Die enge Verbindung mit Emotionen rührt daher, dass Bilder im Gehirn in denselben Arealen verarbeitet werden wie Wahrnehmungen der Wirklichkeit. Im Gegensatz dazu gibt es zur Verarbeitung der Sprache eigene Areale im Gehirn. Deshalb können Bilder wesentlich stärker emotionalisieren und auch mehr Macht ausüben als Sprache.

Bei mir müssen Sie heute traditionell mit dem gesprochenen Wort vorliebnehmen. Ich werde keine Bilder projizieren, obwohl mir das beim Thema Phänotypisierung wirklich schwerer fällt als sonst bei Einleitungsreferaten zu Symposien. Dafür werden Sie vom Kollegen SCHOLZ aus München über Röntgenabsorptiometrie, von Frau Kollegin KREMER-RÜCKER aus Triesdorf über Magnetresonanztomographie (MRT) und von Frau KNEISSL aus Wien über Computertomographie (CT) und MRT mit Bildern ebenso unterrichtet wie von Kollegen FÖRSTER aus Hannover über *In-vivo*-Anwendungen der Zwei-Photonen-Mikroskopie.

Auf Anregung der UNESCO haben die Vereinten Nationen das Jahr 2015 zum „Internationalen Jahr des Lichts und der Lichttechnologien“ erklärt und damit auch die lichtbasierten

technologischen Anwendungen, von der Medizin bis zu den Kommunikationstechnologien, ins Zentrum gestellt.

Schon seit der Antike ist für die Philosophie und die Wissenschaft das Verhältnis von Wahrnehmung und Wirklichkeit eine Herausforderung. Frau LOIDOLT von der jungen Kurie der ÖAW wird im heutigen Abendvortrag eine fundierte philosophische Annäherung an das Verhältnis von Sein und Erscheinen präsentieren und uns damit auch auf den Symposiums-Heurigen einstimmen.

Unsere visuelle Wahrnehmung erfolgt nicht über die Photorezeptoren im Sinnesorgan Auge. Die 130 Millionen Zapfen und Stäbchen projizieren auf eine Million Ganglienzellen, die diese primären Reize verarbeiten und ans Gehirn weiterleiten, wo sie bewertet, charakterisiert und kategorisiert werden. Wie wichtig bewusste visuelle Wahrnehmung ist, lässt sich auch daran erkennen, dass an der Interpretation und Reaktion visueller Reize mehr als die Hälfte der Großhirnrinde beteiligt ist. Bei der Wahrnehmung konstituiert sich im Bewusstsein aus den Reizen des Sehens eine subjektive Wirklichkeit. Das, was wir zu sehen glauben, ist keine allgemein gültige Wirklichkeit. Sie ist ein Konstrukt unseres eigenen Gehirns, und deshalb hat jedes Individuum seine eigene Wirklichkeit. *Per definitionem* ist Wirklichkeit das, was tatsächlich ist, und nicht das, was nur in Phantasie oder Vorstellung vorkommt. Was also ist die Wirklichkeit bei der Phänotypisierung?

Noch einige Worte zur Faszination von visuellen Eindrücken. Nicht nur in der anatomischen Lehre, sondern auch bei Schauveranstaltungen, wie den vielbesuchten Körperwelten, werden sogenannte Plastinate verwendet. Plastinate sind Darstellungen von Phänotypen. Die Plastination ist ein Konservierungsprozess, bei dem Körperwasser durch Kunststoff ausgetauscht wird, um haltbare und geruchsfreie Präparate zu erzeugen. Plastinate faszinieren, weil sie Aufbau und Funktionsweise von Organismen in ihrer anatomischen Komplexität visuell zeigen und verständlicher machen.

Auch artifizielle Veränderungen des Phänotyps wie alle Arten der Tätowierung, Bemalung/Kosmetik oder morphologische Veränderungen der Körperoberfläche verändern das Sein mittels Schein. *Ötzi*, der vor 5300 Jahren verstorbene Mann, dessen Mumie 1991 vom Similaun-Gletscher freigegeben wurde, hatte über 60 parallel geführte Hauteinritzungen, in die Holzkohle eingerieben worden war, also Tätowierungen. Ob es sich dabei um Behandlungsversuche im Sinne einer prähistorischen Akupunktur oder rituelle Tattoos handelt, ist nicht klar. Auf jeden Fall sind das die ältesten gefundenen Tattoos eines Menschen. In Ägypten kam die Tätowierung erst gut 1300 Jahre später in Mode.

Wenden wir uns nun aber dem zweiten zentralen Begriff in Tierzucht und Genetik zu, dem Genotyp. Der Genotyp, also die Gesamtheit der Erbanlagen, ist der vollständige Satz von Genen, den ein Individuum hat. In Analogie zum Phänotyp als Erscheinungsbild ist der Genotyp sozusagen das Erbbild eines Individuums. Entsprechende Kenntnisse des Genotyps vorausgesetzt, ist ableitbar, wie der Phänotyp aussehen wird bzw. wie er aussehen könnte. Das Erscheinungsbild eines Individuums ist also eine, bei einem vorgegebenen Erbbild, mögliche Ausprägung des Genotyps.

Hier lasse ich den von mir sehr geschätzten Johann Wolfgang VON GOETHE (1749–1832) kurz zu Wort kommen, der 1829 – genetisch nicht perfekt, aber deskriptiv unübertroffen – dichtete:

„Vom Vater hab ich die Statur,
Des Lebens ernstes Führen,
Vom Mütterchen die Frohnatur
Und Lust zu fabulieren“³

3 GOETHE [1829] 1960, Bd. I, S. 712.

Die Erbanlagen eines Individuums, der Genotyp, werden bei der Ausprägung des Phänotyps durch Umweltfaktoren modifiziert. Wichtig ist, dass auch diese Reaktion auf die Umwelt, in Abhängigkeit vom Genotyp, unterschiedlich modifiziert werden kann. Dann ist die genetische Variabilität größer als der Phänotyp sie zeigen kann. In aller Regel ist die Zahl der Phänotypen aber größer als die Zahl der Genotypen. Wichtig ist, dass der Phänotyp im Prinzip noch nichts darüber aussagt, in welchem Maß er von genetischen Faktoren oder von Umweltfaktoren bestimmt oder beeinflusst wurde und wird.

Die Variabilität der Beeinflussbarkeit durch Umwelteffekte wird durch die phänotypische Plastizität, also die Möglichkeit eines Genotyps, in unterschiedlichen Lebensräumen unterschiedliche Phänotypen auszuprägen, charakterisiert. Die phänotypische Plastizität kann morphologische und physiologische Charakteristika oder auch Verhaltensweisen betreffen. Phänotypische Plastizität wird genetisch mitunter als Genotyp-Umwelt-Interaktion verstanden.

Bei weitestgehend von genetischen Faktoren bestimmten Phänotypen, die in ihrer Ausprägung wenig auf Umwelteinflüsse reagieren, also in erster Linie vom Genotyp bestimmt und vorhersagbar sind, ist die Plastizität gering. So ist beispielsweise die Ausprägung von Fellfarben in der Regel von Umwelteffekten unabhängig. Meine Studenten kennen eine Ausnahme davon, den Akromelanismus bei rein weiß geborenen Russenkaninchen, die erst nach dem Verlassen des Nestes eine temperaturabhängige dunkle Färbung der Spitze der Schnauze, der Ohren, Läufe und Blume ausbilden.

Bei starker Beeinflussung der Ausprägung der Phänotypen durch die Umwelt ist die Plastizität hoch. So wird etwa die Ausprägung der Bemuskelung stark von Umweltfaktoren wie Fütterung, Bewegung und Training beeinflusst und kann sich, auch während des Lebens, ändern. Hohe Plastizität ermöglicht aber Organismen vor allem, sich weitgehend an die Umweltbedingungen anzupassen. Hier passt noch einmal Johann Wolfgang VON GOETHE, der schon 1829 in einem Aphorismus so treffend formuliert: „Nicht allein das Angeborne, sondern auch das Erworbene ist der Mensch.“⁴

Auf der Basis des Genotyps entsteht also durch modifizierende Umwelteinflüsse der Phänotyp. Ein Phänotyp beruht naturgemäß immer auf einem Genotyp, und umgekehrt kann sich ein Genotyp ohne Phänotyp weder reproduzieren noch kann er existieren.

Die Begriffe genetische und phänotypische Variabilität werden nicht durchgängig streng auseinandergehalten. Änderungen des Genoms entstanden und entstehen durch Mutationen der DNA, Veränderungen des Phänotyps sind Variationen. Eine phänotypische Variation muss durch eine genetische Mutation nicht exakt festgelegt sein, wie die Evolutionsbiologie konstatiert. Es muss weder ein „eins zu eins“ noch ein anderes deterministisches Verhältnis existieren, in der Wissenschaft sprechen wir vom Genotyp-Phänotyp-Verhältnis.

In der Evolutionsbiologie können phänotypische Innovationen, wie etwa die Federn der Vögel oder die Milchdrüsen der Säugetiere, evolutionäre Innovationen sein. Innovationen im Sinne phänotypischer Innovationen haben, weder in der Vorläuferart noch im selben Organismus, homologe Gegenstücke. Quantitative Veränderungen bestehender Merkmale werden damit ausgeschlossen und nur Merkmale, die wirklich neu entstanden sind, werden hier subsummiert. Die synthetische Evolutionstheorie erklärt nicht, wie Neuheiten in der Evolution anders entstehen als Variationen. Charles DARWIN (1809–1882) hat Variation hauptsächlich

4 GOETHE [1829] 1960, Bd. 18, S. 605.

mit natürlicher Selektion und Adaptation erklärt. Während Phänotypische Variation als gegeben angenommen wird, untersucht die evolutionäre Entwicklungsbiologie, wie die Embryonalentwicklung hilft, das Entstehen innovativer Merkmale zu erklären und ihre Realisierung und dauerhafte Verankerung, bis hin zur epigenetischen Integration, zu verstehen.

Den Unterschied von Phänotyp und Genotyp hat bereits Gregor MENDEL (1822–1884) bei seinen Kreuzungsexperimenten mit Erbsen erkannt. Als er Pflanzen aus reingezüchteten Linien mit purpurnen Blüten mit solchen kreuzte, die weiße Blüten hatten, trugen alle Nachkommen purpurne Blüten. Kreuzte er diese Nachkommen untereinander, traten in der zweiten Nachkommengeneration neben purpurnen Blüten auch wieder weiße Blüten auf. Schon dieses einfache Experiment zeigte, dass Phänotypen nur begrenzt Rückschlüsse auf genetische Faktoren zulassen. Zur Beschreibung des Phänomens der verschiedenen Merkmalsausprägungen führte MENDEL die Bezeichnungen dominant und rezessiv ein. Erst der Däne Wilhelm JOHANNSEN (1857–1927) prägte 1911 die Begriffe „Genotyp“ und „Phänotyp“.

Bislang war von dem Phänotyp oder dem Genotyp die Rede. In Wirklichkeit betrachten wir *in praxi* aber immer nur partielle Aspekte beider Begriffe. Um nämlich den kompletten Phänotyp z. B. eines Rindes zu beschreiben, müssten nicht nur die Farbe des Fells, die Farbe und Form der Hörner, Strukturen des Flotzmaules, die Dimensionen der Extremitäten und vieles mehr angegeben werden. Alle Organe, alle morphologischen und physiologischen Merkmale und Verhaltensweisen, ja sogar jede Zelle und jedes einzelne Protein müssten exakt beschrieben werden, um den Phänotyp dieses Tieres völlig zu erfassen. Im Normalfall wäre das nicht zielführend. Deshalb werden von den zigtausend möglichen Merkmalen jeweils nur diejenigen betrachtet und beurteilt, die im gegebenen Fall für den zu untersuchenden Phänotyp des Tieres relevant sind, d. h., man arbeitet mit partiellen Phänotypen. Auch im Hinblick auf den Genotyp wurden lange Zeit nur partielle Bereiche betrachtet, denn der tatsächliche Genotyp eines Individuums, also seine gesamte genomische Sequenz war nicht erfassbar. Jetzt ist das im Prinzip möglich, denn heute kann – mit vertretbarem Aufwand – der vollständige Genotyp, also die gesamte DNA-Sequenz des Genoms, durch Genomsequenzierung bestimmt werden. Die Analyse von Genomen, Transkriptomen und Endophänotypen ist das Thema von Kollegen WIMMERS aus Dummerstorf am morgigen Vormittag.

Unter dem Schlagwort Phänotypisierung werden vor allem Ansätze verfolgt, auch bei Phänotypen immer komplettere Aussagen über das gesamte Erscheinungsbild zu erarbeiten. Die Automatisierung revolutioniert die Phänotypisierung, denn sie ermöglicht auch sehr effiziente Bearbeitungen von Populationen, vor allem bei Pflanzen, wie Kollege WALTER aus Zürich beispielhaft zeigen wird. Funktionelle Genomik und Phänotypisierung werden kombiniert, um das Genom immer besser mit Funktion und Phänotyp zu verknüpfen. Das zunehmende Verständnis der genetischen Grundlagen der Merkmalsausprägung ermöglicht auch die züchterische Verbesserung des Phänotyps durch Marker gestützte Selektion. Bei Erbfehlern erschwert das Auftreten von Phänokopien die Identifizierung von Anlageträgern.

Nun aber zu den bildgebenden Verfahren. Das sind Verfahren, die Messgrößen und/oder daraus abgeleitete Informationen nutzen, um ein Bild von einem realen Objekt zu erstellen. Solche Verfahren werden in nahezu allen naturwissenschaftlichen Bereichen verwendet und in so verschiedenen Disziplinen wie Archäologie, Materialprüfung oder Pflanzen- und Tierzucht genutzt. Besonders in der Medizin gehören Endoskopie, Ultraschall-, Röntgen- und Nukleardiagnostik, Magnetresonanz- und Computertomographie zur diagnostischen Routine. Es ist in höchstem Maße beeindruckend, welche detailgenauen und präzisen Bilder z. B. des Herzens, aber auch aller anderen Organe, Mediziner mit geeigneter apparativer Ausstattung

erstellen können und welche segensreiche Eingriffe ihnen das ermöglicht. Bei mittlerweile fünf Herzkatheter-Eingriffen, bei denen mein Herz und die plastischen Modellierungen in meinen drei Herzkranzgefäßen live visualisiert und simultan auch von mir selbst beobachtet werden konnten, ist mir – durch den Blick in mein Herz – im wahrsten Sinne des Wortes quasi „das Herz aufgegangen“. Das genügt an dieser Stelle – mir jedenfalls genügt es.

Obwohl in der Ankündigung des Symposiums den bildgebenden Verfahren in der Medizin noch ein breiterer Part zgedacht war, werden sich die medizinischen Vorträge heute und morgen – aus Zeitgründen – auf spezielle Sichtbarmachungen im zellulären Bereich und auf tiermedizinische Anwendungen beschränken. Die traditionelle Phänotypisierung, also die Messung, Beschreibung und Analyse von Merkmalen, begann mit der Entwicklung der Systematisierung und Taxonomie von Tieren und Pflanzen. Sie wurde später weitergeführt mit der Charakterisierung und Isolierung von Mutanten und Krankheiten bei Fliegen, Zebrafischen und Mäusen. In den letzten Jahren entstanden in Europa die weltweit ersten Zentren zur systematischen und umfassenden Phänotypisierung von Mausmutanten. Durch exakte Definition und Standardisierung der Methoden und Protokolle der Phänotypisierung wurden die Ergebnisse zwischen Labors vergleichbar, wichtige Krankheitsmodelle charakterisiert und der Weg von der funktionellen Genomforschung zur systemischen Krankheitsanalyse geebnet, wie Ihnen die Kollegen WOLF und AIGNER aus München erläutern werden. Eine von Tierzüchtern im Prinzip schon seit Jahrtausenden gepflegte Praxis ist die Exterieurbeurteilung. Trotzdem ist sie für viele ein Buch mit sieben Siegeln, obwohl, oder vielleicht auch, weil sie nur eine Frage des guten Auges ist. Der „Züchterblick“ hat es Generationen von Tierzüchtern ermöglicht, auch ohne Populations- und Molekulargenetik, beachtliche züchterische Erfolge zu erzielen.

Die Exterieurbeurteilung ist immer funktionell, sie ist nicht Selbstzweck, sondern sie dient der Selektion von leistungsfähigen und gesunden Tieren. Das Wissen, dass zwischen Exterieur und Leistungsfähigkeit ein enger Zusammenhang besteht, wurde ebenso genutzt wie die Beziehung zwischen Exterieur und Gesundheit. Dadurch ist es möglich, zukünftige Belastungen abzuschätzen und deren gesundheitliche Folgen zu minimieren. Das ist auch prophylaktischer Tierschutz.

Im Rahmen eines eigenen Projektes arbeiten wir, mein Mitarbeiter Thomas DRUML wird am Freitag darüber referieren, am Beispiel des Lipizzaners an der Entwicklung von Technologien zur automatisierten objektivierten Phänotypisierung von Exterieur- und Bewegungsmerkmalen. In einer ersten Phase haben wir uns Züchterbenotungen und deren Reihung angeschaut und gesehen, dass es exorbitante Unterschiede gibt. Jetzt wollen wir versuchen, das Pferde-Exterieur mit Foto- und Filmaufnahmen zu erfassen und mit deren Auswertung zu objektiven Kennzahlen zu kommen und letztlich dann nachvollziehbare Beurteilungen zu ermöglichen.

Die Anwendung visueller Verfahren in der Wissenschaft begann in Europa mit den ersten Lupen im 11. Jahrhundert und Mikroskopen im 16. Jahrhundert. 1810 beschrieb Louis MALUS (1775–1812) die Lichtbrechung und Polarisation, 1852 George Gabriel STOKES (1819–1903) die Fluoreszenz, und Paul EHRLICH (1854–1915) begann 1880 mit der Färbung von Präparaten. 1895 entdeckte Wilhelm Conrad RÖNTGEN (1845–1923) in Würzburg die sogenannten X-Strahlen und ihre Nutzung zur Bildgebung. Ein weiterer Meilenstein war das 1938 durch Ernst RUSKA (1906–1988), Max KNOLL (1897–1969) und Bodo VON BORRIES (1905–1956) entwickelte Elektronenmikroskop, dem 1982 das von Gerd BINNING (*1947) und Heinrich ROHRER (1933–2013) entwickelte Rastertunnelmikroskop folgte.

Die Entwicklung der Tomographie mit der überlagerungsfreien Darstellung von lebenden Objekten im Schichtaufnahmeverfahren stellt in der medizinischen Bildgebung einen enormen Fortschritt dar. Aus tomographischen Daten können so auch dreidimensionale Bilder des untersuchten Objekts errechnet werden. Gleich im ersten Vortrag wird Kollegin POHL zeigen, wie Wiener Wissenschaftler Tricks ausklügelten, kleine Proteine in Mitochondrien mit Lichtmikroskopen zu beobachten und zu analysieren, was sich im Inneren der Mitochondrien tut. Diese Methode beruht auf Erkenntnissen der superaflösenden Fluoreszenzmikroskopie, die 2014 mit dem Chemie-Nobelpreis ausgezeichnet worden ist.

Nun aber zu einem weiteren Anlass für das heutige Symposium. Es wurde als wissenschaftlicher Beitrag zur 250-Jahrfeier unserer Universität geplant. Drei Wiener Universitäten feiern 2015 runde Jubiläen:

- die Universität Wien wird 650 Jahre,
- die Veterinärmedizinische Universität 250 Jahre und
- die Technische Universität 200 Jahre alt.

Grundsätzlich passen universitäre Jubiläen durchaus zum Titel unseres Symposiums, denn auch Universitäten entstanden, existieren und entwickeln sich im Spannungsfeld von Schein und Sein. Es gibt viele alte und immer wieder aktuelle Spannungsverhältnisse nicht nur zwischen Sein und Schein, sondern auch zwischen Realität und Virtualität, Wirklichkeit und Gegenwelt, Wahrheit und Fiktion. Weil die heutige Veranstaltung die Erste im Rahmen der Feierlichkeiten der Veterinärmedizinischen Universität Wien ist, einige ganz wenige Daten zur Gründung. Für uns ist der kommende Dienstag, der 24. März, das Jubeldatum. Da jährt sich das denkwürdige Handschreiben von Kaiserin MARIA THERESIA (1717–1780) aus dem Jahr 1765 zum 250. Mal. Sie verfügte: „Ich habe beschlossen, hier eine Lehrschule zur Heilung der Viehkrankheiten errichten zu lassen.“

Ausgelöst durch dieses Schreiben – wenn man so will, diesen „Schein“ – begann am 12. Januar 1767 das wirkliche Sein mit dem ersten Unterricht an der „Kayserlich-königlichen Pferde-Curen- und Operationsschule“ unter Ludwig SCOTTI (1728–1806). Die zweite Wiener Veterinärschule, das „Kayserlich-königliche Thierspital“, wurde durch JOSEF II. (1741–1790), einen Sohn der Kaiserin, am 12. Dezember 1776 begründet.

Weil Jubiläen sich dazu eignen, hier auch einige Anmerkungen zum Spannungsverhältnis von Schein und Sein an tiermedizinischen Universitäten. Dazu lasse ich zwei berühmte Veterinärmediziner zu Wort kommen. Zuerst unseren damaligen Prorektor und späteren ersten akademisch gewählten Rektor Professor Armin VON TSCHERMAK (1870–1952). In seiner Rede, gehalten bei der ersten Promotion an der „K.u.k. Tierärztlichen Hochschule“ in Wien am 6. Februar 1909 zum Thema „Über die Bedeutung der Forschungsarbeit für die menschliche Kultur“, führte er aus:

„Das Sinnen und Forschen nach den ‚Causae et sedes morborum‘, das sogenannte Interessantfinden des Falles an sich [...] weitet Blick und Herz, macht die ärztliche Kunst erst zur Wissenschaft und bewahrt den Arzt davor, in simples wohlwollendes Banausentum zu verfallen.“⁵

Der Zweite ist Prof. Melchior WESTHUES (1896–1971), von 1955 bis 1956 auch Rektor der Ludwig-Maximilians-Universität und berühmter Tierchirurg in München. Er mahnte 1964 bei seinem Festvortrag anlässlich der 50-Jahrfeier der Aufnahme der Tierärztlichen Fakultät das

5 TSCHERMAK 1909.

Streben nach *studia humaniora*, also einem humanistischen Bildungsprogramm, an. Dabei formulierte er sehr eindrücklich:

„Vielmehr bedrängt uns heute die andere, sehr gefährliche Frage, ob die Fakultät außerdem auch dem Bildungsauftrag der Universität zu entsprechen imstande und bereit ist, was aber ihre Legitimation als Fakultät erst ausmacht. Es handelt sich darum, daß sich der Student an der Universität nicht nur zu einem gut funktionierenden, kenntnisreichen Fachmann, sondern zu geistigen Menschen bilden soll. Bildung an der Universität? Das ist heute ein strapazierter Begriff. Man leidet an ihm, denn er ist mehr und mehr fraglich geworden in unserer Zeit.“⁶

Dürfen Universitäten als solche also zu reinen Berufsausbildungsstätten herabgestuft werden oder sollen, ja müssen sie Bildungseinrichtungen bleiben? Was ist zu tun? Die Humboldtsche Freiheit von Forschung und Lehre wie eine Monstranz vor sich herzutragen wird nicht genügen, wenn die begleitende Prozession von ganz anderen Honoratioren geprägt ist. Schaut man auf den Bologna-Prozess, der Gottseidank, im medizinischen Bereich bislang nur fragmentarisch umgesetzt wurde, so wandelt Bologna die gesellschaftliche Funktion des Hochschulstudiums um in eine mehr oder weniger wissenschaftliche Berufsausbildung. Der systemimmanente Widersinn ist eine quadrierende Bildungspolitik, die gleichzeitig planwirtschaftlich und neoliberal ist. Sie möchte einen europäischen Hochschulraum schaffen, wo durch Vereinheitlichung Gleichheit und durch Profilbildung Ungleichheit entstehen soll (BREM 2014).

Mit den Hochschulrahmengesetzen haben Universitäten nicht nur budgetäre Unabhängigkeit erhalten. Die gewaltige Stärkung der Rektorate wurde mit dem Schleifen der Mitbestimmung der Kurien erkaufte. Aber wozu nutzen Universitäten nun diese neue Freiheit? Führen sie die Universität zu einer Renaissance der Freiheit und Unabhängigkeit von Forschung und Lehre? Mitnichten! Vielmehr beobachten wir die Tendenz, sich selbst zu Grunde zu regulieren. Was sich ministerielle Administration nicht getraut hat, setzen Universitäten in Selbstverwaltung völlig unbeschränkt um. So mutieren Universitäten zu Administrationsmonstern mit einer galoppierenden Totalregulierung und Überkontrolle der Universitäten durch die Universitäten selbst!

Das scheint niemanden so sehr zu stören, dass aufbegehrt oder zumindest Wahrnehmbares dagegen unternommen wird. Wer lehnt sich auf, wer kann es, wer traut sich? Von den Studenten ist heute realistischer Weise nicht mehr viel zu erwarten. Sie werden in durchgängig strukturierte Prozedere gezwängt und völlig verschult. Studenten, die im Studium bleiben wollen, begehren nicht auf, sie wollen nur fertig werden. Um die Vielzahl der Prüfungen zu bewältigen, wird das Prüfungssystem geändert. An Stelle von mündlichen oder schriftlichen Prüfungen, in denen Prüflinge sich aktiv äußern können müssen, tritt in der derzeitigen Form häufig die Beantwortung von geschlossenen *Multiple-Choice*-Fragen mit vorformulierten Antworten. Im angelsächsischen Raum, der hier als Vorbild dient, haben solche Prüfungsverfahren eine lange und erfolgreiche Tradition, weil sie mit großem Aufwand vorbereitet und ausgearbeitet worden sind.

Multiple-Choice-Prüfungsverfahren haben zwei entscheidende Vorteile:

- (1.) Die Beantwortung kann leicht ausgewertet werden.
- (2.) Das Ergebnis wird quasi automatisch rechtskräftig erstellt.

Ob Kreuzchen an der richtigen Stelle sind, kann ein Computer objektiv feststellen, und kein Anwalt kann so ein Ergebnis vor Gericht wegdiskutieren. Vorausgesetzt, die Fragen und ihre Antworten sind hundertprozentig korrekt gestellt und formuliert. Um das zu gewährleisten, müssen die Fragen und die normierten Antworten, bevor sie für eine Prüfung zugelassen werden,

6 WESTHUES 1964.

von Kollegen evaluiert werden. Gut gemeint ist aber nicht immer automatisch gut gemacht. Platte und schlecht ausgearbeitete *Multiple-Choice*-Fragen trimmen universitäre Prüfungen auf das Niveau einer theoretischen Führerscheinprüfung. Kinder und Jugendliche aus Primär- und Sekundärschulen könnten, bei hinreichendem Fleiß, solche Fragen genauso gut erledigen wie angehende Mediziner. Dass sie das könnten, ist natürlich nicht das wirkliche Problem, aber glauben wir, dass damit Mediziner gebildet werden, wie wir sie wollen und brauchen? So ein Prüfungssystem degradiert angehende Akademiker zu Kreuzelschreibern, vergleichbar den Bauern in Ludwig ANZENGRUBERS (1839–1899) gleichnamigem Roman, die brav ihre drei Kreuzel malen, um sich bei der Obrigkeit einzuschmeicheln. Universitäten aber müssen kombinatorisches und deduktives Denken lehren und in geeigneter Weise prüfen, ob dies gelungen ist.

Was aber macht die Frau „Viechdokter/der Herr Viechdokter“ in Konfrontation mit einem Patienten, wenn der Fall interessant, sprich schwierig ist. Aufkommende Hilflosigkeit könnte dann die durchaus naheliegende Frage provozieren: „Wo ist die Auswahl für meine Antwortmöglichkeiten?“ Nun, vielleicht gibt es in Zukunft ja tatsächlich entsprechende Apps auf Tablet-Computern, die solche Vorschläge mobil verfügbar machen werden (BREM 2014). Noch ist es aber nicht so weit, und selbst wenn das Realität wird, werden Apps eben normierte Standardantworten bieten, und wer glaubt schon, dass die Erkennung diverser Krankheitssituationen immer Standard ist?

Der häufig angeführte Grund für viele dieser Regulierungen ist die Angst der Universitäten, Studenten, Mitarbeiter oder andere Betroffene könnten juristisch Klage erheben. Aber Angst ist selten ein guter Ratgeber! Ich vermisse hier das Wienerische „No Na“ im Sinne von „Na und“! Hat tatsächlich niemand die Courage, sich gegen diese Regulierungswut zu stellen, weil Angst vor potentiellen Klagen alle und alles lähmt? Wo bleiben Freiheit von Lehre und Wissenschaft, wenn unter den Schlagworten Qualitätssicherung und Machbarkeit wenig hilfreiche Maßnahmen eingeleitet werden, wenn Professoren vor der Vergabe von Themen für wissenschaftliche Arbeiten diese einem monokratischen Organ zur Genehmigung vorlegen müssen und von diesem dann mitunter selbstherrlich gemäßregelt und – ohne eigene Fachkenntnis – Themen abgelehnt werden?

Naturwissenschaftliche und medizinische Forschung muss von Hypothesen getrieben sein. Wie verträgt es sich mit wissenschaftlichem Selbstverständnis, wenn für Doktor- und PhD-Arbeiten noch vor Beginn, bzw. zur Bewilligung, in detailliertesten Arbeitsprogrammen erreichbare Ziele und Ergebnisse postuliert werden müssen. Wenn aber alles ohnehin so klar ist, wie diese Fragebögen erwarten und implizieren, wozu dann überhaupt noch Forschung? Nur zur Bestätigung, dass das, was prognostiziert wurde, tatsächlich nach formalistischer Abarbeitung eintritt.

Wenn man sich aber anschaut, welche Anforderungen bei der Beantragung von externen Forschungsprojekten gestellt werden, ist dieses Vorgehen allerdings in gewisser Weise nachvollziehbar. Die Prinzipien der akademischen Freiheit und Unabhängigkeit der Forschung und Lehre müssen erhalten bleiben. Überbordender Bürokratismus und Administration bedrohen zwar nicht grundsätzlich die Freiheit, aber sie schränken sie in immer stärker werdendem Maße ein. Der Anteil, der von den für die Forschung bereitgestellten und eingeworbenen Ressourcen für aktivitätsferne Arbeiten verwendet werden muss, übersteigt mittlerweile jede vernünftige Dimension (BREM 2014).

Hat man erfolgreich Mittel eingeworben, geht unser Ärger weiter. So muss der Projektleiter beispielsweise auch bei selbst eingeworbenen Drittmitteln, die er ja ohnehin persönlich gegenüber dem Projektträger zu verantworten hat, trotzdem für jede Stellenausschreibung –

selbst für eine geringfügige Beschäftigung – nochmals eine Begründung gegenüber der Universität liefern. Und was ist von einer, der Forschung verpflichteten Universität zu halten, die die Erstattung der Kosten eines eingeladenen externen Wissenschaftlers mit der Begründung ablehnt, diese könne nicht gewährt werden, weil sie nur rein wissenschaftlichen Zwecken diene und nicht öffentlichkeitswirksam sei. An dieser Stelle auch noch einige persönliche Anmerkungen zu Schein und Sein der Beantragung und Abwicklung von Drittmittelprojekten. Eine überschlagende Kalkulation der Ressourcen, die für die von der Politik und dann den Universitäten so überaus massiv eingeforderte Drittmittelinwerbung verbraucht werden, führt zu einer desaströsen Bilanz.

Ich will versuchen, das mal kurz vorzurechnen: Für einen Projektantrag müssen – geschätzt – etwa 10 % der im Projekt beantragten Mittel vor und bei der Antragstellung an personellen und sonstigen Ressourcen aufgewendet werden. Da die derzeitigen Bewilligungsquoten, etwa beim FWF (Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung), der Europäischen Union (EU) oder anderen Projektträgern bei durchschnittlich 25 % oder weniger liegen, bedeutet das, dass mindestens vier Anträge geschrieben und eingereicht werden müssen, um ein Projekt bewilligt zu bekommen. Daraus folgt, dass ca. 40 % der beantragten Mittel bereits für Antragstellung und Einreichung verbraucht sind, wenn die Mittel für ein Projekt genehmigt werden.

Der Aufwand für die detaillierte Kostenabrechnung und deren Prüfung durch die Universität, die Erstellung der Zwischen- und Endberichte und die Schlussprüfung verbraucht auf universitärer Seite etwa 20 % der Projektmittel an eigenen Ressourcen. Auffallen mag, dass die Kontrolle der Mittelverwendung durch die Universität die Vorgaben der Projektträger, also der Geldgeber, häufig übersteigt. Zusätzlich sind für jedes Projekt etwa 25 % an Personalmitteln und nicht geförderten Ausgaben, z. B. Wartungsarbeiten, erforderlich, die aus den eigenen Ressourcen kommen müssen. Und dann werden von Universitäten von den eingeworbenen Mitteln bis zu 25 % zur Deckung der Gemeinkosten einbehalten. Der Gesamtaufwand für die erfolgreiche Beantragung und administrative Bearbeitung eines Drittmittelprojektes beträgt – bei Durchführung einer Vollkostenrechnung – 110 %! Wohlgemerkt, bis zu diesem Zeitpunkt wurde noch keine Chemikalie gekauft, noch kein Personal für das Projekt angestellt und deshalb auch noch kein Handgriff für die wissenschaftliche Bearbeitung des Projektes durchgeführt. Trotzdem sind schon mehr als 100 % der eingeworbenen Mittel verbraucht bzw. verplant.

Jeder, der diese Rechnung nun einigermaßen mitverfolgt hat, wird fragen, was das soll. Mit welchen Mitteln wird dann das Projekt bearbeitet? Na, mit den 75 %, die zwar entstanden sind, aber nicht aus Projektmitteln monetär beglichen werden müssen, weil sie aus universitären Ressourcen gedeckt wurden. In Summe folgt daraus, wenn die Universität ihren Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern verbieten würde, extern Projekte zu beantragen, könnte sie 10 % an Ressourcen sparen, ohne dass die Wissenschaftsleistung darunter leiden würde! Die 75 % der Ressourcen, die für die Projekte von der Universität bereitgestellt werden, könnten dann direkt in Forschung fließen und müssten nicht auf Umwegen erst verbraucht werden, um damit fremde Mittel einzuwerben.

Die Bilanz des gesamten Systems ist negativ! Dabei sind die Ressourcen, die für die globale Begutachtung aller eingereichten Projekte aufgewendet werden müssen, noch gar nicht mitberücksichtigt. Auch das Diktat der nie enden wollenden Evaluierungen und Akkreditierungen der Universitäten mittels quantifizierender Kriterien führt zu nutzloser Nützlichkeit und dient mehr der Legitimation als der Qualitätssicherung.

Eine sinnvolle Lösung wäre, wenn die Politik damit aufhören würde, Universitäten immer weiter und mit immer wieder neu aufgelegten Programmen in die Drittmittelinwerbung zu

drängen. Stattdessen soll sie diese Mittel, die ja vorhanden sind, denn sonst könnten sie für diese Programme nicht budgetiert werden, den Universitäten direkt zukommen lassen. Es würde also nicht einmal mehr kosten, den Universitäten eine auskömmliche und hinreichende Grundfinanzierung zukommen zu lassen, mit der sie ihren Aufgaben in Forschung und Lehre vernünftig nachkommen können.

Universitäten brauchen kluge Köpfe, die Neues erdenken, Hypothesen aufstellen und diese nach den Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis prüfen. Was sie nicht brauchen, sind Wissens- und Datenreproduzierer. Dafür gibt es Schulen. Universitäten sind auch nicht dazu da, allfällig beklagte Versäumnisse der Oberschulen und Gymnasien nachzuholen. Warum versuchen sie es trotzdem, indem sie der Lehre Strukturen aufdrängen, bei denen Lernen an die Stelle von Lehren tritt. Universitäten aber haben die Pflicht, ihren Studenten kombinatorisches, innovatives, deduktives und auch unkonventionelles Denken zu lehren. Wenn reine Wissensvermittlung an die Stelle der Bildung zur Wissenserarbeitung tritt, verfehlen Universitäten ihre Aufgabe in der forschungsgeleiteten Lehre! Wir Alten, die die Universität nicht ob ihres Scheins, sondern ob ihres Seins schätzen und lieben, haben die Verantwortung, die Universität für die Jungen als Bildungseinrichtung zu erhalten und weiterzuentwickeln. Wenn wir das nicht wollen oder nicht mehr können, müssen wir darüber nachdenken, uns in Würde zu verabschieden.

Der Begriff Universität ist abgeleitet aus dem Lateinischen *universitas magistrorum et scholarium*, also der Gemeinschaft der Lehrenden und Lernenden. Darin ist unser Auftrag enthalten, gemeinsam an der Zukunft der Universität und an der Universität der Zukunft zu arbeiten. Das kann nur in Gemeinschaft der Lehrenden und Lernenden gelingen.

In dieser Hoffnung beende ich meine Einleitung mit dem Wunsch: „Vivat, crescat, floreat universitas in aeternum!“

Literatur

- BREM, G.: 100 Jahre Tiermedizinische Fakultät an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Festveranstaltung „Blick zurück nach vorn“. Aula der LMU München, 16. 10. 2014 (2014)
- BUSCH, W.: Schein und Sein. Insel Bücherei Nr. 478. Leipzig: Insel-Verlag 1952
- GOETHE, J. W. VON: Berliner Ausgabe. Poetische Werke. Bd. 1–16. Berlin: Aufbau-Verlag 1960ff. (1960a)
- GOETHE, J. W. VON: Berliner Ausgabe. Kulturtheoretische Schriften und Übersetzungen. Bd. 17–22. Berlin: Aufbau-Verlag 1960ff. (1960b)
- SAINT-EXUPÉRY, A. DE: Der Kleine Prinz. 63. Aufl. Düsseldorf: Karl Rauch 2006
- TSCHERMAK, A. VON: Über die Bedeutung der Forschungsarbeit für die menschliche Kultur. Separatdruck. Österreichische Monatsschrift für Tierheilkunde 3 (1909)
- WESTHUES, M.: Festvortrag. 50 Jahre Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München. Sonderdruck Bayerisches Tierärzteblatt, 15. Jhg. Nr. 9 und 10 (1964)

Prof. DI. Dr. Dr. h. c. mult. Gottfried BREM
Institut für Tierzucht und Genetik
Veterinärmedizinische Universität Wien
Veterinärplatz 1
1210 Wien
Österreich
Tel.: +43 1 250775600
Fax: +43 1 250775690
E-Mail: gottfried.brem@vetmeduni.ac.at

I. Physikalische Grundlagen bildgebender Verfahren

Physikalische Grundlagen der nicht-invasiven Techniken wie Dualenergie-Röntgenabsorptiometrie und Magnetresonanztomographie zur *In-vivo*-Phänotypisierung

Armin M. SCHOLZ,¹ Goran KUŠEC² und Maren BERNAU¹

Zusammenfassung

Nicht-invasive Techniken wie beispielsweise Dualenergie-Röntgenabsorptiometrie (DXA) und Magnetresonanztomographie (MRT) basieren hauptsächlich auf der Entwicklung von elektronisch und Computer-gesteuerten Methoden um *in vivo* objektive phänotypische Daten zu liefern. Der Vorzug für eine spezifische Technik hängt von der Zieltierart ab – kombiniert mit technischen und praktischen Aspekten wie Genauigkeit, Wiederholbarkeit, Kosten, Beweglichkeit, Geschwindigkeit, Praktikabilität, Sicherheit sowie der Notwendigkeit von Fixierung oder/und Sedation. DXA beruht auf der gewebespezifischen Schwächung der ionisierenden Röntgenphotonen auf einem niedrigen und einem hohen Energieniveau und liefert phänotypische 2D-Daten zu Knochenmineralgehalt (g), Knochenmineraldichte (g/cm²), Fettgewebe (g) und Magerweichtgewebe (g). Die MRT beruht auf der Nettomagnetisierung von Protonen in einem magnetischen Feld. Die durch den Kernspin charakterisierten Protonen liefern zeitabhängige Signale (T1: Spin-Gitter-, T2: Spin-Spin-Interaktion) nach einer Energiezufuhr mittels Radiofrequenzwellen bei der Resonanz- bzw. Larmor-Frequenz der interessierenden Atomkerne im dreidimensionalen Koordinatensystem. Die resultierenden Spannungsausschläge dienen der Erzeugung einer Serie von 2D-Bildern, die letztendlich in einer 3D-Volumeninformation resultiert, die die Körperzusammensetzung, Organe oder Körpergewebe charakterisieren hilft. Im Vergleich der zwei Techniken ist MRT die genauere zur Ermittlung der Gewebe- bzw. Körperzusammensetzung und bietet mehr Einsatzmöglichkeiten, während DXA-Scans sofort phänotypische Ergebnisse liefern.

Abstract

Non-invasive techniques, like for example dual energy X-ray absorptiometry (DXA) and magnetic resonance imaging (MRI), are mainly based on the development of electronic and computer-driven methods in order to provide objective phenotypic data *in vivo*. The preference for a specific technique depends on the target animal species – combined with technical and practical aspects like accuracy, reliability, cost, portability, speed, ease of use, safety, and the need for fixation or sedation. DXA relies on tissue specific attenuations of ionizing X-ray photons at a low and a high energy level and provides phenotypic 2D data on bone mineral content (g), bone mineral density (g/cm²), fat tissue (g), and soft lean tissue (g). MRI is based on the net-magnetization of protons in a magnetic field. The spinning protons deliver time dependent signals (T1: spin – lattice, T2: spin – spin interaction) after an energy input by radio frequency waves at the resonance (Larmor) frequency of the nuclei in interest. The corresponding voltage readings can be used to create a series of 2D images finally resulting in 3D volume information for body composition, organs, or tissue related phenotypes. Comparing both techniques, MRI is the more accurate and flexible one, while DXA provides immediate phenotypic results, regarding tissue and body composition.

1 Ludwig-Maximilians-Universität München, Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim der Tierärztlichen Fakultät, Sankt-Hubertusstraße 12, 85764 Oberschleißheim; *a.s@lmu.de.

2 Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agriculture, Kralja Petra Svačića 1d, 31000 Osijek, Croatia.

1. Einleitung

Fortschritte in den Techniken zur nicht-invasiven Bestimmung der *In-vivo*-Körperzusammensetzung basieren in den meisten Fällen auf der Weiterentwicklung von elektronischen Bauteilen sowie der Soft- und Hardware zur Datenverarbeitung. Ziel ist eine Zeit und Arbeit sparende objektive Methodik zur exakten Phänotypisierung von potentiellen Zucht- und Versuchstieren bzw. „Patienten“ oder Zellkulturen. Die bevorzugte Verwendung einer spezifischen Technik richtet sich dabei nach dem Ziel der Messung, technischen und praktischen Aspekten (Genauigkeit, Wiederholbarkeit, Art der benötigten Information, Kosten, Mobilität, Notwendigkeit zur Fixierung bzw. Sedation, Mess- und Auswertungsgeschwindigkeit, Anwendungsrisiken, Tiergröße) (SCHOLZ und BAULAIN 2009, SCHOLZ et al. 2015).

Nachfolgend wird näher auf zwei potentielle nicht-invasive Techniken eingegangen, die regelmäßig im Rahmen von Versuchsanstellungen bzw. Leistungsprüfungen eingesetzt werden.

2. Nicht-invasive Techniken

2.1 Dualenergie-Röntgenabsorptiometrie

Die Dualenergie-Röntgenabsorptiometrie ist im Vergleich zur eher bekannten Röntgen-Computertomographie ein zweidimensionales Durchstrahlungsverfahren, welches auf der Verwendung von zwei verschiedenen Energieniveaus der (absorbierten) Röntgenphotonen basiert (SCHOLZ und BAULAIN 2009, SCHOLZ et al. 2013). Neuere Röntgen-Computertomographen verwenden zum Teil ebenfalls unterschiedliche Röntgenspektren und werden als Dualenergie-Röntgen-Computertomographen (DECT) genutzt (SCHOLZ et al. 2015).

Röntgenstrahlen werden durch chemische Elemente mit unterschiedlicher Ordnungszahl unterschiedlich stark geschwächt. Beruhend auf den Masseschwächungskoeffizienten (μ in cm^2/g) bedingt eine hohe Ordnungszahl eine stärkere Schwächung bzw. Absorption als eine niedrige Ordnungszahl. Knochenmineral (Ca, P) schwächt die Röntgenstrahlung stärker als Weichgewebe, welches zu großen Anteilen aus Wasser (H, O) und Proteinen (N, C, H, O) oder Lipiden (C, H, O) besteht (Abb. 1).

Aus dem Verhältnis der gemessenen Röntgenphotonenintensitäten für das hohe und das niedrige Energieniveau wird ein Röntgenschwächungskoeffizient (R) berechnet, der eine eindeutige Differenzierung von Knochen- und Weichgewebe zulässt. In der Abbildung 2 sind repräsentative Werte für zwei Beispielenenergieniveaus aufgeführt. Für Bildpunkte (PIXEL), die nur Weichgewebe enthalten, wird zur Ermittlung der Fettgewebe- und Nichtfettgewebeanteile die lineare Beziehung zwischen Röntgenschwächungskoeffizient und prozentualem Fettanteil der Weichgewebepunkte genutzt (Abb. 3). Für die Bildpunkte, die Knochenmineral enthalten, erfolgt die Berechnung der Weichgewebezusammensetzung in Abhängigkeit von der benachbarten knochenmineralfreien Weichgewebezusammensetzung. Als Ergebnis eines Ganzkörper- oder regionaler Scans werden Werte für den Knochenmineralgehalt (BMC, g), die Knochenmineraldichte (BMD, g/cm^2), Fettgewebemasse (g) und die Magerweichgewebemasse (g) ausgegeben.

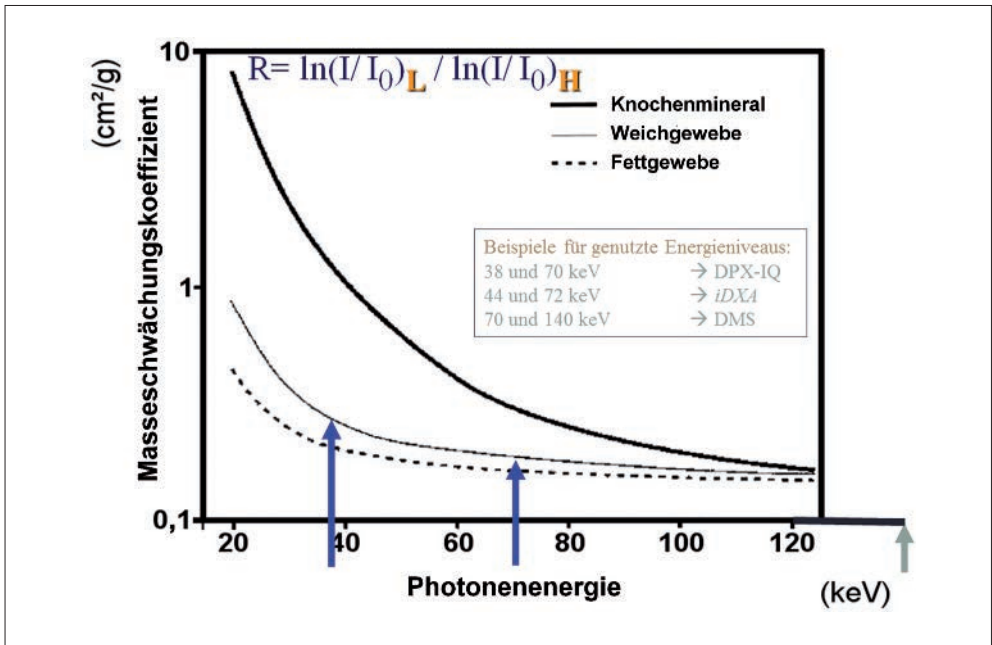


Abb. 1 Massenschwächungskoeffizienten in Abhängigkeit von der Röntgenphotonen-Energie (I = Photonenintensität; I_0 = vor Absorption; L = niedrig, H = hoch; R = Dualenergie-Röntgenschwächungskoeffizient). Die Pfeile markieren gebräuchliche Energieniveaus.

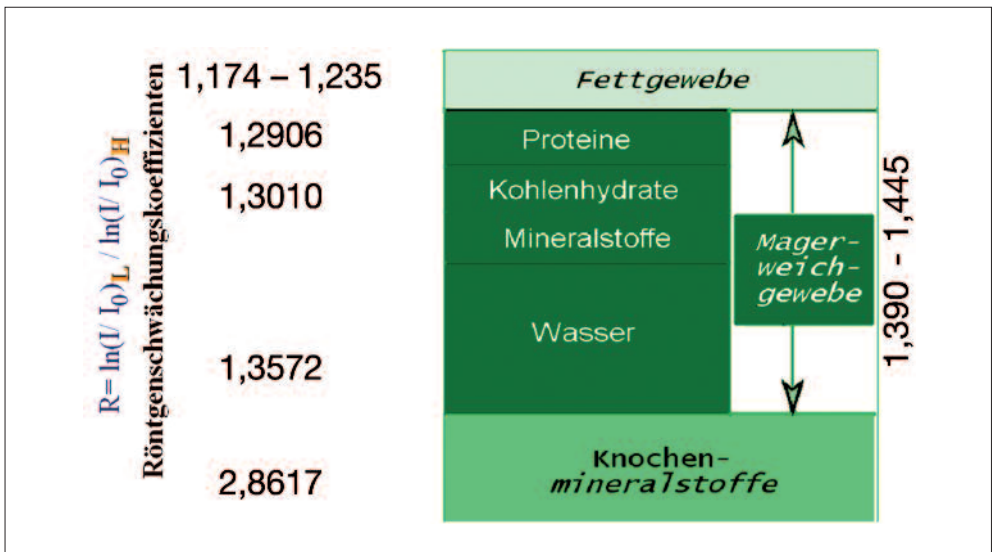


Abb. 2 DXA-3-Komponenten-Modell der Körperzusammensetzung und korrespondierende Röntgenschwächungskoeffizienten (R) für Energieniveaus bei 38 und 70 keV (Werte nach PIETROBELLI et al. 1996, WANG et al. 2010).

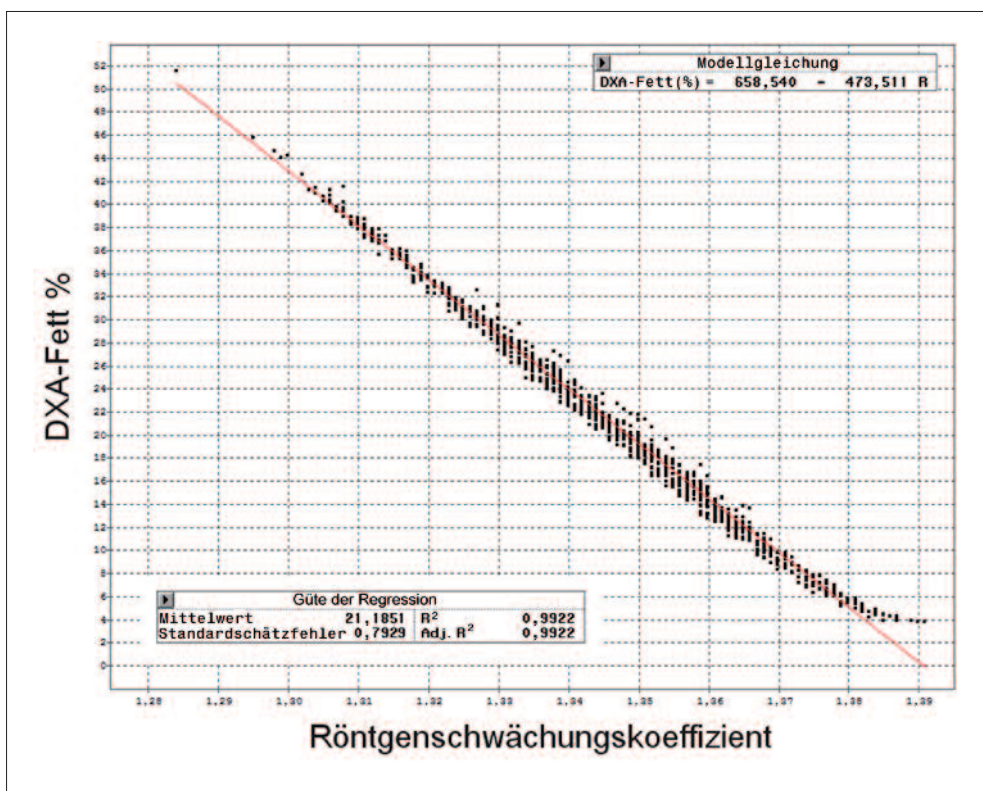


Abb. 3 Beziehung zwischen Röntgenschwächungskoeffizient und DXA-Fettgehalt (% *in vivo*), $n = 1103$ (GE Lunar DPX-IQ).

2.2 Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie arbeitet im Gegensatz zu DXA und CT ohne Röntgenstrahlung. Atomkerne mit einer ungeraden Protonen- und Neutronenzahl besitzen einen sogenannten Spin bzw. Eigendrehimpuls und verhalten sich ähnlich wie ein Stabmagnet. Werden diese Atomkerne (im einfachsten Fall Wasserstoffkerne oder Protonen) oder Objekte mit derartigen Atomkernen einem festen Magnetfeld ausgesetzt, richten sie sich entlang der Feldlinien in paralleler und antiparalleler Richtung aus. Bei einer Magnetfeldstärke von 1 Tesla überwiegen die parallel ausgerichteten Atomkerne im Vergleich zu den antiparallel ausgerichteten um 6 ppm. Die Magnetfeldstärke (B) gibt die zu nutzende Radiofrequenz vor (Tab. 1), da sich die Resonanzfrequenz (Präzessionswinkelgeschwindigkeit), mit der die Atomkerne angeregt werden können, vom sogenannten gyromagnetischen Verhältnis (γ , MHz/Tesla) ableiten lässt und als Larmorfrequenz ($\omega = \gamma B$) bezeichnet wird.

Die zusätzliche Energiezufuhr in Form eines Radio-Hochfrequenzimpulses kippt die Atomkerne aus der vorgegebenen Richtung des festen Magnetfeldes B_0 (z-Achse) bzw. im dreidimensionalen Raum in xy-Richtung. Nach dem Abschalten des Hochfrequenzimpulses geben die angeregten Atomkerne ihre aufgenommene Energie wieder ab, die als elektromagnetische Spannung gemessen werden kann. Die Zeit bis zum Erreichen des Ursprungszustandes (zum Zeitpunkt

Tab. 1 Elektromagnetische Eigenschaften verschiedener Isotope

Isotop	Spin	Resonanzfrequenz bei 4,7 T MHz	Natürliche Häufigkeit %	Relative Sensitivität %
^1H	1/2	200,11*	99,98	100
^2H	1	30,72	0,01	0,96
^3H	1/2	213,45	–	121,36
^{12}C	0	–	98,89	0
^{13}C	1/2	50,33	1,11	1,59
^{31}P	1/2	80	100	6,63

*63,87 MHz bei 1,5 T und 8,24 MHz bei 0,2 T.

des Anlegens des festen Magnetfeldes B_0) hängt zum einen von der Wechselwirkung der Atomkerne (Protonen) untereinander ab und wird als Spin-Spin-Wechselwirkung (xy-Ebene) bzw. Querrelaxationszeit (T_2) bezeichnet. Gleichzeitig gibt es eine sogenannte Längsrelaxation (T_1), die auf der Spin-Gitter-Wechselwirkung (in z-Richtung bzw. Richtung des festen Magnetfeldes), also z. B. der Wechselwirkung von Wasserstoffkernen und Kohlenstoff- oder Stickstoff- bzw. Sauerstoffkernen, beruht. Die Relaxationszeiten T_1 und T_2 sind gewebespezifisch unterschiedlich lang und werden neben der Protonendichte für die Differenzierung von Geweben genutzt (WEISHAUPT et al. 2014). Über unterschiedliche Zeitintervalle zur Anregung der Atomkerne, die als Zeit zwischen den Anregungen durch Radiofrequenzimpulse (Repetition Time = TR) und Zeit zwischen den Echos (Zeit zwischen den Maxima des Signalempfangs während des freien Induktionsabfalls = Echo Time = TE) zu betrachten ist, kann eine Wichtung der Schichtbilder in Bezug auf T_1 (Längsrelaxation), T_2 (Querrelaxation) bzw. Protonendichte vorgenommen werden (TR kurz < 1500 ms und TE kurz < 30 ms = T_1 -Wichtung, TR lang > 1500 ms und TE lang > 80 ms = T_2 -Wichtung, TR lang und TE kurz = Protonendichtewichtung). Das nachfolgende Beispiel (Abb. 4) verdeutlicht die Signalintensitätsunterschiede in einem T_1 - und einem T_2 -gewichteten coronaren Schichtbild eines Schweinenackens (inklusive Teil des Kopfes und der Schulterregion) *in vivo*.



Abb. 4 Vergleich der Signalintensitäten von T_1 - und T_2 -gewichteten Schichtbildern

Um einzelne Atomkerne oder „Atomkerncluster“ in einem Objekt (Gruppe von VOXEL) exakt einer Position zuordnen zu können, werden zusätzliche Gradientenspulen (weitere lokale Magnetfelder) eingesetzt, die im dreidimensionalen Raum mit den Koordinaten x , y , z die Protonen unterschiedlich schnell beschleunigen bzw. phasenverschieden in die Präzessionsbewegung versetzen, so dass nach einer Fourieranalyse ein bzw. mehrere Schichtbilder (in z -Richtung) mit örtlich (in xy -Richtung) aufgelösten Signalintensitäten entstehen (Abb. 5, WEISHAUPT et al. 2014).

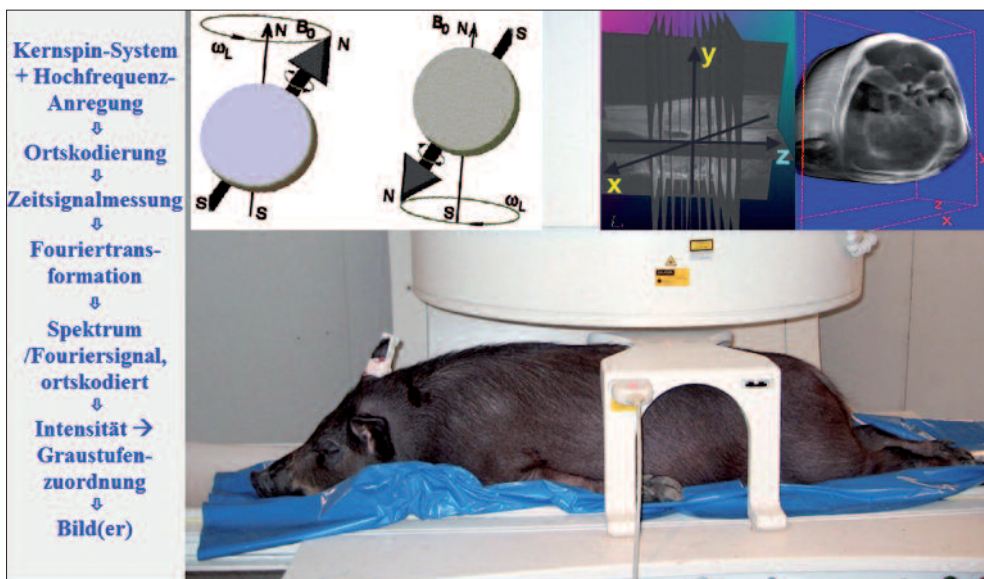


Abb. 5 Prinzip der Magnetresonanztomographie

In einer T_1 -gewichteten Sequenz erscheinen *in vivo* die Voxel (bzw. PIXEL), die hauptsächlich aus Fett bestehen, hell und die Voxel, die hauptsächlich aus Protein und Wasser bestehen, dunkel. Im Gegensatz zur Röntgen-Computertomographie, wo die sogenannten Hounsfield-Einheiten zur Klassifizierung von Geweben herangezogen werden können, gibt es in der Magnetresonanztomographie keine standardisierten Signalintensitäten zur gewebespezifischen Segmentierung der Schichtbilder (KREMER et al. 2012, 2013, BERNAU et al. 2013, 2015, SCHOLZ et al. 2015).

Der Einsatz verschiedener Sequenzwichtungen (T_1 - oder T_2 -gewichtete Sequenzen) ermöglicht die Anwendung der MRT bei muskuloskeletalen Fragestellungen. Veränderungen in Bezug auf die Signalintensitäten lassen auf verschiedene pathologische Zustände schließen (MAY et al. 2000, SCHRANK et al. 2005, LOVITT et al. 2006). So können Signalanhebungen in T_1 -gewichteten MRT-Bildern auf Fettinfiltration, entzündliche Prozesse oder Hämatome hinweisen (MAY et al. 2000, SCHRANK et al. 2005), wohingegen Signalanhebungen in T_2 -gewichteten MRT-Bildern auf Ödeme oder Fettinfiltrationen zurückgeführt werden können (SHELLOCK et al. 1996, SCHRANK et al. 2005). In der Humanmedizin wird die MRT u. a. für die Diagnostik und für Folgeuntersuchungen bei muskuloskeletalen Erkrankungen eingesetzt (MESSINEO et al. 1998, LOVITT et al. 2006). Im Bereich der tiermedizinischen Forschung kann die MRT erfolgreich eingesetzt werden, um zum Beispiel Arzneimittel im Tierkörper zu verfolgen (RUDIN 1994, RUDIN et al. 1995, BREWER et al. 2014, BERNAU et al. 2015).

2.3 Vor- und Nachteile von DXA bzw. MRT

Die zwei Techniken besitzen erwartungsgemäß unterschiedliche Vorzüge für die *In-vivo*-Phänotypisierung.

Speziell in Wiederkäuern beeinflusst der (sich entwickelnde) Pansen die DXA-Messergebnisse *in vivo* in erheblichem Maße (Tab. 2). Trotz dieser Einschränkungen lässt sich der aus dem DXA-Magerweichgewebe abgeleitete Proteinansatz bereits bei jungen wachsenden Tieren (Kälbern) mit hoher Genauigkeit ermitteln (Abb. 6).

Tab. 2 Beziehung zwischen grobgeweblicher Zerlegung und DXA-Körperzusammensetzung *in vivo* (Ganzkörper-DXA; GE Lunar DPX-IQ)

Zerlegung versus DXA	Schwein (n = 61)	Lamm (n = 93)	Kalb (n = 30)
R^2 ($\sqrt{\text{MSE}}$)			
Fett (%)	0,74 (1,72)	0,51 (2,22)	0,003 (1,06)
Fett (g)	0,89 (969)	0,71 (229)	0,42 (228)
Fleisch (%) / Mager (%)	0,65 (2,08)	0,50 (1,88)	0,09 (2,72)
Fleisch (g) / Mager (g)	0,82 (2377)	0,57 (369)	0,94 (617)

(modifiziert aus SCHOLZ et al. 2013)

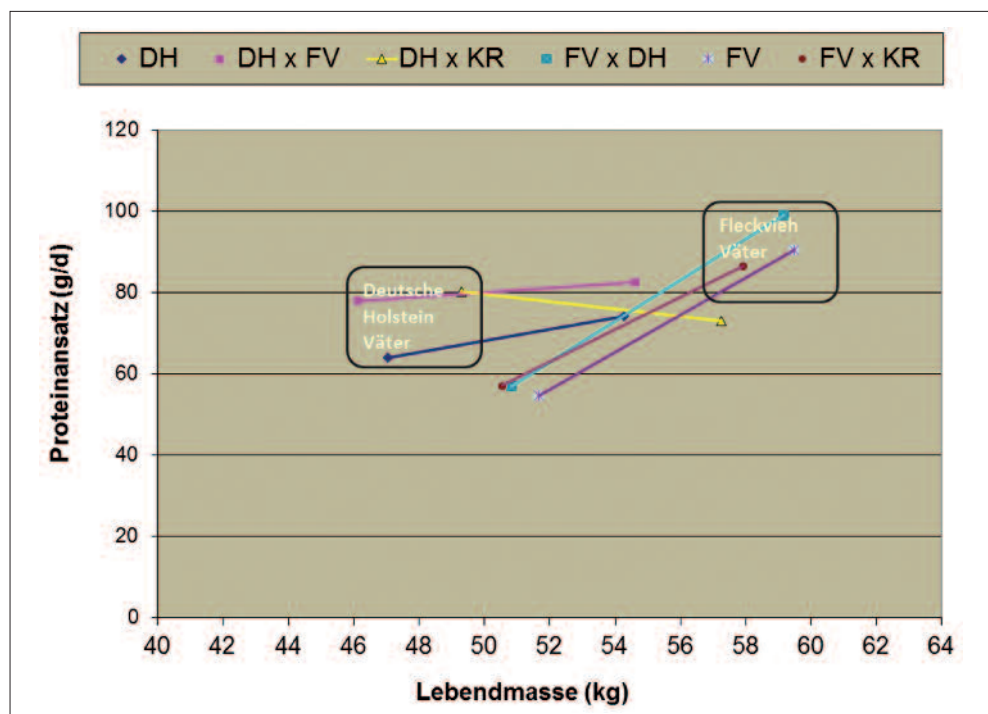


Abb. 6 DXA-Proteinansatz von Kälbern unterschiedlicher genetischer Herkunft im Zeitraum zwischen 5 und 26 bzw. zwischen 26 und 47 Lebenstagen (DH = Deutsche Holstein, FV = Fleckvieh, KR = Kreuzung aus FV und DH). Daten von HAMPE et al. 2005

Im Vergleich zu DXA kann die Magnetresonanztomographie eine höhere Vorhersagegenauigkeit für die Körperzusammensetzung landwirtschaftlicher Nutztiere erzielen (Tab. 3), wobei der Aufwand für die zwei- oder dreidimensionale Bilddatenauswertung aus der MRT sehr viel höher ist als für DXA (Tab. 4).

Tab. 3 Vergleich der Vorhersagegenauigkeit von DXA und MRT *in vivo* (Referenz: Muskelfleischanteil aus Zerlegung – Schwein)

Methode	Referenzgewebe %	In-vivo-Genauigkeit (allein beim Schwein)		Scandauer Ganzkörper Minuten	Strahlungs- exposition mrem
		R ²	√MSE		
MRT	Muskelfleisch	<0,87	>1,20	15–30	–
DXA	Muskelfleisch	<0,72	>1,75	7–25	0,03–0,06

(modifiziert aus SCHOLZ et al. 2013)

Tab. 4 Vor- und Nachteile von Magnetresonanztomographie und Dualenergie-Röntgenabsorptiometrie

	Vorteile	Nachteile
Magnetresonanztomographie	– sehr gute Weichgewebedifferenzierung – multiplanare Darstellung (3D) – funktionelle Bildgebung – keine Strahlenbelastung	– hoher technischer Aufwand – relativ hohe Investitionskosten – eingeschränkte Verfügbarkeit – aufwendige Bildauswertung – Dichte von Fett-, Muskelgewebe sowie Organen variabel
Dualenergie-Röntgenabsorptiometrie	– relativ leicht verfügbar – relativ kostengünstig – schnelle Datenverfügbarkeit – Analyse einfach	– nicht leicht portabel – Ergebnisse nicht unmittelbar zwischen verschiedenen Geräten vergleichbar (geringe Strahlenbelastung)

2.4 Weitere Anwendungen der Kernspinresonanz und von DXA

Neben der Bildgebung lässt sich die Kernspinresonanz (NMR) ebenfalls hervorragend für spektroskopische Analysen u. a. des Muskelstoffwechsels unter Anregung der ³¹P- oder ¹³C-Isotope verwenden (SCHOLZ et al. 1995, 2003, BAULAIN und HENNING 2001). Eine relativ neue Methode ist die quantitative magnetische Resonanz (QMR), die ebenfalls die elektromagnetischen Eigenschaften von Wasserstoffkernen zur Ermittlung der totalen Körperzusammensetzung (Fettmasse, Magermasse) nutzt. Die QMR kommt ohne Bildgebung aus, gestattet daher aber auch keine regionalen Analysen. Im Nutztierbereich wurde diese Methodik bislang nur an relativ kleinen Probanden eingesetzt (Huhn: MITCHELL et al. 2011, Ferkel: MITCHELL et al. 2012), während ZANGHI et al. (2013) die QMR neben DXA auch beim Beagle testeten. Sowohl DXA (SCHOLZ und MITCHELL 2003, HAMPE et al. 2005, ROSEBROUGH und MITCHELL 2007, MITCHELL und SCHOLZ 2008, DOBENECKER et al. 2009) als auch MRT (MITCHELL et al. 2001, KUŠEC et al. 2007, 2008, MARGETA et al. 2007, CONRAD et al. 2011) lassen sich sehr gut im Rahmen von u. a. genetisch begründeten Wachstums- bzw. Effizienzstudien nutzen, um die Zu- bzw. Abnahmen oder Wachstumsraten einzelner Organe (allein MRT) oder von Gewebesystemen bzw. indirekt von chemischen Komponenten des Körpers ermitteln zu können. Eine serielle Schlachtung bzw. Euthanasie von Tieren ist nicht mehr nötig (MITCHELL 2007,

SIMEONOVA et al. 2012). Aufgrund der einfachen Datenauswertung und der schnellen Datenverfügbarkeit ist DXA sehr gut für die Phänotypisierung im Rahmen von genomweiten Assoziationsanalysen beim Nutz- bzw. Modelltier geeignet (Geflügel: RUBIN et al. 2007, Schwein: KOGELMAN et al. 2013, ROTHAMMER et al. 2014), während sich die Anwendung der MRT in Bezug auf genomweite Assoziationsanalysen bislang neben dem Menschen z. B. auf den Haushund (GERBER et al. 2015) begrenzt. DXA ist prädestiniert für Studien, die insbesondere den Knochenmineralgehalt bzw. die Knochenmineraldichte (RUBIN et al. 2007, KOGELMAN et al. 2013, ROTHAMMER et al. 2014) sowie den Körperfett- bzw. -magerweichgewebegehalt (KOGELMAN et al. 2013, ROTHAMMER et al. 2014) als Phänotyp zum Ziel haben, während die MRT einen großen Vorteil in der Untersuchung von Phänotypen hat, die z. B. die Gehirnentwicklung (CONRAD et al. 2012, GERBER et al. 2015) oder Veränderungen von Fett- und Muskelgeweben (BERNAU et al. 2015) beinhaltet.

Jüngere biomolekulare Untersuchungen mittels NMR versuchen zudem den bislang „dunklen“ Zustand bzw. Prozesse von lebenden Zellen und damit neue Phänotypen sichtbar zu machen (ANTHIS und CLORE 2015).

3. Schlussfolgerungen

Die Kombination von exakten, nicht-invasiv gewonnenen phänotypischen Daten aus DXA und MRT mit genomweiten Informationen (z. B. SNP's, Mikrosatelliten, Kandidatengenen) ermöglicht einen erheblichen Wissenszuwachs und tiefere Einsichten in biologische Prozesse, die u. a. das Wachstum und die Veränderung der Körperzusammensetzung von Mensch und Tier steuern. Insbesondere phänotypische Merkmale, die nur mit hohem technischen Aufwand am lebenden Individuum zu messen sind, werden einen Zusatznutzen für die genomische Selektion und Informationsgewinnung erzeugen (HAYES et al. 2013).

Literatur

- ANTHIS, N. J., and CLORE, G. M.: Visualizing transient dark states by NMR spectroscopy. *Quart. Rev. Biophys.* **48**, 35–116 (2015)
- BAULAIN, U., und HENNING, M.: Untersuchungen zur Schlachtkörper- und Fleischqualität mit Hilfe von MR-Tomographie und MR-Spektroskopie. *Arch. Tierz. (Dummerstorf)* **44**, 181–192 (2001)
- BERNAU, M., KREMER, P. V., und SCHOLZ, A. M.: Vergleich der Körperzusammensetzung von Schweinen bei 80 kg und 100 kg Lebendmasse mittels Magnetresonanztomographie. *Züchtungskde.* **85**, 430–439 (2013)
- BERNAU, M., KREMER, P. V., PAPPENBERGER, E., KREUZER, L. S., CUSSLER, K., HOFFMANN, A., and SCHOLZ, A. M.: Safety testing of veterinary vaccines using magnetic resonance imaging in pigs. *Altex* **32**, 51–58 (2015)
- BREWER, K. D., LAKE, K., PELOT, N., STANFORD, M. M., DEBAY, D. R., PENWELL, A., WEIR, G. M., KARKADA, M., MANSOUR, M., and BOWEN, C. V.: Clearance of depot vaccine SPIO-labeled antigen and substrate visualized using MRI. *Vaccine* **32**, 6956–6962 (2014)
- CONRAD, M. S., DILGER, R. N., NICKOLLS, A., and JOHNSON, R. W.: Magnetic resonance imaging of the neonatal piglet brain. *Pediatr. Res.* **71**, 179–184 (2012)
- DOBENECKER, B., BOCK, M. DE, ENGELN, M., GOOSSENS, L., SCHOLZ, A., and KIENZLE, E.: Effect of mitratapide on body composition, body measurements and glucose tolerance in obese Beagles. *Vet. Res. Commun.* **33**, 839–847 (2009)
- GERBER, M., FISCHER, A., JAGANNATHAN, V., DRÖGEMÜLLER, M., DRÖGEMÜLLER, C., SCHMIDT, M. J., BERNARDINO, F., MANZ, E., MATIASSEK, K., RENTMEISTER, K., and LEEB, T.: A deletion in the VLDLR gene in Eurasier dogs with cerebellar hypoplasia resembling a Dandy-Walker-like malformation (DWLM). *PLOS ONE* **10/2**, e0108917, doi:10.1371/journal.pone.0108917 (2015)

- HAMPE, J., NÜSKE, S., SCHOLZ, A. M., und FÖRSTER, M.: Untersuchungen zur Körperzusammensetzung und zum Wachstum von Kälbern unterschiedlicher genetischer Herkunft mittels Dualenergie-Röntgenabsorptiometrie (DXA). *Arch. Tierz. (Dummerstorf)* 48, 428–444 (2005)
- HAYES, B. J., LEWIN, H. A., and GODDARD, M. E.: The future of livestock breeding: genomic selection for efficiency, reduced emissions intensity, and adaptation. *Trends Genet.* 29, 206–214 (2013)
- KOGELMAN, L. J. A., KADARMIDEEN, H. N., MARK, T., KARLSKOV-MORTENSEN, P., BRUUN, C. S., CIRERA, S., JACOBSEN, M. J., JØRGENSEN, C. B., and FREDHOLM, M.: An F2 pig resource population as a model for genetic studies of obesity and obesity-related diseases in humans: design and genetic parameters. *Front. Genet. Livest. Genom.* 4, 1–14 (2013)
- KREMER, P. V., FERNÁNDEZ FIGARES, I., FÖRSTER, M., and SCHOLZ, A. M.: In vivo body composition in autochthonous and conventional pig breeding groups by dual energy X-ray absorptiometry and magnetic resonance imaging under special consideration of Cerdo Ibérico. *Animal* 6, 2041–2047 (2012)
- KREMER, P. V., FÖRSTER, M., and SCHOLZ, A. M.: Use of magnetic resonance imaging (MRI) to predict the body composition of pigs *in vivo*. *Animal* 7, 879–884 (2013)
- KUŠEC, G., BAULAIN, U., KALLWEIT, E., and GLODEK, P.: Influence of MHS genotype and feeding regime on allometric and temporal growth of pigs assessed by magnetic resonance imaging. *Livest. Sci.* 110, 89–100 (2007)
- KUŠEC, G., DJURKIN, I., KRALIK, G., BAULAIN, U., and KALLWEIT, E.: Allometric vs. dynamic models in the investigation of pig growth. *MESO X/6*, 459–464 (2008)
- LOVITT, S., MOORE, S. L., and MARDEN, F. A.: The use of MRI in the evaluation of myopathy. *Clin. Neurophys.* 117, 486–495 (2006)
- MARGETA, V., KRALIK, G., KUŠEC, G., and BAULAIN, U.: Lean and fat development in the whole body and hams of hybrid pigs studied by magnetic resonance tomography. *Czech J. Anim. Sci.* 52, 130–137 (2007)
- MAY, D. A., DISLER, D. G., JONES, E. A., BALKISSOON, A. A., and MANASTER, B. J.: Abnormal signal intensity in skeletal muscle at MR imaging: Patterns, pearls, and pitfalls. *RadioGraph.* 20, 295–315 (2000)
- MESSINEO, D., CREMONA, A., TRINCI, M., FRANCA, A., and MARINI, A.: MRI in the study of distal primary myopathies and of muscular alterations due to peripheral neuropathies: possible diagnostic capacities of MR equipment with low intensity field (0.2 T) dedicated to peripheral limbs. *Magn. Res. Imag.* 16, 731–741 (1998)
- MITCHELL, A. D.: Impact of research with cattle, pigs, and sheep on nutritional concepts: Body composition and growth. *J. Nutr.* 137, 711–714 (2007)
- MITCHELL, A. D., RAMSAY, T. G., and SCHOLZ, A. M.: Measurement of changes in body composition of piglets from birth to 4 kg using quantitative magnetic resonance (QMR). *Arch. Tierz. (Dummerstorf)* 55, 64–71 (2012)
- MITCHELL, A. D., ROSEBROUGH, R. W., TAICHER, G. Z., and KOVNER, I.: In vivo measurement of body composition of chickens using quantitative magnetic resonance. *Poult. Sci.* 90, 1712–1719 (2011)
- MITCHELL, A. D., and SCHOLZ, A. M.: Efficiency of energy and protein deposition in swine measured by dual energy X-ray absorptiometry (DXA). *Arch. Tierz. (Dummerstorf)* 51, 159–171 (2008)
- MITCHELL, A. D., SCHOLZ, A. M., WANG, P. C., and SONG, H.: Body composition analysis of the pig by magnetic resonance imaging. *J. Anim. Sci.* 79, 1800–1813 (2001)
- PIETROBELLI, A., FORMICA, C., WANG, Z., and HEYMSFIELD, S. B.: Dual-energy X-ray absorptiometry body composition model: review of physical concepts. *Amer. J. Physiol.* 271, E941–E951 (1996)
- ROSEBROUGH, R. W., and MITCHELL, A. D.: Growth characteristics of the Ross 708 broiler chicken. *GDA* 70, 3–12 (2007)
- ROTHAMMER, S., KREMER, P. V., BERNAU, M., FERNANDEZ-FIGARES, I., PFISTER-SCHÄR, J., MEDUGORAC, I., and SCHOLZ, A. M.: Genome-wide QTL-mapping of nine body composition and bone mineral density traits in pigs. *Gen. Sel. Evol.* 46, 68 (2014)
- RUBIN, C.-J., BRÄNDSTRÖM, H., WRIGHT, D., KERJE, S., GUNNARSSON, U., SCHUTZ, K., FREDRIKSSON, R., JENSEN, P., ANDERSSON, L., OHLSSON, C., MALLMIN, H., LARSSON, S., and KINDMARK, A.: Quantitative trait loci for BMD and bone strength in an intercross between domestic and wildtype chickens. *J. Bone Miner. Res.* 22, 375–384 (2007)
- RUDIN, M.: In vivo magnetic resonance imaging and spectroscopy in pharmacological research: applications to drug development and profiling. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2, 50–52 (1994)
- RUDIN, M., BECKMANN, N., MIR, A., and SAUTER, A.: In vivo magnetic resonance imaging and spectroscopy in pharmacological research: assessment of morphological, physiological and metabolic effects of drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* 3, 255–264 (1995)
- SCHOLZ, A. M., und BAULAIN, U.: Methoden zur Bestimmung der Körperzusammensetzung am lebenden Nutztier. *Züchtungskde.* 81, 86–96 (2009)
- SCHOLZ, A. M., and MITCHELL, A. D.: Protein, fat, and bone mineral deposition rates in growing pigs (birth to 90 kg) of different RyR1 genotypes studied by dual energy x-ray absorptiometry. In: SOUFFRANT, W. B., and METGES, C. C. (Eds.): *Progress in Research on Energy and Protein Metabolism. EAAP Scient. Ser.* 109, 543–547 (2003)

- SCHOLZ, A. M., BUNGER, L., KONGSRO, J., BAULAIN, U., and MITCHELL, A. D.: Non-invasive methods for the determination of body and carcass composition in livestock – Dual energy X-ray absorptiometry, computed tomography, magnetic resonance imaging, and ultrasound – a review. *Animal* 9, 1250–1264 (2015)
- SCHOLZ, A. M., KREMER, P. V., WENCZEL, R., PAPPENBERGER, E., and BERNAU, M.: Body composition in farm animals by dual energy X-ray absorptiometry. In: MALTIN, C., CRAIGIE, C., and BUNGER, L. (Eds.): *FARM ANIMAL IMAGING* Dublin 2012; pp. 9–15. Ingliston: QMS 2013
- SCHOLZ, A. M., MITCHELL, A. D., SONG, H. F., and WANG, P. C.: ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy – a non-invasive *in vivo* method to measure muscle glycogen metabolism in pigs of different genotypes. *Arch. Tierz. (Dummerstorf)* 46, 199–211 (2003)
- SCHOLZ, A. M., MITCHELL, A. D., WANG, P. C., SONG, H., and YAN, Z.: Muscle metabolism and body composition of pigs with different ryanodine receptor genotypes studied by means of ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy and ^1H magnetic resonance imaging. *Arch. Tierz. (Dummerstorf)* 38, 539–552 (1995)
- SCHRANK, B., URBAN, P., und LÖRCHER, U.: Der Einsatz der Magnetresonanztomographie der Muskulatur bei der Diagnose neuromuskulärer Erkrankungen. *Klin. Neuroradiol.* 15, 241–255 (2005)
- SHELLOCK, F. G., TYSON, L. L., and FLECKENSTEIN, J. L.: Diagnostic imaging of skeletal muscle exercise physiology and pathophysiology. In: FLECKENSTEIN, J. L., CRUES, J. V., and REIMERS, C. D. (Eds.): *Muscle Imaging in Health and Disease*; pp. 113–132. New York: Springer 1996
- SIMEONOVA, M. L., TODOROV, N. A., and SCHINCKEL, A. P.: Review of *in vivo*-methods for quantitative measurement of protein deposition rate in animals with emphasize on swine. *Bulg. J. Agric. Sci.* 18, 455–481 (2012)
- WANG, Z. M., HEYMSFIELD, S. B., CHEN, Z., ZHU, S., and PIERSON, R. N.: Estimation of percentage body fat by dual-energy x-ray absorptiometry: evaluation by *in vivo* human elemental composition. *Phys. Med. Biol.* 55, 2619–2635 (2010)
- WEISHAUP, D., KÖCHLI, V. D., und MARINCEK, B.: Wie funktioniert MRI? 7. Aufl., doi: 10.1007/978-3-642-41616-3_1. Berlin, Heidelberg: Springer 2014
- ZANGHI, B. M., CUPP, C. J., PAN, Y., TISSOT-FAVRE, D. G., MILGRAM, N. W., NAGY, T. R., and DOBSON, H.: Noninvasive measurements of body composition and body water via quantitative magnetic resonance, deuterium water, and dual-energy x-ray absorptiometry in awake and sedated dogs. *Amer. J. Vet. Res.* 74, 733–743 (2013)

Prof. Dr. Armin M. SCHOLZ
Ludwig-Maximilians-Universität München
Tierärztliche Fakultät
Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim
St. Hubertusstraße 12
85764 Oberschleißheim
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 89 218076042
Fax: +49 89 218076041
E-Mail: Armin.Scholz@lvg.vetmed.uni-muenchen.de

Erbfehler und Erbkrankheiten – „Erbsünden“ ohne Sündenfall?

Gemeinsames Symposium der
Österreichischen Akademie der Wissenschaften (ÖAW) und der
Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina – Nationale Akademie der
Wissenschaften
am 21. und 22. März 2013 in Wien

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 119, Nr. 402
Herausgegeben von Gottfried BREM (Wien)
(2015, 180 Seiten, 32 Abbildungen, 14 Tabellen, 22,95 Euro,
ISBN: 978-3-8047-3414-2)

Tierzucht und Tiermedizin haben sich in über zehn Jahrtausenden parallel entwickelt. Ohne die eine gäbe es die andere nicht. Hinweise auf Erbfehler bei Tieren finden sich erst relativ spät. Dagegen spiegelte sich im Humanbereich die Erbfehlerproblematik bereits viel früher wider und führte zur umstrittenen Eugenik. Seit einigen Jahrzehnten beobachten wir in der Tiermedizin eine deutliche Verlagerung der Schwerpunkte. Der Trend geht im Nutztierbereich von der Einzeltiertherapie hin zur Herden- und Bestandsbetreuung, und in der Kleintier- und Pferdemedizin entwickeln sich bei der medizinischen Versorgung Standards, die sich an therapeutischen Möglichkeiten der Humanmedizin orientieren. Es scheint, dass Nutztiere im tierärztlichen Wirken in den Hintergrund geraten, wenn die Kleintiermedizin in den Vordergrund rückt. Die Diagnose von Erbfehlern bei Nutztieren und deren Bekämpfung sowie Bestrebungen zur genetisch züchterischen Optimierung von Krankheitsdispositionen müssen sich gegen diesen Trend behaupten. Daher zeigt der Band aktuelle Entwicklungen in diesem Bereich von Tierzucht und Tiermedizin auf, die von der vollständigen Sequenzierung von Nutztiergenomen über die physiologische Analyse der Wirkungen von Erbschäden bis zu Krankheitsmodellen für die Humanmedizin reichen.

Eignung der Magnetresonanztomographie zur Schätzung der Schlachtleistung von Merino-Lämmern *in vivo*

Prisca V. KREMER-RÜCKER,^{1,2} Maren BERNAU,¹ Christian MENDEL,³
Albert STEINER,³ Esther GRUBER¹ und Armin M. SCHOLZ¹

Zusammenfassung

Um den Verbraucherwünschen nach qualitativ hochwertigem Lammfleisch gerecht werden zu können, müssen die Schafzüchter ihre Zuchtziele und Leistungsprüfungsmethoden zur Phänotypisierung entsprechend anpassen.

Unter diesem Blickwinkel wurden insgesamt 111 männliche Merino-Lämmer (Durchschnittsalter 113 Tage, Durchschnittsgewicht 43,4 kg) lebend mittels Magnetresonanztomographie (MRT) untersucht und drei Tage später geschlachtet sowie grobgeweblich (eine Hälfte) zerlegt. Fünf bzw. sechs T1-gewichtete regionale MRI-Scans mit jeweils 10 Scheiben (Scheibendicke 15 mm, Distanzfaktor 0,25) wurden als Ganzkörperstudie durchgeführt. Zusätzlich diente eine weitere T1-Sequenz mit 15 Scheiben (Transversalschnittebenen, Dicke 7 mm, Distanzfaktor 0,25) speziell der Analyse des Fettgewebevolumens der Keulen. MRT-Volumina für Ganzkörperfett (WBF), Ganzkörpermuskel (WBM), Schulter (SV), Hinterkeule (GV) und Keulenfett (GFV) dienten als neue Merkmale. Eine schrittweise Regressionsanalyse wurde durchgeführt, um das Referenzschlachtkörpergewicht (SKG), die Fleischmasse (CM) und die Fettmasse (CF) aus den unabhängigen MRT-Variablen schätzen zu können. Anschließend wurde das aus den MRT-Variablen geschätzte Schlachtkörpergewicht (MR-SKG) als weitere unabhängige Variable in die Regressionsanalyse zur Schätzung von CM und CF einbezogen. Die engste Beziehung zu SKG ergab sich aus der Kombination von WBM, WBF, GV und SV (= MR-SKG; $R^2 = 0,95$; $\sqrt{\text{MSE}} = 0,56$ kg), während CM am besten aus MR-SKG ($R^2 = 0,89$; $\sqrt{\text{MSE}} = 0,24$ kg) sowie CF aus SV und GFV ($R^2 = 0,83$; $\sqrt{\text{MSE}} = 0,18$ kg) vorhergesagt wurde.

Eine MRT-Ganzkörperanalyse ist eine sinnvolle Methode, um den Schlachtkörperwert von Lämmern *in vivo* schätzen zu können und könnte anstelle der Zerlegung im Rahmen der Nachkommenschaftsprüfung genutzt werden. Die Bestimmung von CF erfordert jedoch Informationen aus einer „dünn-schichtigen“ Sequenz.

Abstract

Consumer demand for high-quality lamb meat requires sheep breeders to adapt breeding goals and performance test methods for phenotyping. For this purpose, totally a number of 111 male Merino lambs (average age 113 days, average weight 43,4 kg) were examined *in vivo* by magnetic resonance imaging (MRI) and slaughtered 3 days later followed by dissection of one carcass half. A number of five or six T1-weighted regional MRI scans with 10 slices each (thickness 15 mm, distance factor 0,25) were performed as a whole body study. Additionally, another T1-weighted sequence including 15 slices (thickness 7 mm; distance factor 0,25) helped to especially examining the fat tissue volume of the gigot region. MRI volume calculations of whole body fat (WBF), whole body muscle (WBM), shoulder (SV), gigot (GV), and gigot fat tissue (GFV) served as new traits. A stepwise regression analysis was performed to predict reference carcass weight (CW), carcass meat (CM), and carcass fat mass (CF) from independent MRI variables. Subsequently, the CW calculated by MRI variables (MRI-CW) was included into the stepwise regressions predicting CM and CF. CW was predicted best by WBM, WBF, GV, and SV (= MRI-CW; $R^2 = 0,95$; $\sqrt{\text{MSE}} = 0,56$ kg). CM was predicted best by MRI-CW ($R^2 = 0,89$; $\sqrt{\text{MSE}} = 0,24$ kg), and CF was predicted best by SV and GFV ($R^2 = 0,83$; $\sqrt{\text{MSE}} = 0,18$ kg).

1 Ludwig-Maximilians-Universität München, Lehr- und Versuchsgut, 85764 Oberschleißheim.

2 Hochschule Weihenstephan-Triesdorf, Fakultät Landwirtschaft, 91746 Weidenbach.

3 Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Tierzucht, 85586 Poing-Grub.

A whole body MRI scan is a useful tool to predict the carcass value of lambs *in vivo* and could be used instead of progeny testing and carcass dissection. Prediction of CF requires additional information of a thin-sliced sequence.

1. Einleitung

Schafzüchter und -produzenten müssen die Leistung ihrer Herden in Abhängigkeit von Rasse bzw. Genotyp (KAIČ und MIOČ 2014) ständig verbessern, zum einen um wettbewerbsfähig zu bleiben und zum anderen um den weltweit weiterhin steigenden Bedarf an Lammfleisch decken zu können (OECD/FAO 2014). Verbesserte Leistungsprüfungsmethoden und Zuchtprogramme in Kombination mit neuen Technologien, wie z. B. der Magnetresonanztomographie (MRT), können dazu beitragen, das Generationsintervall zu verkürzen und die Zuchtwertschätzgenauigkeit zu verbessern. Anstelle von zeitaufwändigen Referenzzерlegungen nutzen bzw. nutzten einige wenige Schafzuchtorganisationen bereits die Computertomographie (CT) für die Leistungsprüfung (GARDNER et al. 2010, BÜNGER et al. 2011, FÜRST-WALTTL und GRILL 2013, JAY et al. 2014). Als weitere potenzielle bildgebende Technik wird die Magnetresonanztomographie (STREITZ et al. 1995, STANFORD et al. 1998, VON KORN et al. 2005, BAULAIN et al. 2011, MARIETTE et al. 2012) angesehen. Der Vorteil dieser Methoden ist der nicht-invasive Charakter und damit der mögliche Einsatz am lebenden Tier. Die Nutzung der CT bedingt jedoch hohe Anforderungen an den Strahlenschutz, da eine langfristige Nutzung ohne Schutzvorkehrungen speziell beim Nutzer ein erhebliches Gesundheitsrisiko darstellt. Dieses Risiko existiert bei der MRT nicht (SCHOLZ et al. 2015).

Beim Schaf stellt die Muskelfülle des Schlachtkörpers zusammen mit seiner Fettabdeckung die grundlegende Basis zur Klassifizierung dar (BAULAIN et al. 2011). Laut *Verordnung (EG) Nr. 1249/2008* mit Durchführungsbestimmungen zu den gemeinschaftlichen Handelsklassenschemata für Schlachtkörper von Rindern, Schweinen und Schafen und zur Feststellung der diesbezüglichen Preise werden Schafschlachtkörper zunächst in Lamm- und Schaffleisch unterteilt und werden dann je nach subjektiver Bewertung der Muskelfülle und zusätzlicher Benotung der Fettabdeckung in eine Handelsklasse eingestuft. Dies impliziert, dass die Erhöhung des Muskelfaseranteils am Schlachtkörper des Lammes und eine entsprechende Reduktion des Fettanteils ebenfalls zu einem direkten Mehrerlös je Schlachtkörper führen. Somit kommt einer züchterischen Verbesserung der Schlachtkörperqualität durch die Erhöhung des Muskelfaseranteils beim Lamm eine hohe wirtschaftliche Bedeutung zu.

Im Rahmen eines Gemeinschaftsversuchs des Instituts für Tierzucht der Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Grub, und des Lehr- und Versuchsgutes (LVG) der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, Oberschleißheim, wurden insgesamt 111 männliche Prüflämmer der Rasse Merino mittels Magnetresonanztomographie (MRT) untersucht. Ziel der Studie war es, die Eignung der MRT als potenzielle Leistungsprüfungsmethodik zur Schätzung der Schlachtleistung am lebenden Lamm als neuen Phänotyp zu evaluieren.

2. Material und Methode

Die Tiere wurden jeweils einmalig in einem Gewichtsbereich von $43,4 \text{ kg} \pm 3,4 \text{ kg}$, mit einem Alter von $113 \text{ d} \pm 13,6 \text{ d}$ zum Ende der Stationsprüfzeit gescannt. Die Untersuchung (Abb. 1) erfolgte nach Sedation der Lämmer in Brustlage mit gestreckten Beinen.

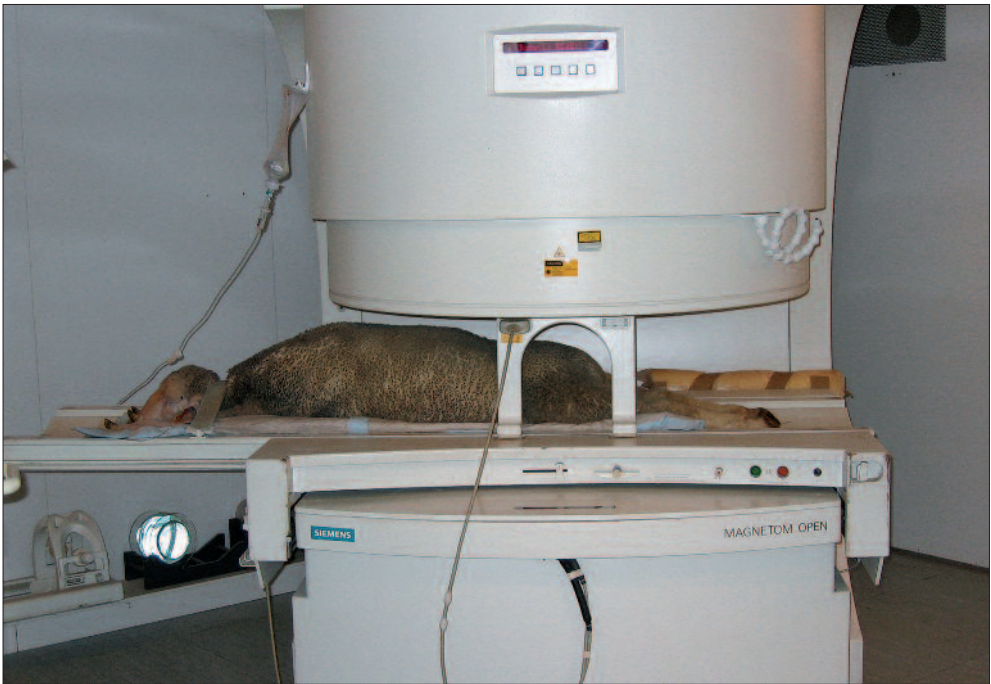


Abb. 1 Untersuchung eines sedierten Lammes mittels Magnetresonanztomographie (MRT)

Drei Tage später wurden die Tiere im Versuchsschlachthaus der LfL geschlachtet und eine Schlachtkörperhälfte nach Erfassung der Schlachtleistungsdaten vollständig zerlegt. Die Auswertung der MRT-Bilder erfolgte mittels der Software „3D Doctor“ (Able Software Corp., Lexington, MA, USA) halbautomatisch oder manuell.

Zu Beginn der 4-jährigen Untersuchungsreihe wurden „nur“ einzelne Körperregionen wie die Brustwirbelsäule und die Kotelettregion der Schafe untersucht (Abb. 2).

Hierzu fand eine T1-gewichtete Spin-Echo-Sequenz (TR 380 ms, TE 15 ms, flip angle 90°, 10 transversale Schnittebenen, Anzahl an Akquisitionen 2, Schichtdicke 15 mm, Distanzfaktor 25, Matrix 256 × 256 Pixel, FoV 461 × 461 mm, Akquisitionszeit 3 min 16 s) Anwendung, um die hohe Signalintensität des Fettes unter T1-Wichtung nutzen zu können. Nachdem die Ergebnisse dieser Daten keine zufriedenstellende Schätzung der Körperzusammensetzung zuließen, wurde das Untersuchungsschema zunächst um die Keulenregion erweitert und schließlich auf den gesamten Tierkörper ausgedehnt (Abb. 2 und 3). Somit wurden die letzten 30 Lämmer vom letzten Halswirbel bis zu den Kniegelenken komplett untersucht (Abb. 4).

Zusätzlich wurden die Bereiche Brustwirbelsäule und Keulenregion im Anschluss an den Ganzkörperscan mittels einer leicht modifizierten T1-gewichteten Spin-Echo-Sequenz (TR 450 ms, TE 15 ms, flip angle 90°, 15 transversale Schnittebenen, Anzahl an Akquisitionen 3, Schichtdicke 7 mm, Distanzfaktor 25, Matrix 192 × 256 Pixel, FoV 461 × 461 mm, Akquisitionszeit 4 min 22 s) untersucht, um eine feinere Auflösung vor allem des sehr dünnen, subkutanen Fettgewebes zu erreichen. Aus den Bildern beider Sequenzen wurden insgesamt 21

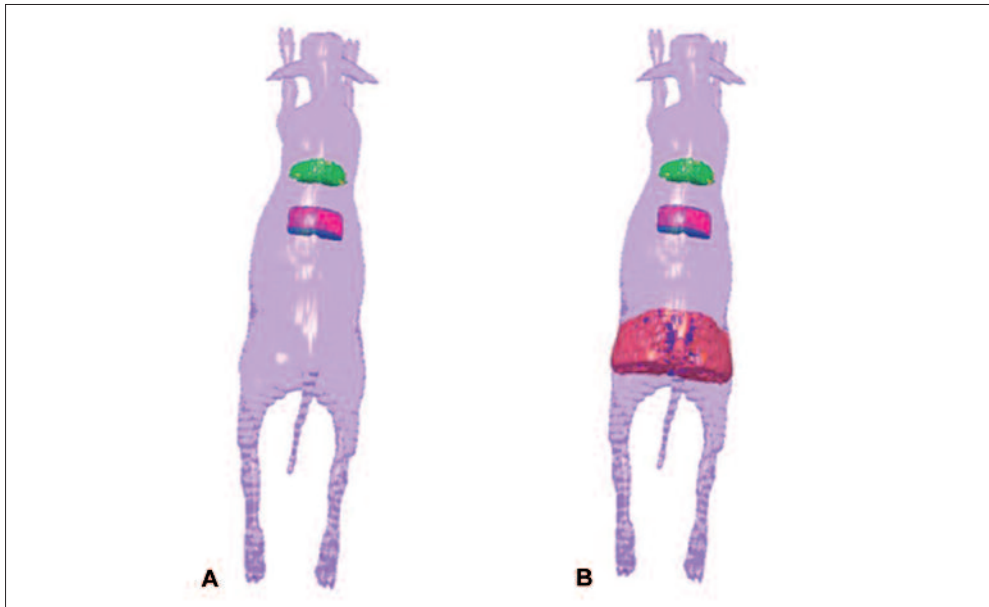


Abb. 2 3D-Rekonstruktion eines Lammes und Darstellung der untersuchten Regionen bis Januar 2010 (A; grün/gelb: Brustwirbelsäule Fett/Muskel, pink/blau: Kotelett Fett/Muskel) und ab Januar 2010 vor Einführung des Ganzkörperscans (B; zusätzlich rot/lila: Keule Muskel/Fett).

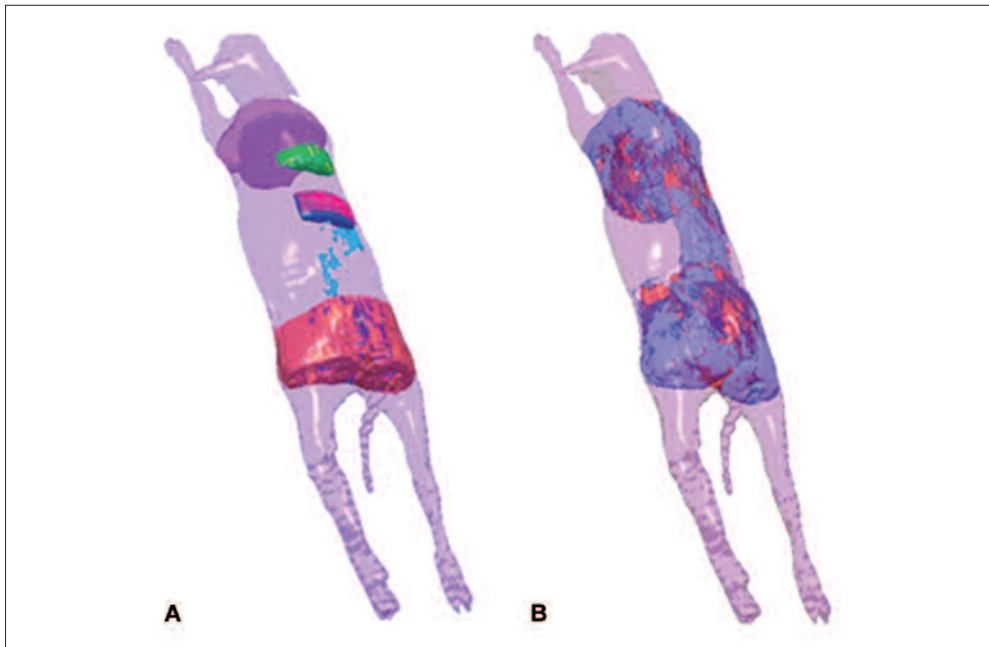


Abb. 3 3D-Rekonstruktion eines Lammes und Darstellung der untersuchten Regionen nach Einführung des Ganzkörperscans (A, zusätzlich hell-lila: Schultergesamtvolumen, hellblau: Nierenfett; B, Ganzkörperfett [rot] und Ganzkörper-Muskel [blau]; fehlend: Ganzkörperfettvolumen, siehe Abb. 4).

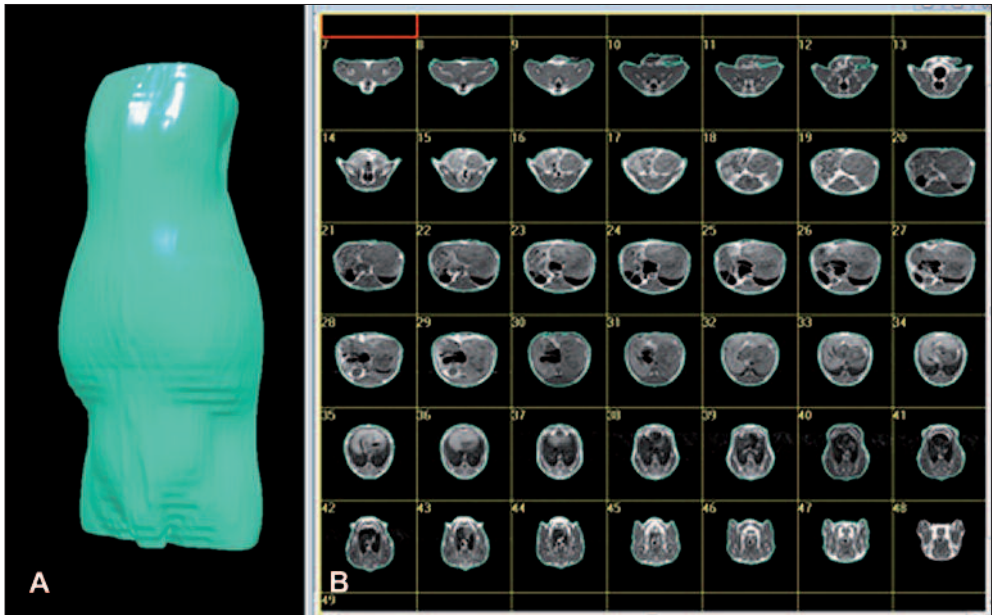


Abb. 4 Screenshot 3D Doctor (Able Software Corp., Lexington, MA, USA): (A) 3D-Rekonstruktion des Ganzkörpervolumens eines Lammes (definierte Region: beginnend am Ellbogengelenk endend auf Höhe des Kniegelenks) aus den im Rahmen des Ganzkörperscans erstellten einzelnen Schnittbildern (B).

verschiedene MRT-Variablen generiert. Darunter befinden sich verschiedene Volumina von Fett bzw. Muskel in definierten Bereichen der Brustwirbelsäule, des Koteletts, der Keulen und aus den Ganzkörperscans die halbautomatisch erfassten Variablen Ganzkörpermuskelvolumen, Ganzkörperfettvolumen, Ganzkörpervolumen, Nierenfett, Keulengesamtvolumen und Schultergesamtvolumen (Abb. 2–4).

Die Datenanalyse erfolgte mittels der Statistiksoftware SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Als Signifikanzniveau wurde im Rahmen von multiplen oder einfachen Regressionsanalysen jeweils ein $p = 0,05$ gewählt. Die Variablenauswahl zum Eingang bzw. Verbleib in der Gleichung erfolgte für die multiple Regressionsanalyse mit Hilfe einer schrittweisen Selektion.

Bei den Untersuchungen an den Lämmern stand die Exaktheit der Methode im Abgleich mit dem Goldstandard, der Zerlegung, im Vordergrund.

3. Ergebnisse

Von den zahlreichen untersuchten Körperregionen erwiesen sich die Keulenregion und vor allem das Volumen der Schulterregion als aussagekräftigste Einzelmerkmale (Tab. 1). Das Schultergesamtvolumen, gemessen mittels MRT, erklärte allein bereits 80 % der Variation des späteren Schlachtkörpergewichtes, 74 % der Fleischmasse des Schlachtkörpers aus Zerlegung und 76 % der entsprechenden Fettmasse. Das Gesamtkeulenvolumen aus MRT erklärte hierbei 66 %, 67 % und 39 % der jeweiligen Variation am Schlachtkörper. Damit übertraf die

Aussagekraft des MRT-Einzelmerkmals Schultergesamtvolumen (Tab. 1) bereits die im Rahmen der konventionellen Schlachtleistungsdaten metrisch erfassten Einzelmerkmale Butterfly-Area (Kotelettfäche beidseitig), Rückenlänge, Schulterbreite und Keulenbreite (Tab. 2) sowie die mittels Ultraschall vor der Schlachtung erfassten Merkmale des langen Rückenmuskels einschließlich des Lebendgewichtes (Tab. 3). So ergibt die Beziehung zwischen Lebendgewicht und Schlachtkörpergewicht „nur“ ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,61$ im Vergleich zu $R^2 = 0,8$ für die Beziehung zwischen MRT-Schultergesamtvolumen und Schlachtkörpergewicht.

Tab. 1 Bestimmtheitsmaß und Standardschätzfehler linearer Regressionsgleichungen zwischen MRT-Variablen der Brustwirbelsäule (BWS) bzw. Schulter und dem Schlachtkörpergewicht (SK-Gewicht), Fleisch- und Fettmasse sowie deren Anteile an einer SK-Hälfte (SKH) nach Zerlegung

MRT-Variablen BWS/Schulter	SK-Gewicht		SKH-Masse Fleisch		SKH-Masse Fett		SKH-Anteil Fleisch		SKH-Anteil Fett	
	R^2	$\sqrt{\text{MSE}}$ [kg]	R^2	$\sqrt{\text{MSE}}$ [g]	R^2	$\sqrt{\text{MSE}}$ [g]	R^2	$\sqrt{\text{MSE}}$ [%]	R^2	$\sqrt{\text{MSE}}$ [%]
BWS FettVol_7mm	0,43	1,85	0,34	1126,39	0,49	587,79	0,32	1,76	0,46	2,09
Schulter GesVol	0,80*	1,08	0,74	698,28	0,76	395,17	0,29	1,72	0,59	1,77
KeuleGesamtVol_15mm	0,66	1,29	0,67	752,91	0,39	537,46	0,04	1,91	0,16	2,24

* fett = Variable mit höchster Beziehung, R^2 = Bestimmtheitsmaß, $\sqrt{\text{MSE}}$ = Wurzel aus Mittlerem Quadrate-Fehler = Standardschätzfehler

Tab. 2 Bestimmtheitsmaß und Standardschätzfehler linearer Regressionsgleichungen zwischen verschiedenen Schlachtleistungsdaten und dem Schlachtkörpergewicht (SK-Gewicht), Fleisch- und Fettmasse sowie deren Anteile an einer SK-Hälfte (SKH) nach Zerlegung (n=111)

Schlacht- leistungs- merkmal	SK-Gewicht		SKH-Masse Fleisch		SKH-Masse Fett		SKH-Anteil Fleisch		SKH-Anteil Fett	
	R^2	$\sqrt{\text{MSE}}$ [kg]	R^2	$\sqrt{\text{MSE}}$ [g]	R^2	$\sqrt{\text{MSE}}$ [g]	R^2	$\sqrt{\text{MSE}}$ [%]	R^2	$\sqrt{\text{MSE}}$ [%]
Schulterbreite	0,00	2,11	0,00	1195,76	0,01	838,76	0,01	2,55	0,01	3,12
Keulenbreite	0,49	1,51	0,43	899,69	0,34	682,03	0,10	2,43	0,22	2,76
Rückenlänge	0,21	1,88	0,16	1093,56	0,14	780,38	0,07	2,47	0,08	3,00
Butterfly-Area	0,56*	1,40	0,64	715,22	0,28	713,16	0,01	2,55	0,14	2,91

* fett = Variable mit höchster Beziehung, R^2 = Bestimmtheitsmaß, $\sqrt{\text{MSE}}$ = Wurzel aus Mittlerem Quadrate-Fehler = Standardschätzfehler

Tab. 3 Bestimmtheitsmaß und Standardschätzfehler verschiedener linearer Regressionsgleichungen zwischen verschiedenen Eigenleistungsmerkmalen aus Ultraschallprüfung (US) und dem Schlachtkörpergewicht (SK), Fleisch- und Fettmasse sowie deren Anteile an einer SK-Hälfte (SKH) nach Zerlegung (n = 111)

Eigenleistungsmerkmal	SK-Gewicht		SKH-Masse Fleisch		SKH-Masse Fett		SKH-Anteil Fleisch		SKH-Anteil Fett	
	R ²	√MSE [kg]	R ²	√MSE [g]	R ²	√MSE [g]	R ²	√MSE [%]	R ²	√MSE [%]
US Fett letzte Rippe	0,02	2,10	0,01	1189	0,01	838	0,01	2,55	0,01	3,13
US Kotelett letzte Rippe	0,34	1,72	0,32	987	0,28	713	0,05	2,50	0,19	2,83
US Fett Mitte Lende	0,02	2,17	0,01	1221	0,02	869	0,01	2,65	0,02	3,21
US Kotelett Mitte Lende	0,33	1,80	0,35	989	0,22	774	0,02	2,64	0,14	2,99
Körpergewicht lebend	0,61*	1,33	0,49	857	0,39	655	0,19	2,30	0,23	2,76

*fett = Variable mit höchster Beziehung, R² = Bestimmtheitsmaß, √MSE = Wurzel aus Mittlerem Quadrate-Fehler

Der Abgleich des Schlachtkörpergewichtes aus der Zerlegung und den Daten der MRT-Merkmale mittels multipler Regressionsanalyse ergab ein maximales Bestimmtheitsmaß von R² = 0,95 (Tab. 4). Daher wurde für die Lämmer, für die alle zur Kalkulation des Schlachtkörpergewichtes aus MRT-Daten benötigten MRT-Variablen vorlagen (n = 30), das „Schlachtkörpergewicht aus MRT-Daten“ berechnet. Die neu generierte Variable „Schlachtkörpergewicht aus MRT-Daten“ wurde anschließend zusätzlich als unabhängige Variable in die Regressionsanalyse einbezogen. Die resultierenden Bestimmtheitsmaße von R² = 0,89 und 0,83 für Fleisch- und Fettmasse aus Zerlegung (Tab. 5) belegen, dass mittels MRT nicht nur das Schlachtkörpergewicht am lebenden Lamm sicher geschätzt werden kann, sondern auch die jeweiligen Mengen von Fett und Fleisch am Schlachtkörper.

Tab. 4 Multiple Regressionsgleichung zwischen dem Schlachtkörpergewicht und allen *In-vivo*-MRT-Variablen (einfließende Beobachtungen n = 30). Signifikanzgrenze für den Verbleib und die Aufnahme der Variablen in die Gleichungen p < 0,05

Abhängige Variable	Interzept	Steigung	Unabhängige Variablen	R ²	√MSE
SK Gewicht [kg]	-6,796	+0,0004	GanzkMuskelVol [cm ³]	0,95	0,56
		+0,0017	GanzkFettVol [cm ³]		
		+0,0025	KeuleGesamtVol [cm ³]		
		+0,0030	SchulterGesamtVol [cm ³]		

SK = Schlachtkörper, Vol = Volumen, R² = Bestimmtheitsmaß, √MSE = Wurzel aus Mittlerem Quadrate-Fehler = Standardschätzfehler

Tab. 5 Multiple Regressionsgleichungen zwischen Merkmalen aus der Zerlegung einer Schlachtkörperhälfte (SKH) und MRT-Variablen einschließlich der Gruppe der 7 mm Variablen und SK-Gewicht aus MRT-Variablen (MR_SKG; einfließende Beobachtungen n = 30). Signifikanzgrenze für den Verbleib der Variablen in der Gleichung $p < 0,05$

Abhängige Variablen	Interzept	Steigung	Unabhängige Variablen	R ²	√MSE
SKH-Masse Fleisch [g]	+550,89	+288,19	MR_SKG [kg]	0,89	242,62
SKH-Masse Fett [g]*	-2822,30	+5,06	KeuleFettVol_7mm [cm ³]	0,83	182,68
		+1,02	SchulterGesamtVol [cm ³]		
SKH-Anteil Fleisch [%]	79,72	+0,011	BWSMuskVol_15mm [cm ³]	0,41	1,72
		-0,006	SchulterGesamtVol [cm ³]		
SKH-Anteil Fett [%]	-10,40	+0,040	KeuleFettVol_7mm [cm ³]	0,67	1,73
		+0,006	SchulterGesamtVol [cm ³]		

BWS = Brustwirbelsäule, Musk = Muskel, Vol = Volumen, R² = Bestimmtheitsmaß, √MSE = Wurzel aus Mittlerem Quadrate-Fehler = Standardschätzfehler

4. Diskussion und Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Kernspintomographie den bislang in diesem Bereich der Leistungsprüfung verwendeten Methoden (Ultraschall, Schlachtleistungsdaten) deutlich überlegen ist. Durch die gewählte Bildschichtdicke von 15 mm ließ sich innerhalb von etwas mehr als 30 min der gesamte Körper der Lämmer erfassen. Auf die dünnerschichtige Sequenz konnte im Anschluss daran nicht verzichtet werden, da Merino-Lämmer im untersuchten Gewichtsbereich sehr mager sind und die Erfassung der dünnen subkutanen Fettschicht und des übrigen Fettgewebes die bei dickerer Schichtdicke auftretenden Partialvolumenartefakte nicht toleriert. Demnach liegt der benötigte Zeitaufwand bei ca. 45 min pro Lamm. Im Vergleich zur in Schottland, Norwegen, Neuseeland und Australien verwendeten Computertomographie für die Leistungsprüfung von Lämmern ist bei der Magnetresonanztomographie mit leichten Abstrichen in der Genauigkeit – aber auch speziell in der Untersuchungsgeschwindigkeit – zu rechnen, während die MRT im Vergleich zur Genauigkeit der Ultraschalluntersuchung einen signifikanten Vorteil besitzt, wenn das Zielmerkmal der Muskelfleischanteil am Schlachtkörper ist (SCHOLZ et al. 2015). Dennoch verfolgen die genannten Länder bzw. Einrichtungen dieser Länder unterschiedliche Herangehensweisen zur nicht-invasiven *In-vivo*-Bestimmung des Muskelfleisch- bzw. Fettanteils im Schlachtkörper. Während Schottland (JONES et al. 2002, BÜNGER et al. 2011), Neuseeland (NICOLL et al. 2002, JOPSON et al. 2009) und Australien (CAVANAGH et al. 2010, GARDNER et al. 2010) mittels CT jeweils Referenzschnittbilder in einzelnen Körperregionen oder des kompletten Körpers (Charollais Breeders 2015) zur Vorhersage der Referenzmerkmale benutzen, erfolgt in Norwegen (hier

aber beim Schwein) routinemäßig eine Ganzkörperuntersuchung kombiniert mit einer voll-automatischen Bild- und Volumenauswertung (GJERLAUG-ENGER et al. 2012). Im Zeitraum von 2000 bis 2009 betrug der geschätzte Zuchtfortschritt je Jahr in Neuseeland 0,17 kg Muskelfleischmasse unter Verwendung von CT und nur 0,07 kg ohne Phänotypisierung mittels CT (Coopworth Sheep Breeders 2015). Während für CT-Schlachtkörpermerkmale beim Schaf bereits Heritabilitäten geschätzt wurden (Tab. 6), existieren keine genetischen Parameteranalysen für MRT-Schlachtkörpermerkmale.

Tab. 6 Heritabilitätsschätzwerte für Phänotypen aus der Computertomographie beim Schaf

CT-Merkmal	Rasse(n)	Heritabilität (s. e.)	Referenz
Muskelfleisch (g)	Charolais, Suffolk, Texel Scottish Blackface Norwegian White	0,47, 0,45, 0,46 (0,09) 0,48 (0,17) 0,57 (0,16)	JONES et al. 2004 KARAMICHOU et al. 2006 KVAME und VANGEN 2007
Fett (g)	Charolais, Suffolk, Texel Scottish Blackface Norwegian White	0,38, 0,41, 0,40 (0,09) 0,60 (0,28) 0,29 (0,13)	JONES et al. 2004 KARAMICHOU et al. 2006 KVAME und VANGEN 2007
Kotelettfläche (cm ²)	Scottish Blackface Merinolandschaf, Suffolk, Texel, Deutsches Schwarzköpfiges Fleischschaf, Jura	0,33 (0,12) 0,24 (0,03)	KARAMICHOU et al. 2006 MAXIMINI et al. 2012
Fettfläche (cm ²)	Scottish Blackface Merinolandschaf, Suffolk, Texel, Deutsches Schwarzköpfiges Fleischschaf, Jura	0,5–0,76 (0,08–0,22) 0,36–0,4 (0,03)	KARAMICHOU et al. 2006 MAXIMINI et al. 2012

s. e. = Standardfehler

Im Humanbereich, hingegen, wurden für die mittels MRT ermittelten viszeralen bzw. subkutanen Fettmassen Heritabilitätsschätzwerte in der Höhe von 0,36 bzw. 0,44 (s. e. 0,11) publiziert (CHOH et al. 2009). Da Schlachtkörpermerkmale generell über mittlere bis hohe Erblichkeiten verfügen (BAULAIN et al. 2011), ist bei entsprechender Genauigkeit auch für MRT-Merkmale davon auszugehen, dass am lebenden Schaf erfasste Schlachtkörpermerkmale ausreichend hohe Heritabilitäten aufweisen, um effizient im Rahmen von gekoppelten Eigenleistungs- und Nachkommenschaftsprüfungen für die Selektion eingesetzt werden zu können.

Literatur

Quelle aller Daten und Abbildungen: Habilitationsschrift Prisca V. KREMER, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2013

- BAULAIN, U., SCHÖN, A., BRANDT, H., und BRADE, W.: Leistungsstand der niedersächsischen Schafzucht dargestellt anhand von Ergebnissen der stationären Nachkommenprüfung von 1993 bis 2007. *Züchtungskd.* 83, 439–450 (2011)
- BÜNGER, L., MACFARLANE, J. M., LAMBE, N. R., CONINGTON, J., MCLEAN, K. A., MOORE, K., GLASBEY, C. A., and SIMM, G.: Use of X-ray computed tomography (CT) in UK sheep production and breeding. In: KARUP-PASAMY, S. (Ed.): *CT Scanning – Techniques and Applications*; pp. 329–348. INTECH Europe, Rijeka, Croatia 2011
- CAVANAGH, C. R., JONAS, E., HOBBS, M., THOMSON, P. C., TAMMEN, I., and RAADSMA, H. W.: Mapping Quantitative Trait Loci (QTL) in sheep. III. QTL for carcass composition traits derived from CT scans and aligned with a meta-assembly for sheep and cattle carcass QTL. *GSE* 42, 36 (2010)
- Charollais Breeders*: <http://www.charollais.com.au/about-us/performance-recording>. (Zugriff: 12. 5. 2015)
- CHOH, A. C., DEMERATH, E. W., LEE, M., WILLIAMS, K. D., TOWNE, B., SIERVOGEL, R. M., COLE, S. A., and CZERWINSKI, S. A.: Genetic analysis of self-reported physical activity and adiposity: The Southwest Ohio Family Study. *Public Health Nutr.* 12/8, 1052–1060 (2009)
- Coopworth Breeders*: <http://www.coopworthgenetics.co.nz/page.php?page=Publications>. (Zugriff: 12. 5. 2015)
- FÜRST-WALT, B., und GRILL, L.: Voraussetzungen zur Implementierung einer Zuchtwertschätzung beim Schaf. Endbericht zum Forschungsprojekt 100552. BOKU-Universität für Bodenkultur, Wien, Österreich (2013)
- GARDNER, G. E., WILLIAMS, A., SIDDELL, J., BALL, A. J., MORTIMER, S., JACOB, R. H., PEARCE, K. L., HOCKING EDWARDS, J. E., ROWE, J. B., and PETHICK, D. W.: Using Australian sheep breeding values to increase lean meat yield percentage. *Anim. Prod. Sci.* 50, 1098–1106 (2010)
- GJERLAUG-ENGER, E., KONGSRO, J., ØDEGARD, J., AASS, L., and VANGEN, O.: Genetic parameters between slaughter pig efficiency and growth rate of different body tissues estimated by computed tomography in live boars of Landrace and Duroc. *Animal* 6, 9–18 (2012)
- JAY, N. P., VAN DE VEN, R. J., and HOPKINS, D. L.: Comparison of rankings for lean meat based on results from a CT scanner and a video image analysis system. *Meat Sci.* 98, 316–320 (2014)
- JONES, H. E., LEWIS, R. M., YOUNG, M. J., and SIMM, G.: Genetic parameters for carcass composition and muscularity in sheep measured by X-ray computer tomography, ultrasound and dissection. *Livest. Prod. Sci.* 90, 167–179 (2004)
- JONES, H. E., LEWIS, R. M., YOUNG, M. J., and WOLF, B. T.: The use of X-ray computer tomography for measuring the muscularity of live sheep. *Anim. Sci.* 75, 387–399 (2002)
- JOPSON, N. B., NEWMAN, S.-A. N., and MCEWAN, J. C.: Developments in the sheep meat industry: Genetic evaluation of meat yield. *Proc. New Zeal. Soc. Anim. Prod.* 69, 158–160 (2009)
- KAIČ, A., and MIOČ, B.: Lamb carcass composition. *MESO XVI*, 270–274 (2014)
- KARAMICHOU, E., RICHARDSON, R. I., NUTE, G. R., MCLEAN, K. A., and BISHOP, S. C.: Genetic analyses of carcass composition, as assessed by X-ray computer tomography, and meat quality traits in Scottish Blackface sheep. *Anim. Sci.* 82, 151–162 (2006)
- KORN, S. VON, BAULAIN, U., ARNOLD, M., und BRADE, W.: Nutzung von Magnet-Resonanz-Tomographie und Ultraschalltechnik zur Bestimmung des Schlachtkörperwertes beim Schaf. *Züchtungskd.* 77, 382–393 (2005)
- KVAME, T., und VANGEN, O.: Selection for lean weight based on ultrasound and CT in a meat line of sheep. *Livest. Sci.* 106, 232–242 (2007)
- MARIETTE, F., COLLEWET, G., DAVENEL, A., LUCAS, T., and MUSSE, M.: *Quantitative MRI in Food Science & Food Engineering*. Encyclopedia of Magnetic Resonance. doi: 10.1002/9780470034590.emrstm1272. West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Ltd. 2012
- MAXIMINI, L., BROWN, D. J., BAUMUNG, R., and FUERST-WALT, B.: Genetic parameters of ultrasound and computer tomography scan traits in Austrian meat sheep. *Livest. Sci.* 146, 168–174 (2012)
- NICOLL, G. B., JOPSON, N. B., and MCEWAN, J. C.: Contribution of CT scanning to genetic improvement in a terminal sire sheep breeding programme. *Proceedings 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, August 19–23, Montpellier, France, Communication Nr. 11–30 (2002)
- OECD/Food and Agriculture Organization of the United Nations*: *OECD-FAO Agricultural Outlook 2014*, OECD PUBLISHING, 2, rue André-Pascal, 75775 PARIS CEDEX 16, France 2014
- SCHOLZ, A. M., BÜNGER, L., KONGSRO, J., BAULAIN, U., and MITCHELL, A. D.: Non-invasive methods for the determination of body and carcass composition in livestock – Dual energy X-ray absorptiometry, computed tomography, magnetic resonance imaging, and ultrasound. *Invited review. Animal* 9, 1250–1264 (2015)
- STANFORD, K., JONES, S. D. M., and PRICE, M. A.: Methods of predicting lamb carcass composition: A review. *Small Rumin. Res.* 29, 241–254 (1998)
- STREITZ, E., BAULAIN, U., und KALLWEIT, E.: Untersuchungen zur Körperzusammensetzung wachsender Lämmer mit Hilfe der Magnet-Resonanz-Tomographie. *Züchtungskd.* 67, 392–403 (1995)

Eignung der Magnetresonanztomographie zur Schätzung der Schlachtleistung

Verordnung: Verordnung (EG) Nr. 1249/2008 der Kommission vom 10. Dezember 2008 mit Durchführungsbestimmungen zu den gemeinschaftlichen Handelsklassenschemata für Schlachtkörper von Rindern, Schweinen und Schafen und zur Feststellung der diesbezüglichen Preise. (ABl. Nr. L 337 S. 3), Celex-Nr. 3 2008 R 1249, zuletzt geändert durch Art. 1 ÄndDVO (EU) 148/2014 vom 17. 2. 2014 (ABl. Nr. L 46 S. 1)

Prof. Dr. med. vet. habil. Prisca V. KREMER-RÜCKER
Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehr- und Versuchsgut
St. Hubertusstraße 12
85764 Oberschleißheim
Bundesrepublik Deutschland

und

Hochschule Weihenstephan-Triesdorf
Fakultät Landwirtschaft
Tierzucht und Tierzüchtung
Markgrafenstraße 16
91746 Weidenbach
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 9826 654203
Fax: +49 9826 6544203
E-Mail: prisca.kremer-ruecker@hswt.de

Rolle der Wissenschaft im Globalen Wandel

Vorträge anlässlich der Jahresversammlung
vom 22. bis 24. September 2012 in Berlin

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 118, Nr. 400
Herausgegeben von Detlev DRENCKHAHN (Würzburg) und
Jörg HACKER (Halle/Saale)
(2013, 396 Seiten, 123 Abbildungen, 27 Tabellen, 29,95 Euro,
ISBN: 978-3-8047-3210-0)

Gesellschaftliche Probleme verlangen heute sehr häufig eine Widerspiegelung im Bereich der Wissenschaften. Als Nationale Akademie der Wissenschaften ist die Leopoldina in zunehmendem Maße gefordert, auch Beratung bei Fragen zu liefern, die über Länder und Kontinentgrenzen hinausgreifen: Klimawandel, der Einsatz erneuerbarer Energien, Fragen der Gesundheitsversorgung, die Einrichtung einer effektiveren Landwirtschaft zur Bekämpfung von Hunger in Krisengebieten und die sich wandelnde Altersstruktur von Bevölkerungen in vielen Staaten sind nur einige Beispiele für entsprechende Gebiete mit dringendem Forschungsbedarf. Sie bilden Herausforderungen für die Gesellschaften, die nur in internationaler, oft globaler Zusammenarbeit zu bewältigen sein werden. Daher wählte die Leopoldina 2012 das Thema „Rolle der Wissenschaft im Globalen Wandel“ für ihre Jahresversammlung. Der Band umfasst Beiträge zu den Themenkomplexen „Die Erde im Globalen Wandel“, „Herausforderungen des Globalen Wandels“ und „Lösungswege von Problemen des Globalen Wandels“ sowie zu den gesellschaftlichen und politischen Implikationen der mit dem globalen Wandel verbundenen Prozesse.

II. Phänotypisierung im zellulären Bereich

Phänotypisierung des ruminalen Mikrobioms bei Wiederkäuern – eine aktuelle interdisziplinäre Herausforderung

Wilfried BRADE (Hannover)

Zusammenfassung

Das Rind ist bezüglich der Verdauung des Futters von seinem Mikrobiom abhängig. Es ist daher verlockend, bereits eine Verbindung zwischen der Zusammensetzung und Menge verschiedener Pansenbakterien und physiologischen Parametern des Wirts zu belegen. Die Genprodukte (Enzyme) der ruminalen Mikroorganismen übernehmen Aufgaben, die im Genom eines Wiederkäuers (Wirt) nicht verankert sind. Dazu gehört unter anderem der Abbau von Nahrungsbestandteilen (z. B. Cellulose), die sie allein nicht zu verdauen vermögen. Durch die Entwicklung neuer molekularbiologischer Hochdurchsatzmethoden nehmen die Erkenntnisse über das ruminale Mikrobiom, also die Gesamtheit der den Pansen eines Wiederkäuers besiedelnden Organismen, stark zu. Der vorliegende Beitrag gibt aktuelle Einblicke in die strukturelle und funktionelle Vielfalt des Pansenmikrobioms sowie in die vielschichtig vorhandenen Interaktionen (Fütterung – Mikrobiom – Wirt).

Abstract

Phenotyping of ruminal microbiome in ruminants – a recent interdisciplinary challenge. Cattle is dependent on the digestion of feed from their microbiome. It is therefore very tempting to prove a link between the composition and quantity of various rumen bacteria and physiological parameters of the host. The development of new molecular biological high-throughput methods are rapidly increasing knowledge of the ruminal microbiome (= the totality of microbial organisms in the rumen of a ruminant). The paper will give new insights into the structural and functional diversity of the ruminal microbiome as well as in the existing complex interactions (feeding – microbiome – host).

1. Einführung

Der Pansen enthält ein sehr komplexes Ökosystem, bestehend aus Mitgliedern aller drei Domänen des Lebens: Bacteria, Archaea und Eukarya. Die Vielzahl der Mikroorganismen im Pansen kann als ein wirtsspezifisches Organ (= ruminales Mikrobiom) aufgefasst werden. Im Laufe des Lebens oder bei veränderter Fütterung (Nutzung) des Wirtes kommt es zu strukturellen und funktionellen Veränderungen des ruminalen Mikrobioms. Zu nennen sind hier deutliche Unterschiede im Mikrobiom eines juvenilen Rindes (präruminales Kalb), einer kraftfutterreich ernährten Milchkuh oder eines raufutterreich ernährten Mastrindes. Neueste Daten haben das Virom als weitere Komplexitätsebene diesem Konzept hinzugefügt. So können lytische Phagen die Bakterienanzahl und -struktur im Pansen beeinflussen.

In der Vergangenheit wurde die Struktur und Vielfalt der ruminalen Mikroorganismen vorrangig durch klassische mikrobiologische Techniken identifiziert (= *In-vitro*-Kulturen). Mittels kulturabhängiger Methoden wird jedoch die tatsächliche mikrobielle Vielfalt im Pansen un-

terschätzt, da nur ein Bruchteil der vorhandenen Mikroorganismen kultivierbar ist (CREEVEY et al. 2014).

Angeregt durch permanente Forderungen zur weiteren Verbesserung der Futtereffizienz von Rindern – bei gleichzeitig angestrebter direkter Einflussnahme auf eine möglichst reduzierte Methanbildung im Pansen – einschließlich rasanter Entwicklungen in der Molekulargenetik (Entwicklung genetische Marker) sowie in der Humanmedizin (= nachgewiesene Wechselwirkungen zwischen dem humanen Darmmikrobiom mit einer Vielzahl von speziellen Krankheiten wie Adipositas, Diabetes mellitus [Typ 2] oder Arteriosklerose – vgl. LEY et al. 2006) interessieren sich nun auch zunehmend die Tierwissenschaftler sowohl für die Interaktionen zwischen Genom und Ernährung als auch von Genom und Genom (Wirt-Mikrobiom). Jedes Individuum beherbergt dabei offensichtlich seine ureigensten Kommensalen (PROCTOR 2013). So ist bei Menschen die Zusammensetzung der Darmbakterien nicht völlig zufällig, denn die wirtsspezifischen Bakterien können bestimmten Gemeinschaften zugeordnet werden, sogenannten Enterotypen.

Seither werden gewaltige Forschungsanstrengungen unternommen, das menschliche Mikrobiom zu kartieren. Internationale Mikrobiom-Projekte entstanden, so z. B. das *Human Microbiome Project* (HMP) der US-amerikanischen *National Institutes of Health* (NIH), das 2008 gestartet wurde (HUTTENHOWER et al. 2012). Während in der 1. Phase (bis 2012) die Mikroben vieler Körperbereiche charakterisiert wurden, werden in der aktuellen Phase deren biologische Eigenschaften untersucht und Kohortenstudien durchgeführt, um Zusammenhänge zwischen Mikrobiota und Krankheiten herauszufinden.

Bei der Erforschung des Pansenmikrobioms der Wiederkäuer stehen wir demgegenüber erst am Anfang intensiver wissenschaftlicher Studien. Hier wurde 2011 das „Hungate1000“-Projekt¹ zur Etablierung der ruminalen mikrobiellen Genomik-Forschung initiiert. Diese globale Forschungsallianz vereint 27 Institute bzw. Universitäten aus 11 Ländern mit dem Ziel, einen Referenzsatz von mikrobiellen Pansensequenzen zu erzeugen, Strategien zur Effizienzverbesserung der Fermentation im Pansen zu erarbeiten und mögliche Minderungsstrategien bei der Umweltbelastung (z. B. Minderung der Methanproduktion) aufzuzeigen.²

Leider sind in diesem internationalen Projekt renommierte wissenschaftliche Einrichtungen aus dem deutschsprachigen Raum unterrepräsentiert.

2. Vorhandensein verschiedener Domänen im Pansenmikrobiom

Bakterien sind die quantitativ bedeutendsten Mitglieder der mikrobiellen Community. LIN et al. (1997) machen Angaben über den relativen Anteil verschiedener Domänen in Pansenproben bei Milchkühen und Mastochsen (bei unterschiedlicher Fütterung) sowie bei Ziegen oder Schafen (Abb. 1). Die bakteriellen, eukaryotischen oder zu den Archaeen-gehörigen rRNA-Anteile an der Gesamt-rRNA im Gastrointestinaltrakt schwanken zwischen den Tieren innerhalb einer Art (Rasse) erheblich. So variierte der *Bacteria*-Anteil zwischen 46,2 % bis 98,2 %, der *Eukarya*-Anteil zwischen 2,5 % und 30,3 % und der *Archaea*-Anteil zwischen 0,9 % und 2,2 % innerhalb der acht untersuchten Milchkühe (LIN et al. 1997). Ähnlich variierte der Anteil der verschiedenen Domänen bei den untersuchten Ziegen oder Schafen.

1 Nach Prof. Robert E. HUNGATE (1906–2004), dem Nestor der Pansen-Mikrobiologie.

2 <http://www.globalresearchalliance.org/>.

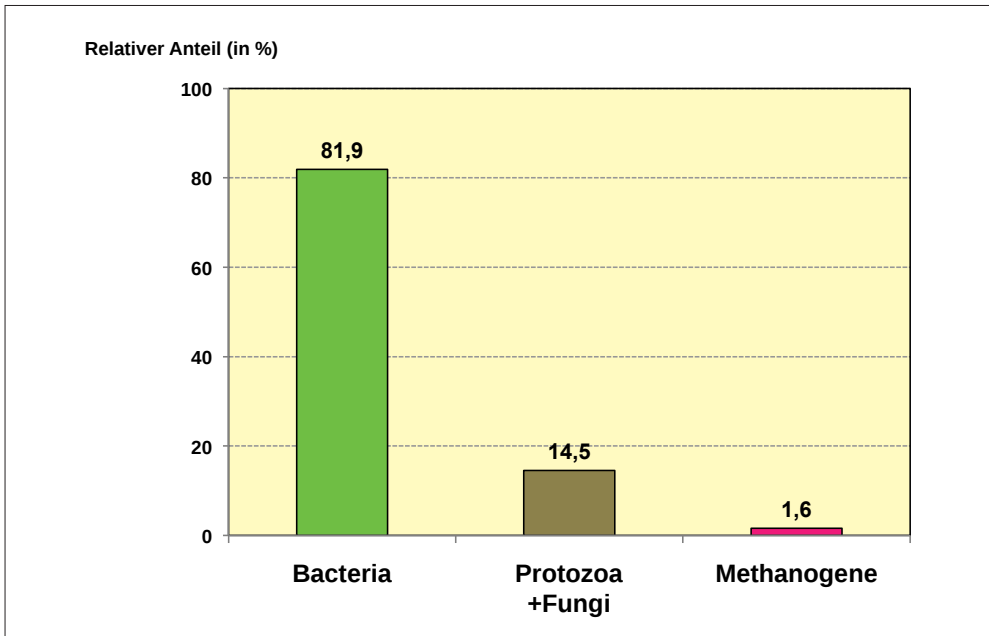


Abb. 1 Relativer Anteil verschiedener Domänen am ruminalen Mikrobiom (in Anlehnung an LIN et al. 1997 – eigene Darstellung [hier verwendetes Datenmaterial: 50 % Kraftfutteranteil an der Ration])

Funktionell lassen sich die ruminalen Mikroben entsprechend ihrer bevorzugten Energiequelle unterscheiden (NAGARAJA 2012). So bauen die cellulolytischen Bakterien zur Energieversorgung Cellulose ab, wachsen langsam und nutzen Ammoniak als Stickstoffquelle.

Eine weitere, oft gewählte Einteilung der Ruminalbakterien erfolgt entsprechend ihres Vorhandenseins im Pansen:

- Pansensaft-assoziierte,
- Pansenpartikel-assoziierte,
- Epithel-assoziierte.

Diese drei ruminalen „Gruppen“ interagieren im Pansen intensiv miteinander. Auch kommen sie in unterschiedlicher Häufigkeit vor. So weisen die Epithel-assoziierten Bakterien, die auch als epimurale Bakterien bekannt sind, in der Regel die geringste Dichte (im Vergleich zu den anderen beiden Populationstypen) aus.

Es gibt zwei Arten von Protozoen im Pansen: geißelte *Protozoa* (Urtierchen) oder bewimperte *Protozoa*. Die bewimperten Protozoen bilden einen wesentlichen Teil der mikrobiellen Zellmasse und umfassen eine Vielzahl morphologischer Typen.

In manchen Wimpertierchen (Ciliaten) sind *Hydrogenosomen* vorhanden; spezielle Organellen (häufig anstelle von Mitochondrien), die ein Überleben unter anaeroben Bedingungen ermöglichen. Diese Protozoen-Species produzieren Wasserstoff (H_2). Die Entfernung dieses Wasserstoffs erfolgt wiederum durch Methanogene (Archaeen). Daher führt die „künstliche“ Beseitigung der Wimpertierchen („Defaunation“) zu einer reduzierten Methanproduktion.

Gut bekannt ist auch, dass Protozoen „Räuber“ von Bakterien und anderen Mikroorganismen sind. Sie greifen somit regulierend in die Bakterienpopulationen ein. Eine Veränderung im Bestand oder der Zusammensetzung der Protozoen wirkt sich folglich auf die gesamte Mikrobengemeinschaft im Pansen aus.

Das Interesse an dem Vorhandensein von Archaeen im Pansen hat in den letzten Jahren in der ruminalen Mikrobiomforschung – vor allem aufgrund der Fähigkeit einiger Arten, Methan (CH_4) zu produzieren – erheblich zugenommen (Abb. 2).

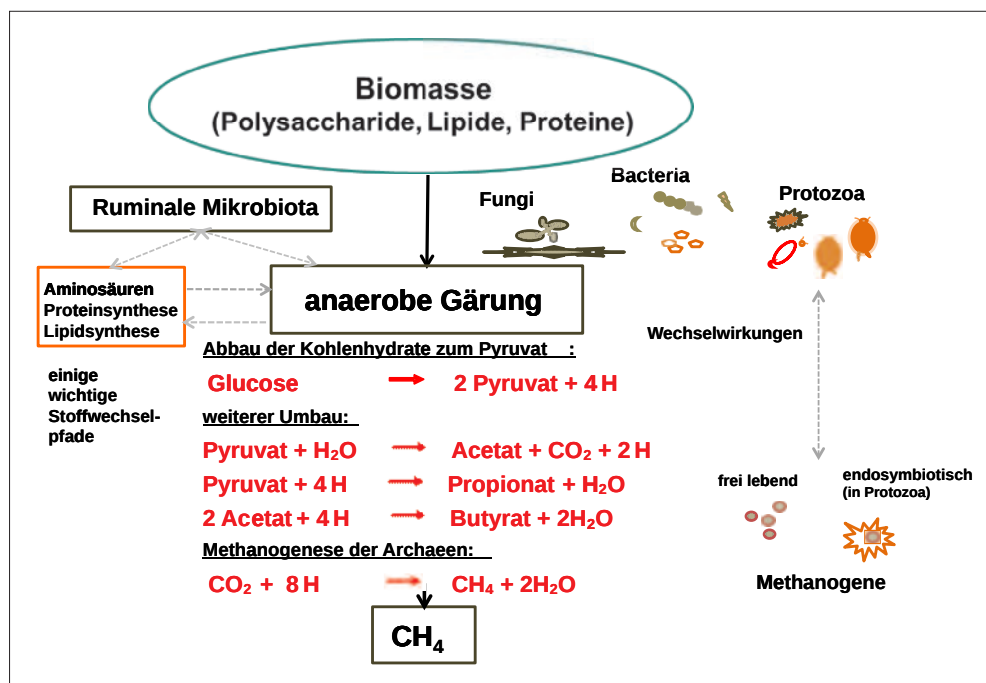


Abb. 2 Schematische Darstellung der anaeroben Verdauung von Biomasse mit abschließender Methanbildung durch archaeelle Methanogene

CH_4 wird durch *methanogene Archaeen* produziert; eine vielfältige Gruppe obligat anaerober Archaea. Ihre CH_4 -Synthese kann als Endprodukt ihrer speziellen Atmung angesehen werden. Die CH_4 -Bildung ist aus zweierlei Hinsicht problematisch: CH_4 führt einerseits zu einem Energieverlust zwischen 5 % bis 12 % der aufgenommenen Energie (FLACHOWSKY und BRADE 2007). Und zum anderen wird das Treibhausgas CH_4 von ihnen erzeugt, das wiederum der Wirt in die Umwelt freisetzt. Der Pansen beinhaltet zusätzlich ein komplexes Virom, dessen Viren systematisch die Zellen von Eukaryoten bzw. Prokaryoten befallen.

So wird der Pansen von einer großen Anzahl von Bakteriophagen³ bewohnt, die wahrscheinlich dazu beitragen, dass eine „Homöostase“ der mikrobiellen Population erreicht wird.

³ Im Allgemeinen sind Phagen sehr wirtsspezifisch.

Schätzungen nennen hier bis zu 10^{11} Phagenpartikel pro Gramm Panseninhalt (NAGARAJA 2012). Darüber hinaus gibt es Hinweise auf die Übertragung von genetischem Material (= horizontaler Gentransfer) zwischen verschiedenen Bakterien-Species einerseits und/oder zwischen Bakterien und beispielsweise bewimperten Protozoen andererseits.

3. Zusammensetzung der ruminalen Bakteriengemeinschaften in Abhängigkeit vom Alter des Wirtes, der Fütterung und Pansenbesiedlung

3.1 Vorbemerkung

Im Laufe des Lebens sowie bei veränderter Fütterung kommt es zu kontinuierlichen Verschiebungen in der Zusammensetzung des ruminalen Mikrobioms, die wiederum auch durch das Genom des Wirtes und weitere Einflussgrößen (z. B. Jahresverlauf, Hitzestress) beeinflusst wird. So gibt es Unterschiede zwischen dem präruminalen Mikrobiom eines „Tränke“-Kalbes und dem Mikrobiom eines adulten Tieres.

Im „reifen“ Pansen ausgewachsener Tiere ist die Besiedlung des Pansens nachhaltig von den eingesetzten Futtermitteln und damit der Nutzungsrichtung (z. B. laktierende oder trockenstehende Milchkühe, Mastbullen) und dem besiedelten „Pansen“-Habitat einschließlich weiterer morphologisch-physiologischer Besonderheiten des Wirts (z. B. Pansenvolumen) abhängig. Diese vielfältigen Einflüsse und Interaktionen sollen nachfolgend detaillierter beschrieben werden.

3.2 Effekte des Alters

Bei Wiederkäuern ist der Gastrointestinaltrakt, einschließlich Vormagenkomplex, bei der Geburt steril. Allerdings wird er bereits in den ersten 24 h nach der Geburt rasch mit Bakterien besiedelt. Gleichzeitig setzen anatomische Veränderungen, speziell in der Struktur der Pansenwand, ein. Der Haubenrinnenreflex bei Kälbern stellt sicher, dass die aufgenommene Milch auf kürzestem Weg direkt in den Labmagen transportiert wird, wo sie durch das Lab und die Salzsäure gerinnt.

Die präruminalen Wandstrukturen – verbunden mit einer gleichzeitigen Verfügbarkeit von Nährstoffen – stellen offensichtlich vom zweiten Lebenstag an *komfortable* Nischen für die (Erst-)Besiedlung mit Mikroorganismen dar; neben proteolytischen Bakterien auch bereits für cellolytische Mikroben oder Methanogene. Protozoen sind etwa ab der dritten Woche nach der Geburt zu beobachten. LI et al. (2012) untersuchten die präruminalen Mikrobiota von unterschiedlich alten männlichen Holstein-Kälbern (14 Tage [d] bzw. 42 d nach der Geburt; gefüttert mit einem Standard-Milchaustauscher) und identifizierten das Vorkommen von 15 bakteriellen Phyla. Die mikrobiellen Communities wurden von den Stämmen *Bacteroidetes*, *Firmicutes* und *Proteobacteria* dominiert.

Auch WU et al. (2012) zeigen, dass die ruminalen Bakteriengemeinschaften bei Kälbern, Milchkühen oder Mastbullen deutlich verschieden waren; bei einer beeindruckenden mikrobiellen Vielfalt und Komplexität in allen drei Tiergruppen. Sie konnten insgesamt 21 Stämme, 31 Klassen, 93 Familien und 219 verschiedene Gattungen nachweisen (Tab. 1).

Tab. 1 Mittlere Anzahl nachgewiesener bakterieller Taxa bzw. OTU's im Pansen in Abhängigkeit vom Alter bzw. der Nutzungsrichtung/Rasse

Tiergruppe/ Untersuchungsmaterial	Taxa				OTU's
	Stamm (Phylum)	Klasse (Classis)	Familie (Familia)	Gattung (Genus)	
Kälber (HF-Bullenkälber, ca. 42 d alt)	12,3	20,0	49,0	97,0	133,3
„reifer“ Pansen bei laktieren- den Milchkühen (HF-Kühe)	17,3	22,8	41,0	73,8	537,5
Mastbullen (ca. 270 kg)	15,6	22,3	39,4	76,5	499,6
gesamt	21	31	93	219	1079

Quelle: WU et al. 2012 (gekürzt). OTU's – Operative taxonomische Einheiten

3.3 Fütterung adulter Rinder

Bei Wiederkäuern mit einem reifen Pansen gelangen die Futtermittel – nach flüchtigem Kauen – mit dem Abschlucken in den Hauben-Pansen-Raum. Dort ist eine Schichtung (Gasschicht, Faserschicht, Flüssigkeitsschicht [= Pansensee]) gegeben. Der Umfang des mikrobiellen Abbaus im Pansen ist von der Abbaugeschwindigkeit sowie der Verweildauer des Futtermittels im Pansen abhängig (Abb. 2).

Während die Verweildauer durch die Höhe der Futteraufnahme und das tierseitig vorhandene Pansenvolumen modifiziert wird, hängt die Geschwindigkeit des Abbaus beispielsweise der Kohlenhydrate in den Vormägen weitgehend von der Art einschließlich der technischen Aufbereitung (mechanische Zerkleinerung) der verabreichten Futtermittel (zellulosereiche oder stärkereiche Fütterung) ab (Abb. 3).

Zusätzlich verändern sich sowohl Struktur als auch Transportfunktionen des Pansenepithels von Wiederkäuern in Abhängigkeit von der Fütterung. Bei vermehrter Aufnahme von Kraftfutter, die erhebliche Veränderungen der Pansenflüssigkeit nach sich zieht (erhöhte Konzentration von kurzkettigen Fettsäuren, pH-Absenkung usw.), nimmt bekanntermaßen die Anzahl und Größe der Zotten zu, die Verhornung wird stärker und Transportleistungen für Ionen werden erhöht (VON DER SCHULENBURG 2005).

Der Ablauf und die Regulation dieser Adaptationsvorgänge werden allerdings bislang nur unzureichend verstanden.

Von besonderer Bedeutung für den Umfang der Umsetzungen in den Vormägen ist, vor allem bei Milchkühen, die Verweildauer des aufgenommenen Futters im Pansen, d. h. die Passagerate durch die Vormägen. Bestätigt werden die dargestellten Zusammenhänge durch zahlreiche Fütterungsversuche. So zeigten beispielsweise BELANCHE et al. (2012), dass bei Verabreichung einer ballaststoffreichen Diät die Kühe einen höheren pH-Wert im Pansen, eine höhere Ammoniakkonzentration und einen höheren Anteil an Acetat und Propionat gegenüber einer ballaststoffarmen Ration hatten.

Eine ballaststoffreiche Fütterung erhöht in der Regel die ruminale Bakterienvielfalt einschließlich der relativen Häufigkeit der Protozoen, anaeroben Pilze und Methanogene; *summa summarum* derjenigen von cellulolytischen Mikroorganismen (Abb. 3).

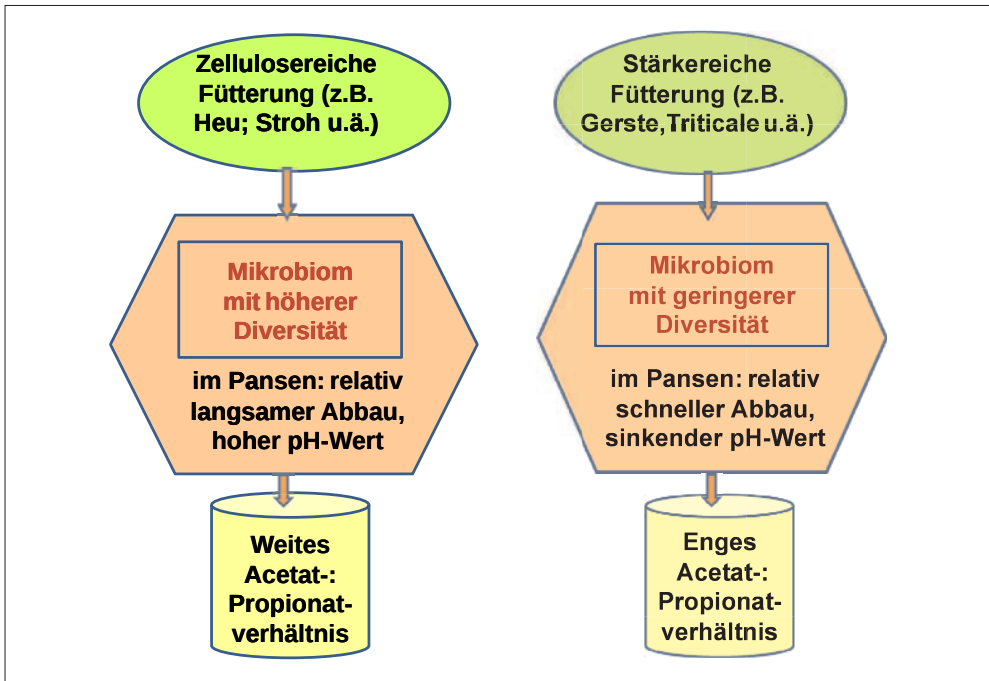


Abb. 3 Schematische Darstellung möglicher Veränderungen im Pansen in Abhängigkeit von der Rationsgestaltung

3.4 Bewertung von Kotproben

Die Analyse fäkaler Metagenome von Menschen hat zwischenzeitlich in der Humanmedizin breiten Eingang gefunden. Auch besteht zwischenzeitlich im humanen Bereich die Möglichkeit (gegen Kostenbeteiligung), aus einer individuellen Stuhlprobe das mikrobielle Profil der Darmbakterien zu sequenzieren und so „sein individuelles Darmmikrobiom“ analysieren zu lassen.⁴ Die mikrobielle Besiedlung humaner Kotproben repräsentiert das individuell vorhandene Mikrobiom am Ende des Gastrointestinaltraktes (Rektum). Rektal gewonnene Kotproben von Rindern sind zwischenzeitlich gleichfalls wiederholt genutzt worden, um die tierindividuelle mikrobielle Besiedlung bzw. mögliche Effekte differenzierter Rationen auf das zugehörige Mikrobiom zu erfassen (DURSO et al. 2012, KIM et al. 2014).

Die dominierenden bakteriellen Phyla waren in den Kotproben von DURSO et al. (2012) *Firmicutes* und *Bacteroidetes*. *Firmicutes* war vor allem in der sehr kraftfutterreichen Fütterungsgruppe dominierend (Abb. 4).

4 Siehe Portal „my.microbes“ des EMBL Heidelberg.

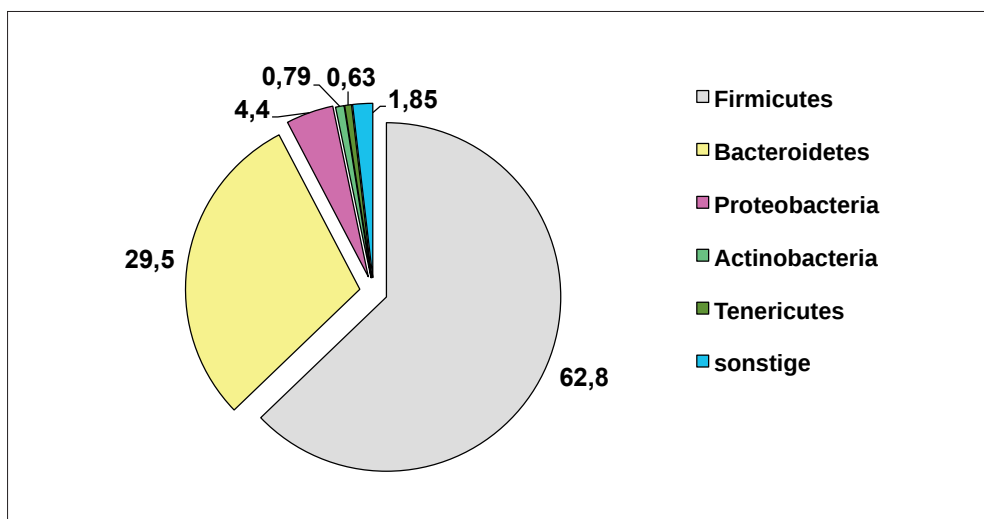


Abb. 4 Prozentanteil verschiedener Bakterienstämme in Kotproben von Mastrindern (Quelle: DURSO et al. 2010 – eigene Darstellung)

Insgesamt belegen vorliegende Untersuchungsergebnisse, dass die fäkale bakterielle Mikrobengesellschaft signifikante strukturelle Häufigkeitsunterschiede zwischen verschiedenen Fütterungsgruppen zu manifestieren vermag.

4. Archaeen

4.1 Generelle Aspekte

Archaeen sind einzellige Organismen und werden, wie die Bakterien, zu den Prokaryoten gezählt. Ihre separate Stellung resultiert aus ihren speziellen physiologisch-biochemischen, genetischen sowie strukturellen Merkmalen. So belegt bereits der Aufbau ihrer Zellwand deutliche Unterschiede zu den anderen Domänen. Besonders interessant ist ihr ungewöhnlicher Stoffwechsel (Abb. 2). Die Methanogenese wird von Archaeen betrieben, die alle zum Phylum der Euryarchaeota gehören (KIM 2012). Die CH_4 -bildenden Archaeen im Pansen sind sowohl in der Pansenflüssigkeit zu finden bzw. am Pansenepithel des Wirtes befestigt.

KIM (2012) prüfte die erforderlichen Substrate für verschiedene Species (Linien) der Gattungen *Methanobrevibacter*, *Methanobacterium* und *Methanospaera*. So benötigt *Methanobrevibacter olleyae* (229/11) für sein Wachstum die Anwesenheit von H_2 und CO_2 . Demgegenüber wächst *Methanobrevibacter ruminantium* (M1) nicht in einem ausschließlichen H_2/CO_2 -Substrat. Es benötigt zusätzlich Acetat oder Formiat und wächst besonders, wenn neben H_2 und CO_2 gleichzeitig zusätzlich eine Kombination von Acetat, Formiat und Methanol vorhanden ist (Tab. 2).

Obwohl die methanogenen Archaeen nur einen kleinen Teil der mikrobiellen Biomasse im Pansen ausmachen, spielen sie somit eine enorm wichtige Rolle in der gesamten Pansenphysiologie. Ihre Fähigkeit, H_2 direkt zu verwerten, reduziert die inhibitorische Wirkung von H_2 auf die gesamte mikrobielle Fermentation im Pansen.

Tab. 2 Effekte verschiedener Substrate für das Wachstum ausgewählter Methanogene

Getestete Methanogene Spezies (Linie/Genotyp)	Substratkombination	beobachtetes Wachstum
<i>Methanobrevibacter olleyae</i> (229/11)	H ₂ /CO ₂	+++
	H ₂ /CO ₂ + Acetat	++
<i>Methanobrevibacter smithii</i> (R4C)	H ₂ /CO ₂	+
	H ₂ /CO ₂ + Acetat	+
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i> (M1)	H ₂ /CO ₂	–
	H ₂ /CO ₂ + Acetat	+ bis +++
	H ₂ /CO ₂ + Formiat	++ bis +++
	H ₂ /CO ₂ + Formiat + Methanol + Acetat	++ bis +++

Quelle: KIM 2012 (gekürzt). – kein Wachstum, + wenig Wachstum, +++ sehr gutes Wachstum.

4.2 Regulation der Genaktivitäten im Rahmen der archaellen Methanogenese

Die Gesamtheit der Gene eines Organismus, egal ob Wirt oder Symbiont, stellt eine riesige Menge an Information dar. Vergleichsweise wenige Gene werden ständig zur Aufrechterhaltung der Grundfunktionen einer lebenden Zelle benötigt. Ihre Aktivität wird reguliert, d.h., sie werden je nach Bedarf „an- oder abgeschaltet“. Als Transkriptom bezeichnet man die Gesamtheit der RNA-Moleküle einer Zelle als Produkte derjenigen Gensequenzen, die gerade „angeschaltet“ sind (= „RNA-Profil“).

SHI et al. (2014) haben sich erstmalig genau dieser Fragestellung im Zusammenhang mit der Methanproduktion bei Schafen gestellt. Sie nutzten zwei Schafgruppen: Schafe mit hoher bzw. niedriger Methanproduktion bei gleicher Diät (*ad libitum*).

Die Struktur der ruminalen mikrobiellen Gemeinschaft zwischen den beiden Schafgruppen erklärte nur einen Teil der Emissionsunterschiede. Keine der beteiligten Domänen (Bacteria, Archaea, Eukaryota) zeigten eine signifikante Veränderung der relativen Häufigkeit zwischen den niedrigen bzw. hohen CH₄-Emittenten (SHI et al. 2014). Demgegenüber war die Genexpression deutlich mit der Methanproduktion gekoppelt. Für sieben von zehn enzymgesteuerten Schritten in der Methanogenese beobachteten SHI et al. (2014) signifikante Zunahmen bezüglich der Häufigkeit der Transkripte je enzymverschlüsselndes Gen bei den hoch CH₄-emittierenden Schafen.

Die Expression von Genen, die an der Methanproduktion beteiligt sind, differierte deutlich zwischen den beiden Schafgruppen. Das deutet darauf hin, dass auch der Genregulation, vielleicht durch die H₂-Konzentration im Pansen oder durch eine tierindividuelle Variation der Verweilzeit des Futters im Pansen gesteuert, eine Bedeutung zukommt.

5. Diskussion

Methanogene gehen eine enge symbiotische Beziehung – zwecks H₂-Transfer mit anderen Mikroorganismen im Pansen, einschließlich Protozoen – ein.

Die Herstellung von H_2 von einer Spezies und seine Verwertung von anderen, die auch als *Inter-Spezies- H_2 -Transfer* bezeichnet wird, ist eine wichtige mikrobielle Interaktion im Pansen. Obwohl die Methanogene nur ca. 1 % bis 4 % an der Gesamtmikrobiellen-Population im Pansen ausmachen, stellt ihre Methanogenese somit einen zentralen Pfad dar, um den anfallenden Wasserstoff „vor Ort“ zu verstoffwechseln.

Ein künftig möglicher Schlüssel zur weiteren Reduktion der Methanproduktion liegt somit darin, alternative Wege zu finden, um den H_2 gleich für solche Produkte zu verwerten, die vorteilhafterweise durch den Wirt (Host) weitergenutzt werden können.

Möglicherweise ist die Beeinflussung der Genexpression zukünftig – neben der gezielten strukturell-funktionellen Beeinflussung des Pansenmikrobioms – ein völlig neuer Weg, die ruminale Methanproduktion der Wiederkäuer gezielt zu verändern.

Schließlich spielt auch der Standort des Wirts mit seinen zugehörigen differenzierten Umwelt- und Fütterungsbedingungen eine Rolle, welche mikrobielle Vielfalt im Host zu finden ist. Es sollte deshalb auch nicht ausgeschlossen werden, dass standortspezifische Aspekte zukünftig zusätzlich zu beachten bleiben und davon abhängig verschiedene Wege bezüglich einer angestrebten Minderung der CH_4 -Emissionen bei Wiederkäuern verfolgt werden müssen. Das Verständnis der symbiotischen Beziehungen innerhalb des ruminalen Mikrobioms sowie zwischen Wirt und seinem ruminalen Mikrobiom bzw. Fütterung und Mikrobiom ist ein wichtiger Schlüssel, um die Milch- und Fleischerzeugung immer effizienter und umweltgerechter zu gestalten. Eine intensivere Grundlagenforschung zu dieser komplexen Thematik wäre auch in Deutschland wünschenswert.

Literatur

- BELANCHE, A., DOREAU, M., EDWARDS, J. E., MOORBY, J. M., PINLOCHE, E., and NEWBOLD, C. H. J.: Shifts in the rumen microbiota due to the type of carbohydrate and level of protein ingested by dairy cattle are associated with changes in rumen fermentation. *J. Nutr.* 142, 1684–1692 (2012)
- BRADÉ, W.: Das ruminale Mikrobiom des Rindes: neuere Erkenntnisse und Ziele aktueller Forschungsaktivitäten. *Prakt. Tierarzt* 95, 67–74 (2014)
- CREEVEY, C. H. J., KELLY, W. J., HENDERSON, G., and LEAHY, S. C.: Determining the culturability of the rumen bacterial microbiome. *Microb. Biotechnol.* 7, 467–479 (2014)
- DURSO, L. M., HARHAY, G. P., SMITH, T. P. L., BONO, J. L., DESANTIS, T. Z., HARHAY, D. H., ANDERSEN, G. L., KEEN, J. K., LAEGREID, W. W., and CLAWSON, M. L.: Animal-to-animal variation in fecal microbial diversity among beef cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4859–4862 (2010)
- DURSO, L. M., WELLS, J. E., HARHAY, G. P., RICE, W. C., KUEHN, L., BONO, J. L., SHACKELFORD, S., WHEELER, T., and SMITH, T. P.: Comparison of bacterial communities in faeces of beef cattle fed diets containing corn and wet distillers' grain with solubles. *Lett. Appl. Microbiol.* 55, 109–114 (2012)
- FLACHOWSKY, G., und BRADÉ, W.: Potenziale zur Reduzierung der Methan-Emissionen bei Wiederkäuern. *Züchtungskde.* 79, 417–465 (2007)
- HUTTENHOWER, C., GEVERS, D., KNIGHT, R., ABUBUCKER, S., BADGER, J. H., et al.: Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486, 207–214 (2012)
- KIM, C. C.: Identification of rumen methanogens, characterization of substrate requirements and measurement of hydrogen threshold. Master-Thesis. Massey-University, Palmerston North, New Zealand (2012)
- KIM, M., KIM, J., KUEHN, L. A., BONO, J. L., BERRY, E. D., KALCHAYANAND, N., FREELY, H. C., BENSON, A. K., and WELLS, J. E.: Investigation of bacterial diversity in the feces of cattle fed different diets. *J. Anim. Sci.* 92, 683–694 (2014)
- LEY, R. E., TURNBAUGH, P. J., KLEIN, S., and GORDON, J. I.: Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022–1023 (2006)
- LI, R. W., CONNOR, E. E., LI, C., BALDWIN, R. L., and SPARKS, M. E.: Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomic tools. *Environ. Microbiol.* 14, 129–139 (2012)

- LIN, C., RASKIN, L., and STAHL, D. A.: Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: comparative analyses using rRNA targeted oligonucleotide probes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 22, 281–294 (1997)
- NAGARAJA, T. G.: A microbiologist's view on improving nutrient utilization in ruminants. <http://dairy.ifas.ufl.edu/rns/2012/11NagarajaRNS2012.pdf> (2012)
- PROCTOR, L. M.: The Human Microbiome: A true story about you and trillions of your closest (microscopic) friends. http://www.actionbioscience.org/genomics/the_human_microbiome.html (2013)
- SHI, W., MOON, Ch. D., LEAHY, S. C., KANG, D., FROULA, J., KITTELMANN, S., FAN, C., DEUTSCH, S., GAGIC, D., SEEDORF, H., KELLY, W. J., ATUA, R., SANG, C., SONI, P., LI, D., PINARES-PATIÑO, C. S., MCEWAN, J. C., JANSSEN, P. H., CHEN, F., VISEL, A., WANG, Z., ATTWOOD, G. T., and RUBIN, E. M.: Methane yield phenotypes linked to differential gene expression in the sheep rumen microbiome. *Genome Res.*, doi:10.1101/gr.168245.113 (2014)
- VON DER SCHULENBURG, A.: Untersuchung der Adaptation des Pansenepithels im zeitlichen Verlauf. Diss., Freie Universität Berlin (2005)
- WU, S., RANSOM, I., BALDWIN 6th, WEIZHONG, L., CONGJUN, L., ERIN, E., CONNOR, E. R., and ROBERT, W. L.: The bacterial community composition of the bovine rumen detected using pyrosequencing of 16S rRNA genes. *Metagenomics 1*, Article ID 235571, doi:10.4303/mg/235571 (2012)

Prof. Dr. habil. Wilfried BRADE
TiHo Hannover und Norddeutsches Tierzuchtberatungsbüro
Zur Koppenheide 8
18181 Graal-Müritz (Ostsee)
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 38206 149807
E-Mail: wilfried.brade@t-online.de

Geist – Gehirn – Genom – Gesellschaft

Wie wurde ich zu der Person, die ich bin?

Vorträge anlässlich der Jahresversammlung
vom 20. bis 22. September 2013 in Halle (Saale)

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 120, Nr. 405
Herausgegeben von Onur GÜNTÜRKÜN (Bochum) und
Jörg HACKER (Halle/Saale)
(2014, 252 Seiten, 54 Abbildungen, 1 Tabelle, 29,95 Euro,
ISBN: 978-3-8047-3322-0)

Die Frage „Wie wurde ich zu der Person, die ich bin?“ betrifft jeden ganz unmittelbar. Der Band zeigt die Bedingungen, Prozesse und Einflussfaktoren auf, die uns in der Interaktion mit unserer Umwelt zu einzigartigen Individuen werden lassen. Er behandelt unser gegenwärtiges Wissen über die natürlichen und kulturellen Wurzeln menschlicher Individualität aus verschiedenen Perspektiven, die von der Humangenetik und Neurobiologie über die Psychologie und die Verhaltens- bzw. Kognitionswissenschaften bis hin zu Philosophie, Wissenschaftsgeschichte und Ethik reichen. In der Sicht der klassischen Bio- und Gesellschaftswissenschaften determiniert die im Genom des Menschen gespeicherte Information im Laufe der frühen Ontogenese den Aufbau des Gehirns, das so entstandene Gehirn schafft den Geist, und durch die Interaktion von Individuen entstehen gesellschaftliche Strukturen. Diese lineare Kausalkette ist aber nach unseren heutigen Erkenntnissen keineswegs vollständig. Gesellschaftliche Strukturen wirken auf das Denken von Individuen zurück, sodass sich Geist und Gesellschaft reziprok beeinflussen. Unser Denken beeinflusst auch unser Gehirn. Neuronale Prozesse wirken auf die Aktivitätsmuster des Genoms zurück. Genom und Gesellschaft interagieren. Geist und Genom stehen ebenfalls in einem Wechselspiel. Der Komplexität dieses Netzwerks aus Geist – Gehirn – Genom – Gesellschaft spürt der Band in vielen Facetten auf aktuellem Wissensstand nach.

Quantifizierung in der Morphologie – Wozu und wie?¹

Rüdiger WANKE (München)

Zusammenfassung

In zahlreichen biomedizinischen Disziplinen haben Messungen und dadurch generierte quantitative Daten eine lange und erfolgreiche Geschichte und werden in der Tat als unverzichtbar erachtet. In den morphologisch orientierten Fachgebieten der Biologie und der Medizin ist dagegen der traditionelle und für lange Zeit der alleinige Untersuchungsansatz rein deskriptiver Natur. Abgesehen von einigen historischen Berichten werden quantitativ-morphologische Untersuchungen erst seit Mitte der 1960er Jahre in größerem Umfang durchgeführt. Seit dieser Zeit hat sich das Gebiet der quantitativen Morphologie in beeindruckender Weise entwickelt und häufig nicht nur als hilfreich, sondern als entscheidend für die Beantwortung einer Vielzahl biomedizinischer Fragestellungen erwiesen.

Durch Quantifizierung können morphologische Befunde objektiv und reproduzierbar erfasst und statistisch ausgewertet werden. Für die Aufklärung von Beziehungen zwischen Struktur und Funktion kann durch quantitativ-morphologische Untersuchungen das notwendige strukturelle Pendant zu funktionellen Datensätzen geliefert werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die durch Messungen ermöglichte Detektion von strukturellen Veränderungen, die durch subjektive Anschauung nicht erkennbar sind. Mikroskopische Untersuchungen von biologischem Material erfolgen üblicherweise an Schnittpräparaten. Die Verwendung von Schnitten ist jedoch verknüpft mit einem Verlust an topologischer Information sowie einer dimensional Reduktion. So präsentieren sich im Schnitt n -dimensionale Objekte als $(n-1)$ -dimensionale Strukturen. Messungen an Schnittpräparaten sind mit Hilfe computergestützter Bildanalyseysteme einfach durchzuführen. Schwierigkeiten ergeben sich jedoch, wenn diese planimetrischen Daten in einem biologischen Sinne interpretiert werden sollen. Für eine räumliche Interpretation von Schnittprofilen dreidimensionaler Objekte sind stereologische Methoden erforderlich.

Abgesehen von traditionellen, auf geometrischen Modellannahmen basierenden Methoden stehen inzwischen zahlreiche modellfreie stereologische Methoden (*design-based stereology*) sowie effiziente Stichprobenverfahren zur Verfügung, wodurch die Einsatzmöglichkeiten der quantitativen Stereologie in der Biomedizin enorm erweitert wurden.

Abstract

In numerous biomedical disciplines measurements and with it generated quantitative data have a long and successful history and are indeed considered as indispensable. The traditional and for a long time the only approach to performing analyses in the morphological disciplines of biology and medicine is purely descriptive in nature, however. Apart from several historical reports quantitative-morphological studies have been performed on a larger scale only since the mid 1960's. Since that time, the field of quantitative morphology has developed in an impressive way and not only proved helpful, but as decisive for answering a wide variety of biomedical questions. By quantifying, morphological findings can be objectively and reproducibly recorded and statistically evaluated. For the elucidation of relationships between structure and function the necessary structural counterpart to functional data sets can be provided by quantitative morphological examinations. Another important aspect made possible by measuring is the detection of structural changes that escape subjective judgement. Microscopic studies of biological material are usually carried out on sections. The use of sections is, however, associated with a loss of topological information, and a di-

1 Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Erwin DAHME in Verehrung zu seinem 90. Geburtstag gewidmet.

mensional reduction, i.e. n -dimensional objects are represented on the sectional plane as $(n-1)$ -dimensional structures. Measurements on sections can easily be performed with computer-assisted image analysis systems. However, difficulties arise when these planimetric data should be interpreted in a biological sense. For a spatial interpretation of profiles from 3-dimensional objects stereological methods are required. Apart from traditional model-based stereological methods numerous model-independent stereological methods (design-based stereology) and efficient sampling designs are available whereby the applications of quantitative stereology in biomedicine were expanded enormously.

1. Einleitung

Die Quantifizierung von Eigenschaften eines Untersuchungsgegenstandes durch Messungen hat in zahlreichen Wissenschaften, wie etwa den Natur- oder den Materialwissenschaften, aber auch in verschiedenen Fachgebieten der Biowissenschaften eine sehr lange Geschichte mit überaus beeindruckenden Erfolgen. Im Unterschied dazu erfolgte in den morphologischen Disziplinen der Biologie und Medizin über lange Zeit lediglich eine qualifizierende Beschreibung von Beobachtungen. Erste Mitteilungen über die Vermessung von Gewebestrukturen sind zwar bereits im Schrifttum des 18. Jahrhunderts zu finden (WEIBEL 1963), in größerem Maße und beflügelt durch die technischen Fortschritte in der Licht- und Elektronenmikroskopie werden jedoch derartige Untersuchungen erst seit den 1960er Jahren durchgeführt. Inzwischen haben sich quantitative Verfahren in den morphologischen Fachgebieten der Biologie und der Medizin einen festen Platz erobert und erweisen sich von zunehmender Bedeutung für die Beantwortung von komplexen biomedizinischen Fragestellungen.

2. Zweck und Ziele der Quantifizierung in der Morphologie

Wenden wir uns zunächst der grundsätzlichen Frage zu, weshalb überhaupt Messungen durchgeführt werden müssen, um morphologische Strukturen unter quantitativen Aspekten mit hinreichender Sicherheit beurteilen zu können.

Das visuelle System des Menschen verfügt über erstaunliche Fähigkeiten bei der Erkennung von Mustern und der Dekomposition komplexer Bilder, ist aber nicht optimiert für die Beurteilung quantitativer Eigenschaften von Objekten wie etwa Größen oder Dichten (WANKE 2002). Die ausgeprägte Befähigung zur visuellen Mustererkennung ermöglicht uns, Objekte selbst dann rasch und sicher identifizieren zu können, wenn diese nur partiell sichtbar oder in stark abstrahierter Form abgebildet sind (Abb. 1). Anschauliche Beispiele hierfür bieten unter anderem skizzenhafte Karikaturen prominenter Persönlichkeiten.

Für die Erfassung von quantitativen Objektmerkmalen ist unser visuelles System dagegen weniger gut geeignet. So bereitet es uns beispielsweise Schwierigkeiten, Aussagen über Unterschiede bezüglich der Größe oder der Zahl von Objekten zu machen, selbst wenn es sich hierbei um einfache geometrische Figuren handelt und wir die zu vergleichenden Abbildungen gleichzeitig und unmittelbar nebeneinander positioniert betrachten können (Abb. 2). Darüber hinaus ist unser visuelles System anfällig für Täuschungen. Dies lässt sich eindrucksvoll anhand der zahlreichen Beispiele für visuelle Illusionen demonstrieren (Abb. 3, 4), die ebenso verblüffend wie faszinierend sind und verschiedenen Kategorien (geometrische Illusionen, Bewegungssillusionen, Farbillusionen, Kontrastillusionen usw.) zugeordnet werden können.

In den Neurowissenschaften werden visuelle Illusionen seit langem genutzt, um das visuelle System und die seiner Funktionsweise zugrundeliegenden neurophysiologischen Prozesse zu erforschen (EAGLEMAN 2001).

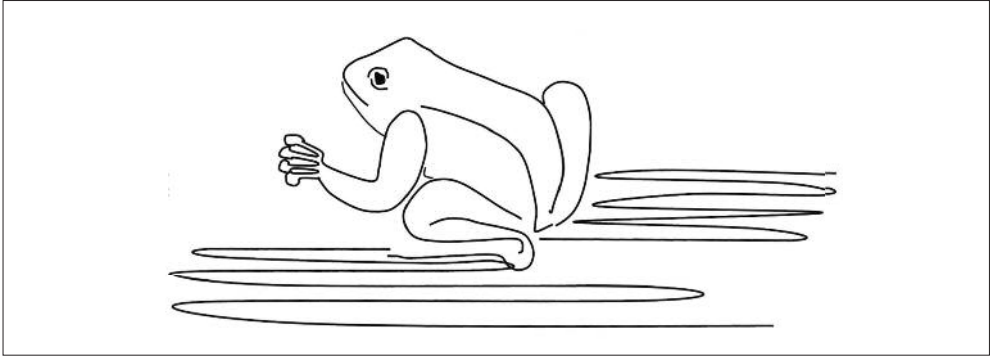


Abb. 1 Beispiel für die Leistungsfähigkeit des menschlichen visuellen Systems bei der Mustererkennung: Wenige Linien genügen, um das dargestellte Objekt erkennen zu können.

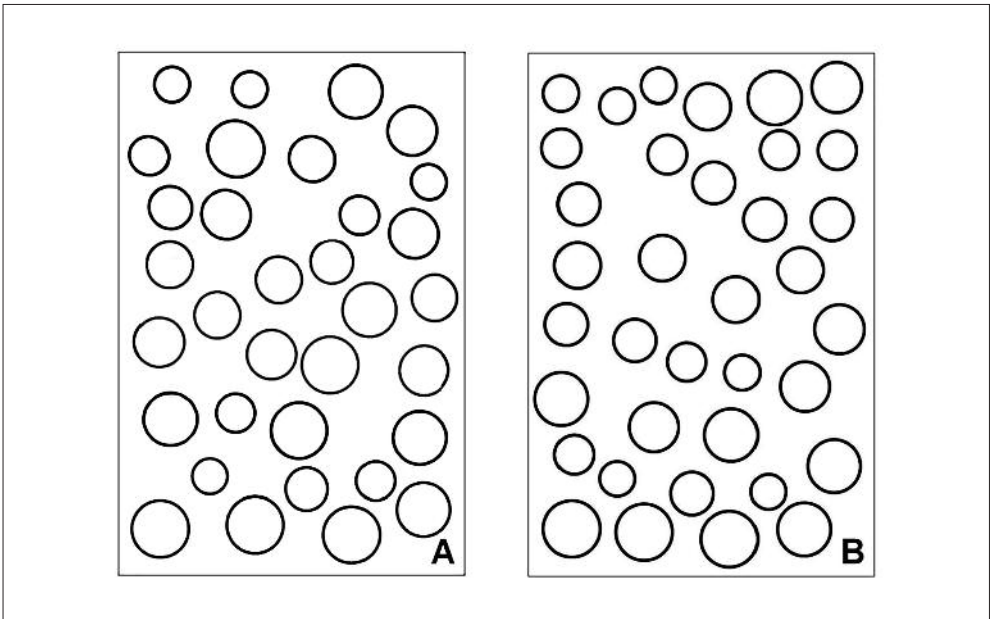


Abb. 2 Beispiel für die limitierten Fähigkeiten des menschlichen visuellen Systems bei der quantitativen Beurteilung von Bildelementen: Ohne Messung respektive Zählung sind die zwischen den Abbildungen A und B bestehenden Unterschiede hinsichtlich der mittleren Größe, der Größenvariation, der numerischen Flächendichte und der Anzahl der Kreisprofile faktisch nicht zu benennen.

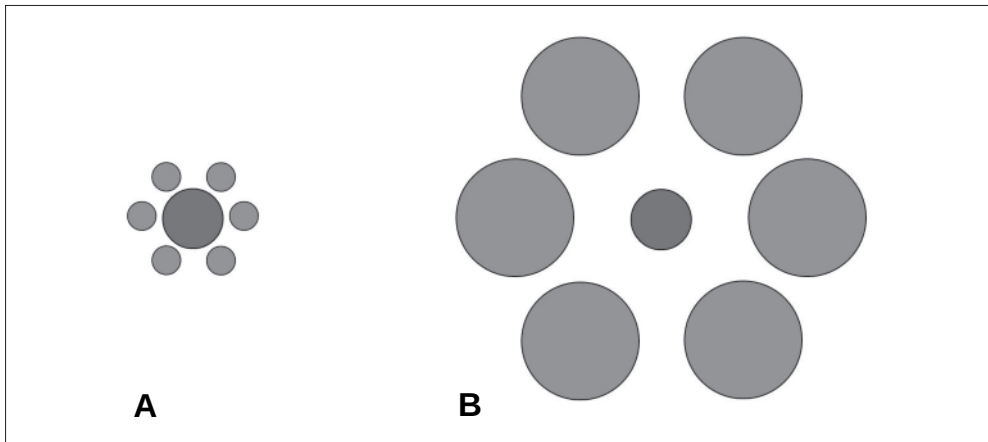


Abb. 3 Visuelle Illusion: Die Kreisscheibe im Zentrum des Ringes aus größeren Kreisscheiben (B) erscheint kleiner als diejenige im Zentrum des Ringes aus kleineren Kreisscheiben (A). Tatsächlich sind die zentralen Kreisscheiben jedoch identisch. Die nach Hermann EBBINGHAUS benannte und auch unter der Bezeichnung Titchener Täuschung bekannte Illusion (KNOL et al. 2015) veranschaulicht, dass die Größenbeurteilung von Objekten durch benachbarte Objekte beeinflusst wird.

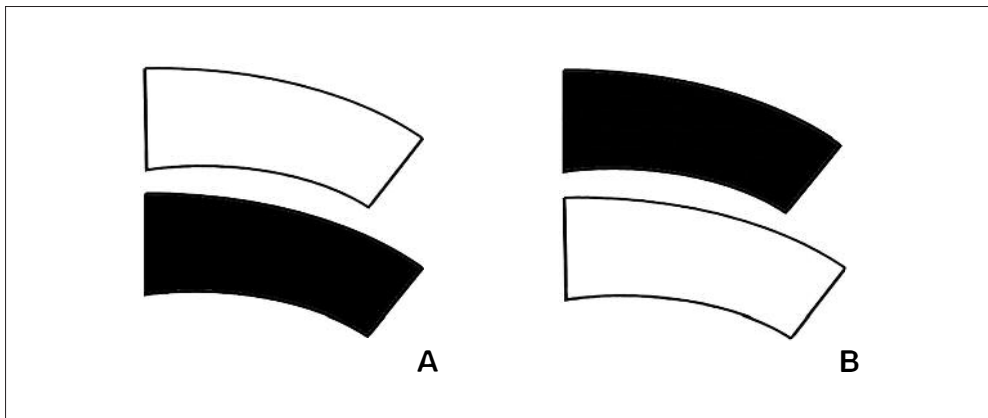


Abb. 4 Visuelle Illusion: In (A) erscheint die untere schwarze Bogenfigur größer als die obere weiße Figur; tauscht man die Figuren aus, so erscheint nunmehr die schwarze kleiner als die weiße Figur. Obwohl alle vier Figuren die identische Größe haben, nehmen wir jeweils die untere Figur als die größere wahr. Joseph JASTROW hat diese Illusion erstmals beschrieben und verwendet, um zu illustrieren, dass sich unser visuelles System bei der vergleichenden Beurteilung von Flächen an der Länge der diese begrenzenden Linien orientiert. Das der Illusion zugrundeliegende Prinzip besteht darin, dass Längenunterschiede gegenübergestellter Grenzlinien auf den Vergleich der Flächeninhalte der Figuren übertragen werden (JASTROW 1892). Die Abbildung wurde dankenswerterweise von Herrn Dr. Andreas BLUTKE, Institut für Tierpathologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, angefertigt.

Bemerkenswert in Bezug auf visuelle Illusionen wie auch andere Sinnestäuschungen ist das Problem der kognitiven Impenetrabilität (BACH und POLOSCHKE 2006). So ändert sich an der täuschenden Wahrnehmung auch dann nichts, wenn wir eine bestimmte visuelle Illusion bereits kennen und wir gegebenenfalls auch noch Informationen über ihr Zustandekommen besitzen.

Die genannten Schwächen unseres visuellen Systems begründen die gegenüber der quantitativen Beurteilung von Bildelementen durch subjektive Anschauung angebrachte Skepsis und liefern ein gewichtiges Argument für die Durchführung von Messungen zur Objektivierung morphologischer Befunde. Zu den Hauptzielen der quantitativen Morphologie gehört somit die Gewinnung von objektiven und reproduzierbaren morphologischen Untersuchungsergebnissen. Wie die rasant angestiegene Zahl entsprechender Publikationen zeigt, haben sich quantitative Methoden inzwischen einen festen Platz in der Anatomie und der Pathologie erobert. Diesbezüglich sei exemplarisch auf einige Übersichtsartikel verwiesen, die sich mit quantitativ-morphologischen Analysen der Lunge (MÜHLFELD et al. 2015), des Gehirns (SCHMITZ und HOF 2005), der Nieren (NYENGAARD 1999), des Herzens (MÜHLFELD et al. 2010) und der Haut (KAMP et al. 2009) befassen.

Einen Anwendungsbereich für quantitativ-morphologische Methoden in der Pathologie bildet die Objektivierung des Schweregrades von Gewebsalterationen. Histopathologische Diagnosen zeichnen sich in aller Regel durch eine hohe Reproduzierbarkeit aus, wohingegen die subjektive Beurteilung des Schweregrades histopathologischer Veränderungen eine hohe Untersuchervariabilität aufweisen und mit erheblichen Fehleinschätzungen verbunden sein kann (BAAK et al. 2002, FRANZÉN et al. 2005). Messdaten erlauben dagegen eine objektive Beurteilung des Schweregrades histopathologischer Veränderungen und liefern gleichzeitig die notwendige Grundlage für eine gegebenenfalls angestrebte statistische Auswertung. Mit den nachfolgenden Anwendungsbeispielen sollen die vielfältigen Nutzungsmöglichkeiten quantitativ-morphologischer Methoden bei der Bearbeitung eines breiten Spektrums biomedizinischer Fragestellungen illustriert werden.

Ein erstes Beispiel bieten unsere Studien an Mausmutanten mit Modellcharakter für die Uromodulin-assoziierten Nephropathien des Menschen. Der Schweregrad der bei zwei, unterschiedliche Mutationen des Uromodulin-Gens aufweisenden Mauslinien auftretenden nephropathologischen Veränderungen (interstitielle Fibrose, Tubulusatrophie, Entzündungszellinfiltrate) wurde durch quantitative Methoden objektiv erfasst und erwies sich als abhängig vom Alter, dem Genotyp und dem Allelstatus. Mit den erzielten Ergebnissen war es erstmals möglich, *in vivo* einen Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt des Auftretens sowie der Geschwindigkeit der Progression dieser Nephropathie einerseits und der Art der ursächlichen Mutation des Uromodulin-Gens sowie dem Allelstatus andererseits aufzuzeigen (KEMTER et al. 2013, WANKE et al. 2015).

Ein wichtiges Anwendungsgebiet quantitativ-morphologischer Methoden in der biomedizinischen Forschung ist die Phänotypcharakterisierung genetisch modifizierter Modellorganismen. Beispiele hierfür bieten die bei diversen neuartigen murinen (HERBACH et al. 2005, 2007, 2011, VAN BÜRCK et al. 2010) respektive porzinen (RENNER et al. 2010, 2013) Diabetesmodellen durchgeführten quantitativ-morphologischen Analysen, die zu wertvollen Erkenntnissen hinsichtlich der krankheitsrelevanten Veränderungen des endokrinen Pankreas geführt und Rückschlüsse auf die beteiligten Pathomechanismen ermöglicht haben. Auch bei der funktionellen Charakterisierung von Komponenten des Wachstumshormon (GH)-IGF-Systems in transgenen Mausmodellen haben sich diese Methoden als überaus hilfreich erwiesen (BLUTKE et al. 2014, 2016, HOEFELICH et al. 2002). Entsprechendes gilt auch für die bei dem weltweit ersten maßgeschneiderten Schweinemodell für die Duchenne-Muskeldystrophie durchgeführten Studien, die eindrucksvoll das Potenzial quantitativ-morphologischer Methoden zur objektiven Charakterisierung und Darstellung der Progression des Krankheitsphänotyps dokumentieren (KLYMIUK et al. 2013).

Einen weiteren wichtigen Anwendungsbereich der quantitativen Morphologie stellt die Überprüfung von Behandlungseffekten dar. So konnte etwa bei einem Mausmodell für den permanenten neonatalen Diabetes mellitus anhand von quantitativ-morphologischen Daten der protektive Effekt einer frühzeitigen Insulinbehandlung auf den Betazellverlust gezeigt werden (KAUTZ et al. 2012). Auch im Rahmen therapieorientierter Studien an Mausmodellen für die Uromodulin-assoziierten Nephropathien (KEMTER et al. 2014) respektive prädiabetischen juvenilen Schweinen (STRECKEL et al. 2015) erwiesen sich quantitativ-morphologische Analysen als essenziell für die Beurteilung von innovativen pharmakologischen Behandlungsansätzen. Bei den bislang aufgeführten Beispielen dienten quantitativ-morphologische Methoden zur objektiven Erfassung morphologischer Befunde respektive zur Objektivierung des Schweregrades von Gewebsalterationen und sollten statistische Auswertungen ermöglichen. Dies ist auch der entscheidende Aspekt bei der Verwendung quantitativ-morphologischer Methoden in der Toxikopathologie (BOYCE et al. 2010).

Ein weiteres Ziel der quantitativen Morphologie kann jedoch auch darin bestehen, nach Veränderungen gewissermaßen zu suchen. So kann durch Messungen die Detektion von strukturellen Veränderungen gelingen, die selbst bei sorgfältiger Betrachtung nicht erkennbar wären. Für eine Reihe von biologischen Strukturparametern konnte gezeigt werden, dass sie eine ähnlich geringe biologische Variabilität aufweisen wie diverse physiologische Parameter (z. B. pH-Wert des Blutes, Körpertemperatur homoiothermer Organismen). Nachdem biologische Strukturen ständigen Umbauprozessen unterliegen, ist das Gleichgewicht zwischen dem Abbau von altem biologischen Material und dem Ersatz durch neues stets bedroht. Bei Parametern mit geringer biologischer Variabilität müssen somit strenge Regulationsmechanismen am Werke sein, um dieses Gleichgewicht aufrecht zu erhalten. Das Ausmaß der interindividuellen Variabilität biologischer Parameter lässt Rückschlüsse auf deren biologische Relevanz zu. So zeichnen sich Parameter mit zentraler Bedeutung für den Organismus meist durch eine sehr geringe biologische Variabilität aus (GUNDERSEN et al. 1980, MATTFELDT 1990). Bei Strukturen mit extrem geringer biologischer Variabilität können daher gegebenenfalls bereits geringfügige Abweichungen zu gravierenden Störungen ihrer Funktion führen. Es wäre somit trügerisch zu unterstellen, dass minimale, nur durch Messungen nachweisbare Veränderungen mehr oder weniger bedeutungslos sein dürften.

Bei diversen Strukturparametern, wie etwa der Breite der podozytären Fußfortsätze oder der Dicke der glomerulären Basalmembran, wäre diese Annahme definitiv falsch (GUNDERSEN et al. 1980, RAYAT et al. 2005). In diesem Zusammenhang ist auch die Bedeutung quantitativer Methoden für die Detektion und Charakterisierung von Frühstadien pathologischer Veränderungen zu erwähnen, die für die Klärung der Pathogenese von besonderem Interesse sind. Ein Beispiel für die Verwendung quantitativ-morphologischer Methoden zur Detektion minimaler struktureller Alterationen bieten im Rahmen der funktionellen Charakterisierung von Kandidatengenen mit potenzieller Relevanz in der Pathogenese von Störungen der glomerulären Filtrationsbarriere sowie der Glomerulosklerose durchgeführte Studien. So konnten bei einem genetisch modifizierten Mausmodell durch quantitative Analysen auf elektronenoptischer Ebene initiale und im Vergleich mit Messdaten der Kontrollgruppe statistisch gesicherte Veränderungen glomerulärer Strukturen detektiert werden, die wichtige Schlussfolgerungen hinsichtlich der Funktion und der pathogenetischen Relevanz des untersuchten Gens respektive Genprodukts ermöglichten (EL-AOUNI et al. 2006).

Als weiteres Beispiel für diesen Verwendungszweck der quantitativen Morphologie können die bei einem robusten transgenen diabetischen Mausmodell durchgeführten Studien

zur detaillierten Dokumentation des Spektrums und der Sequenz Diabetes-assoziiierter renal-er Alterationen genannt werden. Hierbei konnte durch Messungen eine gegenüber Kontrollen signifikante Zunahme des mittleren Volumens der Podozyten als initiale, der glomerulären Hypertrophie vorausgehende Diabetes-assoziierte glomeruläre Veränderung identifiziert werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die bereits in einem sehr frühen Stadium der diabetischen Glomerulopathie nachgewiesene podozytäre Hypertrophie in direktem Zusammenhang mit der Hyperglykämie und nicht als Ausdruck eines durch mechanischen Stress infolge glomerulärer Hypertrophie induzierten adaptiven und damit sekundären Geschehens zu sehen ist, und unterstreichen die Rolle der Podozyten in der Pathogenese der diabetischen Glomerulo-/Nephropathie (HERBACH et al. 2009).

Zu den Hauptzielen der quantitativen Morphologie wird ferner die Aufklärung von Beziehungen zwischen Struktur und Funktion oder zwischen verschiedenen morphologischen Parametern gerechnet (WEIBEL 1981). Im Rahmen von biochemischen, physiologischen, pharmakologischen oder klinischen Untersuchungen werden häufig umfangreiche quantitative Daten generiert. Es ist zumeist wenig befriedigend, als strukturelles Pendant dazu lediglich deskriptive oder semiquantitative Ergebnisse etwa in der Art Alterationsgrad 0/+/++/+++ zur Verfügung zu stellen. Abgesehen von der kritisch zu hinterfragenden Reproduzierbarkeit derartiger semiquantitativer Aussagen erlauben diese keine parametrische Analyse von Struktur-Funktionsbeziehungen.

Vor mehr als zwanzig Jahren wurde von BOLENDER (1992) vorhergesagt, dass quantitativ-morphologische Daten in Bälde für Molekularbiologen ebenso wichtig sein werden wie bereits jetzt für Anatomen, Physiologen oder Pathologen, und dies hat sich als völlig zutreffend erwiesen. Auf die Bedeutung quantitativ-morphologischer Methoden für die Phänotypcharakterisierung einer genetischen Modifikation wurde bereits eingegangen. Hier soll jedoch auf die Relevanz dieser Methoden in Bezug auf Transkriptom- oder Proteomanalysen hingewiesen werden. So werden etwa bei vergleichenden Genexpressionsanalysen von Gewebeproben detektierte Unterschiede in der Abundanz bestimmter Transkripte häufig unkritisch als Ausdruck einer Regulation der Expression („up-regulation“, „down-regulation“) der entsprechenden Gene interpretiert. Diese Schlussfolgerung kann, muss aber keineswegs zutreffend sein, denn ein derartiges Ergebnis kann ebenso gut durch Unterschiede in der zellulären Komposition der analysierten Gewebeproben bedingt sein (SHEN-ORR et al. 2010).

Durch geeignete Stichprobenverfahren und adäquate quantitativ-morphologische Methoden können hinsichtlich ihrer quantitativen Komposition definierte Proben komplexer Gewebe für differentielle Genexpressions- respektive Proteomanalysen bereitgestellt und somit eine Fehlinterpretation der Resultate dieser Analysen vermieden werden. Beispiele für ein entsprechendes Vorgehen bieten Studien zur Erforschung der molekularen Mechanismen der embryomaternalen Kommunikation beim Pferd (MERKL et al. 2010) beziehungsweise Rind (STREYL et al. 2012), wie auch die Untersuchung zyklusabhängiger Veränderungen der Genexpression des equinen Endometriums (GEBHARDT et al. 2012). Einen weiteren Einsatzbereich für quantitativ-morphologische Methoden stellt die klinische Pathologie dar, und sie dient hier beispielsweise zur Überprüfung der Qualität diagnostischer Parameter oder zur Darstellung von strukturellen Determinanten der Prognose (AGGARWAL et al. 2012, MATTFELDT 1990, SØRENSEN 1992). Der Titel dieses Artikels über die Quantifizierung in der Morphologie ist als Frage formuliert und nach den vorangegangenen Ausführungen zur Beantwortung des „Wozu“ soll nunmehr auf das „Wie“ eingegangen werden.

3. Begriffsbestimmungen

Zur Bezeichnung von quantitativ-morphologischen Verfahren werden in der biomedizinischen Literatur die Begriffe „Morphometrie“ und „Stereologie“ häufig synonym gebraucht. Wenn gleich sich gewisse Überschneidungen ergeben, so bestehen doch bei genauer Betrachtung grundsätzliche Unterschiede in der Bedeutung dieser Termini. Der aus den griechischen Wortbausteinen *μορφή* und *μετρική* zusammengesetzte Begriff „Morphometrie“ bedeutet wörtlich übersetzt „Gestaltmessung“ und umfasst letztlich alle Verfahren, die zur Gewinnung von quantitativen Informationen über morphologische Strukturen dienen. Im makroskopischen Bereich sind morphometrische Untersuchungen in der Regel einfach durchzuführen, wie etwa die Bestimmung der Körpergröße.

Die Quantifizierung biologischer Strukturen im mikroskopischen Bereich ist dagegen mit einer Reihe von Problemen konfrontiert, auf die im weiteren Text eingegangen wird. Unter Stereologie ist im Sinne der ursprünglichen Bestimmung dieses Begriffes die Gesamtheit der Methoden zu verstehen, die der räumlichen (griech. *stereos*) Interpretation von Schnittprofilen oder planaren Projektionen dreidimensionaler Objekte dienen (BACH 1963). Demgemäß ist die Stereologie lediglich durch die Zielsetzung definiert, nämlich die Extrapolation aus der Ebene in den dreidimensionalen Raum (MATTFELDT 1990). Stereologische Methoden, deren theoretische Grundlage die stochastische Geometrie ist, kommen in den verschiedensten Disziplinen zur Anwendung, wie etwa der Geologie, den Materialwissenschaften, der Astronomie, der Biologie und der Medizin. Stereologische Untersuchungen haben häufig, aber nicht immer, quantitativen Charakter, so dass zwischen qualitativ-stereologischen Verfahren (z. B. die dreidimensionale Rekonstruktion eines Objekts aus Serienschnitten) und quantitativ-stereologischen Verfahren (z. B. die Bestimmung der Volumenanteile von Mineralien in Gesteinen anhand ihrer an Schliiffpräparaten ermittelten Flächendichten) unterschieden werden kann. Stereologische Analysen haben somit stets dreidimensionalen, aber nicht notwendigerweise quantitativen Charakter, wohingegen morphometrische Untersuchungen stets quantitativer, aber nicht notwendigerweise dreidimensionaler Natur sind.

4. Grundsätzliche Probleme bei quantitativ-mikroskopischen Untersuchungen

Die Schwierigkeiten bei der quantitativ-morphologischen Untersuchung von biologischem Material auf mikroskopischer Ebene sind bedingt durch:

- (a) die geringe Größe der Teilmenge (z. B. histologische Präparate) in Relation zur Grundgesamtheit (z. B. ein bestimmtes Organ);
- (b) strukturelle Eigenschaften des Gewebes;
- (c) die notwendige Gewebepreparation und
- (d) den Umstand, dass für histologische wie auch transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen Schnitte und damit näherungsweise zweidimensionale Proben verwendet werden (TSCHANZ et al. 2014, WANKE 2002).

4.1 Ad (a) Stichprobenumfang

Die bei histologischen Untersuchungen verwendeten Schnittpräparate stellen eine minimale Fraktion des Gesamtgewebes (z. B. eines Organs) dar, und in noch stärkerem Maße gilt dies

für die in der Transmissionselektronenmikroskopie eingesetzten Ultradünnschnitte. Die bei quantitativen Analysen auf licht- oder elektronenmikroskopischer Ebene anzuwendenden Stichprobenverfahren müssen daher hohen Anforderungen genügen. Eine unkritisch durchgeführte Auswahl sogenannter „zufälliger Lokalisationen“, bei denen es sich *de facto* um zwar ungezielt, aber willkürlich ausgewählte Lokalisationen handelt, lässt keine aussagekräftigen Resultate erwarten. Zur Einschätzung einer derartigen, in der Literatur immer wieder zu findenden Vorgehensweise mag das folgende Zitat von GUNDERSEN et al. (1988b) dienen: „If the fields were sampled just because the pathologist liked them the best, the number of profiles may well characterize the pathologist more than the section.“ Eine im statistischen Sinne repräsentative Probenauswahl (*sampling*) ist bei quantitativ-stereologischen Analysen von zentraler Bedeutung. Dabei werden systematische Stichproben mit zufälligem Ausgangspunkt (*systematic uniform random samples*) bevorzugt verwendet, da sie sich gegenüber einfachen Zufallsstichproben durch eine erheblich größere Effizienz auszeichnen (GUNDERSEN und JENSEN 1987). Detaillierte und überaus anschaulich illustrierte Angaben zur Durchführung systematischer Stichprobenverfahren bei einer Vielzahl von Organen finden sich im *Supplemental Material* der Arbeit von ALBL et al. (2016).

4.2 Ad (b) Eigenschaften des Gewebes

Die quantitativ-stereologische Analyse eines Gewebes gestaltet sich grundsätzlich umso aufwendiger, je stärker dessen Aufbau von dem einfachsten geometrischen Modell abweicht, bei dem kugelförmige Objekte gleicher Größe zufällig im Referenzraum verteilt sind (WEIBEL 1979). Als komplizierende Faktoren sind zunächst eine Größenvariation (Polydispersität) oder eine Gestaltsvariabilität (Polymorphie) der zu untersuchenden Elemente zu erwähnen. Weisen die Zielstrukturen eine oder mehrere Vorzugsrichtungen auf (Anisotropie), so sind alle dimensionsbehafteten, an Schnittflächen bestimmten Messgrößen von der Schnittrichtung abhängig. Als weitere problematische Einflussgröße kann eine inhomogene Verteilung der Zielstrukturen im Referenzraum etwa in Form einer geschichteten oder periodischen oder unterschiedlich dichten Anordnung der Elemente genannt werden. Bei biologischem Material kommt erschwerend hinzu, dass häufig mehrere dieser komplizierenden Faktoren kombiniert vorliegen.

4.3 Ad (c) Präparationsartefakte

Die konventionelle Präparation von biologischem Material für lichtmikroskopische Untersuchungszwecke geht mit einer Volumenreduktion einher, die als Einbettungsschrumpfung bezeichnet wird (WEIBEL 1979, HAUG 1980). Deren Ausmaß ist abhängig von der Art des Gewebes, der Art von Fixans und Fixation sowie dem Einbettungsmedium. Der vergleichsweise stärkste Volumenschwund ist bei den in der Histologie routinemäßig verwendeten formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben festzustellen und liegt beispielsweise für Nieren- oder Pankreasgewebe in der Größenordnung von 40 bis 50 % (BANKIR et al. 1988, MARCUSSEN 1990, WANKE et al. 1994) und kann bei menschlichem Hirngewebe 30 bis 70 % betragen (HAUG 1980). Es war der Lübecker Anatom HAUG, der die Abhängigkeit der Einbettungsschrumpfung des Gehirns vom Lebensalter erkannte. Über Jahrzehnte war es geradezu ein Dogma, dass der Alterungsprozess des Menschen naturgemäß mit einem fortschreitenden Verlust von Neuronen in der Großhirnrinde einhergeht. Die Begründung lieferten an Paraffinschnitten der menschlichen Großhirnrinde durchgeführte quan-

titative Untersuchungen, die eindeutig eine größere Dichte von Nervenzellen im *Cortex cerebri* jüngerer im Vergleich zu älteren Individuen dokumentierten. HAUG konnte jedoch nachweisen, dass im Rahmen der paraffinhistologischen Präparation das Hirngewebe jüngerer Individuen signifikant stärker als das älterer Individuen schrumpft. Dadurch rücken die Nervenzellen bei der Einbettung des Hirngewebes jüngerer Menschen im Vergleich zu dem älterer Menschen enger zusammen, was die im Paraffinschnittmaterial festgestellten Unterschiede in der numerischen Dichte der Neuronen erklärt. Nach Korrektur der Daten durch Berücksichtigung der individuellen Einbettungsschrumpfung waren keine altersabhängigen Unterschiede in der Gesamtzahl von Nervenzellen im *Cortex cerebri* mehr nachweisbar (HAUG 1985). Dieses Beispiel zeigt, dass eine scheinbare Nebensächlichkeit, wie die Einbettungsschrumpfung, sich in Wirklichkeit als entscheidend für biologische Schlussfolgerungen herausstellen kann. Gleichzeitig dokumentiert diese Studie eindrucksvoll, dass Relativwerte – wie hier die numerische Dichte der Neuronen im *Cortex cerebri* – in aller Regel keine biologische Interpretation ermöglichen. Der aussagekräftige Parameter war hier die absolute Zahl der Neuronen in der Großhirnrinde. Die Studie gibt auch Anlass zur Kritik an der weit verbreiteten Meinung, dass die Berücksichtigung von systematischen Fehlern, wie in diesem Fall von Präparationsartefakten, überflüssig sei, da sich diese bei verschiedenen Individuen oder Gruppen in gleicher Weise auswirken würden. Die von uns im Rahmen stereologischer Untersuchungen des murinen Pankreas, bei unter streng standardisierten Bedingungen prozessierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben, festgestellten Unterschiede im Ausmaß der Einbettungsschrumpfung (WANKE et al. 1994) hätten im Falle ihrer Nichtbeachtung zu einer Überschätzung der interindividuellen Variation geführt, was eine Verzerrung von statistischen Ergebnissen bedingen kann. Die Berücksichtigung des individuellen Ausmaßes von Präparationsartefakten kann somit zu einer Reduktion von Tierzahlen in tierexperimentellen Studien im Sinne des 3R-Konzeptes (*replace, reduce, refine*) beitragen.

4.4 Ad (d) Problematik der Verwendung von Schnitten

Dreidimensionale Strukturen stellen sich in näherungsweise zweidimensionalen Schnitten um eine Dimension reduziert dar. Volumina präsentieren sich als Flächen, Oberflächen als Linien und Längen als Punkte. Die dimensionslose Zahl von Partikeln wird in Schnitten überhaupt nicht dargestellt. Volumen-, Oberflächen- oder Längendichten von Strukturen können anhand zufällig orientierter Schnitte systematisch gewonnener Proben erwartungstreu geschätzt werden. Problematisch erweist sich dagegen, anhand von Schnitten die Zahl von Partikeln zu ermitteln. Im Schnitt kann lediglich die Zahl der Schnittprofile pro Flächeneinheit bestimmt werden. Dieser planare Parameter (numerische Flächendichte) ist jedoch nicht nur von der Zahl der Partikel pro Volumeneinheit (numerische Volumendichte), sondern auch von deren Ausdehnung senkrecht zur Schnittebene (orthogonale Linearprojektion) und der Schnittdicke abhängig. Bei Anisotropie der Zielstrukturen spielt zusätzlich die Schnittrichtung eine Rolle (MATTFELDT 1990). Letzteres ist zum Beispiel durch die bei gleicher Referenzfläche größere Anzahl von Kernprofilen in Quer- im Vergleich zu Längsschnitten der Skelettmuskulatur erkennbar. Es gibt somit keinen direkten Weg, um von der numerischen Flächendichte zur numerischen Volumendichte zu gelangen. Gerade die numerische Volumendichte und die damit – durch Multiplikation mit dem Volumen des Referenzkompartiments – zu ermittelnde Zahl von Teilchen (beispielsweise Zellen) stellen jedoch zentrale Zielparameter in vielen biomedizinischen Studien dar und sind daher von besonderem Interesse. Da Partikel unterschiedlicher

Größe von einem Schnitt mit einer zu ihrer linearen Ausdehnung senkrecht zur Schnittnormalen („Höhe“) proportionalen Wahrscheinlichkeit getroffen werden, zeigt ein Schnittpräparat eine systematisch verzerrte Stichprobe der Partikelpopulation (Abb. 5). Dies erklärt, weshalb an histologischen Präparaten erzielte Messergebnisse nicht ohne weiteres mit denen von zytologischen Ausstrichpräparaten zu vergleichen sind. Man sollte auch nicht der Versuchung erliegen, eine höhere numerische Flächendichte von Zell- oder Kernprofilen im histologischen Schnitt als klaren Beleg für eine höhere Dichte der Zellen im Gewebe oder eine Zellproliferation zu werten. Ein solcher Befund kann sich ebenso bei einer Vergrößerung der linearen Ausdehnung etwa infolge einer Hypertrophie oder Polymorphie numerisch unveränderter Zellen oder Zellkerne ergeben, die dann mit einer größeren Wahrscheinlichkeit vom Schnitt getroffen werden.

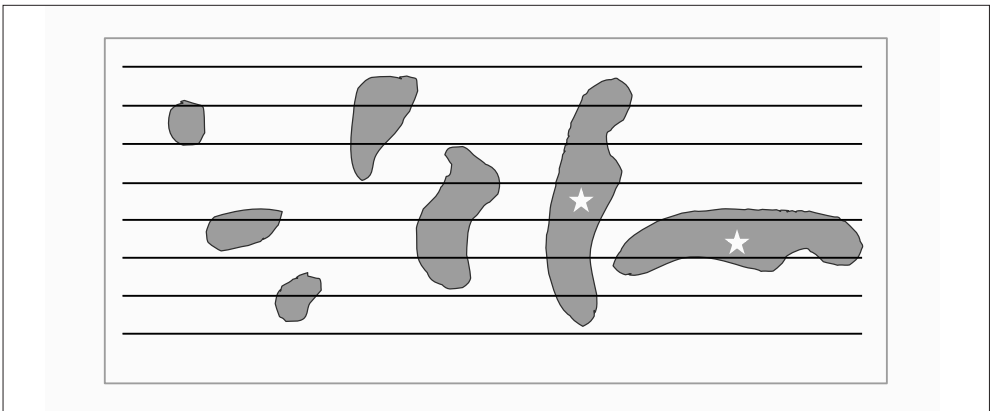


Abb. 5 Die schematische Darstellung einer von der Seite betrachteten Gruppe von Partikeln soll veranschaulichen, dass ein histologischer Schnitt eine verzerrte Stichprobe einer Partikelpopulation enthält. Die horizontalen Linien symbolisieren Schnittebenen. In Abhängigkeit von ihrer orthogonalen Linearprojektion werden die Partikel unterschiedlich häufig getroffen. Wie die mit einem Stern gekennzeichneten Figuren zeigen, können selbst identische Partikel lediglich aufgrund ihrer Orientierung mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit getroffen werden.

Nur mittels stereologischer Methoden kann zwischen diesen Alternativen unterschieden werden (GUNDERSEN 1986, CRUZ-ORIVE 1987a, MATTFELDT 1990). Computergestützte Bildanalysesysteme ermöglichen, verhältnismäßig einfach und rasch morphometrische Befunde an Schnittpräparaten zu erheben. Eine kürzlich erschienene Studie über die in der Lungenforschung eingesetzten quantitativ-morphologischen Methoden ergab, dass in der Mehrzahl der ausgewerteten Publikationen morphometrische (nicht-stereologische) Methoden zum Einsatz kamen (MÜHLFELD et al. 2015). Für bestimmte Fragestellungen können die damit gewonnenen planimetrischen Daten ausreichend sein (NEWBOLD et al. 1989). Schwierigkeiten ergeben sich jedoch, wenn das mit diesen Verfahren generierte Datenmaterial in einem biologischen oder medizinischen Sinne interpretiert werden soll. In den meisten biomedizinischen Studien dürfte jedoch die Verwendung quantitativ-morphologischer Methoden genau dies zum Ziel haben. Die Möglichkeit der relativ einfachen morphometrischen Auswertung von Schnittpräparaten mit Hilfe von Bildanalysesystemen sollte nicht zu der Vorstellung führen, dass auf die quantitative Stereologie verzichtet werden könnte. MATTFELDT (1990) bringt diesen Sachverhalt

klar zum Ausdruck, indem er darauf hinweist, dass „Bildanalyse ohne jegliche Stereologie nicht mehr ist als die exakte Beschreibung eines vom Menschen erzeugten Artefakts, nämlich des histologischen Schnittes“.

5. Historische und methodische Aspekte der Stereologie

Die Stereologie existiert als eigenständige interdisziplinäre Wissenschaft erst seit dem Jahre 1961 (BACH 1963). Am 11. und 12. Mai 1961 fand auf Anregung von Hans ELIAS von der *Chicago Medical School* im Hotel Feldberger Hof im Schwarzwald ein Kolloquium zum Thema „Räumliche Deutung zweidimensionaler Bilder und Schnitte“ statt. Bei den insgesamt zehn Teilnehmern handelte es sich um Angehörige der Disziplinen Anatomie, Pathologie, Histologie, Ingenieurwissenschaften und Mathematik. Im Anschluss an die Vorträge und Diskussionen wurde der Beschluss gefasst, eine wissenschaftliche Gesellschaft zu gründen, deren Hauptanliegen die räumliche Deutung von Schnitten und Projektionsbildern sein sollte. Es galt nunmehr, einen Begriff zu finden, der dieses Anliegen in einem Wort widerspiegeln sollte. Von Hans ELIAS wurde hierfür eine Zusammensetzung aus den griechischen Worten *σtereος* (räumlich) und *λογος* vorgeschlagen. Nachdem sich die Tagungsteilnehmer durch eine telefonische Rückfrage bei der Universitätsbibliothek Freiburg versichert hatten, dass ein solcher Begriff noch nicht existierte, wurde der Vorschlag von Hans ELIAS akzeptiert, und es erfolgte die Gründung der Internationalen Gesellschaft für Stereologie (*International Society for Stereology*).

Der erste internationale Kongress für Stereologie fand vom 18. bis 20. April 1963 in Wien statt (HAUG 1987). Erst viele Jahre später wurde entdeckt, dass die seinerzeit bei der Universitätsbibliothek Freiburg eingeholte Auskunft nicht richtig gewesen war. So fand sich in einer im Jahre 1897 erschienenen Ausgabe von PETRIS *Handbuch der Fremdwörter in der deutschen Schrift- und Umgangssprache* der Begriff „Stereologie“, der damals als Bezeichnung für die sogenannte Kreuzlehre diente, die sich mit der Erklärung aller Arten von Kreuzen auf Münzen, in Wappen und Urkunden befasste (CRUZ-ORIVE 1987a). Diese Bedeutung des Begriffs Stereologie hat inzwischen lediglich historischen Charakter. Wichtige Grundlagen und Prinzipien der Stereologie sind keineswegs neu, sondern lassen sich zum Teil bis in die Antike zurückverfolgen (euklidische Geometrie) und haben somit ebenso historischen Charakter, sind jedoch von größter aktueller Relevanz.

Die erste konkrete Beschreibung einer quantitativ-stereologischen Methode erfolgte im Jahr 1847 durch den französischen Geologen Auguste DELESSE (WEIBEL 1979, MATTFELDT 1990). Zur Bestimmung der Volumendichten von Mineralien in Gesteinen fertigte er Schliffpräparate des Gesteins an, bedeckte diese mit transparentem Papier, zeichnete auf diesem die Konturen der Mineralienprofile nach, verklebte das Papier mit Stanniol, schnitt dieses entsprechend den Markierungen in Teile und wog diese. Er konnte zeigen, dass die indirekt anhand der Gewichtsverhältnisse der jeweiligen Stanniolabschnitte bestimmten Flächenanteile (AA) der Mineralien an den angeschliffenen Gesteinsflächen den Volumendichten (VV) der Mineralien in den Gesteinsproben entsprachen. Die Schätzung der Volumendichte aus der Flächendichte gehört zu den wichtigsten stereologischen Methoden und wird heute als das Prinzip von DELESSE ($VV = AA$) bezeichnet. Der österreichische Geologe August ROSIWAL modifizierte die sehr mühsame Flächenanalyse von DELESSE und entwickelte das Verfahren der linearen Integration zur „ziffermäßigen Feststellung des Quantitätsverhältnisses der Mineral-

bestandtheile gemengter Gesteine“ auf mikroskopischer Ebene (ROSIWAL 1898). Er verwendete Dünnschliffpräparate, deren Deckgläser mit Testlinien versehen waren. Mit Hilfe eines Okularmikrometers war es ihm möglich, die einem bestimmten Mineral zufallende Testlinienlänge zu bestimmen, deren Verhältnis zur Gesamtlänge der Testlinien (LL) den Volumenanteilen der jeweiligen Mineralien an dem Gestein (VV) entsprach. Als weitere Vereinfachung der Bestimmung von Volumendichten wurde unabhängig von den Geologen Ellis THOMSON (1930) und Andrei GLAGOLEV (1933) das Punktzählverfahren eingeführt. Dünnschliffe von Gesteinen wurden mit einem Punktgitter überlagert, und der Quotient aus der Anzahl der bestimmte Mineralien treffenden Punkte und der Gesamtzahl der die Bezugsfläche treffenden Punkte entsprach dem Volumenanteil der Mineralien an dem Gestein. Für das Punktzählverfahren (*point counting technique*) wird daher in der deutschsprachigen Literatur auch die Bezeichnung „Treffermethode“ verwendet. Verkürzt dargestellt gilt somit für die Volumendichte einer Zielstruktur im Referenzkompartiment VV (Zielstruktur/Referenzkompartiment): $VV = AA$ (Prinzip von DELESSE) = LL (lineare Integration nach ROSIWAL) = PP (Punktzählverfahren nach THOMSON respektive GLAGOLEV).

Eine außerordentlich wichtige Methode zur Bestimmung absoluter Volumina interessierender Strukturen verdanken wir dem italienischen Mathematiker Bonaventura CAVALIERI, der ein Schüler von Galileo GALILEI war. Das Prinzip von CAVALIERI besagt, dass Körper mit inhaltsgleichen Querschnittsflächen in gleichen Höhen ein gleiches Volumen haben. Damit ist es möglich, das Volumen eines Körpers nach vollständiger planparalleler, äquidistanter Lamellierung aus der Flächensumme aller Querschnitte und deren Distanz erwartungstreu zu bestimmen. Die Methode erlaubt die Volumenbestimmung beliebig gestalteter Körper sowie von Strukturen, die in andere Gewebe eingebettet und präparatorisch nur bedingt zu isolieren sind (z. B. Inselapparat des Pankreas, infiltrativ wachsende Tumoren) oder auch von inneren Hohlräumen (z. B. Herz- oder Hirnventrikel) und kann für die Bestimmung der Einbettungsschrumpfung von Geweben genutzt werden (GUNDERSEN und JENSEN 1987, MATTFELDT 1990, WANKE 1994).

Essenzielle mathematische Grundlagen für die moderne Stereologie wurden bereits im 18. und dem frühen 19. Jahrhundert geschaffen. Georges-Louis LECLERC, der spätere COMTE DE BUFFON, stellte in seinem im Jahre 1777 veröffentlichten *Essai d'Arithmétique morale* erstmals seine Studien über die zufällige Auslegung geometrischer Figuren in der Ebene vor und gilt daher als Begründer der Theorie der geometrischen Wahrscheinlichkeiten. Eine der wichtigsten und für die stochastische Geometrie bis heute bedeutsamen Aufgaben, mit der sich BUFFON befasste, ist als das Nadelproblem von BUFFON bekannt. Die Frage, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, dass eine zufällig auf ein Papier mit äquidistanten parallelen Linien geworfene Nadel, deren Länge geringer als der Abstand der Linien ist, eine der Linien trifft, konnte BUFFON mit Hilfe der Integralrechnung korrekt beantworten. Dieselbe Lösung für das Nadelproblem fand auch Pierre-Simon DE LAPLACE, der mit seiner im Jahre 1812 veröffentlichten *Théorie Analytique des Probabilités* ein klassisches Hauptwerk der Wahrscheinlichkeitstheorie verfasst hatte, die ein wesentliches Element des mathematischen Fundaments der modernen Stereologie darstellt (HYKŠOVÁ et al. 2012, MATTFELDT 1990).

Betrachtet man die historische Entwicklung der Stereologie und ihres Methodenrepertoires, so lassen sich mehrere Phasen unterscheiden (WEIBEL 1987, 1989, MATTFELDT 1990). In der ersten, bis etwa 1960 reichenden Phase, wurden quantitativ-morphologische Fragestellungen überwiegend pragmatisch bearbeitet, eine verbindende mathematische Grundlage war noch nicht existent, und die Überprüfung der Gültigkeit der erzielten Resultate erfolgte, wenn über-

haupt, durch Experimente an einfachen Modellen. Es gab jedoch auch Ausnahmen davon, und einige der in dieser Zeit entwickelten stereologischen Methoden werden bis heute immer wieder aufgegriffen. Ein Beispiel hierfür bietet eine der ersten Mitteilungen über quantitativ-stereologische Untersuchungen an biologischem Material, die von dem dänischen Mathematiker S. D. WICKSELL (1925) stammt. Er widmete sich der Aufgabe, die Größenverteilung von Milzfollikeln anhand von histologischen Schnittpräparaten zu ermitteln. Unter der Annahme eines idealisierten geometrischen Modells für die Follikel fand er, mit Hilfe von Methoden der geometrischen Wahrscheinlichkeitstheorie, eine Lösung für das von ihm so bezeichnete „corpuscle problem“.

In dieser Phase wurden auch bis heute gültige Methoden für die Bestimmung von diversen stereologischen Parametern wie etwa Längen- oder Oberflächendichten entwickelt. Dabei ist zu bemerken, dass die gleichen Probleme mehrfach von verschiedenen Wissenschaftlern bearbeitet und die gefundenen, übereinstimmenden Lösungen immer wieder aufs Neue publiziert worden sind. So wurden etwa die Methode der Bestimmung von Oberflächendichten dreidimensionaler Strukturen an Schnittprofilen mit Hilfe von Testlinien und die hierfür gültigen Formeln in dem Zeitraum von 1945 bis 1956 in sieben verschiedenen Publikationen mitgeteilt (WEIBEL 1979). Dies macht die schlechte Kommunikation zwischen den mit stereologischen Fragestellungen befassten Wissenschaftlern in der damaligen Zeit deutlich. Die Gründung der Internationalen Gesellschaft für Stereologie im Jahre 1961 läutete die zweite, bis zum 2. Internationalen Kongress für Stereologie, der 1967 in Chicago stattfand, reichende Phase ein.

Ein unmittelbarer und wichtiger Effekt der Gründung dieser Gesellschaft war, dass mit mikroskopischen Untersuchungen befasste Wissenschaftler verschiedener Disziplinen (Materialwissenschaften, Biologie, Medizin) sowie Mathematiker auf internationaler Ebene miteinander in Kontakt kamen und gemeinsam begannen, nach Lösungen für Probleme quantitativ-mikroskopischer Analysen zu suchen. Dies hatte eine deutlich stärkere Beachtung und einen vermehrten Einsatz stereologischer Methoden, vor allem in der Histologie und der Zellbiologie, zur Folge. In dieser Phase entstand die sehr häufig verwendete und bis heute relevante Methode von WEIBEL und GOMEZ (1962) zur Bestimmung der numerischen Dichte und des mittleren Volumens von Partikeln, die näherungsweise als Kugeln, Rotationsellipsoide oder Zylinder betrachtet werden können. Diese Methode erfreut sich beispielsweise bei der quantitativen Analyse von Nierenglomerula großer Beliebtheit (SAMUEL et al. 2007), da sie eine Reihe von Vorzügen gegenüber alternativen, auf geometrischen Modellannahmen für die Glomerula beruhenden Verfahren aufweist. Ebenfalls in dieser Phase wurde eine wichtige stereologische Methode zur Schätzung der Dicke von Membranen entwickelt (WEIBEL und KNIGHT 1964). In der sich daran anschließenden, zeitlich nicht eindeutig zu begrenzenden dritten Phase der Entwicklungsgeschichte der Stereologie erfolgte eine mathematische Konsolidierung sowie eine Steigerung der Effizienz und eine enorme Erweiterung des Spektrums stereologischer Methoden. Ermöglicht wurde dies durch eine stärkere Berücksichtigung von Methoden der geometrischen Wahrscheinlichkeitstheorie und der Statistik. Ein erster wichtiger Beitrag von grundlegender Bedeutung, auch für spätere methodische Entwicklungen, war die Einführung des erwartungstreuen Testfeldes zur korrekten Zählung beliebiger Profile in Schnittebenen durch GUNDERSEN (1977). Andere Zählregeln, wie etwa die in der Hämatologie gebräuchliche Zählkammerregel, können bei histologischen Schnitten zu verzerrten Ergebnissen führen und sind daher für diese Zwecke ungeeignet (GUNDERSEN et al. 1988b).

Eine für quantitativ-stereologische Analysen wichtige Arbeit wurde von SCHERLE (1970) vorgelegt. Bei der quantitativ-stereologischen Untersuchung von Gewebestrukturen gelangt

man zunächst zu Relativwerten – wie etwa Volumen- oder Längendichten – und erst in einem zweiten Schritt durch Multiplikation mit dem Volumen des Referenzraumes zu Absolutwerten (z. B. Gesamtvolumen der Zielstruktur). Viele Untersucher verzichten auf diesen zweiten Schritt oder können diesen, weil beispielsweise im Rahmen einer retrospektiven Studie auf archivierte eingebettete Gewebeproben zurückgegriffen wurde, nicht vornehmen und ziehen Schlussfolgerungen aus den Relativwerten. Dabei wird mehr oder weniger stillschweigend unterstellt, dass etwaige quantitative Veränderungen zwar die Zielstruktur, nicht aber die Bezugsgröße betreffen. Dies ist jedoch bei biologischem Material häufig nicht gewährleistet (GUNDERSEN 1986, MATTFELDT 1990). Unter Umständen können sich die Volumina von Objekt- und Referenzphase gleichsinnig verändern und somit eine normalanatomische Situation suggerieren, wohingegen die Absolutwerte schwerwiegende pathologische Prozesse erkennen lassen. Auf entsprechende Befunde weisen GUNDERSEN und JENSEN (1987) hin. Umgekehrt kann sich eine Veränderung des Relativwertes durch alleinige Zu- oder Abnahme des Referenzvolumens ergeben und damit eine Veränderung der Zielstruktur vorgetäuscht werden. So ergaben beispielsweise stereologische Untersuchungen bei Ratten nach Adriamycingabe eine signifikant dichtere Kapillarisation der Herzmuskulatur. Ohne die Absolutwerte, die zeigten, dass der Befund ausschließlich auf einer Reduktion des Referenzvolumens (linksventrikuläres Myokard) infolge Myokardatrophie bei nephrotischem Syndrom beruhte, hätte die Gefahr einer Fehlinterpretation, etwa im Sinne einer Kapillarproliferation, bestanden (MATTFELDT 1990). Ein entsprechendes Beispiel bietet auch die bereits erwähnte Studie von HAUG (1985) zur Frage altersabhängiger Nervenzellverluste in der Großhirnrinde des Menschen.

Zur Bezeichnung des Risikos, aufgrund der isolierten Betrachtung von stereologischen Relativwerten zu falschen Schlussfolgerungen zu gelangen, dient der von BRAENDGAARD und GUNDERSEN (1986) eingeführte Begriff „reference trap“. Um eine sinnvolle biologische Interpretation quantitativ-stereologischer Daten zu ermöglichen, muss daher vor der Entnahme von Proben das Volumen des Referenzraumes (z. B. eines Organs) zur Erzielung stereologischer Absolutwerte bestimmt werden. Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, das Volumen der Probe als Quotient aus deren Gewicht und Dichte zu berechnen. Um Informationen über die Dichte des Gewebes zu erhalten, sind jedoch Volumenbestimmungen notwendig. Zur Bestimmung des Volumens eines Untersuchungsobjekts (z. B. eines Organs) steht einerseits die auf dem Prinzip von ARCHIMEDES basierende Submersionsmethode nach SCHERLE (1970) und andererseits die Volumetrie nach dem bereits erwähnten Prinzip von CAVALIERI zur Verfügung. Die Cavalieri-Methode hat den Vorteil, dass möglicherweise eigentlich interessierende Komponenten des Untersuchungsobjekts (z. B. Rinde *versus* Mark der Niere) volumetrisch bestimmt werden können und darüber hinaus die dabei erfolgende planparallele äquidistante Lamellierung des Objekts bereits den ersten Schritt des bei stereologischen Untersuchungen bevorzugten Stichprobenverfahrens darstellt. Stereologische Methoden sind stochastischer Natur und erfordern daher eine Randomisierung der Proben und für die Bestimmung von diversen Parametern wie Oberflächen- oder Längendichten zusätzlich eine Randomisierung der räumlichen Orientierung der Proben. Die Entwicklung ausgeklügelter Stichprobenverfahren war daher für die quantitative Stereologie von zentraler Bedeutung (CRUZ-ORIVE und WEIBEL 1981, GUNDERSEN und JENSEN 1987). Ziel dieser Verfahren ist es, allen Teilen des Untersuchungsgegenstandes die gleiche Wahrscheinlichkeit zu verleihen, in die Auswahl zu gelangen (*uniform random sampling*), und dieses Prinzip muss auf allen Auswahlbenen angewandt werden (Auswahl der Individuen, der Gewebeproben, der Schnittpräparate, der Gesichtsfelder und schließlich der Testfelder).

Stereologische Methoden liefern somit immer Schätzwerte. Formulierungen wie „das Volumen des Objekts wurde mit der Methode von CAVALIERI geschätzt“ werden gelegentlich in einem umgangssprachlichen Sinne als mehr oder weniger genaue Abschätzung missverstanden. Tatsächlich handelt es sich jedoch um mathematisch-statistische Schätzwerte, deren Qualität anhand der Kriterien Erwartungstreue, Präzision und Genauigkeit beurteilt werden kann. Diese Kategorien sind in der Stereologie von grundlegender Bedeutung. Die Erwartungstreue (*unbiasedness*) einer Schätzfunktion besagt, dass der mathematische Erwartungswert des Schätzers dem wahren Wert entspricht. Ein erwartungstreuer Schätzer ist somit frei von Verzerrungen (systematischer Fehler, *bias*).

Dieses Kriterium hat in der dritten Entwicklungsphase der Stereologie eine herausragende Rolle gespielt und soll daher an einem einfachen Beispiel veranschaulicht werden. Nehmen wir an, wir hätten eine Schüssel mit Tomatensalat vor uns, für den in Scheiben geschnittene Tomaten verwendet wurden, und wir würden uns dafür interessieren, aus wie vielen Tomaten dieser Salat zubereitet wurde und wie groß diese waren. Unter der Annahme, dass der Salat aus rundlichen Tomaten gefertigt wurde, würden wir eine Kugelgestalt als geometrisches Modell verwenden und wären mit Hilfe relativ einfacher Methoden der modellabhängigen quantitativen Stereologie in der Lage, die richtige Antwort auf diese Frage zu finden. Da wir nur eine Stichprobe des Salates benötigen würden, bliebe noch genug für die Mahlzeit übrig. Wären jedoch für den Salat senkrecht zu ihrer Längsachse planparallel lamellierte längliche San-Marzano-Tomaten verwendet worden, so dass wir anhand der Gestalt der Scheiben keinen Verdacht schöpfen würden, kämen wir mit unserem modellabhängigen Auswertungsansatz zu einem systematisch fehlerbehafteten Ergebnis. Die Präzision (*precision*) wird durch die Varianz des Schätzwertes beschrieben und stellt ein Maß für die Übereinstimmung unabhängiger Messergebnisse dar. Die Kategorien Erwartungstreue und Präzision sind daher streng zu unterscheiden. Würden wir etwa aus unserem San-Marzano-Tomatensalat mehrere Stichproben ziehen und die Scheiben wiederholt und sehr genau vermessen, so wäre damit nichts anderes erreicht, als ein falsches Ergebnis sehr präzise zu bestimmen.

Die Präzision wird auch als Wiederholgenauigkeit bezeichnet, und dies mag ein Grund dafür sein, dass die Begriffe Präzision und Genauigkeit häufig fälschlicherweise synonym gebraucht werden. Die Genauigkeit (*accuracy*) stellt jedoch ein Maß für die Gesamtabweichung des Schätzwertes vom wahren Wert und insofern eine Kombination aus Erwartungstreue und Präzision dar (WALTHER und MOORE 2005). Theoretische und empirische Resultate stimmen darin überein, dass systematische Stichproben mit zufälligem Ausgangspunkt (*systematic uniform random samples*) bei quantitativ-stereologischen Untersuchungen einfachen Zufallsstichproben in Bezug auf die Effizienz weit überlegen sind (GUNDERSEN und JENSEN 1987, MATTFELDT 1990, HOWARD und REED 2005). Diese zeichnen sich dadurch aus, dass mit der streng zufälligen Festlegung des ersten Stichprobenelements alle weiteren Elemente definiert werden. Bei diesem Verfahren könnten sich lediglich bei periodisch angeordneten Strukturen Probleme ergeben, was bei der Planung des Stichprobenverfahrens zu berücksichtigen ist. Zu beachten ist ferner, dass bei systematischen Zufallsstichproben die Genauigkeit der Schätzwerte nicht wie bei einfachen Zufallsstichproben bestimmt werden kann. Für einfache Zufallsstichproben mit unabhängigen Elementen gilt, dass die Varianz des Stichprobenmittelwertes proportional zum Reziprokwert der Anzahl der Stichprobenelemente abnimmt, so dass der Standardfehler des Mittelwertes einfach als Quotient aus der Standardabweichung und der Quadratwurzel der Stichprobenzahl geschätzt werden kann. Systematisch zufällig ausgewählte Stichprobenelemente sind jedoch untereinander

abhängig, so dass dieses einfache Verfahren nicht anwendbar ist und zu erheblichen Fehlern führen würde.

Dieses Problem wurde gelöst, und inzwischen stehen geeignete Verfahren zur Schätzung des relativen Standardfehlers systematischer Zufallsstichproben zur Verfügung (GUNDERSEN und JENSEN 1987, MATTFELDT 1990). Abgesehen von dem Prinzip von DELESSE und dem von CAVALIERI erforderten die klassischen quantitativ-stereologischen Methoden *a priori* eine Annahme über die Gestalt der untersuchten Strukturen. Unter Voraussetzung dieser Zusatzinformation können aus Schnittprofilaten beispielsweise die Größe, Größenverteilung und die Anzahl von partikulären Objekten geschätzt werden (*model-based stereology*). Bei ausgerichteten Strukturen sind zusätzlich Informationen über das Muster und den Grad der Anisotropie notwendig. Um Abweichungen der realen Gegebenheiten von der idealisierten Modellannahme ausgleichen zu können, wurden verschiedene Korrekturfaktoren eingeführt. Die in sich geschlossenste Darstellung der modellabhängigen Stereologie findet sich in dem zweibändigen Lehrbuch von WEIBEL (1979, 1980). Die in diesem Lehrbuch verwendeten stereologischen Symbole haben eine breite Akzeptanz gefunden und werden heute mit geringfügigen Modifikationen international verwendet. Leider ist die Anwendung dieser Methoden auf biologische Objekte, die näherungsweise durch einfache geometrische Modelle respektive Körper der euklidischen Geometrie (z. B. Kugel, Rotationsellipsoid, Zylinder, Scheibe) beschrieben werden können, beschränkt. Nichtkonvexe Partikel (z. B. irregulär gestaltete Zellkerne) waren für diese traditionellen Verfahren überhaupt nicht zugänglich (GUNDERSEN 1986).

Die Einführung der Disektormethode durch einen hinter dem Pseudonym D. C. STERIO (1984) verborgenen Autor (es ist ein offenes Geheimnis, dass es sich um den renommierten dänischen Stereologen Hans Jørgen GUNDERSEN handelt) stellte daher einen methodischen Durchbruch dar. D. C. STERIO ist gleichzeitig ein Anagramm – durch Umstellung der einzelnen Buchstaben wird daraus Disector. Ein Disektor besteht aus einem erwartungstreuen Testfeld (GUNDERSEN 1977) mit bekannter Fläche auf einer Ausgangsebene (*reference plane*) sowie einer parallel dazu in einem bekannten Abstand angeordneten Vergleichsebene (*look-up plane*) und stellt somit ein dreidimensionales Testsystem mit bekanntem Volumen dar. Dieses Testsystem kann entweder aus zwei (*di-sector*) realen Schnitten (*physical disector*) oder zwei virtuellen Schnittebenen (Fokussierungsebenen) in einem dicken Schnitt (*optical disector*) gebildet werden. Gezählt werden Partikel, deren Profile durch das Testfeld auf der Ausgangsebene erfasst und die von der Vergleichsebene nicht geschnitten werden. Mit dem Disektor werden Teilchen unabhängig von ihrer Größe oder Gestalt selektiert und können gerade so gezählt werden, als würde man sie aus dem Referenzkompartiment herauslösen. Nichtkonvexität oder Anisotropie beeinflussen die Erwartungstreue nicht.

Die Disektormethode erlaubt somit bei beliebiger Orientierung der Schnittebenen eine verzerrungsfreie Schätzung der numerischen Volumendichte (Anzahl pro Einheitsvolumen) von Partikeln im Referenzraum. Durch eine Kombination der Disektormethode mit dem Prinzip von DELESSE kann ferner ohne jegliche Modellannahme das mittlere Volumen beliebiger Partikel als Quotient aus der Volumen- und der numerischen Dichte verzerrungsfrei geschätzt werden. Abgesehen von der Erwartungstreue ist die Disektormethode auch noch deutlich effizienter als modellabhängige Verfahren zur Bestimmung der numerischen Volumendichte von Partikeln (STERIO 1984, GUNDERSEN 1986). Stereologische Methoden, die ohne Zugrundelegung eines geometrischen Modelles bei beliebigen Strukturen erwartungstreue Schätzwerte liefern, so dass der Schluss von der Stichprobe auf die Gesamtheit lediglich von einem korrekten Stichprobenplan (*sampling design*) abhängt, werden unter dem Begriff der „design-

based stereology“ zusammengefasst (MATTFELDT 1990). Die Disektormethode kann zur Zählung von Partikeln verwendet werden, was eine genaue Kenntnis der Schnittdicken (*physical disector*) oder des Abstands der Fokussierungsebenen (*optical disector*) voraussetzt.

Der Disektor kann aber auch im Sinne einer räumlichen Sonde für die Selektion von Partikeln unabhängig von ihrer Größe, Gestalt oder Orientierung eingesetzt werden. Diese Eigenschaft wird bei der *Selector*-Methode (CRUZ-ORIVE 1987b) genutzt, die unter Verwendung der *Point-sampled-intercept*-Methode ermöglicht, das mittlere Volumen der mit dem Disektorprinzip verzerrungsfrei ausgewählten Partikel zu bestimmen. Indirekt kann damit auch die Zahl von Partikeln geschätzt werden, ohne dass die Schnittdicke bekannt sein muss. Entsprechende Möglichkeiten bietet auch der auf dem gleichen Prinzip beruhende *Nucleator* (GUNDERSEN 1988, GUNDERSEN et al. 1988a). Für die Bestimmung der Gesamtzahl von Partikeln in einem Untersuchungsobjekt kann auch das *Fractionator*-Verfahren eingesetzt werden (GUNDERSEN 1986). Dessen Prinzip besteht darin, durch immer weiter fortgesetzte systematische Teilungsschritte (*systematic uniform random sampling*) eine Restfraktion des Objekts zu generieren, in der sämtliche enthaltenen Partikel mit Hilfe des Disektorprinzips gezählt werden. Die Multiplikation dieses Zählergebnisses mit dem Kehrwert der numerischen Fraktion ergibt die Anzahl der in dem Objekt enthaltenen Partikel. Da die Ermittlung der Gesamtzahl von Partikeln bei dieser Methode nicht über die numerische Dichte erfolgt, bedarf es keiner Bestimmung des Referenzvolumens, und das Ergebnis ist unbeeinflusst von präparationsbedingten Volumenveränderungen des Gewebes (Einbettungsschrumpfung).

Auch für das Problem der Bestimmung von Oberflächen- und Längendichten anisotroper Strukturen wurden Lösungen gefunden. Bei isotropen Objekten können diese Parameter leicht ermittelt werden, da die Schnittprofile durch die Schnittrichtung nicht beeinflusst werden. Von allen geometrischen Körpern ist jedoch nur die Kugel isotrop. Bei biologischem Material ist daher Anisotropie die Regel, wobei sich verschiedene Gewebe in Bezug auf das Muster und den Grad der Anisotropie stark unterscheiden. Die für die Bestimmung von Oberflächen- und Längendichten verwendeten Gleichungen setzen jedoch nicht notwendigerweise eine Isotropie der zu untersuchenden Objekte voraus. Diese Gleichungen behalten ihre Gültigkeit, wenn isotrop orientierte Testlinien oder Testflächen in anisotrope Objekte eingebracht werden.

Eine Voraussetzung für die Umsetzung dieser seit langem bekannten Tatsache im Kontext der quantitativ-stereologischen Analyse biologischen Materials war die Entwicklung von Methoden zur Generierung von *Isotropic-uniform-random* (IUR, isotrop mit gleichförmiger Zufälligkeit)-Schnitten. Für die Herstellung von IUR-Schnitten kleinerer Gewebeproben bietet sich die einfach durchzuführende *Isector*-Methode an, bei der die Einbettung der Probe in einer Kugelform erfolgt (NYENGAARD und GUNDERSEN 1992). Bei Proben beliebiger Größe ermöglicht dies das *Orientator*-Verfahren, welches eine strikte Randomisierung in allen drei Richtungen des Raumes gewährleistet (MATTFELDT et al. 1990). An IUR-Schnitten können alle quantitativ-stereologischen Parameter bestimmt werden. Diese Schnitte zeichnen sich durch einen kompletten Verlust der Orientierung aus, so dass der Orientator dem Effekt nach eigentlich ein Desorientator ist. Diese Eigenschaft von IUR-Schnitten kann bei der Untersuchung von bestimmten Organen oder Gewebearten unerwünscht sein. Beispiele hierfür sind die Haut oder Organe mit einem geschichteten Wandaufbau und natürlichen Oberflächen, wie Magen, Darm oder Harnblase. Für diese Fälle bietet sich die Methode der sogenannten vertikalen Schnitte (*vertical uniform random sections*, VURS) an (BADDELEY et al. 1986). Bei der Herstellung dieser Schnitte erfolgt eine Randomisierung in der horizontalen Ebene (x-Achse, y-Achse), während die frei wählbare vertikale z-Achse fixiert bleibt und in allen Schnitten er-

kennbar sein muss. VURS sind besonders geeignet für die mit Hilfe von Zykloiddbögen als Testsystem vorzunehmende Quantifizierung natürlicher Oberflächen, wie etwa der resorptiven Oberfläche des Dünndarmes (OGIOLDA et al. 1998), und erlauben – abgesehen von Längendichten – die Bestimmung aller sonstigen stereologischen Parameter. Die Einschränkung bezüglich der Bestimmung von Längendichten gilt für konventionelle VURS. Bei der Verwendung von dicken Gewebeschnitten und virtuellen Zykloiden ist diese Limitierung aufgehoben (GOKHALE et al. 2004).

Diese kurze Übersicht könnte problemlos noch erweitert werden, mag aber genügen, um die Breite des Spektrums der inzwischen verfügbaren quantitativ-stereologischen Methoden und deren Potenzial aufzuzeigen. Vor 50 Jahren haben WEIBEL et al. (1966) geäußert, dass „biological morphologists still shy away from quantitation of their results for the primary reason that direct measurement of structures on sections is very cumbersome and yields doubtful results“. Der erste Teil dieser Aussage hat bis heute noch eine gewisse Gültigkeit. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Anwendung der auf der stochastischen Geometrie und der Wahrscheinlichkeitstheorie basierenden quantitativen Stereologie notwendigerweise ein gewisses mathematisches und statistisches Rüstzeug voraussetzt, was möglicherweise einen abschreckenden Effekt auf viele Morphologen ausübt. Der zweite Teil dieser Aussage hat dagegen seine Gültigkeit verloren. Das zur Verfügung stehende Methodenrepertoire der quantitativen Stereologie ermöglicht eine effiziente und verzerrungsfreie Quantifizierung von biologischen Strukturen und partikulären Objekten – und somit werden keineswegs lediglich „doubtful results“ erzielt.

Neben den fraglos eminent bedeutsamen Entwicklungen in der Stereologie haben technische Fortschritte in der Mikroskopie und der Histologie maßgeblich zu einer Verbesserung der Situation beigetragen. Bei der inzwischen etablierten Kunststoffhistologie ist die Einbettungsschrumpfung im Vergleich zur Paraffinhistologie deutlich weniger ausgeprägt. Kunststoffschnitte lassen morphologische Details ohne Verzicht auf den Informationsgehalt des Übersichtspräparates um ein Vielfaches besser erkennen als der klassische Paraffinschnitt, was Messungen deutlich erleichtert. Kunststoffschnitte haben im Gegensatz zu Paraffinschnitten eine einheitliche Dicke – deren Kenntnis entscheidend für die Disektormethode (*physical disector*) ist – und gleichzeitig eine geringere Dicke, so dass Überprojektionsprobleme (Holmes-Effekt) im Vergleich zum Paraffinschnitt deutlich reduziert sind.

Ferner wurden in den letzten Jahren leistungsfähige computergestützte Stereologiesysteme entwickelt, die kommerziell erhältlich (beispielsweise newCAST, StereoInvestigator, Stereologer, Stereology Toolbox) und unter anderem in der Lage sind, morphologische Strukturen oder immunhistochemische Färbemuster automatisch zu erkennen sowie eine systematisch zufällige Auswahl von Testarealen in definierten Regionen (*regions of interest*) vorzunehmen, und die es gestatten, die Probe mit den verschiedensten Testsystemen (Punktraster, Linienraster, Zykloiddbögen usw.) zu überlagern oder Disektorauswertungen durch virtuelle Ausrichtung von Schnitten erheblich einfacher durchzuführen.

Die Kombination der Stereologie mit der bereits weit verbreiteten virtuellen Mikroskopie ist nicht nur problemlos möglich, sondern bietet auch eine Reihe von Vorzügen. Für quantitativ-stereologische Untersuchungen an digitalen Bildern aller Art bietet sich die STEPanizer-Software an, die im Internet frei verfügbar ist (TSCHANZ et al. 2011). Viele renommierte Fachjournale empfehlen oder verlangen inzwischen in ihren redaktionellen Leitlinien bei der Publikation quantitativ-mikroskopischer Daten biologischen Materials die Anwendung stereologischer Methoden, wobei in aller Regel modellfreie Methoden (*design-based stereology*)

gefordert werden. Von bedeutenden medizinischen Fachgesellschaften wurde dies sogar zum Standard erklärt (HSIA et al. 2010, MADSEN 1999).

6. Schlussfolgerung

Die quantitative Stereologie hat sich in der modernen biomedizinischen Forschung einen festen Platz erobert und in zahlreichen Studien ihr Potenzial eindrucksvoll unter Beweis gestellt. Wie aktuelle Auswertungen der Literatur jedoch zeigen, werden zur Quantifizierung morphologischer Strukturen auf licht- oder elektronenoptischer Ebene nach wie vor sehr häufig hierfür nicht oder nur bedingt geeignete Methoden verwendet, und es wird dennoch der Versuch unternommen, die damit erzielten Ergebnisse in einem biologischen Sinne zu interpretieren. An dieser Stelle seien daher abschließend die von GUNDERSEN und Mitarbeitern (1988b) im Sinne eines Denkanstoßes an Pathologen gerichteten Worte zitiert: „Unbiased quantitative data may mean the difference between ‚interesting observations‘ and real knowledge.“

Literatur

- AGGARWAL, G., SINGH, S., MARWAH, S., DUHAN, A., MATHUR, S. K., MARWAH, N., and SEN, R.: Morphometric analysis in breast lesions. A rapid conjunct to intraoperative imprint smears. *Middle East J. Cancer* 3, 1–8 (2012)
- ALBL, B., HAESNER, S., BRAUN-REICHHART, C., STRECKEL, E., RENNER, S., SEELIGER, F., WOLF, E., WANKE, R., and BLUTKE, A.: Tissue sampling guides for porcine biomedical models. *Toxicol. Pathol.* 44, 414–420 (2016)
- BAAK, J. P. A., TEN KATE, F. J. W., OFFERHAUS, G. J. A., VAN LANSCHOT, J. J., and MEIJER, G. A.: Routine morphometrical analysis can improve reproducibility of dysplasia grade in Barret's oesophagus surveillance biopsies. *J. Clin. Pathol.* 55, 910–916 (2002)
- BACH, G.: Gründung einer internationalen Gesellschaft für Stereologie. *Z. wiss. Mikroskopie* 65, 190–195 (1963)
- BACH, M., and POLOSCHKE, C. M.: Optical illusions. *Adv. Clin. Neurosci. Rehab. (ACNR)* 6, 20–31 (2006)
- BADDELEY, A. J., GUNDERSEN, H. J. G., and CRUZ-ORIVE, L. M.: Estimation of surface area from vertical sections. *J. Microsc.* 142, 259–276 (1986)
- BANKIR, L., FISCHER, C., FISCHER, S., JUKKALA, K., SPECHT, H. C., and KRIZ, W.: Adaptation of the rat kidney to altered water intake and urine concentration. *Pflügers Arch.* 412, 42–53 (1988)
- BLUTKE, A., SCHNEIDER, M. R., RENNER-MÜLLER, I., HERBACH, N., WANKE, R., and WOLF, E.: Genetic dissection of IGF1-dependent and -independent effects of permanent GH excess on postnatal growth and organ pathology of mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* 394, 88–98 (2014)
- BLUTKE, A., SCHNEIDER, M. R., WOLF, E., and WANKE, R.: Growth hormone (GH)-transgenic insulin-like growth factor 1 (IGF 1)-deficient mice allow dissociation of excess GH and IGF 1 effects on glomerular and tubular growth. *Physiol. Rep.* 4, e12709, doi: 10.14814/phy2.12709 (2016)
- BOLENDER, R. P.: Biological stereology: history, present state, future directions. *Microsc. Res. Tech.* 21, 255–261 (1992)
- BOYCE, J. T., BOYCE, R. W., and GUNDERSEN, H. J. G.: Choice of morphometric methods and consequences in the regulatory environment. *Toxicol. Pathol.* 38, 1128–1133 (2010)
- BRAENDGAARD, H., and GUNDERSEN, H. J. G.: The impact of recent stereological advances on quantitative studies of the nervous system. *J. Neurosci. Meth.* 18, 39–78 (1986)
- CRUZ-ORIVE, L. M.: Stereology: Historical notes and recent evolution. *Acta Stereol.* 6, Suppl. II, 43–56 (1987a)
- CRUZ-ORIVE, L. M.: Particle number can be estimated using a disector of unknown thickness: the selector. *J. Microsc.* 145, 121–142 (1987b)
- CRUZ-ORIVE, L. M., and WEIBEL, E. R.: Sampling designs for stereology. *J. Microsc.* 122, 235–257 (1981)
- EAGLEMAN, D. M.: Visual illusions and neurobiology. *Nature Rev. Neuroscience* 2, 920–926 (2001)
- EL-AOUNI, C., HERBACH, N., BLATTNER, S. M., HENGER, A., RASTALDI, M. P., JARAD, G., MINER, J. H., MOELLER, M. J., ST-ARNAUD, R., DEDHAR, S., HOLZMAN, L. B., WANKE, R., and KRETZLER, M.: Podocyte-specific deletion of integrin-linked kinase results in severe glomerular basement membrane alterations and progressive glomerulosclerosis. *J. Amer. Soc. Nephrol.* 17, 1334–1344 (2006)

- FRANZEN, L. E., EKSTEDT, M., KECHAGIAS, S., and BODIN, L.: Semiquantitative evaluation overestimates the degree of steatosis in liver biopsies: a comparison to stereological point counting. *Mod. Pathol.* 18, 912–916 (2005)
- GEBHARDT, S., MERKL, M., HERBACH, N., WANKE, R., HANDLER, J., and BAUERSACHS, S.: Exploration of global gene expression changes during the estrous cycle in equine endometrium. *Biol. Reprod.* 87, 1–13 (2012)
- GLAGOLEV, A. A.: On the geometrical methods of quantitative mineralogical analysis of rocks. *Trans. Inst. Econ. Min. (Moskva)* 59, 1–47 (1933)
- GOKHALE, A. M., EVANS, R. A., MACKES, J. L., and MOUTON, P. R.: Design-based estimation of surface area in thick tissue sections of arbitrary orientation using virtual cycloids. *J. Microsc.* 216, 25–31 (2004)
- GUNDERSEN, H. J. G.: Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *J. Microsc.* 111, 219–223 (1977)
- GUNDERSEN, H. J. G.: Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones. *J. Microsc.* 143, 3–45 (1986)
- GUNDERSEN, H. J. G.: The nucleator. *J. Microsc.* 151, 3–21 (1988)
- GUNDERSEN, H. J. G., BAGGER, P., BENDTSEN, T. F., EVANS, S. M., KORBO, L., MARCUSSEN, N., MØLLER, A., NIELSEN, K., NYENGAARD, J. R., PAKKENBERG, B., SØRENSEN, F. B., VESTERBY, A., and WEST, M. J.: The new stereological tools: Disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96, 857–881 (1988a)
- GUNDERSEN, H. J. G., BENDTSEN, T. F., KORBO, L., MARCUSSEN, N., MØLLER, A., NIELSEN, K., NYENGAARD, J. R., PAKKENBERG, B., SØRENSEN, F. B., VESTERBY, A., and WEST, M. J.: Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96, 379–394 (1988b)
- GUNDERSEN, H. J. G., and JENSEN, E. B.: The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J. Microsc.* 147, 229–263 (1987)
- GUNDERSEN, H. J. G., SEEFELDT, T., and OSTERBY, R.: Glomerular epithelial foot processes in normal man and rats. *Cell Tissue Res.* 205, 147–155 (1980)
- HAUG, H.: Die Abhängigkeit der Einbettungsschrumpfung des Gehirngewebes vom Lebensalter. *Verh. Anat. Ges.* 74, 699–700 (1980)
- HAUG, H.: Gibt es Nervenzellverluste während der Alterung in der menschlichen Hirnrinde? Ein morphometrischer Beitrag zu dieser Frage. *Nervenheilkunde* 4, 103–109 (1985)
- HAUG, H.: The first ten years after the foundation of the international society for stereology in 1961. *Acta Stereol.* 6/2, 35–42 (1987)
- HERBACH, N., BERGMAYR, M., GÖKE, B., WOLF, E., and WANKE, R.: Postnatal development of numbers and mean sizes of pancreatic islets and beta-cells in healthy mice and GIPR(dn) transgenic diabetic mice. *PLOS ONE* 6, e22814 (2011)
- HERBACH, N., GÖKE, B., SCHNEIDER, M., HERMANN, W., WOLF, E., and WANKE, R.: Overexpression of a dominant negative GIP receptor in transgenic mice results in disturbed postnatal pancreatic islet and beta-cell development. *Regul. Pept.* 125, 103–117 (2005)
- HERBACH, N., RATHKOLB, B., KEMTER, E., PICHL, L., KLAFTEN, M., HRABÉ DE ANGELIS, M., HALBAN, P. A., WOLF, E., AIGNER, B., and WANKE, R.: Dominant-negative effects of a novel mutated Ins2 allele causes early-onset diabetes and severe beta-cell loss in Munich Ins2C95S mutant mice. *Diabetes* 56, 1268–1276 (2007)
- HERBACH, N., SCHAIER, I., BLUTKE, A., KAUTZ, S., SIEBERT, A., GÖKE, B., WOLF, E., and WANKE, R.: Diabetic kidney lesions of GIPRdn transgenic mice: podocyte hypertrophy and thickening of the GBM precede glomerular hypertrophy and glomerulosclerosis. *Amer. J. Physiol. Renal. Physiol.* 296, F819–F829 (2009)
- HOEFELICH, A., WEBER, M. M., FISCH, T., NEDBAL, S., FOTTNER, C., ELMLINGER, M. W., WANKE, R., and WOLF, E.: 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 (2002)
- HOWARD, C. V., and REED, M. G. (Eds.): *Unbiased Stereology: Three-dimensional Measurement in Microscopy*. 2nd Ed. Abingdon, New York: Garland Science/Bios Scientific Publishers 2005
- HSIA, C. C. W., HYDE, D. M., OCHS, M., and WEIBEL, E. R.: An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: Standards for quantitative assessment of lung structure. *Amer. J. Respir. Crit. Care Med.* 181, 394–418 (2010)
- HYKŠOVÁ, M., KALOUSOVÁ, A., and SAXL, I.: Early history of geometric probability and stereology. *Image Anal. Stereol.* 31, 1–16 (2012)
- JASTROW, J.: Studies from the laboratory of experimental psychology of the University of Wisconsin – II. *Amer. J. Psychol.* 4, 381–428 (1892)
- KAMP, S., JEMEC, G. B. E., KEMP, K., KJELDSEN, C. R., STENDERUP, K., PAKKENBERG, B., and DAM, T. N.: Application of stereology to dermatological research. *Exp. Dermatol.* 18, 1001–1009 (2009)
- KAUTZ, S., VAN BÜRCK, L., SCHUSTER, M., WOLF, E., WANKE, R., and HERBACH, N.: Early insulin therapy prevents beta cell loss in a mouse model for permanent neonatal diabetes (Munich Ins2(C95S)). *Diabetologia* 55, 382–391 (2012)

- KEMTER, E., PRUECKL, P., SKLENAK, S., RATHKOLB, B., HABERMANN, F. A., HANS, W., GAILUS-DURNER, V., FUCHS, H., HRABÉ DE ANGELIS, M., WOLF, E., AIGNER, B., and WANKE, R.: Type of uromodulin mutation and allelic status influence onset and severity of uromodulin-associated kidney disease in mice. *Hum. Mol. Genet.* 22, 4148–4163 (2013)
- KEMTER, E., SKLENAK, S., RATHKOLB, B., HRABÉ DE ANGELIS, M., WOLF, E., AIGNER, B., and WANKE, R.: No amelioration of uromodulin maturation and trafficking defect by sodium 4-phenylbutyrate in vivo: studies in mouse models of uromodulin-associated kidney disease. *J. Biol. Chem.* 289, 10715–10726 (2014)
- 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., LOCHMÜLLER, H., WALTER, M. C., and WOLF, E.: Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. *Hum. Mol. Genet.* 22, 4368–4382 (2013)
- KNOL, H., HUYS, R., SARRAZIN, J. C., and JIRSA, V. K.: Quantifying the Ebbinghaus figure effect: target size, context size, and target-context distance determine the presence and direction of the illusion. *Front. Psychol.* 6, 1679 (2015)
- MADSEN, K. M.: The art of counting. *J. Amer. Soc. Nephrol.* 10, 1124–1125 (1999)
- MARCUSSEN, N.: Atubular glomeruli in cisplatin-induced chronic interstitial nephropathy. *APMIS* 98, 1087–1097 (1990)
- MATTFELDT, T.: *Stereologische Methoden in der Pathologie*. Stuttgart: Thieme 1990
- MATTFELDT, T., MALL, G., GHAREHBAGHI, H., and MÖLLER, P.: Estimation of surface area and length with the orientator. *J. Microsc.* 159, 301–317 (1990)
- MERKL, M., ULBRICH, S. E., OTZDORFF, C., HERBACH, N., WANKE, R., WOLF, E., HANDLER, J., and BAUERSACHS, S.: Microarray analysis of equine endometrium at days 8 and 12 of pregnancy. *Biol. Reprod.* 83, 874–886 (2010)
- MÜHLEFELD, C., HEGERMANN, J., WREDE, C., and OCHS, M.: A review of recent developments and applications of morphometry/stereology in lung research. *Amer. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 309, L526–L536 (2015)
- MÜHLEFELD, C., NYENGAARD, J. R., and MAYHEW, T. M.: A review of state-of-the-art stereology for better quantitative 3D morphology in cardiac research. *Cardiovasc. Pathol.* 19, 65–82 (2010)
- NEWBOLD, K. M., HOWIE, A. J., GIRLING, A. J., KIZAKI, T., BRYAN, R. L., and CAREY, M. P.: A simple method for assessment of glomerular size and its use in the study of kidneys in acromegaly and compensatory renal enlargement. *J. Pathol.* 158, 139–146 (1989)
- NYENGAARD, J. R.: Stereologic methods and their application in kidney research. *J. Amer. Soc. Nephrol.* 10, 1100–1123 (1999)
- NYENGAARD, J. R., and GUNDERSEN, H. J. G.: The isector: a simple and direct method for generating isotropic, uniform random sections from small specimen. *J. Microsc.* 165, 427–431 (1992)
- OGIOLDA, L., WANKE, R., ROTTMANN, O., HERMANN, W., and WOLF, E.: Intestinal dimensions of mice divergently selected for body weight. *Anat. Rec.* 250, 292–299 (1998)
- RAYAT, C. S., JOSHI, K., SAKHUJA, V., and DATTA, U.: Glomerular basement membrane thickness in normal adults and its application to the diagnosis of thin basement membrane disease: an Indian study. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 48, 453–458 (2005)
- RENNER, S., BRAUN-REICHART, C., BLUTKE, A., HERBACH, N., EMRICH, D., STRECKEL, E., WÜNSCH, A., KESSLER, B., KUROME, M., BÄHR, A., KLYMIUK, N., KREBS, S., PUK, O., NAGASHIMA, H., GRAW, J., BLUM, H., WANKE, R., and WOLF, E.: Permanent neonatal diabetes in INS(C94Y) transgenic pigs. *Diabetes* 62, 1505–1511 (2013)
- RENNER, S., FEHLINGS, C., HERBACH, N., HOFMANN, A., WALDTHAUSEN, D. C. VON, KESSLER, B., ULRICH, K., CHODNEVSKAJA, I., MOSKALENKO, V., AMSELGRUBER, W., GÖKE, B., PFEIFER, A., WANKE, R., and WOLF, E.: Glucose intolerance and reduced proliferation of pancreatic beta-cells in transgenic pigs with impaired glucose-dependent insulinotropic polypeptide function. *Diabetes* 59, 1228–1238 (2010)
- ROSIWAL, A.: Über geometrische Gesteinsanalysen. Ein einfacher Weg zur ziffermäßigen Feststellung der Quantitätsverhältnisse der Mineralbestandtheile gemengter Gesteine. *Verh. der K.-k. geol. Reichsanstalt* 32, 143–175 (1898)
- SAMUEL, T., HOY, W. E., DOUGLAS-MENTON, R., HUGHSON, M. D., and BERTRAM, J. F.: Applicability of the glomerular size distribution coefficient in assessing human glomerular volume: the Weibel and Gomez method revisited. *J. Anat.* 210, 578–582 (2007)
- SCHERLE, W.: A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie* 26, 57–60 (1970)
- SCHMITZ, C., and HOF, P. R.: Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience* 130, 813–831 (2005)
- SHEN-ORR, S. S., TIBSHIRANI, R., KHATRI, P., BODIAN, D. L., STAEDTLER, F., PERRY, N. M., HASTIE, T., SARWAL, M. M., DAVIS, M. M., and BUTTE, A. J.: Cell type-specific gene expression differences in complex tissues. *Nature Methods* 7, 287–289 (2010)
- SØRENSEN, F. B.: Quantitative analysis of nuclear size for objective malignancy grading: a review with emphasis on new unbiased stereologic methods. *Lab. Invest.* 66, 4–23 (1992)

- STERIO, D. C.: The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J. Microsc.* 134, 127–136 (1984)
- STRECKEL, E., BRAUN-REICHART, C., HERBACH, N., DAHLHOFF, M., KESSLER, B., BLUTKE, A., BÄHR, A., ÜBEL, N., EDDICKS, M., RITZMANN, M., KREBS, S., GÖKE, B., BLUM, H., WANKE, R., WOLF, E., and RENNER, S.: Effects of the glucagon-like peptide-1 receptor agonist liraglutide in juvenile transgenic pigs modeling a pre-diabetic condition. *J. Transl. Med.* 13, 73 (2015)
- STREYL, D., KENNGOTT, R., HERBACH, N., WANKE, R., BLUM, H., SINOWATZ, F., WOLF, E., ZERBE, H., and BAUERSACHS, S.: Gene expression profiling of bovine peripartur placental membranes: detection of molecular pathways potentially involved in the release of foetal membranes. *Reproduction* 143, 85–105 (2012)
- THOMSON, E.: Quantitative microscopic analysis. *J. Geol.* 38, 193–222 (1930)
- TSCHANZ, S. A., BURRI, P. H., and WEIBEL, E. R.: A simple tool for stereological assessment of digital images: the STEPanizer. *J. Microsc.* 243, 47–59 (2011)
- TSCHANZ, S., SCHNEIDER, J. P., and KNUDSEN, L.: Design-based stereology: Planning, volumetry and sampling are crucial steps for a successful study. *Ann. Anat.* 196, 3–11 (2014)
- VAN BÜRCK, L., BLUTKE, A., KAUTZ, S., RATHKOLB, B., KLAFTEN, M., WAGNER, S., KEMTER, E., HRABÉ DE ANGELIS, M., WOLF, E., AIGNER, B., WANKE, R., and HERBACH, N.: Phenotypic and pathomorphological characteristics of a novel mutant mouse model for maturity-onset diabetes of the young type 2 (MODY 2). *Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, E512–E523 (2010)
- WALTHER, B. A., and MOORE, J. L.: The concepts of bias, precision and accuracy, and their use in testing the performance of species richness estimators, with a literature review of estimator performance. *Ecography* 28, 815–829 (2005)
- WANKE, R.: Stereology – benefits and pitfalls. *Exp. Toxicol. Pathol.* 54, 163–164 (2002)
- WANKE, R., WEIS, S., KLUGE, D., KAHNT, E., SCHENCK, E., BREM, G., and HERMANN, W.: Morphometric evaluation of the pancreas of growth hormone transgenic mice. *Acta Stereol.* 13, 3–8 (1994)
- WANKE, R., WOLF, E., AIGNER, B., and KEMTER, E.: Durch ENU-Mutagenese generierte murine Nephropathiemodelle. *Nova Acta Leopoldina NF* 119, Nr. 402, 147–156 (2015)
- WEIBEL, E. R.: Morphometry of the human lung. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1963
- WEIBEL, E. R.: Stereological methods. I. Practical methods for biological morphometry. London: Academic Press, 1979
- WEIBEL, E. R.: Stereological methods. II. Theoretical foundations. London: Academic Press, 1980
- WEIBEL, E. R.: Stereological methods in cell biology: where are we-where are we going? *J. Histochem. Cytochem.* 29, 1043–1052 (1981)
- WEIBEL, E. R.: Ideas and tools: the invention and development of stereology. *Acta Stereol.* 6, Suppl. II, 23–33 (1987)
- WEIBEL, E. R.: Measuring through the microscope: development and evolution of stereological methods. *J. Microsc.* 155, 393–403 (1989)
- WEIBEL, E. R., and GOMEZ, D. M.: A principle for counting tissue structures on random sections. *J. Appl. Physiol.* 17, 343–348 (1962)
- WEIBEL, E. R., KISTLER, G. S., and SCHERLE, W. F.: Practical stereological methods for morphometric cytology. *J. Cell. Biol.* 30, 23–38 (1966)
- WEIBEL, E. R., and KNIGHT, B. W.: A morphometric study on the thickness of the pulmonary air-blood barrier. *J. Cell. Biol.* 21, 367–384 (1964)
- WEIBEL, E. R.: Measuring through the microscope: development and evolution of stereological methods. *J. Microsc.* 155, 393–403 (1989)
- WICKSELL, S. D.: The corpuscle problem. A mathematical study of a biometric problem. *Biometrika* 17, 84–99 (1925)

Prof. Dr. Rüdiger WANKE
 Institut für Tierpathologie
 Veterinärstraße 13
 80539 München
 Bundesrepublik Deutschland
 Tel.: +49 89 21802854
 Fax: +49 89 21802544
 E-Mail: wanke@patho.vetmed.uni-muenchen.de

Wahrnehmen und Steuern

Sensorsysteme in Biologie und Technik

Vorträge anlässlich der Jahresversammlung
vom 19. bis 21. September 2014 in Rostock

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 122, Nr. 410

Herausgegeben von Jörg HACKER (Halle/Saale), Rudolf F. GUTHOFF (Rostock),
Gottfried SCHMALZ (Regensburg) und Eberhart ZRENNER (Tübingen)
(2015, 283 Seiten, 131 Abbildungen, 3 Tabellen, 29,95 Euro,
ISBN: 978-3-8047-3447-0)

Mensch und Tier sind für ihr Überleben in der Auseinandersetzung mit der sie umgebenden Umwelt auf die Wahrnehmung optischer, akustischer, olfaktorischer, gustatorischer und haptischer Eindrücke angewiesen. Mit ihren sensorischen Systemen können sie die vielfältigen chemischen und physikalischen Reize aufnehmen, die der Organismus verarbeitet und die schließlich das Verhalten und die Gefühlswelt beeinflussen. Für die Problematik der Sensorik und des Wahrnehmens des Menschen spielt die Begrenzung durch entsprechende Einschränkungen eine besondere Rolle. Diese kann durch die wissenschaftlichen und technischen Möglichkeiten über künstliche Sensorsysteme immer besser kompensiert werden. Schließlich kann sich wahrnehmendes Steuern vom Menschen gänzlich lösen und z. B. Robotern zugewiesen werden. Die Verbindung der Sinn- und Wahrnehmungsproblematik mit ästhetischen Fragestellungen und künstlerischen Herangehensweisen liefert ein weiteres interessantes Diskussionsfeld. Der Band behandelt auch die Themen „Biologische Kommunikation“, „Hören und Sehen“, „Sprache, Denken und Lernen“, „Medizintechnik, angewandte Biomechanik und Robotik“ sowie „Gesellschaft“.

III. Phänotypisierung in der Tiermedizin

Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) in der klinischen Veterinärmedizin: Grundlagen und Anwendungen

Sibylle KNEISSL (Wien, Österreich)

Zusammenfassung

Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) sind moderne Schnittbildverfahren der bildgebenden Diagnostik, die seit Ende der 1980er Jahre auch in der Veterinärmedizin eingesetzt werden. Die Entscheidung, welches Schnittbildverfahren für eine konkrete Fragestellung am besten geeignet ist, ist (noch) nicht exakt zu treffen. Die CT wird oft eingesetzt, wenn mit knöchernen Veränderungen zu rechnen ist, während die MRT in der Weichteildiagnostik die Methode der Wahl darstellt. Im Folgenden wird ein Überblick über den Aufbau der entsprechenden Geräte, die grundlegenden Verfahren und die Indikationen für den Einsatz sowie die jeweiligen Vor- und Nachteile der Verfahren gegeben.

Abstract

In imaging diagnostics, computer tomography (CT) and magnetic resonance tomography (MRT) are modern sectional image techniques that have been applied in veterinary medicine since the end of the 1980s. It is (still) not standardised which sectional image technique fits best for specific clinical questions. CT is often applied if changes in bones are expected, while MRT is applied to examine soft tissues. This paper gives an overview of the construction of the corresponding medical devices, and their basic procedures and applications. We also inform about advantages and disadvantages of these two sectional image techniques.

1. Computertomographie

Die Computertomographie (CT) ist ein modernes Schnittbildverfahren der bildgebenden Diagnostik, das seit Ende der 1980er Jahre auch in der Veterinärmedizin eingesetzt wird. Das Verfahren beruht auf dem röntgenologischen Grundprinzip der Schwächung von Röntgenstrahlen durch Materie. Im Gegensatz zur klassischen Röntgenologie kreist jedoch die Röntgenröhre um den liegenden Patienten, sodass mittels komplizierter computerunterstützter Rechenvorgänge transversale Schnittbilder erzeugt werden können. Spezielle Software ermöglicht auch die Rekonstruktion der transversalen Rohdaten in jeder beliebigen Raumachse und zu einem dreidimensionalen Modell. Im Folgenden wird ein Überblick über den Aufbau eines Computertomographen, den Bildkontrast, Indikationen für die Untersuchung sowie über die Vor- und Nachteile des Verfahrens gegeben.

Ein Computertomograph besteht aus einer Röntgenröhre, einer Detektoreinheit und einem Computer. Die Röntgenröhre kreist um den narkotisierten Patienten und erzeugt einen eng eingebündelten Röntgenstrahl. Die durch den Patienten geschwächte Röntgenstrahlung wird in der Detektoreinheit gemessen und in Form von elektrischen Impulsen an einen Computer

geleitet, der die räumliche Zuordnung der Daten ermöglicht. Beim Spiral-CT, einer Weiterentwicklung der konventionellen CT-Systeme, dient ein Schleifring der Spannungsversorgung der Röhre, sodass keine Beschleunigung und Abbremsung von Röhre und Verkabelung infolge der ständigen Umkehr der Drehbewegung mehr notwendig sind. Die kontinuierliche Drehung der Röhre um den gleichzeitig vorgeschobenen Patiententisch ergibt eine spiralförmige Abtastung eines Untersuchungsvolumens, das in jeder beliebigen Ebene (multiplanar) rekonstruiert werden kann. Dieses Messprinzip erlaubt die Erfassung eines großen Volumens in einer Atempause, wodurch Bildartefakte reduziert werden, und qualitativ hochwertige dreidimensionale Modelle. Die Einführung von Computertomographen mit mehrzeiligen Detektoren (Mehrzeiler-CT) eröffnet durch extrem kurze Aufnahmezeiten (etwa 30 s für die Lunge eines mittelgroßen Hundes) und verbesserte Rekonstruktionsverfahren neue Anwendungsgebiete, die der CT zu neuem Aufschwung verhalfen. In der Praxis bedeutet das, dass die Darstellung von sich schnell bewegenden Organen wie Lunge, Herz- und Herzkranzgefäße detailgetreu verwirklicht werden kann.

Analog zum Röntgenbild werden Skelettanteile weiß, Weichteile und Flüssigkeiten grau, Luft und Gase schwarz dargestellt. Diese Grautöne entsprechen den Schwächungen der Röntgenstrahlung. Erreicht keine Röntgenstrahlung die Detektoreinheit, erscheint dieser Bereich weiß, wird die Strahlung nicht geschwächt, erscheint der Bereich schwarz. Im Gegensatz zur konventionellen Röntgenologie kann jeder Bildpunkt zusätzlich in einem Zahlenwert (Hounsfield-Einheiten, HE) ausgedrückt werden. Mit Luft (–1000 HE) und Wasser (0 HE) sind die Fixpunkte der Dichteskala definiert, die dadurch unabhängig von der verwendeten Röhrenspannung sind. Die Gesamtwerteskala beträgt 4000 HE. Die Breite der Dichteskala kann grundsätzlich zugleich in Grauwerten ausgedrückt werden, wird aber vom menschlichen Auge nicht unterschieden. Da das menschliche Auge maximal etwa 20 Graustufen differenzieren kann, bedient man sich eines elektronischen Hilfsmittels, der Fenstertechnik, bei der ein bestimmter Dichtebereich herausgegriffen wird. Die Fensterlage (*Window Level*, WL) auf der Dichteskala bestimmt, welcher Dichtewert im mittleren Grauton dargestellt wird. Die Fensterbreite (*Window Width*, WW) definiert die Verteilung der Grauskala über einen willkürlich einstellbaren Dichtebereich. Die stufenlose Variationsbreite der Fensterlage und der Fensterbreite ermöglicht es, jeden Dichtebereich mit der nötigen Differenzierung aufzulösen. Ein typisches Weichteilfenster ist 50 WL, 300 WW, ein typisches Knochenfenster ist 400 WL, 4000 WW. Eine vollständige radiologische Befundung muss in mindestens zwei Fenstern erfolgen.

In der CT werden Röntgenkontrastmittel (Bariumsulfat- und Jodpräparate oder Luft) verwendet. Diese weisen eine höhere (positive Kontrastmittel) oder geringere Dichte (negative Kontrastmittel) als das umgebende Gewebe auf. Positive Kontrastmittel werden allerdings in einer geringeren Konzentration eingesetzt und intravenös unter Druck appliziert. Sie reichern sich nach einer gewissen Zeit in den einzelnen Geweben an. Variationen der Anreicherungszeit und -stärke haben diagnostischen Wert.

Im Allgemeinen wird die Computertomographie eingesetzt, um die mit Röntgen und Ultraschall gestellten Verdachtsdiagnosen zu bestätigen oder zu verwerfen. Am Kopf können beispielsweise die exakte Ausdehnung von Missbildungen, Tumoren, Fissuren oder Frakturen bestimmt werden. Dichteunterschiede und Umfangsvermehrungen im Gehirn erlauben Rückschlüsse auf Missbildungen, Tumoren, Blutungen oder Abszesse. Weitere häufige Einsatzgebiete sind die Wirbelsäule, insbesondere die Bandscheibendiagnostik, und unklare Prozesse im Gelenksbereich der Extremitäten. Abdomen oder Becken sind für die CT auf-



Abb. 1 Computertomographie (Foto: Michael BERNKOPF, Veterinärmedizinische Universität Wien)

grund der vollständigen und überlagerungsfreien Darstellung aller Organe besonders gut geeignet, werden aber an der Veterinärmedizinischen Universität seltener einer CT zugeführt. Durch intravenöse Gabe von nicht-ionischem, jodhaltigem Kontrastmittel sind zusätzliche Kontraste in Abhängigkeit der Gewebsdurchblutung für die Diagnosestellung hilfreich. So können zum Beispiel im Abdomen pathologische Gefäßverläufe detailgetreu kontrastiert und in ihrem Verlauf dargestellt werden. Speziell adaptierte Lagerungstische oder Plattformen erlauben es, auch Großtiere im Liegen respektive Stehen zu untersuchen; in Abhängigkeit vom Körpervolumen ergeben sich die Untersuchungsregionen Kopf (im Stehen oder Liegen), obere Halsgegend, kraniale Halswirbelsäule sowie der distale Extremitätenbereich (im Liegen).

Die Befundung einer CT bezieht sich auf Veränderungen der Anatomie und Gewebsdichte. Bezirke höherer Dichte werden hyperdens, Bezirke niedriger Dichte hypodens bezeichnet. Iso-dense Areale zeigen die gleiche Dichte wie ihre Umgebung.

Aus dem bisher Gesagten geht hervor, dass die Vorteile des Verfahrens gegenüber der Röntgenuntersuchung vor allem in der zweidimensionalen, überlagerungsfreien Darstellung und dem besseren Gewebskontrast liegen. Zu geringe Dichteunterschiede einzelner Gewebe oder die Überstrahlung des Gewebes durch den angrenzenden Knochen, z. B. im Bereich der Schädelbasis, erlauben jedoch keine befriedigende Bildgebung. Kleine Tumoren ohne Dichteunterschied zur Umgebung, wie z. B. ein Gliom, können potenziell übersehen werden. Auch Knorpelveränderungen im Gelenksbereich werden infolge der fehlenden Dichteunterschiede und Grenzflächenartefakten nicht befriedigend dargestellt. In diesen Bereichen wird die Magnetresonanztomographie eingesetzt.

2. Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist ein sehr junges Schnittbildverfahren, das zunehmend auch in der Veterinärmedizin eingesetzt wird. Die ersten Veröffentlichungen erschienen erst Ende der 1980er Jahre. Neben Arbeiten über anatomische Grundlagen und einzelnen Fallberichten wurde auch kürzlich ein Atlas veröffentlicht. Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über das physikalische Prinzip, den Aufbau eines Magnetresonanztomographen, den Bildkontrast, Kontrastmittel, sowie den Einsatz im Vergleich zu anderen bildgebenden Verfahren gegeben.

Die MRT beruht auf dem spezifischen Verhalten von Atomkernen mit ungerader Nukleonenzahl (Protonen und Neutronen) (Wasserstoff, Phosphor, Natrium usw.). Sie besitzen einen Eigendrehimpuls, den sogenannten Spin. Da Atomkerne auch eine elektrische Ladung haben, wirken sie wie ein elektrischer Kreisstrom um eine Drehachse und erzeugen damit ein magnetisches Feld. Stärke und Richtung des Magnetfeldes werden durch den magnetischen Feldvektor, μ (magnetisches Moment), definiert. In der Bildgebung wird aufgrund seines starken magnetischen Momentes und seinem ubiquitären Vorkommen vor allem Wasserstoff verwendet. Die Protonen sind in der Regel im Körper ungeordnet, sodass sich ihre magnetischen Momente gegenseitig aufheben. Legt man ein äußeres Magnetfeld an, richten sie sich parallel und antiparallel zu den Feldlinien des Magnetfeldes aus. Mit Hilfe eines Hochfrequenzimpulses werden die Wasserstoffprotonen aus ihrem magnetischen Gleichgewicht ausgelenkt. So wie ein rotierender Kreisel, der von der Seite angestoßen wird, drehen sie sich dann um sich selbst und im Kreis um die Längsachse des Magnetfeldes (Präzession). Schaltet man das Hochfrequenzfeld ab, richten sich die Wasserstoffprotonen wieder entlang der Magnetfeldlinien aus (Relaxation) und geben die zuvor aufgenommene Energie in Form eines elektromagnetischen Signals an die Umgebung ab. Die Intensität und Dauer dieses Signals ist einerseits abhängig von der Magnetfeldstärke, andererseits von Gewebeparametern: der Protonendichte und der Protonenbeweglichkeit. Die Protonenbeweglichkeit wird durch die T1-Relaxationszeit (abhängig von der Bindung der Wasserstoffatome) und die T2-Relaxationszeit (abhängig von Wechselwirkungen zwischen den Protonen) beschrieben. Das Signal wird von einer Spule empfangen, mittels komplizierter Rechenvorgänge räumlich zugeordnet und in einen Grauwert umgewandelt.

Die wichtigsten Bestandteile eines MR-Tomographen sind ein Magnet, ein Gradientensystem, verschiedene Spulen, ein Patiententisch, eine Recheneinheit und ein Kühlsystem. Von einem starken Magneten wird das Magnetfeld erzeugt. Dieses soll eine entsprechende Feldstärke mit möglichst hoher Feldhomogenität aufweisen, da es durch Heterogenitäten zu Signalverzerrungen und damit zu Bildfehlern kommt. Die meisten MR-Geräte weisen Feldstärken zwischen 0,5 und 1,5 Tesla auf. Niederfeldgeräte arbeiten mit Feldstärken von 0,1–0,35 Tesla. Zusätzlich wird das System in einem für hochfrequente Wellen undurchdringbaren Raum (Hochfrequenz-Kabine, Faradayscher Käfig) untergebracht.

Das Gradientensystem besteht aus Gradientenspulen, die so angeordnet sind, dass lineare Gradientenfelder in allen drei Raumrichtungen erzeugt werden können. Die so erzeugte genau definierte Inhomogenität des Magnetfeldes erlaubt die Schichtauswahl und die räumliche Kodierung des empfangenen Signales.

Die HF-Spulen dienen der Erzeugung von hochfrequenten Impulsfolgen und zur Erfassung des dadurch entstehenden Signals.

Der Patiententisch dient der Lagerung des Patienten und ist beweglich, um den Patienten in das meist röhrenförmige Hauptfeld („geschlossenes System“) schieben zu können. Neuere

Geräte sind jedoch auch in Form eines C-Bogens („offenes System“) konstruiert, sodass der Patient oder der Arzt von mindestens drei Seiten an das Gerät herangehen kann. Diese Gerätetypen eignen sich besonders gut für die Anwendung in der Veterinärmedizin, da sie für die wechselnde Anatomie von Klein- und Großtieren am besten adaptierbar sind.

Ein Steuer- und ein Bildrechner sind die Bestandteile des Computersystems. Sie dienen u. a. der Steuerung der Pulsfolgen, der Digitalisierung des elektromagnetischen Signals des Gewebes, der Bildrekonstruktion und der Bildspeicherung.

Durch Wahl geeigneter Pulssequenzen (eine Folge von unterschiedlich langen und starken HF-Impulsen) lässt sich der erzielte Bildkontrast primär auf den Einfluss eines der genannten Gewebeparameter zurückführen. Man spricht von sogenannten Gewichtungen (T1-, T2-, und Protonendichte „PD“-Gewichtung). Spezielle Sequenzen erlauben die Unterdrückung spezifischer Gewebssignale (STIR: Fettunterdrückung, FLAIR: Liquor-Unterdrückung) und erhöhen dadurch die Aussagekraft der Untersuchung. Die hohe Sensibilität des Verfahrens gegenüber pathologischen Veränderungen beruht auf dem unterschiedlichen Flüssigkeitsgehalt und dem daraus resultierenden verschiedenen Signalverhalten von gesundem und krankem Gewebes.

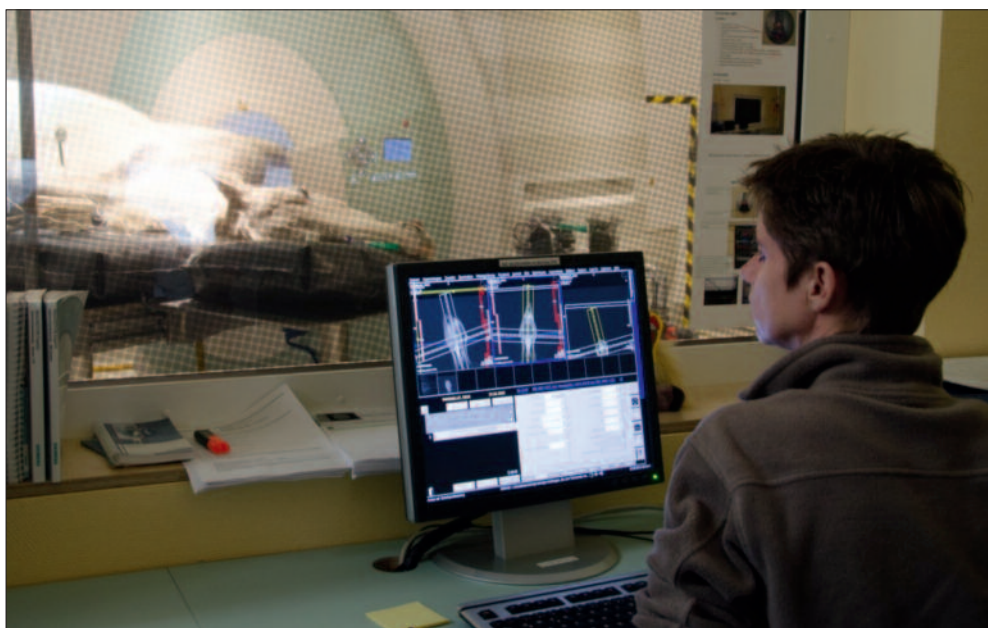


Abb. 2 Magnetresonanztomographie (Foto: Michael BERNKOPF, Veterinärmedizinische Universität Wien)

Paramagnetische Substanzen können diese Gewebeparameter (T1- und T2-Relaxationszeit) beeinflussen und werden deshalb als Kontrastmittel verwendet. Sie führen zu einer Signalanhebung auf T1-gewichteten Sequenzen. Routinemäßig werden sie intravenös, bei speziellen Fragestellungen auch intraartikulär verabreicht. In jüngerer Zeit wurden auch organspezifische Kontrastmittel entwickelt; ihr Einsatz in der Veterinärmedizin ist noch auf die Forschung beschränkt.

Einsatzgebiete sind im Wesentlichen neurologische, ophthalmologische und orthopädische Fragestellungen, die die Untersuchung des Kopfes, der Wirbelsäule und der Extremitäten verlangen. Andere Körperteile, wie z. B. Brust- und Bauchraum, sind aufgrund von atemungs-, blutfluss- und peristaltikbedingten Bewegungen für die MRT weniger geeignet und primär anderen bildgebenden Verfahren (Röntgen, Ultraschall und Computertomographie) zuzuführen. Allerdings sind derzeit spezielle mit einem Elektrokardiogramm gekoppelte Sequenzen für die Darstellung des Herzens in einer klinischen Testphase. Vorteile der MRT gegenüber diesen Verfahren sind die deutlich kontrastreichere Bildgebung der Weichteile, die insbesondere im Gelenksbereich die Unterscheidung aller anatomischen Strukturen erlaubt und die multiplanare Bildgebung (die Schnittebenen sind unabhängig von der Patientenlagerung frei wählbar). Ihr Hauptnachteil ist das fehlende Signal von kalkhaltigen Strukturen. So lassen sich zwar Veränderungen des Knochenmarks sehr gut darstellen, aber knöcherne Zubildungen, Verkalkungen usw. können nur schwer oder gar nicht abgegrenzt werden.

Der Bildbefund für eine MRT bezieht sich im Wesentlichen auf Veränderungen der Anatomie und der Signalverteilung. Als isointens werden zwei Gewebe bezeichnet, die die gleiche Signalintensität bzw. den gleichen Grauwert im Bild haben. Hypointens ist ein Gewebe, das signalärmer bzw. dunkler, und hyperintens ist ein Gewebe, das signalreicher und damit heller als das zu vergleichende Gewebe ist.

Offene oder eigens adaptierte geschlossene Systeme ermöglichen es auch, Großtiere zu untersuchen; in Abhängigkeit vom Körpervolumen ergeben sich die Untersuchungsregionen Kopf, obere Halsgegend, kraniale Halswirbelsäule sowie der distale Extremitätenbereich.

Die zu untersuchenden Patienten dürfen keine magnetisierbaren Teile (Eisen, Implantate usw.) am oder im Körper tragen, da sie vom Magnetfeld angezogen werden und zu Bildartefakten oder auch zu Verletzungen führen können.

Die MRT zeigt gegenüber pathologischen Veränderungen sehr hohe Sensibilität, besitzt aber vergleichsweise geringe Gewebespezifität. Zur Erinnerung: Die Sensitivität beruht auf dem unterschiedlichen Protonen- (Wasser-) Gehalt von gesundem und krankem Gewebe. Im Gegensatz zur Computertomographie kann die Grauwertskala auch nicht mit absoluten Messwerten korreliert werden. Mit jeder Bildgebungssequenz ergeben sich unterschiedliche Grauwerte und Kontraste. Für die Diagnostik sind mindestens zwei Sequenzen (T1- und T2-Gewichtung) notwendig, die miteinander verglichen werden. Theoretisch bieten Relaxationszeiten und Protonendichtemessungen die Möglichkeit zur Gewebecharakterisierung.

3. Welches Schnittbildverfahren für welche Untersuchung?

Die Entscheidung, welches Schnittbildverfahren für eine konkrete Fragestellung am besten geeignet ist, ist (noch) nicht exakt zu treffen. Allgemein lässt sich sagen, dass CT zum Einsatz kommt, wenn primär mit knöchernen Veränderungen zu rechnen ist, während die MRT in der Weichteildiagnostik die Methode der Wahl darstellt. Dies gilt eingeschränkt für Abdomen und Thorax, da die in diesen Regionen auftretenden Bewegungsartefakte die Aussagekraft der MRT beeinflussen können. Sehr kleine Gelenke, wie die Zehen- oder Kiefergelenke bei Kleintieren, sind zurzeit mittels MRT nicht befriedigend untersuchbar. Aufgrund der kürzeren Gesamtuntersuchungszeit und der hohen Sensitivität für frische Blutungen und Frakturen ist CT die Methode der Wahl bei Notfallpatienten.

Bei Fragestellungen der Augen und des Gehirns wird aufgrund der zahlreichen Artefakte durch dickes Knochengewebe im Bereich des Hirnstammes und des schwächeren Weichteilkontrastes in der CT primär MRT angewendet. Im Bereich der Wirbelsäule und Gelenke wird bei fortgeschrittenen röntgenologischen Veränderungen vorzugsweise eine CT, im Rahmen der Frühdiagnostik und bei Verdacht auf Veränderungen des Gehirns oder des Rückenmarks eine MRT durchgeführt.

Literatur

- ASSHEUER, J., and SAGER, M.: MRI and CT Atlas of the Dog. Berlin [u. a.]: Blackwell 1997
GAVIN, P. R.: Practical Small Animal MRI. Ames (IA, USA): Wiley-Blackwell 2009
KLÖPPEL, R., und HEUSER, L.: Spiral-CT. Berlin, Göttingen, Toronto, Seattle: Hans Huber 1999
MURRAY, R. C.: Equine MRI. Chichester: Wiley-Blackwell 2010
SCHWARZ, T., and SAUNDERS, J.: Veterinary Computed Tomography. Chichester: Wiley-Blackwell 2011
WISNER, E., and ZWINGENBERGER, A.: Atlas of Small Animal CT and MRI. Ames (IA, USA): John Wiley & Sons, Inc. 2015

Ao. Univ.-Prof. Dr. Sibylle KNEISSL
Abteilung für Bildgebende Diagnostik
Veterinärmedizinische Universität
Veterinärplatz 1
1210 Wien
Österreich
Tel.: +43 1 250776452
Fax: +43 1 250775790
E-Mail: sibylle.kneissl@vetmeduni.ac.at

Die Bedeutung von Bildung in einer Dienstleistungs- und Wissensgesellschaft.

Welchen Bildungsauftrag hat die Universität?

Symposium veranstaltet von der

Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina – Nationale Akademie der Wissenschaften, der Carl von Ossietzky-Universität Oldenburg und der VolkswagenStiftung am 19. Mai 2015 im Tagungszentrum Schloss Herrenhausen, Hannover

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 121, Nr. 407

Herausgegeben von Marita HILLMER und Katharina AL-SHAMERY (Oldenburg)
(2015, 132 Seiten, 22 Abbildungen, 21,95 Euro, ISBN: 978-3-8047-3513-2)

Wie sieht die moderne Universität des 21. Jahrhunderts aus? Im Spannungsfeld des Bologna-Prozesses und der Exzellenzinitiative, die bereits starke Umbrüche in den deutschen Universitäten bewirkten und im Rahmen von vertikalen und funktionalen Differenzierungen die Voraussetzungen für die Entwicklung neuer Profile in Forschung und Lehre geschaffen haben, steht der Bildungsauftrag von Universitäten zur Diskussion.

Der tiefgreifende Veränderungsprozess von der Universität als Bildungsstätte einer kleinen Elite hin zur Öffnung der Hochschulen für fast jedes Gesellschaftsmitglied ist, bei gleichzeitiger explosionsartiger Zunahme der Komplexität einer global agierenden Gesellschaft, der Ausgangspunkt aktueller Entwicklungen im Hochschulsystem. Einem Diskurs zum Bildungsbegriff und der Neuinterpretation des klassischen Bildungsverständnisses folgen Überlegungen zu den Herausforderungen der Digitalisierung als einem möglichen zukünftigen Haupttreiber des Wandels im Bildungssystem sowie ein Gedankenaustausch über die Wissenschaftskultur und notwendige Freiräume für neue Lehr- und Lernformate.

Von digitalen RGBD-Bildern zum Modell – 3D-Bildanalyse zur Phänotypisierung

Walter G. KROPATSCH (Wien, Österreich)

Zusammenfassung

Wie können wir die Aufnahmen einer 3D-Kamera für die Phänotypisierung nutzen? Basierend auf den Prinzipien der 3D-Bilderfassung werden Modelle diskutiert, die in der Lage sind, aus mehreren Aufnahmen ein Modell zu fusionieren (z. B. eines Tieres), das sowohl die invarianten Eigenschaften beinhaltet, als auch die Variabilität der Bewegung erfasst.

Abstract

How can we utilize the pictures of a 3D camera for phenotyping? Based on the principles of 3D acquisition we discuss models that are able to fuse one model of i.e. an animal out of several views. The model must capture the invariant properties of the animal as well as the variability introduced by its movements.

1. Einleitung

Moderne 3D-Kameras eröffnen vielen Bereichen weitreichende neue Möglichkeiten, Mess- und Analysevorgänge in drei räumlichen und der zeitlichen Dimension mit Computern zu automatisieren, ohne die Daten händisch eingeben zu müssen. Dies gilt nicht zuletzt auch für die Phänotypisierung, sowohl im Bereich der Pflanzen als auch der Tiere. Mustererkennung als Wissenschaft, die aus (Bild-)Daten Information extrahiert, kann dabei wertvolle Dienste leisten, indem Messungen automatisiert und objektiviert dem Experten zur Verfügung gestellt werden. Dabei geht es nur anfänglich um die Erfassung riesiger Datenmengen (Schlagwort „Big Data“, DUMHILL 2012), es steht im Hintergrund immer der Wunsch, zu qualitativ hochwertigen Aussagen zu kommen, die auch durch Messergebnisse objektiv gestützt werden.

In diesem Beitrag werden zunächst kurz die Prinzipien analysiert, die dreidimensionale (3D-) Informationen aus zweidimensionalen (2D-) Bildern extrahieren können. Das ermöglicht die Kinect-Kamera, die in den letzten Jahren auf den Markt gekommen ist und 3D-Daten einfach, verlässlich und relativ billig liefern kann. Dabei soll auch das Korrespondenzproblem angeschnitten werden, das nicht nur Voraussetzung für die 3D-Erfassung ist, sondern auch notwendig ist, um Korrespondenzen zwischen verschiedenen Aufnahmen herzustellen.

Die Rohdaten erfordern dabei meistens sehr viel Speicher und entsprechend auch Rechenkapazität für ihre Bearbeitung. Daher betrachten wir im zweiten Teil dieses Beitrages Modelle,

die die Daten im Computer kompakt darstellen, ohne Information zu verlieren. Weiter sollen diese Modelle die Integration mehrerer Ansichten desselben Objektes erlauben, um schließlich das Objekt vollständig mit einem Modell zu beschreiben. Als Erschwernis kommt bei sich bewegenden Objekten hinzu, dass sie einer zeitliche Variation unterworfen sind, die es zusätzlich im Modell einzubauen gilt.

Über das resultierende 4D-Modell eines Objektes können auch Vergleiche mit ähnlich strukturierten Objekten angestellt werden, um so Gemeinsamkeiten und Unterschiede in einer Klasse von Objekten zu bestimmen. Dies ist eine der wesentlichen Aufgaben bei der Phänotypisierung. Die folgenden Modelle zeigen Möglichkeiten auf, wie solche Modelle aus 3D-Bildern bestimmt werden und welche Analyseschritte damit durchführbar sind.

2. 3D-Kameras

Im Folgenden sollen die Möglichkeiten der Erfassung dreidimensionaler Bilddaten kurz erörtert werden. Nach drei Grundprinzipien (STRECHA et al. 2008) wird dabei hauptsächlich vorgegangen:

- *Passives Stereo*: Dieselbe Bildszene wird mit zwei kalibrierten Kameras aufgenommen und liefert ein Stereo-Bildpaar. Danach müssen in den zwei Bildern korrespondierende Punkte gefunden werden. Diese Suche kann zwar auf eine eindimensionale Suche entlang epipolarer Linien beschränkt werden, durch teilweise Verdeckungen und mehrdeutige Zuordnungen kann sie sich aber rechnerisch ziemlich aufwendig gestalten. Durch Triangulation der korrespondierenden Punkte und der Kenntnis der perspektiven Abbildungen der zwei Kameras kann dann der Abstand des jeweiligen 3D-Punktes von der Bildebene bestimmt werden (Standardverfahren in der Photogrammetrie). Man erhält damit ein um den Tiefenwert erweitertes Bild, das als RGBD-Bild (*Red-Green-Blue-Depth*) bezeichnet wird. Punkte, die nicht in beiden Bildern sichtbar sind (z. B. wegen Verdeckung) oder nicht eindeutig sind (z. B. innerhalb großer homogener Regionen), werden interpoliert.
- *Aktives Stereo*: Bei dieser Variante wird die Suche nach korrespondierenden Punkten durch eine Projektion eines bekannten Punktmusters erleichtert, das im Prinzip eine der Kameras ersetzt. Zumeist wird dabei Infrarot verwendet, um die Farbinformation des Bildes nicht zu stören. Dieses Prinzip wird bei der MS-Kinect-1-Kamera (Abb. 1) angewandt. SMISEK et al. (2011) haben gezeigt, dass mit einer entsprechenden Kalibrierung ausgezeichnete Qualität bei der 3D-Rekonstruktion aus mehreren Ansichten erzielbar ist.
- *Radarprinzip*: In diesem Fall wird der Abstand eines Bildpunktes von der Bildebene dadurch bestimmt, dass die Laufzeit eines ausgesandten und an der Objektoberfläche reflektierten Signals gemessen wird. Je weiter ein Objekt von der Kamera entfernt ist, umso länger ist das Signal unterwegs. Diese dem Radar sehr ähnliche Tiefenmessung wird bei der MS-Kinect-2-Kamera verwendet.

In allen drei Fällen liegt am Ende eine zusätzliche Schicht an Tiefenwerten für jeden Pixel vor (Abb. 1; hell sind Flächen nahe der Kamera, dunkle Flächen sind weiter weg). Damit ist zwar für jeden Bildpunkt (x, y) die Entfernung $z(x, y)$ des abgebildeten Objektes bekannt, dies beschränkt sich aber ausschließlich auf die sichtbaren Bereiche der Oberfläche. Es sind daher mehrere Aufnahmen notwendig, wenn die Oberfläche eines zu analysierenden Objektes

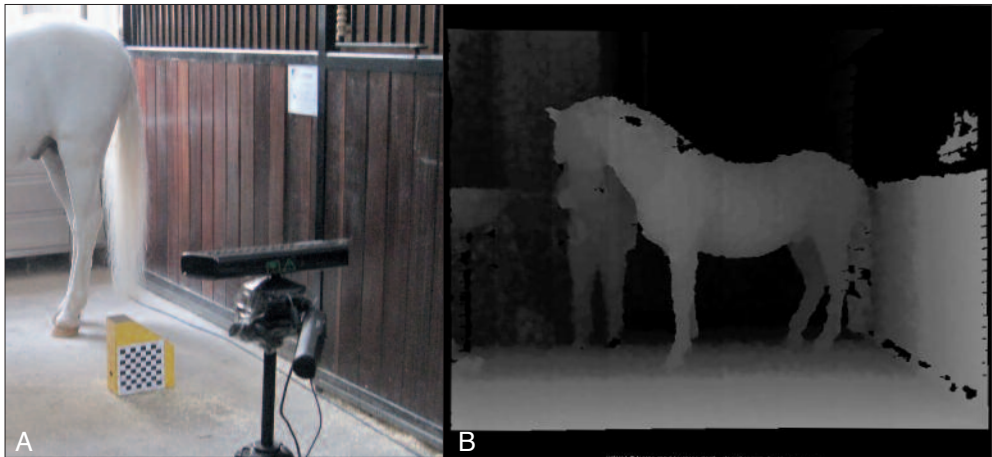


Abb. 1 (A) MS-Kinect 1 bei der Aufnahme eines Lipizzaner-Pferdes und (B) das Tiefenbild

(Pflanze oder Tier) vollständig analysiert werden soll. Dies bringt eine Reihe weiterer Probleme mit sich:

- Die verschiedenen Aufnahmen müssen alle Bereiche der Objektoberfläche vollständig abdecken.
- Die verschiedenen RGBD-Bilder müssen einander angepasst und zusammengestückt werden (wie bei einem Panoramabild).
- Die Stellung des Objektes im Raum kann sich durch Bewegung von einer Aufnahme zur anderen ändern, was das Anpassen vor größere Probleme stellt.
- Um die vollständige Oberfläche in einem Bild darzustellen, müsste die Bildebene zu einer Kugeloberfläche (oder einer komplizierteren räumlich geschlossenen Fläche) gekrümmt werden. Alternativ können abstraktere Modelle wie Punktwolken (Woo et al. 2002) oder unregelmäßige Dreiecksnetze verwendet werden, um die erfassten Daten einheitlich darstellen zu können. Diese Modelle müssen einerseits alle gemessenen Daten korrekt wiedergeben und andererseits eine bildhafte Wiedergabe für die Kontrolle durch den Experten erlauben.
- Die 3D-Kamera liefert direkt keine anatomischen Merkmale. Abbildung 2 zeigt händisch markierte RGB-Landmarken. Methoden, solche anatomischen Merkmale aus den 3D-Rohdaten automatisch zu extrahieren, sind noch in Erforschung.
- Wünschenswert für eine phänotypische Auswertung ist ein einheitliches Modell, das es erlaubt, strukturell korrespondierende Körperteile in verschiedenen Ansichten und Posen zu vergleichen.
- Eine Videoaufnahme liefert eine zeitliche Folge von Bildern. Auch hier muss zuerst die Korrespondenz verschiedener Bildteile bestimmt werden („tracking“). Die Methoden und Probleme sind ähnlich wie beim Stereoverfahren, wenn auch einige weitere Probleme hinzukommen: Nicht nur das abgebildete Objekt kann sich bewegen, auch die Kamera kann bewegt werden.



Abb. 2 Händisch markierte Landmarken im Farbbild

3. Korrespondenzen finden

Die Bestimmung, ob zwei Punkte in zwei verschiedenen Bildern demselben Punkt des Objekts in der Realität entsprechen, wird als Korrespondenzproblem bezeichnet. Einfache Merkmale wie Farbe oder Textur liefern viele Möglichkeiten, deren Überprüfung zum einen viele Mehrdeutigkeiten produziert und zum anderen zu hohe Rechenkomplexität erfordert. Im Fall von Stereobildern kann die 2D-Suche auf eine Suche entlang epipolarer Linien beschränkt werden, die als Schnitt der Bildebene mit der Epipolarebene entstehen. Die Epipolarebene wird durch die beiden Projektionszentren und den untersuchten Punkt aufgespannt.

Eine Alternative sucht nach Merkmalen, die bezüglich der Abbildungsgeometrie und bezüglich diverser Bewegungen invariant sind. Solche „Schlüsselmerkmale“ (*Key features* wie die bekannten SIFT-Merkmale von LOWE 2004) sollen sowohl invariant als auch diskriminativ sein, um nur wenige mögliche Korrespondenzen testen zu müssen. Dasselbe Problem muss auch beim Zusammenfügen mehrerer verschiedener Aufnahmen (wie bei einem Mosaik, PELEG und HERMAN 1997) gelöst werden.

Bei bewegten Objekten kommt hinzu, dass die Merkmale bezüglich der natürlichen Bewegung invariant sein sollten. Hier spielen geodätische Distanzen eine wichtige Rolle. Es

wird dabei die Länge einer Kurve entlang einer 3D-Fläche bestimmt. Dies ist approximativ in einem Tiefenbild (D-Komponente von RGBD) innerhalb eines zusammenhängend sichtbaren Bereichs möglich. Seien $P_i = (x_i, y_i, z_i)$, $i = 1, \dots, n$ die Bildpunkte einer Kurve im RGBD-Bild, dann liefert $g(P_1, P_n)$ eine Schätzung der Länge der Kurve auf der Objektoberfläche:

$$g(P_1, P_n) = \sum_{i=2}^n \sqrt{(x_i - x_{i-1})^2 + (y_i - y_{i-1})^2 + (z_i - z_{i-1})^2} \quad [1]$$

Bei Tieren ist eine Invarianz durch die fixe Länge von Knochen und die Struktur des Tierkörpers gegeben und kann für eine normierte Darstellung in Form eines Modells verwendet werden.

4. Modell

Ein Modell soll die wesentlichen Charakteristika der beobachteten Objekte in kompakter Form darstellen. Dies ist bei den meisten Rohdaten wie Grauwert-, Farb- oder Tiefenbild oder auch bei dem 3D-Voxelbild nicht gegeben. Daher suchen wir in diesem Abschnitt nach Modellen, die unwesentliche Details (z. B. des Hintergrundes) weglassen, aber keines der wichtigen Details des darzustellenden Objektes verlieren. Solche Modelle müssen aus einfacheren Datenstrukturen wie den digitalen Bildern ableitbar sein und die Möglichkeit bieten, mehrere Eingaben zu einem Modell zusammenzufassen („fusionieren“). Bei 3D-Objekten ist eine vollständige Erfassung mit einer einzelnen Aufnahme nicht möglich. Daher soll die „Rundumsicht“ durch Fusionierung mehrerer Ansichten erfolgen. Da die verschiedenen Ansichten auch in unterschiedlichen geometrischen Transformationen vorliegen, soll das Modell solche Transformationen ohne große Verluste und ohne zu großen Rechenaufwand erlauben. Bei bewegten, nicht starren Objekten können die Form und die Erscheinung desselben Objekts variieren, was durch das Modell korrekt wiedergegeben werden soll. Andererseits soll das Modell bezüglich externer Einflussgrößen (z. B. Beleuchtungsverhältnisse, Umgebung, ...) invariant sein. Wir wollen uns in diesem Abschnitt auf Tiere als betrachtete Objekte beschränken, obwohl die meisten Aussagen auch für Pflanzen gelten.

Die folgenden Abschnitte sollen einige Möglichkeiten aufzeigen, wie ein Modell für die Phänotypisierung von Tieren auszuwählen ist (im speziellen Fall geht es um Pferde).

4.1 2D-Modell

Das wohl einfachste Modell eines Bildobjektes ist die binäre Maske. Sie kennzeichnet alle zum Objekt gehörigen Pixel mit „1“ und den Hintergrund mit „0“. Ihre Bestimmung aus einem Grauwert- oder Farbbild ist oft sehr einfach durch ein Schwellwertverfahren durchführbar. Dabei auftretende Störungen können mit diversen Filtern verringert oder ganz eliminiert werden. Ähnlich kann auch aus einem Tiefenbild eine Binärmasken erstellt werden. Während ähnliche Grau- oder Farbwerte entlang der Kontur eines Objektes bei Grauwert- und Farbbildern ein Problem darstellen, treten entlang der Silhouette eines Tieres zumeist sehr große Tiefenunterschiede auf, was eine verlässliche Erkennung der Kontur in den meisten Fällen ermöglicht. Eine Binärmasken benötigt zwar nur 1 Bit pro Pixel, ist aber so groß wie das ganze Bild, auch wenn das Objekt nicht das ganze Bild ausfüllt.

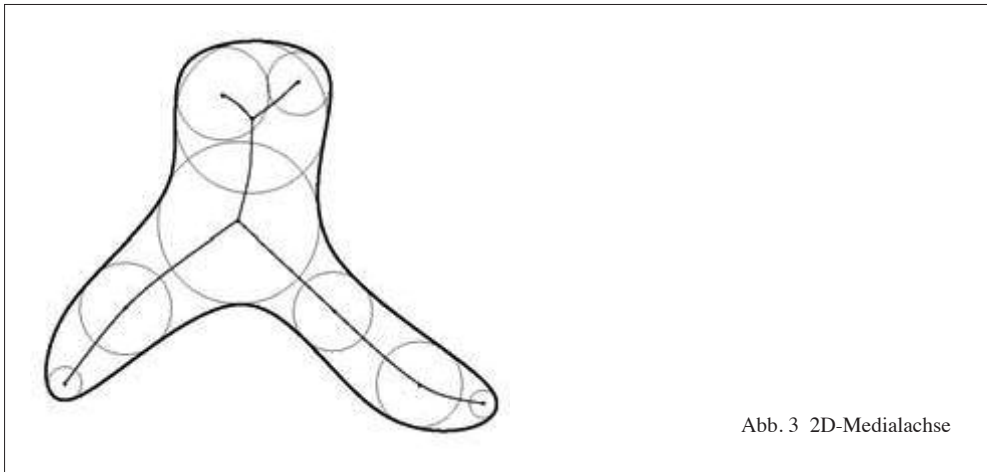


Abb. 3 2D-Medialachse

Ein Modell, das viele notwendige Kriterien erfüllt, ist die Medialachse (Abb. 3). Sie fasst die Mittelpunkte aller maximalen, in die Form einschreibbaren Kreise zusammen. Es gibt verschiedene Methoden, die Medialachse zu bestimmen. Häufig wird für jedes Pixel die Distanz vom Rand des Objekts bestimmt, und dann werden die lokalen Maxima entlang der Grate verbunden. Die Mittelpunkte entlang der Medialachse bilden ein Netz an Kurven. Speichert man mit den Mittelpunktkoordinaten auch noch die Radien der maximalen Kreise, so ist die geometrische Form als Vereinigung aller maximalen Kreise rekonstruierbar. In 2D bildet die Medialachse einer zusammenhängenden Form eine zusammenhängende Struktur aus Kurven mit Verzweigungspunkten. Der Speicherbedarf der Medialachse einer einfachen Form ist im Allgemeinen wesentlich geringer als der einer Binärmaske. Geometrische Transformationen können direkt auf die Koordinaten der Medialachspunkte angewandt werden.

4.2 3D-Modell

Ähnlich wie beim 2D-Modell ist die dreidimensionale binäre Maske (Abb. 4A) das einfachste Modell. Im Dreidimensionalen kann die Medialachse zusätzlich Flächen beinhalten. Sie besteht analog zu 2D aus den Mittelpunkten maximal eingeschriebener Kugeln. Die 3D-Form des Objektes kann durch Vereinigung aller Kugeln rekonstruiert werden.

Allerdings werden 3D-Binärmaske und 3D-Medialachse aus einem Volumenmodell des Bildes (vgl. Computertomographie) abgeleitet, was bei RGBD-Bildern nicht möglich ist. In vielen Fällen reicht es aber, die 2D-Binärmaske aus dem Tiefenbild zu bestimmen und mit der zusätzlichen Tiefeninformation die 3D-Medialachse zu schätzen. Dies gilt immer dann, wenn das Objekt zylindrische Form hat und die Projektion auf die Bildebene zentral ist (bei Aufnahmen mit einer 3D-Kamera sehr oft der Fall). Da die 3D-Medialachse die 3D-Binärmaske rekonstruieren kann, kann damit die Plausibilität der Schätzung verifiziert werden, indem das Objekt in anderen Ansichten dargestellt wird.

In der Computergrafik haben sich unregelmäßige Dreiecksnetze zur Beschreibung der 3D-Oberfläche eines Objekts durchgesetzt. Sie können durch Dreiecksvermaschung des Tiefenbildes entstehen.

Das folgende Beispiel geht zwar von einer 3D-Binärmaske aus, zeigt aber das Potenzial, das im Modell der 3D-Medialachse steckt, um zu einer recht plausiblen Segmentation eines 3D-Objektes zu gelangen. SERINO et al. (2011), DI BAJA et al. (2013) und SERINO et al. (2013) reduzieren die allgemeine 3D-Medialachse auf rein durch Kurven bestimmte Strukturen (siehe Abb. 4). Die resultierende 3D-Zerlegung eines Pferdes hat automatisch die wesentlichen Körperteile gefunden. Dies ist zwar noch nicht die Genauigkeit, die für die Unterscheidung zweier Phänotypen notwendig ist, aber stellt eine gute Basis dafür dar. Zu erforschen wäre, ob mit der Zerlegung auch die anatomische Identifikation der Körperteile möglich ist.

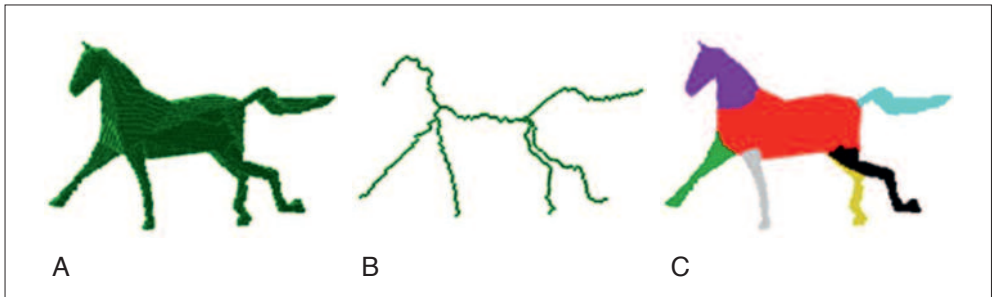


Abb. 4 3D-Modelle eines Pferdes (aus SERINO et al. 2011)

Es gibt drei Arten von Punkten, die bei dem Modell auftreten: Endpunkte (haben nur eine Fortsetzung), Verzweigungspunkte (haben mehr als zwei Fortsetzungen) und normale Punkte (haben genau zwei Fortsetzungen wie ein Gelenk). Diese Kategorisierung erleichtert das Finden von Korrespondenzen und ermöglicht auch die Fusion verschiedener Aufnahmen wie auch die Differenzierung zwischen objektspezifischer Varianz und Aufnahme bedingter Invarianzen. So sind alle Verbindungen zwischen Endpunkten und Verzweigungen dreidimensionale Kurven (1D-Mannigfaltigkeiten), die auf Geraden normalisiert werden können, ähnlich der Methode der Co-Segmentation (siehe z. B. VAN KAICK et al. 2013).

4.3 Menschliche Gebärden zur Steuerung von Computern

Eine ähnliche Zielsetzung verfolgt der nächste Ansatz mit unterschiedlichen Werkzeugen. Dem ursprünglichen Ziel der Entwicklung der Kinect-Kamera, menschliche Gestik zur Steuerung eines Computerspiels einzusetzen, kommt der Ansatz von SHOTTON et al. (2013) schon sehr nahe. Sie erkennen die Stellung eines Menschen mithilfe einer Kinect-Kamera und eines 3D-Skeletts. Auch PROCHAZKA et al. (2014) beschreiben den Einsatz einer Kinect-Kamera und eines 3D-Skeletts zur Diagnose von menschlichen Gangmustern. In beiden Fällen wird das Knochenskelett aber nur sehr ungenau bestimmt, was für die jeweilige Anwendung ausreichend zu sein scheint. Beim Phänotyp sind aber kleine Unterschiede im Modell oft sehr wichtig zu unterscheiden.

4.4 3D-Knochenskelett

Sehr oft hat die Medialachse große Ähnlichkeit mit einem Skelett und wird auch so bezeichnet. Das Knochenskelett eines Tieres (Abb. 5), das für den Phänotyp höchst interessant ist, weicht

aber davon ab und ist visuell auch nicht direkt abbildbar. Es hat den Vorteil, dass Knochen bei Bewegung ihre Form und Länge nicht verändern, also invariant bezüglich Bewegung sind.

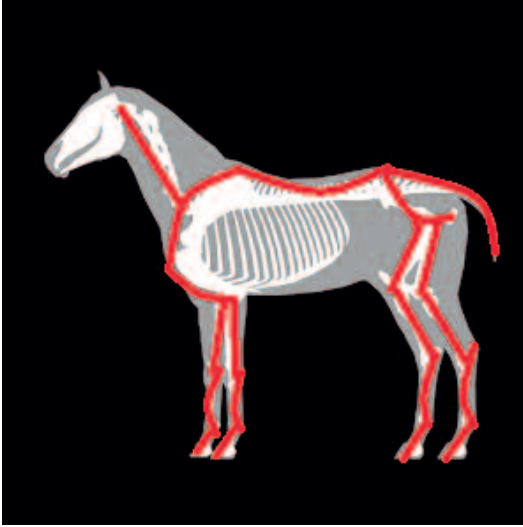


Abb. 5 Knochenskelett eines Pferdes

Daher wäre es eine lohnende Forschungsaufgabe, Wege zu suchen, das Knochenskelett mit der Medialachse eines Tieres so in Übereinstimmung zu bringen, dass alle Knochen des Tieres anatomisch plausible Relationen zur konkreten Form des Tieres bilden.

Eine Möglichkeit, Knochen mit Teilen der Medialachse in Beziehung zu setzen, bieten lokale Koordinatensysteme des jeweiligen (nicht stark veränderbaren) Körperteiles (z. B. Arme und Beine). Ein solches Koordinatensystem wird durch die Form des Teiles definiert und soll großteils invariant bezüglich Bewegung sein. Damit könnte die Lage des Knochens relativ zur Lage des Körperteiles ausgedrückt bzw. angepasst werden.

4.5 Fusion verschiedener Ansichten

Wenn es gelingt, die wesentlichen Körperteile eines Phänotyps in verschiedenen Ansichten zu identifizieren (wie die drei Arten von Verbindungspunkten im Modell von SERINO et al. 2013), dann besteht auch die Möglichkeit, korrespondierende Teile zueinander in Beziehung zu setzen und auch zu überlagern. Dadurch sollten zum einen wesentlich bessere Messergebnisse erzielbar sein als aus einer Ansicht, zum anderen können Ergebnisse verschiedener Ansichten überlagert werden. Das wiederum eröffnet die Möglichkeit, die Variabilität der entsprechenden Körperteile ein und desselben Tieres zu studieren. Weiterhin kann über die Lageänderung der Einzelteile auch Information über die Bewegungen der Einzelteile zueinander gewonnen werden.

Dieselben Studien können aber auch auf andere Phänotypen angewandt werden, was viel genauere Erkenntnisse für die Phänotypisierung verspricht als Messungen an einzelnen Tieren in normierter Stellung.

4.6 Dynamisches Ort-Zeit-Modell

Die räumliche Form und die statischen Eigenschaften der Tiere sind die Basis, aber ihre zeitlichen Veränderungen sind wohl von genauso großer Bedeutung. Abbildung 6 zeigt ein vierdimensionales Modell, das die zeitliche Komponente in den dreidimensionalen Kontext einbettet. Wir müssen dabei die Korrespondenzen aller Punkte der sichtbaren 3D-Oberfläche des Tieres über die Zeit verfolgen können. Die 3D-Medialachse könnte dazu ein sehr nützliches Hilfsmittel sein. Speziell dann, wenn es gelingt, damit auch unter die Oberfläche zu „sehen“ und auch die Bewegungsmuster des Knochenskeletts studieren zu können.

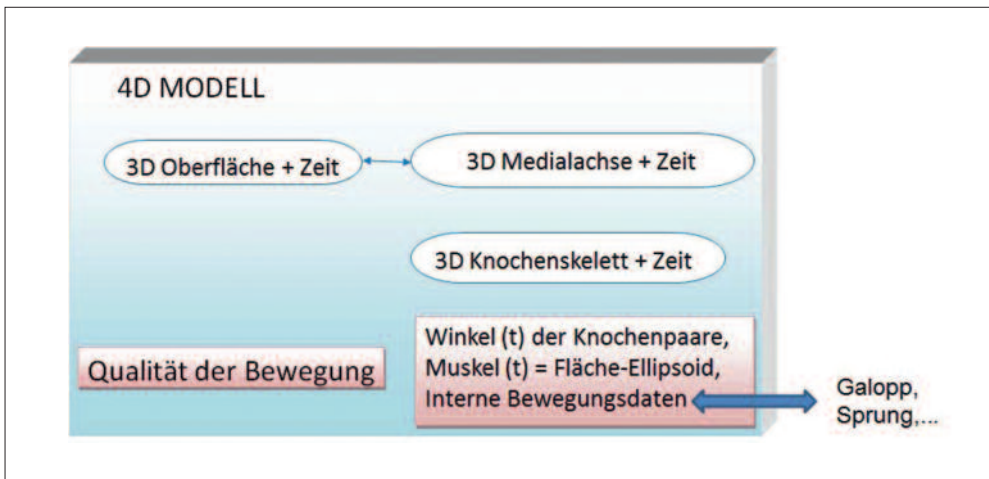


Abb. 6 4D-dynamisches Modell

4.7 Einsatz von Modellen

Wir haben einige grundsätzliche Modelle für die Erfassung von 3D- und 4D-Informationen aus RGBD-Bildsequenzen exemplarisch besprochen. Ihre Bedeutung erlangen sie aber durch die Möglichkeiten, wie sie in der Praxis eingesetzt werden können.

- (Wieder-)Erkennung eines Modells in den Daten: Ist ein Modell eines konkreten Körperteils eines Tieres bekannt, so kann vorab berechnet werden, welche Merkmale die beste Unterscheidung ermöglichen. Auf diese Merkmale kann sich die Suche nach der Identität in neuen Daten dann konzentrieren, ohne eine Vielzahl von abstrakten Merkmalen bestimmen zu müssen.
- Die Fusion mehrerer Aufnahmen desselben Objektes wurde bereits zuvor angeschnitten. Dadurch können Störungen und Ausreißer erkannt und eliminiert werden. Das fusionierte Modell ist repräsentativ für das Objekt und kann durch weitere Aufnahmen verbessert werden.
- Statistische Auswertung charakteristischer Eigenschaften aus dem fusionierten Modell: Wenn es, wie beschrieben, möglich ist, eine Vielzahl von Ansichten teilspezifisch übereinanderzulegen, so steht das volle Instrumentarium der Statistik für ausführliche Untersuchungen zur Verfügung.

- Separation statistischer (z. B. Länge von Gliedmaßen) und dynamischer Eigenschaften (z. B. Gangmuster). Dadurch werden auch charakteristische Bewegungsmuster erfasst, es ist auch denkbar, daraus Animationen zu erzeugen und sie eventuell mit realen Aufnahmen zu vergleichen.

5. Schlussbemerkungen

RGBD-Bilder stellen eine faszinierende neue Datenquelle dar, deren Wert durch Modellierung für 3D-Daten und den integrierten Einsatz von Expertenwissen heute noch gar nicht abschätzbar ist. Die Modelle erlauben die Segmentation der Bildteile, die zum Objekt gehören, sie separieren die topologischen Eigenschaften (im Wesentlichen die Struktur), die immer gleich bleiben, von den geometrischen Eigenschaften, die bis zu einem gewissen Grad veränderlich sind (z. B. bei Bewegung). Einige wenige konkrete Möglichkeiten können aus heutiger Sicht vorhergesehen werden, vieles wird in nächster Zukunft erforscht werden müssen, um das Potenzial, das in diesen Daten steckt, voll nutzen zu können und den Schein dem Sein näherzubringen.

Dank

Ich möchte den Kollegen Dr. DRUML und Prof. Dr. BREM sehr herzlich für den Einblick in die faszinierende Welt der Phänotypen danken und hoffe auf eine noch intensivere Zusammenarbeit in der Zukunft.

Literatur

- BAJA, G. S. DI, SERINO, L., and ARCELLI, C.: 3d curve skeleton computation and use for discrete shape analysis. In: BREUSS, M., BRUCKSTEIN, A., and MARAGOS, P. (Eds.): *Innovations for Shape Analysis, Mathematics and Visualization*; pp. 117–136. Berlin, Heidelberg: Springer 2013
- DUMHILL, E.: *What is big data? An introduction to the big data landscape*. O'Reilly Media (2012)
- LOWE, D. G.: Distinctive image features from scale-invariant keypoints. *Int. J. Computer Vision* 60/2, 91–110 (2004)
- PELEG, S., and HERMAN, J.: Panoramic mosaics by manifold projection. *Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR) 1997*, 338–343. IEEE (1997)
- PROCHAZKA, A., SCHATZ, M., TUPA, O., YADOLLAHI, M., VYSATA, O., and WALLS, M.: The ms kinect image and depth sensors use for gait features detection. *Proceedings IEEE International Conference on Image Processing, ICIP2014*, pp. 2271–2274 (2014)
- SERINO, L., DI BAJA, G. S., and ARCELLI, C.: Using the skeleton for 3d object decomposition. In: HEYDEN, A., and KAHL, F. (Eds.): *SCIA 2011. Lecture Notes in Computer Science Vol. 6688*, pp. 447–456. Berlin, Heidelberg: Springer 2011
- SERINO, L., DI BAJA, G. S., and ARCELLI, C.: Decomposing and sketching 3d objects by curve skeleton processing. In: RUIZ-SHULCLOPPER, J., and SANNITI DI BAJA, G. (Eds.): *CIARP 2013. Part I. Lecture Notes in Computer Science Vol. 8285*, pp. 25–32. Berlin, Heidelberg: Springer 2013
- SHOTTON, J., SHARP, T., KIPMAN, A., FITZGIBBON, A., FINOCCHIO, M., BLAKE, A., COOK, M., and MOORE, R.: Real-time human pose recognition in parts from single depth images. *Commun. ACM* 56/1, 116–124 (2013)
- SMISEK, J., JANOSEK, M., and PAJDLA, T.: 3d with kinect. *Proceedings IEEE International Conference on Computer Vision Workshops, ICCV2011*, pp. 1154–1160 (2011)
- STRECHA, C., HANSEN, W. VON, GOOL, L. V., FUA, P., and THOENNESSEN, U.: On benchmarking camera calibration and multi-view stereo for high resolution imagery. *Computer Vision and Pattern Recognition CVPR 2008. IEEE Conference*; pp 1–8 (2008)
- VAN KAICK, O., XU, K., ZHANG, H., WANG, Y., SUN, S., SHAMIR, A., and COHEN-OR, D.: Co-hierarchical analysis of shape structures. *ACM Trans. Graph.* 32/4, 69:1–69:10 (2013)

WOO, H., KANG, E., WANG, S., and LEE, K. H.: A new segmentation method for point cloud data. *Int. J. Machine Tools and Manufacture* 42/2, 167–178 (2002)

Prof. Dr. Walter G. KROPATSCH
Technische Universität Wien
Institut für Computer-Grafik und Algorithmen
Mustererkennung und Bildverarbeitung 186/3
Favoritenstraße 9/186-3
1040 Wien
Österreich
Tel.: +43 1 5880118660
Fax: +43 1 5880118697
E-Mail: krw@prip.tuwien.ac.at

Strahlenforschung in der Medizin – Relevanz und Perspektiven

Leopoldina-Symposium
am 8. und 9. Mai 2015 in Halle (Saale)

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 121, Nr. 406

Herausgegeben von Karl-Jürgen WOLF (Berlin), Wolfram H. KNAPP (Hannover) und
Thomas HERRMANN (Dresden)
(2016, 346 Seiten, 89 Abbildungen, 7 Tabellen, 27,95 Euro,
ISBN: 978-3-8047-3512-5)

Die Strahlenmedizin mit ihren vielfältigen diagnostischen und therapeutischen Methoden hat in Deutschland einen im internationalen Vergleich hervorragenden Stand. Davon profitieren Patienten und die medizintechnische Industrie. Der Band gibt einen Überblick zu Fortschritten von bildgebender Diagnostik, interventioneller Radiologie und therapeutischer Strahlenmedizin. Neben allgemeinen Fragen der Strahlenanwendung in Krankenversorgung und medizinischer Forschung werden die aktuellen Entwicklungen der verschiedenen Verfahren (u. a. Magnetresonanztomographie, Computertomographie, Positronenemissionstomographie) und moderne Radiotherapien vorgestellt sowie der Einsatz von Radiopharmaka und *In-vivo*-Biomarkern behandelt. Ein besonderer Fokus liegt auf Anwendungen in Onkologie (Mammakarzinom, Prostatakarzinom, Neuroonkologie), Kardiologie und Neurologie.

IV. Exterieurbeurteilung und Phänotypisierung bei Tieren

Funktionelle Phänotypisierung von Schweinemodellen für die Diabetesforschung

Eckhard WOLF ML, kMA ÖAW,^{1,2} Andreas BLUTKE,³ Rüdiger WANKE³ und Simone RENNER^{1,2}

Zusammenfassung

Die Erforschung von Krankheitsmechanismen ist die entscheidende Grundlage für die Entwicklung neuer, zielgerichteter Therapieansätze. Der Weg von der krankheitsorientierten Grundlagenforschung zur klinischen Anwendung am Patienten (= Translationale Medizin) ist jedoch langwierig und kostenintensiv. Geeignete Tiermodelle, die Vorhersagen über die Wirksamkeit und Sicherheit neuer Therapiestrategien erlauben, sind in diesem Prozess unverzichtbar. Bislang werden dafür meist Nagemodelle verwendet, die humane Krankheitsmechanismen bzw. -phänotypen oft nicht gut genug abbilden, um Befunde aus präklinischen Studien direkt auf den Menschen extrapolieren zu können. Daher werden als Ergänzung zu den weit verbreiteten Nagern Modellen Großtiermodelle benötigt, die dem Menschen in anatomischen und physiologischen Merkmalen meist ähnlicher sind. Aus verschiedenen Gründen bietet sich vor allem das Schwein als translationales Tiermodell an. Aufgrund der Entwicklung von Technologien für die gezielte genetische Modifikation von Schweinen ist es heute möglich, humane Krankheitsmechanismen auf molekularer und funktionaler Ebene präzise in einem Großtiermodell zu rekapitulieren. Wir haben verschiedene Schweinemodelle für die translationale Diabetesforschung etabliert. Transgene Schweine, die einen dominant-negativen Rezeptor für das Inkretinhormon GIP (*glucose-dependent insulinotropic polypeptide*) in den pankreatischen Betazellen exprimieren, zeigen einen verminderten Inkretineffekt, eine reduzierte Glukosetoleranz und Insulinsekretion sowie eine progressive Reduktion der Betazell-Masse. INS^{C94Y} transgene Schweine, die das mutierte Insulin C94Y exprimieren, sind ein Modell für permanenten neonatalen Diabetes mellitus, der initial durch eine Störung der Insulinsekretion und in späteren Stadien zusätzlich durch eine Reduktion der Betazell-Masse zustande kommt. Dieser Beitrag bietet einen Überblick über den Einsatz von funktionellen Tests zur Bewertung der Glukosehomöostase und Insulinsekretion in diesen Tiermodellen. Zudem werden quantitative morphologische Verfahren zur Bestimmung der Betazell-Masse und anderer zellulärer Kompartimente des Pankreas kurz beschrieben. Der Beitrag endet mit einer Kurzdarstellung der *Munich MIDY-Pig Biobank*, einer einmaligen Ressource für Untersuchungen von Auswirkungen chronisch erhöhter Blutglukosespiegel auf verschiedene Organe und Gewebe.

Abstract

Research into disease mechanisms is an important basis for the development of novel, targeted therapies. The path from disease-oriented basic research towards clinical application in patients (= translational medicine) is, however, long and cost-intensive. Suitable animal models which allow predictions on the efficacy and safety of novel therapies are inevitable in this process. Rodent models are most widely used, but are often limited in the resemblance of human disease mechanisms and phenotypes. Therefore, effects of new treatments in humans are sometimes difficult to predict on the basis of findings in rodents. Thus large animal models which mimic anatomical and physiological parameters of humans more closely are additionally needed. For a number of reasons the pig is a relevant translational animal

1 Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, Genzentrum und Veterinärwissenschaftliches Department der Ludwig-Maximilians-Universität München.
2 Deutsches Zentrum für Diabetesforschung (DZD).
3 Institut für Tierpathologie, Zentrum für Klinische Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München.

model. Due to the establishment of efficient and precise techniques for genetic modification of pigs, it is possible to generate tailored large animal models which mimic human disease mechanisms on a molecular and functional level. We generated several genetically engineered pig models for translational diabetes research. Transgenic pigs expressing a dominant-negative receptor for the incretin hormone GIP (glucose-dependent insulintropic polypeptide) in the pancreatic beta-cells show a reduced incretin effect, reduced glucose tolerance and insulin secretion, and a progressive reduction of beta-cell mass. INS^{C94Y} transgenic pigs expressing the mutant insulin C94Y are a model for permanent neonatal diabetes mellitus, initially caused by impaired insulin secretion and in later stages additionally by a reduction of beta-cell mass. This chapter provides an overview of functional tests for the evaluation of glucose homeostasis and insulin secretion in porcine biomedical models. In addition, quantitative morphological methods for determining beta-cell mass and other cell compartments of the pancreas are briefly described. The chapter ends with a short description of the Munich MIDY-Pig Biobank, a unique resource for studying consequences of chronic hyperglycemia for different organs and tissues.

1. Schweinemodelle für die translationale Diabetesforschung

Die Prävalenz von Diabetes mellitus nimmt sowohl bei Erwachsenen als auch bei Jugendlichen stetig zu. Derzeit sind weltweit über 380 Millionen Menschen an Diabetes mellitus erkrankt, bis zum Jahr 2035 wird ein Anstieg auf über 590 Millionen Diabetespatienten prognostiziert (<http://www.idf.org/diabetesatlas>). Auch wenn für die verschiedenen Formen von Diabetes mellitus zahlreiche Behandlungsoptionen existieren, ist die Erkrankung progressiv mit schwerwiegenden Folgen, wie Nephropathie, Neuropathie, Retinopathie sowie kardiovaskuläre Erkrankungen, wie koronare Herzkrankheit und Herzinfarkt. Tiermodelle sind von entscheidender Bedeutung, um die Effizienz und Sicherheit neuer Diabetesmedikamente zu testen. Darüber hinaus sind sie auch für die Entwicklung von Biomarkern, die helfen das Kollektiv der Diabetespatienten zu stratifizieren und optimale Behandlungsoptionen für bestimmte Subgruppen zu finden, wichtig.

Während die klassischen Nagermodelle wichtige Einblicke in Krankheitsmechanismen ermöglichen, haben sie hinsichtlich der Vorhersagbarkeit therapeutischer Wirkungen im Menschen oft nur limitierte Aussagekraft (Übersicht: RENNER et al. 2016a). Daher werden für die Entwicklung neuer Diabetestherapien auch andere Spezies, wie Kaninchen, Hunde, nicht-humane Primaten und Schweine, als Modelltiere verwendet (Übersicht: RENNER et al. 2016b). Schweine eignen sich aufgrund anatomischer, physiologischer und biochemischer Ähnlichkeiten zum Menschen besonders gut für die translationale Diabetesforschung. Darüber hinaus erfährt ihre Verwendung als Tiermodell größere Akzeptanz als dies bei Hunden oder nicht-humanen Primaten der Fall ist. Durch die Verfügbarkeit eines breiten Spektrums von Methoden zur gezielten genetischen Modifikation von Schweinen können Krankheitsmechanismen, die verschiedenen Formen des Diabetes mellitus beim Menschen entsprechen, auf molekularer Ebene im Schwein nachgeahmt werden (Übersicht: WOLF et al. 2014).

Etwa 90–95 % der Diabetespatienten leiden am sogenannten Typ-2-Diabetes, einer Form, die durch eine Kombination aus Insulinresistenz und Insulinsekretionsstörung unterschiedlichen Schweregrades und eine daraus resultierende relative Insulindefizienz charakterisiert ist. Sehr häufig ist Typ-2-Diabetes mit Übergewicht bzw. Adipositas assoziiert, welche beim Menschen in der Majorität der Fälle aus hyperkalorischer Ernährung und ungenügender körperlicher Aktivität resultiert. Daher ist die Fütterung von hochkalorischen Spezialdiäten eine wichtige Strategie, um im Schweinemodell Adipositas und Vorstufen von Typ-2-Diabetes, wie verminderte Glukosetoleranz und Insulinsensitivität,

zu induzieren. Eine umfassende Zusammenstellung Diät-induzierter Schweinemodelle für Adipositas und das metabolische Syndrom findet sich in RENNER et al. (2016b). Für solche Studien werden meist Minipig-Stämme, wie Yucatan-, Ossabaw- oder Göttingen-Minipigs, verwendet, die im adulten und/oder adipösen Stadium noch ein handhabbares Gewicht haben. Die verwendeten Diäten basieren entweder auf Getreide oder bestehen aus gereinigten Inhaltsstoffen. Erstere sind kostengünstiger, letztere besser reproduzierbar. Die Diäten zeichnen sich durch eine vergleichsweise hohe Energiedichte aus, die entweder aus einem hohen Fettgehalt und/oder einem hohen Gehalt an Kohlenhydraten resultiert. Oft enthalten diese Diäten zudem 1–2 % reines Cholesterin, womit eine Diabetes-assoziierte Dyslipidämie im Schweinemodell relativ zuverlässig ausgelöst werden kann. Um neben Adipositas und Dyslipidämie auch eine Hyperglykämie zu erzielen, kann die Funktion der Betazellen durch Behandlung mit Betazell-toxischen Chemikalien wie Streptozotocin beeinträchtigt werden. Streptozotocin wird über den GLUT2-Transporter in die Betazellen transportiert, wo es in Glucose und Methylnitrosoharnstoff, der DNA-schädigende Wirkungen hat, gespalten wird. Dies führt in Abhängigkeit von der Dosierung zum Untergang der Betazellen. Ein Nachteil dieser Strategie ist, dass der GLUT2-Transporter nicht nur in den Betazellen, sondern beispielsweise auch in der Leber und in den Tubulusepithelzellen der Niere exprimiert ist, so dass durch die Streptozotocin-Behandlung auch in diesen Geweben Schäden entstehen können. Zudem sind für das Schwein höhere Dosen von Streptozotocin erforderlich als für Nager und nicht-humane Primaten, und eine Wirkung bleibt bei bis zu 30 % der Tiere aus (Übersicht: RENNER et al. 2016b).

Eine Alternative ist die Einschränkung der Betazell-Funktion im Schweinemodell durch die Einführung spezieller genetischer Modifikationen. Wir haben transgene Schweine generiert, die einen dominant-negativen Rezeptor (GIPR^{dn}) für das Inkretinhormon GIP (*glucose-dependent insulintropic polypeptide*) unter der Kontrolle des *Ins2*-Gen-Promotors der Ratte exprimieren (RENNER et al. 2016a, 2010). Der GIPR^{dn} bindet GIP mit gleicher Affinität wie der intakte GIPR (ein klassischer G-Protein-gekoppelter Rezeptor mit 7 Transmembran-Domänen), erlaubt jedoch aufgrund einer Deletion von 8 Aminosäuren und einem zusätzlichen Aminosäureaustausch in der dritten intrazellulären Domäne keine Signaltransduktion (Abb. 1). Das GIPR^{dn} transgene Schweinemodell zeigt wichtige Charakteristika einer prädiabetischen Situation, nämlich einen verminderten Inkretineffekt, eine gestörte Glukosetoleranz, eine initial verzögerte und später quantitativ reduzierte Insulinsekretion sowie eine Reduktion der Betazell-Masse. Aufgrund des reproduzierbaren und progressiven Phänotyps dieses Modells war es möglich, durch einen gezielten metabolischen Untersuchungsansatz Biomarkerkandidaten zu identifizieren, deren Konzentration im Blutplasma mit dem Fortschreiten von Veränderungen in der prädiabetischen Phase assoziiert ist. Insbesondere wurden Signaturen von Aminosäuren und Lipiden gefunden, deren Konzentrationen im Blutplasma eine hohe Korrelation mit der Betazell-Masse zeigen (RENNER et al. 2012).

Eine andere Möglichkeit ist die Expression von mutanten Insulinmolekülen, die – in Abhängigkeit von der Art der Mutation und der Expressionshöhe – zu einem permanenten neonatalen Diabetes mellitus (auch als *mutant insulin gene induced diabetes of youth* – *MIDY* bezeichnet) führen können (RENNER et al. 2013) oder aber einen weniger stark ausgeprägten Phänotyp mit leicht erhöhten Nüchtern-Blutglukosekonzentrationen, einer gestörten Glukosetoleranz und einer verminderten Insulinsekretion zur Folge haben (RENNER et al. Publikation in Vorbereitung).

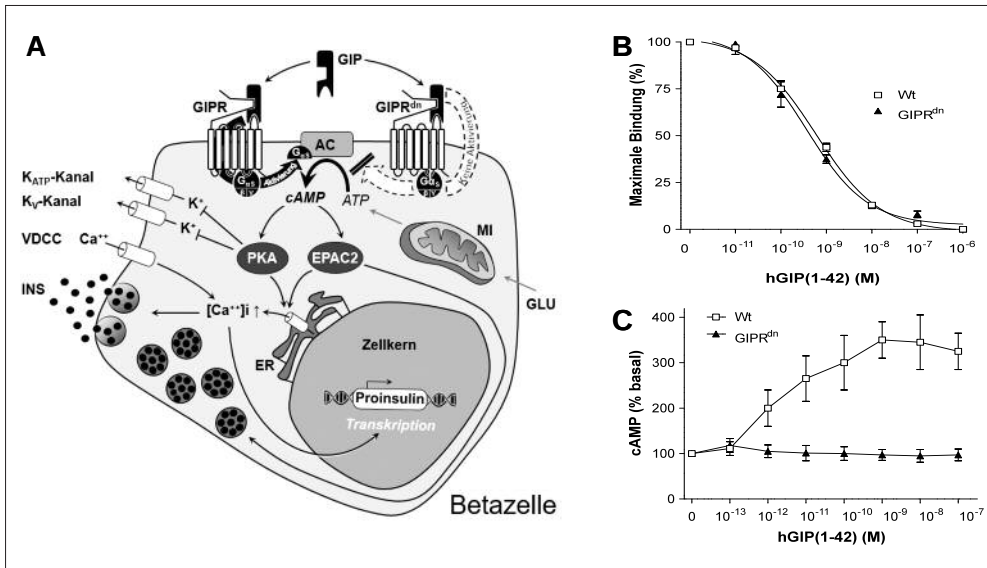


Abb. 1 Funktionsweise des dominant-negativen GIP-Rezeptors (GIPR^{dn}). Aufgrund einer Deletion von 8 Aminosäuren und Einführung eines weiteren Aminosäureaustausches in der dritten intrazellulären Domäne des Rezeptors ist die G-Protein-vermittelte Signaltransduktion gestört (A). GIPR^{dn} kann GIP mit gleicher Affinität binden wie der intakte Rezeptor (B), allerdings kommt es aufgrund der fehlenden Signaltransduktion zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration (C; nach RENNER et al. 2016a).

2. Tests für die Charakterisierung der Glukosehomöostase und Insulinsekretion beim Schwein

Die Glukosehomöostase hängt von der Insulinsekretionskapazität der Betazellen und der Insulinsensitivität der peripheren Zielgewebe ab. Diese Faktoren bestimmen die Glukosetoleranz eines Individuums und seine Fähigkeit, die Blutglukosekonzentration in einem physiologischen Bereich zu halten (SALTIEL und KAHN 2001). Die phänotypische Charakterisierung von Schweinmodellen für die Diabetesforschung erfordert daher eine quantitative Untersuchung dieser Faktoren. Für Nagemodelle, insbesondere für die Maus, liegen standardisierte Untersuchungsprotokolle zur Charakterisierung der Glukosehomöostase und Insulinsekretion vor (z. B. HRABE DE ANGELIS et al. 2015, ROZMAN et al. 2015). Für Großtiermodelle müssen solche Standards noch definiert werden, was eine zentrale Aufgabe der EU-geförderten *COST Action BM1308 „Sharing Advances on Large Animal Models – SALAAM“* ist (siehe www.salaam.genzentrum.lmu.de). Generell haben Untersuchungen zum Glukosestoffwechsel an Großtiermodellen den Vorteil, dass sie durch gezieltes Training der Tiere und Anwendung von zentralen Arterien- und/oder Venenkathetern im Vergleich zu Nagern beinahe ohne Stress für die untersuchten Tiere durchgeführt werden können. Zudem ist es möglich, eine Vielzahl von Proben in hoher zeitlicher Auflösung und in Volumina zu gewinnen, die ein breites Spektrum von Analysen desselben Tierkollektivs ermöglichen (RENNER et al. 2016b).

Grundsätzlich ist zu beachten, dass die Ergebnisse dieser Tests von einer Vielzahl biologischer Variablen beeinflusst werden können. Dazu gehören neben genetischem Hintergrund,

Alter und Geschlecht auch der Ernährungszustand und etwaige Komorbiditäten. Darüber hinaus sind die Haltungsbedingungen (Einzel- versus Gruppenhaltung, Art der Fütterung, Raumklima, insbesondere Temperatur) sowie experimentelle Bedingungen (Fasten, Tageszeit bei der Durchführung des Tests, Stress) wichtige Einflussgrößen.

Glukosetoleranztests prüfen generell die Verarbeitung eines oral oder intravenös verabreichten Glukosebolus. Die jeweilige Glukosetoleranz eines Individuums hängt von der Insulinsekretion der Betazellen sowie von der Insulinsensitivität der peripheren Gewebe ab. Beim oralen Glukosetoleranztest (OGTT) wird nach einer definierten Fastenperiode eine definierte Menge Glukose mittels einer Schlundsonde in den Magen des Schweines appliziert. Diese Technik ist beim Saugferkel einfach und schnell durchführbar und zudem die einzige Option, da die Tiere noch kein festes Futter aufnehmen können. Beim älteren Tier kann das Legen einer Schlundsonde aufgrund der nötigen Fixierung jedoch zu erheblichem Stress führen, welcher das Testergebnis beeinflussen kann. Deshalb wird bei diesen Tieren hauptsächlich ein sogenannter *Mixed-meal*-Toleranztest (MMTT) durchgeführt, wobei ein definierter Glukosebolus einer definierten Futtermenge zugesetzt wird. Beim OGTT wird eine hochprozentige Glukoselösung (zumeist 40 % bis 50 %) ohne weitere Komponenten (z. B. Lipide) oral appliziert. Dadurch erfolgen die Resorption und der Anstieg der Glukosekonzentration in der Zirkulation schneller als beim MMTT. In der Folge kommt es zu einer schnelleren und höheren initialen Insulinsekretion.

MMTT und OGTT ahmen die physiologische Aufnahme von Glukose nach und stimulieren im Darm die Freisetzung der Inkretinhormone GIP (*glucose-dependent insulintropic peptide*) und GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*), welche die Insulinsekretion der Betazellen verstärken (Übersicht: RENNER et al. 2016a). Allerdings können insbesondere beim MMTT intra- und inter-individuelle Unterschiede in der Geschwindigkeit der Magenentleerung und der Glukoseabsorption im Magen-Darm-Trakt zu einer vergleichsweise hohen Varianz der Ergebnisse führen.

Beim intravenösen Glukosetoleranztest (IVGTT) wird ein definierter Glukosebolus direkt intravenös injiziert. Dadurch werden Variablen, wie die Geschwindigkeit der Magenentleerung, die Glukoseaufnahme aus dem Darm und die Sekretion von Inkretinhormonen, ausgeschlossen. Daher sind die Ergebnisse von IVGTTs im Vergleich zu MMTT und OGTT meist reproduzierbarer bzw. zeigen eine geringere Varianz innerhalb einer Versuchsgruppe. Beim IVGTT ist der Anstieg der Glukosekonzentration in der Zirkulation schneller und höher als bei den oralen Tests, die Insulinsekretion ist jedoch aufgrund der Umgehung des Inkretinsystems weniger ausgeprägt. Beim IVGTT müssen sofort (= eine Minute) nach der Glukoseapplikation Blutproben in hoher Frequenz genommen werden, um die schnelle erste Phase und die protrahierte zweite Phase der Insulinsekretion diskriminieren zu können.

Charakteristische Verlaufskurven der Glukose- und Insulinkonzentrationen in der Zirkulation von Schweinen nach MMTT und IVGTT sind in Abbildung 2 dargestellt.

Relevante Parameter für die Bewertung der Glukosehomöostase sind die Glukose- und Insulinkonzentrationen zu den jeweiligen Messzeitpunkten, der maximale Anstieg dieser Parameter sowie die Flächen unter der Glukose- bzw. Insulinkurve (*area under the curve* = AUC). Die AUC des Analyten x (AUC_x) zwischen den aufeinanderfolgenden Zeitpunkten t_a und t_b berechnet sich nach der Trapezregel als $(x_a + x_b) \cdot (t_b - t_a) / 2$, wobei x_a und x_b die Plasmakonzentrationen von x zu den Zeitpunkten t_a und t_b sind. Zur Berechnung der Gesamt- AUC_x werden AUCs der Zeitsegmente addiert. Wenn sich die Basiswerte für Glukose und/oder Insulin zwischen zwei experimentellen Gruppen unterscheiden, können die AUCs darauf korrigiert wer-

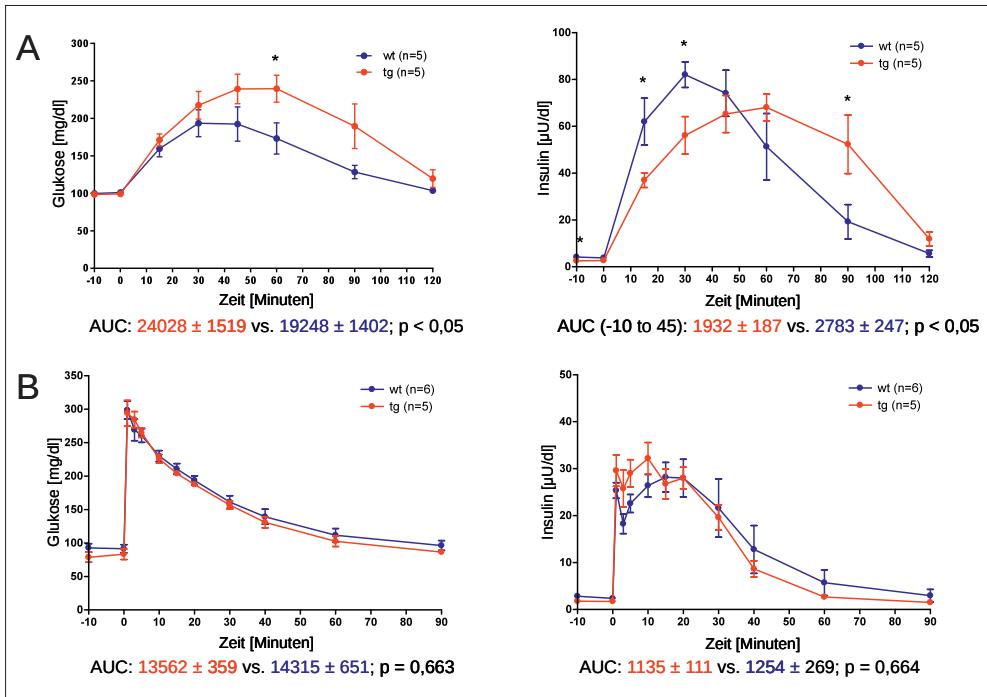


Abb. 2 Charakteristische Verlaufskurven der Glukose- und Insulinkonzentrationen im Blutplasma beim *Mixed-meal*-Toleranztest (MMTT; A) sowie beim intravenösen Glukosetoleranztest (IVGTT; B). Die Tests wurden bei 11 Wochen alten GIPR^{dn} transgenen Schweinen (tg) und nicht-transgenen Wurfgeschwistern (wt) durchgeführt. Bei den GIPR^{dn} transgenen Tieren zeigt sich eine gestörte orale Glukosetoleranz aufgrund einer verzögerten Insulinfreisetzung. Der IVGTT zeigt dagegen in diesem Stadium keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen (nach RENNER et al. 2010).

den (*baseline corrected*, bc). Als Basiswert wird der Mittelwert der Konzentrationen zu den Zeitpunkten vor Glukoseapplikation verwendet. Üblicherweise werden mindestens zu zwei Zeitpunkten vor Glukoseapplikation Blutproben gewonnen, wobei ein Zeitpunkt unmittelbar vor Glukoseapplikation gewählt wird (Zeitpunkt 0 min). Zur Bewertung der Betazell-Funktion ($BCF_{Insulin}$) dient der Quotient $AUC_{Insulin(bc)} / AUC_{Glukose(bc)}$. Allerdings spiegelt die im Plasma gemessene Insulinkonzentration nicht direkt die Insulinsekretion der Betazellen wider, da Insulin teilweise von der Leber aus der Blutzirkulation extrahiert wird. Daher wird als direkter Parameter für die Insulinsekretion der Betazellen häufig die C-Peptid-Konzentration im Plasma bestimmt, da C-Peptid in äquimolarer Menge mit dem Insulin sezerniert, nicht aber durch die Leber extrahiert wird.

Glukosetoleranztests verfolgen primär das Ziel, die Glukosetoleranz des Gesamtorganismus und die Insulinsekretion der Betazellen zu erfassen. Darüber hinaus wurden aus den Daten, die Glukosetoleranztests liefern, für den Menschen auch Surrogat-Indizes entwickelt, die eine Aussage über die Insulinsensitivität erlauben (PATARRAO et al. 2014, SINGH und SAXENA 2010). Von diesen Indices wurde für das Schwein nur der Insulinsensitivitätsindex nach Matsuda ($ISI_{Matsuda}$) (MATSUDA und DEFRONZO 1999) verwendet (CHRISTOFFERSEN et al. 2013, STRECKEL et al. 2015).

Dieser berechnet sich als $10000/\sqrt{(G_0 \text{ (mg/dL)} \times I_0 \text{ (}\mu\text{U/mL)} \times G_m \text{ (mg/dL)} \times I_m \text{ (}\mu\text{U/mL)})}$, wobei G_0 und I_0 die Mittelwerte der Glukose- und Insulinkonzentrationen zu den Zeitpunkten –10 und 0 min und G_m und I_m die Mittelwerte der Glukose- und Insulinkonzentrationen zu den Zeitpunkten 15, 30, 45, 60, 90 und 120 min sind. Bei Göttingen-Minipigs in der Wachstumsphase korrelierte der ISI_{Matsuda} allerdings nicht mit den Ergebnissen von hyperinsulinämischen, euglykämischen Clamp-Studien, die als Goldstandard für die Bestimmung der Insulinsensitivität gelten (CHRISTOFFERSEN et al. 2009). Daher sind weitere Validierungsstudien des ISI_{Matsuda} im Schwein erforderlich, bevor seine Anwendung generell empfohlen werden kann.

Das Problem von Surrogat-Indices für die Insulinsensitivität, die aus den Daten von Glukosetoleranztests geschätzt werden, ist, dass die Plasmakonzentrationen von Glukose und Insulin voneinander abhängig sind und sich wechselseitig beeinflussen und somit keine der beiden Variablen konstant ist. Daher führten DEFRONZO et al. (1979) für den Menschen Verfahren ein, bei denen entweder die Glukose in einer erhöhten Konzentration im Plasma durch den Untersucher konstant gehalten wird (hyperglykämischer Clamp) oder Insulin in einer konstanten Rate infundiert wird, während Glukose variabel in der Menge infundiert wird, die den Blutglukosespiegel im Normalbereich hält (hyperinsulinämischer, euglykämischer Clamp).

Der hyperglykämische Clamp ist die Standardmethode, um die Antwort der Betazellen auf eine anhaltende exogen induzierte Hyperglykämie zu untersuchen. Nach einer Fastenperiode über Nacht wird ein Glukosebolus intravenös verabreicht und dann weiter so viel konzentrierte Glukoselösung infundiert, bis in der Zirkulation und im Extravasalraum die angestrebte erhöhte Glukosekonzentration erreicht ist. Die Glukoseinfusionsrate wird so gewählt, dass das Plateau für üblicherweise 1,5 bis 2 h möglichst konstant bleibt. Dafür wird die Blutglukosekonzentration in Abständen von 5–10 min bestimmt. Die Menge an Glukose, die notwendig ist, um die erhöhte Blutkonzentration zu erhalten, entspricht der Glukoseaufnahme durch den Gesamtorganismus. Allerdings muss hier die Ausscheidung von Glukose mit dem Urin berücksichtigt werden, da die Nierenschwelle ab einer Plasmaglukosekonzentration von etwa 10 mmol/l überschritten wird.

Für die Bestimmung der Insulinsensitivität des Gesamtorganismus wird der hyperinsulinämische, euglykämische Clamp verwendet. Dafür wird nach einer Fastenperiode über Nacht durch Infusion die Insulinkonzentration im Blut bei einem erhöhten Wert (0,4 – 0,6 ng/ml) konstant gehalten. Durch die Infusion von Insulin wird – falls die Menge hoch genug ist und keine hepatische Insulinresistenz vorliegt – die Glukoneogenese in der Leber unterdrückt und zudem die endogene Insulinsekretion gehemmt. Daher entspricht die Menge Glukose, die infundiert werden muss, um eine Normoglykämie aufrechtzuerhalten, der Menge Glukose, die durch die peripheren Gewebe aufgenommen wird, und erlaubt einen Rückschluss auf die Insulinsensitivität. Die Vorgänge beim hyperinsulinämischen, euglykämischen Clamp sind in Abbildung 3 zusammengefasst.

Nachdem die genannten Clamp-Studien sehr aufwendig sind, wurde versucht, auch aus einfach zu messenden Parametern, wie den Nüchtern-Glukose- und -Insulinkonzentrationen im Blutplasma, Indizes für die Bewertung der Glukosehomöostase zu entwickeln. Dafür werden die Blutproben in der Regel nach einer Fastenperiode über Nacht gewonnen. Nachdem die Insulinsekretion pulsatil verläuft, wurde empfohlen, drei Blutproben im Abstand von 5–10 min zu gewinnen und die mittlere Glukose- bzw. Insulinkonzentration im Plasma für die Berechnung von Indizes zu verwenden (WALLACE et al. 2004).

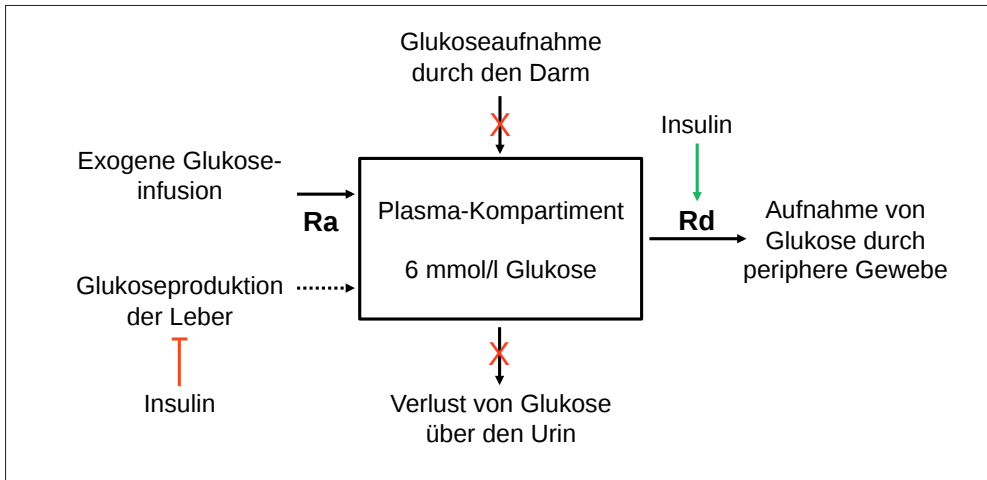


Abb. 3 Insulin- und Glukoseflüsse beim hyperinsulinämischen, euglykämischen Clamp zur Bestimmung der Insulinresistenz (nach KOOPMANS und RADDER 1996). Ra = Rate der Zunahme, Rd = Rate der Abnahme der Glukosekonzentration im Plasma.

HOMA (*homeostasis model assessment*)-Indices werden in klinischen und epidemiologischen Studien verwendet, um die Betazell-Funktion (HOMA- β) und Insulinresistenz (HOMA-IR) aus den Nüchtern-Glukose- (G_0) und -Insulinkonzentrationen (I_0) im Plasma zu schätzen. Das erste Modell (HOMA₁) wurde von MATTHEWS et al. (1985) wie folgt beschrieben:

$$\text{HOMA}_1\text{-}\beta = [I_0 \text{ (mU/L)} \times 20] / [G_0 \text{ (mmol/L)} - 3.5] \quad [1]$$

$$\text{HOMA}_1\text{-IR} = [G_0 \text{ (mmol/L)} \times I_0 \text{ (mU/L)}] / 22.5 \quad [2]$$

HOMA₁ wurde so kalibriert, dass die normale Betazell-Funktion bei 100 % und die physiologische Insulinresistenz bei 1 liegen. Nachdem diese Indices die Betazell-Funktion überschätzen und die Insulinresistenz unterschätzen, wurde im Jahr 1998 ein HOMA₂ etabliert (LEVY et al. 1998); das Modell ist unter <http://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator/> verfügbar. HOMA₁ und HOMA₂ bieten eine akzeptable Schätzung der relativen Unterschiede von Betazell-Funktion und Insulinresistenz zwischen zwei Vergleichsgruppen. Für die Schätzung von Absolutwerten sollte der HOMA₂ verwendet werden (WALLACE et al. 2004). Beim Schwein wurde bislang in erster Linie HOMA₁ verwendet, um Unterschiede zwischen verschiedenen Rassen bzw. physiologischen Zuständen aufzuzeigen (BLAT et al. 2012, CASTELLANO et al. 2010, LIU et al. 2007, THORNING et al. 2015).

Zur Schätzung der Insulinresistenz wurde auf der Basis des HOMA₁-IR der QUICKI-Index (*quantitative insulin sensitivity check index*) entwickelt (KATZ et al. 2000), der wie folgt berechnet wird:

$$\text{QUICKI} = 1 / [\log I_0 \text{ (}\mu\text{U/mL)} + \log G_0 \text{ (mg/dL)}] \quad [3]$$

QUICKI hat eine höhere Reproduzierbarkeit als HOMA₁-IR (ANTUNA-PUENTE et al. 2008, SARAFIDIS et al. 2007), allerdings eine schlechtere Korrelation mit den Ergebnissen von hy-

perinsulinämischen, euglykämischen Clamp-Studien (ANTUNA-PUENTE et al. 2008). Beim Schwein wurde QUICKI nur vereinzelt angewendet (z. B. JONSSON et al. 2006). Eine Validierungsstudie von QUICKI gegen hyperinsulinämische, euglykämische Clamp-Studien bei Göttingen-Minipigs ergab keine ausreichende Korrelation der Ergebnisse beider Methoden (CHRISTOFFERSEN et al. 2009).

3. Quantitativ-morphologische Verfahren zur Bestimmung der endokrinen Zellpopulationen im Schweinepankreas

Im Tiermodell können neben den funktionellen Tests (Glukosetoleranz, Insulinsekretion, Insulinsensitivität) auch quantitative morphologische Untersuchungen zur Bestimmung der Volumina endokriner und sonstiger Zellpopulationen im Pankreas durchgeführt werden. Dabei ist zu beachten, dass Größe und Verteilung der Langerhans-Inseln in verschiedenen Teilen des Pankreas unterschiedlich sind. Daher ist es erforderlich, das Organ systematisch aufzuarbeiten, um eine repräsentative Stichprobe für quantitativ-morphologische Untersuchungen zu gewinnen. Im Mausmodell kann das Pankreas aufgrund seiner geringen Größe komplett untersucht werden (HERBACH et al. 2011, 2005, 2007). Aus dem Schweinepankreas müssen jedoch Proben nach dem Prinzip des *systematic random sampling* gewonnen werden. Eine detaillierte Anleitung findet sich in ALBL et al. (2016), eine Kurzbeschreibung in Abbildung 4.

Zur Bestimmung der Volumendichten der endokrinen Zellpopulationen (Glukagon-produzierende Alphazellen, Insulin-produzierende Betazellen, Somatostatin-produzierende Deltazellen, pankreatisches Polypeptid-produzierende PP-Zellen, Ghrelin-produzierende Epsilonzellen) im Pankreas werden diese in histologischen Schnitten der mittels *systematic random sampling* gewonnenen Proben immunhistochemisch angefärbt. Anschließend werden die Flächendichten der jeweiligen Zellpopulationen mit einem Punktzählverfahren unter Verwendung eines geeigneten Rasters ermittelt. Nach dem Prinzip von DELESSE entsprechen die Volumendichten der Zellpopulationen den ermittelten Flächendichten. Durch Multiplikation der jeweiligen Volumendichten mit dem Pankreasvolumen erhält man die absoluten Volumina der verschiedenen Zellpopulationen (RENNER et al. 2013, 2010, STRECKEL et al. 2015). Mit diesem Verfahren haben wir Auswirkungen der Behandlung von juvenilen GIPR^{dn}-transgenen Schweinen mit dem GLP-1-Rezeptor-Agonisten Liraglutide (Victoza®) auf die Gesamtvolumina der Alpha- und Betazellen untersucht (STRECKEL et al. 2015). Im Vergleich zu Placebo-behandelten Tieren des gleichen Genotyps waren diese Volumina nach Liraglutide-Behandlung signifikant bzw. tendenziell vermindert. Bezogen auf das Körpergewicht, das bei den Liraglutide-behandelten Tieren stark vermindert war, bestand allerdings kein Unterschied in den Gesamtvolumina dieser endokrinen Zelltypen zwischen Behandlungs- und Placebo-Gruppe (Abb. 5).

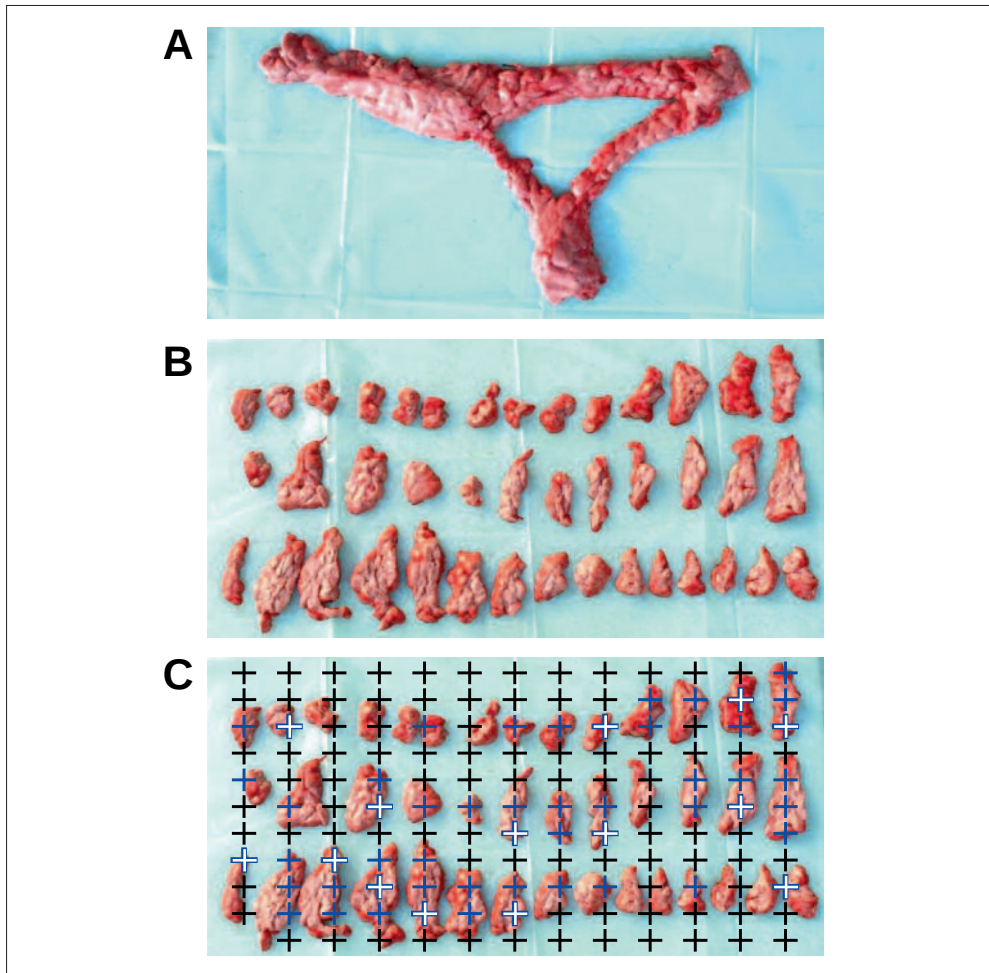


Abb. 4 Systematisch zufällige Auswahl zu beprobender Lokalisationen des Pankreas. Die Bauchspeicheldrüse (A) wird durch planparallele, äquidistante Schnitte lamelliert (B) und mit einem Raster gleichmäßig verteilter Kreuze überlagert (C). Aus sämtlichen auf Pankreasgewebe treffenden Kreuzen (blau) werden die zu beprobenden Lokalisationen (weiß-blaue Kreuze) durch ein festgelegtes Intervall (hier: jedes vierte Kreuz) mit zufälligem Beginn beprobt (nach ALBL et al. 2016).

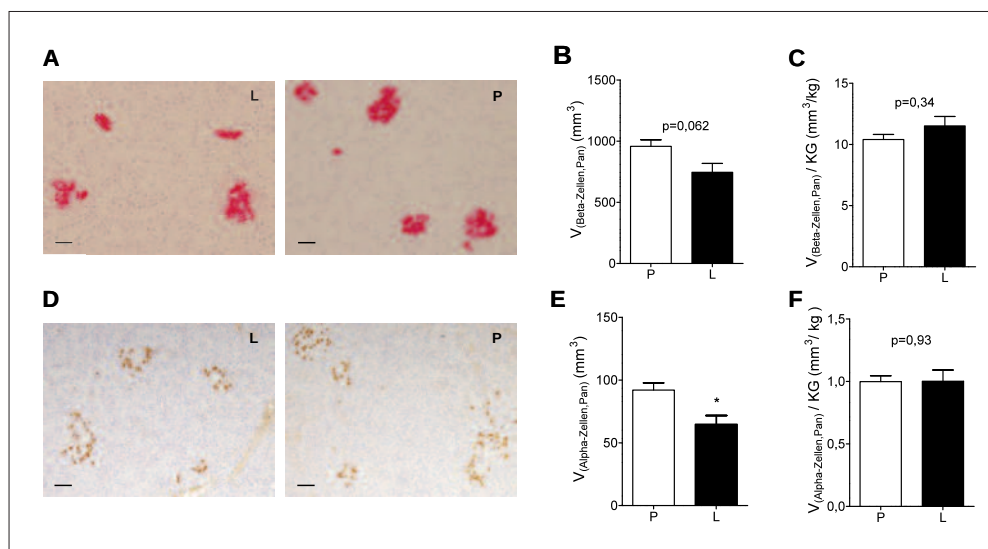


Abb. 5 Quantifizierung der Gesamtvolumina der Beta- bzw. Alphazellen im Pankreas von Liraglutide (L)- bzw. Placebo (P)-behandelten juvenilen GIPR^{dn} transgenen Schweinen (nach STRECKEL et al. 2015). Immunhistochemische Markierung von Insulin (A) bzw. Glukagon (D), absolute (B, E) sowie körperlsgewichtsbezogene Volumina (C, F) der Beta- und Alphazellen.

4. Etablierung einer Biobank von langzeit-diabetischen Schweinen (*Munich MIDY-Pig Biobank*)

Um die Auswirkungen einer chronischen Hyperglykämie auf verschiedene Organe und Gewebe untersuchen zu können, haben wir von 5 langzeit-diabetischen *INS*^{C94Y}-transgenen Schweinen und nicht-transgenen Geschwistertieren im Alter von zwei Jahren eine komplexe Biobank angelegt (siehe Bericht von ABBOTT 2015). Diese beinhaltet ca. 50 unterschiedliche Organe bzw. Gewebe und Körperflüssigkeiten. Im Zuge der Etablierung dieser Biobank wurde das erste standardisierte Protokoll zur systematischen Gewinnung und Prozessierung von Gewebeproben für porcine Krankheitsmodelle erarbeitet (ALBL et al. 2016). Dadurch wird sichergestellt, dass Proben in ausreichender Menge und Qualität für verschiedenste Untersuchungen zur Verfügung stehen. Diese beinhalten holistische molekulare Untersuchungen auf den Ebenen des Transkriptoms, Proteoms, Lipidoms und Metaboloms, Transkript- und Protein-Lokalisationsstudien sowie qualitative und quantitative pathohistologische Untersuchungen. Insgesamt sind in der *Munich MIDY-Pig Biobank* mehr als 20000 Proben gelagert. Ihre Analyse wird neue Einblicke in die Pathogenese von Komplikationen des Diabetes mellitus liefern und zu einem besseren Verständnis der Wechselwirkungen verschiedener Organe und Gewebe im gesunden und im diabetischen Zustand liefern.

Dank

Unsere Projekte zur Erstellung und Charakterisierung von Schweinemodellen für die Diabetesforschung wurden bzw. werden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (GRK 1029: Funktionale Genomforschung in der Tiermedizin), den BMBF-Spitzencluster „m⁴ – Personalisierte Medizin und zielgerichtete Therapien“ und das Deutsche Zentrum für Diabetesforschung (DZD e. V.) gefördert.

Literatur

- ABBOTT, A.: Inside the first pig biobank. *Nature* 519, 397–398 (2015)
- ALBL, B., HAESNER, S., BRAUN-REICHHART, C., STRECKEL, E., RENNER, S., SEELIGER, F., WOLF, E., WANKE, R., and BLUTKE, A.: Tissue sampling guides for porcine biomedical models. *Toxicol. Pathol.* 44, 414–420 (2016)
- ANTUNA-PUENTE, B., FARAJ, M., KARELIS, A. D., GARREL, D., PRUD'HOMME, D., RABASA-LHORET, R., and BASTARD, J. P.: HOMA or QUICKI: is it useful to test the reproducibility of formulas? *Diabetes Metabolism* 34, 294–296 (2008)
- BLAT, S., MORISE, A., SAURET, A., LOUVEAU, I., MACE, K., LE HUEROU-LURON, I., and SEVE, B.: The protein level of isoenergetic formulae does not modulate postprandial insulin secretion in piglets and has no consequences on later glucose tolerance. *Brit. J. Nutrition* 108, 102–112 (2012)
- CASTELLANO, C. A., AUDET, I., LAFOREST, J. P., CHOUINARD, Y., and MATTE, J. J.: Fish oil diets do not improve insulin sensitivity and secretion in healthy adult male pigs. *Brit. J. Nutrition* 103, 189–196 (2010)
- CHRISTOFFERSEN, B., GOLOZOUBOVA, V., PACINI, G., SVENDSEN, O., and RAUN, K.: The young Gottingen minipig as a model of childhood and adolescent obesity: influence of diet and gender. *Obesity* 21, 149–158 (2013)
- CHRISTOFFERSEN, B., RIBEL, U., RAUN, K., GOLOZOUBOVA, V., and PACINI, G.: Evaluation of different methods for assessment of insulin sensitivity in Gottingen minipigs: introduction of a new, simpler method. *Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Compar. Physiol.* 297, R1195–1201 (2009)
- DEFRONZO, R. A., TOBIN, J. D., and ANDRES, R.: Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Amer. J. Physiol.* 237, E214–223 (1979)
- HERBACH, N., BERGMAYR, M., GOKE, B., WOLF, E., and WANKE, R.: Postnatal development of numbers and mean sizes of pancreatic islets and beta-cells in healthy mice and GIPR(dn) transgenic diabetic mice. *PIOS ONE* 6, e22814 (2011)
- HERBACH, N., GOEKE, B., SCHNEIDER, M., HERMANN, W., WOLF, E., and WANKE, R.: Overexpression of a dominant negative GIP receptor in transgenic mice results in disturbed postnatal pancreatic islet and beta-cell development. *Regulatory Peptides* 125, 103–117 (2005)
- HERBACH, N., RATHKOLB, B., KEMTER, E., PICHL, L., KLAFTEN, M., ANGELIS, M. H. DE, HALBAN, P. A., WOLF, E., AIGNER, B., and WANKE, R.: Dominant-negative effects of a novel mutated Ins2 allele causes early-onset diabetes and severe beta-cell loss in Munich Ins2C95S mutant mice. *Diabetes* 56, 1268–1276 (2007)
- HRABE DE ANGELIS, M., NICHOLSON, G., SELLOUM, M., WHITE, J. K., MORGAN, H., RAMIREZ-SOLIS, R., SORG, T., WELLS, S., FUCHS, H., FRAY, M., ADAMS, D. J., ADAMS, N. C., ADLER, T., AGUILAR-PIMENTEL, A., ALI-HADJI, D., AMANN, G., ANDRE, P., ATKINS, S., AUBURTIN, A., AYADI, A., BECKER, J., BECKER, L., BEDU, E., BEKEREDJIAN, R., BIRLING, M. C., BLAKE, A., BOTTOMLEY, J., BOWL, M. R., BRAULT, V., BUSCH, D. H., BUSSELL, J. N., CALZADA-WACK, J., CATER, H., CHAMPY, M. F., CHARLES, P., CHEVALIER, C., CHIANI, F., CODNER, G. F., COMBE, R., COX, R., DALLONEAU, E., DIERICH, A., DI FENZA, A., DOE, B., DUCHON, A., EICKELBERG, O., ESAPA, C. T., FERTAK, L. E., FEIGEL, T., EMEYANOVA, I., ESTABEL, J., FAVOR, J., FLENNIKEN, A., GAMBADORO, A., GARRETT, L., GATES, H., GERDIN, A. K., GKOUTOS, G., GREENAWAY, S., GLASL, L., GOETZ, P., DA CRUZ, I. G., GOTZ, A., GRAW, J., GUIMOND, A., HANS, W., HICKS, G., HOLTER, S. M., HOFER, H., HANCOCK, J. M., HOEHNDORF, R., HOUGH, T., HOUGHTON, R., HURT, A., IVANDIC, B., JACOBS, H., JACQUOT, S., JONES, N., KARP, N. A., KATUS, H. A., KITCHEN, S., KLEIN-RODEWALD, T., KLINGENSPOR, M., KLOPSTOCK, T., LALANNE, V., LEBLANC, S., LENGGER, C., LE MARCHAND, E., LUDWIG, T., LUX, A., MCKERLIE, C., MAIER, H., MANDEL, J. L., MARSCHALL, S., MARK, M., MELVIN, D. G., MEZIANE, H., MICKLICH, K., MITTELHAUSER, C., MONASSIER, L., MOULAERT, D., MULLER, S., NATON, B., NEFF, F., NOLAN, P. M., NUTTER, L. M., OLLERT, M., PAVLOVIC, G., PELLEGATA, N. S., PETER, E., PETIT-DEMOULIERE, B., PICKARD, A., PODRINI, C., POTTER, P., POUILLY, L., PUK, O., RICHARDSON, D., ROUSSEAU, S., QUINTANILLA-FEND, L., QUWAILID, M. M., RACZ, I., RATHKOLB, B., RIET, F., ROSSANT, J., ROUX, M., ROZMAN, J., RYDER, E., SALISBURY, J., SANTOS, L., SCHABLE, K. H., SCHILLER, E., SCHREWE, A., SCHULZ, H., STEINKAMP, R., SIMON, M., STEWART, M., STOGER, C., STOGER, T., SUN, M., SUNTER, D., TEBoul, L., TILLY, I., TOCCHINI-VALENTINI, G. P., TOST, M., TREISE, I., VASSEUR, L., VELOT, E., VOGT-WEISENHORN, D., WAGNER, C., WALLING, A., WATTENHOFER-DONZE, M., WEBER, B., WENDLING, O., WESTERBERG, H., WILLERSHAUSER, M., WOLF, E., WOLTER, A., WOOD, J., WURST, W., YILDIRIM, A. O., ZEH, R., ZIMMER, A., ZIMPRICH, A., HOLMES, C., STEEL, K. P., HERAULT, Y., GAILUS-DURNER, V., MALLON, A. M., and BROWN, S. D.: Analysis of mammalian gene function through broad-based phenotypic screens across a consortium of mouse clinics. *Nature Genet.* 47, 969–978 (2015)
- JONSSON, T., AHREN, B., PACINI, G., SUNDLER, F., WIERUP, N., STEEN, S., SJOBERG, T., UGANDER, M., FROSTEGARD, J., GORANSSON, L., and LINDBERG, S.: A Paleolithic diet confers higher insulin sensitivity, lower C-reactive protein and lower blood pressure than a cereal-based diet in domestic pigs. *Nutrition Metabolism* 3, 39 (2006)
- KATZ, A., NAMBI, S. S., MATHER, K., BARON, A. D., FOLLMANN, D. A., SULLIVAN, G., and QUON, M. J.: Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metabolism* 85, 2402–2410 (2000)
- KOOPMANS, S.-J., and RADDER, J. K.: In vivo insulin action and resistance. The hyperinsulinaemic, euglycaemic clamp technique in conscious rats. *Biomed. Rev.* 5, 31–45 (1996)

- LEVY, J. C., MATTHEWS, D. R., and HERMANS, M. P.: Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program. *Diabetes Care* 21, 2191–2192 (1998)
- LIU, Y., WANG, Z., YIN, W., LI, Q., CAI, M., ZHANG, C., XIAO, J., HOU, H., LI, H., and ZU, X.: Severe insulin resistance and moderate glomerulosclerosis in a minipig model induced by high-fat/ high-sucrose/ high-cholesterol diet. *Experimental Animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science* 56, 11–20 (2007)
- MATSUDA, M., and DEFONZO, R. A.: Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 22, 1462–1470 (1999)
- MATTHEWS, D. R., HOSKER, J. P., RUDENSKI, A. S., NAYLOR, B. A., TREACHER, D. F., and TURNER, R. C.: Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28, 412–419 (1985)
- PATARRAO, R., LAUTT, W., and MACEDO, M.: Assessment of methods and indexes of insulin sensitivity. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo* 9, 65–73 (2014)
- RENNER, S., BLUTKE, A., STRECKEL, E., WANKE, R., and WOLF, E.: Incretin actions and consequences of incretin-based therapies: lessons from complementary animal models. *J. Pathol.* 238, 345–358 (2016a)
- RENNER, S., BRAUN-REICHART, 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.: Permanent neonatal diabetes in INS(C94Y) transgenic pigs. *Diabetes* 62, 1505–1511 (2013)
- RENNER, S., DOBENECKER, B., BLUTKE, A., ZÖLS, S., WANKE, R., RITZMANN, M., and WOLF, E.: Comparative aspects of rodent and nonrodent animal models for mechanistic and translational diabetes research. *Theriogenology* 86/1, 406–421 (2016b)
- RENNER, S., FEHLINGS, C., HERBACH, N., HOFMANN, A., WALDTHAUSEN, D. C. VON, KESSLER, B., ULRICH, K., CHODNEVSKAJA, I., MOSKALENKO, V., AMSELGRUBER, W., GOKE, B., PFEIFER, A., WANKE, R., and WOLF, E.: Glucose intolerance and reduced proliferation of pancreatic beta-cells in transgenic pigs with impaired glucose-dependent insulinotropic polypeptide function. *Diabetes* 59, 1228–1238 (2010)
- RENNER, S., ROMISCH-MARGL, W., PREHN, C., KREBS, S., ADAMSKI, J., GOKE, B., BLUM, H., SUHRE, K., ROSCHER, A. A., and WOLF, E.: 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 (2012)
- ROZMAN, J., RATHKOLB, B., NESCHEN, S., FUCHS, H., GAILUS-DURNER, V., KLINGENSPOR, M., WOLF, E., and HRABE DE ANGELIS, M.: Glucose tolerance tests for systematic screening of glucose homeostasis in mice. *Curr. Protocols Mouse Biol.* 5, 65–84 (2015)
- SALTIEL, A. R., and KAHN, C. R.: Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799–806 (2001)
- SARAFIDIS, P. A., LASARIDIS, A. N., NILSSON, P. M., PIKILIDOU, M. I., STAFILAS, P. C., KANAKI, A., KAZAKOS, K., YOVOS, J., and BAKRIS, G. L.: Validity and reproducibility of HOMA-IR, 1/HOMA-IR, QUICKI and McAuley's indices in patients with hypertension and type II diabetes. *J. Hum. Hypertension* 21, 709–716 (2007)
- SINGH, B., and SAXENA, A.: Surrogate markers of insulin resistance: A review. *World J. Diabetes* 1, 36–47 (2010)
- STRECKEL, E., BRAUN-REICHART, C., HERBACH, N., DAHLHOFF, M., KESSLER, B., BLUTKE, A., BAHR, A., UOBEL, N., EDDICKS, M., RITZMANN, M., KREBS, S., GOKE, B., BLUM, H., WANKE, R., WOLF, E., and RENNER, S.: Effects of the glucagon-like peptide-1 receptor agonist liraglutide in juvenile transgenic pigs modeling a pre-diabetic condition. *J. Translat. Med.* 13, 73 (2015)
- THORNING, T. K., BENDSEN, N. T., JENSEN, S. K., ARDO, Y., THOLSTRUP, T., ASTRUP, A., and RABEN, A.: Cheddar cheese ripening affects plasma nonesterified fatty acid and serum insulin concentrations in growing pigs. *J. Nutrition* 145, 1453–1458 (2015)
- WALLACE, T. M., LEVY, J. C., and MATTHEWS, D. R.: Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 27, 1487–1495 (2004)
- WOLF, E., BRAUN-REICHART, C., STRECKEL, E., and RENNER, S.: Genetically engineered pig models for diabetes research. *Transgenic Res.* 23, 27–38 (2014)

Prof. Dr. Eckhard WOLF
 Genzentrum der
 Ludwig-Maximilians-Universität
 München
 Feodor-Lynen-Straße 25
 81377 München
 Bundesrepublik Deutschland

Tel.: +49 89 218076800
 Fax: +49 89 218076849
 E-Mail: ewolf@genzentrum.lmu.de

Das „gläserne“ Tier: Ein- und Ausblicke in Genome und Gene von Haustieren

Gemeinsames Symposium der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina und der Österreichischen Akademie der Wissenschaften (ÖAW)
vom 10. bis 12. März 2010 in Wien

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 113, Nr. 388
Herausgegeben von Gottfried BREM (Wien)
(2012, 324 Seiten, 71 Abbildungen, 25 Tabellen, 26,95 Euro,
ISBN: 978-3-8047-3028-1)

Der „gläserne Mensch“ hat einen negativen Beigeschmack, das „gläserne Tier“ bisher – noch? – nicht. Die Tierzucht will Tiere so „gläsern“ wie möglich machen: zu Recht, denn keine Industriegesellschaft kann ohne gute Landwirtschaft funktionieren. Der Band liefert einen umfassenden Überblick der Entwicklungen in der innovativen Tierzuchtforschung. Eine wesentliche Voraussetzung ist die Entschlüsselung der Genome. Genomsequenzierung und Genomanalyse sind bei einigen Nutztieren nahezu vollständig ausgeführt oder bereits abgeschlossen. In wenigen Jahren wird voraussichtlich eine ausreichende Kenntnis der Genome weiterer Arten erreicht sein. Die Verfügbarkeit der vollständigen DNA-Sequenz einer Art ermöglicht es nicht nur, gezielt nach merkmalsbeeinflussenden Varianten zu suchen, sondern auch effizienter, als dies zuvor möglich war, krankheitsverursachende Merkmale zu identifizieren und zielgerichtet aus einer Population zu eliminieren. Diese Kenntnisse, in Verbindung mit der Verfügbarkeit sehr diverser Rassen, ermöglichen die Auffindung wichtiger natürlicher genetischer Potenziale und deren sinnvolle Nutzung für eine effiziente zukünftige Nahrungsmittelproduktion.

OMICS: Analyse von Genom, Transkriptom und Endophänotyp – von der genetischen Ausstattung zum Erscheinungsbild

Klaus WIMMERS, Eduard MURANI, Nares TRAKOOLJUL, Michael OSTER,
Alexandra JAEGER, Henry REYER und Siriluck PONSUKSILI (Dummerstorf)

Zusammenfassung

Globale Analysen entlang der Ebenen der Genotyp-Phänotyp-Abbildung tragen zur Identifizierung von molekularen Pfaden und Genen mit funktioneller Bedeutung für tierbasierte Merkmale einer balancierten Tierzucht bei. Art und Menge von Transkripten, Proteinen und Metaboliten werden dabei als molekulare Phänotypen aufgefasst, die als Pendant zur umfassenden Information über die Genotypen dienen. Das heißt, Beobachtungen und Messwerte vom Genom, Transkriptom, Proteom und Metabolom und deren individuelle Variation werden miteinander und mit dem Erscheinungsbild des Tieres und seinen Leistungen in Relation gestellt. Im Sinne einer balancierten Nutztierhaltung gewinnen neben Produktionsmerkmalen funktionale Merkmale eine zunehmende Bedeutung und führen zur Anpassung der Zuchtziele. Eine nachhaltige Nutztierhaltung muss ein hohes Niveau an Tierwohl, Tiergesundheit, Produktions- und Produktqualität sowie Effizienz gewährleisten. Sie braucht ebenso eine große Akzeptanz bei den Verbrauchern. Die durch die Anwendung von omics-Techniken erfassten molekularen Merkmale ermöglichen so, komplexe Zusammenhänge zwischen Produktions- und funktionalen Merkmalen sowie Umweltfaktoren zu untersuchen. Basierend auf den molekularen Phänotypen können Biomarker abgeleitet werden, die Indikatoren für den Zustand eines Organismus sind. Sie können Hinweise auf geeignete Management- oder Behandlungsmaßnahmen geben, als neue Merkmale für komplexe übergeordnete Merkmale dienen und zum Auffinden von merkmalsassoziierten Genen und Allelen für die Marker-/Gen-assistierte Selektion beitragen, was in diesem Beitrag beispielhaft erläutert wird.

Abstract

Holistic analyses of the levels of the genotype-phenotype-map, particularly of the genome and transcriptome and their integration, contribute to the elucidation of the molecular basis of inheritance and trait expression. The individual variation of the genome, transcriptome, proteome, and metabolome are put into relation with each other and with the appearance of the animal. Towards balanced livestock breeding functional traits become increasingly important and lead to the adaptation of the breeding objectives. The data collected by the application of omics techniques provides new molecular phenotypes that contribute to our understanding of complex relationships between production and functional traits and environmental factors. Biomarkers can be derived from these molecular phenotypes and serve as indicators of the state of an organism. Biomarkers provide information on appropriate management or treatment measures, serve as new traits for complex organismal traits and contribute to the identification of trait-associated genes and alleles for the marker-/gene-assisted selection. As new molecular traits biomarker are tools for animal breeding and animal husbandry, which is exemplified in this paper.

1. Einleitung

Analysen auf den Ebenen der Genotyp-Phänotyp-Abbildung können durch die Anwendung von holistischen omics-Techniken erfolgen, wobei die individuelle Variation von Genom, Transkriptom, Proteom und Metabolom miteinander und mit dem Erscheinungsbild des Tieres und seinen Leistungen in Relation gestellt werden.

Die Identifizierung von mehreren Millionen SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism* = Punktmutationen) war Voraussetzung für die technische Entwicklung von SNP-Mikroarrays oder SNP-Chips, die eine Genotypisierung an ca. 50000–700000 Markern in Routineanwendungen erlauben. In genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) werden SNPs mit statistisch signifikanter Beziehung zu einem Merkmal in Tiergruppen mit geringem Kopplungsungleichgewicht identifiziert. Diese SNPs sind mehrheitlich nicht kausal für die Merkmalsausprägung, sondern befinden sich im Kopplungsungleichgewicht zu kausalen Polymorphismen im Genom. Weiter können für die SNP-Marker Effekte auf die Merkmalsprägung geschätzt werden. Dies ist Grundlage der sogenannten genomischen Selektion, bei der in einer Lernstichprobe die Effekte aller SNPs auf züchterisch wichtige Merkmale geschätzt werden. Daraus leitete sich der genomische Zuchtwert eines Tieres als Summe dieser Effekte ab (MEUWISSEN et al. 2001).

Die globale Analyse der Ebene des Transkriptoms in der Genotyp-Phänotyp-Abbildung kann mit Expressions-Mikroarrays oder *Next-Generation-Sequenzierung* der Transkripte (NGS, RNA-Seq) erfolgen. Dabei werden sowohl mRNAs als auch miRNAs quantifiziert und in bioinformatischen Analysen zur Erstellung von funktionalen und regulatorischen Netzwerken genutzt, basierend auf experimentellen Daten – etwa der Korrelationen der Expressionsdaten – und/oder der Annotation der Gene zu definierten molekularen Pfaden. Die Expressionsanalysen ermöglichen die Darstellung des Repertoires an Genen und deren koordinierte Aktivität im Zusammenhang mit der Merkmalsausprägung. Die Abundanz der Transkripte kann dabei als Faktor mit Wirkung auf die Merkmalsausprägung oder selbst als ein genotypabhängiges molekulares Merkmal analysiert werden. Bei der Kombination von Analysen mit Hochdurchsatzverfahren zur Charakterisierung des Genotyps (SNP-Mikroarrays) und Beschreibung des Transkriptoms (Expressionsmikroarrays) werden Daten über das Expressionsniveau verschiedener Gene als phänotypische Merkmale in Kopplungs- bzw. Assoziationsanalysen zur Kartierung von Genomabschnitten genutzt, die die Transkriptabundanz steuern, sogenannten Expressions-QTL, eQTL (JANSEN und NAP 2001, PONSUKSILI et al. 2008). Die Kartierung von Genen und eQTL ermöglicht die Differenzierung von *cis*- und *trans*-Kontrolle der Expression. Dabei legt die Diagnose der *cis*-Kontrolle eines Genes nahe, dass Polymorphismen im Gen vorhanden sind, die ursächlich dessen Expression bestimmen. Mit den Ansätzen der genetischen Genomik wird so ein Zusammenhang zwischen der Variation auf der Ebene der DNA und RNA erstellt. Schließlich entsteht Variation der Transkriptabundanz auch als Konsequenz exogener Faktoren. Unter solchen Genen, deren Expression sich in Antwort auf unterschiedliche Stimuli ändert, befinden sich Kandidatengene für ebenfalls modulierte Merkmale. Auf der Ebene des Genoms sind unter dem Einfluss von Umweltfaktoren epigenetische Veränderungen, d. h. Modifikationen der DNA und des Chromatins, die die Genexpression beeinflussen, möglich. Die Analysen des sogenannten Epigenoms und des Zusammenhangs der epigenetischen Variation mit Expressionsunterschieden und der Variation der Ausprägung eines organismalen Merkmals ordnet das Tier in ein System mit seiner Umwelt ein. Epigenetische Mechanismen sind dabei auch eine molekulare Grundlage für Genotyp-Umwelt-Interaktionen.

Die holistischen Analysen auf den Ebenen der Genotyp-Phänotyp-Abbildung ermöglichen die Ableitung neuer Hypothesen über die Biologie eines Merkmals und liefern neue Erkenntnisse über Mechanismen der Ausprägung und Vererbung züchterisch wichtiger Merkmale.

Im Sinne einer balancierten Nutztierhaltung gewinnen dabei neben Produktionsmerkmalen funktionelle Merkmale eine zunehmende Bedeutung und führen zur Anpassung der Zuchtziele hinsichtlich der Gewichtung von Merkmalen und auch der Berücksichtigung neuer Merkmale (BOICHARD und BROCHARD 2011, MERKS et al. 2011). Dabei können die durch die Anwendung

von omics-Techniken erfassten Merkmale neue molekulare Phänotypen darstellen und zur Verbesserung des Verständnisses der Merkmalsausprägung und zur Aufklärung komplexer Zusammenhänge zwischen Produktions-, Funktions- und Verhaltensmerkmalen sowie Umweltfaktoren beitragen. Die molekularen Phänotypen stellen Biomarker dar, also objektiv und wiederholbar, einfach zu messende Parameter, die Indikatoren für den Zustand eines Organismus sind. Solche Biomarker oder deren Kombination (Biosignatur) können als Merkmal der Kondition oder Symptom Hinweise auf Management- oder Behandlungsmaßnahmen geben. Biomarker können auch, wenn sie diagnostisch für ein komplexes übergeordnetes Merkmal sind, in der Züchtung als neues Merkmal, d. h. Selektionskriterium, herangezogen werden. Schließlich kann die Identifizierung von Biomarkern aus den Ebenen der Genotyp-Phänotyp-Abbildung das Auffinden von merkmalsassoziierten Genen und Allelen erleichtern und so zur Marker-/Gen-assistierten Selektion beitragen. Für die Züchtung stellt ein kausaler Polymorphismus den ultimativen Biomarker dar.

2. Ableitung von Management-, Präventions- und Behandlungsmaßnahmen

In der Milchviehhaltung stellen Mastitiserkrankungen ein Problem für die Ökonomie der Milcherzeugung und das Wohlbefinden der Tiere dar, dem durch Präventions- und Behandlungsmaßnahmen begegnet werden muss. Globale *In-vivo*- und *In-vitro*-Analysen des Transkriptoms von Euterepithelzellen nach *E. coli*- und *Staphylococcus aureus*-Infektionen zeigen, dass die gram-negativen und gram-positiven Keime Mechanismen der Abwehr in unterschiedlicher Weise stimulieren (GÜNTHER et al. 2011, JENSEN et al. 2013). Dabei wurde auch ersichtlich, dass die Euterepithelzellen selbst durch die Expression und Ausschüttung von Zytokinen und Effektorproteinen der angeborenen Abwehr zur Immunabwehr beitragen. Die holistischen Analysen der pathogen- und zellspezifischen Mechanismen der Mastitisabwehr weisen darauf hin, dass eine Inokulation des Euters mit Stimulanzen einer Abwehrreaktion wie Lipopolysacchariden (LPS; „Priming“) zur Prävention von Mastitiserkrankungen beitragen kann. Die Vorbehandlung des Euters, das Priming, mit Immunstimulanzen steigert dabei die Synthese von körpereigenen Abwehr- und Schutzmolekülen, so dass das Euter für eine begrenzte Zeit gegen Neuinfektionen geschützt wird (PETZL et al. 2012). Wie *In-vitro*-Experimente belegen, liegt dieser Schutzwirkung eine induzierte „LPS-Toleranz“ in den Euterepithelzellen zugrunde, bei der die Synthese inflammatorischer Faktoren (Zytokine, z. B. Tumornekrosefaktor-Alpha) vermindert und gleichzeitig die Synthese bakterizider Faktoren (Beta-Defensine) bei einer nachfolgenden Infektion verstärkt wird (GÜNTHER et al. 2012). Sowohl bei der Aktivierung der Abwehrfunktionen im Euter als auch bei der Ausprägung des Schutzes durch Mechanismen der angeborenen Abwehr nach dem Priming sind epigenetische Modifikationen beteiligt. Durch die Analyse der Mechanismen der Ausprägung der Abwehrreaktion bei einer Mastitisinfektion auf den Ebenen des Transkriptoms könnten hier neue Wege zur Mastitisprophylaxe und Therapie der Begleiterscheinungen der akuten Mastitis aufgezeigt werden.

3. Biomarker zur Phänotypisierung des Verhaltens

Die Auseinandersetzung des Tieres mit seiner Umwelt und seine verhaltensphysiologischen Anpassungsreaktionen spielen für das Wohlbefinden eine zentrale Rolle. Das Bewältigungs-

verhalten eines Tieres ist bedeutend für seine Fähigkeit, mit der Umwelt zurechtzukommen, und seine emotionale Bewertung der Umwelt (PUPPE 2003). Weiterhin beeinflusst das Adaptations- und Bewältigungsverhalten auch die Immunreaktion, wobei proaktive Tiere *in vivo* und *in vitro* eine stärkere zelluläre Antwort aufweisen, während reaktive Tiere die humorale Abwehr betonen (GEVERINK et al. 2004). Der negative Einfluss von Aggressions- und Stressverhalten auf Produktions- und Qualitätsmerkmale ist ebenso gezeigt worden (TERLOUW et al. 2008). Die Phänotypisierung des Bewältigungsverhaltens, die Ableitung von Indikatoren, die in enger Beziehung mit dem Befinden der Tiere stehen und die Untersuchung der molekularen und physiologischen Zusammenhänge zwischen Verhalten und der Immunabwehr sind daher von Interesse für eine balancierte Nutztierhaltung. Die Analyse der transkriptionellen Antwort auf einen Immunstimulus vor dem Hintergrund des divergenten Bewältigungsverhaltens trägt dazu bei. Der Vergleich von Expressionsmustern von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von proaktiven und reaktiven Schweinen vor und nach Tetanustoxoidimpfung zeigt in unseren Experimenten, dass die transkriptionelle Antwort der pro- und reaktiven Tiere zu jedem Zeitpunkt vor (Tag 0) und nach der Impfung (Tag 14 und 28) differenzierbar ist. Dabei werden die Gruppenunterschiede am Tag 14 durch eine ähnliche Antwort auf die Tetanustoxoidimpfung teilweise überlagert; beide Verhaltensgruppen zeigen eine adäquate Immunantwort, und eine Verschiebung der Th1- und Th2-Antwort zwischen den Gruppen ist nicht erkennbar. Die Bewältigungsverhaltensgruppen zeigen unterschiedliche Expressionsprofile, vor allem von Genen aus molekularen Pfaden der Zellkommunikation, Angiogenese, Pro-Inflammation, Wundheilung, Immunantwort und Nervensystemfunktionen. Proaktive Tiere aktivieren demgemäß molekulare Pfade, die eine effektive Abwehr und Regeneration fördern, stärker als reaktive Tiere (OSTER et al. 2014a). Die Expressionsprofile und die Erstellung von Netzwerken ko-regulierter Transkripte liefern Biosignaturen für den Verhaltensphänotyp, die zunächst experimentell als Grundlage für weiterführende Analysen der Zusammenhänge zwischen Verhalten, Wohlbefinden, Gesundheit und Leistung dienen und perspektivisch objektive Indikatoren für das Tierwohl liefern können.

4. Integration holistischer Analysen zur Identifizierung kausaler Genvarianten (QTN)

Etwa beim Umsetzen von Schweinen in neue Gruppen kommt es zu aggressivem Verhalten. Diese Stresssituation hat negative Auswirkungen auf die Produktivität und das Wohlbefinden (D'EATH et al. 2010). Vergleichende Expressionsanalysen von Leukozyten, Leber, Nebenniere und Muskel bei Tieren mit moderater und starker Stressreaktion, ausgelöst durch aggressives Verhalten bei Umgruppierung und Transport, zeigten eine Modulation von molekularen Pfaden der angeborenen und erworbenen Abwehr (MURÁNI et al. 2010, 2011, OSTER et al. 2014b,c). Veränderungen bei Effektoren und Zellrezeptoren der Immunabwehr weisen dabei auf eine Alarmierung hinsichtlich einer Immunantwort und -reaktivität. Ferner beobachtet man in allen Geweben eine Verschiebung von molekularen Pfaden in Richtung „fight“. Interessanterweise ist in allen Geweben der Glukokortikoid-Signalweg differentiell reguliert. Analysen von merkmalskorrelierter Expression, genomweiter Assoziation, eQTL und die Modellierung der Kausalität (NEO) zeigten Cortisol-beeinflusste und Cortisol-beeinflussende Gene aus den Funktionspfaden Fettstoffwechsel, Apoptose, Entzündung, Glukokortikoid-Signalweg und Transkriptionsregulation an (PONSUKSILI et al. 2012). Nachfolgende Analysen des Genes für

den Cortisolrezeptor NR3C1, als zentrales Element des Glukokortikoid-Signalwegs und daher als funktionelles und gemäß der genomweiten Assoziationsanalysen positionelles Kandidatengen, führten zur Identifizierung eines SNPs (SNP-c.1829C>T [p.Ala610Val]) in der Ligandenbindungsdomäne, der in diversen Rassen Assoziation mit der Aktivität der Nebenniere zeigt. Dieser SNP repräsentiert einen kausalen Polymorphismus (QTN; *Quantitative Trait Nucleotide*) mit Effekten auf die Ligandenbindung und kortikoidinduzierte transkriptionelle Aktivität des Glukokortikoid-Rezeptors (MURÁNI et al. 2012, REYER et al. 2013, 2014). In dieser Variante ist die Empfindlichkeit des Rezeptors derart verändert, dass die Ausschüttung des Stresshormons Cortisol um mehr als 30 % gesenkt wird. Dies bedeutet verringerte Stressempfindlichkeit und erhöhte Anpassung der Tiere an äußere Reize und somit gesteigertes Wohlbefinden und Leistungserhaltung. Damit ist es gelungen, durch die konsequente Integration von omics-Analysen ein Kandidatengen und durch seine funktionelle Analyse einen kausalen Polymorphismus zu identifizieren. Der Polymorphismus im Kortikoidrezeptorgen stellt ein wesentliches Puzzlestück zur züchterischen Bearbeitung des Merkmalkomplexes Stress und Stressbewältigung dar.

5. Schlussfolgerungen und Perspektiven

Die angeführten Beispiele zeigen, dass die Klärung der Mechanismen der Merkmalsausprägung, Vererbung und Genotyp-Umwelt-Interaktionen durch holistische Analysen entlang der Genotyp-Phänotyp-Abbildung neue molekulare Phänotypen und Biomarker liefern und insbesondere ihre Integration Kandidatengene für quantitative Merkmale anzeigen. Die konsequente weitere Analyse kann erfolgreich bis zur Identifizierung kausaler Polymorphismen (QTN) fortgeführt werden. Als neue molekulare Phänotypen können Biomarker und Polymorphismen so Werkzeuge für die Tierzucht und Tierhaltung darstellen. Dies trägt zur Entwicklung eines biomarker- und genotypgestützten, individualisierten und situativen Managements in der Nutztierhaltung und zur Auswahl von für spezifische Produktions- und Leistungsanforderungen geeigneten Tieren bei.

Literatur

- BOICHARD, D., and BROCHARD, M.: New phenotypes for new breeding goals in dairy cattle. *Animal* 6, 544–550 (2011)
- D'EATH, R. B., TURNER, S. P., KURT, E., EVANS, G., THÖLTING, L., LOOFT, H., WIMMERS, K., MURÁNI, E., KLONT, R., FOURY, A., ISON, S. H., LAWRENCE, A. B., and MORMÈDE, P.: Pigs' aggressive temperament affects pre-slaughter mixing aggression, stress and meat quality. *Animal* 4, 604–616 (2010)
- GEVERINK, N. A., PARMENTIER, H. K., VRIES REILINGH, G. DE, SCHOUTEN, W. G., GORT, G., and WIEGANT, V. M.: Effect of response to backtest and housing condition on cell-mediated and humoral immunity in adult pigs. *Physiol. Behav.* 80, 541–546 (2004)
- GÜNTHER, J., ESCH, K., POSCHADEL, N., PETZL, W., ZERBE, H., MITTERHUEMER, S., BLUM, H., and SEYFERT, H.-M.: Comparative kinetics of *Escherichia coli*- and *Staphylococcus aureus*-specific activation of key immune pathways in mammary epithelial cells demonstrates that *S. aureus* elicits a delayed response dominated by interleukin-6 (IL-6) but not by IL-1A or tumor necrosis factor alpha. *Infect. Immun.* 79, 695–707 (2011)
- GÜNTHER, J., PETZL, W., ZERBE, H., SCHUBERTH, H. J., KOZAN, D., GOETZE, L., and SEYFERT, H.-M.: Lipopolysaccharide priming enhances expression of effectors of immune defence while decreasing expression of pro-inflammatory cytokines in mammary epithelial cells from cows. *BMC Genomics* 13, 17 (2012)
- JANSEN, R. C., and NAP, J. P.: Genetical genomics: the added value from segregation. *Trends Genet.* 17, 388–391 (2001)

- JENSEN, K., GÜNTHER, J., TALBOT, R., PETZL, W., ZERBE, H., SCHUBERTH, H. J., SEYFERT, H.-M., and GLASS, E. J.: *Escherichia coli*- and *Staphylococcus aureus*-induced mastitis differentially modulate transcriptional responses in neighbouring uninfected bovine mammary gland quarters. *BMC Genomics* 14, 36 (2013)
- MERKS, J. W., MATHUR, P. K., and KNOL, E. F.: New phenotypes for new breeding goals in pigs. *Animal* 6, 535–543 (2011)
- MEUWISSEN, T. H., HAYES, B. J., and GODDARD, M. E.: Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157, 1819–1829 (2001)
- MURÁNI, E., PONSUKSILI, S., D'EATH, R. B., TURNER, S. P., EVANS, G., THÖLKG, L., KURT, E., KLONT, R., FOURY, A., MORMÈDE, P., and WIMMERS, K.: Differential mRNA expression of genes in the porcine adrenal gland associated with psychosocial stress. *J. Mol. Endocrinol.* 46, 165–174 (2011)
- MURÁNI, E., PONSUKSILI, S., D'EATH, R. B., TURNER, S. P., KURT, E., EVANS, G., THÖLKG, L., KLONT, R., FOURY, A., MORMÈDE, P., and WIMMERS, K.: Association of HPA axis-related genetic variation with stress reactivity and aggressive behaviour in pigs. *BMC Genetics* 11, 74 (2010)
- MURÁNI, E., REYER, H., PONSUKSILI, S., FRITSCHKA, S., and WIMMERS, K.: A substitution in the ligand binding domain of the porcine glucocorticoid receptor affects activity of the adrenal gland. *PLOS ONE* 7/9, e45518 (2012)
- OSTER, M., MURÁNI, E., PONSUKSILI, S., D'EATH, R. B., TURNER, S. P., EVANS, G., THÖLKG, L., KURT, E., KLONT, R., FOURY, A., MORMÈDE, P., and WIMMERS, K.: Hepatic expression patterns in psychosocially high-stressed pigs suggest mechanisms following allostatic principles. *Physiol. Behav.* 128, 159–165 (2014a)
- OSTER, M., MURÁNI, E., PONSUKSILI, S., D'EATH, R. B., TURNER, S. P., EVANS, G., THÖLKG, L., KURT, E., KLONT, R., FOURY, A., MORMÈDE, P., and WIMMERS, K.: Transcriptional responses of PBMC in psychosocially stressed animals indicate an alerting of the immune system in female but not in castrated male pigs. *BMC Genomics* 15, 967 (2014b)
- OSTER, M., SCHEEL, M., MURÁNI, E., PONSUKSILI, S., ZEBUNKE, M., PUPPE, B., and WIMMERS, K.: The fight-or-flight response is associated with PBMC expression profiles related to immune defence and recovery in swine. *PLOS ONE* 10/3, e0120153 (2014c)
- PETZL, W., GÜNTHER, J., PFISTER, T., SAUTER-LOUIS, C., GOETZE, L., AULOCK, S. VON, HAFNER-MARX, A., SCHUBERTH, H. J., SEYFERT, H.-M., and ZERBE, H.: Lipopolysaccharide pretreatment of the udder protects against experimental *Escherichia coli* mastitis. *Innate Immun.* 18, 467–477 (2012)
- PONSUKSILI, S., DU, Y., MURÁNI, E., SCHWERIN, M., and WIMMERS, K.: Elucidating molecular networks that either affect or respond to plasma cortisol concentration in target tissues of liver and muscle. *Genetics* 192, 1109–1122 (2012)
- PONSUKSILI, S., JONAS, E., MURÁNI, E., PHATSARA, C., SRIKANCHAI, T., WALZ, C., SCHWERIN, M., SCHELLANDER, K., and WIMMERS, K.: Trait correlated expression combined with expression QTL analysis reveals biological pathways and candidate genes affecting water holding capacity of muscle. *BMC Genomics* 9, 367 (2008)
- PUPPE, B.: Stressbewältigung und Wohlbefinden – Verhaltensphysiologische Ansatzpunkte einer Gesundheitssicherung bei Tieren. *Arch. Anim. Breed.* 46, 52–56 (2003)
- REYER, H., PONSUKSILI, S., WIMMERS, K., and MURÁNI, E.: Transcript variants of the porcine glucocorticoid receptor gene (NR3C1). *Gen. Comp. Endocrinol.* 189, 127–133 (2013)
- REYER, H., PONSUKSILI, S., WIMMERS, K., and MURÁNI, E.: Association of N-terminal domain polymorphisms of the porcine glucocorticoid receptor with carcass composition and meat quality traits. *Anim. Genet.* 45, 125–129 (2014)
- TERLOUW, E. M., ARNOULD, C., AUVERIN, B., BERRI, C., LE BIHAN-DUVAL, E., DEISS, V., LEFÈVRE, F., LENSINK, B. J., and MOUNIER, L.: Pre-slaughter conditions, animal stress and welfare: current status and possible future research. *Animal* 2, 1501–1517 (2008)

Prof. Dr. Klaus WIMMERS
 Institut für Genombiologie
 Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN)
 Wilhelm-Stahl-Allee 2
 18196 Dummerstorf
 Bundesrepublik Deutschland
 Tel.: +49 38208 68700
 Fax: +49 38208 68702
 E-Mail: wimmers@fbn-dummerstorf.de

Bildgestützte Methoden zur Analyse von Exterieurmerkmalen bei Pferden

Thomas DRUML und Gottfried BREM ML, WM ÖAW (Wien, Österreich)

Zusammenfassung

In der Pferdezucht spielt die Exterieurbeurteilung eine zentrale Rolle bei der Durchführung von Zuchtprogrammen. Die Beurteilernoten sind naturgemäß subjektiv und weisen Wiederholbarkeiten laut Literatur zwischen 0,32 und 0,99 und Beurteilereinstimmungen mit Korrelationen zwischen 0,10 bis 0,90 auf. Letztendlich führen die Abweichungen zwischen den Richtern zu unterschiedlichen Rangierungen von Tieren. Die Übereinstimmung zwischen Richtern kann auch mit dem skalensensitiven Kappa-Koeffizienten ausgedrückt werden, der in der vorliegenden Arbeit bei Lipizzaner-Stuten zwischen 0,16 bis 0,53 (respektive einem Korrelationskoeffizienten von 0,41 bis 0,68) und bei Lipizzaner-Hengsten zwischen 0,08 bis 0,42 (respektive einem Korrelationskoeffizienten von 0,30 bis 0,55) liegt. Mittlerweile existieren hoch komplexe Bild- und Videoauswertungsmethoden (Gesichtsmustererkennung, Bewegungserkennung, Bildgestützte Diagnostik, Struktur- und Mustererkennung), die auf breitem wissenschaftlichen und technischem Gebiet eingesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Bildanalysetechniken, die auf der sogenannten Prokrustes-Statistik und dem Raum-Form-Modell von GOODALL (1991) aufbauen, angewandt, um objektive Daten, die das Exterieur von 102 Lipizzaner-Hengsten und 44 Lipizzaner-Stuten beschreiben, zu erheben. Die Beurteilungsnoten, welche in einer signifikanten Form-Regression vorlagen, erklären lediglich zwischen 5,93 % und 1,2 % der gesamten Formenvarianz. Gleichzeitig konnte festgestellt werden, dass ein Zusammenhang zwischen dem Maß der Übereinstimmung der Beurteiler in den einzelnen Kriterien mit signifikanten Rangierungen der Pferde im „Horse Shape Space“ bestehen. Merkmale, bei denen die Übereinstimmungskoeffizienten (Kappa-Koeffizienten) unter 0,38 liegen, wurden von den Richtern bei den einzelnen Tieren so gewichtet, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen Richternoten und objektiven Formmerkmalen bestand. Mit Hilfe der Prokrustes-Statistik können der „Horse Shape Space“ – die multidimensionale Verteilung der einzelnen Pferdeformen – und die Bewertungen der einzelnen Richter visualisiert werden. Diese „Idealtiere“ repräsentieren die visuelle Kodierung der Bewertungsnoten, welche von den einzelnen Zuchtrichtern in der jeweiligen Stichprobe beobachtet werden konnten. Somit liegt mit dem Konzept des „Horse Shape Space“ eine objektive und biologisch sinnvolle Datenskala vor, die für die Evaluierung von Bewertungsschemata, Richternoten und Zuchtprogrammen herangezogen werden kann.

Abstract

In this paper the shape of 102 Lipizzan stallions from the Spanish Riding School in Vienna was analyzed using novel techniques from the field of image analysis. In addition we examined the differences in the conformation classifiers' perception of so-called "type traits". Based on 246 two-dimensional anatomical and somatometric landmarks, digitized from standardized photographs the shape variation has been analyzed by use of generalized orthogonal least-squares Procrustes (GPA) procedures. Shape variables were regressed onto the results from linear type trait classifications (shape regressions) and a partial least squares (PLS) model was established to study the covariation of shape predictors and dependent type traits. Therefore, the rating scores of eight conformation classifiers were tested for agreement yielding an inter-rater correlation ranging from 0.30 to 0.55, respectively a Kappa coefficient ranging from 0.08 to 0.42. From the 56 performed shape regressions 32 % resulted in a significant equation. Differences of model horses along the regression curves of mean ratings and individual ratings were visualized by warped and averaged images. The PLS models established were based on three significant factors that explained between 20.1 % to 45.6 % of variation within the shape predictors and 48.8 to 49.5 % of the variation for the dependent trait descriptors. The correlation

of predicted and observed trait descriptors derived with the PLS model comprised 0.63 – 0.71. Finally it has been demonstrated, that shape regressions offer the possibility to visualize and evaluate individual and mean ratings and PLS models, which are calibrated by evaluated and tested rankings, are capable to predict trait descriptors from a set of shape predictors.

1. Einleitung

In der geometrischen Formenanalyse (*Geometric Morphometrics*, GM) werden biologische Strukturen mittels 2- oder 3-dimensionalen Koordinaten erfasst. Eine direkte statistische Analyse dieser Koordinaten wäre nicht zielführend, da verzerrende Effekte, hervorgerufen durch Position, Orientierung und Größe der einzelnen Koordinatenmuster, existieren. Aus diesem Grund müssen die als *Non-Shape*-Variation definierten Störfaktoren mathematisch bereinigt werden, bevor die Daten analysiert werden können (Abb. 1).

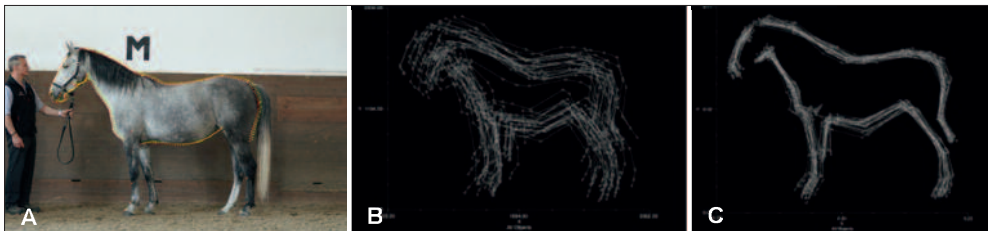


Abb. 1 Koordinatendefinition (A), Eliminierung von *Non-Shape*-Variation (B) aus dem Datenmaterial – Skalierung, Zentrierung und Rotation auf Minimumdistanz (C)

Mittlerweile werden in fast allen morphometrischen Studien Methoden verwendet, welche auf dem Form-Raum-Konzept von KENDALL (1984), der Prokrustes-Distanz und deren tangentialer Raumprojektion aufbauen. Dieser neue Weg in der Analyse von „Landmark“-Koordinaten wird auch als „Generalisierte Prokrustes-Analyse“ (GPA) bezeichnet. Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode, neben der Charakterisierung des „Shape Space“, ist vor allem die Präsentation der Ergebnisse anhand morphologischer Strukturen. Dies wird durch das Beibehalten der Geometrie der Formen während des ganzen Analysewegs ermöglicht. Typischerweise werden Formunterschiede mittels der Gitternetze von D'ARCY THOMPSON (1917, in: MITTERRÖCKER und GUNZ 2009) dargestellt. So ergibt sich in der Interpretation statistischer Ergebnisse ein komplett neuer Weg, der gleichzeitig mit neuen Fragestellungen in der Erforschung von morphologischen Strukturen verbunden ist. Weiterführende Informationen zu GM-Methoden sind in dem Review von MITTERRÖCKER und GUNZ (2009) zu finden.

2. Material und Methoden

Als Bezugssystem, welches für den Vergleich von standardisierten Bildern mittels der Generalisierten Prokrustes-Analyse (GPA) erstellt wird (vgl. DRUML et al. 2015), dient der sogenannte „Shape Space“, eine tangentiale Projektion der multidimensional verteilten Prokrustes-Residuen von der mittleren Form auf eine tangentiale Ebene, mit Schnittpunkt durch das Stichprobenmittel

(Dimensionen d , Anzahl Landmarks = p , $d = 2p - 4$, in diesem Fall 490 Dimensionen). Innerhalb dieses „Shape Space“ sind die einzelnen Formen (Koordinatenmuster der jeweiligen Pferde) untereinander vergleichbar. Durch die GPA werden die einzelnen Formen zentriert, auf die einheitliche Größe 1 skaliert und auf Minimumdistanz zueinander angepasst (Abb. 1). Die einzelnen Formen, die so optimal übereinander gelagert, gleich groß und zentriert sind, sind in Abbildung 2 dargestellt. Aus dieser multidimensionalen Verteilung können die ihr zugrundeliegenden $2p - 4 - 2$ -Shape-Koordinaten und 2 „Uniform Components“ für weitere statistische Analysen verwendet werden. Um den multidimensionalen Form-Raum niederzuskalieren, wird eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt, die jedoch nur innerhalb der Stichprobe eine Gültigkeit hat, da daraus $n - 1$ Hauptkomponenten (PCA-Achsen) destilliert werden.

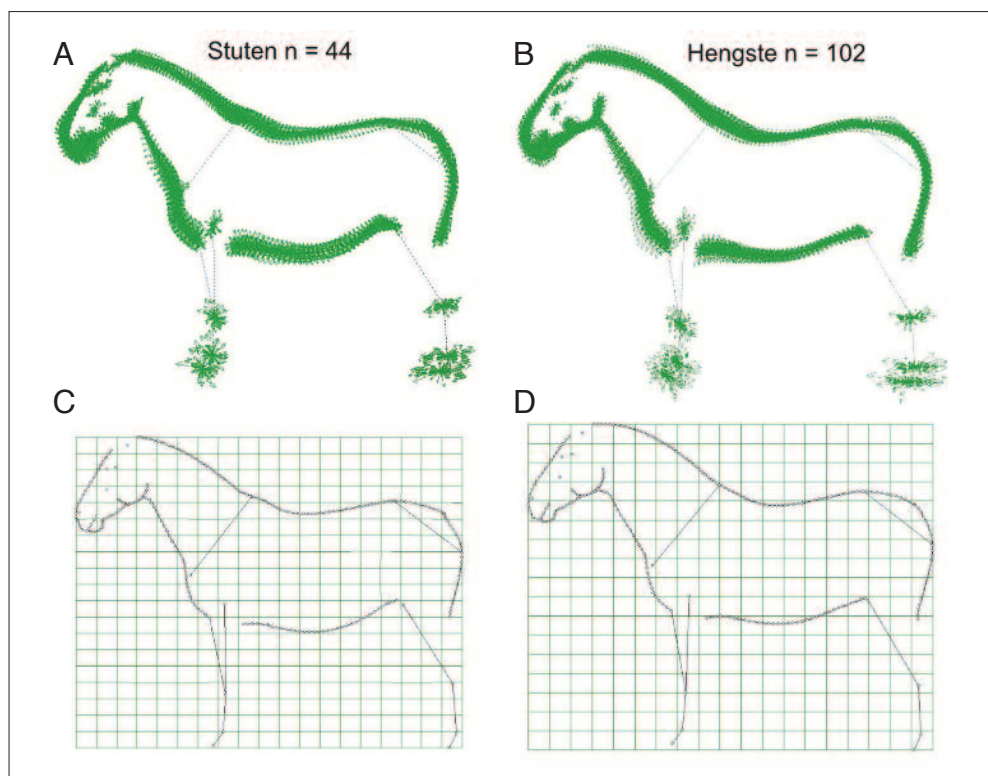


Abb. 2 Oben die Variation innerhalb der Stichproben von 44 Stuten aus dem Gestüt Piber (A, aus DRUML et al. 2015) und der 102 Hengste der Spanischen Reitschule (B). Unten die den Verteilungen zugrundeliegenden beiden mittleren Formen, (C) die „mittlere“ Lipizzaner-Stute aus Piber, (D) der „mittlere“ Hengst der Spanischen Reitschule.

Für diese Studie wurden 102 Hengste der Spanischen Reitschule fotografisch, einem standardisierten Protokoll (DRUML et al. 2015) folgend, phänotypisiert, deren Umrisskoordinaten und anatomische Landmarkkoordinaten aus den Bildern extrahiert und mittels zuvor beschriebener GM-Methoden analysiert.

Im Zuge des Experiments wurden 102 Lipizzaner-Hengste der Spanischen Reitschule in Wien und aus deren Dependence in Heldenberg (Niederösterreich) einer Exterieurbeurteilung

analog zu den 44 Lipizzaner-Stuten nach dem Beurteilungsschema (auf einer Skala von 1 bis 10) mit den Merkmalen Typ, Rassetyp, Geschlechtstyp, Harmonie, Kopf, Hals, Sattellage, Schulter, Brust, Rücken, Kruppe, Fundament, Stellung, Schritt, Trab und Temperament unterzogen. Die Kommission bestand größtenteils aus denselben Richtern wie im 1. Experiment mit den Lipizzaner-Stuten (DRUML et al. 2015).

Die daraus resultierenden 12472 Noten wurden mittels einer ANOVA, einer Korrelationsanalyse, und der Kappa-Statistik auf Unterschiede bzw. Übereinstimmung zwischen den einzelnen Richtern überprüft. Die 33 anatomischen und 213 Umrisskoordinatenpunkte der 102 Pferde wurden mit einer GPA analysiert. Die daraus berechneten Formenvariablen (*Shape Coordinates, relative warp scores*) wurden einer Regressionsanalyse auf die gemittelten Richternoten unterzogen (*Shape-Regression*). Die Kovariation zwischen *Shape*-Koordinaten und den mittleren Richternoten wurde mittels einer *Partial-Least-Square-Analyse* (PLS) untersucht. Deskriptive Statistik, ANOVA, multiple Mittelwertsvergleiche und Tukey-Kramer-Test, Kappa-Statistik sowie die PLS-Analyse wurden mit dem Software Paket SAS (SAS inc. 2009) berechnet, die GPA und die *Shape-Regression* sowie die grafischen Darstellungen wurden mit den Software-Paketen der TPS-Serie durchgeführt (ROHLF 2003, 2004, 2005, 2013, 2014).

3. Ergebnisse

3.1 Richternoten und deren Übereinstimmung

Im Vergleich zu den Stuten wurden die Hengste mit signifikant höheren Noten bewertet. In Tabelle 1 sind die Mittelwerte über alle vergebenen 1482–1583 Noten pro Richter dargestellt. Am strengsten war Richter 7 mit einer mittleren Note von 7,16, die Richter 4 und 6 hingegen vergaben wesentlich höhere Noten mit einem Mittel von 7,58.

Tab. 1 Mittlere Beurteilungsnoten und Standardabweichungen (SE) über alle Merkmale nach Richter

Richter	N	Mittel	Minimum	Maximum	SE	Notenbereich
1	1580	7,57	5	9	0,66	4
5	1565	7,48	5	9	0,68	4
6	1578	7,58	5	9	0,66	4
4	1482	7,58	6	9	0,66	3
2	1568	7,53	6	9	0,67	3
7	1583	7,16	6	9	0,78	3
8	1539	7,55	6	9	0,68	3
9	1577	7,48	5	9	0,65	4

Die Unterschiede zwischen den Richtern waren bei den Hengsten besonders ausgeprägt, was sich auch anhand der zahlreichen signifikant unterschiedlichen Mittelwerte in Tabelle 2 nachvollziehen lässt. Vor allem bei den privaten Zuchtrichtern (Richter 5, 6, 7, 8, 9) und in den Einzelmerkmalen (Kopf, Hals, Sattellage, Schulter, Brust, Rücken, Kruppe, Fundament) kam es zu zahlreichen signifikanten Abweichungen in der Benotung. In der vorausgegangenen multivariaten Varianzanalyse mit dem Modell:

$$y = \hat{y} + \text{alter}_i + \text{richter}_j + \text{tier}_k + e_{ijkl} \quad [1]$$

zeigten die fixen Effekte Richter (1–8) und Tier (1–102) signifikante Einflüsse auf die Grunddaten. Die Bestimmtheitsmaße dieser Modelle reichten von 0,36 bis 0,55, somit konnte dadurch bis zur Hälfte der Varianz in den Daten erklärt werden.

Tab. 2 Unterschiede und deren Signifikanzen der mittleren Beurteilungsnoten der acht Richter in den einzelnen Merkmalen, dargestellt anhand eines multiplen Mittelwertvergleiches, korrigiert nach TUKEY und KRAMER (die hochgestellten Kleinbuchstaben repräsentieren signifikante Unterschiede mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$).

Merkmal	Bestimmtheitsmaß	9	4	1	6	7	2	8	5
Typ	0,52	7,90 ^a	7,81	7,87 ^a	7,82	7,63 ^b	7,85 ^a	7,98 ^a	7,79
Rassetyp	0,52	7,92 ^{ab}	7,79 ^a	7,92 ^{ab}	7,76 ^a	7,83 ^a	8,12 ^{cb}	8,16 ^b	7,97
Geschlechtstyp	0,55	7,59 ^{ac}	7,68	7,52 ^a	7,59 ^{ac}	7,60 ^{ac}	7,73	7,80 ^{bc}	7,84 ^b
Harmonie	0,45	7,63	7,67	7,71 ^{bc}	7,61 ^{ac}	7,48 ^a	7,63	7,83 ^b	7,65
Kopf	0,45	7,84 ^{ac}	7,97 ^c	7,77	7,56 ^b	7,61 ^b	7,67 ^{ab}	7,58 ^b	7,76
Hals	0,51	7,47 ^a	7,69 ^{bc}	7,82 ^b	7,74 ^{bc}	7,55 ^{ac}	7,73 ^{bc}	7,61	7,64
Sattellage	0,36	7,54 ^a	7,48 ^{ac}	7,42 ^{ac}	7,55 ^{ab}	7,10 ^{bc}	7,33 ^c	7,53 ^{ac}	7,49 ^{ac}
Schulter	0,36	7,49 ^{ac}	7,48 ^{ac}	7,49 ^{ac}	7,58 ^a	7,09 ^b	7,66 ^a	7,34 ^c	7,52 ^{ac}
Brust	0,39	7,47 ^d	7,78 ^a	7,61 ^{acd}	7,74 ^{ac}	7,17 ^b	7,57 ^{cd}	7,59 ^{cd}	7,71 ^{ac}
Rücken	0,45	7,49 ^{ab}	7,50 ^{ab}	7,66 ^b	7,51 ^{ab}	7,21 ^c	7,34 ^{ac}	7,32 ^{ac}	7,35 ^{ac}
Kruppe	0,34	7,55 ^{ab}	7,70 ^a	7,53 ^{ab}	7,65 ^a	7,21 ^c	7,54 ^{ab}	7,62 ^{ab}	7,43 ^b
Fundament	0,40	7,08 ^a	7,45 ^b	7,09 ^a	7,23 ^{ab}	6,54 ^c	7,02 ^a	7,32 ^b	6,97 ^a

Die Ergebnisse aus den vorangegangenen Analysen implizierten aufgrund der zahlreichen signifikanten Unterschiede zwischen Richtern eine geringere Übereinstimmung derselben. Aus diesem Grund wurde verstärktes Augenmerk auf die Analyse der Richterübereinstimmung gelegt, um in den darauffolgenden Regressionsanalysen entsprechend geprüfte und verifizierte Richterskalen zu verwenden.

Die Übereinstimmung zwischen mehreren Richtern kann mittels einer Korrelation gemessen werden, wobei aufgrund der eingeschränkten und meist schiefen Notenskala eine Korrektur nach SPEARMAN vorgenommen wird. Eine weitere Möglichkeit ist die Berechnung der exakten Übereinstimmung der Noten zwischen Richtern mittels des Kappa-Koeffizienten nach FLEISS (1970).

In Tabelle 3 werden die Kappa-Koeffizienten für verschiedene Gruppierungen, wie sie bei der Analyse im Falle der Lipizzaner-Stuten verwendet worden waren, dargestellt.

Tab. 3 Kappa-Koeffizienten und Standardabweichungen (SE) von 44 Lipizzaner-Stuten (DRUML et al. 2015) und 102 Lipizzaner-Hengsten (jeweils alle vergebenen Noten), für alle Richter, Gestütsdirektoren (Richter 1–4) und Richter von privaten Zuchtverbänden (Richter 5–9) und Kombination ohne Richter 7. ($\emptyset$ 1629 Noten pro Hengst, min. 2 Noten pro Merkmal)

	Kappa-Stuten	SE	Kappa-Hengste	SE
Alle	0,33	0,007	0,21	0,003
Gestütsdirektoren	0,39	0,016	0,27	0,011
Private Organisationen	0,29	0,016	0,18	0,006
Alle ohne Richter 7	0,38	0,009	0,24	0,004
Private ohne Richter 7	0,48	0,028	0,22	0,008

Die exakten Übereinstimmungen, gemessen mit dem Kappa-Koeffizienten, sind bei der Beurteilung von Hengsten um ein Drittel niedriger als bei Stuten. Die Unterschiede zwischen den Gruppierungen der Richter sind in der Tendenz jedoch ähnlich geblieben. Die Gestütsdirektoren liegen mit ihrem Übereinstimmungsgrad über dem Mittel, die Privaten Richter unter dem Mittel. Das Gleiche gilt für die Kombinationen ohne Richter 7, der mit seinen Noten signifikant von den restlichen Beurteilern abgewichen ist. Mit einem maximalen Kappa-Koeffizienten von 0,27 (Gestütsdirektoren) liegt die Übereinstimmung in einem unteren Bereich und kann daher laut der Definition von FLEISS (1970) nur als „schwache Übereinstimmung“ kategorisiert werden.

Die Übereinstimmungen (Kappa-Koeffizient) zwischen einzelnen Richterpaaren variieren zwischen 0,42 und 0,08, entsprechende Korrelationen korrigiert nach SPEARMAN zwischen 0,55 und 0,30. Die Werte der Gestütsdirektoren sind hier eindeutig in der oberen Hälfte zu finden.

In Tabelle 4 sind die Kappa-Koeffizienten der einzelnen Merkmale dargestellt, die bis zu 50 % niedriger sind, als jene, die bei Stuten ermittelt worden waren. Die Wertigkeit zwischen den einzelnen Merkmalen ist jedoch konstant geblieben. Die höchsten Übereinstimmungskoeffizienten bei Hengsten sind bei den Merkmalen Typ, Geschlechtstyp, Hals und Rasstyp zu beobachten (vgl. Stuten: Typ, Rasstyp, Harmonie, Hals, Geschlechtstyp). Die niedrigsten Konkordanzwerte sind bei den Merkmalen (Hengste): Fundament, Kruppe, Schulter und Sattellage (vgl. Stuten: Sattellage, Fundament, Schulter, Brust) erreicht worden.

Tab. 4 Kappa-Koeffizienten und Standardabweichungen (SE) für Exterieurmerkmale bei 44 Lipizzaner-Stuten (DRUML et al. 2015) und 102 Lipizzaner-Hengsten

	Stuten (n = 44)		Hengste (n = 102)	
	Kappa	SE	Kappa	SE
Typ	0,49	0,028	0,24	0,013
Rasstyp	0,38	0,027	0,21	0,013
Geschlechtstyp	0,28	0,025	0,23	0,013
Harmonie	0,38	0,026	0,19	0,014
Kopf	0,28	0,025	0,18	0,013
Hals	0,30	0,026	0,22	0,014
Sattellage	0,16	0,030	0,13	0,016
Schulter	0,27	0,030	0,09	0,016
Brust	0,27	0,033	0,15	0,016
Rücken	0,32	0,028	0,17	0,016
Kruppe	0,29	0,027	0,08	0,016
Fundament	0,24	0,036	0,06	0,013

3.2 Shape-Regression

Um die Bewertungen der einzelnen Richter, die letztendlich in einer Rangierung der einzelnen Pferde resultieren, auf deren Gültigkeit hin zu prüfen, wurden diese in den Typmerkmalen Typ, Rasstyp, Geschlechtstyp, Harmonie und in den Merkmalskomplexen

„Summe aus allen 13 Merkmalen“ (alias gzw), „Summe aus den 4 Typmerkmalen“ (alias Summe_typ), „Summe aus den Merkmalen Hals, Sattellage, Brust, Rücken und Kruppe“ (alias Format), in einer *Shape*-Regressionsanalyse auf deren Zusammenhang mit der Formenvariation innerhalb der Lipizzaner-Stichprobe geprüft (zur *Shape*-Regression siehe DRUML et al. 2015). Tabelle 5 gibt eine detaillierte Auskunft über die Rangierungen jener Richter, die einen signifikanten Zusammenhang mit der Lipizzaner-Formenvariation in den 7 Merkmalen bzw. Merkmalskomplexen erreicht haben. Der Merkmalskomplex „Format“, in den die Noten der Merkmale Hals, Sattellage, Brust, Rücken und Kruppe eingehen, konnte von keinem Richter bzw. keiner Richterkombination in einen signifikanten Zusammenhang mit der Körperform gebracht werden. Ähnliches gilt auch für den Komplex Punktesumme. Insgesamt lieferten 18 von 56 Regressionsgleichungen (32 %) der einzelnen Zuchtrichter keine signifikanten Regressionskoeffizienten. Zwei Richter (1 und 2) blieben in jedem Merkmal ohne Zusammenhang mit dem „Shape Space“, die „besten“ drei Bewerter (4, 7 und 8) hingegen konnten in fünf bzw. vier Merkmalen eine züchterisch sinnvolle Rangierung der Tiere erstellen.

Tab. 5 Signifikanzniveaus der multiplen Regressionsgleichungen von den *Shape*-Koordinaten auf die Richterbewertungen

Richter	gzw	Summe_Typ	Format	Typ	Rasse- typ	Geschlechts- typ	Harmonie
6	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,0033	0,0000
1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
5	n.s.	n.s.	n.s.	0,0000	0,0000	n.s.	n.s.
4	n.s.	0,0000	n.s.	0,0329	0,0000	0,0000	0,0000
7	n.s.	0,0000	n.s.	0,0000	0,0000	n.s.	0,0000
8	n.s.	0,0033	n.s.	0,0000	n.s.	0,0000	0,0000
9	n.s.	0,0206	n.s.	0,0000	0,0000	n.s.	n.s.
Alle	n.s.	0,0116	n.s.	n.s.	0,0000	0,0000	n.s.
Konsistente 4er	0,0093	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,0148
best_3	0,0002	0,0000	n.s.	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
best_5	0,0000	0,0000	n.s.	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

n.s. = nicht signifikant bei einem Grenzwert von $p \leq 0,05$;

0,0000 = entspricht einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,0001$

Mittelt man alle Richternoten pro Merkmal, so lieferten die Reihungen in Geschlechtstyp, Rassetyp und Summe_Typ signifikante Ergebnisse, während hingegen die „besten“ drei bzw. fünf Richter in allen Merkmalen, bis auf Format, signifikante Reihungen erzielten. Die Notenübereinstimmung der fünf „besten“ Richter (4, 7, 6, 5, 8) war in den Merkmalen Typ und Geschlechtstyp höher als das Mittel über alle acht Richter (Tab. 6). In den restlichen Merkmalen waren die Koeffizienten identisch.

Tab. 6 Der Übereinstimmungskoeffizient Kappa über alle acht Richter und über die fünf „besten Richter“

	Kappa-Wert alle 8 Richter	SE	Kappa-Wert 5 besten Richter	SE
Typ	0,24	0,013	0,29	0,023
Rassetyp	0,21	0,013	0,21	0,021
Geschlechtstyp	0,23	0,013	0,24	0,022
Harmonie	0,19	0,014	0,19	0,025

Von den 32 *Shape*-Regressionen auf die Merkmale Typ, Rassetyp, Geschlechtstyp und Harmonie im Körpermodell von acht unterschiedlichen Richtern konnte bei 14 Gleichungen ein signifikanter Zusammenhang zwischen Benotung und Formenvariation festgestellt werden. Bei 56 % der Beurteilungen (18 Gleichungen) konnte kein Zusammenhang nachgewiesen werden (vgl. Tab. 5).

Anhand von Koordinatentransformationen bzw. neu berechneten Digitalbildern von Modellpferden kann das „ideale“ und „nicht ideale“ Zuchtziel (basierend auf den individuellen Regressionsgeraden der einzelnen Richter-Merkmalskombinationen) grafisch bzw. bildlich dargestellt werden. Gleichzeitig kann die *Shape*-Regression auch als Prüfungsgleichung genutzt werden, um damit zu verifizieren, ob die Reihung der Tiere anhand von den Noten eines Beurteilers mit der Varianz im „Lipizzaner – Shape Space“ korrespondiert. In 56 % der Benotungen der einzelnen Typmerkmale von acht Beurteilern wurden die Reihungen abgelehnt, da sie laut Formenvarianz züchterisch keinen Sinn machten (Regressionskoeffizienten der Gleichungen waren nicht signifikant, daher ist die H_0 – es besteht kein Zusammenhang zwischen x- und y-Variablen – gültig).

Diese Form der Prüfung auf Konsistenz von Richternoten mit der beobachteten Formvariation hat eine praktische Relevanz:

- Sie kann genutzt werden, um bei einer Zuchtzieldefinition bzw. der Optimierung eines Zuchtprogrammes gültige von nicht gültigen Richterreihungen zu differenzieren.
- Mit dieser Prüfung kann auch im Kontext von Zuchtrichterschulungen erstmals objektiv operiert werden, was bislang nicht möglich war, da die Bewertungen der Rangierungen höchst subjektiv erfolgten.

In den Abbildungen 3 bis 5 werden die „idealen“ und „nicht idealen“ Zuchtziele entsprechend den mittleren Noten der Richter 4, 7, 8, 5, 6 (Hengste, Abb. 3 und 4) und den mittleren Noten der Richter 1, 2, 3, 5, 6, 7 (Stuten, Abb. 5 und 6) anhand von Koordinatentransformationen entlang der Regressionsgerade von der Note 5 bis zur Note 10 dargestellt. Mit Hilfe der einzelnen aus den *Shape*-Regressionen errechneten Koordinatenkonfigurationen können auch digitale Fotos entsprechend neu berechnet werden, um die Unterschiede dem Betrachter auch bildlich zu vergegenwärtigen (Abb. 4 neu berechnete negative, mittlere und positive Zuchtziele anhand des Hengstes Favory Biserka; Abb. 6 neu berechnete negative, mittlere und positive Zuchtziele anhand der Stute Benvenuta).

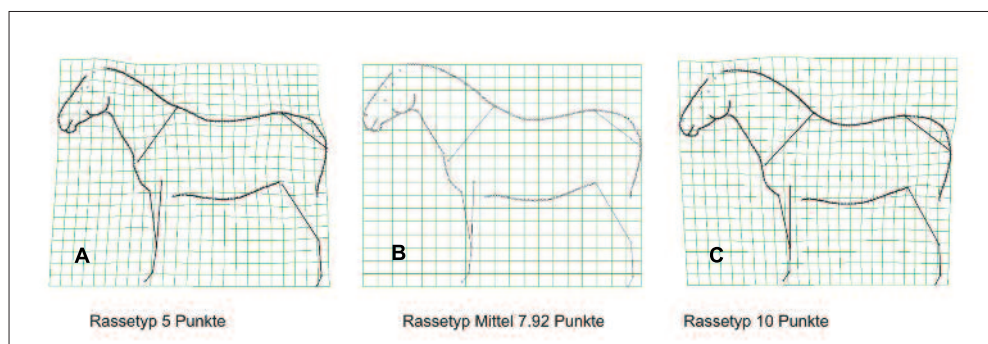


Abb. 3 Koordinatentransformation entlang der Regressionsgerade für das Merkmal Rassetyp, gewichtet nach den „fünf besten Richtern“. Dargestellt sind das Mittel (B), die erwartete Form für eine Bewertung mit fünf Punkten (A) und die erwartete Form für eine Bewertung mit 10 Punkten (C; maximale Punktzahl, entspricht daher dem Zuchtziel).



Abb. 4 Digitalfotos von Favory Biserka, neu berechnet nach den Ergebnissen der Shape-Regression mittels der Ergebnisse der Koordinatentransformation aus Abb. 3. (A) das erwartete Erscheinungsbild des Hengstes mit der Note 5 Rassetyp, (B) das Erscheinungsbild im Populationsmittel, (C) optimales Erscheinungsbild mit der Note 10.

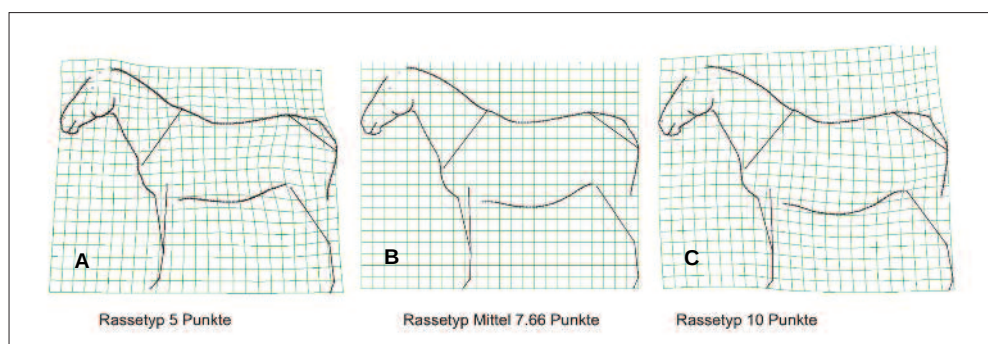


Abb. 5 Koordinatentransformation der Körperformen von Lipizzaner-Stuten entlang der Regressionsgerade für das Merkmal Rassetyp, gewichtet nach dem Mittelwert aller sechs Richter. Dargestellt sind das Mittel (B), die erwartete Form für eine Bewertung mit fünf Punkten (A) und die erwartete Form für eine Bewertung mit 10 Punkten (C; maximale Punktzahl, entspricht daher dem Zuchtziel).



Abb. 6 Digitalfotos der Stute Benvenuta, neu berechnet nach den Ergebnissen der *Shape*-Regression mittels der Ergebnisse der Koordinatentransformation aus Abb. 5. (A) das erwartete Erscheinungsbild der Stute mit der Note 5 Rasetyp, (B) das Erscheinungsbild im Populationsmittel, (C) optimales Erscheinungsbild mit der Note 10.

Diese Methode kann natürlich auch genutzt werden, um die Rangierungen von individuellen Richtern darzustellen. In Abbildung 7 sind solche „Ratings“ von drei verschiedenen Richtern dargestellt. Bei den Negativvarianten sind in der resultierenden Form durchaus deutliche Unterschiede zu erkennen: Für Richter 9 stellten der schwere, geramste Kopf, der lange, matte Rücken sowie die kurze und etwas flachere Kruppe die Hauptmängel dar; Richter 4 sah in seinem „Negativ-Ideal“ vor allem einen kurzen Hals, kurze Schulter und eine kurze, abschüssige Kruppe, ein Bild, an das sich Richter 7 mit seiner Einschätzung anlehnte. Bei den Positivvarianten dieser drei Richter gibt es etwas geringere Unterschiede, was natürlich auch mit dem rechtsschiefen

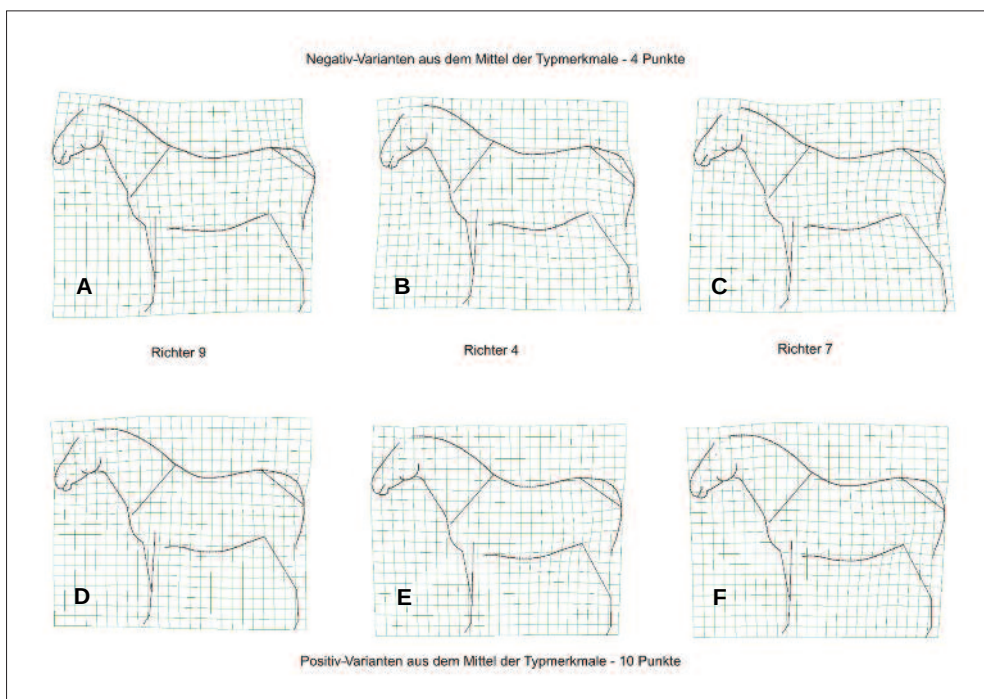


Abb. 7 Koordinatentransformation der Körperformen von Lipizzaner-Hengsten entlang der Regressionsgerade für das Merkmal „Mittlere Typnote“, (A)–(C) jeweils gewichtet nach Richter 9, 4 und 7. Dargestellt sind die erwartete Form für eine Bewertung mit 4 Punkten und die erwartete Form (D)–(F) für eine Bewertung mit 10 Punkten.

Mittelwert der Mittleren Typnoten von 7,63–7,78 begründet ist. Am auffälligsten ist hier wieder Richter 9, der eher ein konkaves Kopfprofil und einen kurzen und starken Rücken bevorzugt.

Um die Kopfnote zu untersuchen, wurde ein „Kopfmodell“ erstellt, das aus den Landmarks (LM) 1, 2, 13, 14, 19–46, 217–246, insgesamt aus 61 Landmarks, besteht. Analog zum Körpermodell wurden in den einzelnen Regressionsgleichungen geprüft, ob ein signifikanter Zusammenhang der Richternoten Kopf und Geschlechtstyp sowie der Merkmale Alter, Widerristhöhe und Kaliber mit der Variation der Kopfformen besteht. Alter und Widerristhöhe zeigten einen signifikanten Zusammenhang, und deren Bestimmtheitsmaße waren 4,24 % und 1,19 %. Nur drei der acht Richter lagen mit ihrer Reihung in einem kausalen Zusammenhang mit der Variation der Kopfformen (Tab. 7). Die Note Geschlechtstyp zeigte keinen signifikanten Zusammenhang mit der Kopfform.

Tab. 7 Signifikanzniveaus der *Shape*-Regressionen für das Kopfmodell

Richter	Geschlechtstyp	Kopf
6	n.s.	0,034
1	n.s.	n.s.
2	n.s.	0,004
5	n.s.	n.s.
4	n.s.	n.s.
7	n.s.	0,000
8	n.s.	n.s.
9	n.s.	n.s.
best_3	n.s.	n.s.
best_5	n.s.	n.s.

In Abbildungen 8 und 9 werden die Koordinatentransformationen bzw. digitalen Bildvisualisierungen für die Regressionsgerade des Kopfmodells in Abhängigkeit der Widerristhöhe von 144 cm bis 168 cm (entspricht der Minima und Maxima der 102 gemessenen Lipizzaner-Hengste) dargestellt.

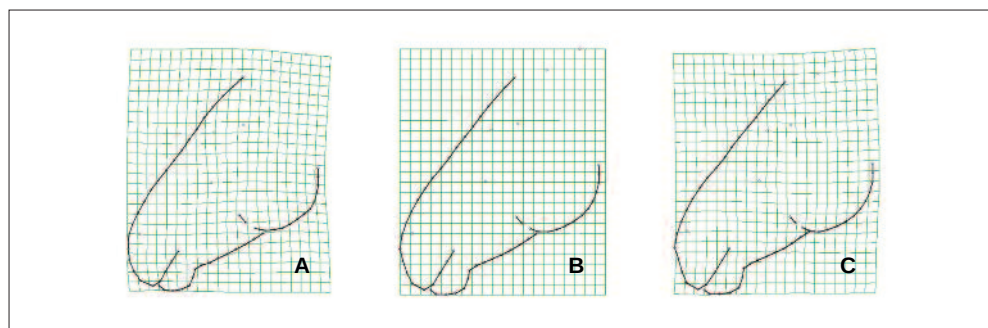


Abb. 8 Koordinatentransformation der Kopfformen von Lipizzaner-Hengsten entlang der Regressionsgerade für das Merkmal Widerristhöhe. Dargestellt sind das Mittel (Kopf von einem Pferd mit 156 cm Größe, Grafik B), die erwartete Form für ein Pferd mit einer Größe von 144 cm (Grafik A) und die erwartete Form für ein Pferd mit einer Größe von 168 cm (Grafik C).

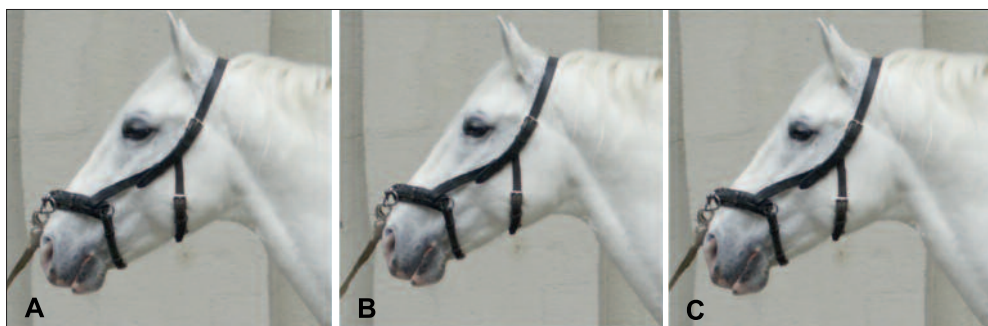


Abb. 9 Digitalfotos des Hengstes Favory Dagmar II, neu berechnet nach den Ergebnissen der *Shape*-Regression mittels der Ergebnisse der Koordinatentransformation. (A) das erwartete Erscheinungsbild des Hengstes mit 144 cm Stockmaß, (B) das Erscheinungsbild im Populationsmittel (Widerristhöhe 156 cm), (C) Erscheinungsbild mit einem Stockmaß von 168 cm.

3.3 Partial-Least-Square-Analyse

Für die Analyse von einem Datensatz, der durch eine hohe Anzahl an Variablen (Prädiktoren), die zusätzlich stark autokorreliert sind, charakterisiert ist, bietet sich die *Partial-Least-Square*-Regression (PLS) an, bei der in einem iterativen Verfahren Faktoren aus den Prädiktor-Variablen (*Shape Coordinates*, Körpermaße) extrahiert werden, die in der eigentlichen Regression verwendet werden (weshalb es weder Probleme mit Interkorrelationen noch mit zu vielen Variablen gibt). Analog zur Hauptkomponentenanalyse (PCA) werden die erklärten Varianzen sowohl der abhängigen Variable (Beurteilungsmerkmale) als auch der Prädiktoren maximiert, die einzelnen Faktoren sind unkorreliert.

Die PLS-Regression analysiert den Zusammenhang zwischen Prädiktoren (X-Matrix) und einer oder mehreren Zielvariablen (Y-Matrix) durch iterative Hauptkomponenten-Analysen der beiden Matrizen. Diese erfolgen aber nicht unabhängig, sondern sie beeinflussen sich gegenseitig: Die Faktorladungen der jeweils anderen Matrix gehen in die PCA der X- bzw. Y-Matrix ein. Dadurch wird gleichzeitig die erklärte Varianz von X- und Y-Matrix maximiert.

Bei einer PLS-Regression geht es darum, aus der Masse der verfügbaren Prädiktoren einen möglichst kleinen Satz auszuwählen, der eine möglichst gute Schätzung der abhängigen Variablen erlaubt. Dafür kann eine Quantifizierungsvariable *Variable Importance for the Projection* (VIP) berechnet werden. Nach einem ersten PLS-Durchlauf mit allen Variablen lassen sich dann für einen zweiten Durchlauf diejenigen Variablen ausschließen, die eine minimale VIP unterschreiten (Grenzwert $VIP < 0,8$; WOLD et al. 2001). In einer Schleife von wiederholten PLS-Durchgängen werden die VIPs so lange abgefragt, bis alle Variablen, die in dem Modell verbleiben, das gesetzte Kriterium erfüllen.

Für die Kreuzvalidierung des PLS-Modells und für die Voraussageschätzung der Beurteilungsvariablen wurde die sogenannte „split option“ gewählt, wobei nach dem Zufallsprinzip jede 9. Beobachtung verworfen wurde und so der Prädiktordatensatz in einen Trainings- und Testdatensatz unterteilt wurde. Mittels einer Validierung mit der PRESS-Statistik konnten drei signifikante PLS-Faktoren extrahiert werden, die 21,0 % (PLS1 11,2 %, PLS2 5,9 %, PLS3 4,0 %) der relativen Variation der Prädiktorvariablen und die 49,5 % (PLS1 16,9 %, PLS2 21,1 %, PLS3 11,4 %) der Varianz der Zielvariablen erklären.

In darauffolgenden weiteren vier PLS-Durchgängen, wobei der Prädiktordatensatz mittels der VIP-Statistik auf informative Variablen eingeschränkt wurde, konnten von 492 *Shape*-Koordinaten (inklusive Widerristhöhe und Kaliberindex) 154 ausgewählt werden, welche ein Maximum an Information beinhaltenen (Widerristhöhe und Kaliberindex waren in diesem Set nicht mehr enthalten). Die aus dem reduzierten Datensatz resultierenden drei signifikanten PLS-Faktoren erklären somit 45,6 % der Varianz der Prädiktoren und gleichzeitig 48,8 % der Varianz der Zielvariablen.

In Abbildung 10 sind die Vektoren der Zielvariablen über der Verteilung der korrespondierenden x-Scores der ersten beiden PLS-Faktoren gelegt dargestellt. Die Ausrichtung und

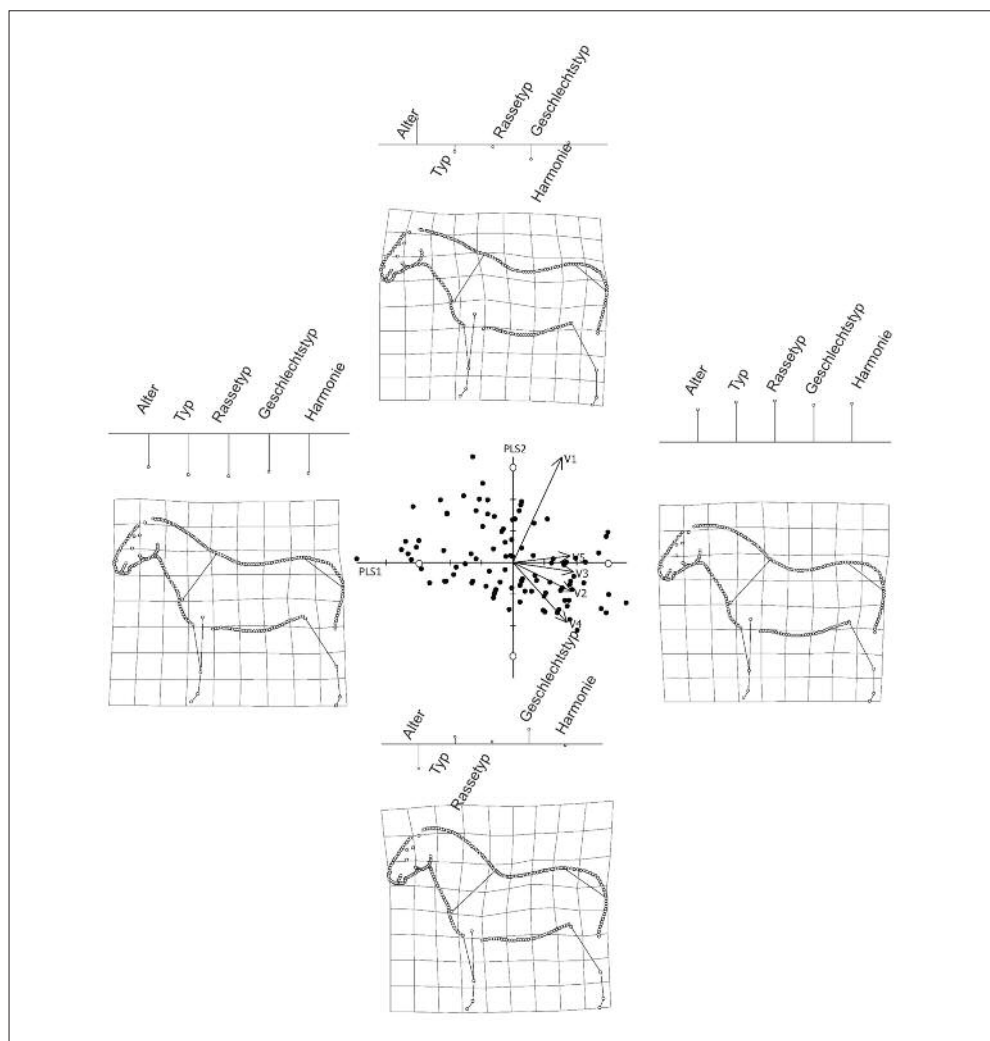


Abb. 10 Schema des dargestellten PLS-Systems. Mit den beiden PLS-Faktoren können für jeden beliebigen Punkt im Koordinatenraum eine eigene Pferdeform und die korrespondierende Bewertung errechnet werden. Vektoren der Beurteilungsvariablen (Abhängige) auf den korrespondierenden „Shape Space“, dargestellt durch die beiden ersten PLS-Faktoren, projiziert. Die Beziehung der Beurteilungsvektoren zueinander ergibt sich aus deren Korrelationsstruktur.

Länge der Vektoren indiziert, dass die Merkmale Typ, Rassetyp und Geschlechtstyp (V2, V3, V5) auf ähnlichen phänotypischen Charakteristika basieren, während hingegen das Merkmal Harmonie (V4) etwas und der Faktor Alter (V1) stark von der Konfiguration der ersten drei Merkmale abweicht. Das erste Paar der PLS-Faktoren repräsentiert 28,1 % der quadrierten Kovarianz (*Shape* und Merkmale), und die Beziehung zwischen der Form und den Beurteilungsmerkmalen kann mittels Koordinatentransformationen, wie in Abbildung 10 gezeigt, dargestellt werden. Die geschätzten Werte der Zielvariablen sind neben der berechneten Form in einem sogenannten Profilplot dargestellt.

Letztendlich kann ein solches PLS-Gleichungssystem evaluiert werden, indem man die Korrelationen zwischen beobachteten und geschätzten Zielvariablen ermittelt. Im originalen PLS-Modell mit der Kreuzvalidierung (*split option cv = 9*) betrug die Korrelation zwischen anhand von *Shape*-Koordinaten geschätzten und beobachteten Beurteilungsmerkmalen 0,67 bis 0,71 ($p < 0,05$). Wird z. B. ein Teil der beobachteten Beurteilungsmerkmale für das Schätzverfahren verworfen, und werden daraufhin die Korrelationen zwischen „echten“ und geschätzten Noten ermittelt, ergibt sich folgendes Bild: (a.) Von 102 Tieren wurden die Noten von 52 Tieren verworfen, die Schätzung erfolgte auf Basis von 50 Tieren. (b.) Von 102 Tieren wurden die Noten von 17 Tieren verworfen, und die Schätzung erfolgte auf Basis von 85 Tieren. Für Fall (a.) resultierte eine Korrelation von 0,33 bis 0,48 und für Fall (b.) eine Korrelation von 0,68 bis 0,71, die nahe am Ergebnis des Kreuzvalidierungsmodells liegt.

4. Schlussfolgerung

Mittels Methoden der Bild- und Formenanalyse aus dem Bereich der Prokrustes-Statistik konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass subjektive Beurteilernoten auf deren Aussagefähigkeit mittels einer *Shape*-Regression geprüft werden können. Die Übereinstimmung zwischen den Exterieurrichtern variierte stark und siedelt sich im unteren Bereich an. Von den durchgeführten Regressionsgleichungen für acht Richter in sieben Merkmalen lieferten nur 32 % ein signifikantes Ergebnis – nur für diesen Prozentsatz konnte der Nachweis erbracht werden, dass die jeweilige Reihung der Tiere in einem Zusammenhang mit deren Formenvariation steht. Gleichzeitig konnte mittels grafischen Koordinatentransformationen gezeigt werden, welche ideale und nicht ideale Zuchtziele für einzelne Richter in verschiedenen Merkmalen bestehen. Die Kovariation von Formmerkmalen und Beurteilungsnoten kann aber auch mit einem *Partial-Least-Squares*-Modell errechnet und dargestellt werden.

Ein etabliertes PLS-Gleichungssystem kann für die Vorhersage von verschiedenen Parametern in der Computergestützten Exterieuranalyse dienen. Die hier berechneten Korrelationen zwischen Beobachtung und Vorhersage bei Typmerkmalen pendeln um die 70 %. Das Modell kann noch optimiert werden (Ausreißer-Kontrolle, Vergrößerung des Datensatzes, Änderungen im Modell), und so kann eine leichte Steigerung dieser Korrelation erwartet werden.

Literatur

- DRUML, T., DOBRETSBERGER, M., and BREM, G.: The use of novel phenotyping methods for validation of equine conformation scoring results. *Animal* 1–10, doi: 10.1017/S1751731114003309 (2015)
- FLEISS, J. L.: Measuring nominal scale agreement among many raters. *Psychol. Bull.* 76, 378–382 (1971)

- GOODALL, C. R.: Procrustes methods in the statistical analysis of shape. *J. Royal Statistical Soc. Series B* 53, 285–339 (1991)
- KENDALL, D. G.: Shape-manifolds, Procrustes metrics and complexe projective spaces. *Bull. London Math. Soc.* 16, 81–121 (1984)
- MITTERRÖCKER, P., and GUNZ, P.: Advances in geometric morphometrics. *Evol. Biol.* 36, 235–247 (2009)
- ROHLF, F. J.: tpsRegr, shape regression, version 1.28. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York, USA (2003)
- ROHLF, F. J.: tpsUtil, file utility program. version 1.26. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York, USA (2004)
- ROHLF, F. J.: tpsDig, digitize landmarks and outlines, version 2.05. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York, USA (2005)
- ROHLF, F. J.: tpsSuper, version 2.13. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York, USA (2013)
- ROHLF, F. J.: tpsPLS, partial least-squares, version 1.22. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York, USA (2014)
- SAS Institute: SAS version 9.1. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA (2009)
- WOLD, S., SJÖSTRÖM, M., and ERIKSSON, L.: PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 58, 109–130 (2001)

Dr. Thomas DRUML
Institut für Tierzucht und Genetik
Veterinärmedizinische Universität Wien
Veterinärplatz 1
1210 Wien
Österreich
Tel.: +43 1 250775634
Fax: +43 1 250775690
E-Mail: Thomas.Druml@vetmeduni.ac.at

Prof. DI. Dr. Dr. h. c. mult. Gottfried BREM
Institut für Tierzucht und Genetik
Veterinärmedizinische Universität Wien
Veterinärplatz 1
1210 Wien
Österreich
Tel.: +43 1 250775600
Fax: +43 1 250775690
E-Mail: gottfried.brem@vetmeduni.ac.at

Was ist Leben?

Vorträge anlässlich der Jahresversammlung
vom 23. bis 25. September 2011 zu Halle (Saale)

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 116, Nr. 394
Herausgegeben von Jörg HACKER (Halle/Saale)
und Michael HECKER (Greifswald)
(2012, 284 Seiten, 115 Abbildungen, 3 Tabellen, 29,95 Euro,
ISBN: 978-3-8047-3060-1)

Es gibt nur wenige Fragen, welche die Menschheit seit Beginn ihrer geistigen Auseinandersetzung mit sich selbst und der sie umgebenden Welt unaufhörlich begleitet haben. „Was ist Leben?“ zählt zu diesen Grundfragen des menschlichen Daseins. Angesichts der beeindruckenden Erfolge der empirischen Forschung an Lebewesen wird die Schwierigkeit immer offenkundiger, eine allgemein überzeugende Antwort auf die Frage nach den grundlegenden Eigenschaften derjenigen Systeme zu geben, die wir „lebendig“ nennen. Diese Rätselhaftigkeit fasziniert Natur-, Geistes- und Kulturwissenschaftler und bringt sie dazu, gemeinsam das Wesen des Lebens zu erkunden. In dem Band behandeln hervorragende Vertreter der unterschiedlichsten Wissenschaftsdisziplinen den noch nicht zufriedenstellend geklärten Ursprung des Lebens. Sie untersuchen das neue, umfassende Verständnis der molekularen Grundlagen von Lebensprozessen aus der Sicht der Genomforschung und beschreiben die Möglichkeiten, Leben in Analogie zu Maschinen zu modellieren. Sie behandeln die ungeheure Vielfalt des Lebens, die Beeinflussbarkeit des Lebens durch menschliche Eingriffe und die Grenzen des Lebens aus biologischer, psychologischer und philosophischer Sicht. Dabei wird deutlich, wie hartnäckig sich die Frage nach dem Leben durch die Wissenschaftsgeschichte, ja durch die ganze Geistesgeschichte zieht und welche Brisanz sie angesichts aktueller Forschungsergebnisse erhalten hat.

Standardisierung der Phänotypisierung von Labormäusen

Bernhard AIGNER (München)

Zusammenfassung

Mutante Mausmodelle wurden für eine Vielzahl der Säugergene erstellt und in der biomedizinischen Forschung zur funktionalen Genomanalyse eingesetzt. Zur Erstellung treffgenauer und wiederholbarer Ergebnisse soll die phänotypische Untersuchung dieser Mauslinien umfassend, systematisch, standardisiert und mit möglichst geringem zeitlichen Aufwand als Hochdurchsatzuntersuchung unter Verwendung von etablierten Routineuntersuchungen durchgeführt werden. Als Orientierungswerte für die Referenzwerte der üblicherweise verwendeten Inzuchtmausstämme stehen Ergebnisse phänotypischer Untersuchungen zur Verfügung, die online in Datenbanken einzusehen sind. Das „International Mouse Phenotyping Consortium“ stellt einen weltweiten Verbund großer Phänotypisierungszentren für mutante Mauslinien dar und zielt auf die Vereinheitlichung der angewandten Untersuchungsprotokolle. In Deutschland bietet die „German Mouse Clinic“ im Helmholtz-Zentrum München eine umfassende, systematische und standardisierte phänotypische Untersuchung mutanter Mauslinien an. Die grundlegende Analyse umfasst mehrere hundert Parameter in den Bereichen Allergie, Verhalten, kardiovaskuläre Untersuchung, klinische Chemie, Dysmorphologie einschließlich Knochen- und Knorpeluntersuchung, Energiemetabolismus, Augenuntersuchung, Immunologie, Lungenfunktion, molekulare Phänotypisierung mittels RNA-Expressionsuntersuchung, Neurologie, Nozizeption, Steroidmetabolismus und Pathologie. Entsprechend den Ergebnissen können weiterführende Untersuchungen in ausgewählten Gebieten durchgeführt werden. Ziel der Untersuchungen ist es, in mutanten Mauslinien unbekannte primäre und/oder sekundäre Veränderungen aufzudecken und damit einen Beitrag zur funktionalen Genomanalyse zu leisten. Darüber hinaus dient die phänotypische Untersuchung mutanter Mauslinien in der „German Mouse Clinic“ auch der Sammlung und unbeschränkten Verbreitung von umfassenden Phänotypdaten einer großen Anzahl an mutanten Mausmodellen. Deshalb sind die Berichte der Untersuchungen online einzusehen. Bei der Untersuchung von Labormäusen stehen verschiedene Faktoren in der Diskussion bezüglich ungenügender Standardisierung oder unklarer Güte der verwendeten Werte bei gegebener Standardisierung. Es ist davon auszugehen, dass die fehlende Wiederholbarkeit von phänotypischen Ergebnissen aus Mäusestudien ihre Ursache teilweise in einer ungenügenden Standardisierung der Versuche hat.

Abstract

Mutant mouse models have been established for a great number of mammalian genes and subsequently used in the functional genome analysis. Accuracy and reproducibility of the results of the phenotypical analyses of the mouse lines are improved by using standardized, systematic and comprehensive high-throughput analyses thereby applying established routine methods. Online databases offer reference values of phenotypical analyses of the usually used inbred mouse strains for your guidance. The “International Mouse Phenotyping Consortium” is a network of large mouse phenotyping centers worldwide and acts as a coordinator for the standardization of the test protocols used. In Germany, the “German Mouse Clinic” of the Helmholtz Zentrum München offers the standardized, systematic and comprehensive phenotypic analysis of mutant mouse lines. The primary analysis covers several hundred parameters in the areas of allergy, behavior, cardiovascular analysis, clinical chemistry, morphological analysis including bone and cartilage, energy metabolism, eye analysis and vision, immunology, lung function, molecular phenotyping, neurology, nociception, steroid analysis, and pathology. According to the results of the primary analysis, subsequent project-specific analyses are carried out. The aim of the analyses is the observation of novel primary and/or secondary phenotypical alterations in mutant mouse lines thereby improving the knowledge about the genome function. Moreover, the phenotypical analyses of mutant mouse lines in the large mouse phenotyping centers worldwide serve for

the collection and free distribution of comprehensive phenotypical data sets of a large number of mutant mouse models. Therefore, the phenotype reports of the German Mouse Clinic are freely accessible online. Currently, various factors in the standardization of the analysis and/or in the setting of the values for the analysis of laboratory mice are under discussion. It must be assumed that absent reproducibility of phenotypical results in mouse studies is at least partially caused by insufficient standardization of the experiments.

1. Einleitung

Labormäuse stellten 2013 in Deutschland in der biomedizinischen Forschung mit 73 % aller eingesetzten Wirbeltiere die zahlenmäßig bei weitem größte Gruppe der Versuchstiere dar.¹ Ein ähnliches Bild bietet sich auch in anderen Ländern, die biomedizinische Forschung betreiben. Für die funktionale Genomanalyse werden seit vielen Jahren mutante Mausmodelle für eine Vielzahl der Säugergene erstellt und untersucht. Daneben werden etablierte Inzuchtmausstämme in Tierversuchen eingesetzt. Der wissenschaftliche Erkenntnisgewinn setzt voraus, dass die Ergebnisse präzise, also reproduzierbar und richtig, d.h. treffgenau, sind.

In Tierversuchen mit Labormäusen werden zum großen Teil Inzuchtmausstämme verwendet, die Populationen genetisch gleicher Tiere mit einer definierten Allelkonstellation des Genoms darstellen, aus der sich der jeweilige stammesspezifische Phänotyp ergibt. Faktoren zur Standardisierung bei der Verwendung von Mausmodellen stellen die drei Bereiche Tier, Umwelt und Versuch dar, für die es jeweils viele Einflussgrößen gibt, die die Untersuchungsergebnisse in unterschiedlicher Weise beeinflussen können. So kommt es trotz der Bemühungen zur Standardisierung der Tierversuche immer wieder zur Beobachtung, dass sich publizierte Ergebnisse nicht von anderen Arbeitsgruppen wiederholen lassen, auch wenn diese die Bedingungen des Originalversuches mit großer Sorgfalt im eigenen Versuch zu reproduzieren versuchen. Als ein oft zitiertes Beispiel zeigte die Untersuchung derselben mutanten Mäuse nach entsprechenden Standardisierungsbemühungen in drei etablierten Labors im Bereich der Verhaltensuntersuchung eine fehlende Übereinstimmung der Ergebnisse. So zeigten homozygot mutante Mäuse für das Gen *Htr1b* (*5-hydroxytryptamine [serotonin] receptor 1B*) im Verhaltenstest „Elevated plus maze“ im Vergleich zu nichtmutanten Wildtyp-Kontrollen des Inzuchtstammes 129/Sv-ter in den drei Labors zum Teil gegensätzliche Verhaltensänderungen (CRABBE et al. 1999). Andere Autoren beschreiben, dass sich die Wirkung von Testsubstanzen als potenzielle neue Medikamente für menschliche Erkrankungen bei Verwendung derselben Mausmodelle und derselben essenziellen Testparameter, wie sie im Originalversuch verwendet wurden, oftmals nicht wiederholen lassen (z. B. PRINZ et al. 2011, PERRIN 2014).

Andererseits werden Überlegungen angestellt, ob bestimmte gut standardisierte Versuchsparameter wie z. B. die Haltungstemperatur von Labormäusen in den Versuchstierhaltungen auf den richtigen Wert eingestellt sind, um in Versuchen mit Mausmodellen aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. In der Regel wird die Raumtemperatur für die Haltung von Labormäusen konstant auf dem Wert von 22 ± 2 °C gehalten, vor allem um dem Personal in der Tierhaltung eine annehmbare Arbeitstemperatur bereitzustellen. Labormäuse haben eine thermoneutrale Temperatur von ca. 30 °C. Auch unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Temperatur in Kompartimenten der Käfige höher sein kann als die Raumtemperatur, sind Beispiele publiziert, die aufzeigen, dass Labormäuse bei Haltung in ihrer thermoneutralen Tem-

¹ <http://www.bmel.de>.

peratur eine höhere Aktivität ihres Immunsystems zeigen als Mäuse, die bei der üblichen Temperatur von 22 °C gehalten werden (KOKOLUS et al. 2013, MALONEY et al. 2014).

2. Phänotypisierung von Labormäusen

Für die Phänotypisierung von Labormäusen sind Online-Datenbanken einsehbar, die Daten aus phänotypischen Untersuchungen vor allem von Inzuchtmausstämmen als auch von mutanten Mauslinien enthalten. Zudem stellen Datenbanken online „Standard operating procedures (SOPs)“ zur Standardisierung der Untersuchungsmethoden zur Verfügung.

2.1 Datenbanken zur Phänotypisierung von Labormäusen

Phänotypdaten von häufig in der biomedizinischen Forschung verwendeten Inzuchtmausstämmen sind in einer Reihe von Datenbanken gesammelt.² Die umfangreichste Datenbank stellt die „Mouse Phenome Database (MPD)“³ dar, die für fast 50 als „MPD Priority Strains“ eingestufte und viele weitere Inzuchtmausstämme wie auch einige F1-Hybridstämme entsprechende Phänotypdaten bereitstellt.⁴ Die Daten stammen aus einer Reihe internationaler Untersuchungsinitiativen und Kollaborationen. In der europäischen Phänotypisierungsinitiative „EuroPhenome“⁵ wurden für die Inzuchtstämme 129, BALB/c, C3H, C57BL/6J, C57BL/6N, CBA und FVB basale Werte für eine Reihe von Untersuchungsbereichen gesammelt.⁶ Diese Referenzdaten stellen Orientierungswerte für die entsprechenden Mausstämme dar, die aufgrund vieler Einflussgrößen in der Untersuchung variieren können. Eine aktuelle Liste aller publizierten mutanten Mauslinien mit den beobachteten Phänotypveränderungen ist für jedes Gen auf der Internetseite „Mouse Genome Informatics“⁷ im Unterpunkt „Mutations, Alleles, and Phenotypes“ zusammengestellt.

2.2 Untersuchungslabors zur Phänotypisierung mutanter Mausmodelle

Eine Abfrage der Datenbank über publizierte mutante Mausmodelle⁸ ergab bei der Suche nach induzierten, definierten genetischen Mutationen mit Hilfe von embryonalen Stammzellen (Suchbegriff „targeted“) ca. 26000 etablierte Mauslinien, die Mutationen in mehr als 8000 verschiedenen Genen umfassen. Für alle Arten von Mutationen (spontan, chemisch-induziert, strahleninduziert, „gene trapped“, „targeted“) sind ca. 34000 etablierte Mauslinien verzeichnet.

2 Die Datenbanken sind auf der Internetseite „<http://www.interphenome.org>“ zusammengestellt.

3 <http://phenome.jax.org>.

4 Die Phänotypdaten umfassen folgende Bereiche: „appearance and coat color, behavior, blood – clinical chemistry, blood – hematology, blood – lipids, blood – xenobiotics, body composition, body fat pads, body weight size and growth, bone, brain, cancer, cardiovascular, cell and tissue damage, ear, endocrine, exercise and endurance, eye, gallbladder, immune system, ingestive preference, integumentary, kidney, liver, longevity, metabolism, muscle, nervous system, neurosensory, reproduction, respiratory, spleen, wound healing“.

5 <http://www.europhenome.org>.

6 Die Untersuchungsbereiche umfassen: „acoustic startle, pre pulse inhibition (PPI), allergy, body weight, clinical chemistry, dual energy X-ray absorption (DEXA), dysmorphology, electrocardiogram, electroretinogram, ELISA, eye size, FACS, food efficiency, funduscopy, grip strength, heart weight / tibia length, hematology, holeboard, hot plate, immunoglobulin, indirect calorimetry, indirect ophthalmoscopy, modified SHIRPA, non-invasive blood pressure, open field, rotarod, intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT), slit lamp, spontaneous breathing, X ray“.

7 <http://www.informatics.jax.org>.

8 <http://www.informatics.jax.org>.

Das internationale Konsortium „International Mouse Phenotyping Consortium (IMPC)“⁹ hat die Erstellung und standardisierte Untersuchung von mindestens einer definierten Mutation für jedes der ca. 20000 Mausgene zur systematischen Beschreibung der biologischen Funktion der Säugergene zum Ziel. Für diesen Zweck wurden Untersuchungsabläufe mit entsprechenden Protokollen sowohl für die primäre phänotypische Untersuchung aller wichtigen Organsysteme in adulten Tieren als auch für detaillierte weitergehende, projektspezifische Untersuchungen einzelner Organsysteme etabliert. Die erstellten „Standard Operating Procedures (SOPs)“ umfassen Untersuchungen der Bereiche:

„behavior and cognition (open field, modified SHIRPA, grip strength, Y-maze, acoustic startle and pre pulse inhibition (PPI), tail flick, tail suspension, swim ability, rotarod), clinical chemistry and hematology (differential blood count, blood collection, blood sample handling, clinical chemistry parameters, hematology, gas anesthesia, coagulation), hormonal and metabolic systems (metabolic cages, dual energy X-ray absorption (DEXA), intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT), cold test, meal tolerance test (MTT), oral glucose tolerance test (OGTT)), cardiovascular (noninvasive blood pressure and heart rate, invasive blood pressure, invasive left ventricular hemodynamics, blood pressure by telemetry, echocardiography (ECG)), allergy and infectious diseases, sensory systems (vision, auditory and vestibular), central / peripheral nervous and skeletal muscle systems, cancer phenotyping, bone including cartilage, arthritis and osteoporosis (dysmorphology, ionic fraction of Ca^{2+} in whole blood, bone densitometry, X-ray, micro CT imaging, skeletal preparation), gene expression, necropsy examination including pathology, histology (necropsy, fixation, trimming, embedding, sectioning, proliferation, apoptosis, staining)“.

Die SOPs umfassen Angaben zu folgenden Unterpunkten:

„purpose, scope, safety requirements, associated documents, notes, quality control, equipment, supplies, procedure, supporting information, history review, Europhenome data, phenotypic classification.“¹⁰

Im Zuge der Hochdurchsatzuntersuchung mutanter Mauslinien wurden weltweit Einrichtungen zur standardisierten, systematischen und umfassenden Untersuchung einer großen Anzahl von Mauslinien etabliert. In Deutschland wurde dafür die „German Mouse Clinic (GMC)“ (Institut für Experimentelle Genetik, Helmholtz-Zentrum München) etabliert, die aus einem Konsortium von Institutionen besteht, die über eine große Expertise für ihren entsprechenden Untersuchungsbereich bei Labormäusen verfügen.¹¹

Import und Haltung von mutanten Mauslinien in der „German Mouse Clinic“ werden nach standardisierten Protokollen durchgeführt, die im Hinblick auf den mikrobiologischen Hygienestatus die publizierten FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*)-Empfehlungen für spezifiziert pathogenfreie (SPF) Maushaltungen (MÄHLER et al. 2014) berücksichtigen. Die grundlegende primäre Analyse besteht aus der Untersuchung von ca. 550 Parametern und einer detaillierten finalen pathologischen Untersuchung der Tiere, wobei in der Regel 60 Tiere (je 15 männliche und 15 weibliche Tiere sowohl der mutanten Tiere als auch der entsprechenden Wildtypkontrolltiere) einer mutanten Mauslinie innerhalb von 13 Wochen nach einem standardisierten Ablaufprotokoll untersucht werden. Je nach Ergebnis können anschließend linienspezifisch weiterführende Analysen durchgeführt werden. Die grundlegende primäre Analyse umfasst folgende Bereiche und Methoden:

- Allergie (ELISA auf Gesamtplasma IgE);
- Verhalten (*open field*, *acoustic startle reflex*);

⁹ <http://www.mousephenotype.org>.

¹⁰ <http://empress.har.mrc.ac.uk>.

¹¹ <http://www.mouseclinic.de>.

- kardiovaskuläre Untersuchung (peripherer Blutdruck, transthorakale Echokardiographie an Tieren bei Bewusstsein);
- klinische Chemie (intraperitonealer Glukosetoleranztest [IPGTT], klinische Chemie, Hämatologie);
- Dymorphologie, einschließlich Knochen- und Knorpeluntersuchung (morphologische Untersuchung von > 50 Parametern, Röntgen, Ganzkörperknochendensitometrie mittels DEXA [Dual-Röntgen-Absorptiometrie]);
- Energiemetabolismus (indirekte Kalorimetrie, Körperzusammensetzung mittels TD-NMR [time domain nuclear magnetic resonance]);
- Augenuntersuchung (Scheimpflug imaging, optical coherence tomography, laser interference biometry, virtual vision test);
- Immunologie (FACS-Analyse von peripheren Blutleukozyten, Bioplex-Analyse der Plasmawerte von Immunglobulin-Isotypen, ELISA auf Rheumatoid-Faktor und Anti-DNA-Antikörper);
- Lungenfunktion (Spontanatmungsmuster);
- molekulare Phänotypisierung mittels RNA-Expressionsuntersuchung (zwei Organe zur Wahl mittels Illumina Bead Arrays);
- Neurologie (modified SHIRPA, grip strength, rotarod, auditory brainstem response [ABR]);
- Nozizeption (hot plate);
- Steroidmetabolismus (Corticosteron, Androstenedion, Testosteron) und
- Pathologie (makroskopische und histologische [HE-Färbung] Untersuchung aller Organe).

Die in der „German Mouse Clinic“ ermittelten Daten werden in einem Untersuchungsreport zusammengestellt, der Abschnitte zur Beschreibung der grundlegenden primären Untersuchung und der verwendeten Untersuchungsprotokolle sowie die detaillierte Darstellung und Diskussion der Ergebnisse enthält¹² (GAILUS-DURNER et al. 2009, FUCHS et al. 2011, 2012). Nach einer bestimmten Zeitspanne sind die Berichte der Untersuchungen auch online einzusehen.¹³

2.3 Erkennung neuer Alterationen in mutanten Mauslinien in der „German Mouse Clinic“

Ziel der standardisierten, systematischen und umfassenden phänotypischen Untersuchung in der „German Mouse Clinic“ ist es, in mutanten Mauslinien unbekannte primäre und/oder sekundäre Veränderungen aufzudecken und damit einen Beitrag zur funktionalen Genomanalyse zu leisten. Dies soll nachfolgend beispielhaft dargestellt werden.

Im phänotypbasierten Münchener ENU-Mausmutagenese-Projekt wurden mit Hilfe der Chemikalie N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff (ENU = *ethyl nitroso urea*) zufällig vor allem Punktmutationen in Mäusen des Inzuchtstammes C3HeB/FeJ (C3H) induziert und damit mutante Mauslinien mit interessanten phänotypischen Alterationen erstellt (HRABÉ DE ANGELIS et al. 2000, 2007). Durch die Verwendung von Plasmaharnstoff als Untersuchungsparameter wurden neue mutante Mauslinien für die biomedizinische Forschung gezüchtet, die erhöhte Plasmaharnstoffwerte als Anzeichen von potenziellen Nierenfunktionsstörungen zeigten (AIGNER et al. 2007). In zwei dieser Linien wurde die ursächliche Mutation im Gen Uromodulin (*Umod*) identifiziert. In beiden Linien führte dies zum Austausch einer Aminosäure an verschiedenen

¹² <http://www.mouseclinic.de>.

¹³ <http://146.107.6.187/phenomap/jsp/annotation/public/phenomap.jsf>.

Stellen des Proteins (Linie *Umod*^{C93F} [KEMTER et al. 2013b] und Linie *Umod*^{A227T} [KEMTER et al. 2009]).

Uromodulin (*UMOD*) kodiert ein Glykoprotein, das vor mehr als 60 Jahren als Tamm-Horsfall-Glykoprotein (THP) identifiziert wurde und das mengenmäßig am häufigsten im Harn von Säugern vorkommende Protein darstellt. Es wird ausschließlich in Zellen des dicken aufsteigenden Teils der Henleschen Schleife synthetisiert (TALH-Zellen). Nach der Synthese wird das Uromodulin-Vorläuferprotein innerhalb des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates zum reifen Glykoprotein prozessiert und mit dem Harn ausgeschieden. Über die genaue Funktion von *UMOD* ist wenig bekannt.

Beim Menschen tritt ein dominant vererbliches Krankheitssyndrom auf, das als Uromodulin-assoziierte Nierenerkrankung (UAKD, *uromodulin-associated kidney disease*) oder „uromodulin storage disease“ zusammengefasst wird. Auslöser der Erkrankung sind vor allem heterozygote *UMOD*-Mutationen. Die Erkrankung ist charakterisiert durch eine Störung der TALH-Zellen, die durch die gestörte Prozessierung des mutanten Uromodulins ausgelöst wird. Dies führt zu einer Störung der Ausscheidung von Harnsäure, zu Defekten der Harnkonzentrierungsfähigkeit und zu variablen Ausbildungen des Krankheitsverlaufes, wobei auch Nierenversagen auftreten kann. Histologische Untersuchungen der Nieren zeigen dabei das Auftreten einer tubulointerstitiellen Fibrose mit moderaten Entzündungszellinfiltraten und Zysten. Die klinische Ausprägung der UAKD beim Menschen ist häufig auch innerhalb der betroffenen Familien heterogen und unabhängig vom Typ und der Lage der Mutation. Nierendefekte in unterschiedlicher Ausprägung stellen das Hauptsymptom bei *UMOD*-Mutationen des Menschen dar (BLEYER und HART 2011, BLEYER et al. 2011).

Analog zu den funktionellen Nierendefekten der UAKD des Menschen zeigten die beiden mutanten Mauslinien *Umod*^{C93F} und *Umod*^{A227T} ebenfalls erhöhte Plasmawerte für Harnstoff und Kreatinin als Marker für das Vorliegen eines Nierendefektes. Das mutante Uromodulin führte zur Dysfunktion der TALH-Zellen („gain-of-toxic function“) aufgrund der gestörten Prozessierung des mutanten Uromodulins. Dabei beeinflussten der Typ der Mutation und der Allelstatus den Beginn, den Schweregrad und den Verlauf der Krankheitssymptome. So war der Schweregrad der Nierenveränderungen in heterozygoten *Umod*^{C93F}-Mutanten und homozygoten *Umod*^{A227T}-Mutanten ähnlich ausgeprägt.

Außer der Funktion von *UMOD* in der Niere ist bisher wenig über dieses Gen bekannt. Dies war der Anlass, die beiden *Umod*-mutanten ENU-Linien in der „German Mouse Clinic“ (Institut für Experimentelle Genetik, Helmholtz-Zentrum München) zu untersuchen. Die Berichte der Untersuchungen sind online einzusehen¹⁴ (KEMTER et al. 2013a).

Für die Untersuchung in der „German Mouse Clinic“ wurden heterozygot mutante und homozygot mutante Tiere der Linie *Umod*^{A227T} in einem Alter von 2–4 Monaten sowie heterozygot mutante Tiere der Linie *Umod*^{C93F} im Alter von 7–10 Monaten im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren beiderlei Geschlechts untersucht. Die Untersuchung bestätigte den Nierendefekt.

Darüber hinaus war bei beiden mutanten Linien ein deutlich reduziertes Körpergewicht auffällig. Die Dual-Röntgen-Absorptiometrie (DEXA)-Untersuchung zur Analyse der Körperzusammensetzung zeigte eine hochgradige Reduktion der Fettmasse und des Fettgehaltes in diesen Tieren. Der Beginn des Auftretens des verringerten Körpergewichts wurde in der Linie *Umod*^{C93F} etwa zur gleichen Zeit wie der Beginn der klinischen Nierenveränderungen beobachtet. Somit

14 <http://146.107.6.187/phenomap/jsp/annotation/public/phenomap.jsf>.

ist zumindest der Beginn des Auftretens des verringerten Körpergewichts nicht die Folge einer chronischen Niereninsuffizienz, da die Jungtiere nur milde Symptome einer Nierendysfunktion aufwiesen. Die Untersuchung des Energiemetabolismus offenbarte, dass die mutanten Tiere trotz ihres geringeren Körpergewichtes eine höhere Futteraufnahme als die Kontrolltiere zeigten (Tab. 1; KEMTER et al. 2009, 2013a, b). Der Grund dafür ist in weiteren Studien abzuklären.

Tab. 1 Untersuchungen der beiden mutanten Mauslinien $Umod^{422T}$ und $Umod^{C93F}$ in der „German Mouse Clinic“ (nach KEMTER et al. 2009, 2013a, b)

Test	Parameter	$Umod^{422T}$				$Umod^{C93F}$			
		Männlich Homozygote Mutanten	Wildtyp-Kontrolle	Weiblich Homozygote Mutanten	Wildtyp-Kontrolle	Männlich Heterozygote Mutanten	Wildtyp-Kontrolle	Weiblich Heterozygote Mutanten	Wildtyp-Kontrolle
DEXA	Körpergewicht (g)	27,8 ± 3,2 ^b	32,6 ± 2,6	25,2 ± 1,6	33,2 ± 4,1	29,1 ± 1,0 ^c	38,0 ± 2,0	25,2 ± 1,5 ^c	36,3 ± 6,1
	Fettanteil (g)	5,8 ± 4,2 ^a	10,8 ± 3,4	9,9 ± 8,3 ^a	21,6 ± 5,4	4,3 ± 1,2 ^c	13,7 ± 3,2	3,0 ± 1,3 ^c	16,1 ± 6,8
	Knochenmineraldichte (mg/cm ²)	51,3 ± 5,0 ^b	58,2 ± 3,2	53,2 ± 2,6 ^a	61,3 ± 5,2	53,3 ± 2,1 ^c	62,9 ± 1,9	53,7 ± 2,8 ^c	65,7 ± 4,0
Indirekte Kalorimetrie	Knochenmineralgehalt (%)	1,9 ± 0,4	2,1 ± 0,4	1,9 ± 0,2	2,0 ± 0,1	1,9 ± 0,1 ^b	2,2 ± 0,3	1,9 ± 0,1 ^b	2,5 ± 0,5
	Körpergewicht (g)	26,4 ± 0,7 ^c	31,6 ± 0,6	24,0 ± 0,4 ^c	28,2 ± 0,1	28,9 ± 0,5 ^c	37,2 ± 0,9	25,3 ± 0,6 ^c	37,0 ± 1,4
Kalorimetrie	Futteraufnahme (g/d)	6,1 ± 0,3 ^c	5,1 ± 0,2	6,0 ± 0,3 ^c	4,9 ± 0,3	7,6 ± 0,9	5,8 ± 0,2	7,9 ± 0,6 ^b	5,5 ± 0,2
	(MW ± SE)								

DEXA, Dual-Röntgen-Absorptiometrie. Linie $Umod^{422T}$, DEXA: Daten von 15 Wochen alten Tieren (n = 5–10 / Gruppe) als Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung (SD); Linie $Umod^{422T}$, indirekte Kalorimetrie: Daten von 13 Wochen alten Tieren (n = 10 / Gruppe) als Mittelwerte (MW) ± Standardfehler (SE). Linie $Umod^{C93F}$, DEXA: Daten von 9 Monate alten Tieren (n = 10 / Gruppe) als Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung (SD); Linie $Umod^{C93F}$, indirekte Kalorimetrie: Daten von 33 Wochen alten Tieren (n = 7 / Gruppe) als Mittelwerte (MW) ± Standardfehler (SE). Student's *t*-Test im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen: a: $P < 0,05$, b: $P < 0,01$, c: $P < 0,001$.

Offensichtliche metabolische Veränderungen wurden in den bisher publizierten *Umod*-mutanten Mausmodellen nicht beschrieben, was sowohl die beiden *Knockout*-Modelle (BATES et al. 2004, MO et al. 2004) als auch die beiden transgenen Linien mit additivem Gentransfer (TAKIUE et al. 2008, BERNASCONI et al. 2010) einschließt. Dieser Phänotyp wurde auch bei *UMOD*-Mutationen des Menschen bisher nicht untersucht.

Daneben wurden in den mutanten Tieren der beiden Linien *Umod*^{C93F} und *Umod*^{A227T} erhöhte Plasmakalziumwerte und erhöhte Plasmaaktivitäten der alkalischen Phosphatase (ALP) gemessen. Die Analyse des Skeletts mittels DEXA ergab einen Effekt der Mutationen auf Skelettparameter in Form einer Verminderung der Knochendichte und des Knochenmineralgehaltes. Dies ist als sekundäre Veränderung in Folge des Nierendefektes zu erklären (Tab. 1; KEMTER et al. 2009, 2013a, b). Auch dieser Phänotyp wurde bisher weder bei den übrigen *Umod*-mutanten Mausmodellen noch bei *UMOD*-Mutationen des Menschen untersucht.

Zusammenfassend erbrachte die standardisierte, systematische und umfassende Untersuchung der beiden mutanten Mauslinien *Umod*^{C93F} und *Umod*^{A227T} auf dem genetischen Hintergrund des Inzuchtstammes C3H neben der Bestätigung des primär untersuchten Nierendefektes eine Anzahl weiterer Veränderungen, wie Veränderungen im Körpergewicht, der Körperzusammensetzung, des Knochenstoffwechsels und des Energiemetabolismus. Diese Effekte wurden bisher weder bei den übrigen publizierten *Umod*-mutanten Mausmodellen noch bei *UMOD*-Mutationen des Menschen beschrieben bzw. untersucht.

3. Schlussfolgerung

Zur Erstellung treffgenauer und wiederholbarer Ergebnisse bei der Untersuchung mutanter Mausmodelle in der biomedizinischen Forschung sind standardisierte, systematische und umfassende phänotypische Untersuchungen durchzuführen. Online sind Datenbanken einsehbar, die Daten aus phänotypischen Untersuchungen sowohl der üblichen Inzuchtmausstämme als auch von mutanten Mauslinien enthalten. Zudem stellen Datenbanken online „Standard operating procedures (SOPs)“ zur Standardisierung der Untersuchungsmethoden zur Verfügung. Weltweit wurden große Phänotypisierungszentren für die Untersuchung mutanter Mauslinien etabliert. In Deutschland bietet die „German Mouse Clinic“ im Helmholtz-Zentrum München eine solche Analyse von mehreren hundert Parametern aller wichtigen Organsysteme an. Ziel dieser Untersuchungen ist es, in mutanten Mauslinien unbekannte primäre und/oder sekundäre Veränderungen aufzudecken und damit einen Beitrag zur funktionalen Genomanalyse zu leisten. Dies wurde beispielhaft in zwei mutanten Mauslinien für das Gen Uromodulin (*Umod*) dargestellt. Bei der Untersuchung von Labormäusen stehen verschiedene Faktoren in der Diskussion bezüglich ungenügender Standardisierung oder unklarer Güte der verwendeten Werte bei gegebener Standardisierung. Es ist davon auszugehen, dass die fehlende Wiederholbarkeit von phänotypischen Ergebnissen aus Mäusestudien ihre Ursache teilweise in einer ungenügenden Standardisierung der Versuche hat.

Literatur

AIGNER, B., RATHKOLB, B., HERBACH, N., KEMTER, E., SCHESSL, C., KLAFTEN, M., KLEMP, M., HRABÉ DE ANGELIS, M., WANKE, R., and WOLF, E.: Screening for increased plasma urea levels in a large-scale ENU mouse mutagenesis project reveals kidney disease models. *Amer. J. Physiol. Renal Physiol.* 292, F1560–F1567 (2007)

- BATES, J. M., RAFFI, H. M., PRASADAN, K., MASCARENHAS, R., LASZIK, Z., MAEDA, N., HULTGREN, S. J., and KUMAR, S.: Tamm-Horsfall protein knockout mice are more prone to urinary tract infection: rapid communication. *Kidney Int.* 65, 791–797 (2004)
- BERNASCONE, I., JANAS, S., IKEHATA, M., TRUDU, M., CORBELL, A., SCHAEFFER, C., RASTALDI, M. P., DEVUYST, O., and RAMPOLDI, L.: A transgenic mouse model for uromodulin-associated kidney diseases shows specific tubulointerstitial damage, urinary concentrating defect and renal failure. *Hum. Mol. Genet.* 19, 2998–3010 (2010)
- BLEYER, A. J., and HART, P. S.: UMOD-associated kidney disease. In: PAGON, R. A., BIRD, T. D., DOLAN, C. R., STEPHENS, K., and ADAM, M. P. (Eds.): *Gene Reviews*. Seattle, WA: University of Washington 2011
- BLEYER, A. J., ZIVNA, M., and KMOCH, S.: Uromodulin-associated kidney disease. *Nephron Clin. Pract.* 118, C31–C36 (2011)
- CRABBE, J. C., WAHLSTEN, D., and DUDEK, B. C.: Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science* 284, 1670–1672 (1999)
- FUCHS, H., GAILUS-DURNER, V., ADLER, T., AGUILAR-PIMENTEL, J. A., BECKER, L., CALZADA-WACK, J., DA SILVA-BUTTKUS, P., NEFF, F., GOTZ, A., HANS, W., HOLTER, S. M., HORSCH, M., KASTENMULLER, G., KEMTER, E., LENGGER, C., MAIER, H., MATLOKA, M., MOLLER, G., NATON, B., PREHN, C., PUK, O., RACZ, I., RATHKOLB, B., ROMISCH-MARGL, W., ROZMAN, J., WANG-SATTLE, R., SCHREWE, A., STOGER, C., TOST, M., ADAMSKI, J., AIGNER, B., BECKERS, J., BEHRENDT, H., BUSCH, D. H., ESPOSITO, I., GRAW, J., ILLIG, T., IVANDIC, B., KLINGENSPOR, M., KLOPSTOCK, T., KREMMER, E., MEMPEL, M., NESCHEN, S., OLLERT, M., SCHULZ, H., SUHRE, K., WOLF, E., WURST, W., ZIMMER, A., and HRABÉ DE ANGELIS, M.: Mouse phenotyping. *Methods* 53, 120–135 (2011)
- FUCHS, H., GAILUS-DURNER, V., NESCHEN, S., ADLER, T., AFONSO, L. C., AGUILAR-PIMENTEL, J. A., BECKER, L., BOHLA, A., CALZADA-WACK, J., COHRS, C., DEWERT, A., FRIDRICH, B., GARRETT, L., GLASL, L., GOTZ, A., HANS, W., HOLTER, S. M., HORSCH, M., HURT, A., JANAS, E., JANIK, D., KAHLE, M., KISTLER, M., KLEIN-RODEWALD, T., LENGGER, C., LUDWIG, T., MAIER, H., MARSCHALL, S., MICKLICH, K., MOLLER, G., NATON, B., PREHN, C., PUK, O., RACZ, I., RASS, M., RATHKOLB, B., ROZMAN, J., SCHEERER, M., SCHILLER, E., SCHREWE, A., STEINKAMP, R., STOGER, C., SUN, M., SZYMCAK, W., TREISE, I., VARGAS PANESSO, I. L., VERNALEKEN, A. M., WILLERSHAUSER, M., WOLFF-MUSCATE, A., ZEH, R., ADAMSKI, J., BECKERS, J., BEKEREDJIAN, R., BUSCH, D. H., EICKELBERG, O., FAVOR, J., GRAW, J., HOFER, H., HOSCHEN, C., KATUS, H., KLINGENSPOR, M., KLOPSTOCK, T., NEFF, F., OLLERT, M., SCHULZ, H., STOGER, T., WOLF, E., WURST, W., YILDIRIM, A. O., ZIMMER, A., and HRABÉ DE ANGELIS, M.: Innovations in phenotyping of mouse models in the German Mouse Clinic. *Mamm. Genome* 23, 611–622 (2012)
- GAILUS-DURNER, V., FUCHS, H., ADLER, T., AGUILAR PIMENTEL, A., BECKER, L., BOLLE, I., CALZADA-WACK, J., DALKE, C., EHRLHARDT, N., FERWAGNER, B., HANS, W., HOLTER, S. M., HOLZWIMMER, G., HORSCH, M., JAVAHERI, A., KALLNIK, M., KLING, E., LENGGER, C., MORTH, C., MOSSBRUGGER, I., NATON, B., PREHN, C., PUK, O., RATHKOLB, B., ROZMAN, J., SCHREWE, A., THIELE, F., ADAMSKI, J., AIGNER, B., BEHRENDT, H., BUSCH, D. H., FAVOR, J., GRAW, J., HELDMAIER, G., IVANDIC, B., KATUS, H., KLINGENSPOR, M., KLOPSTOCK, T., KREMMER, E., OLLERT, M., QUINTANILLA-MARTINEZ, L., SCHULZ, H., WOLF, E., WURST, W., and HRABÉ DE ANGELIS, M.: Systemic first-line phenotyping. *Methods Mol. Biol.* 530, 463–509 (2009)
- HRABÉ DE ANGELIS, M., FLASWINKEL, H., FUCHS, H., RATHKOLB, B., SOEWARTO, D., MARSCHALL, S., HEFFNER, S., PARGENT, W., WUENSCH, K., JUNG, M., REIS, A., RICHTER, T., ALESSANDRINI, F., JAKOB, T., FUCHS, E., KOLB, H., KREMMER, E., SCHAEBLE, K., ROLLINSKI, B., ROSCHER, A., PETERS, C., MEITINGER, T., STROM, T., STECKLER, T., HOLSBOER, F., KLOPSTOCK, T., GEKELER, F., SCHINDEWOLF, C., JUNG, T., AVRAHAM, K., BEHRENDT, H., RING, J., ZIMMER, A., SCHUGHART, K., PFEFFER, K., WOLF, E., and BALLING, R.: Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis. *Nature Genet.* 25, 444–447 (2000)
- HRABÉ DE ANGELIS, M., MICHEL, D., WAGNER, S., BECKER, S., and BECKERS, J.: Chemical mutagenesis in mice. In: FOX, J. G., BARTHOLD, S. W., DAVISSON, M. T., NEWCOMER, C. E., QUIMBY, F. W., and SMITH, A. L. (Eds.): *The Mouse in Biomedical Research. Vol. 1: History, Wild Mice, and Genetics*; pp. 225–260. Burlington, MA: Academic Press 2007
- KEMTER, E., PRUECKL, P., RATHKOLB, B., MICKLICH, K., ADLER, T., BECKER, L., BECKERS, J., BUSCH, D. H., GOTZ, A. A., HANS, W., HORSCH, M., IVANDIC, B., KLINGENSPOR, M., KLOPSTOCK, T., ROZMAN, J., SCHREWE, A., SCHULZ, H., FUCHS, H., GAILUS-DURNER, V., HRABÉ DE ANGELIS, M., WOLF, E., and AIGNER, B.: Standardized, systemic phenotypic analysis of Umod(C93F) and Umod(A227T) mutant mice. *PLoS One* 8, e78337 (2013a)
- KEMTER, E., PRUECKL, P., SKLENAK, S., RATHKOLB, B., HABERMANN, F. A., HANS, W., GAILUS-DURNER, V., FUCHS, H., HRABÉ DE ANGELIS, M., WOLF, E., AIGNER, B., and WANKE, R.: Type of uromodulin mutation and allelic status influence onset and severity of uromodulin-associated kidney disease in mice. *Hum. Mol. Genet.* 22, 4148–4163 (2013b)
- KEMTER, E., RATHKOLB, B., ROZMAN, J., HANS, W., SCHREWE, A., LANDBRECHT, C., KLAFTEN, M., IVANDIC, B., FUCHS, H., GAILUS-DURNER, V., KLINGENSPOR, M., HRABÉ DE ANGELIS, M., WOLF, E., WANKE, R., and AIGNER, B.: Novel missense mutation of uromodulin in mice causes renal dysfunction with alterations in urea handling, energy, and bone metabolism. *Amer. J. Physiol. Renal Physiol.* 297, F1391–F1398 (2009)

- KOKOLUS, K. M., CAPITANO, M. L., LEE, C. T., ENG, J. W., WRIGHT, J. D., HYLANDER, B. L., SEXTON, S., HONG, C. C., GORDON, C. J., ABRAMS, S. I., and REPASKY, E. A.: Baseline tumor growth and immune control in laboratory mice are significantly influenced by subthermoneutral housing temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 20176–20181 (2013)
- MÄHLER, M., BERARD, M., FEINSTEIN, R., GALLAGHER, A., ILLGEN-WILCKE, B., PRITCHETT-CORNING, K., and RASPA, M.: FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab. Anim.* 48, 178–192 (2014)
- MALONEY, S. K., FULLER, A., MITCHELL, D., GORDON, C., and OVERTON, J. M.: Translating animal model research: does it matter that our rodents are cold? *Physiology (Bethesda)* 29, 413–420 (2014)
- MO, L., ZHU, X. H., HUANG, H. Y., SHAPIRO, E., HASTY, D. L., and WU, X. R.: Ablation of the Tamm-Horsfall protein gene increases susceptibility of mice to bladder colonization by type 1-fimbriated *Escherichia coli*. *Amer. J. Physiol. Renal Physiol.* 286, F795–F802 (2004)
- PERRIN, S.: Preclinical research: Make mouse studies work. *Nature* 507, 423–425 (2014)
- PRINZ, F., SCHLANGE, T., and ASADULLAH, K.: Believe it or not: how much can we rely on published data on potential drug targets? *Nature Rev. Drug. Discov.* 10, 712–713 (2011)
- TAKIUE, Y., HOSYOYAMADA, M., YOKOO, T., KIMURA, M., OCHIAI, M., KANEKO, K., ICHIDA, K., HOSoya, T., and SHIBASAKI, T.: Production and characterization of transgenic mice harboring mutant human UMOD gene. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 27, 596–600 (2008)

Prof. Dr. Bernhard AIGNER
Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie
Hackerstraße 27
85764 Oberschleißheim
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 89 218078420
Fax: +49 89 218078422
E-Mail: b.aigner@gen.vetmed.uni-muenchen.de

Phänotypisierung des Schlachtkörpermerkmals Rückenfettdicke bei Spiegelkarpfen (*Cyprinus carpio*) mittels Ultraschall *in vivo* und Computertomographie *post mortem*

Paula MAAS,^{1,5} Beata GRZEGRZÓŁKA,² Martin OBERLE,³ Michael JUDAS,⁴ Manfred GAREIS⁵ und Prisca KREMER-RÜCKER¹

Zusammenfassung

Die kürzliche Eintragung von regionalen Speisekarpfen in das EU-Qualitätsregister verlangt eine konkrete Überwachung des Fettgehalts der Fische zur Sicherung der Produktqualität und Steigerung der Verbraucherakzeptanz. Die Fettgehaltsbestimmung sollte bedingt durch die Lebendvermarktung der Fische *in vivo* erfolgen. Momentan wird ein kostenintensives, auf Mikrowellentechnologie basierendes Gerät verwendet, um den Fettgehalt der lebenden Karpfen zu bestimmen. Vorhergehende Untersuchungen stellten einen Zusammenhang des Fettgehalts im Filet mit der Dicke der Rückenfettauflage der Karpfen her. Im Hinblick auf eine alternative Messmethode wurde ein Versuch zur Phänotypisierung der Rückenfettdicke von Spiegelkarpfen durchgeführt. Die Rückenfettdicke von 100 Karpfen wurde *in vivo* mittels Ultraschall erfasst. Nach der Schlachtung wurden die Fische im Computertomographen gescannt und die Schnittbilder zur Vermessung des Rückenfetts verwendet. Die erneute Erfassung der Rückenfettdicke erfolgte am filetierten Schlachtkörper mittels einer Schieblehre. Erste Ergebnisse deuten auf eine mäßige Korrelation zwischen den einzelnen Messmethoden hin.

Abstract

Several areas in Bavaria producing mirror carps are protected under European Quality Schemes. Among others stringent requirements regarding to the fat content have been fixed. The goal is to insure product quality and achieve high customer acceptance. Currently, a measurement based on microwave technology is in use to determine the fat content in live fish. A previous study has shown a high correlation between the fat content and the back fat layer thickness measured at split carcass. In this study 100 live mirror carps were measured *in vivo* using a mobile ultrasound device. After slaughtering the fish were scanned in a computer tomograph. The back fat layer thickness was measured once again using a caliper. Preliminary results present descriptive statistics about the several measurements and analysis of correlation. The correlations between the different measurement methods are moderate.

1. Einleitung

Im Jahr 2013 wurden in Deutschland 20500 t Speisefisch produziert. Wichtigste Fischart im Bereich der Kaltwasserproduktion ist hierbei die Regenbogenforelle mit 9600 t, gefolgt vom

1 Hochschule Weihenstephan-Triesdorf, Fakultät Landwirtschaft, Weidenbach, DE.

2 Warschauer Naturwissenschaftliche Universität, Institut für Genetik und Tierzucht, Warschau, PL.

3 Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Fischerei, Außenstelle für Karpfenteichwirtschaft, Höchststadt an der Aisch, DE.

4 Max-Rubner-Institut, Institut für Sicherheit und Qualität bei Fleisch, Kulmbach, DE.

5 Ludwig-Maximilians-Universität, Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim, DE.

Karpfen mit 5700 t. Die Haupterzeugung von Karpfen findet laut BRÄMICK (2014) in den Bundesländern Bayern (2339 t) und Sachsen (1877 t) statt.

Zur Sicherung der Produktqualität in der Erzeugung von Speisefischen ist es von großer Bedeutung den Fettgehalt des Filets zu bestimmen. Gerade beim Karpfen, der eine hohe Variation im Fettgehalt aufweist (FAUCONNEAU et al. 1995), wird ein magerer Fisch angestrebt, um die Verbraucherakzeptanz des Produktes zu gewährleisten. Darüber hinaus verfügen in Bayern mehrere Karpfenerzeugerregionen über einen Eintrag ihres Produktes in das EU-Qualitätsregister als „g.g.A.“ – „geschützte geographische Angabe“ (Verordnung [EU] Nr. 1151/2012). Seit 2012 ist nach dem „Oberpfälzer Karpfen“ und dem „Fränkischen Karpfen“ auch der „Aischgründer Karpfen“ eine solche geschützte Angabe. Während sich der „Oberpfälzer Karpfen“ laut Produktspezifikation der genannten Verordnung u. a. durch ein fettarmes Filet auszeichnet, liegt – ebenfalls laut Produktspezifikation – der Fettgehalt des „Aischgründer Karpfens“ im Filet mit Haut bei maximal 10 % (Spezifikation gemäß Artikel 4 Abs. 2 der Verordnung [EG] Nr. 510/2006). Dies stellt den Erzeuger vor die Herausforderung, den Fettgehalt der lebend vermarkteten Fische zu kennen, um eine entsprechende Preiskalkulation durchzuführen. Obwohl im Bereich anderer Tierarten, beispielsweise Rind (BRETHOUR 1992) und Lamm (DELFA et al. 1994), die Ultraschalltechnologie zur Bestimmung von Körperzusammensetzung insbesondere von Rückenfettdicke schon längst Verwendung findet, gibt es beim Fisch in diesem Bereich wenige Erkenntnisse. Lediglich bei Welsen wurde der Einsatz der Ultraschalltechnologie hinsichtlich der Körperzusammensetzung untersucht (BOSWORTH et al. 2001). Basierend auf der Fettgehaltsmessung mittels eines mikrowellentechnologiebasierten Fish-Fatmeters stellten OBERLE et al. (2013) beim Karpfen einen Zusammenhang des Fettgehaltes im Filet mit der Dicke der Rückenfettauflage her ($R^2 = 0,85$). Auf Basis dieser Ergebnisse erfolgte die Empfehlung, am geteilten Schlachtkörper die Fettdicke am Rücken des Karpfens mittels Messschieber zu messen und so die Vermarktungsfähigkeit als z. B. „Aischgründer Karpfen“ zumindest nach der Schlachtung und Zerlegung zu validieren.

2. Material und Methode

Im Rahmen eines Gemeinschaftsprojektes der Fakultät Landwirtschaft der Hochschule Weihenstephan-Triesdorf (HSWT), der Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) – Außenstelle für Karpfenteichwirtschaft des Instituts für Fischerei, des Max-Rubner-Instituts (MRI) – Sicherheit und Qualität bei Fleisch und des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) wurde im Oktober 2014 eine Studie durchgeführt, um die Möglichkeiten der Ultraschalltechnologie (US) und der Computertomographie (CT) zur Bestimmung des Fettgehaltes im Filet von Spiegelkarpfen zu evaluieren. Hierzu wurden 100 Spiegelkarpfen (*Cyprinus carpio*) mittels US *in vivo* untersucht und anschließend geschlachtet und zerlegt. 60 der Fische wurden nach der Schlachtung, vor der Zerlegung, zusätzlich mittels CT gescannt. Im Anschluss wurde die Rückenfettdicke aller Fische mithilfe eines digitalen Messschiebers am Schlachtkörper vermessen. Die Regierung von Mittelfranken wurde über das Vorhaben in Kenntnis gesetzt – eine Tierversuchsanzeige oder -genehmigung hatte nicht zu erfolgen.

Die untersuchten Fische stammten aus 10 verschiedenen Teichen des Aischgrunds oder angrenzender Regionen Oberfrankens (Tab.1).

Tab. 1 Anzahl der entnommenen Spiegelkarpfen (*Cyprinus carpio*) je Teich mit Gewichtsangabe in Gramm bezüglich Durchschnitt, Minimum, Maximum und Standardabweichung. Die Fische sind dreisömmrig (K3).

Teich	n-Fische	$\bar{x}$ -Gewicht (g)	Minimum (g)	Maximum (g)	Standardabweichung
B	10	2004	1355	2443	± 331
C	10	2208	1532	2607	± 369
D	10	1605	1173	1947	± 201
E	10	1451	1050	2041	± 307
F	10	1600	951	2530	± 512
G	10	1041	907	1172	± 104
H	8	1233	967	1731	± 234
I	11	1000	902	1115	± 79
J	11	1396	1184	1638	± 192
K	10	1136	975	1625	± 195
Gesamt	100	1467	902	2607	± 467

Für die Ultraschallmessungen wurde ein tragbares Ultraschallgerät (MicroMaxx, Fujifilm SonoSite, Frankfurt am Main, Deutschland) in Kombination mit einer 5MHz-Endlinearsende verwendet. Hierzu wurden die Fische in einer mit Teichwasser befüllten Box mit jeweils vier Einzelabteilen gehalten (Abb. 1A und 1B). Dies ermöglichte eine tierindividuelle Erfassung der Rückenfettdicke am nicht sedierten Fisch im schwimmenden Zustand ohne zusätzliche Verwendung eines Kontaktmediums für die Sonde und ohne Kontakt zum Tier (Abb. 1C). Die Datenerfassung erfolgte auf Basis zweier Bilder in sagittaler Schnittebene im Bereich der Rückenfettauflage. Nach Fixieren des ersten Bildes wurde die Dicke der Fettauflage an drei verschiedenen Punkten bestimmt (Abb. 2A). Ultraschall-Messpunkt 1 (US1) liegt 2,5 cm caudal vom Beginn der Fettauflage. Ultraschall-Messpunkt 2 (US2) befindet sich 3 cm caudal und Ultraschallmesspunkt 3 (US3) 3,5 cm Richtung caudal vom Ansatz der Fettschicht entfernt. Auf einem zweiten Sagittalbild wurde die Fettschicht 2 cm (US4) vom Ursprung des ersten Hartstrahls der Rückenflosse ausgehend, Richtung cranial, vermessen (Abb. 2B). Die Abmessung der entsprechenden Distanzen erfolgte mittels der integrierten Messfunktion des Gerätes und wurde tierindividuell aufgezeichnet.



Abb. 1 (A) Karpfen in einer mit Teichwasser befüllten Box zur tierindividuellen Erhebung der Ultraschalldaten, (B) Vermessung der Rückenfettdicke mithilfe eines mobilen Ultraschallgerätes und (C) Position der Sonde unter Wasser ohne direkten Kontakt zum Tier.

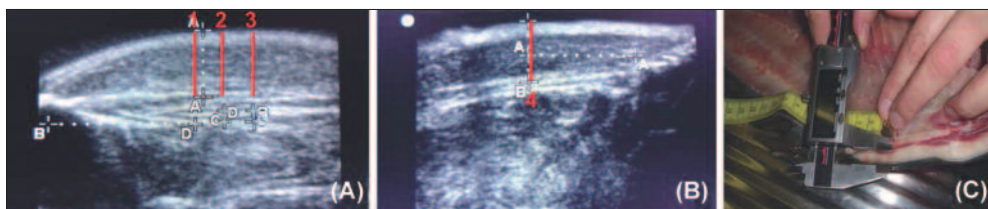


Abb. 2 (A) Sagittales Schnittbild der Rückenfettauflage, Vermessung an drei definierten Positionen, 2,5 cm (US1), 3 cm (US2) und 3,5 cm (US3) caudal von Beginn der Fettschicht entfernt. (B) Sagittales Schnittbild der Rückenfettauflage, der vierte Messpunkt liegt 2 cm (US4) cranial des Ansatzes des ersten Hartstrahls der Rückenflosse. (C) Erfassung der Rückenfettstärke mithilfe eines digitalen Messschiebers nach Filetieren der Fische am verbliebenen Fettkamm.

Für die darauf folgende Schlachtung wurden die Tiere durch sachkundiges Personal mittels Kopfschlag betäubt und mittels Kiemenschnitt entblutet. Der Transport der frisch geschlachteten Fische zur Computertomographie erfolgte unmittelbar im Anschluss an die Schlachtung. Die Kerntemperatur betrug bei Ankunft am MRI zum CT ca. 10 °C.

Die CT-Scans der Karpfen erfolgten am MRI mittels eines Siemens Somatom Plus 4. Für die Untersuchung wurden die geschlachteten Fische wiederum in der zur Ultraschallmessung verwendeten Box positioniert und so dementsprechend in Chargen von jeweils vier Fischen parallel aufrecht gescannt (Abb. 3). Der Zeitaufwand betrug 10–15 min je Untersuchungsgang; aufgrund der Röhrenbelastung wurde jeder Scan auf zwei getrennte Sequenzen aufgeteilt (Schichtdicke jeweils 3 mm, Matrix 512 × 512 Pixel, FoV 300 × 300 mm, Rotationszeit 1 s, Röhrenspannung 140 kV, Röhrenstrom 146 mA). Die Rückenfettstärke wurde anhand der CT-Bilder vermessen. Auf Höhe des ersten Dorsalfortsatzes der Wirbelsäule wurde mithilfe einer integrierten Messfunktion der Software „Able 3D Doctor“ die Fettstärke erfasst.

Unmittelbar nach Anschluss des Scans erfolgte der gekühlte Rücktransport. Die Fische wurden nach Ankunft umgehend filetiert und die Rückenfettstärke der Schlachtkörper mittels Messschieber vermessen (Abb. 2C). Die Messpunkte wurden in Anlehnung an die Datenerfassung mittels Ultraschall definiert und lagen 2,5 cm (CP1) bzw. 3,5 cm (CP2) Richtung caudal vom Ansatz des Rückenfetts ausgehend und 2 cm (CP3) vom Ursprung des ersten Hartstrahls der Rückenflosse gemessen Richtung cranial. Verwendet wurde ein COXT710350 der Firma Connex.

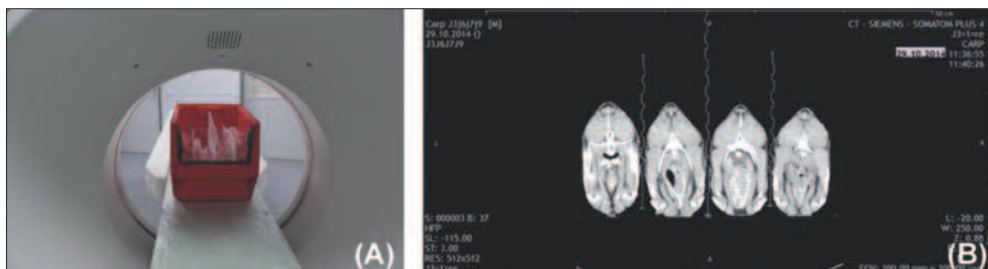


Abb. 3 (A) Fische beim Scan im CT des Max-Rubner-Instituts (MRI) in Kulmbach. (B) Computertomographisches Transversalschnittbild, dargestellt mittels synedra View (synedra IT GmbH).

Die Auswertung der CT-Bilder erfolgte mit der Software „Able 3D Doctor“ (Lexington, MA, USA; FDA approved). Alle Daten wurden in Excel 2010 erfasst und mittels der Statistiksoftware R!Studio (Boston, MA, USA) auf Normalverteilung getestet und unter Verwendung von Korrelationsanalysen analysiert.

3. Ergebnisse

Die Rückenfettdickenmessung mittels Ultraschall liefert Normalverteilungen für die vier Messpunkte. Die Mittelwerte sind annähernd deckungsgleich, ausgenommen Ultraschall-Messpunkt 4 (Tab. 2).

Tab. 2 Mittelwerte ($\bar{x}$) und Standardabweichungen (s) der Ultraschall-Messpunkte US1, US2, US3 und US4, der Messschieber-Messpunkte CP1, CP2, CP3 und des Messpunktes der computertomographischen (CT) Aufnahmen

Messpunkt	$\bar{x}$	s
US1	1,05	$\pm 0,18$
US2	1,05	$\pm 0,19$
US3	1,06	$\pm 0,19$
US4	0,92	$\pm 0,17$
CP1	0,69	$\pm 0,21$
CP2	0,72	$\pm 0,22$
CP3	0,61	$\pm 0,16$
CT	0,59	$\pm 0,18$

Der Mittelwert der Rückenfettdicke in Position US4 ($\bar{x}$ 0,92) ist geringer als die Mittelwerte von US1–US3 ($\bar{x}$ 1,05–1,06). Ursache ist die Anatomie – als caudalster Messpunkt liegt US4 in einem Bereich, in dem sich die Fettschicht verschmälert, bevor sie endet. Die Verteilung der einzelnen Ultraschallmessunkte ist in Abbildung 4 durch Boxplots dargestellt.

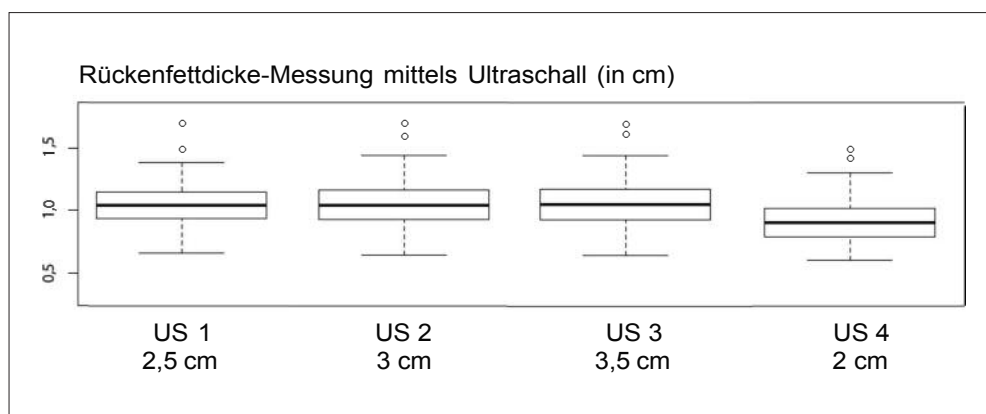


Abb. 4 Boxplots der Ultraschallmesspunkte US1, US2, US3 und US4

Die Datenbetrachtung der Messschiebermesspunkte zeigt ein ähnliches Bild (Abb. 5). Der kleinere Mittelwert von CP3 ($\bar{x}$ 0,61) im Gegensatz zu CP1 ($\bar{x}$ 0,69) und CP2 ($\bar{x}$ 0,72) lässt sich ebenfalls durch die Position des Messpunktes erklären. Dieser liegt auf gleicher Position wie der Ultraschallmesspunkt 4. Zur vergleichenden Darstellung der Messschiebermesspunkte sind diese in Abbildung 5 in Boxplots dargestellt.

Der CT-Messpunkt liegt auf Höhe des ersten Dorsalfortsatzes. Es erfolgte die exakt mittige Ausmessung. Der Mittelwert liegt bei $\bar{x}$ 0,59. In Abbildung 6 sind Boxplots des US3, des CP2 und des CT-Messpunkts vergleichend nebeneinander dargestellt.

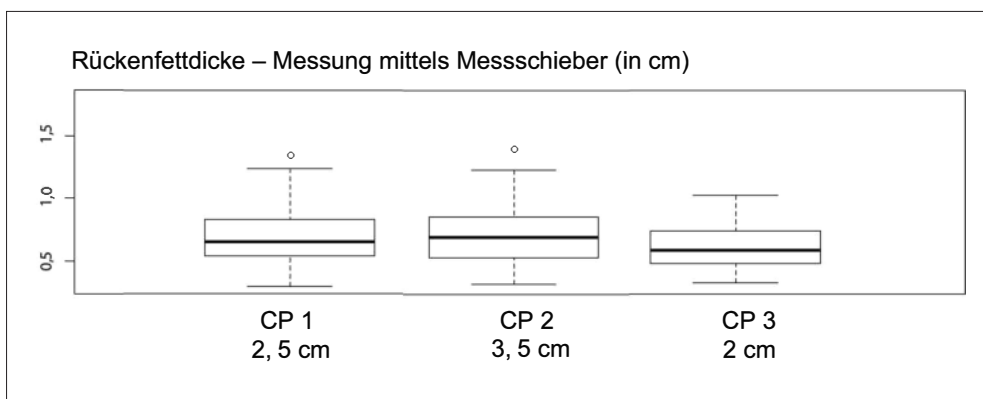


Abb. 5 Boxplots der Messschiebermesspunkte CP1, CP2 und CP3

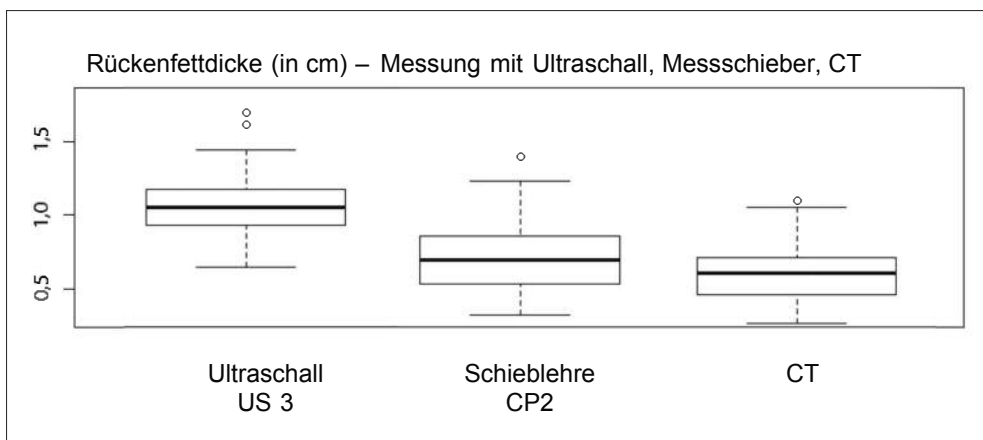


Abb. 6 Boxplots des Ultraschallmesspunkts US3, des Messschiebermesspunkts CP2 und des CT-Messpunkts

Die höchste Korrelation ergibt der Vergleich von US3 und CP2 mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,649$ und einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,805$ (Abb. 7). In Abbildung

8 ist die Korrelation von Messschiebermesspunkt 2 (CP2) und der CT-Bildmessung dargestellt. Diese ergibt ein R^2 von 0,5921 und ein r von 0,769. Der Vergleich von Ultraschallmesspunkt 3 (US3) und der CT-Messung, in Abbildung 9 gezeigt, ergibt ein R^2 von 0,629 und ein r von 0,793.

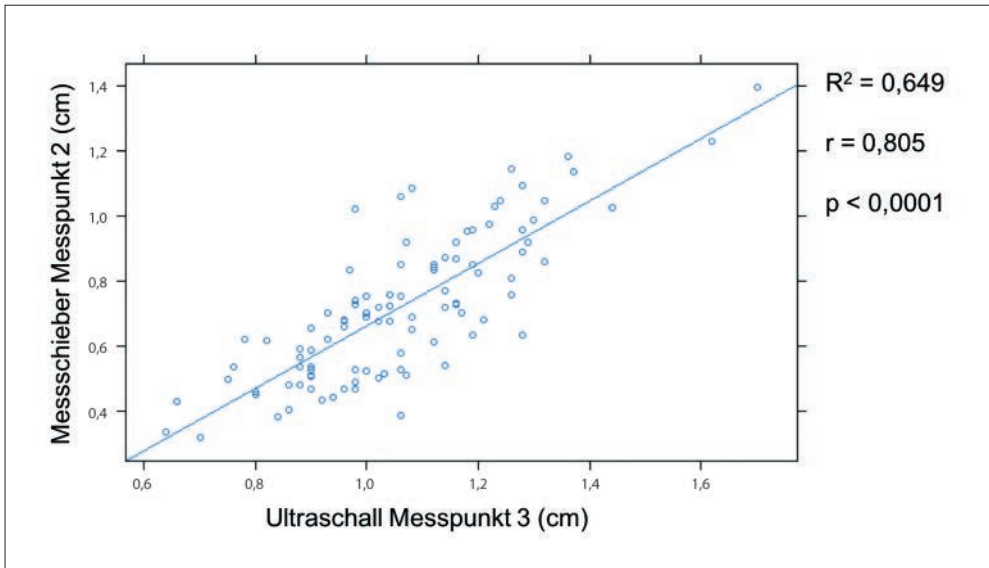


Abb. 7 Korrelation zwischen Ultraschallmesspunkt 3 (US3) und Messschiebermesspunkt 2 (CP2), $n = 100$

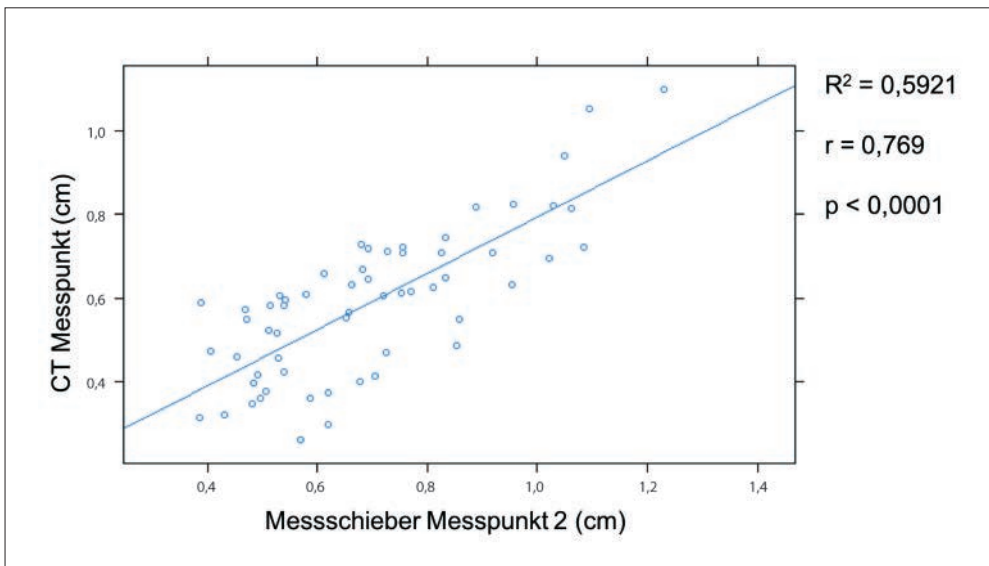


Abb. 8 Korrelation zwischen Messschiebermesspunkt 2 (CP2) und CT-Bildmesspunkt, $n = 60$

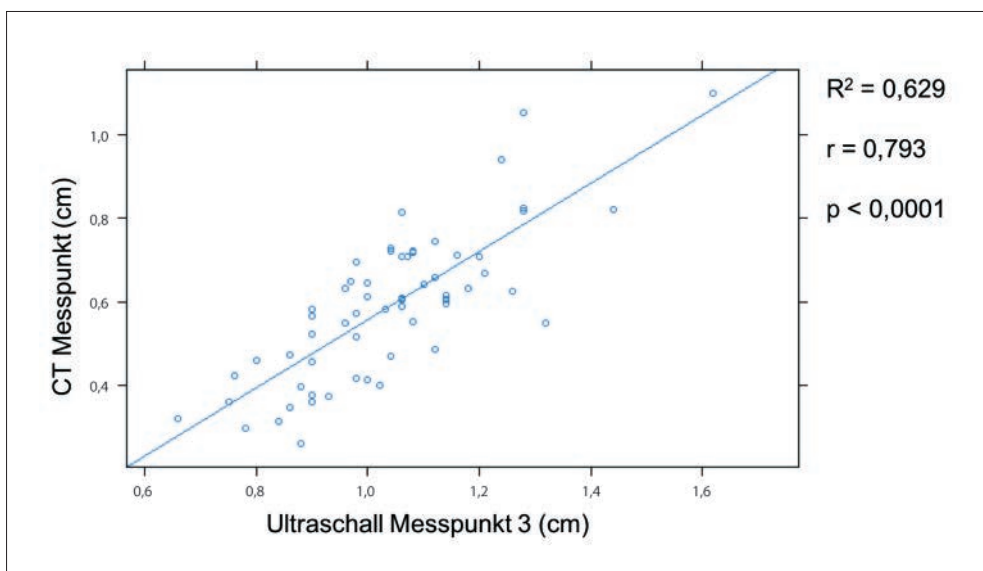


Abb. 9 Korrelation zwischen Ultraschallmesspunkt 3 (US3) und CT-Bildmesspunkt, n = 60

4. Diskussion

Die Schätzung des Fettgehaltes von Schlachtkörpern an Hand einzelner Fettkompartimente des Tierkörpers ist gängige Praxis in der Züchtung verschiedener Tierarten (MÜLLER und POLTEN 2004). Unveröffentlichte Untersuchungen an geschlachteten und filetierten Karpfen ergaben Hinweise, dass ebenfalls bei dieser Spezies ein Zusammenhang zwischen dem Fettgehalt des Filets und der im Rücken ausgebildeten Fettschicht vorhanden ist (OBERLE et al. 2013).

Die vorliegende Arbeit zielte daher auf die Evaluation der Möglichkeit zur Phänotypisierung der Rückenfettdicke bei Spiegelkarpfen (*Cyprinus carpio*) mittels Ultraschall *in vivo* und Computertomographie *post mortem*. Als Referenz diente der entsprechende Abgleich mit der Messung mittels Schieblehre am Schlachtkörper nach Zerlegung.

Untersucht wurden hierzu 100 Spiegelkarpfen aus 10 Teichen des Aischgrundes und angrenzender Regionen im nördlichen Bayern. 60 Fische wurden zusätzlich nach der Schlachtung, aber vor der Zerlegung mittels Computertomographie untersucht.

Der Vergleich der Rückenfett-Messung mittels Ultraschall am lebenden Fisch und mittels Schieblehre am filetierten Schlachtkörper zeigt eine mäßige Korrelation beider Parameter. Die Daten der jeweiligen Messmethoden waren zwar normal verteilt, die absoluten Zahlen wiesen jedoch eine deutliche Diskrepanz auf. Die Aufnahme eines präzise mittigen Ultraschallschnittbildes wurde durch die Messung unter Wasser und ohne Berührung des Fisches erschwert. Auffallend waren tendenziell höhere Messwerte der Fettschichtdicke im Ultraschall als am Schlachtkörper. Diese ergaben sich vermutlich aus der Aufnahme von schrägen Bildern der Fettschicht.

Die Datenerfassung mittels Schieblehre erfolgte hingegen am zerlegten Schlachtkörper, was durchweg zur Vermessung des Merkmals nach sagittaler Schnittführung führte. Die exakte

mittige Messung war jedoch nicht möglich, da durch die vorherige Filetierung die Vermessung durch Anlegen des Messschiebers seitlich an dem verbliebenen Fettstreifen erfolgen musste.

Die Ausmessung der Fettschicht auf den CT-Bildern konnte durch die gute Darstellbarkeit exakt mittig erfolgen und immer an der anatomisch gleichen Stelle vorgenommen werden.

Die Daten repräsentieren vorläufige Ergebnisse. Es ist festzuhalten, dass sich sowohl mittels US *in vivo*, wie auch mittels CT *post mortem* eine Phänotypisierung des Merkmals Rückenfettdicke mit guter Genauigkeit vornehmen lässt.

Um die Sicherheit der Methode zu steigern, bedarf es einer exakteren Positionierung der Ultraschallsonde und einer genaueren Definition eines anatomischen Fixpunktes. Eine solche Findung soll an Hand verschiedener, noch zu evaluierender Messpunkte auf Basis der CT-Bilder vorgenommen werden. Weiterhin ist der Abgleich der Daten mit Werten aus der chemischen Analyse geplant. Es soll überprüft werden, welcher konkrete Zusammenhang zwischen Rückenfettdicke und dem Fettgehalt im Filet besteht.

Literatur

- BOSWORTH, B. G., HOLLAND, M., and BRAZIL, B. L.: Evaluation of ultrasound imagery and body shape to predict carcass and fillet yield in farm-raised catfish. *J. Animal Sci.* 79, 1483–1490 (2001)
- BRÄMICK, U.: Jahresbericht zur Deutschen Binnenfischerei und Binnenaquakultur 2013. online unter: www.portal-fischerei.de
- BRETHOUR, J. R.: The repeatability and accuracy of ultrasound in measuring backfat of cattle. *J. Animal Sci.* 70, 1039–1044 (1992)
- DELFA, R., TEIXEIRA, A., GONZALES, C., and BLASCO, I.: Ultrasonic estimates of fat thickness and *longissimus dorsi* muscle depth for predicting composition of live Aragon lambs. *Small Ruminant Res.* 16, 159–164 (1995)
- FAUCONNEAU, B., ALAMI-DURANTE, H., LAROCHE, M., MARCEL, J., and VALLOT, D.: Growth and meat quality relations in carp. *Aquaculture* 129, 265–297 (1995)
- MÜLLER, S., and POLTEN, S.: Vergleichsuntersuchungen zur Ultraschall-Speckdickenmessung beim Schwein im Rahmen der Eigenleistungsprüfung. *Arch. Tierz.* 47/3, 249–263 (2004)
- OBERLE, M., HLAVAC, D., and HOPKINS, J.: Ableitung des Fettgehaltes von Karpfenfilets aus der Fettauflage am Rücken. Jahresbericht 2012 der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) – Instituts für Fischerei (Herausgeber) (2013)
- Spezifikation* gemäß Artikel 4 Abs. 2 der Verordnung (EG) Nr. 510/2006 zum Antrag auf Eintragung der Bezeichnung “Aischgründer Karpfen“ als g.g.A.
- Verordnung (EU) Nr. 1151/2012

Prof. Dr. Prisca KREMER-RÜCKER
Hochschule Weihenstephan-Triesdorf
University of Applied Sciences
Fakultät Landwirtschaft
Tierzucht und Tierhaltung
Markgrafenstraße 16
91746 Weidenbach
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 9826 654203
Fax: +49 9826 6544203
E-Mail: prisca.kremer-ruecker@hswt.de

Deglacial Changes in Ocean Dynamics and Atmospheric CO₂ Modern, Glacial, and Deglacial Carbon Transfer between Ocean, Atmosphere, and Land

Leopoldina-Symposium
vom 18. bis 21. März 2015 in Halle (Saale)

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 121, Nr. 408

Herausgegeben von Michael SARNTHEIN (Kiel) und Gerald H. HAUG (Zürich)
in Zusammenarbeit mit Edouard BARD (Aix-en-Provence), Hubertus FISCHER (Bern),
Tatiana ILYINA (Hamburg) und Michael SCHULZ (Bremen)
(2015, 352 Seiten, 116 Abbildungen, 2 Tabellen, 26,95 Euro,
ISBN: 978-3-8047-3433-3)

Vor 35 Jahren enthüllten Eiskernbohrungen erstmals die dramatischen Veränderungen des atmosphärischen CO₂-Gehaltes am Übergang vom Glazial zum Interglazial. Diese natürlichen Veränderungen gehören neben dem vom Menschen verursachten Anstieg des CO₂-Gehaltes in der Atmosphäre in der Gegenwart zu den herausragenden Themen der Erforschung des Kohlenstoffzyklus. Seit den 1980er Jahren wurde eine große Anzahl wissenschaftlicher Resultate und Modelle publiziert, die die Rolle des Kohlenstoffaustausches zwischen dem größten Reservoir auf der Erde, dem globalen Ozean, und dem in der Atmosphäre und auf dem Land aufdecken. Diese Studien verlangen Überblick und breite Synthese.

Der Band liefert die Basis, um Grenzen in den Modellen der Schlüsselprozesse des Kohlenstoffkreislaufs auszuloten, die den Austausch zwischen den vier Hauptkohlenstoffquellen auf der Erdoberfläche, dem Ozean, der Atmosphäre, der terrestrischen Biosphäre und den Böden, kontrollieren. Der vorliegende Band enthält fast 70 erweiterte Zusammenfassungen auf dem neuesten Wissensstand in den entsprechenden Gebieten der CO₂-Forschung. Die Beiträge untersuchen empirische und modell-basierte Forschungsergebnisse sowohl über sich verändernde Kohlenstoffvorräte der Vergangenheit als auch Formen, Lokalisierungen und Raten des Kohlenstofftransfers.

Phänotypisierung der Krankheitsempfänglichkeit in natürlich infizierten Nutztierpopulationen

Gesine LÜHKEN (Gießen)

Zusammenfassung

Infektionserkrankungen beim Nutztier verursachen hohe ökonomische Verluste und beeinträchtigen das Tierwohl. Einzelne Erreger verursachen außerdem Zoonosen. Für eine Reihe von Infektionserkrankungen sind weder prophylaktische Maßnahmen noch kausale Therapien verfügbar oder zugelassen. Bei anderen entwickeln die Erreger gegen die eingesetzten Präparate Resistenzen, die möglicherweise sogar die Bekämpfung humaner Infektionserreger beeinträchtigen können. Eine Sanierung von Beständen durch Merzung infizierter Tiere bedeutet ökonomische Verluste, stößt an ethische Grenzen und ist nicht nachhaltig, da sanierte Bestände wieder neu infiziert werden können. Die züchterische Selektion auf eine geringere Empfänglichkeit ist eine alternative Strategie zur Bekämpfung von Infektionserkrankungen beim Nutztier. Dies ist allerdings nur möglich, wenn die Empfänglichkeit für die betreffende Infektionskrankheit durch genetische Faktoren beeinflusst wird. In den seltensten Fällen wird die Empfänglichkeit für eine Infektionskrankheit monogen vererbt. Im Zusammenspiel meist vieler Genvarianten und zudem von Umweltfaktoren werden in der Regel niedrige bis mittlere Heritabilitäten für die Infektionsempfänglichkeit beobachtet. Durch die vollständige Sequenzierung der Genome der wichtigsten Nutztierspezies sowie die Verfügbarkeit von hochdichten Genotypisierungschips stellt die Nutzung von genetischen Daten zur Selektion heute nicht mehr das Hauptproblem dar. Eine große Herausforderung ist hingegen immer noch die sichere Phänotypisierung der Empfänglichkeit. Vor- und Nachteile der Phänotypisierung von Tieren aus Praxisbeständen gegenüber Versuchsherden sowie der Nutzung natürlicher gegenüber experimenteller Infektion werden diskutiert. Am Beispiel von Scrapie und Maedi-Visna beim Schaf wird die Bedeutung der Erregerdifferenzierung deutlich gemacht. Möglichkeiten, aber auch Schwierigkeiten bei der Untersuchung bzw. dem Nachweis physikalischer Infektionsbarrieren, der Antikörperbildung, des Erregers und von Krankheitssymptomen als bedeutende Phänotypen für die Empfänglichkeit von Infektionskrankheiten werden beispielhaft erläutert.

Abstract

Infectious diseases in farm animals cause high economical losses and restrain animal welfare. Some pathogens also have zoonotic potential. There are neither prophylactic measures nor causal therapies available or allowed for a series of infectious diseases. In others, pathogens are developing drug resistances, which even may impair the fight against human pathogens. Disease eradication by testing and culling is neither cost-effective nor sustainable, as disease-free herds are still susceptible to infection. Breeding for a lower susceptibility is an alternative strategy to tackle infectious diseases in farm animals. This will only be possible if susceptibility to an infectious disease is influenced by genetic factors. Only in rare cases, susceptibility is inherited as a monogenic trait. In contrast, heritabilities in low to medium range are observed due to interplay of many genetic variants and additional environmental effects. After complete genome sequences of all important farm animal species and high-density genotyping arrays were made available, the usage of molecular genetic data for selection purposes is not the main problem anymore. Instead, the exact phenotyping of disease susceptibility is still a major challenge. Advantages and disadvantages of phenotyping animals from field flocks *versus* experimental flocks as well as of the usage of natural infections *versus* experimental infections are discussed. Scrapie and maedi-visna in sheep are given as examples for the importance of pathogen differentiation. Options and limitations of the analysis or determination of physical barriers of infection, antibody production, pathogen presence and quantity, and disease symptoms as important phenotypes of susceptibility to infectious diseases are illustrated with examples.

1. Hintergrund

Infektionserkrankungen beim Nutztier verursachen hohe ökonomische Verluste, können den Verbraucher und die Umwelt gefährden und beeinträchtigen das Tierwohl und damit auch die öffentliche Akzeptanz der tierischen Produktion.

Erreger einiger Infektionserkrankungen der Nutztiere können Zoonosen verursachen (Tab. 1). Die Infektion mit den zoonotischen *Campylobacter*-Spezies ist derzeit die häufigste bakterielle Darmerkrankung beim Menschen in Deutschland mit rund 64000 gemeldeten Fällen im Jahr 2013, gefolgt von der Salmonellose mit knapp 19000 gemeldeten Fällen im selben Jahr (*Bundesinstitut für Risikobewertung* 2013).

Tab. 1 Beispiele für Infektionserkrankungen beim Nutztier mit Informationen zum zoonotischen Potenzial, zur Bedeutung für die Ökonomie der Tierproduktion und für das Wohl erkrankter Tiere, zur Möglichkeit der kausalen Therapie oder Impfung und zur Variabilität der genetischen Empfänglichkeit

Infektions- erkrankung	Nutztier- spezies	Zoonose	Bedeutung für Ökonomie der Tierproduktion	Bedeutung für das Wohl erkrankter Tiere	Kausale Therapie oder Impfung	Variabilität der genetischen Empfänglichkeit
Hämonchose	vor allem Schaf, Ziege	nein	hoch	gering bis mittel, Einzelfälle hoch	möglich, je- doch Resistenz- entwicklung des Erregers	ja
Klassische Scrapie	Schaf, Ziege	nein (aber: BSE)	abhängig von Prävalenz und tierseuchen- rechtlichen Maßnahmen	hoch	keine	ja
Maedi-Visna	Schaf	nein	mittel bis hoch	mittel bis hoch	keine	ja
Maul- und Klauenseuche (MKS)	Klauentiere	(selten milde Symptome)	sehr hoch	hoch	nicht zugelassen in MKS-freien Ländern	nein
Moderhinke	Schaf und andere kleine Wiederkäuer	nein	hoch	hoch	möglich, nicht immer (dauer- haft) erfolgreich	ja
Ödemkrank- heit	Schwein	nein	hoch	hoch	Impfung möglich	ja
Paratuber- kulose	vor allem Rind, Schaf	ja (wird vermutet)	hoch	hoch	Impfung nicht zugelassen	ja
Salmonellose	alle	ja	hoch	gering bis mittel	Impfung möglich	abhängig von Spezies (Geflügel ja, Rind nein)

Konventionelle Strategien zur Bekämpfung von Infektionserkrankungen beim Nutztier beinhalten den gezielten Einsatz von entsprechenden Präparaten bei erkrankten Individuen (z. B. Antibiotika bei bakteriellen Infektionen, Anthelmintika bei Wurmbefall), häufig in Kombination mit der vorsorglichen Behandlung auch nicht erkrankter Tiere. Eventuell werden erkrankte oder sogar nicht erkrankte, aber infizierte Tiere aus dem Bestand entfernt (Merzung). Prophylaktisch kann gegen bestimmte Infektionserkrankungen geimpft werden. Zudem empfiehlt sich für Neuzugänge eine Quarantäne, für bestimmte Pathogene eventuell sogar die Überprüfung des Infektionsstatus neu einzugliedernder Tiere, beispielsweise durch Bestimmung des spezifischen Antikörpertiters.

Infektionserkrankungen bei Nutztieren sowie die durchgeführten Bekämpfungsmaßnahmen können hohe ökonomische Verluste verursachen, z. B. durch Leistungsminderung infizierter Tiere, verringerte Qualität der tierischen Produkte oder sogar Tierverluste (auch durch Merzung), Kosten für Medikamente, Impfstoffe und tierärztliche Tätigkeiten und durch gesteigerten Arbeitsaufwand des Tierhalters. Diese Kosten können vor allem bei Infektionserkrankungen, die üblicherweise nicht nur einzelne Tiere betreffen, sehr hoch sein. Die potenziell alle Schafe auf der Weide infizierenden gastrointestinalen Parasiten verursachen in Großbritannien jährlich Kosten in einer Größenordnung von etwa 84 Millionen Britischen Pfund (GBP) und haben damit die größte ökonomische Bedeutung unter den Schafkrankheiten. Der britischen Schafproduktion entstehen jährlich aber auch hohe Kosten beispielsweise durch Infektionen mit dem Moderhinke-Erreger (ca. 24 Millionen GBP), den Zoonose-Erregern *Chlamydia psittaci* (ca. 20 Millionen GBP) und *Toxoplasma gondii* (ca. 12 Millionen GBP) sowie durch die Räude milbe *Psoroptes ovis* (ca. 8 Millionen GBP) (NIEUWHOF und BISHOP 2005, DAVIES et al. 2009). Die ökonomische Bedeutung für einige weitere Infektionserkrankungen beim Nutztier ist in Tabelle 1 angegeben.

Zum anderen sind für eine Reihe von Infektionserkrankungen weder kausale Therapien noch Impfstoffe verfügbar; dies gilt beispielsweise für die Infektion von Schafen mit dem Maedi-Visna-Virus (REINA et al. 2009). Dagegen werden im Fall der Maul-und-Klauenseuche (MKS) prinzipiell verfügbare Impfstoffe bei spontanen Ausbrüchen in eigentlich MKS-freien Ländern nicht eingesetzt, um den MKS-freien Status nicht zu verlieren. Gastrointestinale Nematoden haben mittlerweile gegen alle bedeutenden Anthelminthikagruppen und innerhalb weniger Jahre nach dessen Markteinführung sogar gegen das neue Monepantel Resistenzen entwickelt (WOLSTENHOLME et al. 2004, SCOTT et al. 2013). Antibiotische Behandlungen und Resistenzbildungen bei bakteriellen Infektionen der Nutztiere werden zudem als Auslöser von Antibiotikaresistenzen im humanmedizinischen Bereich diskutiert (ECONOMOU und GOUSIA 2015).

Auf diagnostischen Tests und Merzung infizierter Tiere basierende Bekämpfungsprogramme können zwar durchaus erfolgreich sein, wie beispielsweise bei der Maedi-Visna-Infektion der Schafe (PETERHANS et al. 2004), sind aber bei diesem Beispiel weder kosteneffektiv durchführbar (HOUWERS 1990) noch nachhaltig, da virusfreie Herden bei Kontakt mit infizierten Schafen oder auch Ziegen neu infiziert werden können (GJERSET et al. 2009).

Das Tierwohl ist durch eine Infektionserkrankung in der Regel spätestens bei Vorhandensein klinischer Symptome beeinträchtigt. Dies kann aber auch bereits bei subklinischen Infektionen der Fall sein, wenn beispielsweise durch eine verringerte Milchleistung beim subklinisch infizierten Muttertier die Versorgung des säugenden Jungtieres mit Nährstoffen und eventuell auch mit kolostralen Antikörpern beeinträchtigt ist. Das Keulen von teilweise hohen Zahlen tatsächlich oder potenziell infizierter, aber nicht erkrankter Tiere zur Verhinde-

rung der weiteren Ausbreitung von Infektionen (z. B. bei MKS-Ausbrüchen) bzw. zur Sanierung betroffener Betriebe birgt ethische Probleme. Indirekt ergeben sich negative Auswirkungen von Infektionserkrankungen auf das Tierwohl auch durch einen Trend zu Halteungsverfahren, die Infektionen zumindest theoretisch weniger begünstigen als tiergerechtere Verfahren, beispielsweise durch Wechsel zu einer einstreulosen Halteform.

Probleme hinsichtlich des Umwelt- und Ressourcenschutzes entstehen durch Infektionserkrankungen beim Nutztier aufgrund von Rückständen oder auch einer möglichen Freisetzung der zur Behandlung oder Prophylaxe eingesetzten Präparate. Beispielsweise kann das zur Behandlung von Klaueninfektionen bei Wiederkäuern in Klauenbädern eingesetzte giftige Kupfersulfat in den Erdboden gelangen und außerdem das Pflanzenwachstum beeinträchtigen (SMITH et al. 2014).

Die genannten konventionellen Bekämpfungsstrategien gegen Infektionserkrankungen bei Nutztieren stoßen an vielfältige Grenzen. Ein anderer Ansatz ist die züchterische Selektion auf Tiere mit einer geringeren Empfänglichkeit für ein bestimmtes Pathogen oder eine Gruppe von Pathogenen (DAVIES et al. 2009). Dies ist prinzipiell für jede Infektionserkrankung möglich, für die eine genetische Variabilität der Resistenz bzw. der Empfänglichkeit in der Wirtspopulation beobachtet wird.

Je größer der Einfluss der Genetik und je geringer der Einfluss von Umweltfaktoren auf die Empfänglichkeit ist, desto größer ist der zu erwartende Erfolg einer solchen Strategie. Allerdings gibt es nur wenige Infektionserkrankungen, bei denen einzelne Genorte einen sehr großen Einfluss auf die Empfänglichkeit zu haben scheinen, wie beispielsweise das Prionprotein (*PRNP*)-Gen bei der klassischen Form der ovinen Scrapie (LÜHKEN et al. 2007). Eine tatsächlich monogene Vererbung der Infektionsresistenz ist eine seltene Ausnahme, wurde jedoch für die Ödemkrankheit beim Schwein in autosomal-rezessiver Form zunächst durch Zuchtexperimente nachgewiesen (BERTSCHINGER et al. 1993). Eine Mutation im *FUT1*-Gen führt dazu, dass bei homozygoten Trägern der Mutation keine *E. coli*-F18-Rezeptoren im Dünndarmepithel exprimiert werden, so dass der Erreger der Ödemkrankheit nicht haften kann (MEIJERINK et al. 2000).

Üblicherweise handelt es sich bei der Empfänglichkeit gegenüber Infektionskrankheiten jedoch um ein komplexes Merkmal, das neben Umwelteffekten durch viele im gesamten Genom verteilte Genvarianten mit jeweils geringen Effekten beeinflusst wird (BISHOP 2015). Deren Anteil an der Merkmalsausprägung wird durch die Heritabilität ausgedrückt, für die Werte zwischen 0 (kein genetischer Einfluss, nur Umwelteinfluss) bis 1 (nur genetischer Einfluss, kein Umwelteinfluss) geschätzt werden können. Die Empfänglichkeit von Schafen für die Infektion durch den gastrointestinalen Nematoden *Haemonchus contortus* (Hämonchose) wird phänotypisch unter anderem durch die Anzahl von Wurmeiern im Kot (*Faecal egg count*, FEC) ermittelt. Der FEC nach einer ersten Infektion (FEC1) wird nach aktuellem Kenntnisstand durch mindestens 21 Genorte kontrolliert, die auf 14 verschiedenen Chromosomen liegen.¹ Die Heritabilität für dieses Merkmal liegt im niedrigen bis mittleren Bereich (HUNT et al. 2013).

Die Schätzung der Heritabilität für die Empfänglichkeit für eine Infektionskrankheit erlaubt schließlich auch die Schätzung von Zuchtwerten für einzelne Tiere und damit eine Vorhersage über die Empfänglichkeit der Nachkommen und eine entsprechende Selektion. Hierzu werden aber nicht nur Phänotypen der Empfänglichkeit der Zuchttiere benötigt, sondern auch deren

¹ www.animalgenome.org, Zugriff am 13. 3. 2015.

Verwandschaftsverhältnisse, bestenfalls über mehrere Generationen. Phänotypen für die Krankheitsempfänglichkeit werden allerdings in Zuchtherden mit kontrollierter Verpaarung selten erhoben, zumal auch der entsprechende Infektionserreger darin vorkommen muss.

Die Verfügbarkeit von Genomsequenzdaten und molekulargenetischen Hochdurchsatz-techniken (z. B. hochdichte *Single Nucleotide Polymorphisms* [SNP]-Chips mit üblicherweise mindestens 50000 SNPs) für mittlerweile alle bedeutenden Nutztierspezies ermöglicht die Identifizierung kausaler Genvarianten oder wenigstens gekoppelter Marker über genomweite Assoziationsanalysen. Es ist von großem Vorteil, dass sich für solche Assoziationsanalysen auch Phänotypisierungsdaten von betroffenen (*cases*) und nicht betroffenen (*controls*) Tieren aus von einer Infektionskrankheit betroffenen Herden *ohne* bekannte Abstammung eignen (BISHOP 2015). Identifizierte direkte oder indirekte genetische Marker erlauben schließlich die Selektion auf geringere Krankheitsempfänglichkeit in Kombination mit oder sogar ohne eine vorhergehende Phänotypisierung der Zuchttiere.

2. Phänotypisierung der Empfänglichkeit von Nutztieren gegenüber Infektionskrankheiten

2.1 Praxisherden versus Versuchsherden, natürliche versus experimentelle Infektion

Die Möglichkeiten und Einschränkungen zur Sammlung von Proben aus natürlich infizierten Praxisbeständen (Zucht- oder Gebrauchsherden) oder aber aus Versuchsherden unterscheiden sich in wichtigen Punkten, einen Vergleich hierzu bietet Tabelle 2. Experimentelle Infektionen können nur in Versuchsherden erfolgen, während in Praxisherden nur natürlich infizierte Tiere zur Verfügung stehen. Experimentelle Infektionen sind in der Regel aufwändiger und mit höheren Kosten verbunden. Zur Phänotypisierung der Empfänglichkeit durch experimentelle Infektion mit *Haemonchus contortus* müssen die infektiösen Larven beispielsweise aus Kot isoliert, kultiviert, quantifiziert und oral eingegeben werden (GAULY et al. 2002). Dafür können der Infektionszeitpunkt, die Infektionsdosis, das Erregerspektrum und der Infektionsweg kontrolliert werden. Dies ist bei natürlichen Infektionen mit gastrointestinalen Nematoden nicht möglich. Allerdings scheinen Ergebnisse, die aus Studien mit natürlichen Infektionen stammen, mindestens genauso gut oder sogar besser geeignet zu sein, um die genetische Variation der Empfänglichkeit zu charakterisieren, da beispielsweise bei der natürlichen Infektion das Futteraufnahmeverhalten auf der Weide ebenfalls eine Rolle spielt (GAULY et al. 2002, MILLER et al. 2006).

Bei natürlichen Infektionen muss mit einem Erregerspektrum anstelle der Infektion mit nur einem Erreger gerechnet werden. Dies erhöht zum einen den Aufwand bei der Phänotypisierung. Zum anderen ist es möglich, dass nicht alle vorhandenen Spezies, Stämme oder Genotypen einer Erregergruppe identifiziert werden können. Bei der üblichen Methode zur Bestimmung des FEC durch mikroskopische Auszählung der Wurmeier in einer Kotprobe (BAIRDEN 1991) beispielsweise können nicht alle Nematodenspezies voneinander differenziert werden.

Tab. 2 Möglichkeiten und Einschränkungen der Sammlung von Proben zur Phänotypisierung der Empfänglichkeit für Infektionskrankheiten an Nutztieren aus Praxisbeständen und aus Versuchsherden

Kriterium	Situation in Praxisbeständen	Situation in Versuchsherden
Infektion	natürlich, eventuell keine/geringe Variabilität (keine bis wenige Tiere oder [fast] alle Tiere infiziert)	natürlich oder experimentell, kann besser kontrolliert werden
Kosten	in der Regel gering	hoch
Möglichkeiten der Phänotypisierung (Häufigkeit, Aufwändigkeit der Methoden usw.)	gering	in der Regel hoch
Tierversuchsantrag oder -anzeige	in der Regel nicht notwendig/möglich (eventuell Anzeige)	in der Regel notwendig
Umwelteinflüsse	keine Kontrolle, unterschiedlich bei verschiedenen Betrieben	bessere Kontrolle
Verfügbare Anzahl an Tieren	kann sehr hoch sein	begrenzt
Vergleichbarkeit der Tiere (Rasse, Alter, Infektionsrisiko usw.)	niedrig bis hoch	in der Regel sehr hoch
Verwandschaftsverhältnisse der Tiere	Informationen bei Zuchtherden vorhanden, bei Gebrauchsherden in der Regel nicht	in der Regel Informationen vorhanden, eventuell geplante Anpaarungen möglich

2.2 Bedeutung der Erregerdifferenzierung

Eine unzureichende Differenzierung des Erregers kann dazu führen, dass Assoziationen zwischen Genvarianten und der Krankheitsempfänglichkeit falsch interpretiert werden. Bei der Scrapie (Traberkrankheit) der Schafe wurde in der Europäischen Union und auch in anderen Ländern bereits auf den Resistenz-vermittelnden *PRNP*-Genotypen ARR/ARR selektiert, bevor man feststellte, dass es neben dem schon länger identifizierten („klassischen“) Priortyp auch eine atypische Variante gibt (BENESTAD et al. 2003, BUSCHMANN et al. 2004). Die zuvor festgestellten Assoziationen von *PRNP*-Genotypen mit Resistenz bzw. Empfänglichkeit gegenüber Scrapie bestehen bei Infektionen mit atypischer Scrapie nicht in gleicher Weise und erklärten so im Nachhinein die Identifizierung der nun als atypisch Scrapie-positiv erkannten Schafe mit dem eigentlich als resistent geltenden Genotyp ARR/ARR. Durch Selektion auf diesen Genotyp lässt sich also nur die klassische Form, nicht jedoch die atypische Form der Scrapie bekämpfen (LÜHKEN et al. 2007).

Schon lange ist bekannt, dass Schafrassen unterschiedlich stark empfänglich für die Maedi-Visna-Erkrankung sind (HOUWERS et al. 1989, STRAUB 2004). In nordamerikanischen Schafherden wurden signifikante Assoziationen von Varianten des *TMEM154*-Gens mit verschiedenen Phänotypen (u. a. Antikörpertiter im Blut und Provirus-Gehalt der DNA aus verschiedenen Geweben) für den Infektionsstatus von Schafen mit dem Maedi-Visna-Virus beobachtet (HEATON

et al. 2012). Ein Zusammenhang zwischen *TMEM154*-Genotypen und der Empfänglichkeit für Maedi-Visna konnte auch beim Vergleich der als sehr empfänglich geltenden Schafrassen Ostfriesisches Milchschaaf, Texel- und Kamerunschaaf mit den eher als unempfindlich geltenden Rassen Merinolandschaaf, Graue Gehörnte Heidschnucke und Suffolk festgestellt werden (LÜHKEN et al. 2014). In deutschen Schafherden serologisch positiv auf Maedi-Visna getestete Schafe wiesen signifikant häufiger das anscheinend Empfänglichkeit vermittelnde *TMEM154*-Allel auf als serologisch negative Schafe aus denselben Herden (ELTANANY et al. 2014). Es bleibt jedoch abzuwarten, ob dies züchterisch nutzbar ist, da kürzlich in den USA gezeigt wurde, dass der protektive Effekt von *TMEM154*-Allelen davon abhängen kann, welche Genotypen (Stämme) des Maedi-Visna-Virus in einer betroffenen Schafherde oder Population vorkommen (SIDER et al. 2013). Das Vorkommen und die Verbreitung von Maedi-Visna-Virus-Genotypen wurden in vielen Ländern noch nicht untersucht. Bei einer ersten molekulargenetischen Charakterisierung des viralen gag-pol-Genbereichs (GIAMMARIOLI et al. 2011) in Proben aus nord- und süddeutschen Schafherden zeigte sich eine eher geringere genetische Heterogenität der identifizierten Virusgenotypen im Vergleich zu anderen Ländern (BAZZUCCHI et al. 2015).

2.3 Phänotypen der Krankheitsempfänglichkeit

Die Empfänglichkeit für eine Infektionskrankheit ist phänotypisierbar über die individuelle qualitative und quantitative Ausprägung von Infektionsbarrieren sowie Anzeichen des Infektionsverlaufs. Bei letzteren kann die Anwesenheit und Menge des Erregers sowie klinischer Symptome erfasst werden.

Infektionsbarrieren bilden (a.) physikalische Barrieren (z. B. Haut, Schleim, Magensäure, Flimmerepithel, Magen-Darm-Flora, abwesende oder defekte Rezeptoren für Erreger, (b.) das unspezifische (angeborene) Immunsystem (z. B. Entzündungsmediatoren, Lysozym, Defensine, Komplementfaktoren, natürliche Killerzellen) und (c.) das spezifische (erworbene) Immunsystem (vor allem spezifische Antikörper und aktivierte T-Zellen). Am besten sind Phänotypen geeignet, die eng mit der genetischen Empfänglichkeit gegenüber Infektionserkrankungen korrelieren und bereits am Jungtier (vor Zuchtauswahl) sowie einfach und günstig zu erfassen sind.

2.3.1 Physikalische Barrieren

Physikalische Barrieren sind Phänotypen, die eine Aussage zur Empfänglichkeit zulassen, ohne dass die zu charakterisierenden Tiere einer Infektion ausgesetzt werden müssen. Allerdings ist die Phänotypisierung physikalischer Barrieren in der Regel eher aufwändig.

Die Empfänglichkeit für enterotoxische *E. coli*-Infektionen (Ödemkrankheit) lässt sich phänotypisch beim Schwein feststellen, indem mikroskopisch untersucht wird, ob *E. coli*-Bakterien mit F18-Fimbrien sich an den Bürstensaum von präparierten Schweine-Enterozyten (Bioplate oder nach Tötung entnommen) anlagern können und somit die F18-Rezeptoren bei dem jeweiligen Tier vorhanden sind oder nicht (FRANCIS 2002).

Als physikalische Barriere gegen die bakterielle Klauenerkrankung Moderhinke kann das Klauenhorn angesehen werden. Unter anderem können der Röhrchendurchmesser und die Zahl der Hornröhrchen pro Flächeneinheit (Hornröhrchendichte) als Maß für die Belastbarkeit und Widerstandsfähigkeit des Horns betrachtet werden (GÜNTHER et al. 1983) und daher als möglicher Phänotyp für die Moderhinke-Empfänglichkeit, der unabhängig von einer Infektion zu bestimmen ist. Die histologische Untersuchung beider Parameter ergab signifikante Un-

terschiede zwischen klinisch Moderhinke-positiven und -negativen Merinolandschaften und Merinolandschaftkreuzungen, die allerdings teilweise auch von der Schafrasse abhängig und dabei sogar gegenläufig assoziiert waren, so dass eine mögliche züchterische Nutzung dieser sehr aufwändigen Phänotypisierungsmethode bisher fraglich ist (SCHIEFEN et al. 2011).

2.3.2 Antikörperbildung

Bei der serologischen Bestimmung des spezifischen Antikörpertiters handelt es sich um eine der einfachsten und günstigsten Phänotypisierungsmethoden, wobei zwar eine bereits stattgefunden Infektion, nicht aber eine klinische Erkrankung nachgewiesen wird. Wichtige Vor- und Nachteile dieses Phänotyps sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tab. 3 Vor- und Nachteile der Verwendung spezifischer Antikörpertiter als Phänotyp für die Empfänglichkeit von Nutztieren gegenüber Infektionserkrankungen

Vorteile	Nachteile
– relativ einfache Probennahme, z. B. bei Milchproben auch nicht-invasiv und automatisch	– bei Infektion mit manchen Erregern keine humorale Immunantwort
– nach Etablierung eines serologischen Tests einfach und schnell durchzuführen	– Antikörperbildung kann sehr spät erfolgen oder früh wieder absinken (Zeitpunkt der Probennahme?)
– teilweise kommerzielle Tests verfügbar	– möglicher Einfluss anderer Infektionen, maternalen Antikörper und Impfungen
– eventuell Verfügbarkeit von Antikörpertitern aus amtlichem Monitoring, Sanierungsprogrammen	– Sensitivität und Spezifität können geringer sein als bei anderen Phänotypen
– eventuell Phänotypisierung auch ohne vorherige Infektion (Impftiter)	– nicht in allen Fällen geklärt, in welcher Richtung Antikörperbildung und Krankheitsempfänglichkeit korrelieren

Der Goldstandard zum Nachweis der Infektion von Rindern mit dem Paratuberkulose-Erreger *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) ist die monatelang dauernde Kotkultur mit einer Sensitivität von ca. 35 % im Vergleich zu 15 % bei der serologischen Bestimmung des Antikörpertiters durch *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (PURDIE et al. 2011). Zudem können die Ergebnisse verschiedener kommerziell verfügbarer ELISA-Tests voneinander abweichen (KÜPPER 2014). Die Verwendung unterschiedlicher und möglicherweise auch unzureichend sensitiver ELISA-Tests zur Phänotypisierung der Paratuberkulose-Empfänglichkeit in verschiedenen Studien könnte erklären, warum diese häufig bezüglich der identifizierten assoziierten Genorte für Paratuberkulose-Empfänglichkeit nicht übereinstimmen (KÜPPER et al. 2014).

2.3.3 Nachweis und Quantifizierung des Erregers

Die bereits erwähnte genetische Variabilität des Maedi-Visna-Erregers hat möglicherweise auch Einfluss auf die Sensitivität oder Spezifität der eingesetzten serologischen Tests zur Bestimmung des Antikörpertiters. Zudem kann aufgrund der Pathogenese dieser Infektionserkrankung erwartet werden, dass Provirus-DNA bereits vor einem Antikörperanstieg nachzuweisen ist, auch wenn dies in der Praxis nicht immer der Fall zu sein scheint (HERR-

MANN-HOESING et al. 2007, HERRMANN-HOESING 2010). Außerdem korrelierte der Gehalt an Provirus-DNA in peripheren mononukleären Blutzellen signifikant mit der Stärke der Läsionen in verschiedenen Geweben, während dies für den serologischen Antikörpertiter nicht der Fall war (HERRMANN-HOESING et al. 2009). Daher ist der molekulare Nachweis des Maedi-Visna-Provirus, bestenfalls mit einer quantitativen Methode, zwar aktuell kein Ersatz für die Bestimmung des Antikörpertiters, aber doch ein wichtiger zusätzlicher Phänotyp zur Charakterisierung der Maedi-Visna-Empfänglichkeit einzelner Individuen.

Als Beispiel für die Quantifizierung des Erregers als die am häufigsten verwendete Methode zur Phänotypisierung der Krankheitsempfänglichkeit – sowohl in einigen Ländern im Rahmen der klassischen Zuchtwertschätzung als auch zur Identifizierung von genetischen Markern (MATIKA et al. 2011, HUNT et al. 2013) – sei an dieser Stelle nochmals die bereits erwähnte Bestimmung des *faecal egg count* (FEC) im Rahmen der Selektion von Schafen auf geringere Empfänglichkeit gegenüber gastrointestinalen Nematoden genannt.

2.3.4 Krankheitssymptome

Krankheitssymptome sind in der Regel einfach zu erfassen, allerdings kann die Quantifizierung und Differenzierung zu anderen Krankheitsursachen schwierig sein. Aufgrund der Aufwändigkeit der Bestimmung des FEC bei der Infektion mit gastrointestinalen Parasiten wird die Empfänglichkeit teilweise auch über mehr oder weniger gut mit dem FEC korrelierende Krankheitssymptome phänotypisiert. Mit dem *dag score* wird der Grad der Kotverschmutzung in der Perianalregion von Schafen klassifiziert, um die durch einige Nematodenspezies verursachte Diarrhoe zu quantifizieren. Dieser Phänotyp scheint mit dem Einfluss der Wirtsgenetik auf die Produktion an Wurmeiern allerdings wenig zu tun zu haben (POLLOTT et al. 2004), lässt sich zudem nur grob quantifizieren und kann ohne weitere Untersuchungen nicht von anderen Diarrhoeursachen differenziert werden.

Zur Quantifizierung der Empfänglichkeit von kleinen Wiederkäuern gegenüber dem im Labmagen blutsaugenden *Haemonchus contortus* wird relativ häufig das Ausmaß des Blutverlustes (Anämiegrad) über verschiedene Parameter bestimmt. Während die Bestimmung des Verhältnisses der Blutzellen zum Plasma (Hämatokrit) immerhin noch die Entnahme von Blut und die Verwendung einer Zentrifuge erfordert, wird bei dem *FAMACHA score* direkt die Blässe der Sklera und der Augenschleimhaut des Tieres anhand einer Farbkarte beurteilt (BURKE und MILLER 2008). Eine Differenzierung scheint jedoch zumindest bei schwächer ausgeprägter Anämie ohne die Hilfe eines Farbanalysegerätes schwierig. Zudem wurden Rassenunterschiede bezüglich der Farbe der Augenschleimhaut gefunden (MOORS und GAULY 2009).

Eine detaillierte Übersicht zur Eignung weiterer Phänotypen der Empfänglichkeit für gastrointestinale Parasiten bei Schafen und Ziegen sowie ihre Vor- und Nachteile findet sich bei SADDIQI et al. (2012) und HUNT et al. (2013).

Literatur

- BAIRDEN, K.: Ruminant parasitic gastritis: some observations on epidemiology and control. Diss., University of Glasgow 1991
- BAZZUCCHI, M., LÜHKEN, G., CASCIARI, C., PIERINI, I., GIAMMARIOLI, M., and MIA, G. M. DE: Molecular characterization and phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses (SRLV) circulating in Germany. Xth International Congress ESVV 2015, Montpellier, 30th August–3rd September 2015

- BENESTAD, S. L., SARRADIN, P., THU, B., SCHONHEIT, J., TRANULIS, M. A., and BRATBERG, B.: Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet. Rec.* **153**, 202–208 (2003)
- BERTSCHINGER, H. U., STAMM, M., and VÖGEL, P.: Inheritance of resistance to oedema disease in the pig: experiments with an *Escherichia coli* strain expressing fimbriae 107. *Vet. Microbiol.* **35**, 79–89 (1993)
- BISHOP, S. C.: Genetic resistance to infections in sheep. *Vet. Microbiol.* **181**, 2–7 (2015)
- Bundesinstitut für Risikobewertung: Erreger von Zoonosen in Deutschland im Jahr 2013. *BfR Wissenschaft* **02/2015** (2013)
- BURKE, J. M., and MILLER, J. E.: Use of FAMACHA system to evaluate gastrointestinal nematode resistance/resilience in offspring of stud rams. *Vet. Parasitol.* **153**, 85–92 (2008)
- BUSCHMANN, A., BIACABE, A. G., ZIEGLER, U., BENCSIK, A., MADEC, J. Y., ERHARDT, G., LÜHKEN, G., BARON, T., and GROSCHUP, M. H.: Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *J. Virol. Methods* **117**, 27–36 (2004)
- DAVIES, G., GENINI, S., BISHOP, S. C., and GIUFFRÀ, E.: An assessment of opportunities to dissect host genetic variation in resistance to infectious diseases in livestock. *Animal* **3**, 415–436 (2009)
- ECONOMOU, V., and GOUSIA, P.: Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infect. Drug Resist.* **8**, 49–61 (2015)
- ELTANANY, M., HÜBNER, S., and LÜHKEN, G.: Analysis of association between sequence variants in regions of candidate genes TMEM154, CCR5 and ZNF389 with maedi-visna susceptibility in sheep. *Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde e. V. und der Gesellschaft für Tierzuchtwissenschaften e. V.*, Dummerstorf, 17.–18. September 2014
- FRANCIS, D. H.: Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. *J. Swine Health Prod.* **10**, 171–175 (2002)
- GAULY, M., KRAUS, M., VERVELDE, L., VAN LEEUWEN, M. A., and ERHARDT, G.: Estimating genetic differences in natural resistance in Rhon and Merinoland sheep following experimental *Haemonchus contortus* infection. *Vet. Parasitol.* **106**, 55–67 (2002)
- GIAMMARIOLI, M., BAZZUCCHI, M., PUGGIONI, G., BRAJON, G., DEI GIUDICI, S., TACCORI, F., FELIZIANI, F., and MIA, G. M. DE: Phylogenetic analysis of small ruminant lentivirus (SRLV) in Italian flocks reveals the existence of novel genetic subtypes. *Virus Genes* **43**, 380–384 (2011)
- GJERSET, B., RIMSTAD, E., TEIGE, J., SOETAERT, K., and JONASSEN, C. M.: Impact of natural sheep-goat transmission on detection and control of small ruminant lentivirus group C infections. *Vet. Microbiol.* **135**, 231–238 (2009)
- GÜNTHER, M., ANTON, W., and KÄSTNER, R.: *Klauserkrankheiten*. Jena: VEB Gustav Fischer 1983
- HEATON, M. P., CLAWSON, M. L., CHITKO-MCKOWN, C. G., LEYMASTER, K. A., SMITH, T. P., HARHAY, G. P., WHITE, S. N., HERRMANN-HOESING, L. M., MOUSEL, M. R., LEWIS, G. S., KALBFLEISCH, T. S., KEEN, J. E., and LAEGREID, W. W.: Reduced lentivirus susceptibility in sheep with TMEM154 mutations. *PLOS Genet.* **8**, e1002467 (2012)
- HERRMANN-HOESING, L. M.: Diagnostic assays used to control small ruminant lentiviruses. *J. Vet. Diagn. Invest.* **22**, 843–855 (2010)
- HERRMANN-HOESING, L. M., NOH, S. M., WHITE, S. N., SNEKVIK, K. R., TRUSCOTT, T., and KNOWLES, D. P.: Peripheral ovine progressive pneumonia provirus levels correlate with and predict histological tissue lesion severity in naturally infected sheep. *Clin. Vaccine Immunol.* **16**, 551–557 (2009)
- HERRMANN-HOESING, L. M., WHITE, S. N., LEWIS, G. S., MOUSEL, M. R., and KNOWLES, D. P.: Development and validation of an ovine progressive pneumonia virus quantitative PCR. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**, 1274–1278 (2007)
- HOUWERS, D. J.: Economic importance, epidemiology and control. In: PETURSSON, G., und HOFF-JORGENSEN, R. (Eds.): *Maedi-Visna and Related Diseases*; pp. 83–117. Boston, MA: Kluwer Academic Press 1990
- HOUWERS, D. J., VISSCHER, A. H., and DEFIZE, P. R.: Importance of ewe/lamb relationship and breed in the epidemiology of maedi-visna virus infections. *Res. Vet. Sci.* **46**, 5–8 (1989)
- HUNT, P. W., KUJAS, J., and INGHAM, A.: Understanding parasitic infection in sheep to design more efficient animal selection strategies. *Vet. J.* **197**, 143–152 (2013)
- KÜPPER, J. D.: Genetic and phenotypic aspects of infection with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in German Holstein cows. *Diss.*, Universität Gießen 2014
- KÜPPER, J. D., BRANDT, H. R., and ERHARDT, G.: Genetic association between NOD2 polymorphism and infection status by *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in German Holstein cattle. *Anim. Genet.* **45**, 114–116 (2014)
- LÜHKEN, G., BUSCHMANN, A., BRANDT, H., EIDEN, M., GROSCHUP, M. H., and ERHARDT, G.: Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases. *Vet. Res.* **38**, 65–80 (2007)
- LÜHKEN, G., ELTANANY, M., and HÜBNER, S.: Frequencies of candidate gene variants for ovine lentivirus susceptibility in German sheep breeds. 34th International Society for Animal Genetics Conference, Xi'An, 28.07.–01.08.2014

- MATIKA, O., PONG-WONG, R., WOOLLIAMS, J. A., and BISHOP, S. C.: Confirmation of two quantitative trait loci regions for nematode resistance in commercial British terminal sire breeds. *Animal* 5, 1149–1156 (2011)
- MEIJERINK, E., NEUENSCHWANDER, S., FRIES, R., DINTER, A., BERTSCHINGER, H. U., STRANZINGER, G., and VÖGELI, P.: A DNA polymorphism influencing alpha(1,2)fucosyltransferase activity of the pig FUT1 enzyme determines susceptibility of small intestinal epithelium to *Escherichia coli* F18 adhesion. *Immunogenetics* 52, 129–136 (2000)
- MILLER, J. E., BISHOP, S. C., COCKETT, N. E., and MCGRAW, R. A.: Segregation of natural and experimental gastrointestinal nematode infection in F2 progeny of susceptible Suffolk and resistant Gulf Coast Native sheep and its usefulness in assessment of genetic variation. *Vet. Parasitol.* 140, 83–89 (2006)
- MOORS, E., and GAULY, M.: Is the FAMACHA chart suitable for every breed? Correlations between FAMACHA scores and different traits of mucosa colour in naturally parasite infected sheep breeds. *Vet. Parasitol.* 166, 108–111 (2009)
- NIEUWHOF, G. J., and BISHOP, S. C.: Costs of the major endemic diseases of sheep in Great Britain and the potential benefits of reduction in disease impact. *Anim. Sci.* 81, 23–29 (2005)
- PETERHANS, E., GREENLAND, T., BADIOLA, J., HARKISS, G., BERTONI, G., AMORENA, B., ELIASZEWICZ, M., JUSTE, R. A., KRASSNIG, R., LAFONT, J. P., LENIHAN, P., PETURSSON, G., PRITCHARD, G., THORLEY, J., VITU, C., MORNEX, J. F., and PEPIN, M.: Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet. Res.* 35, 257–274 (2004)
- POLLOTT, G. E., KARLSSON, L. J., EADY, S., and GREEFF, J. C.: Genetic parameters for indicators of host resistance to parasites from weaning to hogget age in Merino sheep. *J. Anim. Sci.* 82, 2852–2864 (2004)
- PURDIE, A. C., PLAIN, K. M., BEGG, D. J., SILVA, K. DE, and WHITTINGTON, R. J.: Candidate gene and genome-wide association studies of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and sheep: a review. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 197–208 (2011)
- REINA, R., BERRIATUA, E., LUJAN, L., JUSTE, R., SANCHEZ, A., ANDRES, D. DE, and AMORENA, B.: Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: an update. *Vet. J.* 182, 31–37 (2009)
- SADDIQI, H. A., SARWAR, M., IQBAL, Z., NISA, M., and SHAHZAD, M. A.: Markers/parameters for the evaluation of natural resistance status of small ruminants against gastrointestinal nematodes. *Animal* 6, 994–1004 (2012)
- SCHIEFEN, D., LÜHKEN, G., BRANDT, H., und ERHARDT, G.: Molekulargenetische und histologische Untersuchungen im Zusammenhang mit Moderhinke. Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde e. V. und der Gesellschaft für Tierzuchtwissenschaften e. V., Freising/Weihenstephan, 6.–7. 9. 2011
- SCOTT, I., POMROY, W. E., KENYON, P. R., SMITH, G., ADLINGTON, B., and MOSS, A.: Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Parasitol.* 198, 166–171 (2013)
- SIDER, L. H., HEATON, M. P., CHITKO-MCKOWN, C. G., HARHAY, G. P., SMITH, T. P., LEYMASTER, K. A., LAEGREID, W. W., and CLAWSON, M. L.: Small ruminant lentivirus genetic subgroups associate with sheep TMEM154 genotypes. *Vet. Res.* 44, 64 (2013)
- SMITH, A. C., WOOD, C. L., MCQUERRY, K. J., and BEWLEY, J. M.: Effect of a tea tree oil and organic acid footbath solution on digital dermatitis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97, 2498–2501 (2014)
- STRAUB, O. C.: Maedi-Visna virus infection in sheep. History and present knowledge. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 1–5 (2004)
- WOLSTENHOLME, A. J., FAIRWEATHER, I., PRICHARD, R., SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. VON, and SANGSTER, N. C.: Drug resistance in veterinary helminths. *Trends Parasitol.* 20, 469–476 (2004)

Prof. Dr. Gesine LÜHKEN
 Institut für Tierzucht und Haustiergenetik
 Justus-Liebig-Universität Gießen
 Ludwigstraße 21
 35390 Gießen
 Bundesrepublik Deutschland
 Tel.: +49 641 9937681
 E-Mail: Gesine.Luehken@agr.uni-giessen.de

Arthropod-borne Infectious Diseases and Arthropods as Disease Agents in Human and Animal Health

Internationales Symposium

1. – 3. Oktober 2015 in Berlin

Nova Acta Leopoldina N. F. Nr. 411

Herausgegeben von Thomas C. METTENLEITER (Greifswald/Insel Riems),
Stefanie BECKER (Hannover), Theodor HIEPE (Berlin), Richard LUCIUS (Berlin)
und Bianca M. BUSSMANN (Greifswald/Insel Riems)
(2016, 272 Seiten, 50 Abbildungen, 12 Tabellen, 25,95 Euro,
ISBN: 978-3-8047-3609-2)

Vor allem blutsaugende Arthropoden besitzen als Überträger – Vektoren – von Infektionskrankheiten des Menschen und der Tiere große medizinische und wirtschaftliche Bedeutung. Sie übertragen vor allem in tropischen und subtropischen Ländern bedeutsame Erkrankungen, wie Malaria, Chagas-Krankheit und Viehseuchen. Als Probleme des ärmeren Südens der Welt fanden sie in der Forschung der reichen Industrieländer lange nicht die erforderliche Aufmerksamkeit. Der wachsende Handel und zunehmende Reiseaktivitäten in einer sich globalisierenden Welt, aber auch der Klimawandel führen zu einer Ausbreitung der Überträger und Erreger solcher Infektionskrankheiten in bisher nicht betroffene Gebiete. Die Beiträge behandeln eine große Vielfalt von Arthropoden und die von ihnen übertragenen Krankheitserreger. Die Aufklärung der Übertragungswege und der Wechselwirkungen zwischen den (als Wirte oder Vektoren) beteiligten Organismen sowie den Erregern wird mit den Mitteln von Genomik, Transkriptomik, Proteomik und Metabolomik vorangetrieben. Obwohl der Wissensstand gerade in den letzten Jahren enorm angewachsen ist, sind noch viele wichtige Fragen offen. Sie sollen auch mit diesem Band in interdisziplinärer Zusammenarbeit von Experten der verschiedenen Fachgebiete benannt bzw. geklärt werden, um effektivere Bekämpfungsstrategien für durch Arthropoden übertragene Krankheiten entwickeln zu können und in einer sich in vielfachen Wandlungsprozessen befindlichen Welt kostengünstig verfügbar zu machen.

V. Abendvortrag

Was zeigt sich in der Erscheinung? Eine philosophische Annäherung an das Verhältnis von Sein und Erscheinen

Sophie LOIDOLT (Wien, Österreich)

Zusammenfassung

Die Geschichte der Philosophie und der Wissenschaften kann als eine Verfallsgeschichte der Erscheinung begriffen werden. Während im antiken Griechenland das Erscheinen noch als das „Sich-Zeigen“ einer Sache selbst erfasst wurde, gerät durch den wissenschaftlichen Fortschritt in der Neuzeit das wahrnehmungsmäßig Erscheinende in Misskredit. Die wahren Beweggründe des Universums werden nun als Naturgesetze erfasst, die sich in oder hinter den Erscheinungen verbergen und durch Mathematisierung und Experiment ausfindig gemacht werden müssen. Neben diesen vor allem durch Galileo GALILEI angestoßenen Entwicklungen wird in der Philosophie ungefähr zeitgleich mit René DESCARTES alles Erscheinende in Zweifel gezogen und damit der Glaubwürdigkeit der Erscheinungswelt radikal der Boden entzogen. Erst die Phänomenologie Edmund HUSSERLS und Martin HEIDEGGERS im 20. Jahrhundert rehabilitiert den Erscheinungsbegriff und greift dabei auf den antiken Gedanken zurück, dass Erscheinen nicht prinzipiell verbirgt, sondern im Gegenteil, die fundamentale Art und Weise ist, wie sich uns etwas zeigt. Unsere (natur)wissenschaftlichen Forschungen beginnen bei den Phänomenen, bei den Erscheinungen der Lebenswelt. Von ihnen müssen wir ausgehen, und an ihnen sowie in unserer Lebenswelt müssen sich unsere wissenschaftlichen Prognosen schließlich auch wieder bewahrheiten, d. h. zeigen. Die Wirklichkeit verbirgt sich also nicht hinter den Erscheinungen, sondern manifestiert sich in ihnen. In meinem Beitrag möchte ich die verschiedenen Erscheinungsbegriffe von der Antike bis zur Phänomenologie thematisieren und damit die Entwicklungen nachzeichnen, die die Auffassung des Verhältnisses von Sein und Erscheinen geprägt haben.

Abstract

The history of philosophy and the sciences can be understood as a history of the decline of the phenomenon. While in ancient Greece the appearance (*phainomenon*) was still perceived as the “self-manifestation” of a thing, scientific progress in modern times has led to a loss of credibility with respect to how things appear to us. The true causes of the universe were from then on recognized as natural laws that are hidden in or behind the phenomena and that must be identified by mathematization and experiment. In addition to these developments, triggered mainly by Galileo GALILEI, René DESCARTES radically doubted the credibility of the phenomenal world in the context of epistemology and philosophy. Only in the 20th century, phenomenology, founded by Edmund HUSSERL and Martin HEIDEGGER, rehabilitated the concept of the phenomenon by drawing on the ancient idea that the appearance does not hide true being, but to the contrary, that it is the fundamental way by which truth and true being manifests itself. Our scientific research starts from the phenomena, in our life-world. From here we have to proceed, and here our forecasts and calculations have to prove themselves. In my contribution, I would like to address the various shifts in the concept of appearance from antiquity to phenomenology and thus trace the developments that have shaped the conception of the relation between being and appearance.

Das Verhältnis von Sein und Erscheinen ist ein altes Problem der Philosophie, das schon im antiken Griechenland zum Nachdenken anregte. Eine der zentralsten Fragen ist dabei, ob Erscheinung „bloßer Schein“ ist, oder ob sie das Erscheinen des Wahren und Wirklichen selbst ist. Wie weit können wir der Erscheinung vertrauen? Inwieweit ist sie ein bloßes Trugbild,

hinter dem sich die eigentlichen Verhältnisse verbergen? Und müsste man zu diesen dann nicht auf ganz anderem Wege gelangen als über das, was wir wahrnehmen? Kurz: Wieviel Schein und wieviel Sein machen die Erscheinung aus? Oder, anders formuliert: Wie „subjektiv“ ist die Erscheinung, und was kann das mit objektiver Wissenschaft zu tun haben – oder auch nicht?

Wie die letzte Formulierung zeigt, ist diese Problemstellung nicht nur eine philosophische. Auch die Methode der Naturwissenschaften ist implizit von der Auseinandersetzung mit diesem Problem geprägt. Das hängt unter anderem damit zusammen, dass die Neuzeit, in die mit Galileo GALILEI die Entwicklung der modernen naturwissenschaftlichen Methode fällt, ein neues Verhältnis zur erscheinenden Welt einnimmt. Durch die Methode von Experiment und Mathematisierung wird man mehr und mehr auf eine Welt „hinter“ den Erscheinungen geführt, auf eine mathematisierte Welt von Naturgesetzmäßigkeiten, von der letzten Endes nicht mehr klar ist, wie sie überhaupt mit der erscheinenden Welt zusammenhängt.

Diese Entwicklung, in deren Zusammenhang die Phänotypisierung als eine gewisse Gegenbewegung „zurück zur Erscheinung“ interpretiert werden könnte, möchte ich in meinem Beitrag philosophisch und ideengeschichtlich nachzeichnen. Denn interessanterweise hat der naturwissenschaftliche Zugang zur Welt, für den die Physik steht, gar nicht wenig mit der Tradition der Metaphysik zu tun – und das genau in seinem Verständnis des Verhältnisses von Sein und Erscheinung. Und nicht nur das: Sogar schon in unserer Alltagssprache zeigt sich, dass wir im Grunde immer schon implizite „kleine Metaphysiker“ sind und ein bestimmtes Verständnis des Verhältnisses von Sein und Erscheinung voraussetzen. In unserer Alltagssprache gibt es die Dichotomien von Wirklichkeit und Erscheinung sowie von Sein und Schein. Diese Dichotomien verwenden wir oft so: Es ist eine Sache, wie ein Ding erscheint, aber es ist eine andere Sache, wie es wirklich ist. Eine „Erscheinung“ zeigt daher an, was ein Ding dem Erscheinen nach ist, aber wenn wir wissen wollen, was oder wie es *wirklich* ist, und vor allem: was die *Gründe* einer Erscheinung sind, dann müssen wir über die Erscheinung hinaus, hinter sie zurück usw.

Was hat das mit Metaphysik zu tun? Und wie charakterisiert sich überhaupt die metaphysische Annäherung an das Verhältnis von Sein und Erscheinen?

1. Metaphysik und das antike Verständnis von Sein und Erscheinen

PLATONS Höhlengleichnis¹ ist eine der bekanntesten metaphorischen Denkfiguren der philosophischen Tradition: Der antike griechische Philosoph PLATON beschreibt darin, dass unser Leben sich im Grunde in einer Höhle abspiele, in der wir gefesselt sitzend auf eine Wand starren – man könnte heute sagen: auf einen Bildschirm, eine Filmleinwand, einen Screen. Denn was wir für die Wirklichkeit halten, sind im Grunde nur die Schatten, die dadurch entstehen, dass hinter uns Figuren vor dem Lichtschein eines Feuers vorbeigetragen werden. Der Philosoph, so PLATONS Gleichnis der Erkenntnis, ist derjenige, der aus der Höhle ausbricht und hinaufsteigt zum Sonnenlicht, das ihn zunächst unglaublich blendet. Doch schließlich erkennt er in diesem Sonnenlicht die Dinge, wie sie wirklich sind, und er erkennt in ihnen die Gründe für die Erscheinungen.

1 PLATON 1982, S. 327–332.

Das ist – in prägnanter Kurzform – die metaphysische Geschichte der abendländischen Philosophie, die durch die christliche Interpretation vom eitlen, vergänglichen Diesseits und dem wahren Jenseits nur noch verstärkt wurde: Erscheinungen sind bloße Schatten, Täuschungen, von denen wir uns losreißen müssen, um hinaufzusteigen ins Sonnenlicht der wahren Erkenntnis – im Sinne PLATONS: zu den Ideen, zur Wesenserkenntnis, d. h. zur Erkenntnis dessen, was wahrhaft ist und nicht nur Schein ist. *Meta ta physika*: über die *physis* hinaus, über die Natur, über das Erscheinende hinaus.

Aber das ist doch gerade das Gegenteil von Physik, wird man nun berechtigterweise denken. Das ist freilich in einem Sinne wahr, denn die Physik/die Naturwissenschaft steigt weder zu einem Ideenhimmel auf, noch zu einem Gott. Aber uns geht es ja hier um das ganz bestimmte Verständnis des Verhältnisses von Sein und Erscheinung. Und dieses Verständnis (das sich von PLATON bis KANT durchhält) lautet der klassischen Metaphysik gemäß, *dass man über die Erscheinungen hinausgehen muss, um die Gründe der Erscheinungen zu erkennen*. Also auch: dass man sich durch den Geist von der Sinnenwelt ablöst und die Verhältnisse dahinter erkennt. Philosophisch charakterisiert man diese z. B. als „Wesensgründe“ oder „Ideen“ oder „Dinge an sich“; naturwissenschaftlich spricht man z. B. von Naturgesetzen oder, konkreter, z. B. von „Genomen“.

Der Leitgedanke dieser philosophischen und wissenschaftlichen Bemühungen ist stets der gleiche: die Erscheinungen, sagt KANT, „müssen selbst noch Gründe haben, die nicht Erscheinungen sind“.² Dies führt auf die sogenannte „Zwei-Welten-Theorie“: Die Welt der „Dinge an sich“ und die Welt der Erscheinungen, die in einem klaren hierarchischen Verhältnis zueinander stehen: die eine bedingt die andere, und die eine ist daher auch „wirklicher“ als die andere. Das wahre Sein, das was wirklich ist, *verursacht* die Erscheinungen. Zu all dem kommt in der Neuzeit noch hinzu, dass man das Erscheinende als das „subjektiv Verzerrte“ versteht (dazu gleich weiter unten). Hinsichtlich der antiken Auffassung ist zunächst noch wichtig und auch interessant zu erwähnen, dass sich PLATON mit seinem philosophischen Verständnis, das er im Höhlengleichnis zum Ausdruck bringt, im Grunde diametral gegen das *herkömmliche* griechisch-antike Verständnis von „Erscheinung“ stellt. PLATON sagt also *nicht* das, was alle denken, sondern erarbeitet sich gerade ein *neues* Verständnis; dazu kommt noch, wie oben angedeutet, dass wir aufgrund der christlichen Interpretation ein noch viel leib- und erscheinungsfeindlicheres Bild von PLATON haben, als dies tatsächlich der Wirklichkeit entsprochen haben dürfte.

Was war nun das gängige, geläufige Verständnis von „Erscheinung“, *phainomenon* im alten Griechenland, das sowohl bei den Vorsokratikern als auch in der politischen Welt, z. B. in den Reden des PERIKLES, zum Ausdruck kommt? Ziehen wir dafür HEIDEGGERS Übersetzung und Auseinandersetzung mit dem Erscheinungsbegriff heran:

„*Phainomenon* besagt: etwas, das sich zeigt. *Phainomai* ist gleich: ‚sich zeigen‘; *phaino* gleich ‚etwas an den Tag bringen‘; der Stamm ist *pha*; dies hängt zusammen mit *phos*, Licht, Helligkeit.“³

Das „*phainomenon*“ ist also kein Schein, kein Schatten, sondern die Manifestation des Dinges selbst: Das, was sich von sich selbst her zeigt. Das, was ins Offene kommt und dadurch „vernommen“ werden kann. Erscheinen heißt so verstanden: In die Unverborgenheit treten. „Welt“ ist bei den Griechen immer ein Erscheinungsraum, ein Raum der Helle, in dem sich etwas

2 ARENDT 1998, S. 34.

3 HEIDEGGER 1994, S. 6f.

überhaupt erst zeigen kann. HEIDEGGER übersetzt in dieser Weise auch das altgriechische Wort für Wahrheit, *aletheia*: aus der Verborgenheit treten in die Erscheinung. Auch *physis*, also: Natur, wird in dieser Weise verstanden (und auch das betont vor allem HEIDEGGER in einer Interpretation der Vorsokratiker):

„Was sagt nun das Wort *physis*? Es sagt das von sich aus Aufgehende (z. B. das Aufgehen einer Rose), das sich eröffnende Entfalten, das in solcher Entfaltung in die Erscheinung-Treten und in ihr sich Halten und Verbleiben [...]“⁴

Dieses Verständnis ist natürlich sehr verschieden von einem Verständnis von Natur als einem naturgesetzlichen Vorgang. *Physis* in diesem alten Sinne ist aber nicht ein Vorgang, den wir unter anderen Dingen beobachten, sondern: „Die *physis* ist das Sein selbst, kraft dessen das Seiende erst beobachtbar wird und bleibt.“⁵ Sein heißt hier Erscheinen. Das bedeutet: Das Erscheinen ist nicht etwas, das dem Sein nachträglich oder hin und wieder zukommt. *Sein ist vielmehr Erscheinen, zeigt sich durch Erscheinen.*

Dadurch soll zumindest angedeutet sein, dass schon in der Antike zwei sehr unterschiedliche Positionen vorhanden sind. Auf der einen Seite: Erscheinung ist bloßer Schein, hinter den man zurück muss. Und auf der anderen Seite: Erscheinung ist das, wodurch sich Sein überhaupt zeigen kann. PLATON dreht dieses ursprüngliche Verständnis radikal um.⁶

2. Neuzeit: Galileo und Descartes

In welcher Weise radikalisiert sich diese Position nun gerade in der Neuzeit und gerade auch durch den Zugang der Naturwissenschaften?

Die Geschichte der Philosophie und der Wissenschaften ist im Grunde eine *Verfalls-geschichte der Erscheinung*. Während im antiken Griechenland das Erscheinen noch als das „Sich-Zeigen“ einer Sache selbst erfasst wurde, gerät durch den wissenschaftlichen Fortschritt in der Neuzeit das wahrnehmungsmäßig Erscheinende noch mehr und auf neue Weise in Misskredit – werden doch die wahren Beweggründe des Universums nun als Naturgesetze erfasst, die sich in oder hinter den Erscheinungen verbergen und durch Mathematisierung und Experiment ausfindig gemacht werden müssen. Neben diesen vor allem durch Galileo GALILEI angestoßenen Entwicklungen wird in der Philosophie ungefähr zeitgleich mit René DESCARTES alles Erscheinende in Zweifel gezogen und damit der Glaubwürdigkeit der Erscheinungswelt radikal der Boden entzogen. Die zwei Großen am Beginn der Neuzeit, die ich also hervorheben möchte und deren Weltansichten uns auch noch heute entscheidend prägen, sind: GALILEO (1564–1641) und DESCARTES (1596–1650).

Edmund HUSSERL, der Begründer der Phänomenologie, der selbst auch Mathematiker war und GALILEOS „Mathematisierung der Natur“ eine ausführliche Analyse widmete,⁷ bezeichnet GALILEO als einen gleichzeitig „entdeckenden und verdeckenden Genius“.⁸ Und HUSSERL sieht diese „Entdeckung-Verdeckung“ auch noch immer in der neueren Physik am Werk. Denn es bleibt auch bei der neueren Physik strukturell gleich, dass Natur immer am „eigentlichsten“

4 HEIDEGGER 1953, S. 11.

5 HEIDEGGER 1953, S. 11.

6 Vgl. ARENDT 1998, S. 29–39.

7 Vgl. HUSSERL 1976, §9, S. 20–59.

8 HUSSERL 1976, S. 53.

in mathematischen Formeln gegeben ist und dann zu interpretieren ist, wie wir das verstehen könnten. HUSSERL will durch diese kritische Annäherung im Übrigen keinesfalls die „erstaunliche Denkleistung“ GALILEIS mindern.⁹ Vielmehr geht es ihm darum, dass gerade dadurch, dass die Natur objektiv als mathematische verstanden wird, die *subjektive Leistung* verdeckt wird, dass wir Natur mathematisieren.

„In naturwissenschaftlicher und geometrischer Idealisierung messen wir [...] der Lebenswelt [...] ein wohlpassendes *Ideenkleid* an, das der sogenannten objektivwissenschaftlichen Wahrheiten, die wir konstruieren in einer (wie wir hoffen) wirklich und bis ins Einzelne durchzuführenden und sich ständig bewährenden Methode zunächst bestimmte Zahlen-Induzierungen für die wirklichen und möglichen sinnlichen Füllen der konkret-anschaulichen Gestalten der Lebenswelt, und eben damit gewinnen wir Möglichkeit einer Voraussicht der konkreten, noch nicht oder nicht mehr als wirklich gegebenen, und zwar der lebensweltlich-anschaulichen Weltgeschehnisse; einer Voraussicht, welche die Leistungen der alltäglichen Voraussicht unendlich übersteigt.“¹⁰

Das „Ideenkleid“ der Mathematik und Symbole steht also für die „eigentliche Wirklichkeit“, jenseits der sinnlichen Erscheinungen in der Lebenswelt. Der Grundgedanke der Galileiischen Physik ist genau der, die Natur als mathematisches Universum zu begreifen. Aber HUSSERL weist uns darauf hin, dass das Ideenkleid der Mathematik es macht, dass wir „für *wahres Sein nehmen, was eine Methode* ist“¹¹ (nämlich um Voraussagen in unserer Lebenswelt zu machen). Wir betrachten also das, was Methode ist – die Mathematisierung der Natur – als das eigentliche, wahre Sein der Natur. Damit bleibt aber, so HUSSERL, nicht nur Natur unverstanden, sondern auch der eigentliche Sinn der Methode, der Formeln, der „Theorien“ bleibt unverstanden als das, was er ist: menschlich geistige Leistung. Die Methode der Naturwissenschaft entwickelt zwar eine verlässliche Technik, die jeder erlernen kann. Aber wir verstehen immer weniger, was eigentlich das Verhältnis zwischen mathematisierter Natur und Erscheinung ist und was wir damit zu tun haben.

Zu diesem Entwicklungsstrang kommt durch die Philosophie und Erkenntnistheorie noch ein weiterer dazu: Die Subjektivierung der Erscheinungswelt. Damit komme ich zu DESCARTES, dessen womöglich bekanntester Satz lautet: *Cogito ergo sum*. Aber was ist damit eigentlich gemeint? DESCARTES' (1992) Hauptwerk, die *Meditationes de prima philosophia*, suchen nach einem unerschütterbaren Fundament für alle Wissenschaften – also nach etwas, an dem man nicht zweifeln kann. Im Zuge seiner systematischen Untersuchung fallen natürlich alle Sinneserscheinungen ganz zuerst unter die Rubrik dessen, was bezweifelt werden kann. Ich kann mich ja ständig täuschen in der Sinnenwelt, also kann sie ganz gewiss kein Fundament für die wahre Erkenntnis sein. Das einzige, worin ich mich nicht täuschen kann, ist, dass ich gerade einen Akt des Zweifels vollziehe. Will ich nämlich daran wieder zweifeln, so kann ich das ja nur, indem ich wieder einen Akt des Zweifels vollziehe. Will heißen: Auch wenn alles, was ich bezweifle, in Wirklichkeit nichts, bzw. Lug und Trug, sein könnte, den Vollzug meines Zweifels (das *Dass* meines Zweifels) selber kann ich im Zweifeln nicht selbst nochmal bezweifeln – also ist das *cogito ergo sum* eigentlich auch ein *dubito ergo sum*. Der Witz an diesem Verfahren ist nun, dass dadurch die ganze erscheinende Wirklichkeit zu einem Korrelat meines Bewusstseins wird und diese Wirklichkeit noch dazu absolut bezweifelt werden kann – als wäre alles ein Traum, als wären wir Gehirne im Tank. Hannah ARENDT beschreibt den „Zweifel des Descartes“ als eine Auflösung objektiv gegebener Wirklichkeit in subjektive

9 HUSSERL 1976, S. 53.

10 HUSSERL 1976, S. 51.

11 HUSSERL 1976, S. 52.

Bewusstseinsdaten bzw. subjektive mentale Prozesse.¹² Die Erfahrung von der Realität der erscheinenden Welt wird also subjektiviert, Erscheinungen sind „bloß subjektiv“.

Erscheinungen, in der Antike noch das Sich-selbst-Zeigen des Wahren in der Welt, werden dadurch also zu privaten sinnlichen Daten, die sich in unserer jeweiligen Psyche befinden. Es fragt sich dann natürlich – und das wird auch *die* Frage der neuzeitlichen Erkenntnistheorie von DESCARTES über den englischen Empirismus bis zu KANT – wie wir von diesen Sinnesdaten in unserem Bewusstsein jemals wieder zur äußeren Welt zurückgelangen sollen, wie wir überhaupt von ihr wissen können. Aber sowenig lebenspraktisch diese Frage klingt – sie spielt nicht unwesentlich mit auch in unserem heutigen Selbstverständnis, das, grob gesprochen, so aussieht: Wie uns die Welt erscheint, das alles, was wir hier sehen, dieser Festsaal usw., ist das Produkt dessen, was unser Gehirn aus sensuellen Reizen macht. Erscheinung ist absolut *subjektiv* und absolut *relativ*. Was übrig bleibt von dem, was wir als „die Wirklichkeit“ verstehen, entzieht sich unseren Sinnen und kann nur über die Vermittlung von abstrakten mathematischen Symbolen erkannt werden. Hannah ARENDT hat diese Entwicklung folgendermaßen charakterisiert: Der Mensch verliert seinen Grund in der Erscheinung. Und sie deutet auch die Auswirkungen dieses philosophischen Bildes auf unser Selbstverständnis und auf das unverstandene Verhältnis von Sein und Erscheinen an:

„Das Naturbild der modernen Physik, dessen Anfänge man auf Galileo zurückverfolgen kann und das dadurch entstand, dass das Vermögen des menschlichen Sinnesapparats, Wirklichkeit zu vermitteln, in Frage gestellt wurde, zeigt uns schließlich ein Universum, von dem wir nicht *mehr* wissen, als dass es in bestimmter Weise unsere Messinstrumente affiziert; und das, was wir von unseren Apparaten ablesen können, sagt über die wirklichen Eigenschaften, in dem Bilde Eddingtons, nicht mehr als, als eine Telefonnummer von dem aussagt, der sich meldet, wenn wir sie wählen. Anstatt mit objektiven Eigenschaften, mit anderen Worten, finden wir uns mit den von uns selbst erbauten Apparaten konfrontiert, und anstatt der Natur oder dem Universum begegnen ‚wir gewissermaßen immer nur uns selbst‘ (Heisenberg).“¹³

In diesem Punkt befindet sich ARENDT in bestem Einverständnis mit HUSSERL, der in der *Krisis der Wissenschaften* ebenso feststellt, dass mit der Neuzeit die Degradierung der erscheinenden Welt auf eine Welt von Illusionen und subjektiven Empfindungsqualitäten vollzogen wird:

„Die Phänomene sind nur in den Subjekten; sie sind in ihnen nur als kausale Folgen der in der wahren Natur stattfindenden Vorgänge, die ihrerseits nur in mathematischen Eigenschaften existieren. Ist die anschauliche Welt unseres Lebens bloß subjektiv, so sind die gesamten Wahrheiten des vor- und außerwissenschaftlichen Lebens, welche sein tatsächliches Sein betreffen, entwertet. Nur insofern sind sie nicht bedeutungslos, als sie, obschon falsch, ein hinter dieser Welt möglicher Erfahrung liegende, ein ihr transzendentes An-sich vage bekunden.“¹⁴

Wir sitzen also nach wie vor in der Höhle, aus der wir uns höchstens „herausrechnen“ können.

3. Welche Relevanz hat also die Erscheinung?

Im Vorangehenden habe ich eine „Verfallsgeschichte“ der Erscheinung nachgezeichnet, in Bezug auf welche sich Naturwissenschaft und Metaphysik ähnlicher sind, als man vielleicht denken würde. Zum Abschluss möchte ich noch ein Argument vorbringen, warum es vielleicht

¹² ARENDT 1981, S. 348–354.

¹³ ARENDT 1981, S. 333.

¹⁴ HUSSERL 1976, S. 54.

doch Sinn macht, bei der Erscheinung anzufangen, und warum unser Weltbild, das unsere Alltags- und Wahrnehmungswelt zur Scheinwelt verdammt, vielleicht doch nicht ganz zutrifft.

Das Argument lautet: Wir beginnen immer in der sogenannten „Lebenswelt“¹⁵, und wir bleiben darin eingebettet, insofern die wissenschaftlichen Resultate und Prognosen sich auch in einer Lebenswelt zeigen müssen (und nicht bloß in einer theoretischen Hinterwelt). Das deutet auf einen gewissen Zusammenhang hin. Wenn wir nicht vertrauen könnten, dass uns die Erscheinungen etwas Wahres zeigen, eine Fährte legen, die auf ihre Ursachen führen (oder: in denen sich ihre Ursachen manifestieren/zeigen), dann könnten wir kein wissenschaftliches Vorgehen darauf stützen. Insofern ist der Phänotyp das, was sich von sich selbst her zeigt, das Erscheinende in einer realen Welt, das auch von seiner Umgebung geprägt ist.

In dieser Umgebung und Erscheinungswelt leben sowohl wir als auch die Lebewesen, die wir erforschen. Modelle und Methoden verweisen nur auf diese Wirklichkeit unserer Lebenswelt, versuchen ihre Ursachen zu begreifen – sie können unsere Lebenswelt, die eine Erscheinungswelt ist, aber nie ersetzen. Niemand existiert in einer Welt der Gene, genausowenig wie nie jemand in einer metaphysischen Hinterwelt jemals sein Leben gelebt hat. Diese theoretischen Gebäude und Gebilde sind von unserer Lebenswelt aus erbaut und weisen auf sie zurück; das Sein, das wir als verursachendes verstehen, ist immer eines *von der Erscheinung her*. Umgekehrt verwirklichen sich die Prozesse der Natur, die wir mehr und immer besser verstehen lernen, genau in dieser Welt und in keiner anderen, die dahinter oder daneben wäre. Insofern ist die Erscheinung, durch die wir die *ursprünglichste Bekanntschaft* mit der Welt und miteinander und mit anderen Lebewesen haben, doppelt relevant: als Ort des Ausgangs unserer Forschungen und als Ort der Verwirklichung des nicht-unmittelbar Erscheinenden. Die Wirklichkeit verbirgt sich also nicht hinter den Erscheinungen, sondern sie manifestiert sich in ihnen.

Literatur

ARENDT, H.: *Vita activa*. München: Piper 1981

ARENDT, H.: *Vom Leben des Geistes*. München: Piper 1998

DESCARTES, R.: *Meditationen über die Grundlagen der Philosophie*. Hamburg: Meiner 1992

HEIDEGGER, M.: *Einführung in die Metaphysik*. Tübingen: Niemeyer 1953

HEIDEGGER, M.: *Einführung in die phänomenologische Forschung*. Frankfurt (Main): Klostermann 1994

HUSSERL, E.: *Die Krisis der europäischen Wissenschaften und die transzendente Phänomenologie*. Den Haag: Nijhoff 1976

PLATON: *Der Staat*. Stuttgart: Reclam 1982

Dr. Sophie LOIDOLT
Universität Wien
Institut für Philosophie
Universitätsstraße 7 (NIG)
1010 Wien
Österreich
E-Mail: sophie.loidolt@univie.ac.at

¹⁵ Vgl. HUSSERL 1976.

Symmetrie und Asymmetrie in Wissenschaft und Kunst

Vorträge anlässlich der Jahresversammlung
am 18. und 19. September 2015 in Halle (Saale)

Nova Acta Leopoldina N. F. Nr. 412

Herausgegeben von Martin QUACK (Zürich) und Jörg HACKER (Halle/Saale)

(2016, 275 Seiten, 116 Abbildungen, 7 Tabellen, 29,95 Euro,

ISBN: 978-3-8047-3610-8)

Symmetrien und Asymmetrien gibt es in allen Bereichen der Wirklichkeit. Das Bestreben, ihr Wechselspiel zu erfassen, verbindet die Wissenschaften mit den Künsten. Symmetrie und Asymmetrie sind Strukturprinzipien, die sich in Mathematik und Philosophie abstrakt definieren lassen, aber auch in den empirischen Wissenschaften eine Vielzahl von Phänomenen in Natur und Kultur erklären können. Doch auch die Kunst – von der Musik bis zur Architektur – beschäftigt sich in jeweils eigener Weise mit Symmetrie und Symmetriebrüchen. Der Band liefert Beispiele, die von der Physik, insbesondere der Teilchenphysik, über die Astronomie, die Chemie (z. B. Chiralität) und die Biologie (z. B. Fortbewegung) bis in das Gebiet der Medizin (z. B. Krebsentstehung und Wundheilung) reichen. Außerdem werden Symmetriebrüche in der Moral, die Rolle von Symmetrie und Asymmetrie in der bildenden Kunst und die Symmetrie als strukturelles Prinzip des Denkens in der Moderne untersucht.

