

Angefertigt an der Universität Rostock, Medizinische Fakultät,
Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie

**Der Einfluss des RAGE
(receptor for advanced glycation end products)
auf den subbasalen Nervenplexus
der Cornea bei Mäusen mit einem Diabetes mellitus**

Inauguraldissertation
zur

Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin
der Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von: Florian Thomas geb. am: 09.02.1994 in: Rüdersdorf

Wohnhaft in: Berlin

Gutachterin:

Prof. Dr. rer. nat. S. E. Baltrusch

Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie

Medizinische Fakultät der Universität Rostock

Rostock, 21.09.2020

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00003102



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung - Nicht-kommerziell -
Weitergabe unter gleichen Bedingungen 4.0 International
Lizenz.

Gutachter:

Prof. Dr. Holger Willenberg Universitätsmedizin Rostock,
Sektion Endokrinologie und Stoffwechselkrankheiten

Prof. Dr. Uwe Lendeckel Universitätsmedizin Greifswald,
Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie

Jahr der Einreichung: 2020
Jahr der Verteidigung: 2021

Tagungsbeiträge

Janine Leckelt, Florian Thomas, Annett Kott, Rica Waterstradt, Oliver Stachs, Anselm Jünemann, Markus Tiedge, Simone Baltrusch: Eine hohe RAGE-Expression könnte für das frühzeitige Auftreten von Diabetes mellitus assoziierten neuropathischen Schädigungen der Cornea verantwortlich sein; *52. Jahrestagung der DDG, Berlin*

Janine Leckelt, Florian Thomas, Annett Kott, Rica Waterstradt, Oliver Stachs, Anselm Jünemann, Markus Tiedge, Simone Baltrusch: High RAGE expression might be responsible for early corneal nerve fiber damage in diabetic individuals: *EASD Berlin 2018*

Promotionsverteidigung: 07.06.2021, an der Universitätsmedizin Rostock

Inhaltsverzeichnis

Tagungsbeiträge	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Diabetes mellitus	1
1.1.1 Ätiologie und Pathogenese des Diabetes mellitus.....	1
1.1.2 Akutkomplikationen eines Diabetes mellitus.....	3
1.1.3 Langzeitkomplikationen bei Patienten mit Diabetes Mellitus	5
1.1.4 Periphere sensomotorische Polyneuropathie.....	6
1.1.4.1 Ätiologie	6
1.1.4.2 Pathophysiologische Aspekte.....	7
1.1.4.3 Diagnostik.....	8
1.1.4.4 Therapie.....	9
1.2 RAGE und dessen Liganden	10
1.2.1 Entstehung und Bedeutung von AGEs	10
1.2.2 Aufbau und Funktion des RAGE	10
1.3 Das menschliche Auge und die Cornea	13
1.3.1 Aufbau des menschlichen Auges	13
1.3.2 Mikroskopischer Aufbau der menschlichen Cornea	14
1.3.3 Funktion der Cornea	16
1.3.4 Aufbau des subbasalen Nervenplexus der Cornea	16
1.4 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie der Cornea	18
1.4.1 Grundprinzipien der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie	18
1.4.2 Corneale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM).....	19
1.4.3 Beispiele verschiedener Cornea-Schichten mittels CLSM.....	21
1.5 Fragestellung	22
2 Materialien und Methoden	23
2.1 Materialien	23
2.1.1 Programme	23
2.1.2 Geräte	23
2.1.3 Chemikalien	23

2.1.4	Antikörper	24
2.1.5	Medikamente.....	24
2.1.6	Kits	24
2.1.7	Verbrauchsmaterialien.....	24
2.2	Methoden.....	25
2.2.1	Tiermodell und Haltung	25
2.2.2	Versuchsaufbau und Versuchsablauf.....	25
2.3	Bestimmung des Körpergewichts	26
2.4	Bestimmung der Blutglukose	26
2.5	Bestimmung des HbA1c-Wertes	27
2.6	Induktion eines Diabetes mellitus mittels Streptozotocin (STZ)	27
2.7	Southern Blot.....	28
2.8	In vivo Mikroskopie der Cornea.....	28
2.8.1	Narkose der Tiere.....	28
2.8.2	Analyse des subbasalen Nervenplexus	29
2.8.3	Auswertung der Bilder	30
2.9	Ex vivo Mikroskopie der Cornea	31
2.9.1	Corneaextrahierung	31
2.9.2	Immunfluoreszenzfärbung der Cornea mit PGP 9.5	31
2.9.3	Untersuchung der Cornea unter dem Fluoreszenzmikroskop	32
2.9.4	Auswertung der Gesamtaufnahme.....	33
3	Ergebnisse	35
3.1	Entwicklung des Gewichts.....	35
3.2	Entwicklung des Blutzuckers	36
3.3	Entwicklung des HbA1c	37
3.4	Entwicklung der Nervendichte	38
3.4.1	In vivo.....	38
3.4.2	Ex vivo	41
4	Diskussion	48
4.1	Konzeption der Studie.....	48
4.2	Beurteilung der Studienergebnisse.....	49

4.3	Die Bedeutung des RAGE in der Pathogenese der peripheren Polyneuropathie.....	50
4.4	Der subbasale Nervenplexus der Cornea und die periphere Polyneuropathie.....	53
4.5	Ausblick	54
5	<i>Zusammenfassung</i>	55
6	<i>Thesen</i>	57
	<i>Literaturverzeichnis</i>	X
	<i>Selbstständigkeitserklärung</i>	XVII
	<i>Tabellarischer Lebenslauf</i>	XVIII

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 1 in Abhängigkeit von benigner (TH-2-Lymphozyten überwiegen) oder destruktiver (TH-1-Lymphozyten überwiegen) Insulinitis bzw. einer Kombination aus beidem (Quelle: Helmut Schatz, *Diabetologie kompakt*. Vol. 4. Auflage. 2006 Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart). 2

Abbildung 2: Darstellung einer möglichen Entstehungstheorie und des zeitlichen Verlaufs des Diabetes mellitus Typ 1 (Quelle: Helmut Schatz, *Diabetologie kompakt*. Vol. 4. Auflage. 2006 Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart). 2

Abbildung 3: Unter physiologischen Bedingungen wird postprandial durch die Insulinausschüttung die Antilipolyse gefördert, wodurch es zur Fettspeicherung kommt. Während eines Insulinmangelzustands, wie er bei einem unbehandelten Diabetes mellitus Typ 1 vorliegt, entsteht ein Überangebot an freien Fettsäuren, welches negative Auswirkungen auf den Metabolismus hat (Quelle: Helmut Schatz, *Diabetologie kompakt*. Vol. 4. Auflage. 2006 Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart). 4

Abbildung 4: RAGE-vermittelte NF- κ B Aktivierung und die damit verbundene Genexpression von Zytokinen und anderen proinflammatorischen Faktoren (Quelle: Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products: *J Mol Med*; 2005;(83):876-86.). 11

Abbildung 5: Durch Liganden von RAGE ausgelöste Hochregulierung der RAGE Expression führt zur Daueraktivierung der Zelle und zu vermehrten Bindungsstellen für Liganden (Quelle: Angelika Bierhaus et. al, Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products; 2005). 12

Abbildung 6: Makroskopischer Aufbau des menschlichen Auges. (Quelle: <https://www.augentagesklinik-spreebogen.de/de/das-auge> Abruf: 15.03.2019) 13

Abbildung 7: Mikroskopischer Aufbau der Cornea. Von oben nach unten: Epithelschicht, Bowman-Membran, Stroma, Descemet-Membran, Endothelschicht (Quelle: <https://www.lasikon.de/auge/hornhaut-cornea/> Abruf: 21.03.2019). 15

Abbildung 8: A: Darstellung von Nervenverläufen der stromalen und subbasalen Nervenfaserbündel in einer menschlichen Cornea. B: Schematische Darstellung der

Nervenfaserverläufe im Zentrum. In der Zentralregion der Cornea laufen die Nerven annähernd parallel von oben nach unten. In der Peripherie orientieren sie sich eher in die seitlichen (nasalen/temporalen) Regionen. (Quelle: Muller, L.J., et al., Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp Eye Res*, 2003. 76(5): p. 521-42.) 17

Abbildung 9: Aufbau und Prinzip des konfokalen Laser-Scanning Mikroskops 18

Abbildung 10: Darstellung eines Cornealen Laser Mikroskops. Das weiße Gerät mit der Aufschrift HRTII ist der Heidelberger Retina Tomograph II. Der schwarze Aufsatz auf dem Retina Tomograph ist das Rostocker Cornea Modul, das speziell für die Untersuchung des vorderen Augenabschnitts in Rostock entwickelt wurde. (Quelle: Heidelberg Engineering GmbH – Gerhart-Hauptmann-Straße 30; 69221 Dossenheim, Deutschland). 19

Abbildung 11: Orthograder Schnitt (A) eines Z-Stack Bildes der Cornea nach KIT-Alignment ohne Bildüberlagerung verschiedener Schnitte und exemplarische Aufnahmen verschiedener Zellschichten: Superfizialschichten (B), Flügelzellen (C), Basalzellen (D), sub-epithelialer Nervenplexus (E), Bowman-Membran (F) und Stroma (G, H, I). Die Aufnahmen wurden rekonstruiert unter Benutzung einer konkaven TomoCap. (Quelle: Stachs et. al; Cellular in vivo 3D imaging of the cornea by confocal laser scanning microscopy) 21

Abbildung 12: Maus in einem Mousefix-Animalholder (Quelle: Sciencedirect.com. vollständige URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014483513003679> Abruf: 20.02.2019) 29

Abbildung 13: Exemplarische Darstellung einer 3D Intensitätsprojektion des subbasalen Nervenplexus mittels PGP9.5-Färbung inferior im Wirbelbereich (A) und durch Imaris automatisiert erkannte Nervenfaserverstruktur (rot, B). 34

Abbildung 14 : Körpergewicht der RAGE -/- Mäuse im Alter von 8 - 10 Wochen (Startpunkt) und 10 und 20 Tage nach Injektion von Natriumcitratlösung (Kontrolle, schwarze Säulen) oder Streptozotocin (Diabetisch, graue Säulen). Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM für 6 Tiere pro Gruppe. *, $p < 0,05$ versus Kontrolle; #, $p < 0,05$ versus Startpunkt Diabetisch (ANOVA/Bonferroni-Test). 35

Abbildung 15: Blutglukose der RAGE -/- Mäuse im Alter von 8 - 10 Wochen (Startpunkt) und 10 und 20 Tage nach Injektion von Natriumcitratlösung (Kontrolle, schwarze Säulen) oder

Streptozotocin (Diabetisch, graue Säulen). Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM für 6 Tiere pro Gruppe. ***, $p < 0,001$ versus Kontrolle; ###, $p < 0,001$ versus Startpunkt Diabetisch (ANOVA/Bonferroni-Test). 36

Abbildung 16: HbA1c-Wert der RAGE -/- Mäuse im Alter von 6 Wochen (Startpunkt) sowie 10 und 20 Tage nach Injektion von Natriumcitratlösung (Kontrolle, schwarze Säulen) oder Streptozotocin (Diabetisch, graue Säulen). Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM für 6 Tiere pro Gruppe. ***, $p < 0,001$ versus Kontrolle; ###, $p < 0,001$ versus Startpunkt Diabetisch (ANOVA/Bonferroni-Test). 37

Abbildung 17: Exemplarische in vivo Darstellung des subbasalen Nervenplexus mittels CLSM einer RAGE -/- Kontrollmaus im Alter von 8 - 10 Wochen (A) sowie 10 (B) und 20 (C) Tage nach Injektion von Natriumcitratlösung. 38

Abbildung 18: Exemplarische in vivo Darstellung des subbasalen Nervenplexus mittels CLSM einer diabetischen RAGE -/- Maus im Alter von 8 - 10 Wochen (A) sowie 10 (B) und 20 (C) Tage nach Injektion von Streptozotocin. 39

Abbildung 19: Corneale Nervenfasernlänge (CNFL) der RAGE -/- Mäuse im Alter von 8 - 10 Wochen (Startpunkt) sowie 10 und 20 Tage nach Injektion von Natriumcitratlösung (Kontrolle, schwarze Säulen) oder Streptozotocin (Diabetisch, graue Säulen). Die Quantifizierung erfolgte manuell mittels der Routine NeuronJ im Programm ImageJ (NIH). Es wurden pro Tier und Auge 5 Bilder der in vivo CLSM des subbasalen Nervenplexus ausgewertet und zunächst der Mittelwert pro Tier errechnet. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM für 6 Tiere pro Gruppe. n.s., nicht signifikant versus Kontrolle; \$\$\$, $p < 0,001$ versus Startpunkt Kontrolle; ###, $p < 0,001$ versus Startpunkt Diabetisch (ANOVA/Bonferroni-Test). 40

Abbildung 20: 3D Intensitätsprojektion des subbasalen Nervenplexus ex vivo mittels PGP9.5-Färbung inferior im Wirbelbereich über eine Fläche von 16 (A, D) oder 25 (B, C, E, F) zusammenhängenden Einzelbildern. Dargestellt sind die RAGE -/- Kontrollmäuse, die 20 Tage nach Injektion von Natriumcitratlösung getötet wurden. 43

Abbildung 21: 3D Intensitätsprojektion des subbasalen Nervenplexus ex vivo mittels PGP9.5-Färbung inferior im Wirbelbereich über eine Fläche von 16 (A – E) oder 25 (F) zusammenhängenden Einzelbildern. Dargestellt sind die diabetischen RAGE -/- Mäuse, die 20 Tage nach Injektion von Streptozotocin getötet wurden. 46

Abbildung 22: Corneale Nervenfaserlänge (CNFL) der RAGE $-/-$ Mäuse 20 Tage nach Injektion von Natriumcitratlösung (Kontrolle, schwarze Säulen) oder Streptozotocin (Diabetisch, graue Säulen). Nach Tötung der Tiere wurde die Cornea präpariert und die Nerven mittels PGP9.5-Färbung dargestellt. Anschließend wurde der komplette subbasale Nervenplexus über 20 μm Tiefe in einer Fläche von 16 oder 25 zusammenhängenden Einzelbildern inferior im Wirbelbereich aufgenommen. Die Quantifizierung der in Abbildung 20 und 21 dargestellten Bilder erfolgte automatisiert über die Bildung einer 3D Oberfläche in der Gesamtaufnahme im Programm Imaris. n.s., nicht signifikant (Student's t-Test). 47

Abbildung 23: Corneale Nervenfaserlänge (CNFL) der diabetischen B6/J RAGE $-/-$ Mäuse im Vergleich zu B6/J thy1-YFP Mäusen. Die Ergebnisse sind prozentual zur mitgeführten Kontrolle dargestellt. Die Daten zu den thy1-YFP Mäusen sind der Arbeit von Leckelt et al. [71] entnommen. ***, $p < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni-Test). 51

Abkürzungsverzeichnis

STZ	Streptozotocin
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RAGE	<i>receptor of advanced glycation end products</i>
AGE	<i>advanced glycation end products</i>
sRAGE	<i>soluble</i> RAGE (löslicher RAGE)
CLSM	<i>Confocal Laser-Scanning Microscope</i> (Konfokale/Corneale Laser-Scanning Mikroskopie)
LADA	<i>Latent Autoimmune Diabetes of the Adult</i>
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
LDL	<i>low-density Lipoprotein</i>
HDL	<i>high-density Lipoprotein</i>
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
N.	Nervus (Nerv)
CGRP	<i>calcitonin gene-related peptide</i>
µm	Mikrometer
nm	Nanometer
BMI	Body-Mass-Index
DNA	Desoxyribonukleinsäure
s.c.	subkutan
dpt.	Dioptrie
A	Adenin
T	Thymin
G	Guanin
C	Cytosin

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

1.1.1 Ätiologie und Pathogenese des Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselkrankheit, deren Auftreten weltweit stetig zunimmt (1). Die zwei am Häufigsten vorkommenden Arten des Diabetes mellitus sind der Typ 1 und Typ 2. Dem Diabetes mellitus Typ 1 wiederum liegen unterschiedliche Entstehungsprozesse zugrunde. Pathophysiologisch handelt es sich bei dem Typ 1a um einen Autoimmunprozess, der in den Langerhans-Inseln des Pankreas stattfindet und einen Untergang der insulinproduzierenden Betazellen zur Folge hat (2). Die Ursache dafür ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass neben genetischen auch Umweltfaktoren wie Ernährung und virale Infektionen eine Rolle spielen (3, 4). Eine kleine Minderheit der Patienten leiden an dem Diabetes mellitus Typ 1b. Dieser entsteht durch idiopathische Zerstörung oder Fehlfunktion der Betazellen im Pankreas (5). Eine Sonderform des Diabetes mellitus Typ 1 ist der „LADA“ (*Latent Autoimmune Diabetes in Adults*) bei dem es im Erwachsenenalter zu einem immunbedingten Diabetes kommt.

Eine Theorie ist, dass sich nach einer enteroviralen Infektion oder nach Aufnahme bestimmter Nahrungsbestandteile Lymphozyten und/oder Makrophagen in den Betazellen der Langerhans-Inseln des Pankreas ansiedeln. Diese Tatsache allein bedeutet aber noch nicht die sofortige Zerstörung der Betazellen. Wenn die Anzahl der Th2-Lymphozyten (Untergruppe der T-Helfer-Zellen) überwiegt, liegt die nicht destruktive oder auch benigne Phase vor. Erst wenn sich Th1-Lymphozyten (Untergruppe der T-Helfer-Zellen) ansiedeln und aktiviert werden, startet der Prozess der Zerstörung von Betazellen (6). Wie in Abbildung 1 zu sehen ist, ist es oft eine Kombination aus beiden Arten, die zum Untergang der Betazellen führt. In der Abbildung 2 ist eine mögliche Entstehungstheorie des Diabetes mellitus Typ 1 abgebildet. Sie besagt, dass sich durch eine vorangegangene Infektion oder durch äußere Umwelteinflüsse Autoantikörper gegen die Betazellen der Langerhans-Inseln bilden welche sukzessive die Zerstörung selbiger initiieren (6). Zur klinischen Manifestation der Erkrankung kommt es erst, wenn nur noch ca. 20% der Zellen funktionsfähig sind.

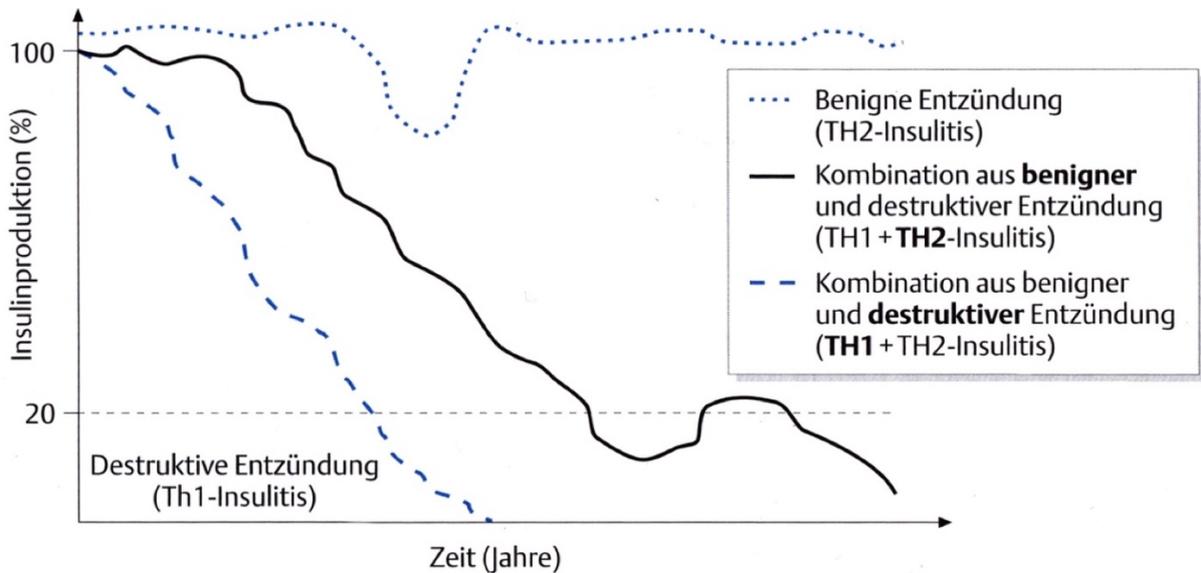


Abbildung 1: Darstellung der Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 1 in Abhängigkeit von benigner (TH-2-Lymphozyten überwiegen) oder destruktiver (TH-1-Lymphozyten überwiegen) Insulinitis bzw. einer Kombination aus beidem (Quelle: Helmut Schatz, *Diabetologie kompakt*. Vol. 4. Auflage. 2006 Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart).

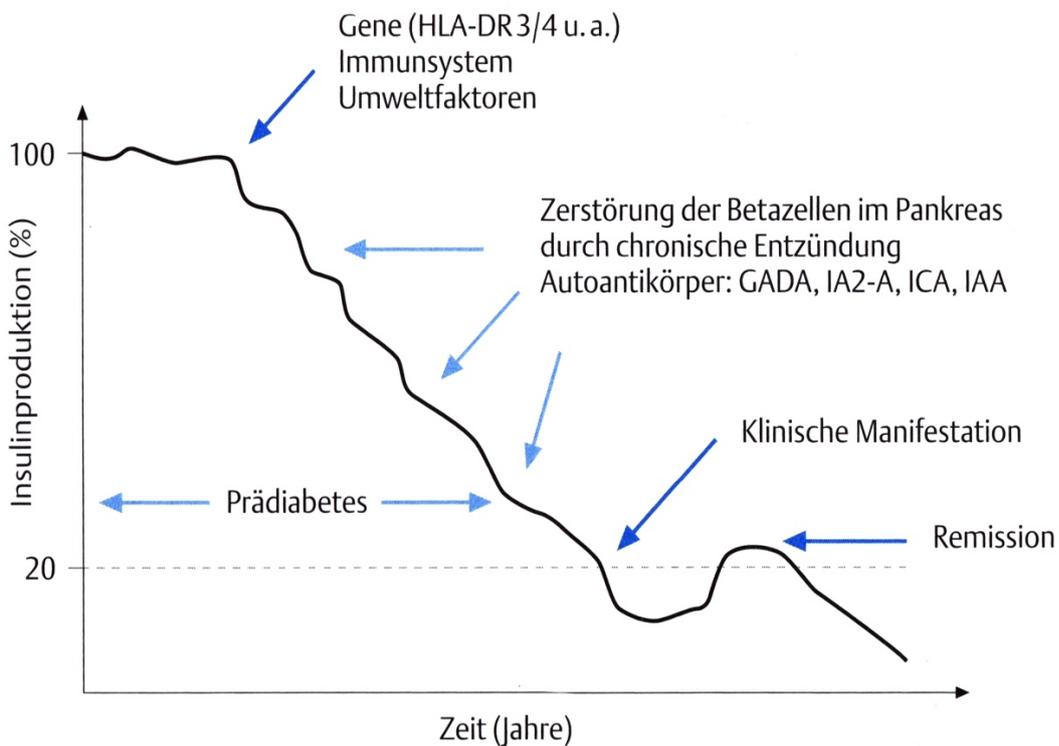


Abbildung 2: Darstellung einer möglichen Entstehungstheorie und des zeitlichen Verlaufs des Diabetes mellitus Typ 1 (Quelle: Helmut Schatz, *Diabetologie kompakt*. Vol. 4. Auflage. 2006 Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart).

Der Diabetes mellitus Typ 2 dagegen ist sowohl durch eine Störung der Insulinsekretion als auch durch eine periphere Insulinresistenz charakterisiert (7). Die Insulinresistenz kann sich schon ein Jahrzehnt vor der klinischen Manifestation entwickeln. Physiologisch kommt es postprandial insulinabhängig zur Glukoseaufnahme in Fettgewebe und Muskulatur. Zudem wird die Glukoseverwertung und -speicherung in der Leber stimuliert. Beim Diabetes mellitus Typ 2 ist dieser Prozess aufgrund der peripheren Insulinresistenz vermindert. Kompensatorisch liegt in dieser Phase häufig eine Hyperinsulinämie vor. Hinzu kommt, entweder bereits in der prädiabetischen Phase oder nach Manifestation des Typ 2 Diabetes mellitus, eine Insulinsekretionsstörung und ein Betazellmassenverlust, wodurch letztendlich ein relativer Insulinmangel vorliegt. Verstärkt wird die Kombination aus Insulinresistenz und gestörter Insulinsekretion durch Adipositas und Bewegungsmangel. Im Vordergrund einer Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 stehen daher Gewichtsreduktion, Lebensumstellung und der Einsatz oraler Antidiabetika, wohingegen der Diabetes mellitus Typ 1 immer insulinpflichtig ist (6, 7).

1.1.2 Akutkomplikationen eines Diabetes mellitus

Der Untergang bzw. die immunologisch bedingte Zerstörung der Betazellen im Pankreas führt zu einem Mangel an Insulin, der trotz adäquater Ernährung dauerhaft eine katabole Stoffwechsellage bedingt. Hierbei finden sich Störungen hauptsächlich im Fett-, Kohlenhydrat- und Eiweißstoffwechsel.

Im Kohlenhydratstoffwechsel dominiert die hyperglykämie Stoffwechsellage. Insulin hemmt unter physiologischen Bedingungen die Glykogenolyse in der Leber. Bei einem unbehandelten Diabetes mellitus fällt diese hemmende Wirkung weg. Zudem fördert Insulin an Muskulatur und Fettgewebe die Glukoseaufnahme über den Einbau des GLUT4 in die Plasmamembran. Durch die fehlende Glukoseaufnahme kommt es daher bei einem Diabetes mellitus zur postprandialen Hyperglykämie (8). Der schließlich dauerhaft erhöhte Blutzucker führt zu einem deutlichen Anstieg der Serumosmolalität mit nachfolgender Glukosurie und Elektrolytentgleisung. Klinisch äußert sich dieser Zustand in Polyurie und Polydipsie, Müdigkeit, Gewichtsverlust (9), Dehydratation bis hin zur Exikkose und Muskelkrämpfen (6). Im Fettstoffwechsel wirkt Insulin physiologisch antilipolytisch und vermindert hierdurch die Anzahl freier Fettsäuren im Blut. Bei Insulinmangel kommt es demnach zu einem Anstieg der

freien Fettsäuren im Blut. Diese wirken sowohl an der Leber als auch am Skelettmuskel dem Insulin entgegen, wie in Abbildung 3 dargestellt. Es folgt eine Steigerung der hepatischen Glukoneogenese und eine Aufnahmehemmung der Glukose im Skelettmuskel mit resultierender Hyperglykämie(6).

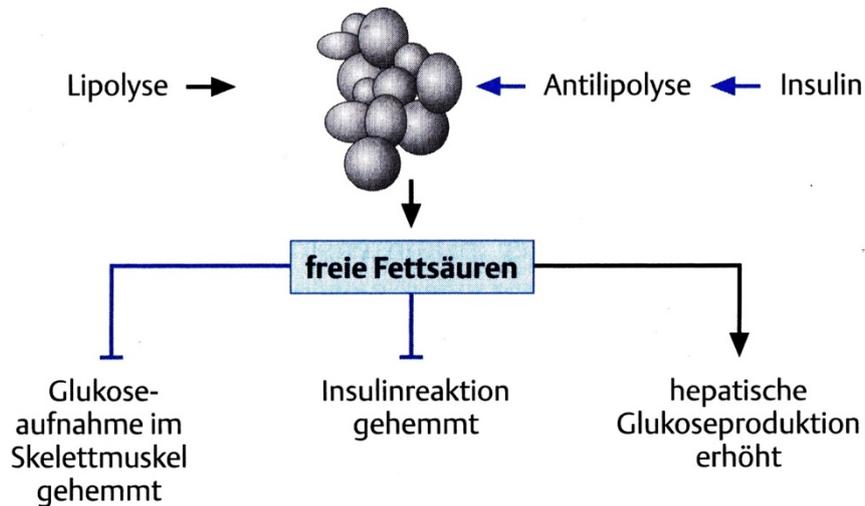


Abbildung 3: Unter physiologischen Bedingungen wird postprandial durch die Insulinausschüttung die Antilipolyse gefördert, wodurch es zur Fettspeicherung kommt. Während eines Insulinmangelzustands, wie er bei einem unbehandelten Diabetes mellitus Typ 1 vorliegt, entsteht ein Überangebot an freien Fettsäuren, welches negative Auswirkungen auf den Metabolismus hat (Quelle: Helmut Schatz, *Diabetologie kompakt*. Vol. 4. Auflage. 2006 Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart).

Aufgrund der katabolen Stoffwechsellage kommt es in der Leber verstärkt zur Bildung von Ketonkörpern, was die Gefahr einer Ketoazidose birgt. Sie liegt laut Definition vor, wenn gleichzeitig eine Hyperglykämie (Blutglukose > 11 mmol/L), eine Azidose (pH < 7,3) und eine Ketonämie (> 3 mmol/L) im Blut besteht (10). Im Proteinstoffwechsel ergibt sich durch den Mangel an Insulin eine gesteigerte Proteolyse. In der Klinik macht sich dies durch Muskelschwäche, Leistungsknick, Abgeschlagenheit und Infektneigung bemerkbar (6). Die genannten Symptome führen zu einem Gewichtsverlust des Patienten. Unbehandelt führt ein absoluter Insulinmangel zum Tod.

1.1.3 Langzeitkomplikationen bei Patienten mit Diabetes Mellitus

Trotz adäquater Behandlung mit Insulin und/oder oralen Antidiabetika kann es sowohl beim Diabetes mellitus Typ 1 als auch beim Typ 2 zu Langzeitkomplikationen kommen. Diese können sich an unterschiedlichen Organen bemerkbar machen. Unter anderem treten klinisch relevante Komplikationen an Auge, Niere, Herz, Gefäßen und Nerven auf (2). Diese können in mikro- und makroangiopathische Komplikationen unterscheiden werden. Zu den mikroangiopathischen Folgen zählen die diabetische Retinopathie, diabetische Nephropathie sowie die diabetische Neuropathie (11). Im Gegensatz dazu werden Schäden am Herz und den Herzkranzgefäßen sowie den großen Arterien den makroangiopathischen Komplikationen zugeordnet (zum Beispiel die Koronare Herzkrankheit oder die periphere arterielle Verschlusskrankheit) (12, 13). Morphologisch lässt sich die Atherosklerose bei Nichtdiabetikern und Diabetikern nicht unterscheiden. Allein aufgrund des frühzeitigen Auftretens und der distal betonten Läsionen könnten sich Rückschlüsse auf die Erkrankung ziehen lassen (6).

Herz- und Gefäßerkrankungen sind die häufigsten Todesursachen, von denen Patienten mit einem Diabetes mellitus betroffen sind. Besonders hoch ist zudem das Risiko für Myokardinfarkte, Schlaganfälle und die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) (14). Das Risiko hieran zu erkranken oder zu versterben korreliert mit einem erhöhten HbA1c-Wert und LDL/HDL-Verhältnis (6, 15).

Eine der mikroangiopathischen Langzeitkomplikation des Diabetes mellitus ist die diabetische Retinopathie, welche laut Untersuchungen des Robert-Koch-Instituts die dritthäufigste Erblindungsursache in Deutschland ist (16). Daher ist für Patienten mit Diabetes mellitus eine jährliche Kontrolle des Augenfundus notwendig, um den Erkrankungsbeginn früh zu erkennen und entsprechend behandeln zu können (6). Histologische Kennzeichen einer mikroangiopathischen Komplikation sind ein Verlust der Perizyten, eine Verdickung der subendothelialen Basalmembran, eine erhöhte Gefäßpermeabilität sowie eine Vermehrung der extrazellulären Matrix.

Außerdem entwickeln ca. 30 bis 40% der Patienten mit Diabetes mellitus nach zehn bis fünfzehn Jahren eine diabetische Nephropathie. Ursächlich wurden bisher metabolische, hämodynamische und genetische Faktoren identifiziert (17). Ungefähr ein Drittel aller Dialysepatienten ist aufgrund der diabetischen Nephropathie in Behandlung. Der Beginn der Erkrankung ist durch die glomeruläre Hyperfiltration gekennzeichnet. Anschließend kommt es

zum Abfall der glomerulären Filtration und endet in einer manifesten Niereninsuffizienz. Die glomeruläre Hyperfiltration entsteht durch hämodynamische Faktoren, die den Druck innerhalb des Glomerulus erhöhen. Darüber hinaus spielen metabolische Faktoren eine wesentliche Rolle. Diese beeinflussen die funktionellen Eigenschaften der glomerulären Basalmembran, in deren Folge eine Mikroalbuminurie entstehen kann. Aufgrund dessen ist ein jährliches Mikroalbumin-Screening für Patienten mit Diabetes mellitus von besonderer Bedeutung (6). Eine deutliche Einschränkung der Lebensqualität für Patienten mit Diabetes mellitus stellt die diabetische Neuropathie dar. Diese kann sich in einer peripheren sensomotorischen Polyneuropathie oder einer autonomen diabetischen Neuropathie mit kardialer, gastrointestinaler oder urogenitaler Beteiligung äußern. Diagnostisch ist deshalb neben einem regelmäßigen neurologischen Screening auf Areflexie, Veränderungen der Sensibilität oder Parästhesien eine Beobachtung der gastrointestinalen und urogenitalen Funktionen notwendig (13). Periphere Neuropathien können nach klinischem Bild, Verlauf, Lokalisation und der Frage nach symmetrischen oder asymmetrischen Auftreten eingeteilt werden (6).

Beim Diabetes mellitus ist die periphere sensomotorische Polyneuropathie von besonderer Bedeutung, da der Großteil der Patienten davon betroffen ist (18).

1.1.4 Periphere sensomotorische Polyneuropathie

1.1.4.1 Ätiologie

Die periphere sensomotorische Polyneuropathie ist bei Patienten mit Diabetes mellitus mit einem Anteil von fast 80%, die häufigste Form der Neuropathie (13). Diese Art der Neuropathie verläuft meistens chronisch, kann aber auch akut schmerzhaft beziehungsweise schmerzlos verlaufen (6). Bei der peripheren Polyneuropathie sind hauptsächlich die dünn myelinisierten Nervenfasern der Gruppe A δ (verantwortlich für stechenden Schmerz) und die unmyelinisierten Fasern der Gruppe C (verantwortlich für dumpfen Schmerz) betroffen (19). Die Symptome beginnen zuerst distal an den Füßen und schreiten mit der Zeit nach proximal voran. Bei der peripheren sensomotorischen Polyneuropathie kann zwischen Negativsymptomen (Schwäche, Taubheit, Sensibilitätsverlust oder Gangunsicherheit) und Positivsymptomen (z.B. brennen, kribbeln) unterschieden werden (20). Besteht die Neuropathie über einen langen Zeitraum, so kann es zu Komplikationen wie neuropathischen

Fußläsionen (zum Beispiel Fußsulkus), diabetischer Neuroosteoathropathie (Charcot-Fuß) oder zu nichttraumatischen Amputationen kommen (19-21). Diese Krankheitsbilder bedingen im beruflichen und sozialen Bereich eine erhebliche Funktions- und Leistungseinschränkung für die betroffenen Patienten (22). Vileikyte et al. fanden heraus, dass durch die Polyneuropathie bei Patienten mit Diabetes mellitus gehäuft depressive Symptome oder depressive Verstimmungen vorkommen. Als mögliche Ursache für die Entwicklung der depressiven Symptome vermuten die Autoren neben den auftretenden Schmerzen vor allem eine bestehende Unsicherheit (23). Darüber hinaus können die Schmerzen zu einem gestörten Schlaf und daraus resultierend zu Müdigkeit, Konzentrationsschwierigkeiten sowie Leistungsminderung führen (24).

Es sind zahlreiche Risikofaktoren für die Entstehung einer peripheren Polyneuropathie bekannt. Hierzu zählen unter anderem die Erkrankungsdauer, das Alter des Patienten, die Körpergröße und des Weiteren das Vorhandensein von anderen Langzeitschäden wie diabetischer Retino- oder Nephropathie (19, 25). Die Kontrolle und Einstellung einer normoglykämischen Stoffwechsellage schützt vor einem erhöhten Blutzuckerspiegel, dem wohl wichtigsten Risikofaktor für das Auftreten einer peripheren Polyneuropathie (20). Alkohol- und Nikotinkonsum stellen unabhängige Risikofaktoren dar. Hypertonie und Hyperlipidämie begünstigen zudem die periphere Polyneuropathie. Ihre therapeutische Beeinflussung bietet somit Ansätze für Präventionsmöglichkeiten der Erkrankung (19).

1.1.4.2 Pathophysiologische Aspekte

Die Pathogenese der Polyneuropathie ist ein multifaktorielles Geschehen, welches bis heute noch nicht vollständig verstanden und erforscht ist (20). Grundlegend lässt sich eine Beeinflussung der Stoffwechselprozesse in Nerven und Gefäßen durch die bei Diabetikern vorkommende Hyperglykämie festhalten. Unterschiedliche Hypothesen für Ursache und Entstehung der peripheren Polyneuropathie sollen nachfolgend kurz dargestellt werden. Auf der einen Seite wird angenommen, dass durch die vermehrte Anreicherung von Fruktose aus dem Polyol-Weg eine osmotische Dysbalance entsteht, die direkt zur Nervenschädigung führt. Auf der anderen Seite entsteht im Stoffwechselweg der Fruktose vermehrt NADH, wodurch es in der Atmungskette zur verstärkten Bildung von freien Sauerstoffradikalen kommen kann. Diese schädigen wiederum ebenfalls die Nerven (1, 6, 26). Außerdem ist bei Patienten mit

Polyneuropathie eine Abnahme der Na⁺/K⁺-ATPase Aktivität beobachtet worden, was zu einer Verlangsamung der Nervenleitgeschwindigkeit und damit einer neuronalen Funktionseinschränkung führt. Eine weitere Erklärung ist, dass die vermehrte Anreicherung von *advanced glycation end products* (AGEs), die an ihrem Rezeptor, *receptor for advanced glycation end products* (RAGE), binden und intrazelluläre Signalkaskaden wie beispielsweise die Aktivierung von NF-κB auslösen, letztendlich zu neuronalem Stress und Nervenschäden führen können (1, 6).

Diese und weitere Prozesse sind vermutlich auch für die Entstehung der Mikroangiopathie mitverantwortlich. Aus der dadurch entstehenden Hypoxie folgen funktionelle und morphologische Schäden an den Nerven (siehe Kapitel 1.2).

1.1.4.3 Diagnostik

Eine weiterführende Diagnostik der Neuropathie sollte nicht nur bei Patienten mit Symptomen sondern auch bei asymptomatischen Patienten mit Diabetes mellitus erfolgen. Daher wird ein Screening durchgeführt (19). Es wird mit einer ausführlichen Anamnese des Patienten begonnen, die Erkrankungsdauer, Diabetestherapie und die bereits bekannten Spätkomplikationen beinhaltet. Nachfolgend sollten die Füße gründlich inspiziert werden, mit besonderem Augenmerk auf Haut, Schweißsekretion, Blasen, Infektionen oder Ulcera. Darauf folgt die körperliche und neurologische Untersuchung, wobei der Pulsstatus, die Schmerz-, Temperatur-, Berührungs- und Vibrationsempfindung überprüft werden sollen. Darüber hinaus ist es sinnvoll, die Muskeleigenreflexe bei den Patienten zu testen (19, 27). Mit Hilfe dieser Untersuchungen erfolgt ein Scoring, mit dem der Schweregrad der subjektiven Beschwerden und der Schweregrad des neurologischen Defizits des Patienten eingeschätzt werden kann. Andere mögliche Ursachen für die Beschwerden, wie zum Beispiel die pAVK, Alkoholmissbrauch, Vitamin B12-Mangel oder Venenerkrankungen sind differentialdiagnostisch auszuschließen (19, 28). Allerdings fehlen bei der Diagnostik der diabetischen Polyneuropathie objektive, nicht-invasive und zuverlässig reproduzierbare Untersuchungsmethoden. Die Bestimmung der Nervenleitgeschwindigkeit liefert objektive Ergebnisse. Allerdings wird die Funktion der C- und Aδ-Fasern hierdurch nicht erfasst. Aufgrund dessen ist die Methode für die Früherkennung einer peripheren Polyneuropathie nicht geeignet. Eine Hautbiopsie ist zwar sehr aussagekräftig, um C- und Aδ-Fasern zu

quantifizieren, aber erfolgt invasiv und ist daher zur regelmäßigen Verlaufskontrolle ungeeignet (19).

Eine neue Methode zur Diagnostik der Small-Fiber Neuropathie stellt die CLSM (Corneale Laser-Scanning Mikroskopie) dar. Sie ermöglicht nicht invasiv die Betrachtung des subbasalen Nervenplexus der Cornea, welcher bei einer Polyneuropathie frühzeitig betroffen ist. Die Methode besitzt daher das Potential, sowohl in der Früherkennung als auch in der Langzeitkontrolle der diabetischen Polyneuropathie eingesetzt zu werden (29).

1.1.4.4 Therapie

Die Therapie der peripheren sensomotorischen Polyneuropathie gestaltet sich schwierig, da der einzige kausale Ansatz die optimale Stoffwechseleinstellung ist (30). Auch in der nordamerikanischen DCCT-Studie konnte gezeigt werden, dass eine Senkung des HbA1c zu einer Verbesserung der Langzeitfolgen führt. Daher wird eine intensivierete Insulintherapie für alle Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 empfohlen (6). Weitere Ziele der Therapie sind die Verlangsamung der Erkrankungsprogression und das Vermeiden von neuropathischen Ulcera an den Beinen und Füßen. Dabei ist es wichtig, so früh wie möglich Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, hohe LDL-Werte, Alkohol- und Nikotinkonsum zu vermeiden bzw. zu therapieren. Die Entstehung eines diabetischen Fußsyndroms sollte durch regelmäßige Kontrolle und Pflege verhindert werden. Zudem ist eine adäquate Schmerztherapie zur Reduktion der auftretenden neuropathischen Schmerzen wichtig. Hierbei spielt der Einsatz von Medikamenten zur Schmerzlinderung und Verbesserung der Lebensqualität eine wichtige Rolle (1). Diese therapeutische Maßnahme ist rein symptomatisch und nicht kausal. Es kommen Analgetika wie Ibuprofen und Tramadol, Antikonvulsiva wie Pregabalin und Gabapentin, sowie Antidepressiva wie Duloxetin und Amitriptylin zum Einsatz. Der Einsatz dieser Medikamente erfolgt nach individueller Evaluation von Verträglichkeit, Interaktionen mit anderen Medikamenten und auftretenden Nebenwirkungen. Als eine weitere Möglichkeit gibt es die physikalische Therapie, welche aber meist ohne essentiellen Wirknachweis bei den Patienten ist (1, 6, 19, 20).

1.2 RAGE und dessen Liganden

1.2.1 Entstehung und Bedeutung von AGEs

Advanced glycation end products (AGEs) entstehen als Nebenerzeugnisse des menschlichen Metabolismus und können sowohl durch exogene (zum Beispiel Ernährung) als auch durch endogene Einflüsse (zum Beispiel Hyperglykämie oder Entzündung) erhöht sein (31). Die AGE-Bildung erfolgt bei Proteinen mit langer sowie auch kurzer Lebensdauer, Peptiden, Fettbestandteilen und Nukleinsäuren. Die Entstehung erfolgt im ersten Schritt mit der nicht enzymatischen Bildung einer Schiff'schen Base, wobei die Carbonylgruppe der Glukose mit einer Aminogruppen von Proteinen reagiert. Im zweiten Schritt findet eine Amadori-Umlagerung statt, welche die Umverteilung von Glykosylaminen beschreibt. Im letzten Schritt erfolgen mehrere komplexe Reaktionen, welche bisher nur unvollständig erforscht sind, die letztendlich zur Entstehung eines AGE führen (32-34). Die Glykierung der Proteine kann zur Funktionseinschränkung bis hin zum Funktionsverlust führen. Es wird zudem vermutet, dass sie sich verstärkt an Gefäßwänden ablagern und somit zur Entstehung von Atherosklerose beitragen (35). Ein Beispiel für ein AGE ist das S/100 Calgranulin, welches ein Calcium-bindendes Polypeptid ist und bei chronischen Entzündungen vermehrt extrazellulär akkumuliert. Darüber hinaus gibt es noch HMGB1-Proteine, die bei der Zellnekrose eine Rolle spielen (36-38). Sie tragen zudem zur Entstehung eines Diabetes mellitus bei und begünstigen eine diabetische Neuropathie, Nephropathie sowie makrovaskulären Erkrankungen (38). Des Weiteren korrelieren AGEs positiv mit dem Alter eines Menschen. Je älter man ist, desto höher ist der Anteil an diesen Produkten in sehr langlebigen Proteinen. Dies lässt darauf schließen, dass AGEs auch im Alterungsprozess eine Rolle spielen könnten (35).

1.2.2 Aufbau und Funktion des RAGE

Der *receptor for advanced glycation end products* (RAGE) ist ein Transmembranrezeptor der Immunglobulin Superfamilie und kann in fast allen Körperzellen exprimiert werden. Eine hohe Expression ist in Lungen- und Hautzellen zu finden. In anderen Geweben scheint die Expression herunterreguliert. Er besitzt drei Immunglobulin-ähnliche Anteile, eine V- und zwei C-Domänen. Außerdem gehört eine Transmembrandomäne sowie ein zytoplasmatischer Anhang aus Aminosäuren zum Molekül (39-42). An den Rezeptor binden neben AGEs

unterschiedliche Liganden. Er reagiert auch mit den Oberflächenmolekülen von Bakterien, Prionen und Leukozyten. Bindet nun einer der genannten Liganden an den Rezeptor, so werden intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst, insbesondere die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs. NF- κ B ist ein proinflammatorischer Transkriptionsfaktor, welcher als einer der ersten aktiviert wird, um zum Beispiel die Zellabwehr in die Wege zu leiten (43, 44).

Normalerweise liegt er an einem Inhibitor namens I κ B α im Zytoplasma gebunden vor, welcher aber schnell durch Phosphorylierung so verändert wird, dass er NF- κ B freigibt und dieser aktiv werden kann (siehe Abbildung 4) (44). NF- κ B fungiert als Transkriptionsfaktor für verschiedene Zytokine, Adhäsionsmoleküle, prothrombotische und vasokonstriktive Genprodukte sowie für RAGE und I κ B α (44-46). So führt die Aktivierung von NF- κ B zu einer Vielzahl von modulierenden Reaktionskaskaden (38).

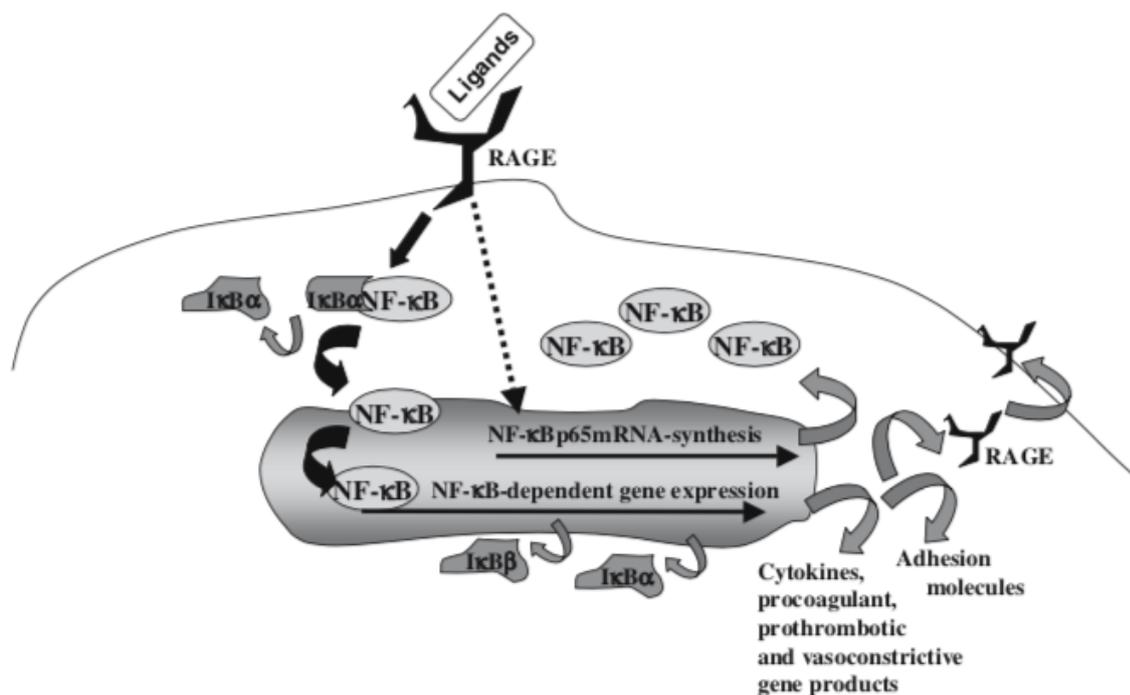


Abbildung 4: RAGE-vermittelte NF- κ B Aktivierung und die damit verbundene Genexpression von Zytokinen und anderen proinflammatorischen Faktoren (Quelle: Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products: J Mol Med; 2005;(83):876-86.).

Durch NF- κ B-Aktivierung wird RAGE verstärkt exprimiert. Bei anhaltender Aktivierung durch AGEs oder anderen Liganden kommt es zu einer Hochregulierung der Transkription und somit zur Überexpression des RAGE und dadurch zu vermehrten Bindungsstellen für Liganden (siehe Abbildung 5) (43, 45). Dieser sich selbstverstärkende Kreislauf führt zu einem dauerhaften inflammatorischen Zustand der Zelle, der in zellulärer Dysfunktion enden kann (43, 47). Durch die Aktivierung von RAGE können auch noch andere Wege der Signaltransduktion aktiviert werden, darunter die Ras-MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) und PKC (Protein Kinase C) Signalkaskade (48).

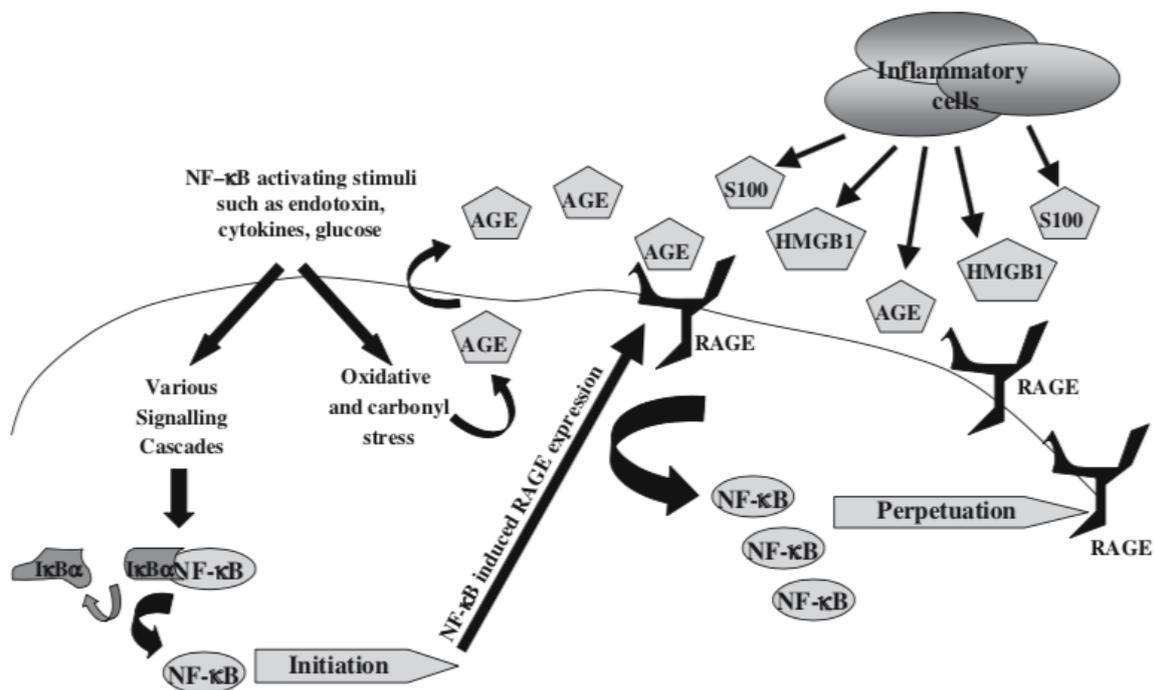


Abbildung 5: Durch Liganden von RAGE ausgelöste Hochregulierung der RAGE Expression führt zur Daueraktivierung der Zelle und zu vermehrten Bindungsstellen für Liganden (Quelle: Angelika Bierhaus et. al, Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products; 2005).

AGEs akkumulieren bei vielen inflammatorischen Krankheiten, wie zum Beispiel Diabetes mellitus, Morbus Alzheimer und chronischem Nierenversagen. Zirkulierende *soluble* RAGE (sRAGE) sind ein physiologischer Gegenspieler zum RAGE und in der Lage AGEs zu binden. Diese verkürzte extrazelluläre Variante des Rezeptors wurde bereits in Studien dazu eingesetzt, die Liganden verstärkt in der Blutbahn zu binden. Auf diese Weise wird verhindert, dass Liganden an den RAGE gelangen (47, 49). Hierdurch wurde der Einfluss des AGE-RAGE Systems auf unterschiedliche Krankheiten untersucht. Es gibt aber auch andere Möglichkeiten

den RAGE-Rezeptor zu blockieren. So kam in einem Tiermodell ein monoklonaler anti-RAGE Antikörper zum Einsatz. Die Anwendung des Antikörpers wirkte sich in dieser Studie positiv auf den Verlauf einer Sepsis aus (50). Ebenso konnten Blondonnet et. al im Tierversuch zeigen, dass durch die Verabreichung des anti-RAGE Antikörpers und des sRAGE das ARDS (*acute respiratory distress syndrome*) bei den Tieren deutlich milder als in der Kontrollgruppe verlief (51). Dies verdeutlicht die wichtige Rolle des RAGE für unterschiedliche Pathologien.

1.3 Das menschliche Auge und die Cornea

1.3.1 Aufbau des menschlichen Auges

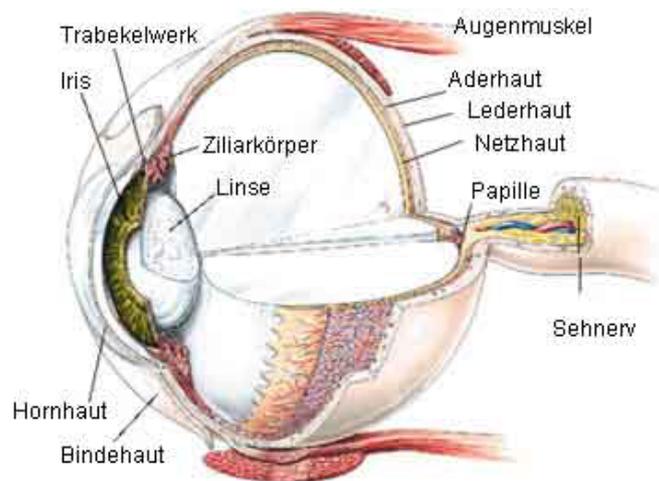


Abbildung 6: Makroskopischer Aufbau des menschlichen Auges. (Quelle: <https://www.augentagesklinik-spreebogen.de/de/das-auge> Abruf: 15.03.2019)

Das menschliche Auge besteht aus drei verschiedenen Schichten: der äußeren, der mittleren und der inneren Augenhaut. Die äußere Schicht des Auges besteht zum einen aus der Cornea (Hornhaut) und zum anderen aus der Sklera (Lederhaut). Letztere setzt die mechanische Funktion der Cornea nach hinten fort, verliert aber ihre Transparenz und ist darum weiß. Auf der Sklera liegend, befindet sich die Konjunktiva (Bindehaut). Diese verbindet den vorderen Augenabschnitt mit den Augenlidern. Die mittlere Augenhaut besteht aus der Iris (Regenbogenhaut), dem Corpus ziliare (Ziliarkörper) sowie der Choroidea (Aderhaut) welche zusammen die Uvea bilden. In einer zirkulären Aussparung der Iris befindet sich die Pupille.

Hierdurch kann der Lichteinfall im Auge kontrolliert werden kann, da die Iris sich zirkulär zusammenziehen oder auseinanderdehnen kann. Das Corpus ziliare ist für die Produktion des Kammerwassers zuständig, welches den intraokulären Druck im Auge reguliert und das Auge ernährt. Außerdem kann das Corpus ziliare die Linse verformen, um somit deren Brechkraft zu verändern.

Die innere Schicht besteht aus der Netzhaut (Retina). Die Retina ist für die Umwandlung eines Lichtreizes in elektrische Impulse zuständig. Diese Impulse werden dann über den Sehnerv an den Occipitallappen, das Sehzentrum im Gehirn, weitergeleitet. Im Inneren des Augapfels befindet sich der Glaskörper. Dieser besteht zu 98% aus Wasser und zu 2% aus Hyaluronsäure sowie Kollagenfasern. Er ist für die Stabilität des Bulbus zuständig und ebenso wie die Cornea transparent. Außerdem wirkt er einer Netzhautablösung entgegen (52-54). Der makroskopische Aufbau des menschlichen Auges ist exemplarisch in der Abbildung 6 zu sehen.

1.3.2 Mikroskopischer Aufbau der menschlichen Cornea

Die Cornea ist, von außen nach innen betrachtet, in folgende fünf (bzw. sechs) Schichten unterteilt:

1. Epithelschicht
2. Bowman-Membran
3. Stroma
- (4. Dua Schicht)
5. Descement-Membran
6. Endothelschicht

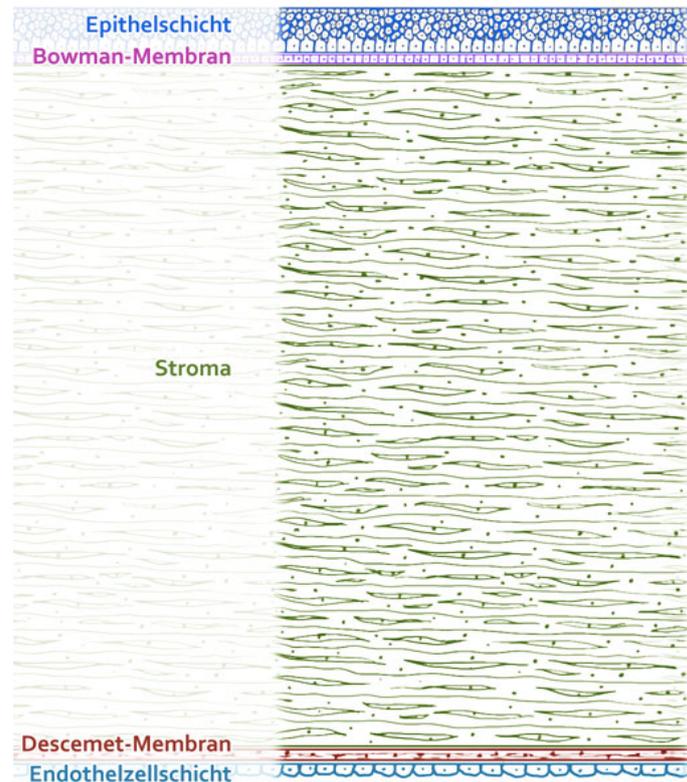


Abbildung 7: Mikroskopischer Aufbau der Cornea. Von oben nach unten: Epithelschicht, Bowman-Membran, Stroma, Descemet-Membran, Endothelschicht (Quelle: <https://www.lasikon.de/auge/hornhaut-cornea/> Abruf: 21.03.2019).

In Abbildung 7 ist der mikroskopische Aufbau der Cornea dargestellt. Die Dua Schicht ist auf der Abbildung nicht dargestellt, da ihre Definition als eigenständige Schicht noch diskutiert wird. Das Epithel ist die oberflächlichste Schicht der Cornea und in der Lage, sich selbstständig zu regenerieren. Die Bowman-Membran oder auch Membrana limitans anterior (ca. 8-12 μm) und das Stroma enthalten Kollagenfasern (55). Das Stroma ist die breiteste Schicht der Cornea und sorgt für ihre Transparenz. Außerdem enthält sie neben den Kollagenfasern auch Keratinozyten und Proteine. Das Endothel kann durch aktive Pumpmechanismen ständig Wasser aus der Cornea befördern und trägt somit ebenfalls zur Transparenz bei. Dua et al. postulierten im Jahre 2013 eine sechste Schicht der Hornhaut. Diese azelluläre Schicht befindet sich zwischen dem Stroma und der Descemet-Membran oder auch Membrana limitans posterior und besteht aus Kollagenfibrillen (56).

1.3.3 Funktion der Cornea

Die Cornea wird auch als das durchsichtige Fenster des Bulbus bezeichnet (52) und bietet neben dem mechanischen Schutz des Auges mit +43 dpt auch den Großteil (insgesamt ca. +60 dpt) der gesamten Brechkraft des Auges. Das Epithel der Cornea verhindert durch engen Zellzusammenschluss (unter anderem durch Gap- und Tight Junctions) das Durchdringen von Krankheitserregern und ist teilweise für die Regulation des Wasserhaushalts im Stroma verantwortlich (52). Die Cornea weist eine hohe Transparenz auf, was zum einen dadurch möglich ist, dass die Kollagenfasern in einem bestimmten Winkel (parallel zur Cornea-Oberfläche) zum sichtbaren Licht angeordnet sind und zum anderen eine geringe Wassereinlagerung in den Zellen vorhanden ist, welche durch das Endothel der Cornea ständig im Gleichgewicht gehalten wird. Außerdem erlaubt die extrem hohe Dichte an Nervenfasern in der Cornea dem Körper eine sehr feine und sensible Antwort auf äußerliche Reize. Als Beispiel wäre hier der Lidschlussreflex zu nennen (57). Sensorisch wird dieser Teil von dem N. ophthalmicus aus dem N. trigeminus innerviert. Sympathisch wird die Cornea von Nervenfasern aus dem Ganglion cervicale superior versorgt. Durch diese Innervation können mehrere neuromodulatorische Wirkungen, wie Ionen-transport, Zellproliferation, Differenzierung, Adhäsion und Migration sowie die Wundheilung beeinflusst werden (58, 59). Regulatorische Zusammenhänge dieser Prozesse sind weiterhin Gegenstand der Forschung. Es gibt Theorien, wonach trophische Effekte über verschiedene Neurotransmitter oder Neuropeptide wie zum Beispiel CGRP, Substanz P oder Norepinephrin geregelt sein sollen (60, 61).

1.3.4 Aufbau des subbasalen Nervenplexus der Cornea

Der subbasale Nervenplexus der Cornea befindet sich zwischen der Epithelschicht und der Bowman-Membran. Er umfasst ungefähr 5400-7200 Nervenfaserbündel und ist damit eines der am bestinnerviertesten Gewebe im menschlichen Körper (57, 62). Diese Nerven bestehen aus A δ und C-Fasern. Die A δ -Fasern haben eine dünne, die C-Fasern gar keine Myelinscheide, weswegen sie auch als erstes von einem Untergang betroffen sind (63). Der Ausgangspunkt für den Plexus sind vier große stromale Nerven, welche durch die extraokulären Muskeln treten, von da aus zum Limbus corneae ziehen und sich dann in viele Nervenäste aufspalten. Kurz nach dem Übertritt durch den Limbus verlieren die Nerven ihre Myelinscheide und das

Perineurium, was wichtig für die Transparenz der Cornea ist (57). Aus diesen gehen dann kleinere, dünnere Epithelnerven hervor, welche von der Peripherie in die Mitte der Cornea ziehen. Sie bilden dicke Nervenfaserbündel und formen dann in der Zentralregion der Cornea einen Wirbel. Außerdem gibt es noch kleinere freie Nervenendigungen, welche sich abspalten und das Epithel der Cornea innervieren. (64). Die subbasalen Nerven des Plexus liegen demnach eher zentral und weisen eine viel höhere Dichte als stromale Nerven auf. In Abbildung 8 ist die Nervenordnung in der Cornea exemplarisch dargestellt. Wenn die Nerven im Zuge einer peripheren Polyneuropathie verloren gehen, kann es vorkommen, dass die Tränendrüse nicht mehr ausreichend Flüssigkeit produziert und somit ein trockenes Auge resultiert. Dies kann zu Epitheldefekten der Cornea oder einer oberflächlichen Keratitis führen (65). Dies ist ein Grund, die CLSM (Corneale Laser-Scanning Mikroskopie) zur Diagnostik der Cornea weiterzuentwickeln und zu etablieren.

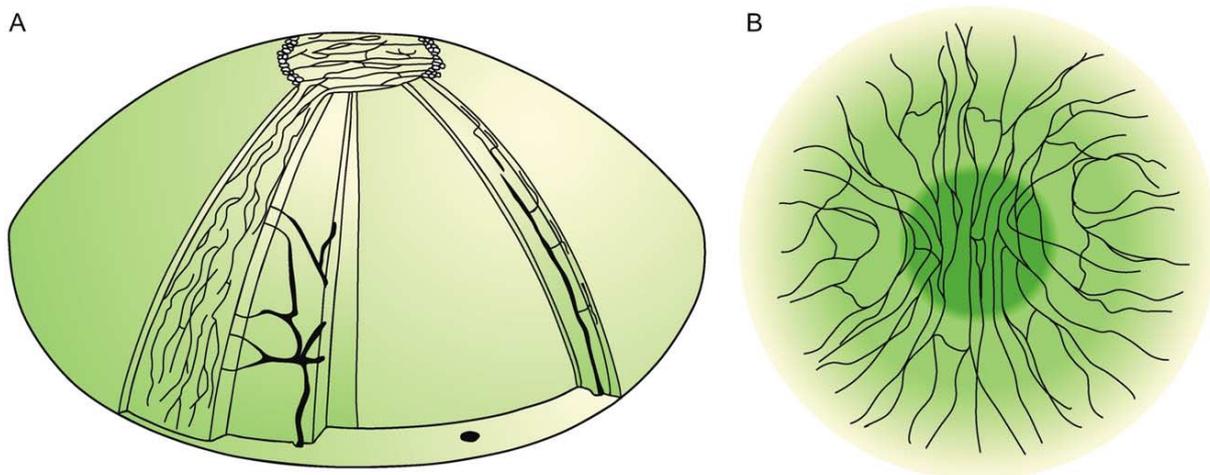


Abbildung 8: A: Darstellung von Nervenverläufen der stromalen und subbasalen Nervenfaserbündel in einer menschlichen Cornea. B: Schematische Darstellung der Nervenfaserverläufe im Zentrum. In der Zentralregion der Cornea laufen die Nerven annähernd parallel von oben nach unten. In der Peripherie orientieren sie sich eher in die seitlichen (nasalen/temporalen) Regionen. (Quelle: Muller, L.J., et al., Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp Eye Res*, 2003. 76(5): p. 521-42.)

1.4 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie der Cornea

1.4.1 Grundprinzipien der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie

Mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop kann das zu untersuchende Objekt von einem Laser punktwise abgescannt werden. Es sind dadurch Aufnahmen in hoher Auflösung in allen drei Ebenen (x , y , z) möglich. Die Lichtquelle ist ein Laser, welcher auf einen Dichroitischen Spiegel trifft und durch die Objektivlinse auf die Probe fokussiert wird. Das zurückstrahlende Licht der Fluorochrome in der Probe hat eine höhere Wellenlänge und gelangt gebündelt durch die Objektivlinse auf den Dichroitischen Spiegel zurück und von da aus durch eine Lochblende auf den Detektor. Aufgrund dieses Aufbaus erreicht nur Licht aus der Fokalebene den Detektor. Dadurch werden gute Abbildungen in verschiedenen Tiefen des Objekts ermöglicht, welche zu hochauflösende Bilder am Computer zu rekonstruiert werden können.

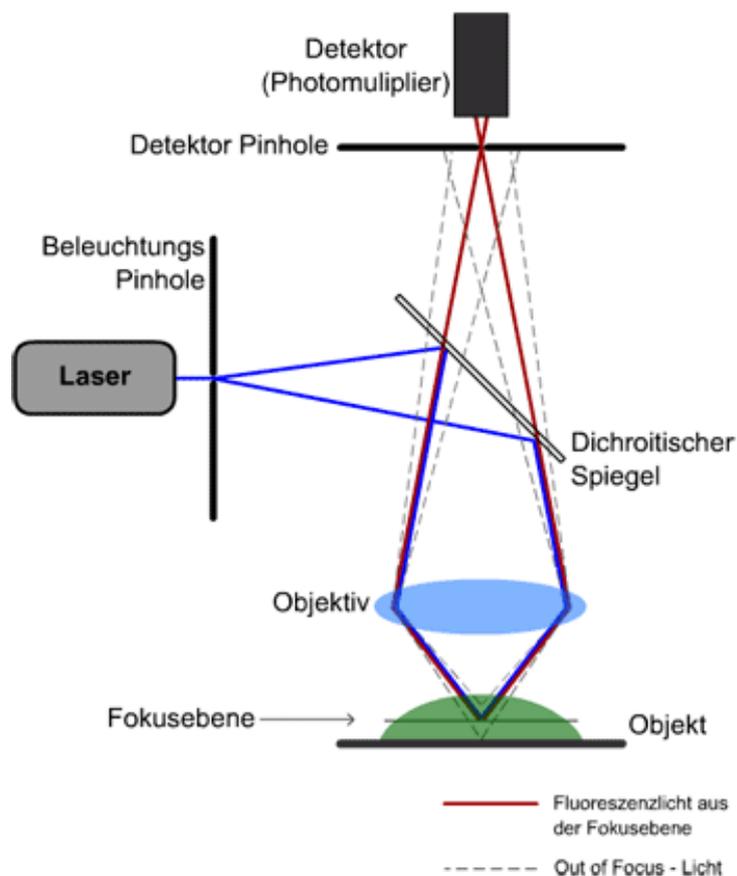


Abbildung 9: Aufbau und Prinzip des konfokalen Laser-Scanning Mikroskops

(Quelle: Lichtscheidl, Irene und Volgger, Michael; Universität Wien; URL:

https://www.univie.ac.at/mikroskopie/3_fluoreszenz/clsm/1_einleitung.htm Abruf:

24.04.2019)

Der Aufbau eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops ist in Abbildung 9 beispielhaft dargestellt. Vorteil der Untersuchungsmethode ist die sehr hohe Qualität der Aufnahme, die eine anschließende Quantifizierung der Bilder erleichtert. Allerdings ergeben sich durch die Untersuchungsmethode auch Nachteile. Da zum Beispiel durch zu hohe Laserstrahlung die Probe verändert werden kann, weshalb eine Optimierung der Parameter nötig ist, um eine Fehlinterpretation von Artefakten zu vermeiden (66, 67).

1.4.2 Corneale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM)

Die konfokale Laser-Scanning Mikroskopie der Cornea (auch Corneale Laser-Scanning Mikroskopie, CLSM) ist ein neueres Verfahren, mit dessen Hilfe Bilder aus jeder einzelnen Schicht der Cornea (von Epithel bis Endothel) aufgenommen werden können. Dieser Aufbau ist eine Kombination aus dem Heidelberger Retina Tomograph II und dem Rostocker Cornea Modul, wie in Abbildung 10 zu erkennen ist.

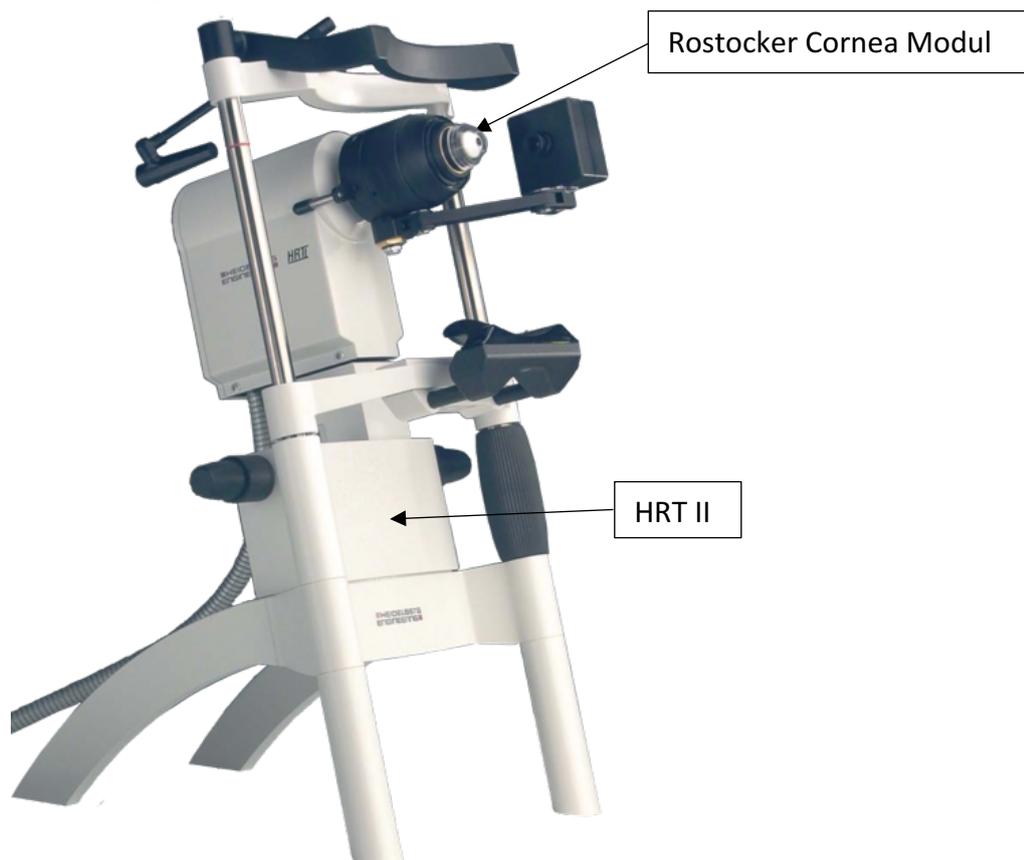


Abbildung 10: Darstellung eines Cornealen Laser Mikroskops. Das weiße Gerät mit der Aufschrift HRTII ist der Heidelberger Retina Tomograph II. Der schwarze Aufsatz auf dem Retina Tomograph ist das Rostocker Cornea Modul, das speziell für die Untersuchung des

vorderen Augenabschnitts in Rostock entwickelt wurde. (Quelle: Heidelberg Engineering GmbH – Gerhart-Hauptmann-Straße 30; 69221 Dossenheim, Deutschland).

Durch das Aufbringen der an den vorderen Augenabschnitt adaptierten Optik ist es möglich, eine schnelle, reproduzierbare in vivo Mikroskopie der Cornea durchzuführen. Diese nicht-invasive Methode erfordert nur einen Kontakt zwischen der auf dem Objektiv aufgebrachten Polymethylmetacrylat-Kappe oder auch TomoCap und der Augenoberfläche, die mit Hilfe eines Gels hergestellt werden kann. Neben der Diagnostik cornealer Erkrankungen könnte die CLSM in Zukunft als objektives, diagnostisches Verfahren zur Beurteilung der peripheren Neuropathie dienen und somit die Möglichkeit bieten, früher therapeutisch zu intervenieren (29, 68). Bisher konnte eine Diagnose der peripheren Neuropathie erst nach dem Auftreten von klinischen Symptomen oder bei Zeichen von Nervenschädigungen festgestellt werden. Da in der Cornea die Nerven bereits vor dem Auftreten von klinischen Symptomen reduziert sind, könnte die CLSM als Frühdetektion der Erkrankung dienen (66). Die Untersuchung ist umfangreich, da die Nerven auf der Cornea inhomogen verteilt sind. Dadurch sind Einzelbilder nicht ausreichend, um den subbasalen Nervenplexus zu quantifizieren (69). Es kann deshalb sinnvoll sein, ein voll automatisiertes Verfahren zu verwenden, um größere Bereiche der Cornea zu detektieren (29).

1.4.3 Beispiele verschiedener Cornea-Schichten mittels CLSM

In der CLSM kann man sehr gut die einzelnen Schichten der Cornea bildlich darstellen. In Abbildung 11 sind einige Beispiele für die verschiedenen Abschnitte aufgezeigt.

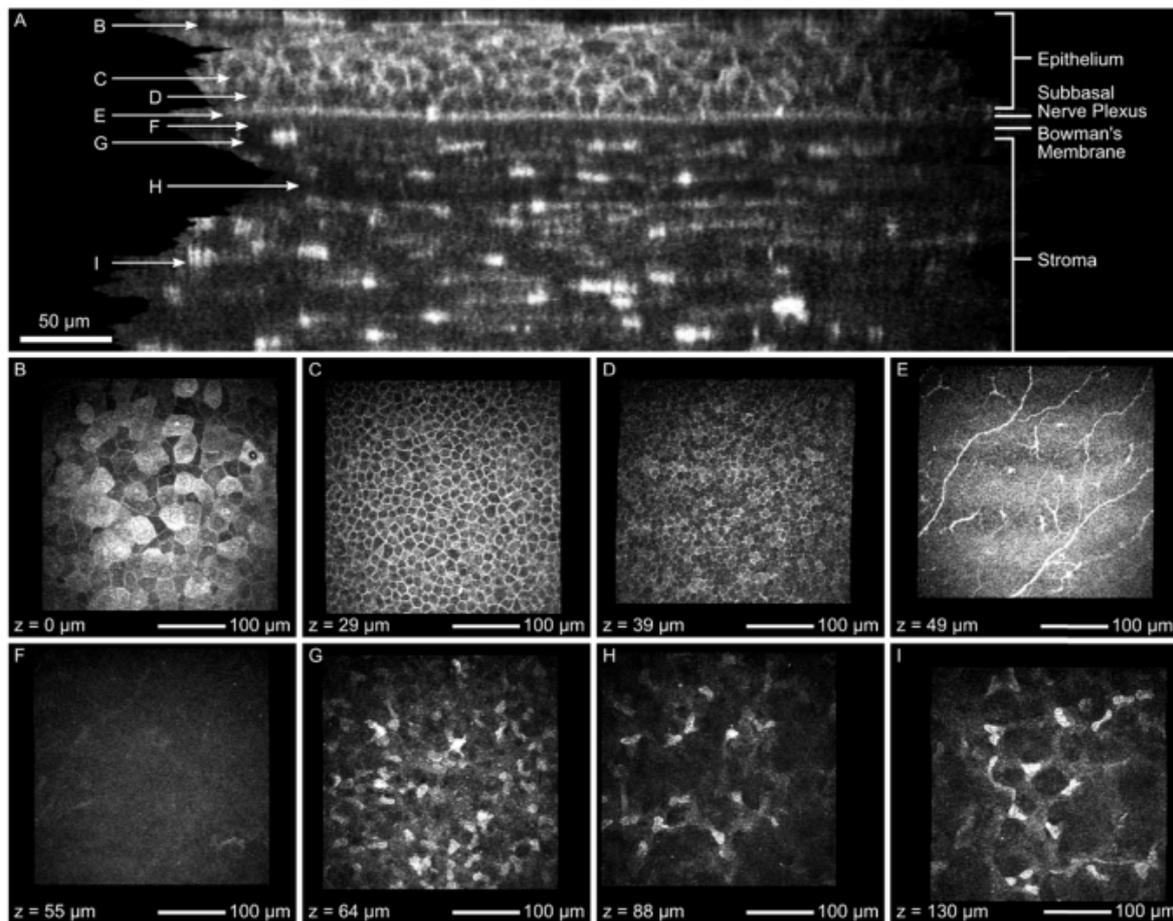


Abbildung 11: Orthograde Schnitt (A) eines Z-Stack Bildes der Cornea nach KIT-Alignment ohne Bildüberlagerung verschiedener Schnitte und exemplarische Aufnahmen verschiedener Zellschichten: Superfizialschichten (B), Flügelzellen (C), Basalzellen (D), sub-epithelialer Nervenplexus (E), Bowman-Membran (F) und Stroma (G, H, I). Die Aufnahmen wurden rekonstruiert unter Benutzung einer konkaven TomoCap. (Quelle: Stachs et. al; Cellular in vivo 3D imaging of the cornea by confocal laser scanning microscopy)

1.5 Fragestellung

Die diabetische Neuropathie stellt eine deutliche Einschränkung der Lebensqualität für Patienten mit Diabetes mellitus dar. Sowohl beim Menschen als auch im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Nerven des subbasalen Plexus der Cornea sehr frühzeitig bei Ausbildung einer diabetischen Neuropathie verloren gehen. Dieser Prozess konnte in diabetischen Mäusen mittels CLSM aufgezeigt werden. Bisher ist unklar, warum die Nervenfaserdichte der Cornea bereits reduziert ist, während sie in der Haut noch unverändert ist. Interessanterweise ist die Expression des RAGE in der Cornea aber signifikant höher als in anderen Geweben (70). Da der RAGE nach Bindung von AGEs über Aktivierung von NF- κ B ein proinflammatorisches Signal an die Zellen sendet (38), könnte es dadurch zu einem zellulären Stress der Nervenfasern kommen. Aufgrund der Hyperglykämie kommt es im Diabetes mellitus zu einer erhöhten Bildung von AGEs. Deshalb sind mehr Liganden für den RAGE vorhanden, wodurch ein selbstverstärkender negativer Kreislauf entsteht (38) und ein Verlust der Nervenfasern begünstigt wird (71). Um die Rolle dieser AGE-RAGE Achse in der diabetischen Neuropathie weiter zu untersuchen, wurde ein RAGE Knockout Mausmodell verwendet. Bei diesem Mausmodell wird in allen Zellen der extrazelluläre Anteil des RAGE Rezeptors nicht exprimiert. Ziel dieser Arbeit war es

1. in den RAGE Knockout Tieren mittels Streptozotocin einen Diabetes mellitus zu induzieren und die Tiere über 20 Tage mit einer Kontrollgruppe zu vergleichen.
2. Blutzucker, Gewicht und HbA1c-Wert der Tiere longitudinal zu beschreiben.
3. den subbasalen Nervenplexus mittels CLSM longitudinal in vivo zu analysieren und die Bilddaten zu quantifizieren.
4. die Tiere am Ende des Experiments zu euthanasieren, die Cornea post mortem zu präparieren und den subbasalen Nervenplexus mittels PGP9.5 Immunfluoreszenz und konfokaler Mikroskopie zu analysieren und die Bilddaten zu quantifizieren.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Programme

NeuronJ (ImageJ)	National Institutes of Health (NIH), USA
GraphPad Prism	San Diego, CA, USA
Imaris	Bitplane, Schweiz

2.1.2 Geräte

Mousefix Animalholder	Orchtrup, Deutschland
Blutzuckermessgerät Freestyle Mini	Abbott, Alameda, Kanada
DCA HbA1c Analyzer	Siemens, Erlangen, Deutschland
FluoView FV10i	Olympus, Hamburg, Deutschland
Laborwaage Laboratory LC 620 S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Lichtmikroskop Olympus CW2	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Heidelberg Retina Tomograph II	Heidelberg Engineering, Heidelberg, Deutschland
Rostock Cornea Modul	Heidelberg Engineering, Heidelberg, Deutschland
TomoCap	Heidelberg Engineering, Heidelberg, Deutschland

2.1.3 Chemikalien

KH_2PO_4	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Merck, München, Deutschland
NaCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
10x PBS	Lonza BioWhittaker BE17-515F
Phosphat-Buffer-Solution (PBS)	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
EDTA (Titriplex III)	Merck, München, Deutschland
BSA	Roth, Karlsruhe, Deutschland 8076.3

Triton X-100	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Roti-Mount FluorCare DAPI	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Succrose	Serva, Heidelberg, Deutschland
Formafix 4% gepuffert	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Diethylether	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.4 Antikörper

PGP9.5	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
TRITC	Abcam, Cambridge, UK

2.1.5 Medikamente

Ketamin ©Ketamin Inresa	Roth, Neuss, Deutschland
Atipamezolhydrochlorid ©Antisedan	Espea, Finnland
Medetomidinhydrochlorazid ©Dorbene	León, Spanien
Streptozotocin	St. Louis, MO, USA

2.1.6 Kits

HämoglobinA1c Reagenzkit für DCA	Siemens, Erlangen, USA
Blutglukose-Teststreifen Freestyle Mini	Abott, Alameda, Kanada

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

1,5 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
2,0 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
50 ml Zentrifugenröhrchen	Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland
15 ml Zentrifugenröhrchen	Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland
Objektträger (76x26mm)	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland

Deckgläser (22x22mm)	Menzel-Gläser (ThermoScientific)
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen, Deutschland
Carbomer Gel [®] Visdisc	Visdisc, Berlin, Deutschland
Glukose 10%	Braun, Melsungen, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Tiermodell und Haltung

Für den Versuch wurden zwölf homozygote, männliche C57BL/6J RAGE Knockout Mäuse im Alter von acht bis zehn Wochen verwendet. Diese Tiere tragen einen generalisierten Knockout der extrazellulären Domäne des RAGE. Die Mäuse wurden an der Universität Heidelberg generiert (Prof. P.P. Nawroth) (72) und dem Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie (Transfer Agreement mit Prof. S. Baltrusch) zur Verfügung gestellt. Sie wurden unter standardisierten Bedingungen (Raumtemperatur $23\pm 1^\circ\text{C}$, Luftfeuchtigkeit $53\pm 2\%$, künstlicher Tag-/Nachtrhythmus, Hellphase von 6.00 bis 18:00 Uhr) in der zentralen Versuchstierhaltung der Universitätsmedizin Rostock gezüchtet und gehalten. Je nach Wurfgröße saßen die Tiere in 2er- und 4er-Gruppen. Jedes Tier erhielt eine individuelle Kennzeichnung mittels Ohrlochung. Den Tieren stand Standarddiät in Form von Trockenpellets und Trinkwasser *ad libitum* zur Verfügung. Für die Versuche lag ein genehmigtes Versuchstiervorhaben des Landesamtes für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern vor.

2.2.2 Versuchsaufbau und Versuchsablauf

Zunächst wurden 12 acht bis zehn Wochen alte RAGE Knockout Mäuse markiert. Anschließend wurden von allen zwölf Mäusen die Parameter Körpergewicht, Blutglukosekonzentration und HbA1c-Wert bestimmt. Diese Erfassung diente als Ausgangswert (Tag 0). Im Versuch wurde darauf geachtet, dass der HbA1c-Wert sowie die Blutglukose immer nahezu zur gleichen Tageszeit bestimmt wurden. Nachfolgend wurde bei allen Tieren die erste CLSM durchgeführt (Tag 0). Die insgesamt aus drei Würfen stammenden Tiere zeigten keine erkennbaren Auffälligkeiten im Gesundheitszustand. Sie wurden zufällig auf zwei Gruppen aufgeteilt. Sechs

RAGE Knockout Mäuse wurden der Kontrollgruppe zugeordnet, die nachfolgend nur die Trägerlösung, einen Natriumcitratpuffer (50 mM, pH 4,5) injiziert bekamen. Die anderen sechs Tiere wurden der Gruppe zur Diabetes mellitus Induktion zugeordnet. Ihnen wurde nachfolgend eine niedrige Dosis Streptozotocin (50 mg/kg) in Natriumcitratpuffer injiziert. Die Behandlung erfolgte täglich über fünf Tage. Nach intraperitonealer Injektion bekamen die Mäuse ihr normales Futter sowie Wasser, welches mit 10%iger Glukoselösung angereichert wurde. Weiterhin wurde der Allgemeinzustand der Tiere überwacht und engmaschig die Blutglukose gemessen.

Im Abstand von 10 und 20 Tagen wurde die CLSM zum Erfassen der Nervenfaserdichte durchgeführt und der HbA1c-Wert erneut gemessen. Mindestens zweimal in der Woche wurden das Gewicht und die Blutglukosekonzentration bestimmt. Abschließend wurden die Tiere mit CO₂ euthanasiert. Die Cornea wurde jeweils zügig extrahiert, am oberen Augenpol mit einer Nadel markiert und für 15-20 min in PFA 4% gelagert. Danach wurde sie für 48 Stunden in vorgefertigte 30%ige Sucroslösung überführt und bei 5°C im Kühlschrank gelagert. Zum Schluss wurde eine Immunfluoreszenzfärbung der Cornea mittels PGP 9.5 durchgeführt und die erhaltenen Präparate am Mikroskop untersucht.

2.3 Bestimmung des Körpergewichts

Das Körpergewicht wurde mittels einer Laborwaage bestimmt. Hierzu wurde die zu messende Maus auf die Waage gesetzt und gewartet bis diese sich ruhig verhielt. Das Gewicht wurde dann von dem digitalen Display der Waage abgelesen und dokumentiert. Die Gewichtsbestimmung wurde immer direkt nach der Blutzuckerbestimmung durchgeführt.

2.4 Bestimmung der Blutglukose

Um die Blutglukose zu bestimmen, wurden ein Skalpell, ein Blutzuckermessgerät sowie Teststreifen bereitgelegt. Die Messungen wurden generell vormittags zwischen 7 Uhr und 11 Uhr durchgeführt. Durch einen kleinen Schnitt in den Schwanz der Maus wurde ein Blutropfen gewonnen und auf den mit dem Blutzuckermessgerät verbundenen Teststreifen gegeben. Das Gerät ermittelt den Blutglukosewert nach der Glukoseoxidase-Methode. Das Gerät misst in einem Bereich von 1,1 - 27,8 mmol/l. Werte unter 1,1 mmol/l mit „Lo“ und Werte über 27,8 mmol/l mit „Hi“ im Display eingeblendet.

2.5 Bestimmung des HbA1c-Wertes

Der HbA1c-Wert ist ein im Blut gemessener Parameter, der die Blutglukoseeinstellung der letzten acht bis zwölf Wochen widerspiegelt. Es handelt sich hierbei um das glykierte Hämoglobin, welches auch zur Gruppe der AGEs gezählt wird. In Abhängigkeit von der Blutglukosekonzentration kommt es vor allem zur nichtenzymatischen Glykierung von Valin- und Lysinresten der Globinketten. Entsprechend der Lebensdauer der Erythrozyten ist der Wert ein Indikator für die mittlere tägliche Blutglukosekonzentration der vergangenen zwei Monate. Der Test ist in der Routinediagnostik bedeutsam, da so die Therapie von Patienten mit Diabetes mellitus überprüft und optimiert werden kann. Für die Untersuchung wurde das DCA System in Kombination mit einer Reagenztestkassette verwendet. Grundlage des Assays ist eine Latex-Immunoagglutinationsreaktion. Es wurde bei dem Test sowohl die spezifische HbA1c-Konzentration als auch die Gesamtkonzentration an Hämoglobin gemessen. Das Verhältnis aus den beiden Werten wird ebenfalls als Prozentwert für den HbA1c angegeben. Die für die Reaktion benötigten Reagenzien sind bereits alle in der Reagenztestkassette enthalten. Für die Messung wurde das Schwanzende der Maus mit dem Skalpell angeritzt und Blut in die Kapillare, welche sich an der Reagenztestkassette befindet, überführt. Anschließend wurde die Testkassette in die Haltevorrichtung des DCA Systems eingelegt. Das Ergebnis konnte nach ungefähr sechs Minuten abgelesen werden.

2.6 Induktion eines Diabetes mellitus mittels Streptozotocin (STZ)

Um einen Diabetes Mellitus zu induzieren, wurde Streptozotocin verwendet, welches die Betazellen in den Langerhans-Inseln der Bauchspeicheldrüse angreift und zerstört (73). Den Mäusen wurde eine gewichtsadaptierte STZ-Dosis von 50mg/kg an fünf aufeinanderfolgenden Tagen intraperitoneal gespritzt. Die Tiere wurden zuvor bei kontinuierlicher Bereitstellung von Trinkwasser vier Stunden nüchtern gesetzt. Durch die Zerstörung der Betazellen kann anfangs eine Hypoglykämie-Gefahr bei den Tieren bestehen. Um dieses Risiko zu minimieren, wurde eine 10%ige Glukose Lösung in ihr Trinkwasser gegeben. Das STZ wurde mit einer Konzentration von 6mg/ml in 50 mM Natrium-Citrat-Puffer (pH-Wert 4,5) aufgelöst. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit und Lösungsinstabilität des Streptozotocins wurden die Eppendorf-Röhrchen mit Aluminiumfolie umschlagen und nach spätestens zehn Minuten verabreicht. Vor der Injektion wurden die Tiere mit Diethylether betäubt. Sechs Tieren wurde STZ gespritzt und

sechs bekamen zur Vergleichbarkeit in Bezug auf Stresssituation im Versuchsablauf und den Einfluss des Natrium-Citrat-Puffers die Trägerlösung in gleichem Volumen injiziert. Hierdurch wurden möglichst gleiche Bedingungen für beide Gruppen geschaffen.

2.7 Southern Blot

Ein Southern Blot ist eine Methode, mit deren Hilfe man bestimmte DNA-Fragmente analysieren kann. Durch diesen Blot wurde der RAGE Knockout in allen zwölf Tieren durch das Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie nachgewiesen. Dafür benötigt man eine mindestens 0,5 cm lange Schwanzbiopsie des zu untersuchenden Tieres, welche bei -20°C zunächst in Puffer gelagert wurde. Nachfolgend wurde die DNA aus der Lösung isoliert, sichtbar gemacht und bei 4°C in einem Kühlschrank aufbewahrt. Anschließend wurde die DNA durch Restriktionsenzyme an definierten Stellen in kleine Fragmente geschnitten. Danach wurden die DNA-Fragmente mittels einer Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Auf diesen Schritt folgte die Hybridisierung der DNA. Dies bedeutet, dass sich markierte Basen an ihren jeweiligen Basenpartner (A-T/G-C) anlagern und somit wieder ein DNA-Doppelstrang entsteht. Auf diese Weise konnte man den gesuchten DNA-Abschnitt später identifizieren.

2.8 In vivo Mikroskopie der Cornea

2.8.1 Narkose der Tiere

Für die Durchführung der CLSM wurde eine Narkose benötigt, um eine Bewegung der Tiere während der Untersuchung auszuschließen. Um diesen Zustand zu erreichen, wurde den Tieren eine subkutane Injektion von Dornobene (0,04 mg) sowie Ketamin (0,6 mg) verabreicht. Durch eine Schmerzreizsetzung am Schwanz der Tiere wurde überprüft, ob die Tiere sich in ausreichend tiefer Narkose befanden. Um einer Austrocknung der Cornea vorzubeugen, wurde auf beide Augen ein Tropfen des Carbomer-Gel aufgetragen, welches später dann auch den Kontakt zwischen Auge und TomoCap herstellte. Anschließend wurde die narkotisierte Maus für die Zeit der Untersuchung in einen Mousefix-Animalholder fixiert. Mit Hilfe des integrierten Wärmegeräts konnte die Körpertemperatur der Tiere konstant auf 37° gehalten

werden. Nach Abschluss der fünf- bis fünfzehnminütigen Untersuchung erhielten die Mäuse subkutan Antisedan (0,06 mg) als Antidot für Dornene. Nach der Untersuchung wurden die Mäuse zurück in ihren Käfig gesetzt und mit Rotlicht bestrahlt, um einer Unterkühlung während der Aufwachphase vorzubeugen.

2.8.2 Analyse des subbasalen Nervenplexus

Während sich die Maus in Narkose befand, wurde die Cornea mithilfe der Cornealen Laser-Scanning Mikroskopie untersucht. Die zu untersuchende Maus wurde im Mousefix-Animalholder so platziert, dass das zu untersuchende Auge senkrecht zum Wasserimmersionsobjektiv (x63/0,95 NA, Carl Zeiss) des Mikroskops lag. Als nächstes wurde erneut Carbomer-Gel sowohl auf das Auge der Maus als auch in die TomoCap gegeben. Anschließend wurde die mit dem Gel beschichtete TomoCap auf die Frontlinse des Mikroskops aufgesetzt, wodurch ein kohärenter Strahlengang des Lasers zwischen der Frontlinse und der Cornea der Maus geschaffen wurde.

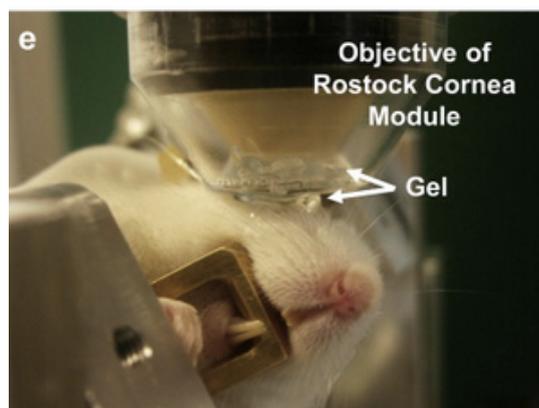


Abbildung 12: Maus in einem Mousefix-Animalholder (Quelle: ScienceDirect.com. vollständige URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014483513003679> Abruf: 20.02.2019)

Der Geräteaufbau besitzt eine integrierte, digitale Kamera, wodurch man auf dem Computermonitor Echtzeitaufnahmen der Cornea betrachten kann. Um die Cornea in den Fokus zu bringen, wurde der Mikroskopkopf manuell nach links und rechts sowie nach vorn und hinten bewegt. Im Anschluss daran wurde die Tiefeneinstellung so verändert, dass der subbasale Nervenplexus sichtbar wurde. Dafür gibt es ein weiteres Element, einen motorisierten Joystick, mit dessen Hilfe das Objektiv axialer Richtung verstellt werden konnte.

Dadurch wurde die Cornea schrittweise in die Tiefe bis zum Plexus fokussiert, welcher sich zwischen Epithelschicht und Bowman-Membran der Cornea befindet. Erkannt wurde er durch die feinen, längs verlaufenden Nervenfasern. Nach Auffinden des Nervenplexus wurden mithilfe des Sequenz-Modus vier Bilder pro Sekunde aufgenommen. Hierbei wurde immer nach dem gleichen Prinzip vorgegangen und temporal beginnend die zentrale Cornea Schritt für Schritt mäandrierend untersucht. Ein Bild misst $300 \times 300 \mu\text{m}$ und hat eine Auflösung von 384×384 Pixeln. Es entstanden in etwa 500-1000 Bilder pro Auge.

2.8.3 Auswertung der Bilder

Für die Auswertung des subbasalen Nervenplexus wurde zunächst eine Bildauswahl nach festen Kriterien durchgeführt. Als erstes wurden Aufnahmen mit der höchsten Kontrastierung und feinen, klar erkennbaren Nerven extrahiert. Daraus wurden Aufnahmen mit der optisch höchsten Nervenfaserdichte ausgewählt. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich Bilder nicht überschneiden und möglichst keine Artefakte zu erkennen sind. Von jedem Auge der Mäuse wurden nach diesem Prinzip fünf Bilder ausgewählt. Die Auswertung wurde dann manuell mittels der Software NeuronJ, einer in ImageJ integrierten Routine, durchgeführt. Die subbasalen Nerven wurden darin mit der Computermaus nachgezeichnet. Dabei wurden stromale Nervenfasern, welche erheblich dicker sind als die subbasalen Nerven, nicht nachgezeichnet und somit von der Quantifizierung des subbasalen Nervenplexus ausgeschlossen. Die Länge aller ausgewerteten subbasalen Nervenfasern bezeichnet man als corneale Nervenfasernlänge (in mm/mm^2 pro Bild). Für jede Cornea wurde der Mittelwert aus den fünf ausgewerteten Bildern errechnet. Eine solche Auswertung sollte durch zwei unabhängige Personen durchgeführt werden, um ein objektives Ergebnis zu erhalten. Daher wurden die Bilder zusätzlich von einer Mitarbeiterin des Instituts für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie quantifiziert.

2.9 Ex vivo Mikroskopie der Cornea

2.9.1 Corneaextrahierung

Am euthanasierten Tier wurde mit einer Kolibripinzette das Auge umfasst und durch leichten Druck etwas hervorgewölbt. Mit einer Nadel wurde durch einen kleinen Stich das obere Drittel der Cornea markiert, damit später die Orientierung der Cornea unter dem Fluoreszenzmikroskop wiedererkannt werden konnte. Um den Augapfel aus der Orbita und vom Sehnerv abzutrennen, wurde der Augapfel direkt hinter der Pinzette mit einer Schere abgeschnitten. Alle weiteren Schritte wurden unter einem Lichtmikroskop durchgeführt. Danach wurde das Auge in PBS gewaschen und anschließend für 15 Minuten in PFA 4% gegeben. Das Auge wurde nun in zwei Segmente zerteilt. Dazu wurde mit einer Phakolanze in die Lederhaut gestochen und das Auge mit einer gebogenen Schere in einen vorderen und einen hinteren Teil geteilt. Aus dem vorderen Teil wurden nun mit einer Pinzette die Iris, der Glaskörper und die Linse entfernt. Unter einem Lichtmikroskop wurde die so erhaltene Cornea mit einem Skalpell an vier bis sechs Stellen so eingeschnitten, dass sie flach auf einem Objektträger liegen konnte. Danach wurde die Cornea für 15 min in PFA 4% eingelegt. Anschließend wurde die Cornea für maximal 48 Stunden im Kühlschrank bei 4°C in 0,1 M PBS 30%iger Sucroslösung bis zur Immunfluoreszenzfärbung gelagert.

2.9.2 Immunfluoreszenzfärbung der Cornea mit PGP 9.5

Um die Nerven in der Cornea sichtbar zu machen, wurde der panneuronale Marker PGP 9.5 verwendet. Diese Immunfluoreszenzfärbung ist eine anerkannte Methode, um C- und A δ -Fasern in einer Hautbiopsie zu quantifizieren (74). Zunächst wurde ein PGP 9.5 Antikörper an das Antigen gebunden. An diesen Primärantikörper wurde dann ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff TRITC gekoppelter Sekundärantikörper gebunden. Die Färbung wurde folgendermaßen durchgeführt. Es wurde für jede Cornea ein 2 ml Eppendorf-Gefäß vorbereitet. Dieses wurde mit 2 ml HN-EDTA-PBS gefüllt. Anschließend wurde die Cornea aus der Sucrose genommen, kurz in 1x PBS abgewaschen und in das Eppendorf-Gefäß gelegt. Danach wurde sie so über Nacht (zum Beispiel von 15 Uhr bis 11 Uhr) bei 37°C auf einem Schüttler liegend inkubiert. Am nächsten Tag wurden dann wieder 2 ml Eppendorf-Gefäße benötigt, welche mit 2 ml PBS-TX befüllt wurden. Die Cornea wurde nun von den HN-EDTA-PBS in die

vorbereiteten PBS-TX Behältnisse überführt und bei Raumtemperatur für 90 Minuten auf einen Schüttler gelegt. Darauffolgend wurden wieder 2 ml Eppendorf Behältnisse mit 2 ml PBS-TX-BSA befüllt. In dieser Lösung wurde die Cornea bei Raumtemperatur für 120 Minuten auf den Schüttler gelegt. Nun wurde die PGP 9.5 Primärantikörperlösung (Verdünnung 1:500) angesetzt und in 1,5 ml Eppendorf Behältnisse mit je 100 µl befüllt und die Cornea hineingelegt. In einem abgedunkelten Behälter wurde die Cornea darin über Nacht in einem Kühlschrank aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden wieder 1,5 ml Eppendorf-Gefäße mit PBS-TX-BSA vorbereitet. Die Cornea wurde darin umgelagert und für 10 Minuten auf dem Schüttler gewaschen. Dieser Waschschrift wurde direkt danach wiederholt, indem das PBS-TX-BSA abgezogen und durch neues ersetzt wurde. Nachfolgend wurde die TRITC Sekundärantikörperlösung (Verdünnung 1:500) angesetzt, und es wurden je 100 µl in 1,5 ml Eppendorf Behältnisse gefüllt. Nachdem die Cornea das zweite Mal gewaschen wurde, wurde sie in die vorbereiteten Gefäße überführt. Die Cornea wurde diesmal eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Objektträger beschriftet. Die Cornea wurde anschließend mit 1x PBS abgespült und auf einen Objektträger gelegt. Mithilfe von Zellstoff wurde die restliche Flüssigkeit abgezogen. Danach wurde ein Tropfen Roti-Mount FluorCare DAPI auf die Cornea gegeben und diese mit einem 22x22 mm Deckgläschen abgedeckt. Danach wurden die Ränder des Deckgläschens mit Nagellack versiegelt. Zuletzt wurden die Objektträger in eine Präparate-Mappe gelegt und im Kühlschrank aufbewahrt.

2.9.3 Untersuchung der Cornea unter dem Fluoreszenzmikroskop

Die präparierte Cornea wurde unter dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop, FluoView 10i untersucht. Dazu wurde der Objektträger mit der Cornea in die Halterung eingelegt. Dieses Mikroskop besitzt keine Okulare, sondern findet mithilfe der mitgeführten DAPI Kernfärbung automatisiert zelluläre Ebenen und erstellt eine Übersichtsaufnahme des gesamten Präparats. Durch einen LD Laser von 559 nm wurde der Fluoreszenzfarbstoff TRITC angeregt und die Ebene des subbasalen Nervenplexus aufgesucht. Dabei wurde der Wirbel identifiziert und als Zentrum der nachfolgenden Aufnahme definiert. Dann wurde das Tool „Multi Area Z-Stacks Time Lapse“ geöffnet und 16 oder 25 Felder für die Untersuchung ausgewählt. Zur vollständigen Aufnahme des Nervenplexus um den Wirbel ist zudem eine Aufnahme in

unterschiedlichen Tiefenebenen notwendig. Es wurde ein Bereich von 20 μm in Schritten von 0,5 μm analysiert. Die Gesamtaufnahme erfolgte automatisiert mit einem Ölimmersionsobjektiv (x60/UPLASAPO, 1,35 NA, Olympus) und einer Auflösung von 1024x1024 Pixel über mehrere Stunden. Anschließend wurden die Einzelbilder mittels der FluoView Software als Gesamtaufnahme zusammengefügt und eine „Maximum Intensity Projection“ erstellt. Diese wurde als TIFF-Datei exportiert.

2.9.4 Auswertung der Gesamtaufnahme

Das TIFF-Bild wurde in der Software IMARIS geöffnet und mittels des Tools „Surface“ ausgewertet. Da jedes Einzelbild ein Volumen von $212 \times 212 \times 20 \mu\text{m}^3$ besitzt ergibt sich eine Gesamtfläche von $14382080 \mu\text{m}^3$ bei 16 Feldern bzw. $22472000 \mu\text{m}^3$ bei 25 Feldern. Aufgrund der guten Kontrastierung der Nerven gegenüber dem Hintergrund werden diese als Oberfläche automatisiert erkannt. Die Software berechnet das Gesamtvolumen der Oberfläche und kann mittels einer Excel-Tabelle ausgelesen werden und wird dann in Relation zur Gesamtbildfläche gesetzt. Eine solche durch Imaris erkannte Struktur ist im Vergleich zum Originalbild exemplarisch in Abbildung 13 dargestellt.

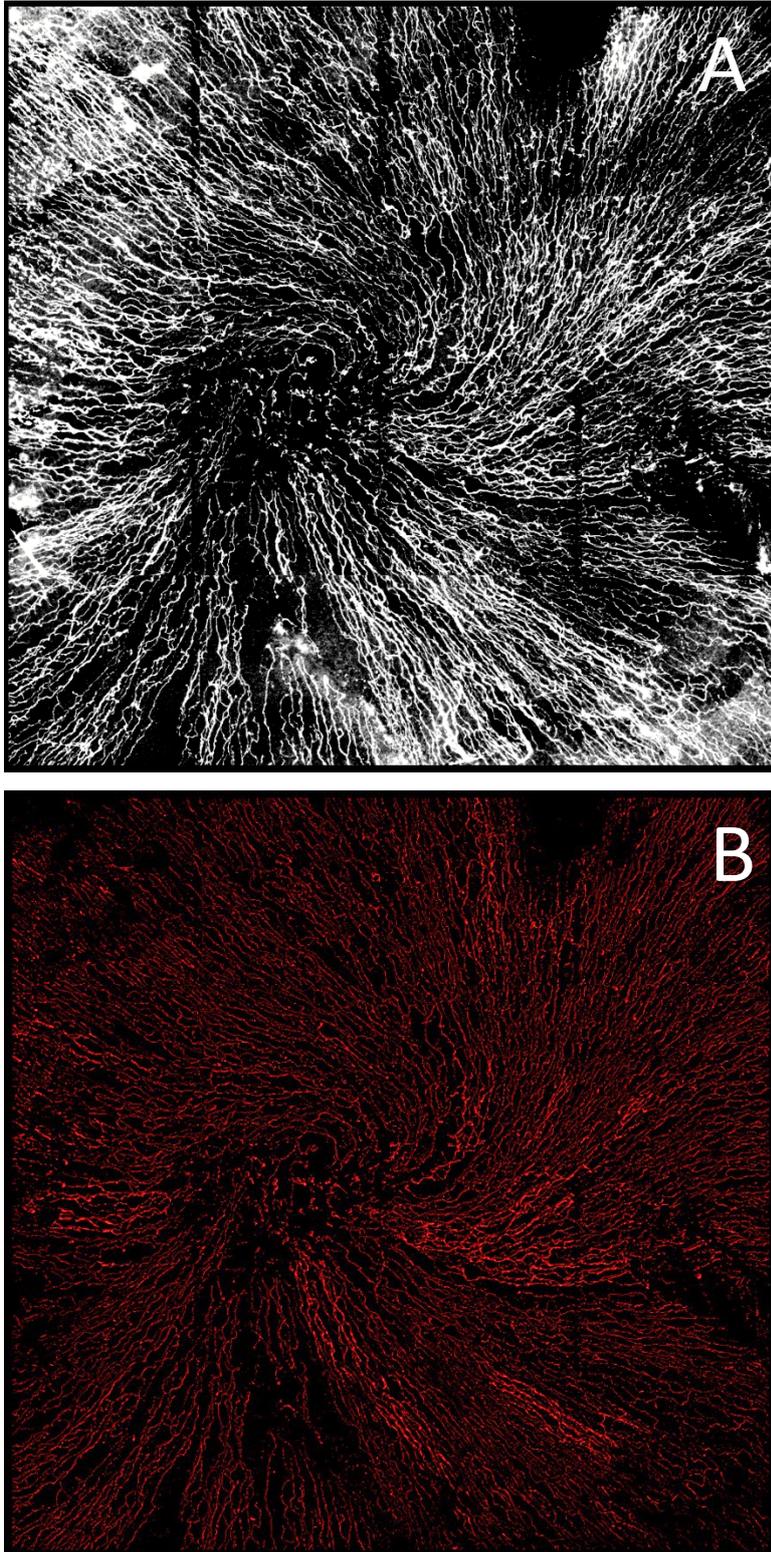


Abbildung 13: Exemplarische Darstellung einer 3D Intensitätsprojektion des subbasalen Nervenplexus mittels PGP9.5-Färbung inferior im Wirbelbereich (A) und durch Imaris automatisiert erkannte Nervenfaserverstruktur (rot, B).

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung des Gewichts

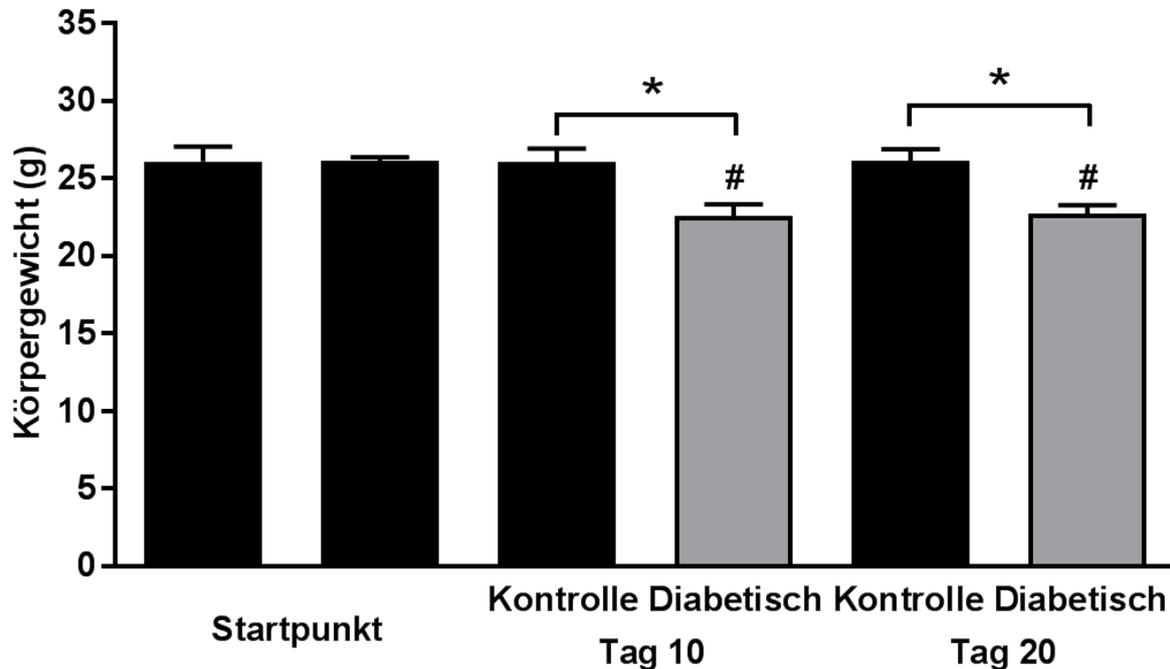


Abbildung 14 : Körpergewicht der RAGE $-/-$ Mäuse im Alter von 8 - 10 Wochen (Startpunkt) und 10 und 20 Tage nach Injektion von Natriumcitratlösung (Kontrolle, schwarze Säulen) oder Streptozotocin (Diabetisch, graue Säulen). Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM für 6 Tiere pro Gruppe. *, $p < 0,05$ versus Kontrolle; #, $p < 0,05$ versus Startpunkt Diabetisch (ANOVA/Bonferroni-Test).

Die Entwicklung des Körpergewichts der beiden Versuchsgruppen ist in Abbildung 14 dargestellt. Der Kontrollgruppe wurde am Startpunkt (Tag 0) eine Natriumcitratlösung verabreicht. Die zweite Gruppe erhielt eine STZ-Injektion, damit die Tiere einen Diabetes mellitus entwickeln. Laut Grafik scheint es anfangs keinen signifikanten Unterschied gegeben zu haben, das mittlere Körpergewicht war in beiden Gruppen dicht beieinander. In der Kontrollgruppe (linker Balken) wurde ein Wert von $26,09 \pm 2,74$ g und in der diabetischen Versuchsgruppe (rechter Balken) von $26,13 \pm 0,67$ g gemessen. Nach 10 und 20 Tagen hatten die diabetischen Tiere im Gegensatz zu der Kontrollgruppe jeweils signifikant an Gewicht verloren ($22,57 \pm 2,18$ g versus $22,7 \pm 1,64$ g $p < 0,05$).

3.2 Entwicklung des Blutzuckers

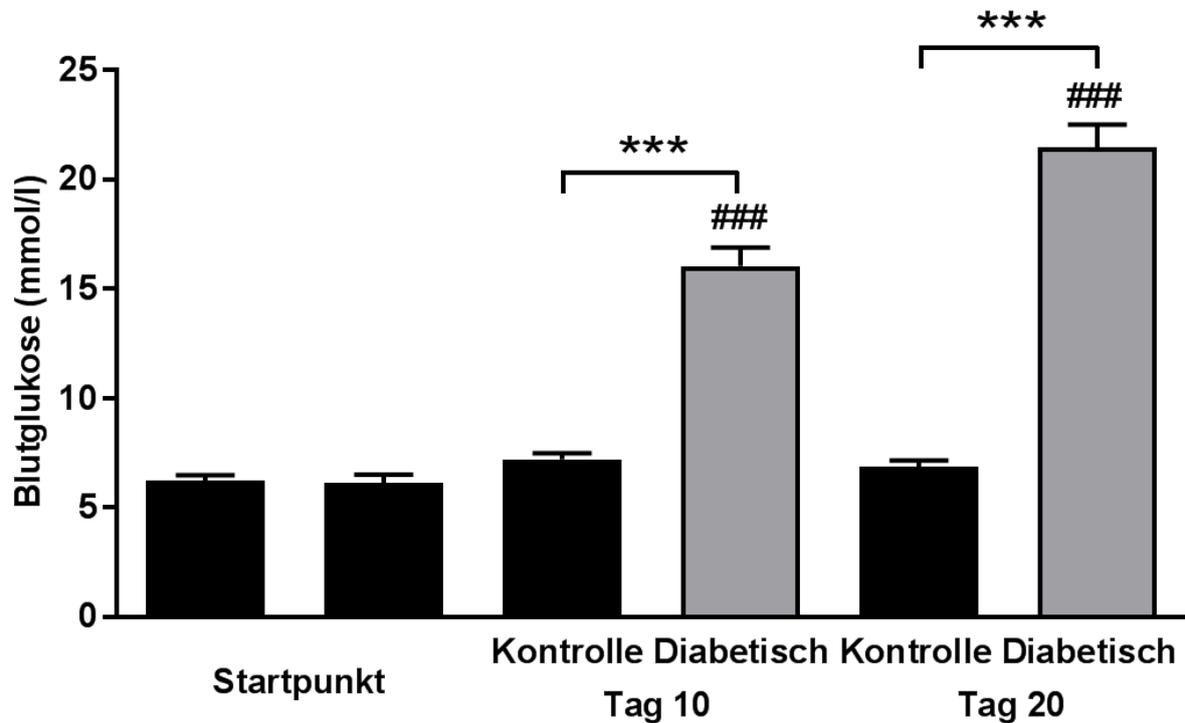


Abbildung 15: Blutglukose der RAGE $-/-$ Mäuse im Alter von 8 - 10 Wochen (Startpunkt) und 10 und 20 Tage nach Injektion von Natriumcitratlösung (Kontrolle, schwarze Säulen) oder Streptozotocin (Diabetisch, graue Säulen). Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM für 6 Tiere pro Gruppe. ***, $p < 0,001$ versus Kontrolle; ###, $p < 0,001$ versus Startpunkt Diabetisch (ANOVA/Bonferroni-Test).

Die Entwicklung der Blutglukosekonzentration ist in Abbildung 15 dargestellt. Am Anfang der Untersuchung (Startpunkt, Tag 0) lagen beide Gruppen bei einem ähnlichen Ausgangswert mit $6,21 \pm 0,77$ mmol/l (Kontrollgruppe links) gegenüber $6,13 \pm 1,02$ mmol/l (diabetische Tiere rechts). Nach der STZ-Injektion stieg die Blutglukose bei der diabetischen Versuchsgruppe deutlich an. Die Werte lagen bei $16,04 \pm 2,39$ mmol/l an Tag 10 und $22 \pm 2,91$ mmol/l an Tag 20. In der Kontrollgruppe hingegen veränderte sich der gemessene Blutglukosespiegel nur geringfügig ($7,2 \pm 0,8$ mmol/l an Tag 10 und $6,88 \pm 0,79$ mmol/l an Tag 20). Dadurch ergab sich eine signifikante Erhöhung der Blutglukose in der diabetischen Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,001$).

3.3 Entwicklung des HbA1c

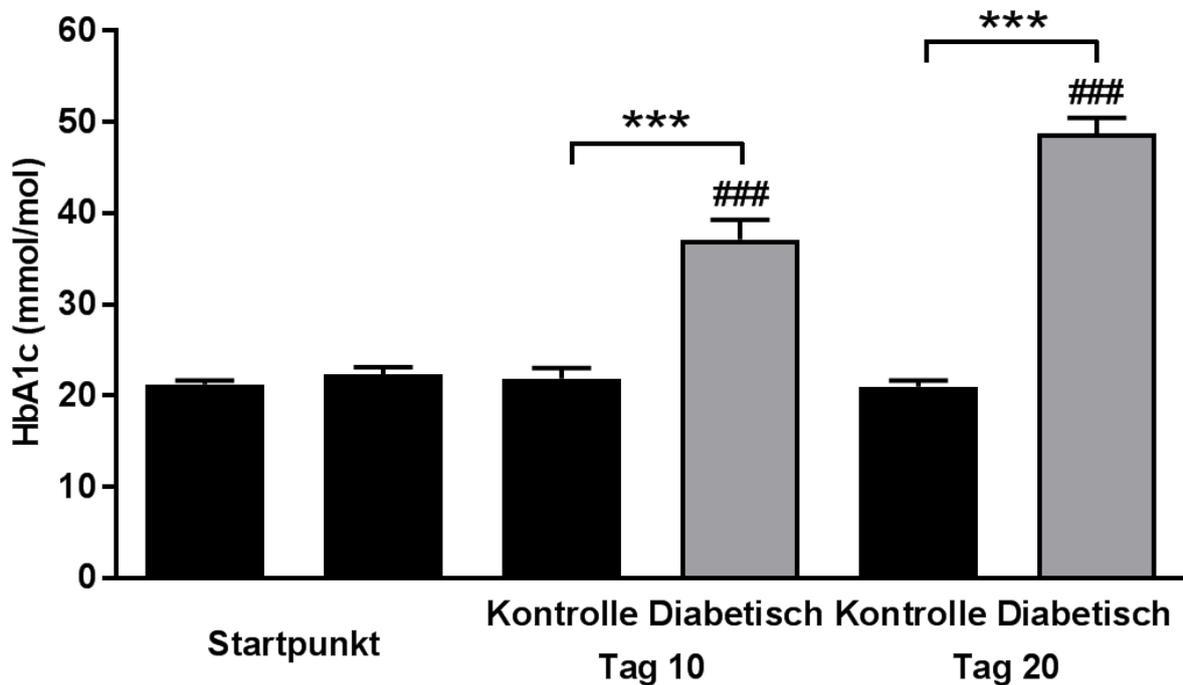


Abbildung 16: HbA1c-Wert der RAGE $-/-$ Mäuse im Alter von 6 Wochen (Startpunkt) sowie 10 und 20 Tage nach Injektion von Natriumcitratlösung (Kontrolle, schwarze Säulen) oder Streptozotocin (Diabetisch, graue Säulen). Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM für 6 Tiere pro Gruppe. ***, $p < 0,001$ versus Kontrolle; ###, $p < 0,001$ versus Startpunkt Diabetisch (ANOVA/Bonferroni-Test).

Die Entwicklung des HbA1c Wertes ist in Abbildung 16 dargestellt. Laut Grafik sind die HbA1c-Werte beim Startpunkt in beiden Gruppen annähernd gleich ($21,22 \pm 1,23$ mmol/mol bei der Kontrollgruppe (links) versus $22,33 \pm 2,21$ mmol/mol bei der diabetischen Gruppe (rechts)). In Übereinstimmung mit der ermittelten Blutglukose erhöhten sich die Werte der diabetischen Gruppe an Tag 10 ($37,13 \pm 5,69$ mmol/mol) und an Tag 20 ($47 \pm 4,73$ mmol/mol) signifikant gegenüber der Kontrollgruppe und zum Ausgangswert am Startpunkt ($p < 0,001$).

3.4 Entwicklung der Nervendichte

3.4.1 In vivo

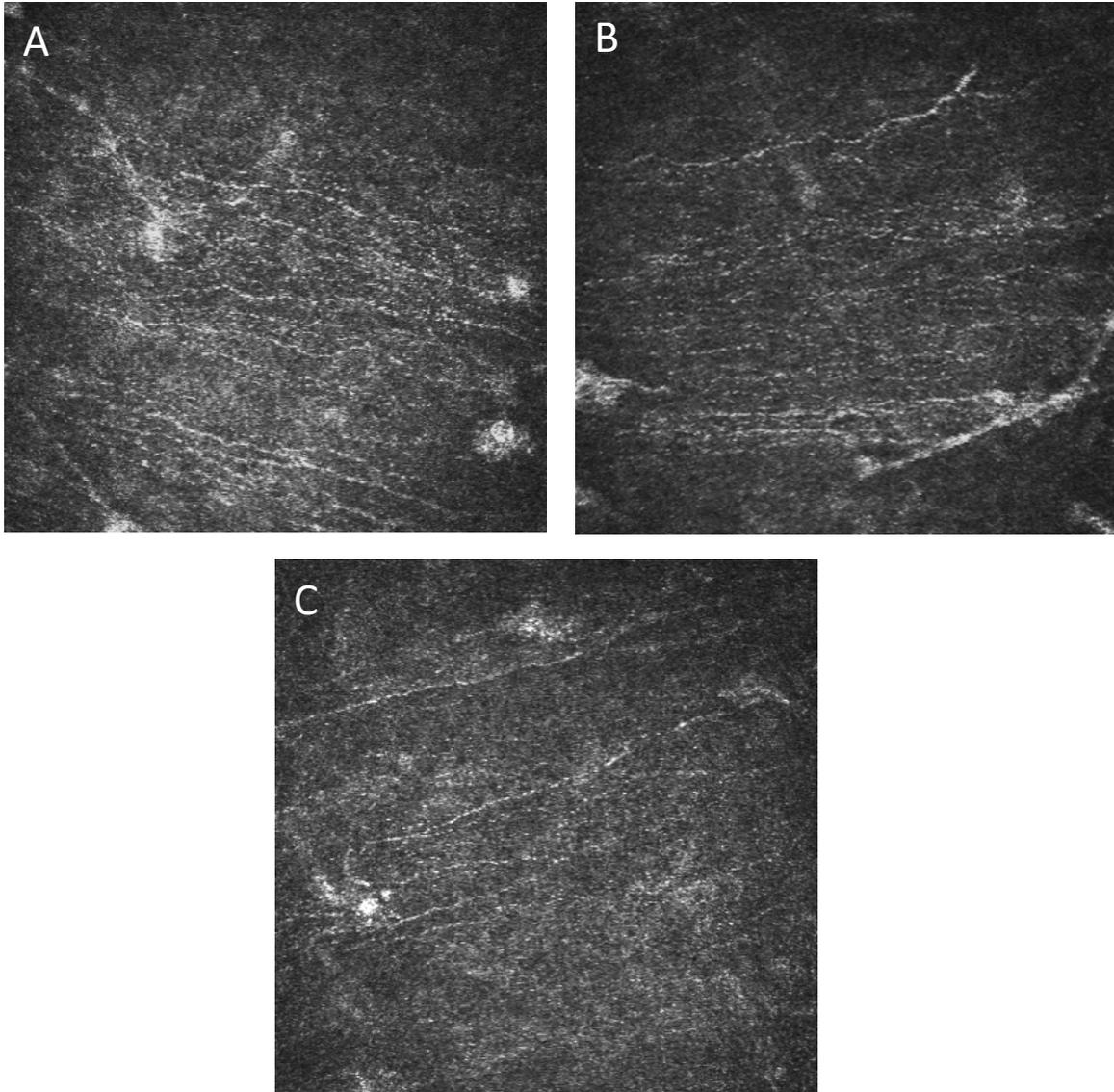


Abbildung 17: Exemplarische in vivo Darstellung des subbasalen Nervenplexus mittels CLSM einer RAGE $-/-$ Kontrollmaus im Alter von 8 - 10 Wochen (A) sowie 10 (B) und 20 (C) Tage nach Injektion von Natriumcitratlösung.

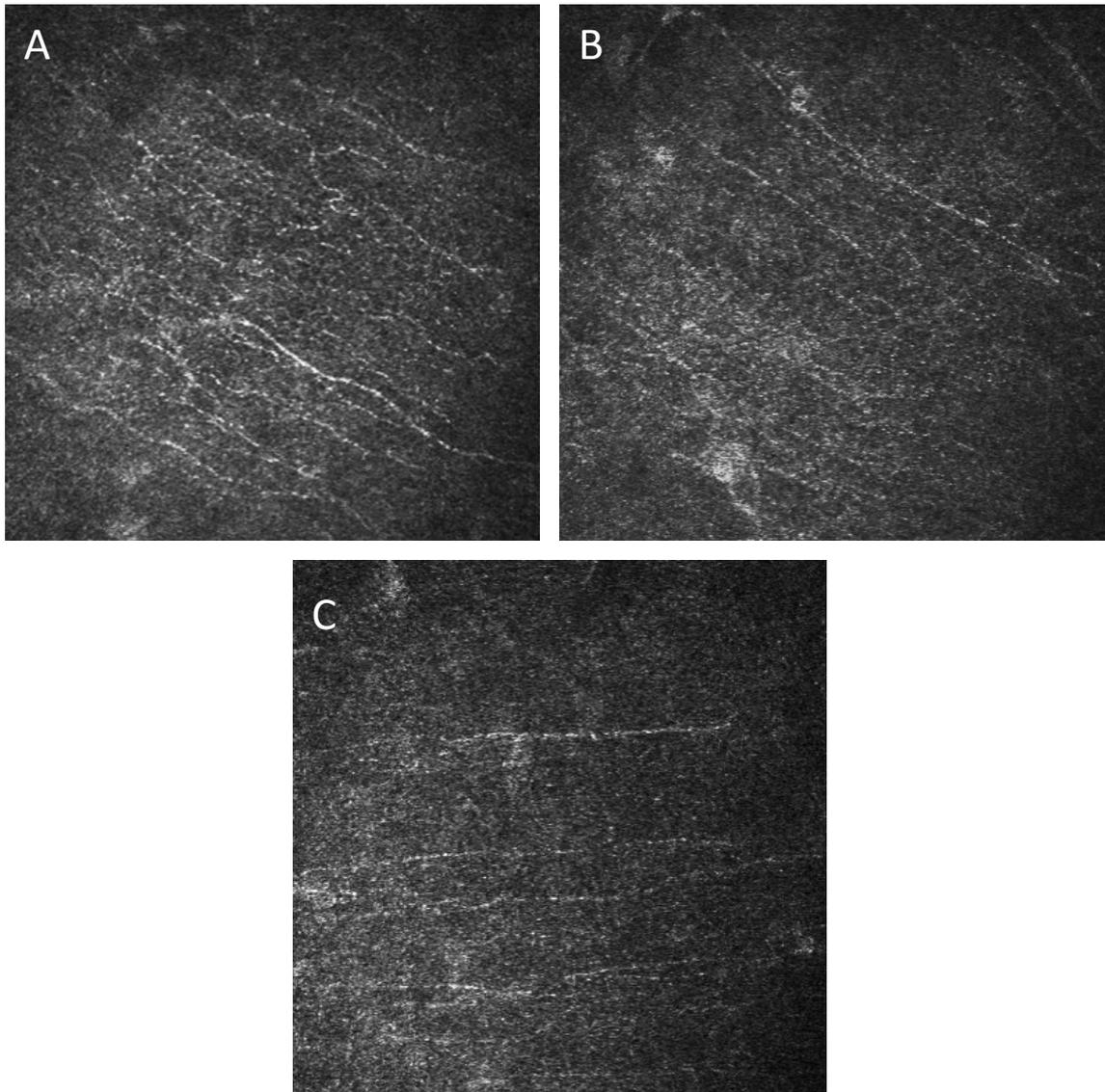


Abbildung 18: Exemplarische in vivo Darstellung des subbasalen Nervenplexus mittels CLSM einer diabetischen RAGE $-/-$ Maus im Alter von 8 - 10 Wochen (A) sowie 10 (B) und 20 (C) Tage nach Injektion von Streptozotocin.

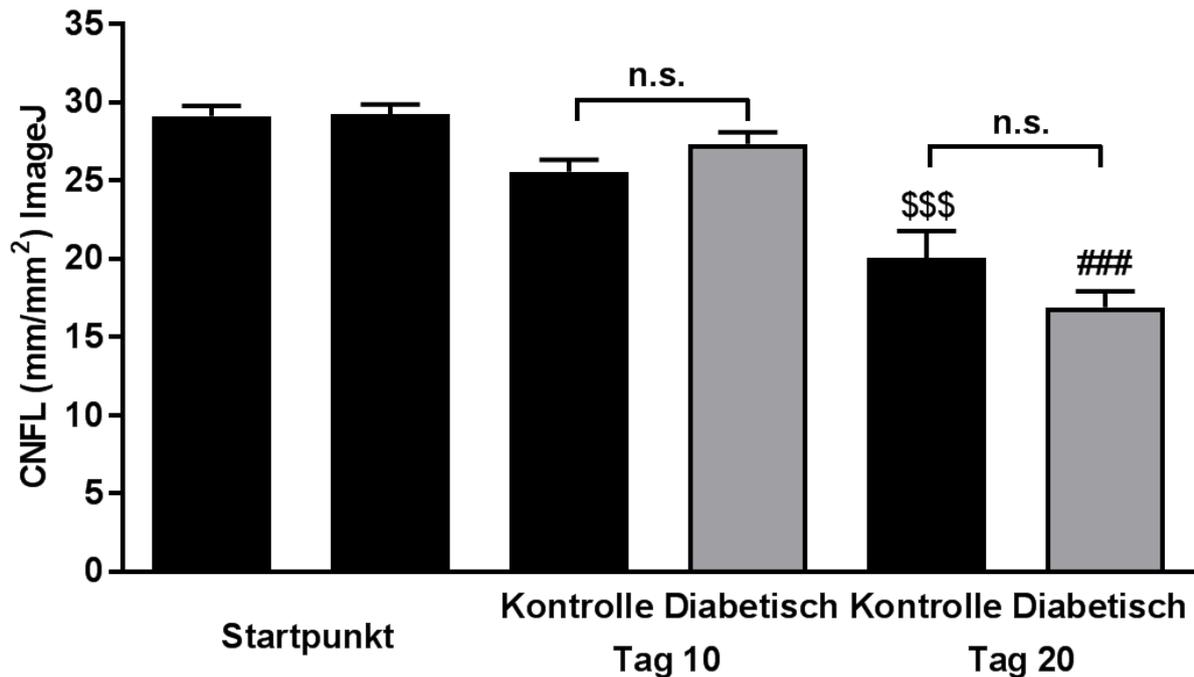
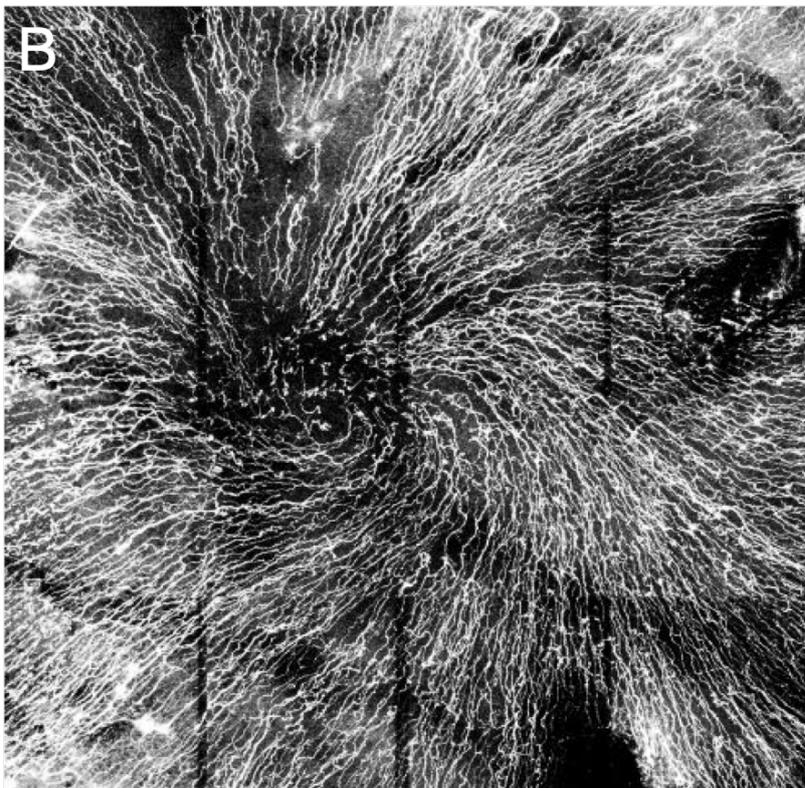
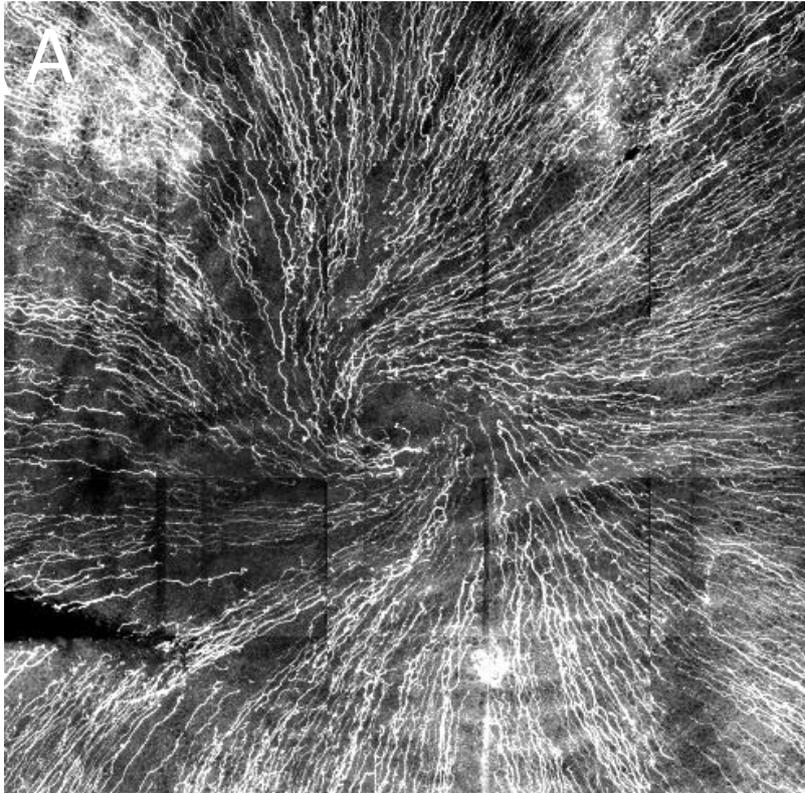
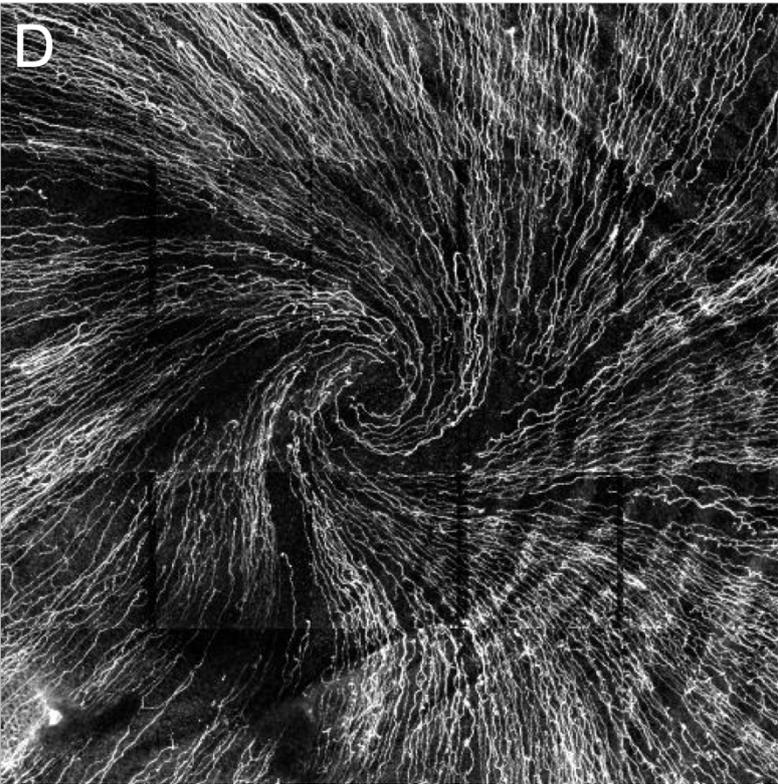
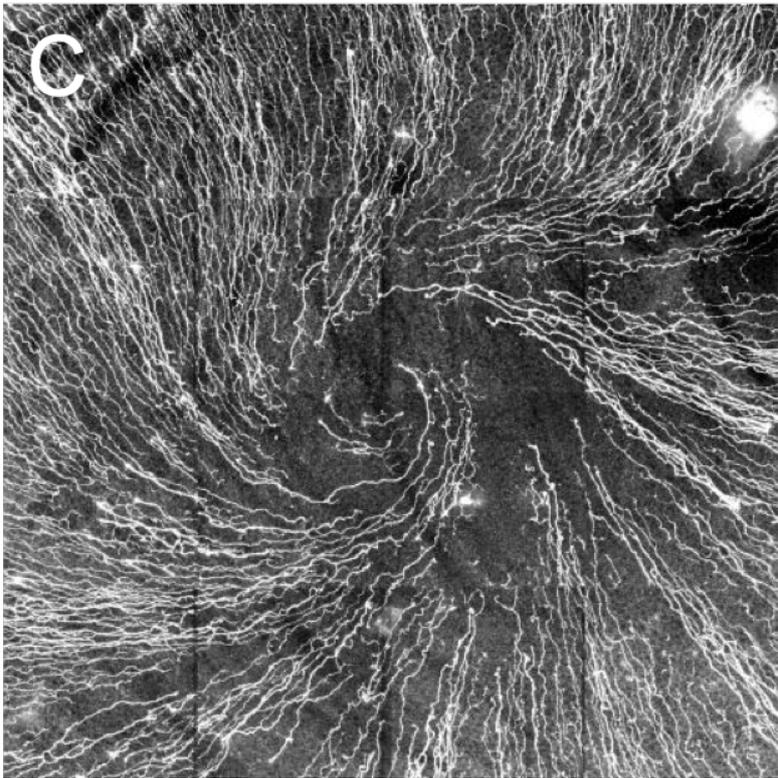


Abbildung 19: Corneale Nervenfaserlänge (CNFL) der RAGE ^{-/-} Mäuse im Alter von 8 - 10 Wochen (Startpunkt) sowie 10 und 20 Tage nach Injektion von Natriumcitratlösung (Kontrolle, schwarze Säulen) oder Streptozotocin (Diabetisch, graue Säulen). Die Quantifizierung erfolgte manuell mittels der Routine NeuronJ im Programm ImageJ (NIH). Es wurden pro Tier und Auge 5 Bilder der in vivo CLSM des subbasalen Nervenplexus ausgewertet und zunächst der Mittelwert pro Tier errechnet. Dargestellt sind Mittelwert ± SEM für 6 Tiere pro Gruppe. n.s., nicht signifikant versus Kontrolle; \$\$\$, p < 0,001 versus Startpunkt Kontrolle; ###, p < 0,001 versus Startpunkt Diabetisch (ANOVA/Bonferroni-Test).

In Abbildung 19 ist die Entwicklung der cornealen Nervenfaserlänge (CNFL) der Kontroll- und Diabetesgruppe dargestellt. Die der Auswertung zugrunde liegenden in vivo CLSM Aufnahmen sind für jede Gruppe und jeden Zeitpunkt exemplarisch in Abbildung 17 und 18 dargestellt. Zu Beginn des Versuchs (Startpunkt) war die ermittelte CNFL in beiden Gruppen vergleichbar. An Tag 10 lag der ermittelte Mittelwert der Diabetesgruppe etwas höher als der Mittelwert der Kontrollgruppe, der Unterschied war jedoch nicht signifikant (25,57 ± 1,32 mm/mm² vs. 27,37 ± 1,62 mm/mm²). An Tag 20 wurden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ermittelt. Diesmal lag der Mittelwert der Kontrollgruppe etwas höher (20,08 ± 3,8 mm/mm² vs. 16,91 ± 2,26 mm/mm²). Insgesamt war eine signifikante Abnahme der Nervenfaserlänge über den Versuchszeitraum von Tag 0 zu Tag 20 zu detektieren.

3.4.2 Ex vivo





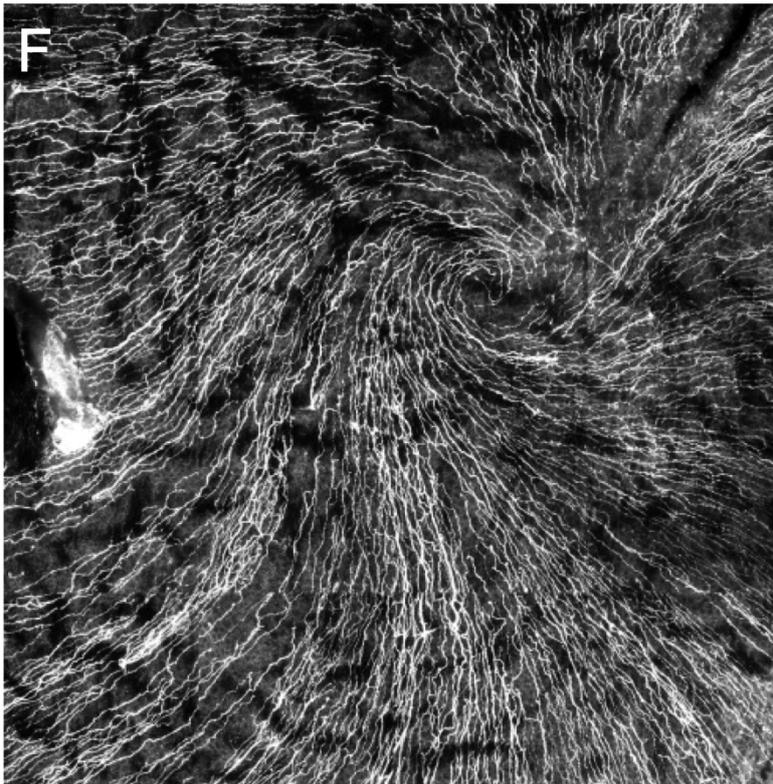
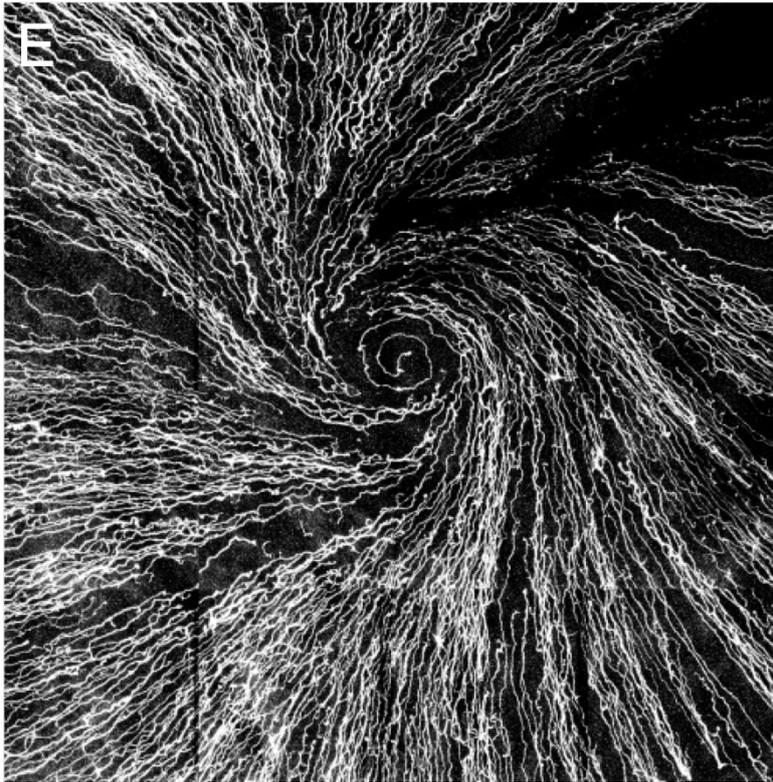
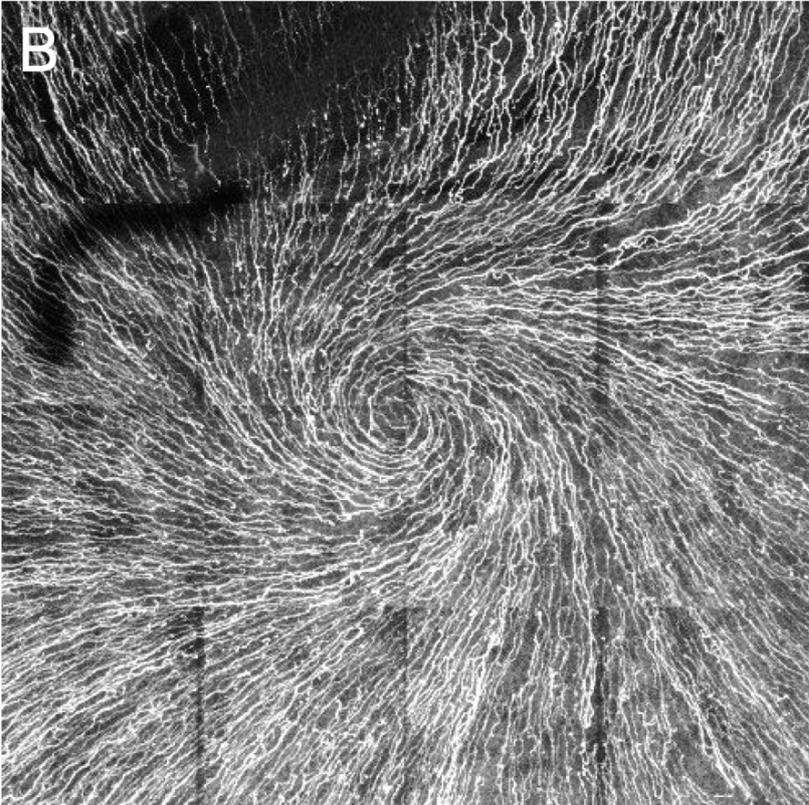
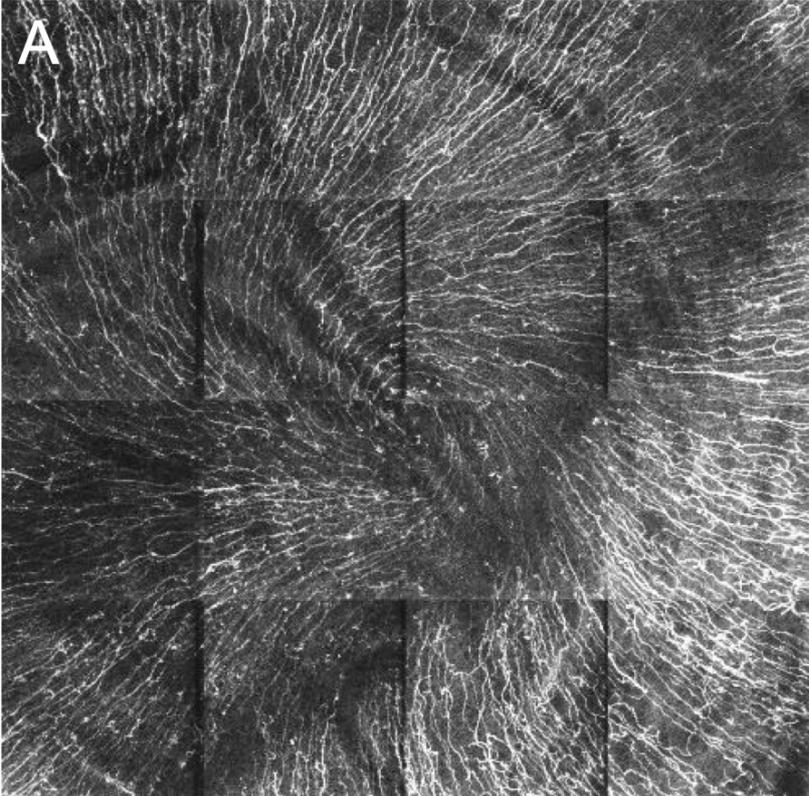
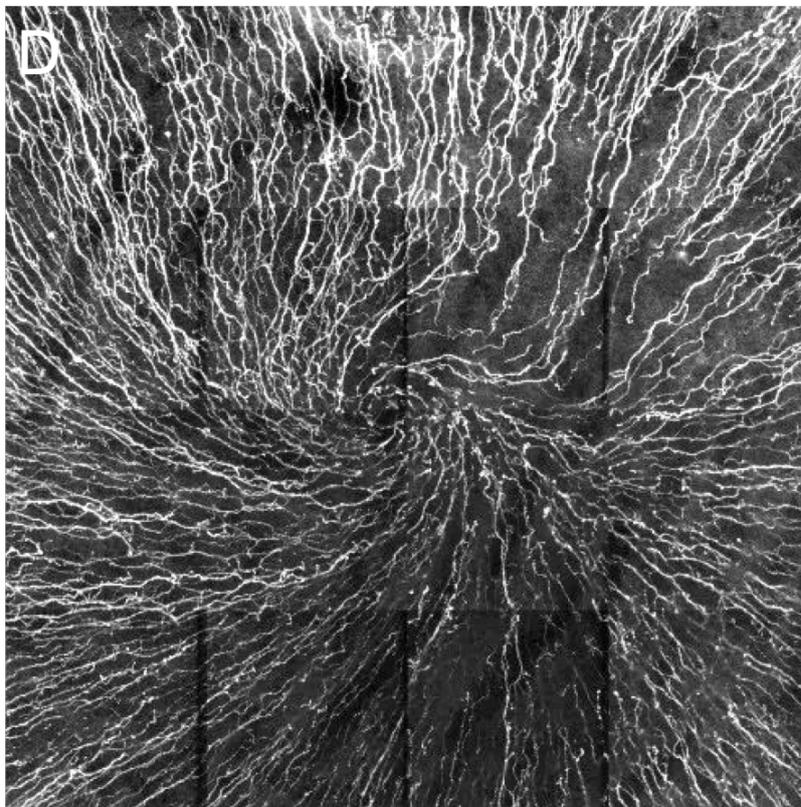
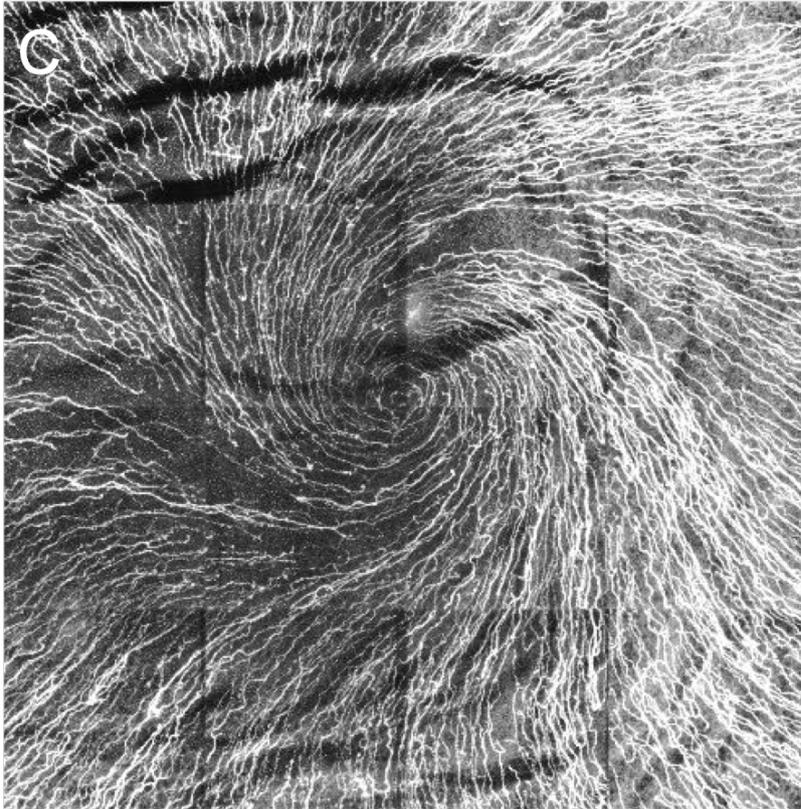


Abbildung 20: 3D Intensitätsprojektion des subbasalen Nervenplexus ex vivo mittels PGP9.5-Färbung inferior im Wirbelbereich über eine Fläche von 16 (A, D) oder 25 (B, C, E, F) zusammenhängenden Einzelbildern. Dargestellt sind die RAGE $-/-$ Kontrollmäuse, die 20 Tage nach Injektion von Natriumcitratlösung getötet wurden.





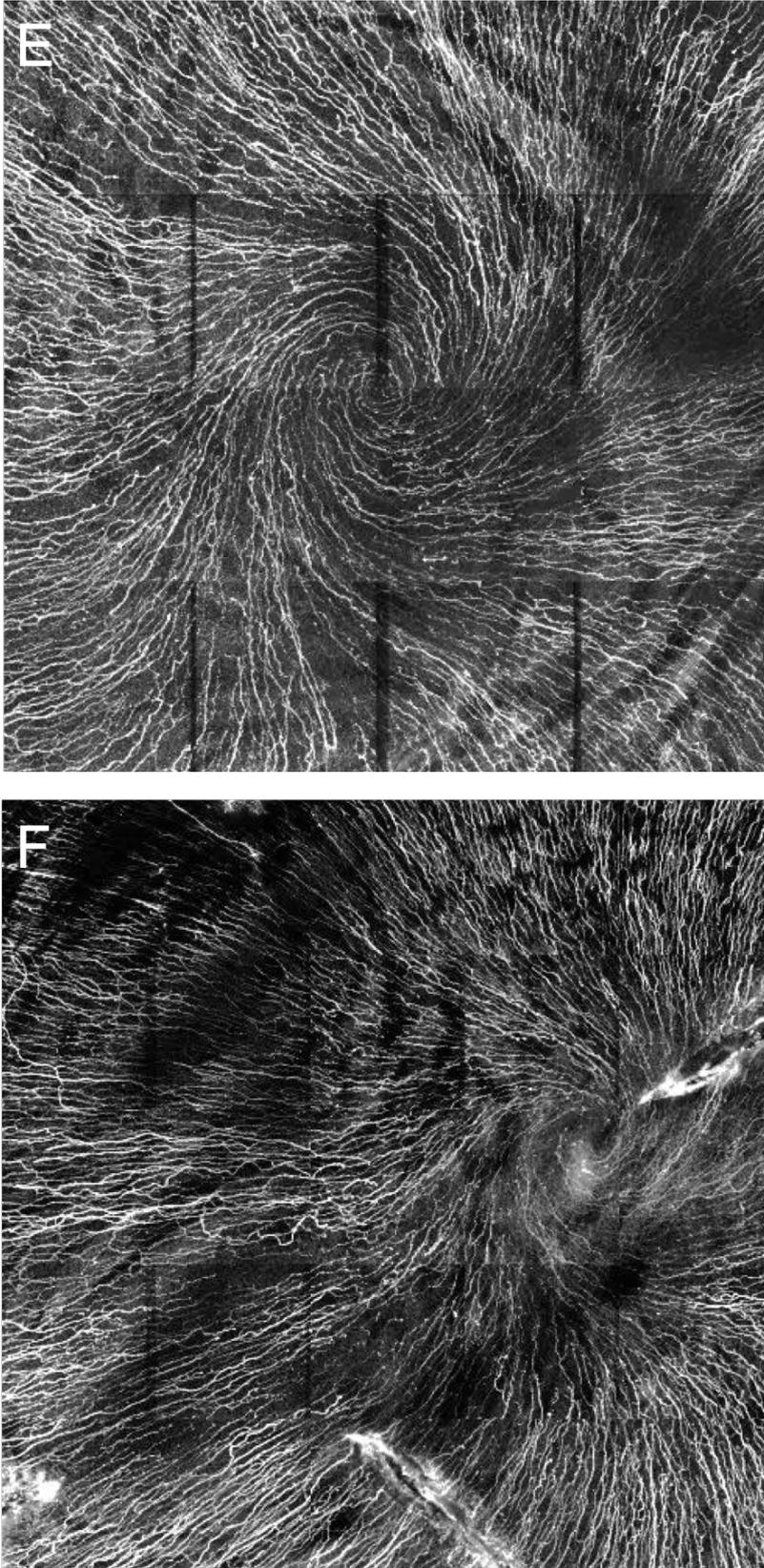


Abbildung 21: 3D Intensitätsprojektion des subbasalen Nervenplexus ex vivo mittels PGP9.5-Färbung inferior im Wirbelbereich über eine Fläche von 16 (A – E) oder 25 (F) zusammenhängenden Einzelbildern. Dargestellt sind die diabetischen RAGE $-/-$ Mäuse, die 20 Tage nach Injektion von Streptozotocin getötet wurden.

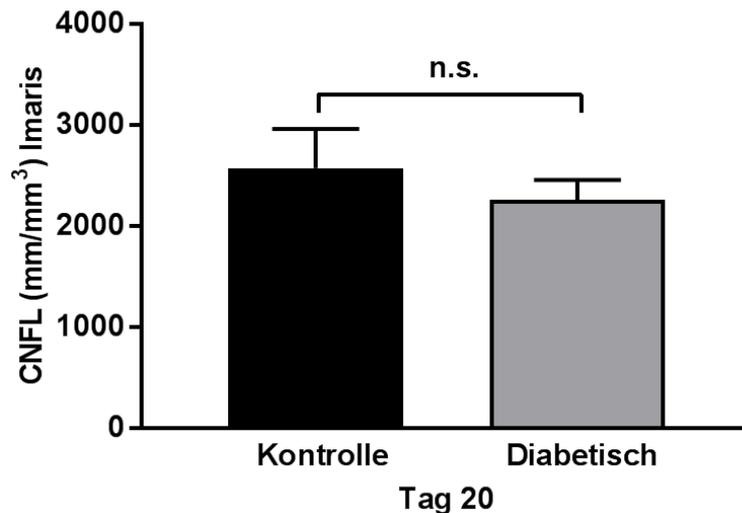


Abbildung 22: Corneale Nervenfaserlänge (CNFL) der RAGE ^{-/-} Mäuse 20 Tage nach Injektion von Natriumcitratlösung (Kontrolle, schwarze Säulen) oder Streptozotocin (Diabetisch, graue Säulen). Nach Tötung der Tiere wurde die Cornea präpariert und die Nerven mittels PGP9.5-Färbung dargestellt. Anschließend wurde der komplette subbasale Nervenplexus über 20 µm Tiefe in einer Fläche von 16 oder 25 zusammenhängenden Einzelbildern inferior im Wirbelbereich aufgenommen. Die Quantifizierung der in Abbildung 20 und 21 dargestellten Bilder erfolgte automatisiert über die Bildung einer 3D Oberfläche in der Gesamtaufnahme im Programm Imaris. n.s., nicht signifikant (Student's t-Test).

Nach PGP9.5-Immunfluoreszenzfärbung wurden die Corneae im konfokalen Laser-Scanning Mikroskop analysiert. Hierzu wurde der Bereich inferior im Wirbelbereich ausgewählt und der komplette subbasale Nervenplexus über eine Tiefe von 20 µm erfasst. Um einen größeren Bereich bewerten zu können, wurden um den Wirbel 16 oder 25 zusammenhängende Einzelbilder aufgenommen und mit Hilfe des Überlappungsbereich der Einzelbilder zusammengefasst. Die Gesamtaufnahmen für die Kontrollgruppe sind in Abbildung 20, die der diabetischen Versuchsgruppe in Abbildung 21 dargestellt. Das Nervenfaservolumen im Wirbelbereich der Cornea wurde über die Bildung einer 3D Oberfläche mittels Imaris quantifiziert. Das Ergebnis ist in Abbildung 22 dargestellt. Die Kontrollgruppe lag im Mittelwert ein wenig über der Diabetesgruppe. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (2571,06 ± 863,75 mm/mm³ vs. 2257,53 ± 444,21 mm/mm³). Damit korreliert die ex vivo PGP9.5 Analyse der Nervenfaserdichte mit der in vivo CLSM Analyse zu Tag 20 (Abbildung 19).

4 Diskussion

4.1 Konzeption der Studie

Spätschäden der Erkrankung stellen eine deutliche Einschränkung der Lebensqualität für Patienten mit Diabetes mellitus dar. Die periphere sensomotorische Polyneuropathie ist eine dieser folgenreichen Komplikationen und stellt eine hohe Belastung für erkrankte Patienten dar. Bisher fehlen kausale Therapieansätze und eine adäquate Behandlung gestaltet sich dadurch äußerst schwierig. Durch den Verlust der Schmerzempfindung kann es im Verlauf einer peripheren Polyneuropathie zu schweren Komplikationen wie neuropathischen Fußläsionen, Charcot-Füßen oder nichttraumatischen Amputationen kommen, was wiederum zu einer erhöhten Morbidität und einer verringerten Lebensqualität führt (19, 75). Häufig stehen aber die bei der Neuropathie entstehenden Schmerzen im Vordergrund der Symptomatik des Patienten. Um eine Verbesserung zu erreichen, beziehungsweise um die Manifestation der Erkrankung möglichst weit in die Zukunft hinauszuzögern, ist es notwendig, die Diagnose frühzeitig zu stellen. Zumeist gelingt dies heutzutage noch nicht, da bisher noch keine objektive, standardisierte Früherkennungsmethode eingeführt wurde. Eine vielversprechende Methode stellt allerdings die konfokale Laser-Scanning Mikroskopie dar. Diese wurde daher in dem hier vorliegenden Tierversuch angewendet, um die Nervenfaserdichte des subbasalen Plexus der Cornea untersuchen und beurteilen zu können. Um medikamentöse Ansätze für die Vermeidung oder zumindest die Verlangsamung des Fortschreitens der peripheren Polyneuropathie zu finden, ist das Wissen um deren Pathophysiologie notwendig. Deshalb werden experimentelle Ansätze benötigt, die der Physiologie des Menschen möglichst nahekommen, weshalb in dieser Arbeit ein Tierversuch durchgeführt wurde. Aufgrund der geringeren Lebensdauer lassen sich Pathologien im Mausmodell auch kurzfristiger nachverfolgen. Zudem ist es im Tiermodell möglich, eine bestimmte Struktur zu modifizieren und die Auswirkungen auf den Organismus zu untersuchen. Um den Einfluss der AGE-RAGE Achse bei der Entstehung einer Polyneuropathie weiter zu analysieren, wurden RAGE Knockout Mäuse verwendet (64).

In der Versuchsgruppe (Diabetesgruppe) bekamen die Mäuse über fünf Tage Streptozotocin gespritzt, was dazu führt, dass die Betazellen im Pankreas angegriffen und zerstört werden (73). Auf diese Weise wurde chemisch ein Diabetes mellitus in den Tieren erzeugt. Beim

Menschen entsteht der Diabetes mellitus Typ 1 aufgrund eines Autoimmunprozesses über einen Zeitraum von mehreren Jahren. Da die Mäuse für drei Wochen unbehandelt der Erkrankung überlassen wurden, kann bei der Entwicklung von Spätschäden aber von einem vergleichbaren Prozess ausgegangen werden. Ein Zeitraum von drei Wochen im Mausmodell entspricht ungefähr einem über drei bis fünf Jahre schlecht eingestellten Diabetes mellitus Typ 1 bei einem Menschen.

4.2 Beurteilung der Studienergebnisse

Die Tiere wurden während der Studie regelmäßig untersucht. Die Ergebnisse zum Gewichtsverlauf spiegeln die bei einem Diabetes mellitus vorliegende, katabole Stoffwechsellage wider. Die diabetischen Tiere haben im Gegensatz zur Kontrollgruppe deutlich an Gewicht verloren. Durch die zusätzliche Betrachtung der ermittelten Blutglukosewerte kann geschlussfolgert werden, dass sich die Tiere der Diabetesgruppe in einer hyperglykämischen Stoffwechsellage befanden, da die Werte signifikant über dem Normalwert lagen. Durch die Zerstörung der Betazellen des Pankreas kann nachfolgend nicht mehr genügend Insulin produziert werden, was aber für die Aufnahme der Glukose in die Zellen unabdingbar ist. Darüber hinaus wurden bei den Tieren der Diabetesgruppe signifikant über dem Normalwert liegende HbA1c-Werte ermittelt. Dies deutet auf eine im Vergleich zu den Kontrolltieren verstärkte nichtenzymatische Glykierung und Bildung von AGEs hin. Es konnte in anderen Mausstämmen gezeigt werden, dass eine solche Stoffwechselentgleisung zu einer Reduzierung der Nervenfasern des subbasalen Plexus der Cornea führt (76). Im Gegensatz dazu war die Nervenfaserdichte des subbasalen Plexus der Cornea bei der Diabetesgruppe in dieser Studie im Vergleich zur Kontrollgruppe im Verlauf der 20 Versuchstage nicht signifikant verändert. Dieses Ergebnis korreliert zwischen den in-vivo CLSM Versuchen und den ex-vivo PGP9.5-Immunfluoreszenz Versuchen. Dies bedeutet, dass der RAGE in der Pathogenese des Nervenfaserverlustes eine Rolle spielen könnte und die B6/J-Tiere durch den RAGE Knockout möglicherweise vor einer signifikanten Abnahme der Nervenfaserdichte geschützt sind.

4.3 Die Bedeutung des RAGE in der Pathogenese der peripheren Polyneuropathie

Die konfokale Laser-Scanning Mikroskopie der Cornea hat in einigen Studienzentren in den letzten Jahren bereits Eingang in die Diagnostik der peripheren sensomotorischen Polyneuropathie gefunden. Sie ist als nicht-invasives und objektives Verfahren zum Nachweis einer diabetischen Polyneuropathie anerkannt. Es konnte gezeigt werden, dass bereits geringfügige Veränderungen der Nervenfaserdichte detektiert werden können (66, 77).

Mit dieser sensitiven Methode konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass sich die Nervenfaserdichte der Cornea über den Untersuchungszeitraum tendenziell reduziert hat. Vergleicht man die beiden Gruppen am jeweiligen Untersuchungstag ist allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen den diabetischen Tieren und den Kontrolltieren zu erkennen. Es kann daher von einem physiologischen Alterungsprozess ausgegangen werden, welcher bereits in der Literatur beschrieben worden ist, (78) der bei den RAGE Knockout Mäusen aber besonders ausgeprägt zu sein scheint. In dieser Studie konnte bei etwa 3 Monate alten Tieren, was beim Menschen einem Alter von 18-25 Jahren entspricht, somit gezeigt werden, dass der RAGE Knockout einen Schutz vor einem Verlust von Nervenfasern bietet. Allerdings bleibt die Frage offen, ob dieser Schutz ebenfalls gegen eine im höheren Lebensalter induzierte diabetische Stoffwechsellage besteht. Dies sollte weiterführend untersucht werden.

Janine Leckelt führte am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universität Rostock unter vergleichbaren Bedingungen eine ähnlich konzipierte Studie durch. Sie untersuchte etwa 3 Monate alte B6/J Thy1-YFP Mäuse, die den RAGE exprimieren (76). Der direkte Vergleich beider Studien ist in Abbildung 23 dargestellt und legt die Vermutung nahe, dass der RAGE Einfluss auf den Verlauf der diabetischen Polyneuropathie hat.

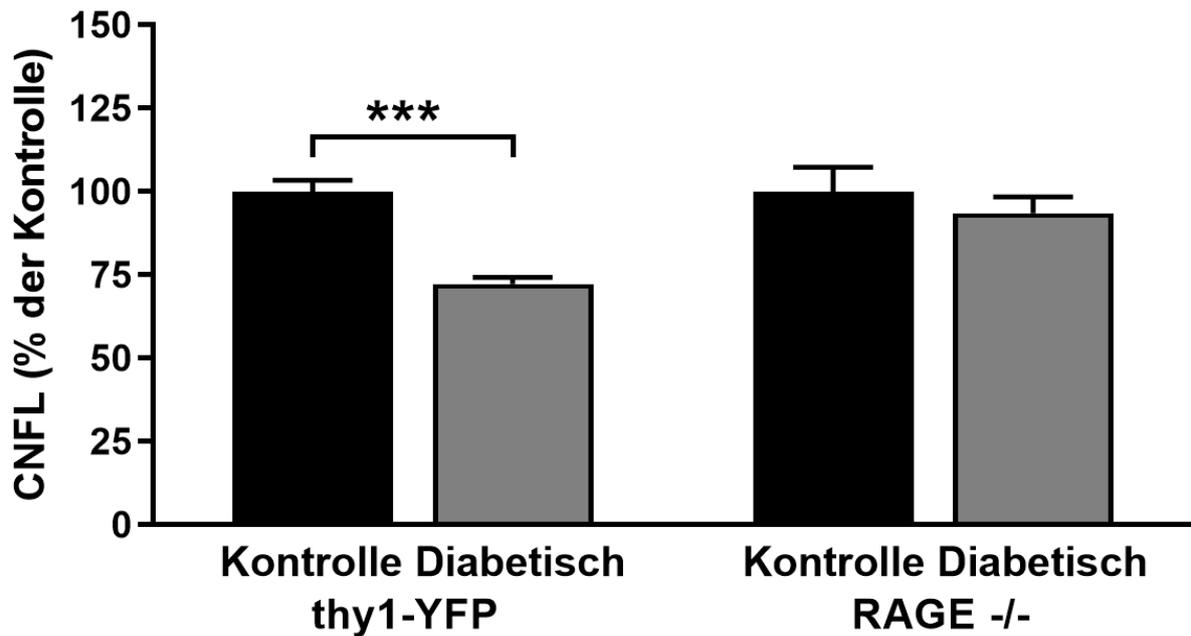


Abbildung 23: Corneale Nervenfaserlänge (CNFL) der diabetischen B6/J RAGE $-/-$ Mäuse im Vergleich zu B6/J thy1-YFP Mäusen. Die Ergebnisse sind prozentual zur mitgeführten Kontrolle dargestellt. Die Daten zu den thy1-YFP Mäusen sind der Arbeit von Leckelt et al. [71] entnommen. ***, $p < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni-Test).

Kürzlich konnte am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universität Rostock gezeigt werden, dass AGEs bei B6/J Mäusen mit einer diabetischen Stoffwechsellage verstärkt in Linse und Cornea des Auges akkumulieren (70). Deshalb liegt nun die Vermutung nahe, dass es vermittelt durch den RAGE zu einer Aktivierung von NF- κ B kommt, wodurch eine permanente Stresssituation in der Zelle ausgelöst wird. Diese führt schlussendlich zu einer Entzündungsreaktion und neuronalem Zelluntergang mit nachfolgendem Verlust von Nervenfasern (38). Durch die erhöhte Konzentration der AGEs, ist dies ein sich selbstverstärkender Kreislauf, der zu einer dauerhaften Aktivierung des Rezeptors und der damit verbundenen Überexpression von RAGE führt. Es konnte gezeigt werden, dass unter physiologischen Umständen der RAGE auf ungefähr 30% der Nervenfasern vorkommt. Bei der Neuropathie steigt die Dichte des Rezeptors auf den Nerven deutlich an (71). Eine signifikant höhere RAGE Expression konnte kürzlich ebenfalls am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie in der Cornea von B6/J Thy1-YFP Mäuse mit einer diabetischen Stoffwechsellage im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren nachgewiesen werden. Bislang ist die einzige kausale Therapie zur Verzögerung dieses Kreislaufs eine optimale

Blutglukoseeinstellung des jeweiligen Patienten (30), sodass die Konzentration an AGEs nicht weiter ansteigt. Allerdings gibt es im Tierversuch bereits die Möglichkeit, die Bindung von AGEs an ihren Rezeptoren zu verhindern. Dieser Effekt wird von einer Substanz, dem löslichen (*soluble*) RAGE (sRAGE) vermittelt. Dies ist der extrazelluläre Teil des Rezeptors, welcher die AGEs in der Zirkulation bindet und somit die Möglichkeit des Andockens der Liganden an ihre zellulären Rezeptoren verhindern kann (38, 79). Die Wirkung des sRAGE konnte in unterschiedlichen Studien bestätigt werden. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass der sRAGE einen Schutz bei der Entstehung von mikro- aber auch von makrovaskulären diabetischen Spätschäden bietet (80-83). Die Arbeitsgruppe um Rong publizierte hingegen, dass die Blockade von RAGE durch sRAGE eine optimale Regeneration von Nerven nach Quetschverletzungen unterdrückt (84). Andererseits wurde in dieser Arbeit aber bestätigt, dass eine effektive Blockade von RAGE bzw. das Fehlen des Rezeptors in einem RAGE Knockout Modell Schutz vor der Nervendegeneration selbst bietet. Dass der RAGE auch eine positive Rolle bei der Nervenregeneration übernehmen soll, erscheint zunächst widersprüchlich. Möglicherweise handelt es sich aber um zwei unabhängig voneinander ablaufende Prozesse, die einzeln betrachtet werden müssen. Zudem stellt sich die Frage, ob und in welchem Ausmaß die tierexperimentellen Studien auf die Situation beim Menschen übertragen werden können und ob der sRAGE somit einen potentiellen Ansatzpunkt für die Entwicklung von Medikamenten darstellt. Dabei darf allerdings nicht vergessen werden, dass mögliche Langzeitfolgen noch nicht hinreichend untersucht worden sind. In Tierversuchen der Universität Heidelberg konnte bestätigt werden, dass sich der Gesundheitszustand von Mäusen mit chronischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Arteriosklerose oder Morbus Alzheimer deutlich verbesserte, wenn man ihnen sRAGE injizierte (85). Zu berücksichtigen ist ebenfalls dass der RAGE nicht der einzige Rezeptor für AGEs ist. HMGB-1 oder die S100-Proteine, die ebenfalls zur Gruppe der AGEs gehören binden neben dem RAGE auch an Rezeptoren, die AGE-R1 (zuständig für die AGE Aufnahme), AGE-R2 (interagiert mit AGE-R1, hat aber keine direkte AGE-Bindung) und AGE-R3 (besitzt eine hohe AGE-Affinität) genannt werden (86). Daher sind weiterführende Experimente notwendig, um den Prozess vollständig zu verstehen.

4.4 Der subbasale Nervenplexus der Cornea und die periphere Polyneuropathie

Die Nerven des subbasalen Plexus der Cornea sind wichtig für die Aufrechterhaltung der Epithelfunktion derselben. Veränderungen im subbasalen Nervenplexus der Cornea sind nicht nur mit dem Auftreten der peripheren Polyneuropathie, sondern auch mit der diabetischen Retinopathie assoziiert (66, 87, 88). Die Arbeitsgruppe um Dyck fand in einer Langzeitstudie heraus, dass die Dauer und Schwere der Hyperglykämie im Einklang mit dem Ausmaß der Schwere der Polyneuropathie steht (89). Allerdings ist bei der Entstehung der Neuropathie nicht nur die Blutglukose, sondern auch Lipide, der Blutdruck und der BMI des Patienten von Bedeutung (25, 90). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass eine Optimierung des HbA1c, zu einer verbesserten Symptomatik der Neuropathie bei einem Diabetes mellitus Typ 1 führt (76, 91). Dementgegen verbesserten sich die Symptome bei einem Diabetes mellitus Typ 2 nur geringfügig (92). Um bei Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 2 Erfolge zu erzielen, gilt es eine Umstellung der Lebensweise und eine Gewichtsreduktion zu erreichen. In Studien mit Typ 2 Diabetikern konnte die Arbeitsgruppe um Gaede und Mitarbeiter herausfinden, dass die optimale Einstellung von Gewicht, Blutzucker, Blutfetten und Blutdruck zu einer Verbesserung der Retinopathie, Nephropathie und autonomen Neuropathie führen kann (93, 94).

Eine weitere Studie zeigte, dass das Ausmaß der Neuropathie bei Patienten, bei denen es zu einer Manifestation des Diabetes mellitus im frühen Lebensalter kam, deutlicher ausgeprägt war als bei Patienten, die im höheren Lebensalter erkrankten (95). Dies könnte damit zusammenhängen, dass durch die dauerhaft erhöhten AGEs die Nervendegeneration stärker gefördert wurde (96). Hinzu kommt, dass es zum Beispiel in der Pubertät zu Problemen bezüglich der Compliance kommen kann, weshalb viele Blutglukosespitzen im Tagesverlauf auftreten können (96). Dies führt zu einer vermehrten Bildung von AGEs und die Progression der Erkrankung wird weiter gefördert. Aus diesem Grund ist es besonders wichtig, Spätschäden frühzeitig zu erkennen, um geeignete therapeutische Schritte in die Wege zu leiten. Die Diagnostik der Neuropathie besteht unter anderem bisher darin, elektrophysiologische Untersuchungen an den Gliedmaßen durchzuführen. Dabei werden aber nur die großen Nervenfasern beurteilt, während aber die kleinen Nerven zuerst von der Neuropathie betroffen sind (18). Durch die Anwendung der CLSM könnte das Problem der Früherkennung zukünftig gelöst werden. Durch dieses objektive und nicht-invasive Verfahren könnte in Routineuntersuchungen bei Patienten mit Diabetes mellitus zu einem frühen

Zeitpunkt die Neuropathie diagnostiziert werden. Dadurch könnte die Prognose von diabetischen Spätschäden verbessert werden. Wie wichtig diese Untersuchung in Zukunft sein wird, bestätigte die Arbeitsgruppe um Tavakoli damit, dass sie zeigen konnte, dass ein schlecht eingestellter Diabetes mit einer deutlich erhöhten Nervendegeneration der Cornea einhergeht (66).

4.5 Ausblick

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, wurden die B6/J RAGE Knockout Mäuse mit einem chemisch induzierten Diabetes mellitus vor einem Nervenverlust in der Cornea geschützt. Allerdings stellt sich nun die Frage, über welchen Mechanismus dieser Schutz vermittelt wird. Ein Erklärungsansatz wäre, dass es durch die fehlende Aktivierung von bestimmten Mechanismen, die zu oxidativem Stress führen, zu einer geringeren Abnahme der Nervenfaserdichte kommt. Bisher ist allerdings unklar, durch welche Zellen dieses Signal vermittelt wird. Eine Studie konnte diesbezüglich zeigen, dass Keratinozyten ein Netzwerk bilden und so die sich im Stroma befindenden Nerven umgeben (57). Keratinozyten sind vergleichbar mit Fibroblasten. Sie sind wichtig für die corneale Transparenz, die mechanische Stabilität sowie für die Bildung von Kollagen und Glykosaminoglykanen (97, 98). Sie können ebenfalls mithilfe der CLSM untersucht werden. Die Arbeitsgruppe um Malik konnte zeigen, dass sich die Dichte der Keratinozyten in der Cornea bei Patienten mit Diabetes mellitus reduzierte. Außerdem fanden sie heraus, dass eine Verbindung zwischen der Dichte an Keratinozyten auf der einen Seite und der Dauer eines Diabetes mellitus und der glykämischen Kontrolle auf der anderen Seite besteht. Die wichtigste Erkenntnis im Hinblick auf diese Arbeit ist, dass sie herausfanden, dass eine Korrelation zwischen der Dichte an Keratinozyten und dem Nervenverlust des subbasalen Nervenplexus besteht (98). Die Arbeitsgruppe um Yam konnte herausfinden, dass aktivierte Fibroblasten, abgeleitet aus Keratinozyten, das Nervenwachstum durch Ausschüttung bestimmter Zytokine fördern (99). Dies könnte den Zusammenhang zwischen dem Untergang der Nerven und dem Verlust der Keratinozyten deutlich machen. Über den Verlust der Keratinozyten könnte somit auch der Nervenfaserverlust bedingt sein. Diesen Zusammenhang nachzuweisen, ist aktuell Gegenstand tierexperimenteller Untersuchungen am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universität Rostock.

5 Zusammenfassung

Beim Diabetes mellitus Typ 1 handelt es sich um eine Stoffwechselerkrankung, der ein Autoimmunprozess zugrunde liegt. Die Folge dessen ist eine sukzessive Zerstörung der insulinproduzierenden Betazellen in den Langerhans-Inseln des Pankreas (2). Durch die Betazellen wird die Konzentration der Glukose im Blutkreislauf gemessen und durch eine Insulinsekretion auf Veränderungen wie zum Beispiel durch Nahrungsaufnahme reagiert. Diese regulierte Insulinsekretion ist fundamental für die Aufrechterhaltung der Blutglukosehomöostase im Körper.

Bei einem Diabetes mellitus kommt es auch unter Insulintherapie häufig zu Hyperglykämien, wodurch im Körper vermehrt AGEs (*advanced glycation end products*) entstehen. Nachdem AGEs an ihren Rezeptor, RAGE, binden, werden in der Zelle eine Reihe von Signalkaskaden ausgelöst. Einer dieser Signalwege führt letztendlich zur Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B (38). Die Rezeptorbindung der AGEs führt unter anderem dazu, dass vermehrt RAGE exprimiert wird, wodurch ein sich selbst verstärkender Kreislauf mit RAGE Überexpression entsteht (38). Dadurch ist die Zelle dauerhaft in einem inflammatorischen Zustand, der zu zellulärer Dysfunktion oder zum Zelltod führen kann (43).

Eine der Langzeitfolgen, an der viele Patienten mit Diabetes mellitus leiden, ist die periphere sensomotorische Polyneuropathie. Es wird vermutet, dass die AGEs-RAGE Achse eine entscheidende Rolle beim Verlauf einer diabetischen Polyneuropathie einnimmt. Der Effekt, der durch den RAGE vermittelt wird, führt zu einem dauerhaften neuronalen Stress mit anschließendem Verlust der Nervenzelle (71). Anzumerken ist, dass der RAGE interessanterweise unter physiologischen Bedingungen in der Cornea signifikant höher exprimiert wird, als in anderen Geweben (70). Unklar ist bisher noch, warum bei einem manifesten Diabetes mellitus die Nervenfaserdichte der Cornea bereits reduziert ist, während in der Haut noch keine Veränderungen zu bemerken sind (76)

Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss über die AGEs-RAGE Achse auf die Nervenfaserdichte in der Cornea von Mäusen mit einem Diabetes mellitus im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne Diabetes mellitus zu untersuchen. Für die Untersuchungen wurden männliche C57BL/6J RAGE Knockout Mäuse verwendet, bei denen die extrazelluläre Domäne des RAGE nicht exprimiert wird. Den Mäusen der Versuchsgruppe wurde durch Streptozotocin ein Diabetes mellitus induziert. Blutglukose und HbA1c-Wert waren im Vergleich zur

Kontrollgruppe signifikant erhöht. Mittels der in vivo Laser-Scanning Mikroskopie wurden die Tiere longitudinal innerhalb von 20 Tagen dreimal untersucht und jeweils die Dichte des subbasalen Nervenplexus der Cornea quantifiziert. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass C57BL/6J RAGE Knockout Mäuse trotz eines manifesten Diabetes mellitus keine signifikant veränderte Nervenfaserdichte gegenüber der Kontrollgruppe aufwiesen. Dies steht im Gegensatz zu Untersuchungen an Mäusen mit Diabetes mellitus, die den RAGE Rezeptor vollständig exprimieren (76). Um das Ergebnis zu überprüfen wurde die Cornea zum Versuchsende nach Tötung der Tiere auch ex vivo mittels Färbung durch den panneuronalen Marker PGP9.5 und anschließende Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Da gezeigt werden konnte, dass die zentral gelegene Wirbelstruktur gegenüber der Hyperglykämie besonders suszeptibel ist (76), wurde dieser Bereich durch Serienaufnahmen als Mappe dargestellt und ein automatisiertes Analyseverfahren etabliert. Übereinstimmend mit den in vivo Aufnahmen wurde auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen C57BL/6J RAGE Knockout Mäusen mit und ohne Diabetes mellitus festgestellt. Daraus lässt sich schließen, dass der RAGE im Verlauf der Polyneuropathie eine wichtige Rolle spielen könnte. Die AGEs binden allerdings nicht ausschließlich an den RAGE. Es existieren andere Rezeptoren, wie zum Beispiel AGE-R1, AGE-R2 und AGE-R3, mit denen sie eine Bindung eingehen und bisher noch nicht vollständig erforschte Effekte in den Zellen auslösen können (71). Weiterführende Experimente sind daher notwendig, um den Einfluss von AGEs in der Pathogenese der diabetischen Polyneuropathie zu verstehen.

6 Thesen

- 1.) Der Diabetes mellitus Typ 1 ist eine Stoffwechselerkrankung, die durch einen Autoimmunprozess bedingt wird. Dadurch werden die Betazellen der Langerhans-Inseln zerstört, wodurch kein Insulin mehr freigesetzt werden kann. Aufgrund dessen ist die Glukosehomöostase gestört.
- 2.) Bei einem Diabetes mellitus kommt es auch unter Insulintherapie häufig zu Hyperglykämien, wodurch im Körper vermehrt AGEs (advanced glycation end products) gebildet werden, die an der Entwicklung von Spätschäden beteiligt sind.
- 3.) Durch Bindung von AGEs an ihren Rezeptor (RAGE) werden inflammatorische Prozesse induziert.
- 4.) Der AGEs-RAGE Achse wird daher eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der diabetischen Polyneuropathie zugeschrieben.
- 5.) Beim Menschen wie auch im Tiermodell konnte mittels der in vivo Laser-Scanning Mikroskopie gezeigt werden, dass es durch einen Diabetes mellitus zu einem frühzeitigen Verlust von Nervenfasern in der Cornea kommt, der Veränderungen in der Haut vorangeht.
- 6.) C57BL/6J RAGE Knockout Mäusen fehlt die extrazelluläre Bindedomäne des RAGE, wodurch die AGEs-RAGE Achse unterbrochen ist.
- 7.) Um bei diesen C57BL/6J RAGE Knockout Mäusen einen Diabetes mellitus zu induzieren, wurde in dieser Studie Streptozotocin verwendet. Die Manifestation der Erkrankung wurde durch signifikant erhöhte Blutglukose und HbA1c-Werte nachgewiesen.
- 8.) Trotz eines manifesten Diabetes mellitus zeigten C57BL/6J RAGE Knockout Mäuse in der in vivo Laser-Scanning Mikroskopie keine signifikant veränderte Nervenfaserdichte gegenüber der Kontrollgruppe.
- 9.) Die ex vivo fluoreszenzmikroskopische Analyse des Wirbels des subbasalen Nervenplexus der Cornea mittels des panneuronalen Markers PGP9.5 bestätigte den Befund.
- 10.) Es konnte somit gezeigt werden, dass der Knockout des RAGE einen schützenden Effekt auf den Nervenfaserverlust der Cornea bei den diabetischen Mäusen hat.
- 11.) Da der RAGE in der Cornea höher exprimiert wird als in anderen Geweben, könnte die Interaktion von AGEs mit dem RAGE zum frühzeitigen Verlust der Nervenfasern in der Cornea beitragen.

Literaturverzeichnis

1. Boulton AJ, Malik RA, Arezzo JC, Sosenko JM. Diabetic somatic neuropathies. *Diabetes care*. 2004;27(6):1458-86.
2. Garcia-Contreras M, Brooks RW, Boccuzzi L, Robbins PD, Ricordi C. Exosomes as biomarkers and therapeutic tools for type 1 diabetes mellitus. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2017;21(12):2940-56.
3. Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nature reviews Endocrinology*. 2009;5(4):219-26.
4. Op de Beeck A, Eizirik DL. Viral infections in type 1 diabetes mellitus--why the beta cells? *Nature reviews Endocrinology*. 2016;12(5):263-73.
5. Maahs DM, West NA, Lawrence JM, Mayer-Davis EJ. Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2010;39(3):481-97.
6. Schatz H. *Diabetologie kompakt*. 4. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2006 405 p.
7. Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet (London, England)*. 2014;383(9922):1068-83.
8. Hatakeyama H, Kanzaki M. Heterotypic endosomal fusion as an initial trigger for insulin-induced glucose transporter 4 (GLUT4) translocation in skeletal muscle. *The Journal of physiology*. 2017;595(16):5603-21.
9. Usher-Smith JA, Thompson MJ, Zhu H, Sharp SJ, Walter FM. The pathway to diagnosis of type 1 diabetes in children: a questionnaire study. *BMJ open*. 2015;5(3):e006470.
10. Kempegowda P, Coombs B, Nightingale P, Chandan JS, Al-Sheikhli J, Shyamanur B, et al. Regular and frequent feedback of specific clinical criteria delivers a sustained improvement in the management of diabetic ketoacidosis. *Clinical medicine (London, England)*. 2017;17(5):389-94.
11. Li W, Huang E, Gao S. Type 1 Diabetes Mellitus and Cognitive Impairments: A Systematic Review. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2017;57(1):29-36.
12. Schwartz SS, Epstein S, Corkey BE, Grant SFA, Gavin lii JR, Aguilar RB, et al. A Unified Pathophysiological Construct of Diabetes and its Complications. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2017;28(9):645-55.
13. Herold G. *Innere Medizin 2017: Eine vorlesungsorientierte Darstellung : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. Köln: Gerd Herold; 2017. 997 p.
14. Aronson D, Rayfield EJ, Chesebro JH. Mechanisms determining course and outcome of diabetic patients who have had acute myocardial infarction. *Annals of internal medicine*. 1997;126(4):296-306.
15. Laakso M. Glycemic control and the risk for coronary heart disease in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. The Finnish studies. *Annals of internal medicine*. 1996;124(1 Pt 2):127-30.
16. Pfau N, Kern AO, Wolfram C, Kalcklösch M, Prütz F. *Themenheft Blindheit und Sehbehinderung; Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. Robert Koch-Institut. 2017.
17. Krolewski AS, Laffel LM, Krolewski M, Quinn M, Warram JH. Glycosylated hemoglobin and the risk of microalbuminuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1995;332(19):1251-5.

18. Petropoulos IN, Alam U, Fadavi H, Marshall A, Asghar O, Dabbah MA, et al. Rapid automated diagnosis of diabetic peripheral neuropathy with in vivo corneal confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(4):2071-78.
19. Bundesärztekammer (BÄK) KBK, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinie Neuropathie bei Diabetes im Erwachsenenalter – Kurzfassung, 1. Auflage. Version 3. 2012. Available from: www.dm-neuropathie.versorgungsleitlinien.de; [cited: 12.03.2019].
20. Kaku M, Vinik A, Simpson DM. Pathways in the diagnosis and management of diabetic polyneuropathy. *Current diabetes reports.* 2015;15(6):15-35.
21. Jude E, Boulton AJM. End-stage complications of diabetic neuropathy. *Diabetes Rev* 1999;7:395– 410.
22. Mayfield JA, Reiber GE, Sanders LJ, Janisse D, Pogach LM. Preventive foot care in people with diabetes. *Diabetes care.* 2003;26(1):S78-9.
23. Vileikyte L, Peyrot M, Gonzalez JS, Rubin RR, Garrow AP, Stickings D, et al. Predictors of depressive symptoms in persons with diabetic peripheral neuropathy: a longitudinal study. *Diabetologia.* 2009;52(7):1265-73.
24. Sadosky A, Schaefer C, Mann R, Bergstrom F, Baik R, Parsons B, et al. Burden of illness associated with painful diabetic peripheral neuropathy among adults seeking treatment in the US: results from a retrospective chart review and cross-sectional survey. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy.* 2013;6:79-92.
25. Adler AI, Boyko EJ, Ahroni JH, Stensel V, Forsberg RC, Smith DG. Risk factors for diabetic peripheral sensory neuropathy. Results of the Seattle Prospective Diabetic Foot Study. *Diabetes care.* 1997;20(7):1162-7.
26. Obrosova IG. Increased sorbitol pathway activity generates oxidative stress in tissue sites for diabetic complications. *Antioxidants & redox signaling.* 2005;7(11-12):1543-52.
27. Valk GD, Nauta JJ, Strijers RL, Bertelsmann FW. Clinical examination versus neurophysiological examination in the diagnosis of diabetic polyneuropathy. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association.* 1992;9(8):716-21.
28. Young RJ, Ewing DJ, Clarke BF. Chronic and remitting painful diabetic polyneuropathy. Correlations with clinical features and subsequent changes in neurophysiology. *Diabetes care.* 1988;11(1):34-40.
29. Allgeier S, Bartschat A, Bohn S, Peschel S, Reichert KM, Sperlich K, et al. 3D confocal laser-scanning microscopy for large-area imaging of the corneal subbasal nerve plexus. *Scientific reports.* 2018;8(1):7468.
30. Callaghan BC, Little AA, Feldman EL, Hughes RA. Enhanced glucose control for preventing and treating diabetic neuropathy. *The Cochrane database of systematic reviews.* 2012(6):Cd007543.
31. Guilbaud A, Niquet-Leridon C, Boulanger E, Tessier FJ. How Can Diet Affect the Accumulation of Advanced Glycation End-Products in the Human Body? *Foods (Basel, Switzerland).* 2016;5(4):84.
32. Baynes JW. Role of Oxidative Stress in Development of Complications in Diabetes. *Diabetes* 1991;40:405-12.
33. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *The New England Journal of Medicine.* 1988;380(20):1315-21.
34. Leuner B, Max M, Thamm K, Kausler C, Yakobus Y, Bierhaus A, et al. RAGE influences obesity in mice. Effects of the presence of RAGE on weight gain, AGE accumulation, and insulin levels in mice on a high fat diet. *Z Gerontol Geriatr.* 2012;45(2):102-8.

35. Bierhaus A, Nawroth P. Schlüssel zum Verständnis chronischer Erkrankungen. *Ruperto Carola*. 03/2002.
36. Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*. 1999;97(7):889-901.
37. Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;322(4):1111-22.
38. Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products: *J Mol Med*; 2005;(83):876-86.
39. Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(21):14998-5004.
40. Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, et al. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(21):14987-97.
41. Schmidt AM, Mora R, Cao R, Yan SD, Brett J, Ramakrishnan R, et al. The endothelial cell binding site for advanced glycation end products consists of a complex: an integral membrane protein and a lactoferrin-like polypeptide. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(13):9882-8.
42. Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D, et al. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *The American journal of pathology*. 1993;143(6):1699-712.
43. Bierhaus A, Schiekofer S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, Chen J, et al. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes*. 2001;50(12):2792-808.
44. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *The New England Journal of Medicine*. 1997;336(15):1066-71.
45. Li J, Schmidt AM. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(26):16498-506.
46. Bierhaus A, Chen J, Liliensiek B, Nawroth PP. LPS and cytokine-activated endothelium. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2000;26(5):571-87.
47. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest*. 2001;108(7):949-55.
48. Ghavami S, Rashedi I, Dattilo BM, Eshraghi M, Chazin WJ, Hashemi M, et al. S100A8/A9 at low concentration promotes tumor cell growth via RAGE ligation and MAP kinase-dependent pathway. *Journal of leukocyte biology*. 2008;83(6):1484-92.
49. Bucciarelli LG, Wendt T, Rong L, Lalla E, Hofmann MA, Goova MT, et al. RAGE is a multiligand receptor of the immunoglobulin superfamily: implications for homeostasis and chronic disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2002;59(7):1117-28.
50. Lutterloh EC, Opal SM, Pittman DD, Keith JC, Jr., Tan XY, Clancy BM, et al. Inhibition of the RAGE products increases survival in experimental models of severe sepsis and systemic infection. *Critical care (London, England)*. 2007;11(6):122.
51. Blondonnet R, Audard J, Belville C, Clairefond G, Lutz J, Bouvier D, et al. RAGE inhibition reduces acute lung injury in mice. *Scientific reports*. 2017;7(1):7208.

52. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie 3. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2009:575-76.
53. Awwad S, Mohamed Ahmed AHA, Sharma G, Heng JS, Khaw PT, Brocchini S, et al. Principles of pharmacology in the eye. *British journal of pharmacology*. 2017;174(23):4205-23.
54. Ulfing N. Kurzlehrbuch Neuroanatomie 1. Auflage. Germany: Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart; 2008.
55. Komai Y, Ushiki T. The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1991;32(8):2244-58.
56. Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Desemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology*. 2013;120(9):1778-85.
57. Muller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TM. Corneal nerves: structure, contents and function. *Experimental eye research*. 2003;76(5):521-42.
58. Marfurt C, Burnstock G, Sillito A. Nervous control of the cornea. Harwood Academic Publishers. 2000:41-92.
59. Marfurt CF, Murphy CJ, Florczak JL. Morphology and neurochemistry of canine corneal innervation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2001;42(10):2242-51.
60. Garcia-Hirschfeld J, Lopez-Briones LG, Belmonte C. Neurotrophic influences on corneal epithelial cells. *Experimental eye research*. 1994;59(5):597-605.
61. Jones MA, Marfurt CF. Sympathetic stimulation of corneal epithelial proliferation in wounded and nonwounded rat eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37(13):2535-47.
62. Muller LJ, Pels L, Vrensen GF. Ultrastructural organization of human corneal nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37(4):476-88.
63. Leppin K, Behrendt AK, Reichard M, Stachs O, Guthoff RF, Baltrusch S, et al. Diabetes mellitus leads to accumulation of dendritic cells and nerve fiber damage of the subbasal nerve plexus in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(6):3603-15.
64. He J, Bazan HE. Neuroanatomy and Neurochemistry of Mouse Cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57(2):664-74.
65. Cousen P, Cackett P, Bennett H, Swa K, Dhillon B. Tear production and corneal sensitivity in diabetes. *Journal of diabetes and its complications*. 2007;21(6):371-3.
66. Tavakoli M, Quattrini C, Abbott C, Kallinikos P, Marshall A, Finnigan J, et al. Corneal confocal microscopy: a novel noninvasive test to diagnose and stratify the severity of human diabetic neuropathy. *Diabetes care*. 2010;33(8):1792-7.
67. Lichtscheidl I, Volgger M. Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM). Internetseite der Universität Wien URL: https://www.univie.ac.at/mikroskopie/3_fluoreszenz/clsm/1_einleitung.htm
Abruf:24.06.2019.
68. Guthoff RF, Baudouin, C., Stave, J. Atlas of Confocal Laser Scanning In-vivo Microscopy in Ophthalmology. Principles and Applications in Diagnostic and Therapeutic Ophthalmology (Springer, 2006).
69. Patel DV, McGhee CN. Mapping of the normal human corneal sub-Basal nerve plexus by in vivo laser scanning confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(12):4485-8.
70. Leckelt J, Thomas F, Kott A, Waterstradt R, Stachs O, Baltrusch S, et al. High RAGE expression might be responsible for early corneal nerve fibre damage in diabetic individuals. *Diabetologia*. 2018;254(1):129-30

71. Juranek JK, Kothary P, Mehra A, Hays A, Brannagan TH, 3rd, Schmidt AM. Increased expression of the receptor for advanced glycation end-products in human peripheral neuropathies. *Brain and behavior*. 2013;3(6):701-9.
72. Liliensiek B, Weigand M, Bierhaus A, Nicklas W, Kasper M, Hofer S. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;113(11):1641-50.
73. Wu KK, Huan Y. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current Protocols in Pharmacology*. 2008;5.47(40).
74. Hsieh ST, Lin WM, Chiang HY, Huang IT, Ko MH, Chang YC, et al. Skin Innervation and Its Effects on the Epidermis. *Journal of biomedical science*. 1997;4(5):264-8.
75. Boulton AJ, Vileikyte L, Ragnarson-Tennvall G, Apelqvist J. The global burden of diabetic foot disease. *Lancet (London, England)*. 2005;366(9498):1719-24.
76. Leckelt J, Guimaraes P, Kott A, Ruggeri A, Stachs O, Baltrusch S. Early detection of diabetic neuropathy by investigating CNFL and IENFD in thy1-YFP mice. *The Journal of endocrinology*. 2016;231(2):147-57.
77. Alam U, Jeziorska M, Petropoulos IN, Asghar O, Fadavi H, Ponirakis G, et al. Diagnostic utility of corneal confocal microscopy and intra-epidermal nerve fibre density in diabetic neuropathy. *PLoS One*. 2017;12(7):e0180175.
78. Reichard M, Weiss H, Poletti E, Ruggeri A, Guthoff RF, Stachs O, et al. Age-Related Changes in Murine Corneal Nerves. *Current eye research*. 2016;41(8):1021-8.
79. Liliensiek B, Weigand MA, Bierhaus A, Nicklas W, Kasper M, Hofer S, et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;113(11):1641-50.
80. Wendt TM, Tanji N, Guo J, Kislinger TR, Qu W, Lu Y, et al. RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *The American journal of pathology*. 2003;162(4):1123-37.
81. Bierhaus A, Haslbeck KM, Humpert PM, Liliensiek B, Dehmer T, Morcos M, et al. Loss of pain perception in diabetes is dependent on a receptor of the immunoglobulin superfamily. *J Clin Invest*. 2004;114(12):1741-51.
82. Sakaguchi T, Yan SF, Yan SD, Belov D, Rong LL, Sousa M, et al. Central role of RAGE-dependent neointimal expansion in arterial restenosis. *J Clin Invest*. 2003;111(7):959-72.
83. Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran LJ, Jr., Chow WS, et al. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nature medicine*. 1998;4(9):1025-31.
84. Rong LL, Trojaborg W, Qu W, Kostov K, Yan SD, Gooch C, et al. Antagonism of RAGE suppresses peripheral nerve regeneration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004;18(15):1812-7.
85. Bierhaus A, Nawroth P. Schlüssel zum Verständnis chronischer Erkrankungen. *Ruperto Carola*. 03/2002.
86. He CJ, Koschinsky T, Buenting C, Vlassara H. Presence of diabetic complications in type 1 diabetic patients correlates with low expression of mononuclear cell AGE-receptor-1 and elevated serum AGE. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*. 2001;7(3):159-68.
87. De Cilla S, Ranno S, Carini E, Fogagnolo P, Ceresara G, Orzalesi N, et al. Corneal subbasal nerves changes in patients with diabetic retinopathy: an in vivo confocal study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(11):5155-8.
88. Nitoda E, Kallinikos P, Pallikaris A, Moschandrea J, Amoiridis G, Ganotakis ES, et al. Correlation of diabetic retinopathy and corneal neuropathy using confocal microscopy. *Current eye research*. 2012;37(10):898-906.

89. Dyck PJ, Davies JL, Litchy WJ, O'Brien PC. Longitudinal assessment of diabetic polyneuropathy using a composite score in the Rochester Diabetic Neuropathy Study cohort. *Neurology*. 1997;49(1):229-39.
90. Tesfaye S, Chaturvedi N, Eaton SE, Ward JD, Manes C, Ionescu-Tirgoviste C, et al. Vascular risk factors and diabetic neuropathy. *N Engl J Med*. 2005;352(4):341-50.
91. Albers JW, Herman WH, Pop-Busui R, Feldman EL, Martin CL, Cleary PA, et al. Effect of prior intensive insulin treatment during the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) on peripheral neuropathy in type 1 diabetes during the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Study. *Diabetes care*. 2010;33(5):1090-6.
92. Ismail-Beigi F, Craven T, Banerji MA, Basile J, Calles J, Cohen RM, et al. Effect of intensive treatment of hyperglycaemia on microvascular outcomes in type 2 diabetes: an analysis of the ACCORD randomised trial. *Lancet (London, England)*. 2010;376(9739):419-30.
93. Gaede P, Lund-Andersen H, Parving HH, Pedersen O. Effect of a multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008;358(6):580-91.
94. Gaede P, Vedel P, Larsen N, Jensen GV, Parving HH, Pedersen O. Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2003;348(5):383-93.
95. Ceska Burdova M, Kulich M, Dotrelova D, Mahelkova G. Effect of diabetes mellitus type 1 diagnosis on the corneal cell densities and nerve fibers. *Physiological research*. 2018;67(6):963-74.
96. Davidson EP, Coppey LJ, Yorek MA. Early loss of innervation of cornea epithelium in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats: improvement with ilepatril treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(13):8067-74.
97. DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *Journal of cataract and refractive surgery*. 2011;37(3):588-98.
98. Kalteniece A, Ferdousi M, Azmi S, Marshall A, Soran H, Malik RA. Keratocyte Density Is Reduced and Related to Corneal Nerve Damage in Diabetic Neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018;59(8):3584-90.
99. Yam GH, Williams GP, Setiawan M, Yusoff NZ, Lee XW, Htoon HM, et al. Nerve regeneration by human corneal stromal keratocytes and stromal fibroblasts. *Scientific reports*. 2017;7:45396

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe.

Berlin, 05.09.2020

Tabellarischer Lebenslauf

Name, Vorname: Thomas, Florian
Straße, Hausnummer: Sonnenallee 147
E-Mail: flo9294@gmx.de
Handynummer: 01575 / 7670461
Geburtsdatum: 09.02.1994
Geburtsort: Rüdersdorf (bei Berlin)
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch



Bildungsweg

03/2021-heute

Assistenzarzt für Anästhesiologie

Caritas-Klinik Maria Heimsuchung

01/2020-02/2021

Assistenzarzt der Anästhesiologie

im ambulanten OP-Zentrum FirstOP

01/2019-12/2019

Promotionsstudent

an dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Rostock

Thema: Der Einfluss des RAGE (receptor for advanced glycation end products) auf den subbasalen Nervenplexus der Cornea bei Mäusen mit einem Diabetes mellitus

10/2012-11/2018

Studium der Humanmedizin

an der Universität Rostock

Abschluss/Abschlussnote: Staatsexamen 2,33

07/2006-07/2012

Heinitz-Gymnasium Rüdersdorf

Abschluss: Abitur

Abiturnote: 1,6

Famulatur und Praktisches Jahr

03/2015

Famulatur Allgemeinmedizin

Jürgen Sadowski (Woltersdorf b. Berlin)

08/2015

Famulatur Gastroenterologie

Universitätsklinikum Rostock

03/2016

Famulatur Anästhesie

Sankt Gertrauden-Krankenhaus (Berlin)

08/2016

Famulatur Kardiologie

St.-Hedwig-Krankenhaus (Berlin)

03/2017

Famulatur Rettungsstelle

Immanuel Klinik Rüdersdorf

11/2017 – 02/2018

1. Terial Chirurgie im Krankenhaus Bethel Berlin

03/2018 – 06/2018

2. Terial Anästhesie im

Evangelischen Krankenhaus Königin Elisabeth Herzberge

07/2018 – 10/2018

3. Terial Innere Medizin im Krankenhaus Bethel Berlin

Nebenjob

01/2016-03/2016

Prodekanat für Forschung (Universität Rostock)

05/2019-12/2019

Anästhesieassistenz bei FirstOP

Sprachen

Sprachkenntnisse

Englisch, Französisch (Grundkenntnisse)