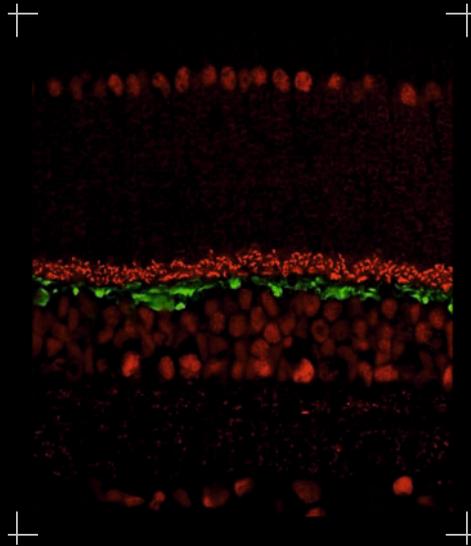


# Morphologische Analyse von caninen RPE65<sup>-/-</sup> Retinae vor und nach AAV-vermittelter Gentherapie

---

**DANIELA KLEIN**



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



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**Morphologische Analyse von caninen *RPE65*<sup>-/-</sup>  
Retinae vor und nach AAV-vermittelter  
Gentherapie**

**INAUGURALDISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Humanbiologie  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Daniela Klein**  
aus Offenbach am Main

Gießen 2014

Aus der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde  
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,  
Standort Gießen

Direktorin: Prof. Dr. Birgit Lorenz

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Knut Stieger

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Thomas Braun

Tag der Disputation: 29.01.2015

## ***Meiner Familie***

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	Das Sehvermögen.....	2
1.2	<b>Aufbau der Säugetiernetzhaut</b> .....	<b>3</b>
1.2.1	Retinales Pigmentepithel.....	4
1.2.2	Tapetum lucidum.....	4
1.2.3	Photorezeptoren.....	5
1.2.4	Bipolarzellen.....	9
1.2.5	Horizontalzellen.....	11
1.2.6	Amakrinzellen.....	12
1.2.7	Ganglienzellen .....	13
1.2.8	Gliazellen .....	13
1.3	<b>Visueller Zyklus</b> .....	<b>14</b>
1.3.1	RPE65 und seine Eigenschaften.....	17
1.4	<b>Erkrankungen aufgrund von Mutationen im RPE65-Gen</b> .....	<b>18</b>
1.4.1	Frühkindliche Netzhautdegeneration beim Menschen.....	18
1.4.2	Kongenitale stationäre Nachtblindheit und RPE65-Mutation beim Hund.....	20
1.5	<b>Gentherapie</b> .....	<b>22</b>
1.5.1	Gentherapievektoren.....	24
1.5.2	Gentherapie beim RPE65-Hundemodell .....	26
1.5.3	Klinische Phase der Gentherapie beim Menschen mit RPE65-Mutationen.....	28
1.6	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>30</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>31</b>
2.1	<b>Materialien</b> .....	<b>31</b>
2.1.1	Versuchstiere .....	31
2.1.2	Weitere Materialien .....	33
2.2	<b>Methodik der Vorarbeiten</b> .....	<b>42</b>
2.2.1	Subretinale Injektion.....	42
2.2.2	Postoperative Erfolgs- und Verlaufskontrollen .....	42
2.2.3	Präparation der Augenbecher und Fixation.....	42
2.3	<b>Methodik der eigenen Arbeit</b> .....	<b>43</b>

2.3.1	Immunohistochemie .....	43
2.3.1.1	Retinapräparation .....	43
2.3.1.2	Anfertigung von vertikalen Gefrierschnitten .....	45
2.3.1.3	Färbung der Präparate mittels indirekter Immunfluoreszenz .....	45
2.3.1.3.1	Färbung von vertikalen Gefrierschnitten.....	45
2.3.1.3.2	Färbung von Flachpräparaten zur Zapfenverteilungsanalyse.....	46
2.3.1.4	Epifluoreszenzmikroskopie und konfokale Laserscanningmikroskopie.....	47
2.3.2	Bildbearbeitung und Ergebnisauswertung.....	47
2.3.2.1	Analyse der Zapfenverteilung .....	48
2.3.2.2	Analyse der synaptischen Verbindungen in der OPL.....	49
2.3.2.3	Statistische Auswertung .....	49
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>51</b>
<b>3.1</b>	<b>Erstellung eines Zellmarkerkatalogs für die canine Retina .....</b>	<b>51</b>
<b>3.2</b>	<b>Vergleichende Analysen von Wildtyp- und <i>RPE65</i><sup>-/-</sup>- Hunden im jungen adulten Alter</b>	<b>59</b>
3.2.1	Photorezeptoren.....	59
3.2.1.1	Zapfenverteilung.....	59
3.2.1.2	Opsinlokalisierung.....	63
3.2.2	Synaptische Verbindungen in der OPL .....	65
<b>3.3</b>	<b>Retinale Strukturen im zeitlichen Verlauf der Erkrankung.....</b>	<b>70</b>
3.3.1	Photorezeptoren.....	70
3.3.2	Synaptische Verbindungen in der OPL .....	72
<b>3.4</b>	<b>Retinale Strukturen nach erfolgreicher Gentherapie.....</b>	<b>75</b>
3.4.1	Zapfen nach Gentherapie.....	75
3.4.1.1	Zapfenverteilung.....	75
3.4.1.2	Opsinlokalisierung.....	76
3.4.2	Synaptische Verbindungen in der OPL .....	80
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>83</b>
<b>4.1</b>	<b>Zellmarkerkatalog .....</b>	<b>83</b>
<b>4.2</b>	<b>Status quo im Alter von 2 Jahren .....</b>	<b>86</b>
<b>4.3</b>	<b>Morphologische Veränderungen im Verlauf der Erkrankung .....</b>	<b>91</b>
<b>4.4</b>	<b>Gentherapeutische Effekt auf die Zellen der Retina .....</b>	<b>93</b>

4.5	Fazit.....	95
5	ZUSAMMENFASSUNG .....	96
6	SUMMARY .....	97
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	98
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	100
9	TABELLENVERZEICHNIS.....	102
10	LITERATURVERZEICHNIS.....	103
11	ANHANG .....	118
12	PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN.....	123
12.1	Publikationen .....	123
12.2	Präsentationen.....	123
12.3	Vorträge.....	123
12.4	Poster .....	124
13	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....	125
14	DANKSAGUNG .....	126

# 1 Einleitung

Die frühkindliche Netzhautdegeneration stellt eine der schwersten klinischen Formen der degenerativen Erkrankung der Retina dar und ist mit schweren visuellen Einschränkungen bis hin zur vollständigen Erblindung noch vor dem 20. Lebensjahr verbunden. Beim Menschen wurden verschiedene Gene als Ursache identifiziert, unter anderem das Gen RPE65, welches hier von besonderem Interesse ist. Das Protein RPE65 ist im retinalen Pigmentepithel (RPE) lokalisiert und ein zentrales Enzym des visuellen Zyklus zur Wiederherstellung des Sehpigmentes.

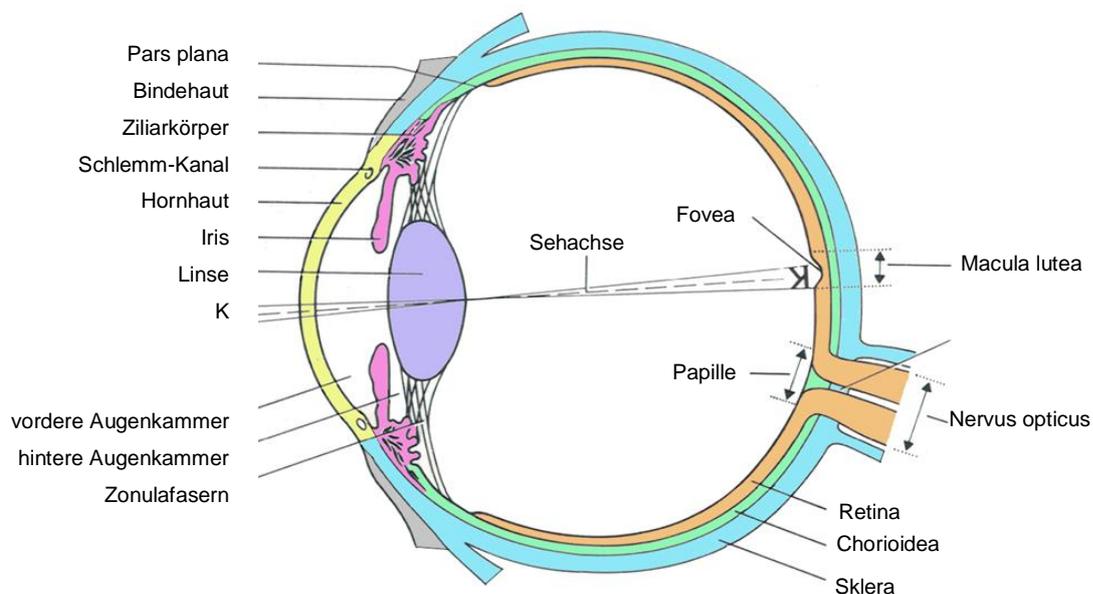
Adenoassoziiertes Virus (AAV) vermittelte Gentherapie, die das Einschleusen einer korrekten Kopie des mutierten Gens in das RPE zum Ziel hat, führt im Hundemodell für diese Erkrankung erfolgreich zur Wiederherstellung des Sehvermögens. Klinische Phase I/II Studien in den USA und England haben beim Menschen nur teilweise die Sehleistung verbessern können. Die Ursache für diese Diskrepanz ist unklar.

Im Rahmen dieser Studie sollten der Verlauf der Erkrankung und die Auswirkungen des retinalen Gentransfers am natürlich vorkommenden Hundemodell untersucht werden. Für die Analysen standen komplette Augen von Tieren zu Verfügung, die zum Teil im Rahmen von präklinischen Studien im INSERM UMR 1089 in Nantes (Frankreich) unter der Leitung von Dr. Fabienne Rolling erfolgreich gentherapeutisch behandelt wurden. Die detaillierten immunohistochemischen Untersuchungen der verschiedenen Netzhäute wurden unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Knut Stieger aus dem Labor für molekulare Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Universität Gießen durchgeführt. Durch eine Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt am Main (PD Dr. Silke Haverkamp) konnten die dort vorhandenen Fluoreszenzmikroskope und das konfokale Laserscanningmikroskop genutzt werden.

Ein Teil der Ergebnisse konnte bereits erfolgreich in *Plos One* publiziert werden.

## 1.1 Das Sehvermögen

Der Aufbau des Auges ist bei allen Säugetieren sehr ähnlich (Abbildung 1.1) (Grehn 1995). Der Lichteinfall geschieht durch eine Öffnung in der Regenbogenhaut (Iris), die als Pupille bezeichnet wird und deren Durchmesser verändert werden kann. Die Iris ist bei vielen Tieren und auch beim Menschen charakteristisch gefärbt und individuell. Nachdem das Licht die Pupille passiert hat, trifft es auf die Linse wo es gebrochen wird. Danach tritt das Licht durch die verschiedenen Schichten der Netzhaut (Retina) und erregt schließlich die Photorezeptoren. Ab hier wird das Licht in ein elektisches Signal umgewandelt und der Reiz wird dann über verschiedene Zellen, welche in den folgenden Abschnitten genauer beschrieben werden, an das Gehirn weitergeleitet. Die Sehbahn beginnt somit in den Photorezeptoren (für die Verschaltung innerhalb der Retina siehe Abschnitt 1.2) und setzt sich im optischen Nerv (Nervus opticus) fort. In der Sehnervenkreuzung (Chiasma opticum) kreuzt ein Anteil der Fasern der nasalen Netzhauthälfte auf die Gegenseite. Die Sehbahn heißt ab hier Tractus opticus und gelangt als dieser zum seitlichen Kniehöcker (Corpus geniculatum laterale). Nach einer erneuten Verschaltung wird das Signal zur Sehrinde der Großhirnrinde (Cortex) weitergeleitet. Die Versorgung der Netzhaut erfolgt über die Aderhaut (Chorioidea). Die Aderhaut ist von der schützenden Lederhaut (Sklera) umgeben, welche dem Auge seine Stabilität gibt. Die Sklera geht im vorderen Bereich in die Hornhaut (Cornea) über, diese dient dem Auge ebenfalls als Schutz vor äußeren Einflüssen.

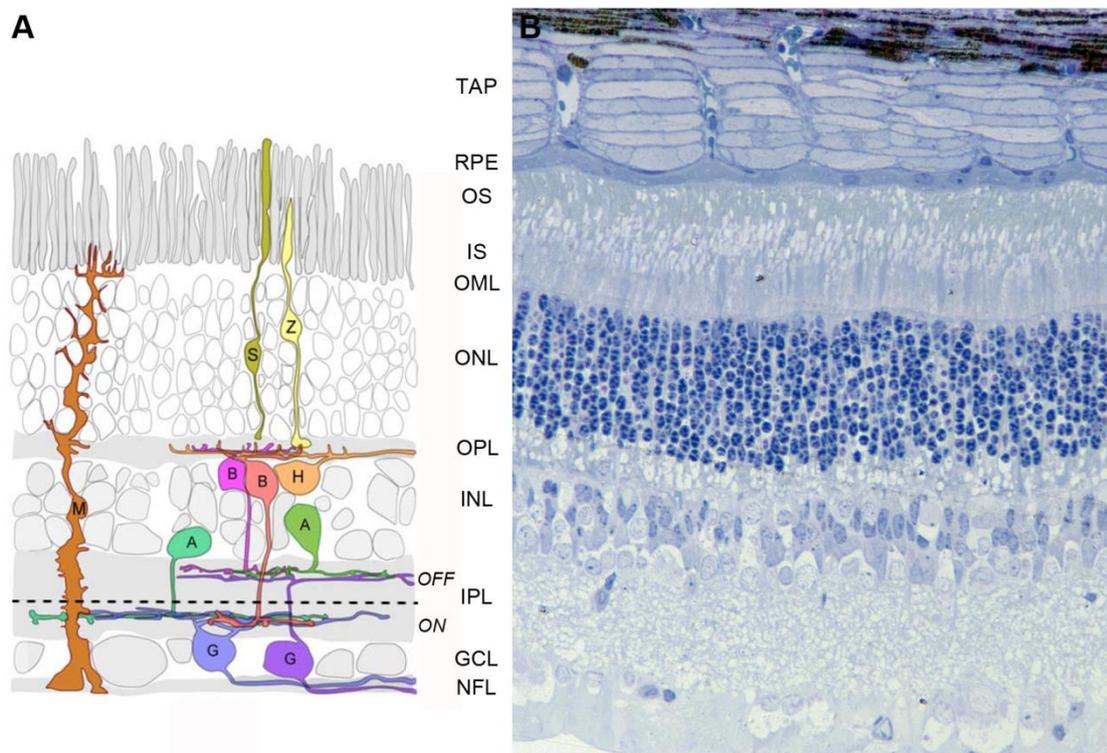


**Abbildung 1.1 Schematische Darstellung des menschlichen Auges**

*Zu sehen sind die anatomischen Strukturen des Auges im Querschnitt. Des Weiteren ist der Strahlengang des einfallenden Lichts durch das Auge dargestellt (gestrichelte Linie). Das erfasste Objekt (K) wird verkehrt herum auf der Netzhaut dargestellt und erst durch das Gehirn wieder in seine ursprüngliche Position gebracht. Modifiziert nach (Grehn 1995).*

## 1.2 Aufbau der Säugetiernetzhaut

Die Netzhaut der Säugetiere gliedert sich in mehrere Schichten (Dowling 2012a). Zum retinalen Pigmentepithel hin befinden sich die Außensegmente (OS) der Photorezeptoren und nachfolgend die Innensegmente (IS) dieser Zellen. Die Zellkerne der Photorezeptoren bilden die äußere nukleäre Schicht (ONL). Die Verschaltung der Photorezeptoren (Neurone 1. Ordnung) auf die Bipolar- und Horizontalzellen (Neurone der 2. Ordnung) geschieht in der äußeren plexiformen Schicht (OPL). Unter der OPL liegt die innere nukleäre Schicht (INL), welche aus den Zellkernen der Amakrin-, Bipolar- und Horizontalzellen besteht. In der inneren plexiformen Schicht (IPL) werden die Neurone der 2. Ordnung mit den Ganglienzellen (Neurone der 3. Ordnung) verschaltet. Die IPL wird in zwei Schichten gegliedert: Die ON-Schicht und die OFF-Schicht (Kolb 2007a). Die Zellkerne der Ganglienzellen formen die Ganglienzellschicht und ihre Axone die Nervenfaserschicht (NFL) (Dowling 2012a). Eine Darstellung der einzelnen Schichten sowie der Zellen innerhalb der Schichten zeigt Abbildung 1.2. Die Zellarten werden in den folgenden Abschnitten erklärt.



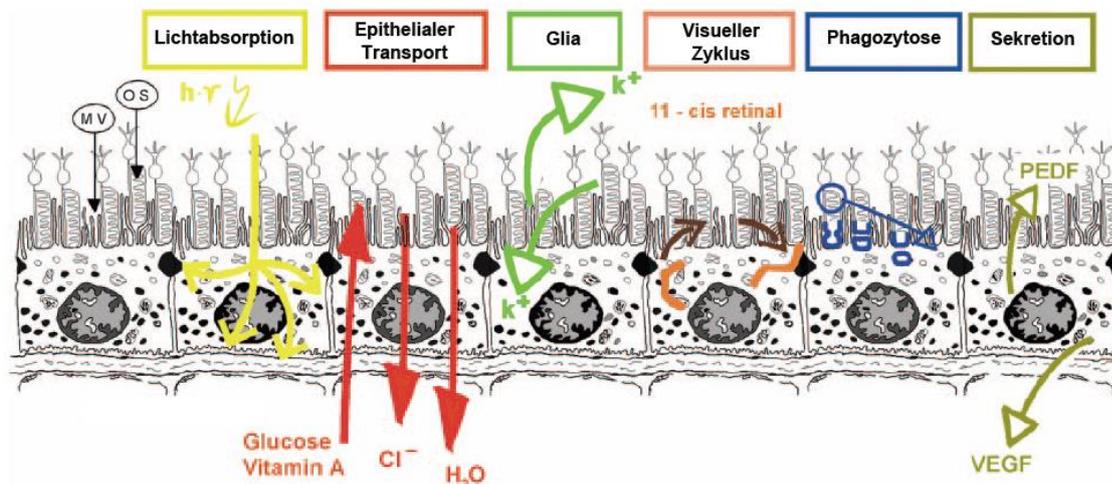
**Abbildung 1.2 Aufbau der Säugetierretina**

(A) Grafische Darstellung der retinalen Schichten (B) Toluidinblau Färbung der zentralen caninen Netzhaut. TAP Tapetum lucidum. RPE Retinale Pigmentepithel. OS: Außensegmente; IS: Innensegmente; ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht; IPL: Innere plexiforme Schicht; OFF: OFF-Schicht der inneren plexiformen Schicht; ON: ON-Schicht der inneren plexiformen Schicht; GCL: Ganglienzellschicht; NFL: Nervenfaserschicht; S: Stäbchen; Z: Zapfen; B: Bipolarzelle; H: Horizontalzelle; A: Amakrinzelle; G: Ganglienzelle; M: Müllerzelle. (A) Modifiziert nach (Euler et al. 2009; Puller 2009); (B) Quelle: Augenklinik Gießen.

## 1.2.1 Retinales Pigmentepithel

Das retinale Pigmentepithel (RPE) ist ein hexagonales einschichtiges Flimmerepithel, welches zwischen der Chorioidea und der Retina lokalisiert ist (Bok 1993). Die Zellen enthalten Melanosomen, welche das Pigment Melanin beinhalten. Die mikrovillären Fortsätze des RPEs dienen der Verbindung mit den Außensegmenten der Photorezeptoren.

Das Epithel hat verschiedene Aufgaben (Abbildung 1.3) (Strauss 2005). Zum einen stellt es eine wichtige Schutzfunktion für die Retina dar, da es das durchgehende Licht absorbiert. Eine weitere Funktion ist die Versorgung der Photorezeptoren mit Nährstoffen sowie die Sekretion von verschiedenen Stoffen, die die Retina benötigt. Die RPE-Zellen sind in den visuellen Zyklus involviert (siehe Abschnitt 1.3). Im Rahmen des Abbaus der abgenutzten Diskmembranen der Photorezeptoren hat das RPE eine wichtige Phagozytosefunktion. Des Weiteren ist das RPE ein Teil der Blut-Retina-Schranke und hält somit die Homöostase der Ionen aufrecht.



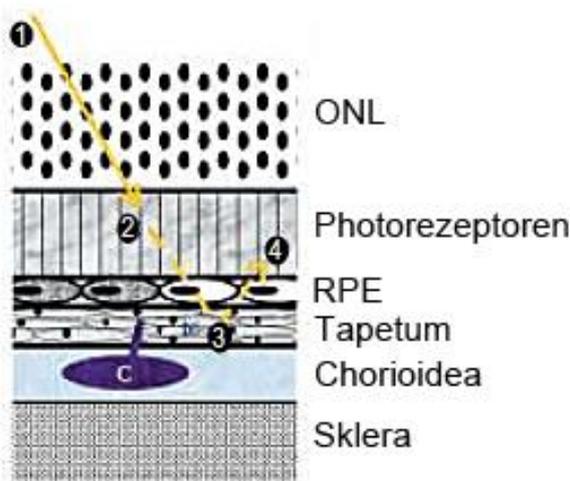
**Abbildung 1.3 Die Aufgaben des retinalen Pigmentepithels**

MV: Mikrovilli; OS: Außensegment; PEDF: Pigmentepithel spezifischer Faktor; VEGF: Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor; Cl: Clorid; H<sub>2</sub>O: Wasser. Modifiziert nach (Strauss 2005).

## 1.2.2 Tapetum lucidum

Das Tapetum lucidum ist eine besondere Schicht, welche nur bei wenigen Säugetieren, aber bei vielen Fischen und einigen Reptilien, zu finden ist (Ollivier et al. 2004). Der Hund hat ein sogenanntes Tapetum lucidum fibrosum. Diese Art von Tapetum besteht aus rechteckigen Zellen, welche zwischen der Chorioidea und dem RPE lokalisiert sind. Je nach Lokalisation innerhalb des Auges besteht es aus mehreren Zellschichten (zentral) oder aus nur einer (peripher). Generell findet man

beim Hund nur im superioren Bereich Tapetalzellen und hier enthält das RPE kein Melanin, so dass der Augenhintergrund im diesem Bereich heller erscheint (Lesiuk & Braekevelt 1983). Die Funktion des Tapetums ist die Reflexion des eintreffenden Licht. Dies führt zu einer zweiten Anregung der Photorezeptoren. Zu diesem Zwecke beinhalten die Zellen des Tapetum Zinkcysteine, welche das Licht reflektieren (Chijiwa et al. 1990). Dieser Prozess soll zu einer besseren Anregung der Photorezeptoren bei schwachen Lichtverhältnissen führen und somit vor allem der Verbesserung des Sehvermögens in der Dämmerung dienen. Deshalb findet man ein Tapetum vor allem bei dämmerungs- und nachtaktiven Tieren. Der Aufbau des Tapetums und der Verlauf des Lichts ist in Abbildung 1.4 dargestellt.



**Abbildung 1.4 Tapetum lucidum fibrosum**

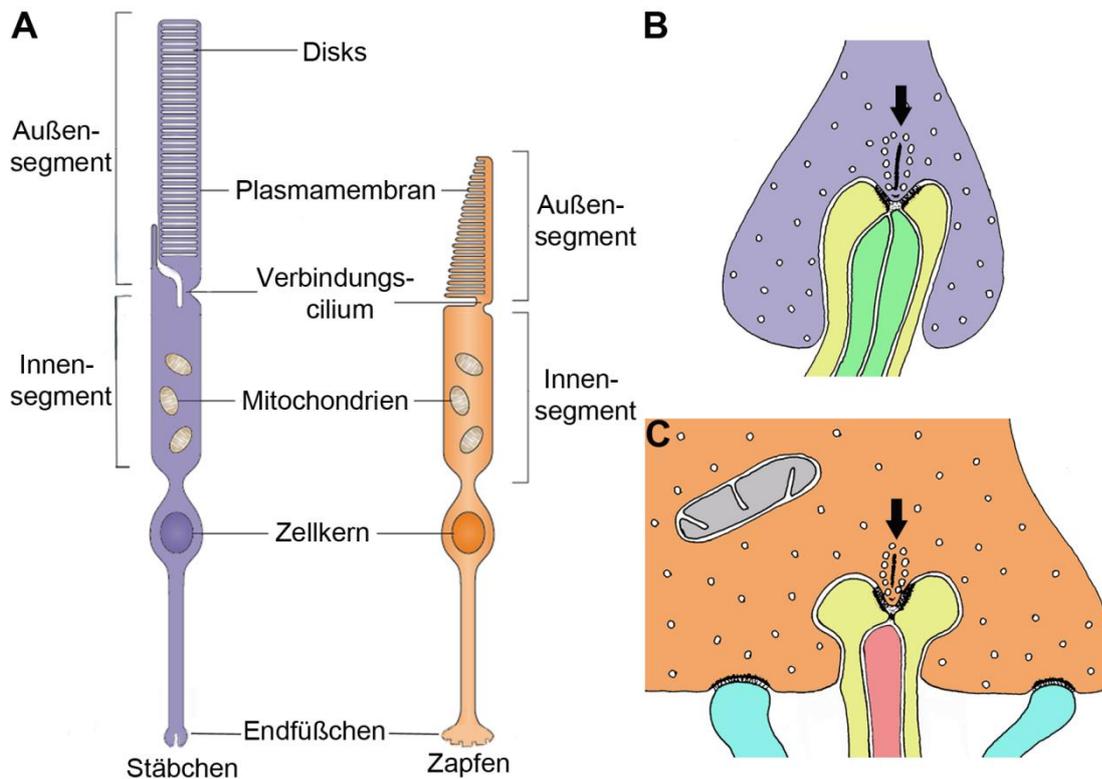
*Diagramm des caninen Tapetums. 1. Einfallendes Licht. 2. Erste Anregung der Photorezeptoren. 3. Reflexion des Lichts durch das Tapetum. 4. Zweite Anregung der Photorezeptoren. ONL: Äußere nukleäre Schicht; RPE: Retinales Pigmentepithel. Modifiziert nach (Ollivier et al. 2004).*

### 1.2.3 Photorezeptoren

Der Photorezeptor ist in verschiedene Teile gegliedert (Abbildung 1.5). Die Außensegmente (*outer segments*, OS) verbinden die Photorezeptoren mit dem RPE. Die Außensegmente werden kontinuierlich erneuert, dies geschieht jede Nacht (Young 1971). Die abgestoßenen Teile werden vom RPE phagozytiert. Über das Verbindungscilium (*Connecting cilium*, CC) ist das Außensegment mit dem Innensegment (*inner segment*, IS) verbunden (Fliegauß et al. 2007). Hier finden die meisten Stoffwechselprozesse statt, deshalb ist diese Struktur reichhaltig an Mitochondrien. Als nächster Abschnitt folgt der Zellkern. Die Zellkerne bilden in ihrer Gesamtheit die äußere nukleäre Schicht (*outer nuclear layer*, ONL). Über das Terminal oder auch Endfüßchen ist der Photorezeptor mit den nachgeschalteten Zellen verbunden. Untereinander sind die Photorezeptoren über elektrische Synapsen miteinander verbunden (Raviola & Gilula 1975).

Zwei Typen von Photorezeptoren können unterschieden werden. Zum einem gibt es Stäbchen (S, Abbildung 1.2) und zum anderen Zapfen (Z, Abbildung 1.2). Die beiden Photorezeptortypen (Abbildung 1.5 A) unterscheiden sich in ihrer Morphologie und in ihrer Aufgabe. Die Außensegmente der Stäbchen bestehen aus aufeinander gestapelten Membranscheiben (Disks), wohingegen die Außensegmente der Zapfen aus kontinuierlichen Einstülpungen der Plasmamembran bestehen. In ihrer Form unterscheiden sie sich ebenfalls. Das Außensegment des Stäbchen ist zylindrisch geformt und lang, während das Außensegment der Zapfen kürzer ist und eine konische Form aufweist. Die Endfüßchen der Stäbchen sind über eine einzelne invaginierte Bandsynapse mit den nachgeschalteten Zellen verbunden. Das Stäbchen ist auf diese Weise über eine Synapse mit zwei lateralen Horizontalzellfortsätzen und zwei zentralen Bipolarzellendriten verbunden, welches präsynaptisch ein einzelnes großes Proteinband ausweist (Dowling & Boycott 1966) (Abbildung 1.5 B). Die Endfüßchen der Zapfen sind viel größer als die der Stäbchen und ein einzelnes Endfüßchen enthält zwischen 20 und 40 Bandsynapsen (Ahnelt et al. 1990). Die invaginierten Bandsynapsen der Zapfen setzen sich aus zwei lateralen Horizontalzellendriten und einem zentralen ON-Zapfenbipolarzellendrit zusammen. Diese Struktur wird Triade genannt (Kolb 2007b). Die Zapfenendfüßchen sind mit den OFF-Zapfenbipolarzellen hingegen über basale synaptische Verbindungen ohne Invagination verbunden (Dowling 2012a) (Abbildung 1.5 C).

Die Stäbchen sind für das Dämmerungs- und Nachtsehen zuständig. Die meisten Säugetiere, wie auch der Hund, haben eine stäbchendominierte Retina (Jeon et al. 1998; Mowat et al. 2008). Ihre Anzahl variiert je nach Spezies und nimmt von zentral nach peripher hin ab. Das Sehpigment der Stäbchen heißt Rhodopsin und ist in den Außensegmenten lokalisiert. Das Rhodopsin hat sein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von ungefähr 508 nm (Jacobs et al. 1993), d.h. die Wahrscheinlichkeit der Erregung des Photorezeptors ist bei dieser Wellenlänge am höchsten. Die Empfindlichkeit der Stäbchen ist sehr viel höher als die der Zapfen, da den Stäbchen bereits ein einzelnes Photon zur Anregung ausreicht (Hecht et al. 1942). Die Folge davon ist, dass es den Stäbchen möglich ist, auch bei sehr schwachen Lichtintensitäten zu reagieren.



**Abbildung 1.5 Schematische Darstellung der Photorezeptoren**

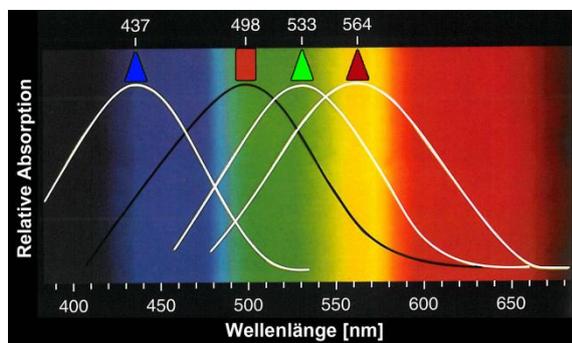
(A) Grafik zum Aufbau des Photorezeptors. Der Photorezeptor gliedert sich in das Außensegment, das Innensegment, den Zellkern und sein Terminal. Stäbchen (lila) und Zapfen (orange) unterscheiden sich vor allem im Aufbau ihrer Außensegmente und ihrer Terminalien. (B) Detaillierte Ansicht des Stäbchenendfüßchens. Das Stäbchen (lila) bildet mit den nachgeschalteten Horizontalzellen (gelb) und Stäbchenbipolarzellen (grün) eine invaginierende Synapse mit einem Proteinband (Pfeil). (C) Ausschnitt aus der Detailansicht des Zapfenendfüßchens. Der Zapfen (orange) bildet mit den nachgeschalteten ON-Zapfenbipolarzellen (rot) und den Horizontalzellen (gelb) eine invaginierende Synapse mit Proteinbändern aus. Die OFF-Zapfenbipolarzellen (blau) hingegen bilden einen basale nicht invaginierenden Kontakte mit den Zapfen. (A) Modifiziert nach (Wright et al. 2010); (B und C) Modifiziert nach (Dowling 2012b).

Die Zapfen unterteilt man beim Menschen und den Altweltaffen in drei Subtypen: Blauzapfen, Grünzapfen und Rotzapfen (Nathans et al. 1986). Somit sind sie sogenannte Trichromaten (Jacobs 2008). Diese Zellen sind für das Farb- und Kontrastsehen verantwortlich. Die Einteilung der Zapfen erfolgt auf Grund ihres photosensitiven Stoffes, dem Zapfenopsin (siehe Abbildung 1.6). Die Blauzapfen besitzen ein Opsin, welches eine spektrale Sensitivität von ungefähr 420 nm aufweist. Da dies in kurzwelligen Lichtbereich ist, werden sie auch *short wavelength* sensitive Zapfen (S-Zapfen) genannt. Die Grünzapfen beinhalten ein Opsin, das auf eine Wellenlänge um 530 nm am besten reagiert. Dies liegt im mittleren Wellenlängenbereich, daher werden sie auch *medium wavelength* sensitive Zapfen (M-Zapfen) genannt. Die Rotzapfen haben ihr Absorptionsmaximum bei ungefähr 560 nm,

welches im langwelligen Bereich zu finden ist, deswegen werden sie auch als *long wavelength* sensitive Zapfen (L-Zapfen) bezeichnet.

Bei den meisten Säugetierspezies, so auch beim Hund (Peichl 2005), findet man aber nur 2 Zapfentypen, Blauzapfen (Absorptionsmaximum 431 nm) und eine Mischform, welche als Rotgrünzapfen (L/M-Zapfen) (Absorptionsmaximum 555 nm) bezeichnet wird (Jacobs et al. 1993). Dies macht diese Tiere zu sogenannten Dichromaten.

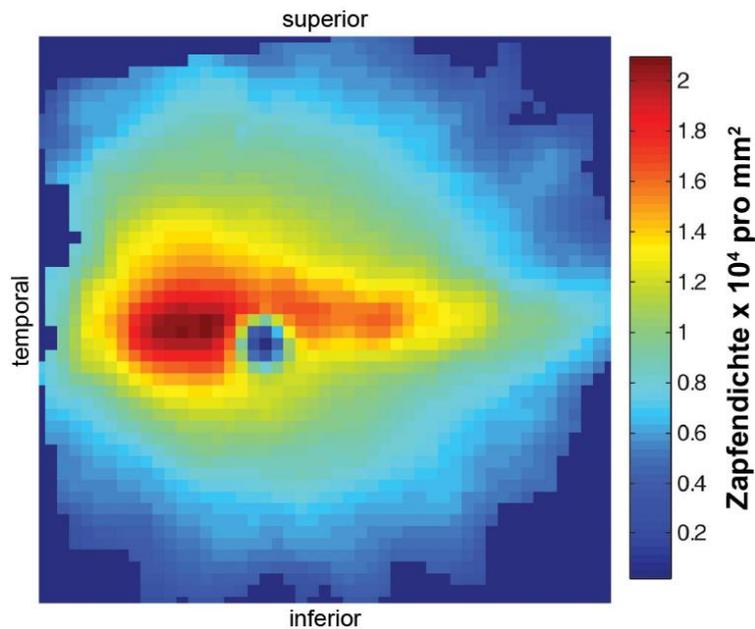
Bei manchen Säugetieren hat sich das Absorptionsmaximum der Zapfenopsine im Laufe der Jahre verändert oder einige Zapfentypen sind überhaupt nicht mehr vorhanden. Zum Beispiel weist der Blauzapfen der Mäuse eine eher UV-sensitive spektrale Sensitivität (350-360 nm) auf (Gouras & Ekesten 2004). Diese Veränderungen sind wahrscheinlich eine Anpassung an die verschiedenen Lebensumstände der Tiere. Bei einigen Amphibien und bei Vögeln treten bei den Zapfen noch weitere Subtypen auf, womit diese Tiere vermutlich ein noch besseres Farbsehen als der Mensch aufweisen.



**Abbildung 1.6 Spektrale Sensitivität der Photorezeptoren beim Primaten**

Die Photorezeptoren reagieren aufgrund ihres enthaltenen Opsins auf verschiedene Wellenlängen des Lichts. S-Zapfen (blaues Dreieck), M-Zapfen (grünes Dreieck), L-Zapfen (rotes Dreieck) und Stäbchen (rotes Quadrat) Modifiziert nach (Dowling 2012b).

Die Verteilung der Zapfen in der Retina ist genau wie bei den Stäbchen von zentral nach peripher hin abnehmend (Abbildung 1.7). Als besondere Struktur ist hier die Fovea der Primaten und des Menschen zu erwähnen (Cajal 1911). Sie stellt eine zentrale Einsenkung der Retina dar, welche sich lateral zum optischen Nerv befindet und den Bereich des schärfsten Sehens darstellt. Hier findet man eine besonders hohe Zapfendichte und keine Stäbchen, wobei es ebenfalls einen zentralen blauzapfenfreien Bereich in dieser Struktur gibt (Bumsted & Hendrickson 1999). Analog zur Fovea weisen einige Tierarten, so auch der Hund, eine sogenannte Area centralis auf (Abbildung 1.7). Die Zapfendichte ist hier ebenfalls erhöht, wobei die Einsenkung der Struktur wie im Falle der Fovea fehlt (Mowat et al. 2008). Des Weiteren gibt es im zentralen Bereich der Retina beim Hund und weiteren Tieren noch eine zusätzliche Struktur, welche mit der Fovea in Vergleich zu setzen ist, der *visual streak*. Dieser definiert sich aber über eine höhere Ganglienzelldichte in diesem Bereich (Peichl 1992).



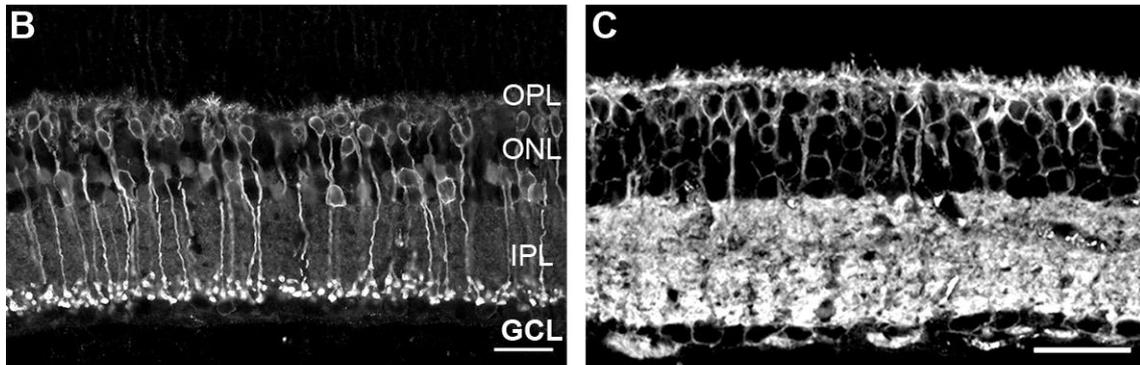
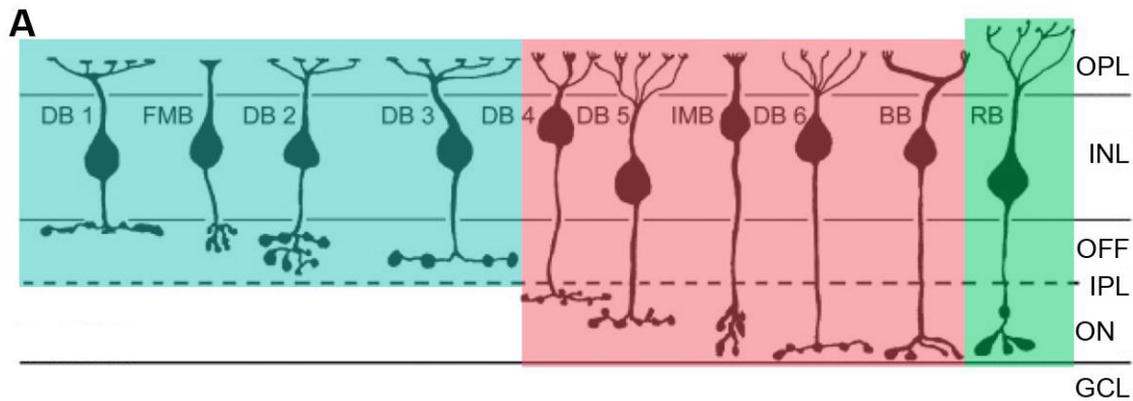
**Abbildung 1.7**  
**Zapfendichte in der Hunderetina**

*Die Zapfendichte ist von zentral nach peripher hin abnehmend. Der blaue Fleck in der Mitte der Retina stellt den Austritt des optischen Nervs dar. Temporal vom optischen Nerv ist die Area centralis gelegen (dunkelroter Bereich). Sie besitzt die höchste Zapfendichte und stellt ein Analogon zur menschlichen Fovea dar. Modifiziert nach (Mowat et al. 2008).*

In der Netzhaut gibt es noch weitere photosensitive Zellen, die melanopsinhaltigen Ganglienzellen. Man geht aber davon aus, dass diese Zellen nicht am klassischen Sehvorgang beteiligt sind, sondern am Pupillenlichtreflex und der circadianen Rhythmik (Berson et al. 2002).

### 1.2.4 Bipolarzellen

Die Bipolarzellen verbinden die vorgeschalteten Photorezeptoren mit den nachgeschalteten Ganglienzellen. Die Dendriten der Bipolarzellen kontaktieren die Photorezeptorendfüßchen und bilden mit diesen und den Fortsätzen der Horizontatzellen zahlreiche Synapsen für die Verschaltung der Zellen und der Weiterleitung des elektrischen Impulses aus. Diese Synapsen bilden die äußere plexiforme Schicht (outer plexiform layer, OPL). Die Zellkerne der Bipolarzellen bilden die innere nukleäre Schicht (inner nuclear layer, INL) und ihre synaptischen Verbindungen mit den Ganglienzellen die innere plexiforme Schicht (inner plexiform layer, IPL).



### Abbildung 1.8 Bipolarzelltypen

(A) Schematische Darstellung der zehn verschiedenen Bipolarzellen in der menschlichen Retina. Die vier Zellen auf der linken Seite (blau hinterlegt) stellen die Zapfen-OFF-Bipolarzellen dar. In der Mitte befinden sich die Zapfen-ON-Bipolarzellen (rot hinterlegt) und ganz rechts ist die einzige Stäbchenbipolarzelle zu sehen (grün hinterlegt). (B) Stäbchenbipolarzellen in der Mäuseretina. Mit Protein Kinase C alpha lassen sich die Stäbchenbipolarzellen anfärben. (C) In der Mäuseretina lassen sich die ON-Bipolarzellen mit Hilfe von  $G_o$  alpha darstellen. DB1-DB6: Diffuse Bipolarzelle 1-6; FMB: flat midget Bipolarzelle; IMB: invaginating midget Bipolarzelle; BB: blue cone Bipolarzelle; RB: Stäbchenbipolarzelle; ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht; IPL: Innere plexiforme Schicht; GCL: Ganglienzellschicht. Maßstabsbalken 25  $\mu$ m. (A) Modifiziert nach (Boycott & Wässle 1991); (B und C) Modifiziert nach (Haverkamp & Wässle 2000).

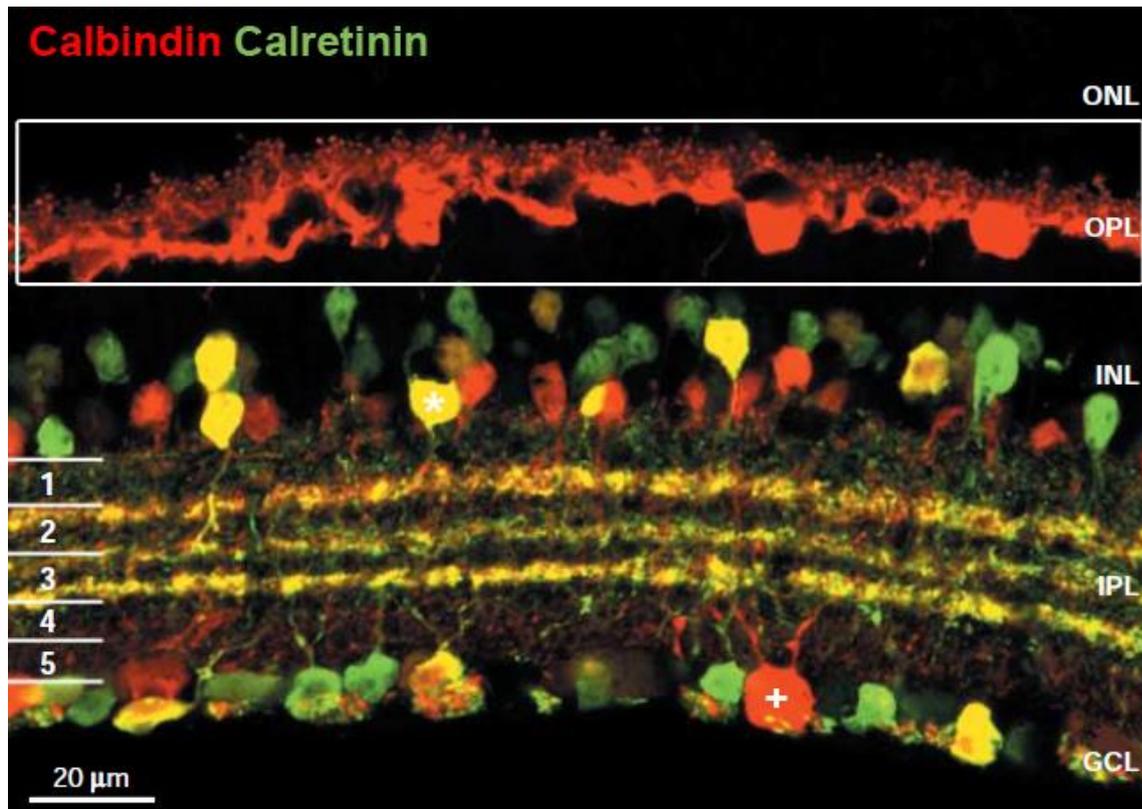
Die Bipolarzellen unterteilen sich in Stäbchen- und Zapfenbipolarzellen. Es gibt nur eine Art Stäbchenbipolarzellen in der Säugetierretina. Bei ihr handelt es sich um eine ON-Bipolarzelle. Eine Stäbchenbipolarzelle ist mit mehreren Photorezeptoren verbunden. Im zentralen Bereich sind das um die 15-20 Stäbchen, in der Peripherie sogar 40-50 Stäbchen (Kolb 2007b).

Die Zapfenbipolarzellen werden in ON- und OFF-Bipolarzellen unterschieden, die entsprechend entweder in der ON- oder OFF-Schicht der IPL stratifizieren. Ihre Einteilung basiert auf ihrer Reaktion nach erfolgtem Lichteinfall auf die vorgeschalteten Photorezeptoren. Durch den Lichteinfall kommt es zur Hyperpolarisation der Photorezeptoren und somit zur Unterdrückung der Ausschüttung von Glutamat. Bei ON-Bipolarzellen führt das Fehlen von Glutamat zu einer Depolarisation der Zellen; bei OFF-Bipolarzellen hingegen zu einer Hyperpolarisation der Zellen (Kolb 2009). Je nach Tierart gibt es unterschiedlich viele Arten von Zapfenbipolarzellen. Beim Menschen

zum Beispiel sind neun verschiedene Arten zu unterscheiden (Abbildung 1.8) (Boycott & Wässle 1991). Es gibt sowohl diffuse Bipolarzellen, welche keine zellspezifische Verschaltung ausbilden als auch die *blau-selektive* Bipolarzelle, welche nur mit Blauzapfen Verschaltungen einget. Durch den Bedarf eines hohen Auflösungsvermögens im zentralen Bereich haben sich beim Menschen und Primaten spezielle Zellen ausgebildet, welche eine eins zu eins Verschaltung aufweisen. Diese Zellen bilden den *midget pathway*, welcher nur in der zentralen Retina existiert. Die Zapfen sind hier direkt mit den *midget* Bipolarzellen und diese mit *midget* Ganglienzellen verknüpft (Gouras 1971). Die Verschaltung der diffusen Bipolarzellen mit den Zapfen ist ganz unterschiedlich und variiert zwischen fünf bis sieben (zentral) und 12-14 (peripher) verschalteten Zapfen pro Bipolarzelle (Chun et al. 1996). Die Situation beim Hund wurde noch nicht eingehend untersucht.

### 1.2.5 Horizontalzellen

Eine weitere Zellart der äußeren plexiformen Schicht und der inneren nukleären Schicht stellen die Horizontalzellen dar (Abbildung 1.9 weißer Rahmen). Man unterscheidet primär zwei verschiedene Arten von Horizontalzellen: A und B Horizontalzellen in der Säugetierretina (Gallego 1971), wobei es speziesspezifische Unterschiede in der Ausbildung der beiden Art gibt. Sie lassen sich anhand ihrer Größe und den Zellen, mit denen sie Verbindungen ausbilden, unterscheiden. A-Horizontalzellen haben einen großen Dendritenbaum, welcher um die 150-250  $\mu\text{m}$  abdeckt. B-Horizontalzellen hingegen haben einen Dendritenbaum mit einem Durchmesser von 75-150 $\mu\text{m}$ . Der Umfang der Zellen variiert je nach Tierart und innerhalb der Retina, d.h. zentral ist der Umfang geringer als in der Peripherie. Die Dendriten beider Horizontalzelltypen sind mit Zapfen verbunden aber nur die Axone der B-Horizontalzellen zeigen eine Verbindung zu den Stäbchen (Hack & Peichl 1999; Bloomfield & Miller 1982). Die Horizontalzellen verknüpfen die Photorezeptoren sowie die Bipolarzellen untereinander und dies führt zu einer Modulation der lateralen Inhibition und somit zu einer besseren Anpassung des Auges an die Lichteinflüsse sowie einer Verbesserung des Kontrastsehens (Wu 1992).



**Abbildung 1.9 Kalziumbindeproteine in der Mausretina**

*Calbindin (rot) markiert in der Mausretina die Horizontalzellen (weißer Rahmen) der OPL sowie einige Amakrinzelltypen (\*) und einige Ganglienzelltypen (+). Calretinin (grün) markiert vor allem Amakrinzellen und einige Ganglienzellen. Gelbmarkierte Zellen exprimieren sowohl Calbindin als auch Calretinin. Die IPL wird in fünf Schichten unterteilt. ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht; IPL: Innere plexiforme Schicht; GCL: Ganglienzellschicht. Modifiziert nach (Haverkamp & Wässle 2000; Wässle 2004).*

## 1.2.6 Amakrinzellen

In der Säugetierretina existieren rund 30 verschiedene Amakrinzelltypen (MacNeil & Masland 1998). Grob lassen sie sich über ihre Größe und die Stratifizierung ihres Dendritenbaums unterscheiden. Sie gliedern sich in schmal-, klein-, mittlere- und großausgedehnte Zellen (Kolb 2007a). Die Benennung der Zellen erfolgt über ihre Stratifizierung innerhalb der IPL. Die IPL kann in fünf Schichten unterteilt werden, wobei die oberen beiden Schichten als OFF-Schichten bezeichnet werden und die unteren drei Schichten zur ON-Schicht gehören (Abbildung 1.9). Zellen, welche in zwei weitauseinander liegenden Schichten stratifizieren, werden z.B. als bistratifizierende Zellen bezeichnet; Zellen, welche benachbarte Schichten abdecken als breitstratifizierende Zellen. Es existieren ebenfalls Amakrinzellen mit einem sehr ausgedehnten Dendritenbaum. Dazu gehören auch die sogenannten Starburst-Amakrinzellen (Kolb 2007a). Die Zellkerne der Amakrinzellen (Abbildung 1.9 \*) sind Teil der inneren nukleären Schicht. Eine weitere Gruppe der Amakrinzellen hat ihre

Zellkörper außerhalb dieser Schicht in der GCL, von daher werden diese Zellen als *displaced* Amakrinzellen bezeichnet. Amakrinzellen können zwei verschiedene Arten von Neurotransmitter enthalten, GABA und Glyzin (Kolb 2003). Hierdurch lassen sie sich ebenfalls unterscheiden. Die Aufgabe der Amakrinzellen besteht in der lateralen Inhibition sowie in der Verarbeitung von richtungsselektiven Lichtreizen und weiteren parakrinen diffusen Adaptionsvorgängen (Masland 2012).

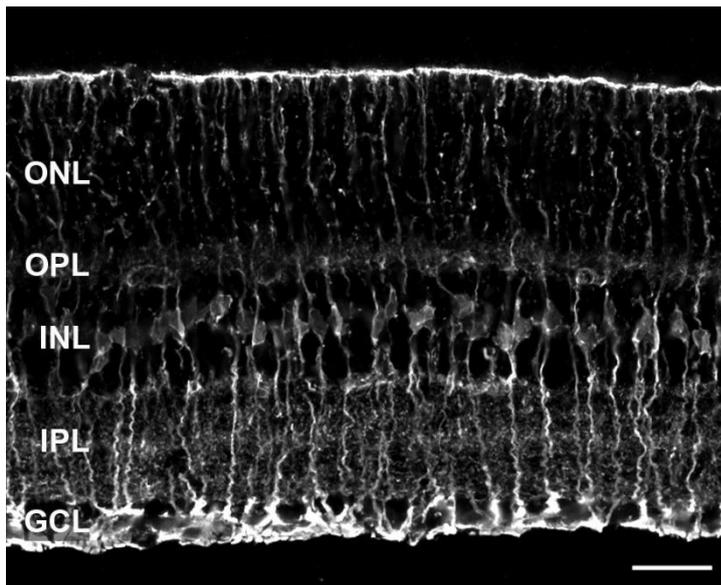
### 1.2.7 Ganglienzellen

Innerhalb der inneren plexiformen Schicht erfolgt die Weiterleitung des elektrischen Signals von den Bipolarzellen auf die Ganglienzellen (Abbildung 1.9 +). Auch hier gibt es mehr als 25 verschiedene Zellarten (Kolb 2007a). Ganglienzellen lassen sich ebenfalls in ON- und OFF-Zellen unterteilen. Die Benennung der Ganglienzellen in den Säugetieren erfolgt nach einem Schema, welches von Boycott und Wässle definiert wurde (Boycott & Wässle 1974). Man differenziert zwischen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ganglienzellen. Diese unterscheiden sich in ihrer Größe und der Ausbildung des Dendritenbaums. In der primaten und humanen Retina hingegen unterscheidet man die *parasol* und die *midget* Ganglienzelle (Leventhal et al. 1981). Die *parasol* Ganglienzellen werden auch als M-Zellen bezeichnet, da sie in die magnozellularen Schichten des lateralen Kniehöckers projizieren. Die *midget* Ganglienzellen hingegen nennt man P-Zellen, da hier eine Projektion auf die parvozellulären Schichten des lateralen Kniehöckers stattfindet.

Die Axone der Ganglienzellen bilden die Nervenfaserschicht und vereinigen sich im optischen Nerv. Über diesem erfolgt dann die Signalweiterleitung über die Sehbahn und das Chiasma opticum bis hin zur Sehrinde.

### 1.2.8 Gliazellen

Die Netzhaut besitzt drei verschiedene Arten von Gliazellen. Die wichtigste Gliazelle der Retina stellt die Müllerzelle dar (Dreher et al. 1992). Sie erstreckt sich von der äußeren limitierenden Membran (outer limiting membrane, OLM) bis zur inneren limitierenden Membran (inner limiting membrane, ILM) und verläuft somit durch die gesamte Neuroretina (Abbildung 1.2 und 1.10). Sie hat verschiedene Aufgaben: Versorgung der Retina mit Stoffwechselprodukten, Entsorgung von Abfallprodukten, Schutz der Neuronen vor überschüssigen Neurotransmittern, Synthese von Retinolsäure aus Retinol, und Homöostasekontrolle der Ionen (Reichenbach & Bringmann 2013).



**Abbildung 1.10 Müllerzellen in der Mausretina**

Die Müllerzellen lassen sich mit Hilfe des Enzyms Glutamin-Synthetase in ihrer Gesamtheit darstellen. ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht; IPL: Innere plexiforme Schicht; GCL: Ganglienzellschicht.

Maßstabsbalken: 25  $\mu\text{m}$ .  
Modifiziert nach (Haverkamp & Wässle 2000).

Zum anderen gibt es die kleinen Astrozyten, welche in einer geringen Zahl in der Nervenfaserschicht vorhanden sind (Ogden 1978). Sie dienen der Retina nicht direkt als Versorgungszellen, sondern sind die Gliascheiden der Ganglienzellen und somit ein Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke. Ein weiterer Typ sind die Mikrogliazellen (Boycott & Hopkins 1981). Sie befinden sich in allen Schichten der Retina zwischen den üblichen dort vorhandenen Zellen. Ihre Aufgabe besteht darin, dass sie die Funktion von Makrophagen bei einem Trauma in der Retina übernehmen und auch sonst phagozitieren sie abgestorbene retinale Neuronen.

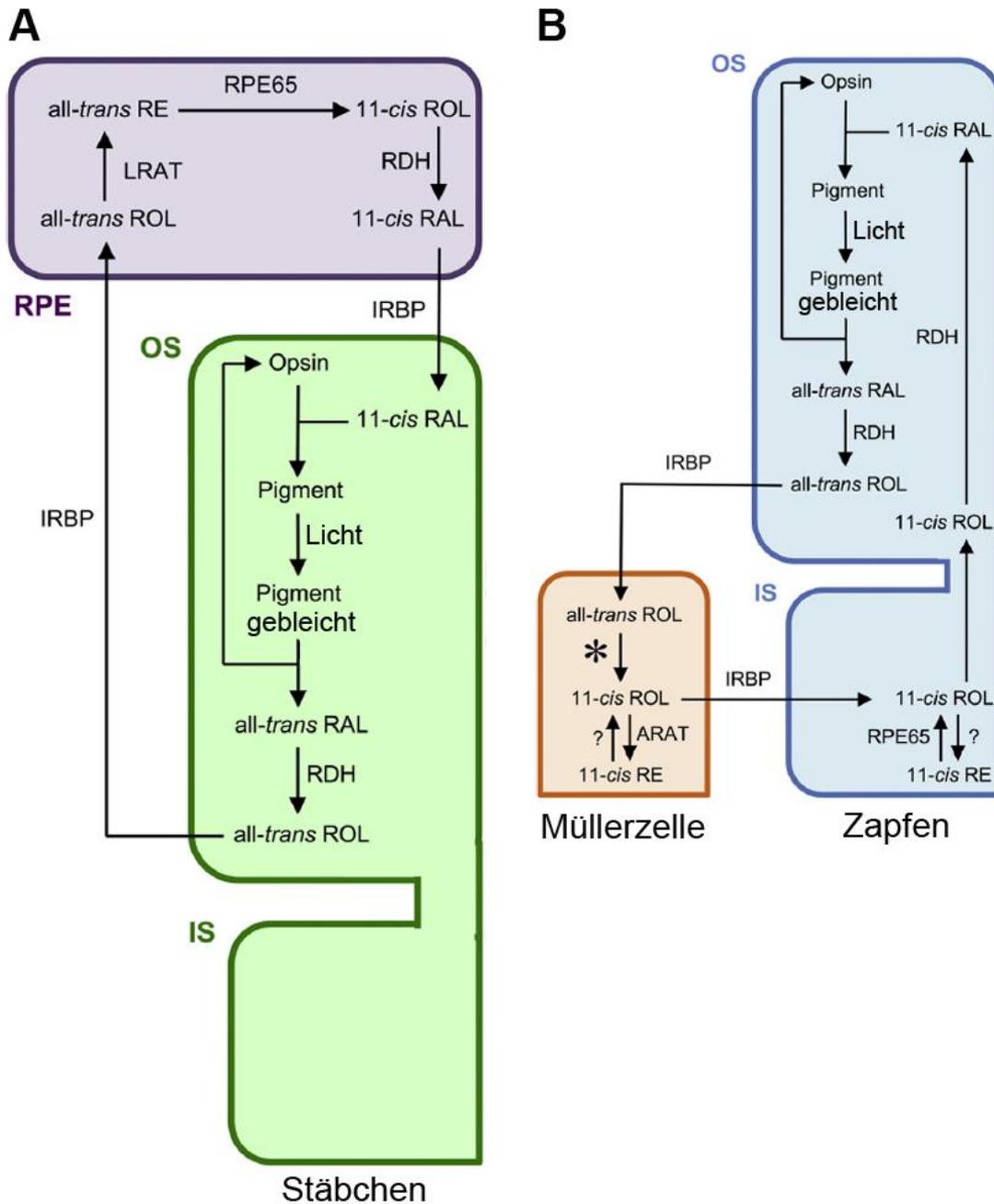
### 1.3 Visueller Zyklus

Der visuelle Zyklus ist ein wichtiger Bestandteil der Signaltransduktionskaskade des Auges (Lorenz et al. 2010). Im Dunkeln bindet das Chromophor 11-cis Retinal (11-cis RAL) an das Apo-Opsin und bildet mit diesem zusammen das funktionelle Opsin. Bei Lichteinfall wird das 11-cis RAL in seine trans-Form konvertiert und das Opsin geht in seinen aktiven Zustand über. Das aktive Opsin bindet nun an das G-Protein Transducin, um die weiteren Schritte der Sehkaskade in Gang zu setzen. Um die Signaltransduktionskaskade erneut starten zu können ist es notwendig, dass das all-trans Retinal (all-trans RAL) zurück in seine 11-cis Form isomerisiert wird.

Das Recyclen des Retinals in den Stäbchen erfolgt über den klassischen visuellen Zyklus (Abbildung 1.11 A), in den verschiedene Enzyme involviert sind (Tang et al. 2012). All-trans RAL wird vom Rhodopsin getrennt und durch eine kombinierte Reaktion von zwei Retinaldehydrogenasen (RDH) RDH8 und RDH12 zu all-trans

Retinol (all-trans ROL) umgewandelt (Chen et al. 2012). Über das Interphotorezeptorbindeprotein (IRBP) wird das all-trans ROL zurück in das RPE gebracht und bindet dort an das zelluläre Retinaldehydrobindeprotein (CRALBP) (Sparkes et al. 1992). Durch das Enzym Lecithin Retinol Acyltransferase (LRAT) wird es dann in all-trans Retinylester (all-trans RE) transformiert (Batten et al. 2004). Anschließend wird das all-trans RE durch die Isomerohydrolase RPE65 in 11-cis Retinol (11-cis ROL) isomerisiert (Jin et al. 2005; Moiseyev et al. 2005; Redmond et al. 2005). 11-cis ROL wird nun zu 11-cis-RAL dehydriert. Dies geschieht wahrscheinlich durch eine kombinierte Reaktion der RDH5 und RDH10 (Parker & Crouch 2010). Somit steht 11-cis RAL wieder als Chromophor für das Apo-Opsin zur Verfügung, nachdem es von IRBP in das Außensegment gebracht wurde.

Seit einigen Jahren besteht die Hypothese, dass die Zapfen ihr Chromophor neben dem klassischen visuellen Zyklus über einen alternativen Zyklus beziehen (Wang & Kefalov 2011). Bei diesem Zyklus wird das all-trans ROL über das IRBP in die Müllerzellen gebracht (Abbildung 1.11 B). Für die Umwandlung des all-trans ROL in 11-cis ROL ist das Enzym zurzeit noch unbekannt (\* in Abbildung 1.11). Kaylor et al postulieren, dass die Dihydroceramidedesaturase-1 (DES1) das entscheidende Enzym des Zapfenzyklus darstellt (Kaylor et al. 2013).



**Abbildung 1.11 Visueller Zyklus**

(A) Klassischer visueller Zyklus der Stäbchen. Das Enzym RPE65 ist für die Umwandlung von all-trans Retinylester zu 11-cis Retinol zuständig. Anschließend wird durch die Retinol-Dehydrogenasen (RDH) das 11-cis Retinol zu 11-cis Retinal dehydriert. 11-cis Retinal ist entscheidend für die Aktivierung des Opsin. Wird das Opsin durch das Licht gebleicht, so wandelt sich das Retinoid wieder in seine trans-Form um. Das entstandene all-trans-Retinal wird zu all-trans Retinol verstoffwechselt und zurück ins RPE transportiert. Hier erfolgt die Umwandlung in all-trans Retinylester durch die Lecithin-Retinol-Acyltransferase (LRAT) und es steht somit wieder dem RPE65 als Substrat zur Verfügung. (B) Alternativer Zyklus der Zapfen. Die Retinoide werden zwischen den Müllerzellen und den Zapfen ausgetauscht. Zurzeit ist die Isomerase der Müllerzelle noch unbekannt (\*). ARAT: Acyl CoA Retinol Acyltransferase; RE: Retinylester, RAL: Retinal; ROL: Retinol. Modifiziert nach (Tang et al. 2012).

### 1.3.1 RPE65 und seine Eigenschaften

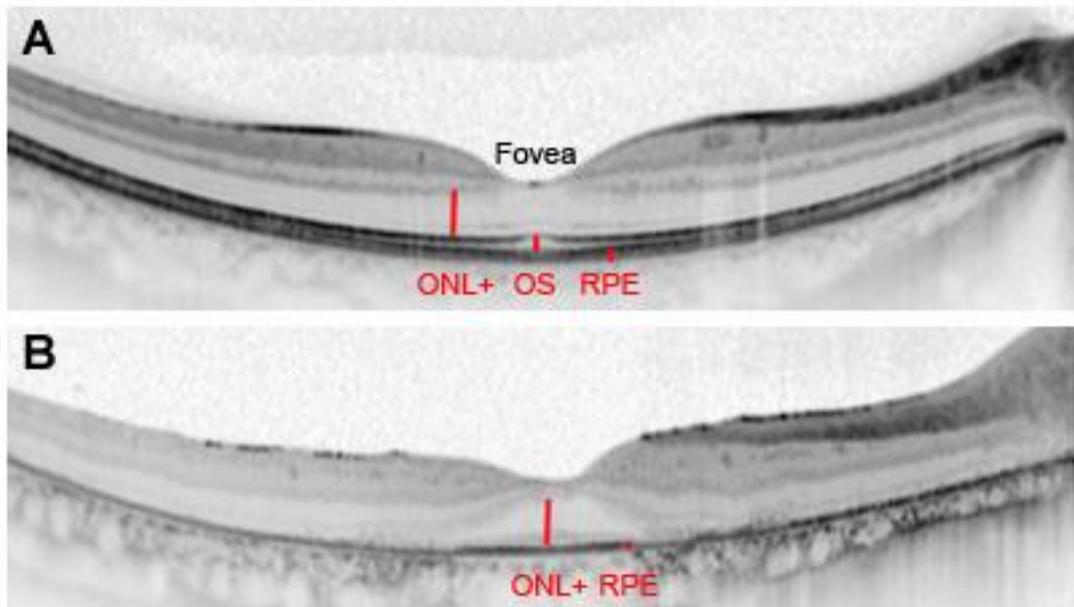
RPE65 ist ein RPE-spezifisches Protein, welches seinen Namen durch seine Größe in der SDS-Page bei 65 kDa erhielt (Nicoletti et al. 1995; Kiser & Palczewski 2010). RPE65 wird in der Literatur erstmalig 1991 erwähnt, als ein monoklonaler Antikörper entwickelt wurde, welcher ein RPE-spezifisches Protein mit einem molekularen Gewicht von 63kDa detektiert (Sagara & Hirosawa 1991). Dieses Protein wurde innerhalb des glatten endoplasmatischen Retikulums gefunden, aber es konnte nicht die Aminosäuresequenz des Proteins ermittelt werden. Durch seine Lage und seine Größe kann aber angenommen werden, dass es sich bei dem beschriebenen Protein um RPE65 handelt. Die Hauptexpression von RPE65 findet im RPE statt, wobei es bei Mäusen, Menschen und Salamandern mit Hilfe des PETLET-Antikörpers auch in den Zapfen detektiert werden konnte (Ma et al. 1998; Tang, Buhusi, et al. 2011; Tang, Wheless, et al. 2011; Znoiko et al. 2002). Beim Hund hingegen markiert der PETLET-Antikörper nur RPE65 im Pigmentepithel (Acland et al. 2005). Die Aufdeckung der Aminosäuresequenz des RPE65 und der Vergleich von RPE65 in verschiedenen Spezies zeigte, dass hohe Sequenzhomologie zwischen den Spezies und eine absolute Konservierung von vier Histidineresten innerhalb des Proteins bestehen, welches zur Bindung von Eisen als Kofaktor fungiert (Båvik et al. 1993; Kiser & Palczewski 2010). Durch die Entdeckung von Mutationen im RPE65-Gen, welche eine frühkindliche Netzhauterkrankung hervorrufen, und die Entwicklung der *RPE65*<sup>-/-</sup> Maus, welche früh erblindet im Zusammenhang mit einem gestörten Retinoidmetabolismus, konnten erste Erkenntnisse über die Funktion des Proteins gewonnen werden (Gu S., Thompson D., Srikumari C.R 1997; Redmond et al. 1998). Im Jahr 2005 konnte dann von drei Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass RPE65 für die Umwandlung von all-trans Retinylestern zu 11-cis Retinol zuständig ist und somit als Isomerohydrolase des visuellen Zyklus fungiert (Jin et al. 2005; Moiseyev et al. 2005; Redmond et al. 2005). Durch die Entwicklung der R91W knock-in Maus, welche eine häufige Mutation beim Menschen enthält, und der Entdeckung des natürlichen Mausmodells (rd12 Maus) mit einer Mutation im RPE65 Gen konnten in den folgenden Jahren viele Erkenntnisse zur weiteren Funktion des Proteins und der damit verbundenen Erkrankung gemacht werden (Pang et al. 2005; Samardzija et al. 2008)

## **1.4 Erkrankungen aufgrund von Mutationen im RPE65-Gen**

### **1.4.1 Frühkindliche Netzhautdegeneration beim Menschen**

Die schwere frühkindliche Netzhautdegeneration (Early Onset Severe Retinal Dystrophy EOSRD) ist eine genetische Erkrankung beim Menschen, bei der Mutationen in mindestens 17 Genen ursächlich sein können (LCA1-17) (OMIM 2014). Besonders schwere Formen werden als Lebersche kongenitale Amaurose (LCA) bezeichnet (Lorenz et al. 2010). Hierbei treten die klinischen Symptome sehr früh in der Kindheit auf und führen im weiteren Verlauf der Erkrankung zur Erblindung der Patienten.

Mutationen im RPE65-Gen (LCA2) beim Menschen werden autosomal rezessiv vererbt und stellen die Ursache für 6-10% aller EOSRD/LCA Erkrankungen dar. Die Erkrankung weist ein breites Spektrum in der Erscheinung des Phänotyps bei den einzelnen Patienten auf, da verschiedene Mutationen im RPE65-Gen ursächlich sein können (Lorenz et al. 2008). Die Patienten zeigen zunächst eine Sehschwäche bei schwachen Lichtverhältnissen (Nachtblindheit), da bei dieser Erkrankung zuerst die Stäbchen betroffen sind. Das Elektretinogramm (ERG) der Patienten, welches die Funktionalität der retinalen Zellen anzeigt, ist unter der Nachweisgrenze. Sie haben einen Nystagmus (Augenzittern) und haben einen reduzierten Visus (Lorenz et al. 2000; Lorenz et al. 2008; Jacobson et al. 2009). Das Hauptmerkmal dieser Patienten ist eine fehlende Autofluoreszenz des Augenhintergrunds, da es bei diesen Patienten durch den nicht funktionierenden visuellen Zyklus zu keiner Ablagerung von Lipofuszin im RPE kommt (Lorenz et al. 2004). In den Aufnahmen mittels der optischen Kohärenztomographie (OCT) weisen die Patienten eine Verminderung der äußeren Retina und des RPEs auf (Abbildung 1.12). Dieser Verlust tritt bereits innerhalb der ersten Lebensdekade auf, wobei er stärker in der Peripherie als im zentralen Bereich der Retina ausgebildet ist (Jacobson et al. 2008).



**Abbildung 1.12 Optische Kohärenztomographie bei einem augengesunden Probanden und einem RPE65 Patienten**

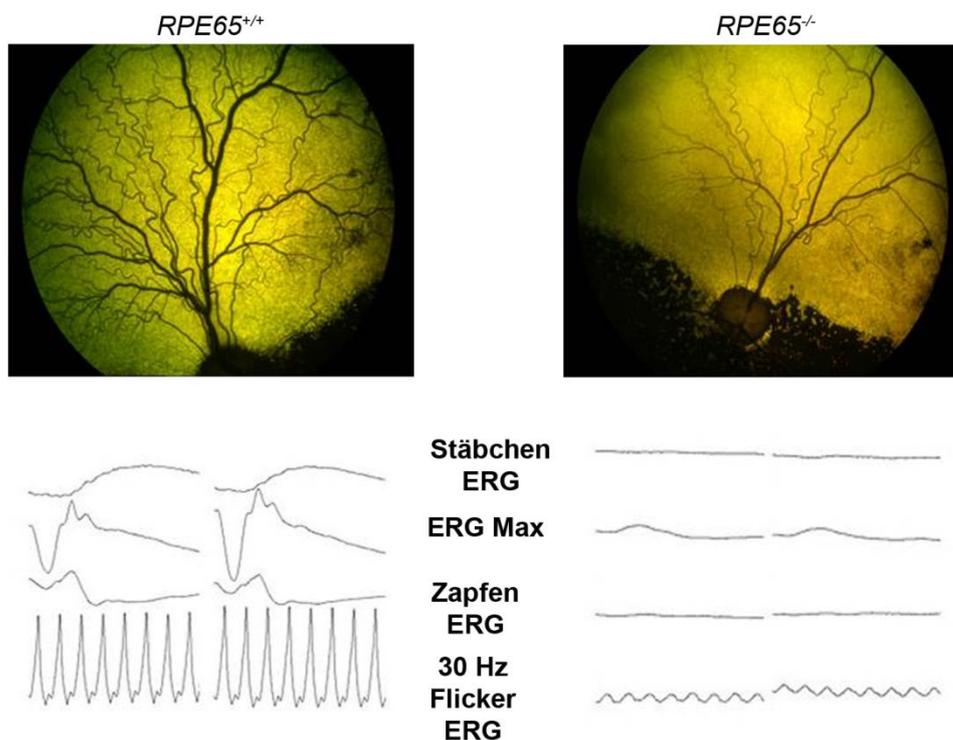
*In A ist eine OCT Aufnahme eines gesunden Erwachsenen abgebildet. Das RPE, die OS und die ONL+ sind klar von einander abgrenzbar. In B sieht man die OCT Aufnahme eines RPE65 Patienten im Alter von 17 Jahren. Das RPE ist hier nur noch ein dünner schwarzer Strich. Die ONL+ Schicht ist perifoveal nicht mehr nachweisbar. Die Außensegmente sind nicht mehr sichtbar. OCT: Optische Kohärenztomographie; RPE: Retinales Pigmentepithel; OS: Außensegmente (der Photorezeptoren); ONL+ = OPL+ONL+MLE+IS; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere nukleäre Schicht; MLE: Membrana limitans externa; IS: Innensegmente (der Photorezeptoren) Quelle: Augenklinik Gießen.*

Durch die Anwendung der Pupillometrie konnte gezeigt werden, dass Patienten mit RPE65 Mutation einen verminderten Pupillenreflex unter skotopischen sowie photopischen Bedingungen haben (Lorenz et al. 2012). Zusätzlich berichten diese Patienten häufig von einer Blausehschwäche. Dies kann man mittels der Messung der spektralen Sensitivität der Zapfen nachweisen, wobei die entsprechende Kurve für die S-Zapfen fehlt (persönliche Korrespondenz Frau Prof. Birgit Lorenz).

Von einer Patientin mit sehr weit fortgeschrittenem Krankheitsbild, welche auf Grund einer anderen Erkrankung verstorben ist, wurden die Augen histologisch untersucht (Bonilha et al. 2011). In der Peripherie zeigt diese Patientin eine sehr weit fortgeschrittene Degeneration der Photorezeptoren. Zentral zeigten sich unterhalb der Macula ödematöse Veränderungen sowie eine weniger starke Degeneration der Zellen. Das Material war ansonsten aber nur bedingt auswertbar aufgrund des späten Stadiums der Erkrankung.

## 1.4.2 Kongenitale stationäre Nachtblindheit und RPE65-Mutation beim Hund

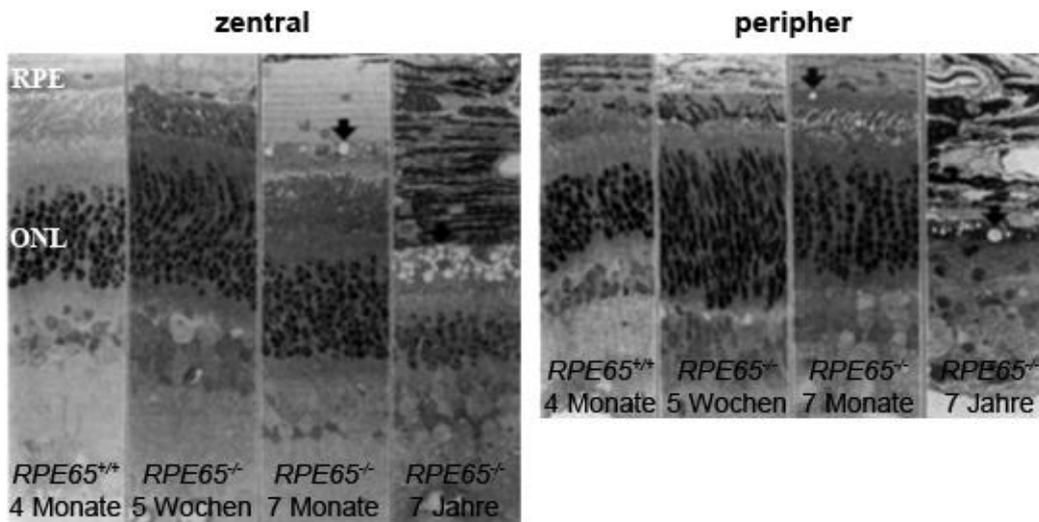
In der schwedischen Linie der Hunderasse Briard wurde eine Erkrankung der Augen festgestellt, welche als kongenitale stationäre Nachtblindheit beschrieben wurde (Narfström et al. 1989). Bei diesen Tieren zeigte sich, dass sie nachtblind sind und ein nicht nachweisbares ERG haben (Abbildung 1.13). Des Weiteren konnten Narfström und Kollegen keine Verschlechterung des Zustandes innerhalb von 1,5 Jahren feststellen. Auf Grund des Stammbaumes der untersuchten Tiere wurde geschlossen, dass es sich bei dieser Erkrankung um einen autosomal rezessiven Erbgang handeln muss.



**Abbildung 1.13 Funktionelle Untersuchungen der Hundenetzhaut im Alter von 2 Jahren**  
 Die linke Seite der Abbildung zeigt das Fundusbild und die verschiedenen ERG-Ableitungen bei einem gesunden Hund. Die rechte Seite stellt die Situation im RPE65<sup>-/-</sup> Hund dar. Die Gefäße im Fundusbild sind deutlich dünner. Die verschiedenen ERG Ableitungen führen zu keinen messbaren Ergebnissen. ERG: Elektroretinogramm. Modifiziert nach (Le Meur et al. 2007).

Die morphologische und elektronenmikroskopische Untersuchung der Augen der erkrankten Briards hat gezeigt, dass es zuerst in der Peripherie zu einem Verlust von Zellen in der ONL kommt und im späteren Verlauf dies auch zentral geschieht (Wrigstad et al. 1992; Wrigstad et al. 1994). Zusätzlich zeigte sich durch die histologische Untersuchung, dass sich im Verlauf der Erkrankung im RPE runde

Einschlusskörperchen bilden (Schwarze Pfeile, Abbildung 1.14). Schlussfolgernd aus diesen Ergebnissen handelt es sich bei dieser Erkrankung nicht um eine stationäre Erkrankung, sondern um eine langsam fortschreitende Dystrophie (Abbildung 1.14). Die Ergebnisse von Wrigstad konnten durch Untersuchungen mittels OCT bestätigt werden (Cideciyan et al. 2013). Auch hier zeigte sich, dass es zunächst in der Peripherie zur Verdünnung der ONL kommt und erst im späteren Verlauf (älter als fünf Jahre) auch zentral Verluste zu sehen sind.



**Abbildung 1.14 Histologische Untersuchung der RPE65<sup>-/-</sup> Retina**

*Im Laufe der Erkrankung kommt es sowohl zentral als auch peripher zur Abnahme der Dicke der ONL. Im RPE sind runde Einschlusskörperchen sichtbar (schwarzer Pfeil). RPE: Retinales Pigmentepithel; ONL: Äußere nukleäre Schicht. Modifiziert nach (Wrigstad et al. 1994).*

Es konnte schließlich gezeigt werden, dass bei der Erkrankung eine Nullmutation im RPE65-Gen vorliegt. Hierbei handelt es sich um einen Verlust von vier Basenpaaren (485delAAGA) im Exon 5, wobei es zu einem verfrühten Stopcodon kommt (Veske et al. 1999). Somit wird bei den erkrankten Tieren kein RPE65-Protein gebildet. Die gleiche Genmutation wurde auch in der amerikanischen Linie der Rasse Briard gefunden (Aguirre et al. 1998).

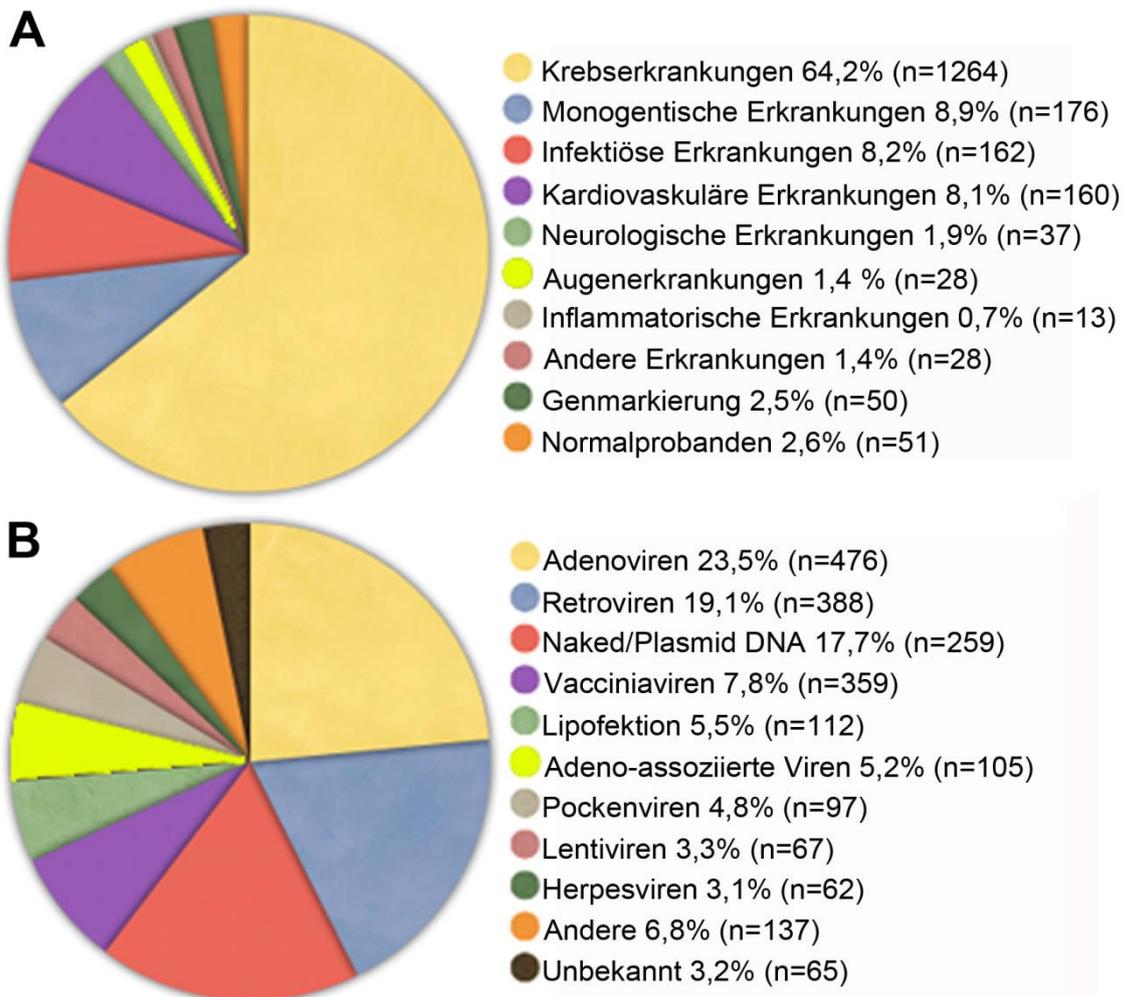
Die immunohistochemische Untersuchung des Hundemodells erfolgte bis jetzt durch zwei Gruppen (Hernández et al. 2010; Mowat et al. 2013). Hernández und Kollegen untersuchten Tiere im Alter zwischen vier und 17 Monaten. Sie stellten keine Veränderungen in der Anzahl der Zapfen oder der Zapfenopsinproduktion fest, aber eine Delokalisation des Rhodopsins sowie eine Abnahme der ONL-Schichtdicke auf Grund des Stäbchenverlusts. Des Weiteren wurden leichte Veränderungen in den Stäbchenbipolarzellen gezeigt. Mowat und Kollegen hingegen untersuchten zwei verschiedene Altersstadien (drei Monate und 65,5 Monate). Sie fanden bei beiden

Gruppen delokalisiertes Zapfenopsin und einen Zellverlust in den einzelnen Zapfentypen im Vergleich der beiden Altersstadien. Die bereits zuvor beschriebenen Veränderungen in den Stäbchen konnten in dieser Studie bestätigt werden. Keine der beiden Studien ging auf unterschiedliche Bereiche innerhalb des Auges ein. Die Untersuchungen erfolgten nur im superioren Bereich der Retina.

## 1.5 Gentherapie

Im Jahr 2000 wurden die ersten Patienten erfolgreich mittels Gentherapie behandelt. Hierbei handelte es sich um Kinder mit einem schweren kombinierten Immundefekt, denen ein funktionierendes Immunsystem fehlt (Cavazzana-Calvo et al. 2000). In den folgenden Jahren wurden dann für verschiedene weitere Erkrankungen gentherapeutische Ansätze entwickelt (Abbildung 1.15 A).

Die Gentherapie unterteilt man in spezifische und unspezifische Gentherapie. (Stieger & Lorenz 2008; Stieger & Lorenz 2014). Bei der spezifischen Gentherapie muss die Voraussetzung gegeben sein, dass das zu therapierende Gen bekannt ist. Es gibt zwei mögliche Vorgehensweisen für diese Therapieform. Zum einen die *gene addition therapy* und zum anderen die *gene silencing* Technik. Bei der *gene addition therapy*, welche vor allem bei autosomal rezessiven Mutationen zum Einsatz kommt, wird eine funktionelle Kopie des betroffenen Gens mit Hilfe eines Vektors in die Zielzelle gebracht. Nach erfolgreicher Injektion können diese Zellen dann das Protein normal produzieren und ihre Funktion aufnehmen. Diese Vorgehensweise ist möglich, da vor der Therapie kein funktionelles Genprodukt produziert wurde. Bei dominant negativen Mutationen hingegen wird eine mutierte Form des Proteins in den Zellen produziert, welche für die Zellen toxisch ist (*toxic gain of function*), oder das mutierte Gen löst einen dominanten negativen Effekt auf das zweite Genprodukt aus. Hier ist es notwendig das fehlerhafte Gen herunter zu regulieren. Dies geschieht über die *gene silencing* Technik. Hierbei wird die Produktion des mutierten Proteins auf RNA-Ebene durch den Einsatz von Ribozymen oder siRNA blockiert (Lewin et al. 1998; Tessitore et al. 2006).



**Abbildung 1.15 Gentherapeutische Studien im Jahr 2012 im Überblick**

(A) Das Kuchendiagramm zeigt die prozentuale Verteilung der Erkrankungen bei denen zurzeit gentherapeutische Studien durchgeführt werden. Die Augenerkrankungen (gelb) stellen mit 1,5% einen geringen Anteil dar. (B) In diesem Kuchendiagramm sieht man die verwendeten Vektoren für gentherapeutische Zwecke. Adenoassoziierte Viren (gelb) sind der Goldstandard für die retinale Gentherapie. In der Gesamtheit aller gentherapeutischen Studien sind sie aber ein eher selten eingesetzten Vektor. Modifiziert nach (Ginn et al. 2013).

Bei einer großen Anzahl von Erkrankungen sind aber die betroffenen Gene noch unbekannt (Hartong et al. 2006). Daher ist es hier nicht möglich eine ursächliche Therapie anzuwenden. Hier kommt die unspezifische Gentherapie zum Einsatz. Es werden die Gene für verschiedene Faktoren transferiert, um die auftretenden Symptome zu lindern. Vor allem werden neuroprotektive Stoffe wie z.B. *fibroblast growth factor*, *glial cell line-derived growth factor*, *ciliary neurotrophic factor* und Erythropoietin verwendet (Grimm et al. 2002; Buch et al. 2006; McGee Sanftner et al. 2001; Lau et al. 2000). Des Weiteren ist der Einsatz von antiangiogenen Faktoren wie z.B. Angiostantin, *pigment epithelium-derived factor* (PEDF) oder *vascular endothelial growth factor* (VEGF) verbreitet (Deng et al. 2005; Lai et al. 2001; Mori et al. 2002).

## 1.5.1 Gentherapievektoren

Für die Applikation des therapeutischen Proteins stehen verschiedene Arten von Vektoren zur Verfügung (Abbildung 1.15 B). Die Wahl des Vektors ist abhängig von der Größe des therapeutischen Proteins und der Zielzellen. Man unterscheidet virale und nicht virale Vektoren. Als virale Vektoren benutzt man Adenoviren, adenoassoziierte Viren (AAV), Herpes Simplex Viren, Lentiviren, Pockenviren und Retroviren und als nicht virale Vektoren vor allem Nanopartikel (Conley & Naash 2010; Ginn et al. 2013). Für den Einsatz am Auge werden Adenoviren, Lentiviren und AAV verwendet (Petersen-Jones 2012). Die Details zu diesen Virusarten sind in Tabelle 1.1 aufgeführt. Die Vektoren sollten folgende Eigenschaften besitzen, um ihre Sicherheit zu gewährleisten:

- (1) Sie sollten nicht replizierend sein,
- (2) keine ungewünschte Immunreaktion auslösen,
- (3) falls sie ins Genom integrieren, sollte diese Integration in spezifische Regionen erfolgen, damit es nicht zur Tumorgenese kommt.

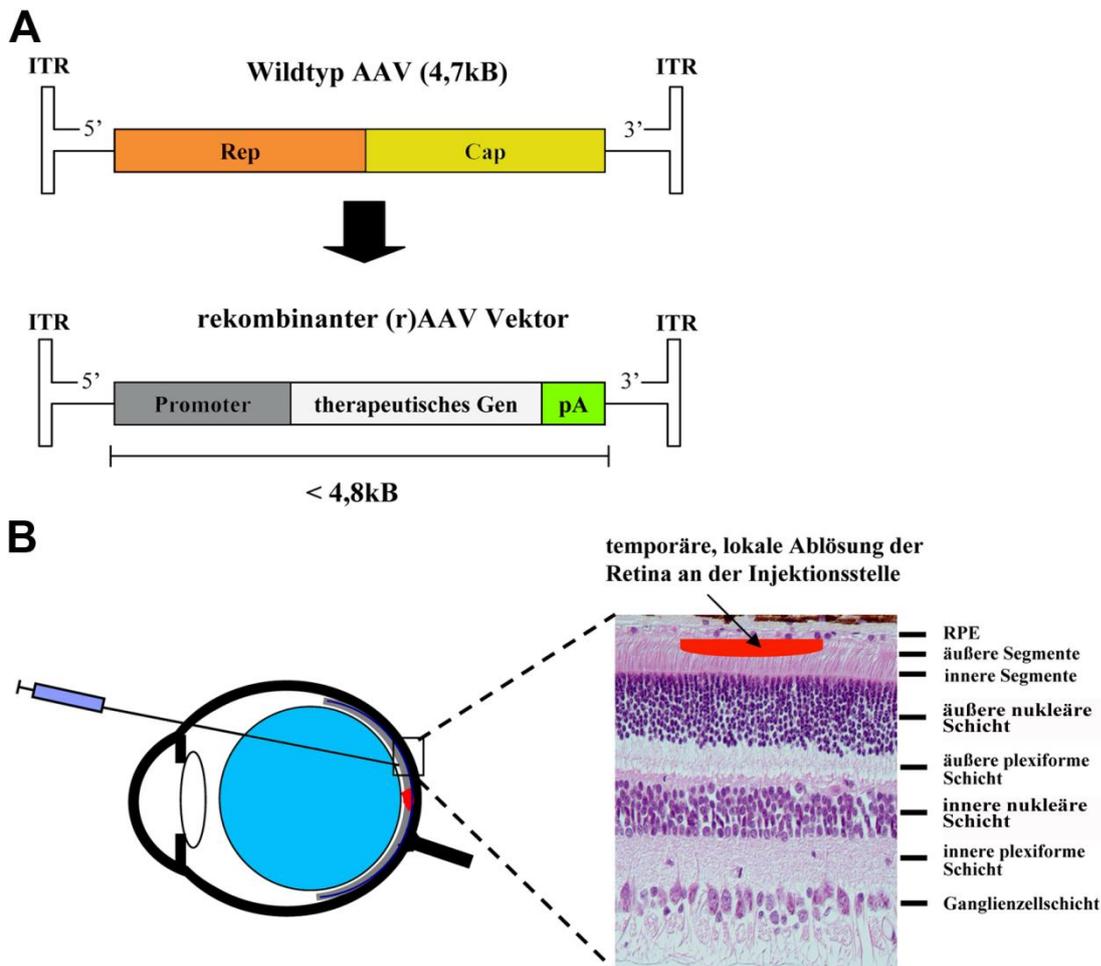
**Tabelle 1.1 Virale Vektoren für den Einsatz am Auge**

	Art	Größe der Expressionskassette	Hülle	Integration
<b>Adenoviren</b>	doppelsträngiger DNA Virus	36 kb	nein	nein
<b>AAV</b>	einzelsträngiger DNA Virus	4,8 kb	nein	nein
<b>Lentiviren</b>	doppelsträngiger RNA Virus	7 kb	ja	ja

*AAV: Adenoassoziierter Virus; Daten aus (Petersen-Jones 2012; Stieger & Lorenz 2014)*

Für retinale Gentherapie sind die adenoassoziierten Viren der Goldstandard. Die AAV sind kleine unbehüllte Parvoviren, welche eine einzelsträngige DNA von etwa 4000 Basen Länge enthalten (Srivastava 1983). Der kodierende Teil der DNA enthält zwei offene Leseraster, die vier Rep-Proteine und drei Cap-Proteine codieren (Flotte 2004). Zur Herstellung eines Vektors (siehe Abbildung 1.16 A) werden die kodierenden Sequenzen entfernt und an diese Stelle eine Promotersequenz, das therapeutische Gen und eine Poly-A-Sequenz eingefügt. Der erfolgreich hergestellte rekombinante AAV-Vektor kann dann ins Auge intravitreal oder subretinal injiziert werden. Die Wahl der Applikationsart ist abhängig von der gewünschten Zielstruktur und dem Zelltropismus des Vektors (Tabelle 1.2). Die subretinale Injektion ist in der Abbildung 1.16 B dargestellt. Im Injektionsbereich löst sich die Retina dann vom RPE ab und es

entsteht eine Blase, welche die Injektionsflüssigkeit enthält. Die Retina lagert sich aber innerhalb von 24 bis 48 Stunden wieder an das RPE an (Stieger & Lorenz 2008).



### Abbildung 1.16 Schematische Darstellung der Gentherapie

(A) Die Graphik zeigt den Aufbau eines AAV-Vektors. Die kodierenden Sequenzen des Wildtyp-AAVs werden komplett entfernt und durch einen Promoter, ein therapeutisches Gen und eine poly-A-Sequenz (pA) ersetzt. (B) Die Graphik zeigt die subretinale Injektion des AAV-Vektors in die Retina. Durch die Injektion in den subretinalen Spalt löst sich die Retina in diesem Bereich temporär ab. Diese Ablösung regeneriert sich aber bereits innerhalb von 24-48 Stunden. ITR: inverted terminal repeats; pA: poly A-Sequenz; AAV: Adenoassoziierter Virus; RPE: Retinales Pigmentepithel. Modifiziert nach (Stieger & Lorenz 2008).

Bis jetzt wurden elf verschiedene Serotypen und über 100 Variationen bei den Wildtyp AAV entdeckt (Wu et al. 2006). Im Labor lassen sich durch die Kombination der ITR (inverted terminal repeat) und der Rep-Proteine des einen Virus mit den Capsiden eines anderen Virus rekombinante AAVs nach Wahl ihrer Eigenschaften herstellen. Dieses Verfahren nennt man *cross packing* (Alexander & Hauswirth 2008). Die Benennung der Viren lautet z.B. AAV2/4, wobei die erste Zahl die Herkunft der ITR (hier AAV Serotyp 2) und die zweite Zahl die Herkunft der Capside (hier Serotyp 4) angibt. Diese rAAVs (Tabelle 1.2) haben unterschiedliche Zelltropismen, welche ihre Wahl für die Therapie mitbestimmt (Stieger & Lorenz 2008).

**Tabelle 1.2 Zellulärer Tropismus der rAAV-Serotypen**

Serotyp	Maus	Hund	Primat
rAAV2/1	RPE	-	-
rAAV2/2	RPE+PR	RPE+PR	RPE+PR
rAAV2/4	-	RPE	RPE
rAAV2/5	RPE+PR	RPE+PR	RPE+PR
rAAV5/5	RPE+PR	n.u.	n.u.
rAAV2/6	RPE	n.u.	n.u.
rAAV2/7	RPE+PR	n.u.	n.u.
rAAV2/8	RPE+PR	RPE+PR+INL+GCL	RPE+PR+INL+GZ
rAAV2/9	RPE+PR+MZ	n.u.	n.u.

rAAV: Rekombinanter adenoassoziierter Virus; RPE: Retinales Pigmentepithel; PR: Photorezeptoren; INL: Innere nukleäre Schicht, GZ: Ganglienzellen; MZ: Müllerzelle; n.u.: nicht untersucht. Modifiziert nach (Stieger & Lorenz 2008).

## 1.5.2 Gentherapie beim RPE65-Hundemodell

Bei der spezifischen Gentherapie ist vor allen die *gene addition therapy* des RPE65-Gens zu erwähnen. Im Briardhundemodell gab es die ersten Ergebnisse im Jahr 2001 (Acland et al. 2001). Es wurden drei Hunde unilateral subretinal mit AAV2/2-Vektoren behandelt, welche unter einem Cytomegalievirus-Promotor canines RPE65 produzieren. Am therapierten Auge konnte sowohl unter skotopischen als auch photopischen Bedingungen ein ERG nachgewiesen werden, wobei die Amplituden aber niedriger waren als im gesunden Tier. Zusätzlich konnte ein positiver Effekt auf den Pupillenlichtreflex gezeigt werden. Die Tiere konnten sich unter schwachen Lichtbedingungen in einem Hindernisparcours orientieren, was vor der Therapie nicht der Fall war. Post mortem zeigte sich im behandelten Auge eine Expression des rekombinanten RPE65 mittels PCR. Eine zweite Gruppe konnte bei zwölf weiteren Tieren die Wirksamkeit der subretinalen AAV-vermittelten Gentherapie bestätigen (Narfstrom 2003b; Narfstrom 2003a).

In den folgenden Jahren führten diese beiden Gruppen weitere Untersuchungen an den bereits behandelten Hunden durch und erhöhten die Anzahl der behandelten Tiere (Ford et al. 2003; Acland et al. 2005; Narfström et al. 2005). Somit konnte gezeigt werden, dass die erreichten Erfolge über längere Zeit stabil vorhanden sind.

Acland und Kollegen führten auch umfangreiche Untersuchungen zu den Nebeneffekten der Therapie durch. Sie untersuchten Blutserum und Kammerwasser

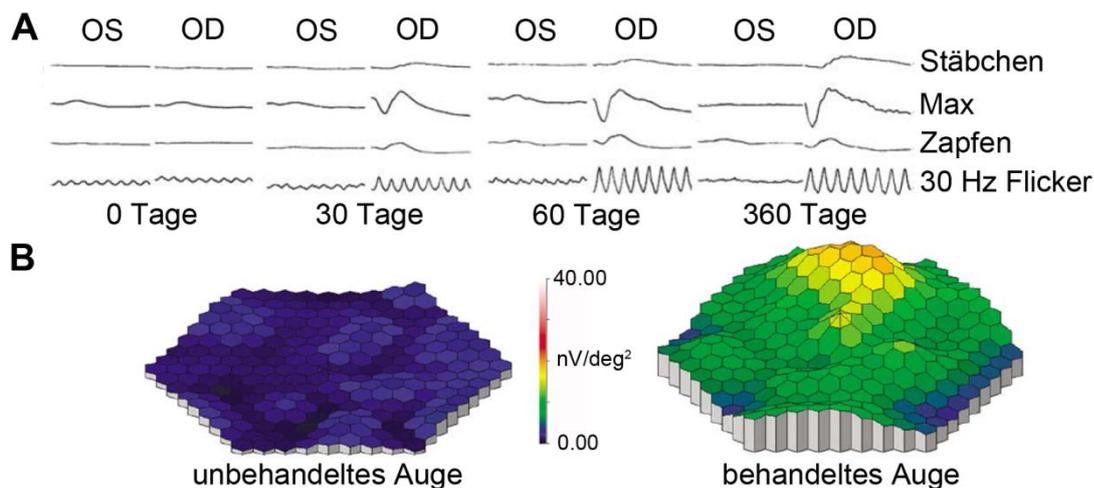
auf AAV2-Antikörper und konnten keine signifikante Erhöhung der Titer nach der Therapie feststellen. Des Weiteren erfolgten Untersuchungen von extraokularem Gewebe auf Expression von RPE65, welche alle zu einem negativen Ergebnis führten (Acland et al. 2005).

Die AAV-vermittelte unilaterale Gentherapie mittels eines RPE spezifischen Vektors (AAV2/4) und eines RPE65 spezifischen Promotors führte ebenfalls zum gewünschten Therapieerfolg (Le Meur et al. 2007) (Abbildung 1.17). Auch hier konnten nach erfolgter Therapie verschiedene ERG-Ableitungen gemessen werden, welche bis ein Jahr nach der Injektion erhalten blieben. Die Hunde schafften es ebenfalls erfolgreich unter schwachen Lichtbedingungen einen Hindernisparcours zu absolvieren.

Eine zweite Injektion des gleichen Vektors in das kontralaterale Auge führte in zwei Studien zu keiner vollständigen Immunreaktion (Annear et al. 2011; Amado et al. 2010). Es wurde zwar festgestellt, dass sich neutralisierende Antikörper gegen das Capsid von AAV2 bilden, diese aber keine T-Zellen vermittelte Immunreaktion auslösen. Antikörper gegen das transgene Protein hingegen konnten nicht nachgewiesen werden.

Immunohistochemische Untersuchungen der erfolgreich behandelten Tiere zeigten eine in vivo Produktion von RPE65 (Narfstrom 2003a; Acland et al. 2005; Le Meur et al. 2007). In weiteren Untersuchungen konnte mittels Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass es durch die Therapie zu einem verminderten Verlust von S-Zapfen und zur Relokalisation von delokalisierten Opsin kommt (Mowat et al. 2013).

Lange Zeit ging man durch die Erfahrung bei der Gentherapie davon aus, dass beim Hund ein therapeutisches Fenster vorliegt, welches eine Therapie auf ein Maximalalter bei Injektion auf zwei Jahre beschränkt. Durch eine aktuelle Studie konnte gezeigt werden, dass ein positiver therapeutischer Effekt beim *RPE65*<sup>-/-</sup> Hund bis zu einem Alter von sechs Jahren erzielt werden kann (Annear et al. 2013).



**Abbildung 1.17 Erfolgreiche Gentherapie beim  $RPE65^{-/-}$  Hund**

(A) ERG-Ableitungen zu verschiedenen Zeitpunkten. Ab dem 60. Tag nach Therapie sind im behandelten Auge (OD) deutliche Ableitungen messbar. Diese sind auch ein Jahr nach Therapie stabil. (B) Multifokales ERG ein Jahr nach Therapie. Im unbehandelten Auge sind keine Messungen möglich. Im behandelten Auge, besonders im superioren Bereich (Bereich der Injektion), ist eine deutliche Zunahme der Amplituden zu erkennen. ERG: Elektretinogramm; OS: linkes Auge; OD: rechtes Auge. Modifiziert nach (Le Meur et al. 2007).

### 1.5.3 Klinische Phase der Gentherapie beim Menschen mit RPE65-Mutationen

Die ersten Phase I-Studien am Menschen fanden bereits 2007 statt. Es wurden gleichzeitig drei voneinander unabhängige Studien durchgeführt (NCT00481546, NCT00516477, NCT00643747). Diese Studien umfassten 30 Patienten, die über 90 Tage bis hin zu drei Jahren nach der Therapie beobachtet wurden (Bainbridge et al. 2008; Hauswirth et al. 2008; Cideciyan et al. 2008; Cideciyan et al. 2009; Maguire et al. 2008; Maguire et al. 2009; Jacobson et al. 2012; Testa et al. 2013). Die Studien unterscheiden sich im verwendeten Vektor und im Alter der Patienten. Die Patienten erhielten eine subretinale Injektion in das Auge, welches den schlechteren Visus aufwies. Ein tabellarischer Überblick über die Ergebnisse der einzelnen Studien ist in Tabelle 1.3 dargestellt. In erster Linie konnte gezeigt werden, dass die Therapie keine schädlichen Nebenwirkungen hat. Die meisten Patienten berichteten über eine deutlich verbesserte Lichtempfindlichkeit und eine Reduzierung des vorher vorhandenen Nystagmus. Dies spricht für einen Therapieeffekt auf die Stäbchen. Viele der Patienten konnten sich nach der Therapie in einem Hindernisparcours besser orientieren, da sich bei ihnen der Visus geringfügig verbessert hatte. Von einer klinisch relevanten Verbesserung des Visus spricht man aber erst ab Verdopplung des Dezimalwertes der Sehschärfe (Sieving et al. 2006). Dies war aber nur bei fünf Patienten aus Studie von Maguire und Kollegen der Fall (Testa et al. 2013). Die gewünschten klinisch

messbaren Effekte blieben aber aus, da sowohl unter skotopischen als auch photopischen Bedingungen die Signale des ERG außerhalb des messbaren Bereichs lagen. Der therapeutische Effekt auf die Zapfen ist somit beim Menschen sehr gering. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die erzielten Ergebnisse bis zu einem Zeitpunkt von drei Jahren erhalten bleiben (Testa et al. 2013; Jacobson et al. 2012). Die Studien am Menschen sind zurzeit in Phase II und Phase III angelangt (NCT00999609).

**Tabelle 1.3 Überblick der ersten drei Phase I-Studien**

<b>Bainbridge et al. 2008</b>	<b>Maguire et al. 2008&amp;2009 Simonelli et al. 2010 Testa et al. 2013</b>	<b>Hauswirth et al. 2008 Cideciyan et al. 2008&amp;2009 Jacobson et al. 2012</b>
<b>3 Patienten</b>	<b>12 Patienten</b>	<b>15 Patienten</b>
AAV2/2.hRPE65.hRPE65 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Volumen: 1ml</li> <li>• Vektor-Titer: <math>1 \times 10^{11}</math> vg/ml</li> <li>• Makula und angrenzende Gebiete</li> </ul>	AAV2/2.modCBA.hRPE65 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Volumen: 150-300 <math>\mu</math>l</li> <li>• Vektor-Titer:  <math>1,5 \times 10^{10}</math> vg/ml  <math>4,8 \times 10^{10}</math> vg/ml  <math>1,5 \times 10^{11}</math> vg/ml</li> <li>• Makula und angrenzende Gebiete</li> </ul>	AAV2/2.modCBA.hRPE65 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Volumen: 150-450 <math>\mu</math>l</li> <li>• Vektor-Titer:  <math>5,96 \times 10^{10}</math> vg/ml  <math>7,95 \times 10^{10}</math> vg/ml  <math>8,94 \times 10^{10}</math> vg/ml  <math>11,92 \times 10^{10}</math> vg/ml  <math>17,88 \times 10^{10}</math> vg/ml</li> <li>• Verschiedene Stellen</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• ein Auge behandelt</li> <li>• Keine schweren Nebenwirkungen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ein Auge behandelt</li> <li>• Keine schweren Nebenwirkungen</li> <li>• makuläres Loch bei einem Patienten</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ein Auge behandelt</li> <li>• Keine schweren Nebenwirkungen</li> <li>• Retinale Verdünnung bei einem Patienten in der Macula</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• ERG kein Effekt</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ERG kein Effekt</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ERG kein Effekt</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Navigation durch einen Hindernisparcours +</li> <li>• Lichtempfindlichkeit +</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Navigation durch einen Hindernisparcours +</li> <li>• Lichtempfindlichkeit +</li> <li>• Visus +</li> <li>• Nystagmus reduziert</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lichtempfindlichkeit +</li> <li>• Visus +</li> </ul>

AAV: Adeno-assoziierte Viren; hRPE65: humaner RPE65 Promotor/ humanes RPE65; modCBA: modifizierter Hühner  $\beta$ -Aktin Promotor; ERG: Elektroretinogramm

Bei drei Patienten aus der Studie von Maguire und Kollegen (NCT00516477) wurde zusätzlich eine Behandlung des zweiten Auges durchgeführt (Bennett et al. 2012). Hier zeigte sich, dass auch nach einer zweiten Applikation von Vektoren keine Immunantwort ausgelöst wird. Die Patienten konnten sich nach der Behandlung besser im Dämmerungslicht orientieren und zeigten einen verbesserten Pupillenlichtreflex.

## 1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, das canine Modell für die frühkindliche Netzhautdegeneration aufgrund einer Mutation im RPE65-Gen genauer durch eine gründliche immunohistochemische Untersuchung zu charakterisieren.

Hierfür ist es zunächst notwendig einen Zellmarkerkatalog für die canine Netzhaut zu erstellen, da nur wenige Daten für diesen Bereich in der Literatur existieren.

Im Anschluss werden die im ersten Teil der Arbeit erfolgreich getesteten Zellmarker dazu genutzt, einen Status praesens im Alter von zwei Jahren im mutierten Tier zu erstellen, um diesen in den Vergleich mit gesunden Tieren im selben Alter zu bringen.

Der dritte Teil der Arbeit besteht darin, dass der Verlauf der Erkrankung immunohistochemisch dargestellt werden soll.

Im vierten Teil der Arbeit erfolgt dann die immunohistochemische Untersuchung von erfolgreich mit AAV-Vektoren behandelten Tieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Versuchstiere

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden Hunde der Rasse Briard mit einer homozygoten Nullmutation im RPE65-Gen (B1-C4) sowie Kontrolltiere (A1-A3) anderer Rassen ohne Mutation in diesem Gen verwendet. Die Tiere mit *RPE65*<sup>-/-</sup> Mutation lassen sich in zwei Gruppen einteilen:

- Tiere ohne Behandlung (B1-B7)
- Tiere mit unilateraler subretinaler Injektion eines rAAV Vektors (C1-C4)

Die genauen Angaben zu den einzelnen Tieren sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Die Tiere stammen alle aus dem Boibonne Center der veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Nantes (Frankreich). Die Hunde wurden hier nach dem *ARVO statement for the use of animals in ophthalmic and vision research* sowie nach der EU-Richtlinie 2010/63 und den Regelungen der Tierversuchskommission der Universität von Nantes gehalten.

Für die Erstellung des Zellmarkerkatalogs wurden zusätzlich als Positivkontrolle Gefrierschnitte von Rattenaugen der Linie Sprague-Dawley (bereitgestellt vom Boibonne Center, Universität Nantes) sowie Gefrierschnitte von Mäuseaugen der Line C57/Bl6 (bereitgestellt vom Max Planck Institut für Hirnforschung, AG PD Dr. Silke Haverkamp) verwendet.

**Tabelle 2.1 Versuchstiere**

Hund	Status	Auge	Vektor	Alter bei Injektion	Sehkraft nach Therapie	Alter bei Euthanasie	Fixierzeit				
A1	WT	links	unbehandelt			3 Monate	30 Minuten				
A2		rechts				15 Minuten					
A3		links				30 Minuten					
B1	rechts	24 Monate				15 Minuten					
B2	links	28 Monate				15 Minuten					
B3		links							30 Monate	30 Minuten	
B4											
B5											
B6											
B7	RPE65 <sup>-/-</sup>	rechts				unbehandelt			78 Monate	15 Minuten	
C1	links	rechts							12 Monate	30 Monate	30 Minuten
	links	links							unbehandelt		
C2	rechts	rechts	18 Monate	36 Monate	15 Minuten						
	links	links	unbehandelt								
C3	rechts	rechts	7 Monate	54 Monate	30 Minuten						
	links	links	unbehandelt								
C4	rechts	rechts	6 Monate	96 Monate	15 Minuten						
	links	links	unbehandelt								

WT: Wildtyp; CMV: Cytomegalievirus-Promotor; pRPE65: RPE65-Promotor; +: Verbesserung

## 2.1.2 Weitere Materialien

Die verwendeten Chemikalien, Materialien, Geräte und andere Hilfsmittel sind in den Tabellen 2.2, 2.3 und 2.7 aufgeführt. Alle eigenhändig hergestellten Lösungen und Puffer sind in Tabelle 2.4 aufgelistet. Eine Übersicht über die getesteten Primärantikörper befindet sich in Tabelle 2.5. Die Details zu den verwendeten Sekundärantikörpern und sonstigen fluoreszenzmarkierten Stoffen enthält Tabelle 2.6.

**Tabelle 2.2 Verwendete Chemikalien und Reagenzien**

Chemikalie/Reagenz	Bezugsquelle
Aqua Poly-Mount	Polysciences Europe, Eppelheim, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA) Fraktion V	Serva, Heidelberg, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ )	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, absolute	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Jung Tissue Freezing Medium	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Normal Donkey Serum (NDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Salzsäure rauchend 37% (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sucrose	Serva, Heidelberg, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

**Tabelle 2.3 Verwendete Verbrauchsmaterialien**

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Aluminiumfolie	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Deckgläser 24x50 mm	Engelbrecht, Edermüde, Deutschland
Fettstift	Dako, Hamburg, Deutschland
Parafilm M	VWR, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen, diverse Ausführungen	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland; Corning Inc., New York, USA
PP Test Tubes 50 ml Cellstar	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Rasierklingen, brechbar	Gebr. Martin, Tuttlingen, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Greiner, Frickenhausen, Deutschland; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Skalpellklingen, unsteril, verschiedene	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sterilfilter 150 ml	Corning Inc.; New York, USA
SuperFrost Ultra Plus Objektträger	Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland

**Tabelle 2.4 Puffer und Lösungen**

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	DAPI Stammlösung 0,1 mg/ml 1 :1000 in PBS
Antikörperinkubationslösung	3 % NDS 1 % BSA 0,5 % oder 1 % Triton X-100 0,02 % NaN <sub>3</sub> in PB/PBS/TBS
Natriumazid Stammlösung	5 % NaN <sub>3</sub> in Aqua dest.
Natronlauge 3 M	12,00 g Natriumhydroxid in 100 ml Aqua dest.
Paraformaldehyd (PFA) 4 %	4 g PFA in 100 ml PBS (pH 7,4)
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), 0,01 M, pH 7,4	8,76 g NaCl 0,20 g KCl 50 ml 0,2 M PB pH 7,4 auf 1 L mit Aqua dest. auffüllen
Phosphatpuffer (PB), 0,1 M, pH 7,4	21,71 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O 2,62 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O in 1 L Aqua dest.
Phosphatpuffer (PB), 0,2 M, pH 7,4	43,42 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O 5,24 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O in 1 L Aqua dest.
Präinkubationslösung	10 % NDS 1% BSA 0,5 % Triton X-100 in PBS
Sucrose, 10/20/30%ig	10/20/30 g Sucrose 0,5 ml 5 % NaN <sub>3</sub> auf 100g in PB lösen
Tris-gepufferte Salzlösung (TBS), pH 7,4	8,8 g NaCl 3,0 g TRIS 2,0 g KCL In 1 L Aqua dest.
Triton X-100 Stammlösung	5% Triton X-100 in PB/PBS

**Tabelle 2.5 Getestete Primärantikörper**

Name (Bestell-Nr.)	Wirt	Immunogen	Bezugsquelle
A20	ms	AAV2 Capsidproteine	Jürgen Kleinschmidt, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Deutschland
ADK4	ms	AAV4 Vektor Partikel	Jürgen Kleinschmidt, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Deutschland
Blue Opsin (AB5407)	rb	Rekombinantes humanes blau-sensitives Opsin	Chemicon, CA, USA
Calbindin (300)	ms	Calbindin D-28k aus Hühnerdarm	Swant, Bellinzona, Schweiz
Calbindin (CB38)	rb	Rekombinantes Calbindin D-28k der Ratte	Swant, Bellinzona, Schweiz
Calretinin (MAB1568)	ms	Rekombinantes Calretinin der Ratte	Chemicon, CA, USA
Calretinin (CR7699/3H)	rb	Rekombinantes humanes Calretinin mit 6-His-Tag am N-Terminus	Swant, Bellinzona, Schweiz
ChAT (AB144P)	gt	Humane plazentare Cholineacetyltransferase	Chemicon, CA, USA
ChAT (AB143)	rb	Humane plazentare Cholineacetyltransferase	Chemicon, CA, USA
CRALBP (NB100-74392)	ms	Rekombinantes humanes zelluläres Retinaldehydrobindeprotein (CRALBP)	Novus Biologicals, Cambridge, UK
CRALBP (sc-28193)	rb	N-terminales Peptid des humanen Retinaldehydrobindeproteins (CRALBP) (AS 1-100)	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
CtBP2 (612044)	ms	Peptid des c-terminierten Bindepotein 2 (CtBP2) der Maus (AS 361-445)	BDTransduction Laboratories, NY, USA
CtBP2 (1930039)	rb	N-terminales Peptid des c-terminierten Bindepotein 2 (CtBP2) der Ratte (AS 431-445)	Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland
G <sub>α11</sub> (sc-389)	rb	Peptid der G <sub>α</sub> Untereinheit des humanen visuellen Transducin der Stäbchen	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
G <sub>α12</sub> (sc-390)	rb	Peptid der G <sub>α</sub> Untereinheit des humanen visuellen Transducin der Zapfen	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA

Name (Bestell-Nr.)	Wirt	Immunogen	Bezugsquelle
GFAP (AB5804)	rb	Aufgereinigtes bovines <i>glial fibrillary acidic protein</i> (GFAP)	Chemicon, CA, USA
GluR5 (sc-7616)	gt	C-terminales Peptid der humanen Glutamin Rezeptor Untereinheit 5 (GluR5)	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
Glutamine-Synthetase (610517)	ms	Aufgereinigtes Glutamine-Synthetase des Schafs (AS 1-373)	BDTransduction Laboratories, NY, USA
Go $\alpha$ (MAB3073)	ms	Aufgereinigtes G Protein O alpha (Go $\alpha$ ) aus Rindergehirn	Chemicon, CA, USA
HCN4 (APC-052)	rb	N-terminales Peptid der humanen Hyperpolarisations-aktivierten, zyklischen Nukleotid gesteuerten Ionenkanal-Untereinheit 4 (HCN4) (AS119-155)	Alomone Labs, Jerusalem, Israel
LRAT (sc-101391)	ms	Synthetisches Peptid der humanen Lecithin-Retinol-Acyltransferase (LRAT) (AS 190-199)	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
mGluR6 (GP13105)	gp	C-terminales Peptid des metabotropen Glutamatrezeptor 6 (mGluR6) der Ratte	Neuromics; MN, USA
NOS (N7280)	rb	Synthetisches Peptid der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) des Rattengehirns (AS 1409-1429)	Sigma-Aldrich, MO, USA
OPN1MW/MW2/LW (sc-22117)	gt	Peptid der extrazellulären Domäne des humanen rot-sensitiven Opsins	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
OPN1SW (sc-14363)	gt	N-terminales Peptid des humanem blau-sensitiven Opsins	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
Opsin JH 455	rb	C-terminales Peptid des humanen blau-sensitiven Opsins (Wang et al., 1992)	J. Nathans, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA
Opsin JH 492	rb	C-terminales Peptid des humanen rot-sensitiven Opsins (Wang et al., 1992)	J. Nathans, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA
PKC $\alpha$ (P4334)	rb	C-terminales Peptid der V5 Region der Proteinkinase C alpha (PKC $\alpha$ ) der Ratte (AS 659-672 mit Lys am N-Terminus)	Sigma-Aldrich, MO, USA

<b>Name (Bestell-Nr.)</b>	<b>Wirt</b>	<b>Immunogen</b>	<b>Bezugsquelle</b>
PSD95 (MABN68)	ms	Rekombinantes humanes postsynaptic density protein 95 (PSD95) (Klon K28/43)	Chemicon, CA, USA
RDH5 (sc-98348)	rb	Peptid der humanen Retinol-Dehydrogenase 5 (RDH5) (AS 111-150)	Santa Cruz Biotechnology,
Rhodopsin (MAB5356)	ms	Bovines Rhodopsin (Klon Rho 1D4)	Chemicon, CA, USA
RPE65	rb	Bovine mikrosomale Membranproteine des retinalen Pigmentepithels	INSERM UMR 1089, Institut de Recherche Thérapeutique 1, Université de Nantes, France
RPE65(NB100-355)	ms	Bovine mikrosomale Membranproteine des retinalen Pigmentepithels	Novus Biologicals, Cambridge, UK
Synaptophysin (S5768)	ms	Synaptophysin des Rattengehirns	Sigma-Aldrich, MO, USA
Vimentin (ab8069)	ms	Porcine Linse	Acam, Cambridge, UK
Vimentin (5741)	rb	Synthetisches Peptid des humanen Vimentins	Cell Signaling, CA, USA

ms: Maus; rb: Kaninchen; gt: Ziege; gp: Meerschweinchen; AS: Aminosäure

**Tabelle 2.6 Verwendete Sekundärantikörper und fluoreszenzmarkierte Reagenzien**

Konjugat	Art	Quelle	Verdünnung
Alexa Fluor 350	dk α gt	Molecular Probes, Eugene, USA	1:500
Alexa Fluor 488	dk α ms		
	dk α rb		
Alexa Fluor 546	dk α ms		
Alexa Fluor 594	dk α ms		
	dk α rb		
Cy3	dk α gp	Jackson IR/Dianova, Hamburg, Deutschland	1:500
	dk α gt		
	dk α ms		
	dk α rb		
DAPI	-	Molecular Probes, Eugene, USA	1:1000
PNA (Alexa Fluor 488/594/647)	-		

α: anti; dk: Esel; ms: Maus; rb: Kaninchen; gt: Ziege; gp: Meerschweichen; PNA: Peanut-Agglutinin

**Tabelle 2.7 Verwendete Geräte und Hilfsmittel**

<b>Gerät/Hilfsmittel</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Analysenwaage, ACC-110.4	Satorius, Göttingen, Deutschland
AxioVision 4.8	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland
<i>Cell counter plugin</i>	Kurt De Vos, Academic Neurology, University of Sheffield, UK
Digitales Fluoreszenzmikroskop BZ8000	Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland
Excel 2010	Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
Färbekammer, schwarz	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Färbetrog nach Choplin/ nach Hellendahl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axio Imager.Z1 mit ApoTome, div. Filtern sowie Axio Cam MR	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axioplan imaging Mot mit div. Filtern und Axio CamMR	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland
Glasgefäße Duran, div. Ausführungen	VWR, Darmstadt, Deutschland
HBO Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe 50 bis 100 W	Osram, München, Deutschland
ImageJ 1.47n5	W.S. Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, USA
Klingenbrecher nach Castroviejo 13 cm	Gebr. Martin, Tuttlingen, Deutschland
Konfokales Laserscanningmikroskop Axioskop 2 MOT mit LSM 5 Pascal Modul und Ar-Laser 488, 514 nm, 25 mW sowie HeNe-Laser 543 nm, 1 mW	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland
Kryostat CM 3050	Leica, Nussloch, Deutschland
LSM Image Browser 4.2.0.121	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland
Luft-Objektive: Plan Neofluar 2,5x/0,075 Plan Neofluar 10x/0,30 Ph1 Plan-Apochromat 20x/0.8 Plan Neofluar 40x/0,75 M27	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland
Magnetrührer	IKA, Staufen, Deutschland
Messpipetten Duran, div. Ausführungen	VWR, Darmstadt, Deutschland
Öl-Immersionsobjektive: Plan-Neofluar 40x/1,30 Plan-Apochromat 63x/1,40	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland
pH Meter, Seven Easy S20	Mettler Toledo, Schwerzenbach, Schweiz
Photoshop CS 5 extended	Adobe Systems, München, Deutschland
Pinsel, Stärke 2	Karstadt, Essen, Deutschland
Pipetten, div. Ausführungen	Brand, Wertheim, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PowerPoint 2010	Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Präzisionswaage	Ohaus, Zürich, Schweiz
Schüttler Certomat H	Satorius, Göttingen, Deutschland

Sigma Plot 12.0	Systat Software Inc., San Jose CA, USA
Stereomikroskop SMZ168	Motic, Wetzlar, Deutschland
Vortexmischer	VWR, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad TW12	Julabo, Seelbach, Deutschland
Word 2010	Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
Zentrifuge 1-15 PK	Sigma, München, Deutschland
Zentrifuge, Mini Star	VWR, Darmstadt, Deutschland

## **2.2 Methodik der Vorarbeiten**

Die hier aufgeführten Vorarbeiten erfolgten alle am INSERM UMR 1089 Institut de Recherche Thérapeutique 1 der Universität Nantes (Frankreich) durch das dortige Personal.

### **2.2.1 Subretinale Injektion**

Die subretinale Injektion der Tiere erfolgte nach einem standardisierten Verfahren nach Weber et al. 2003. Hierfür wird unter Isoflurannarkose eine 44-Gauge Kanüle via Sklerotomie ins Auge eingeführt und durch den Glaskörper voran geschoben. Unter mikroskopischer Kontrolle wird dann eine gezielte Menge Vektorlösung in den subretinalen Raum injiziert. Die Injektionsstelle ist einige mm oberhalb des optischen Nervs gesetzt worden, damit sich die injizierte Flüssigkeit im superioren zentralen Bereich der Retina ausbreiten kann. Postoperativ wurden die Tiere für sechs Tage mit Antibiose und Schmerzmittel versorgt (Weber 2003). Eine graphische Darstellung der Vorgehensweise findet sich in Abbildung 1.16.

### **2.2.2 Postoperative Erfolgs- und Verlaufskontrollen**

Um den Therapieerfolg und seinen Verlauf zu kontrollieren wurden, folgende Verfahren bei den Tieren nach der subretinalen Injektion angewendet:

- Funduskopie
- Fluoreszein Angiographie
- Optische Kohärenztomographie
- Elektoretinogramm
- Hindernisparcours

Die Vorgehensweise bei diesen Untersuchungen sowie Teile der Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Le Meur et al. 2007).

### **2.2.3 Präparation der Augenbecher und Fixation**

Die Tiere wurden durch eine Überdosis von Anästhetika euthanasiert und die Augen direkt im Anschluss entnommen.

Die Präparation der Augenbecher erfolgte unter stereomikroskopischer Kontrolle in PBS. Hierfür wurden die Augen entlang der Ora serrata geöffnet und die vordere Augenkammer, sowie Linse und Glaskörper entfernt.

Anschließend wurden die Augenbecher mit 4 % PFA in PB bei Raumtemperatur auf dem Schüttler für 15 bzw. 30 Minuten fixiert. Die Fixierung wurde durch Waschen in PBS unterbrochen und die Augen für den Versand nach Gießen ordnungsgemäß verpackt.

## **2.3 Methodik der eigenen Arbeit**

Durch die Kooperation mit der AG PD Dr. Silke Haverkamp am Max-Planck-Institut für Hirnforschung konnte dort die Technik der Immunhistochemie mit allen dazu gehörigen Schritten (siehe Abschnitt 2.3.1) erlernt und dann im Labor für molekulare Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der JLU Gießen etabliert werden. Des Weiteren standen die dort vorhandenen Epifluoreszenzmikroskope sowie ein konfokales Laserscanningmikroskop für die in dieser Arbeit gemachten Untersuchungen zur Verfügung.

### **2.3.1 Immunhistochemie**

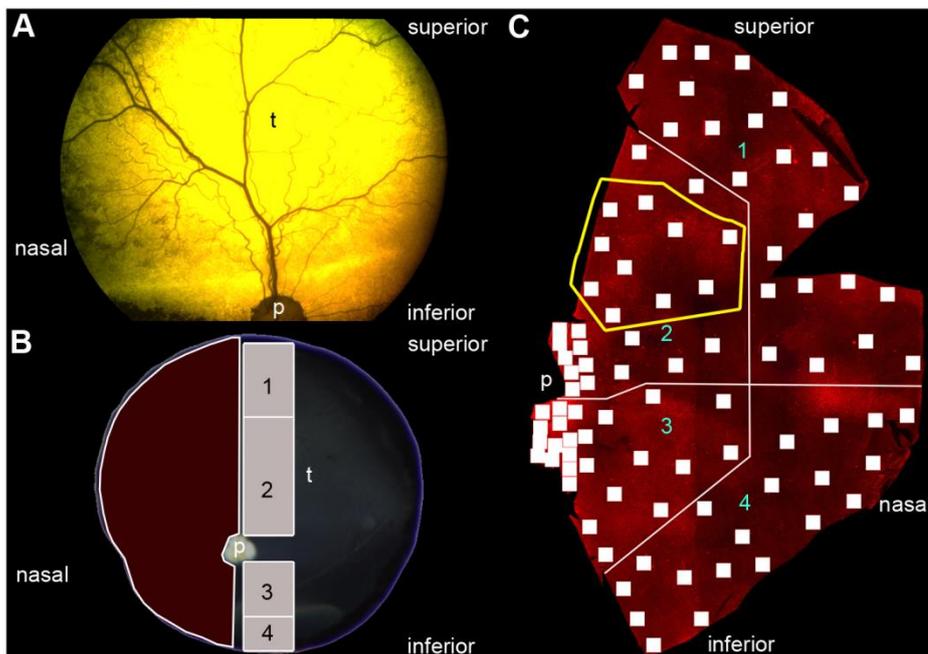
Um die Augen für das spätere Einfrieren vorzubereiten, wurden diese in eine aufsteigende Sucrosereihe bei 4°C gegeben (10% Sucrose für ½ h, 20 % Sucrose für 1h und 30 % Sucrose über Nacht mit jeweils 0,02% NaN<sub>3</sub>). Die Sucrose dient dem Gewebe als Gefrierschutz und das Natriumazid verhindert ein Wachstum von Bakterien und Pilzen. Die Hundeaugen wurden im Anschluss direkt präpariert oder zur Aufbewahrung in 30 % Sucrose mit 0,02 % NaN<sub>3</sub> bei -20° eingefroren.

#### **2.3.1.1 Retinapräparation**

Bereits eingefrorene Augen wurden bei 4°C langsam aufgetaut, um das Gewebe zu schonen. Die Präparation der Augen erfolgte in einer Plastikschaale in 30 % Sucrose mit 0,02 % NaN<sub>3</sub>. Hierfür wurde das Auge so in der Schale ausgerichtet, dass die Retina ständig mit Sucrose bedeckt war und somit nicht austrocknen konnte.

Für die einzelnen Analysen auf Vertikalschnitten wurden verschiedene Bereiche der Retina aus dem Auge entnommen. Zur Erstellung des Zellmarkerkatalogs (Abschnitt 3.1) wurden Teile der Retina verwendet, welche für die restlichen Untersuchungen nicht von Bedeutung waren. Für die Analysen im jungen adulten Alter (Abschnitt 3.2) und die Verlaufsanalyse (Abschnitt 3.3) wurden Teile der Retina nach dem Schema in Abbildung 2.1 B aus dem Auge entnommen. Für die Untersuchung nach erfolgreicher Genterapie (Abschnitt 3.4) wurden Stücke aus dem superioren Bereich des rechten

Auges von vier Tieren (C1- C4) entnommen, bei denen sichergestellt war, dass sie innerhalb des injizierten Bereichs liegen. Des Weiteren wurden jeweils Stücke aus dem inferioren Bereich des rechten Auges dieser Tiere entnommen, womit sicher gestellt war, dass dort die Injektion keinen Einfluss mehr hatte. Zusätzlich wurde für diese Analyse jeweils ein Stück Retina aus dem superioren Bereich des kontralateralen Auges dieser Tiere entnommen.



**Abbildung 2.1 Präparationsschema des Hundeauges**

**(A)** In-Vivo-Funduskopie. Die Darstellung zeigt vor allem den superioren Bereich des Auges. Die dunkleren bis schwarzen Areale stellen einen Teil des pigmentierten Bereichs dar. Oberhalb des optischen Nerven (p) liegt das Tapetum lucidum (t). **(B)** Canines RPE65<sup>-/-</sup> Auges postmortal. Der rotmarkierte Bereich wurde für die Zapfenverteilungsanalyse entnommen und entspricht dem abgebildeten Flachpräparat in C. Die graumarkierten Bereiche wurden zum Anfertigen von vertikalen Schnitten entnommen und ihre Nummerierung entspricht der Einteilung für die Synapsen- und Verlaufsanalyse. **(C)** Flachpräparat zur Analyse der Zapfenverteilung. Die weißen Quadrate stellen die gemachten Aufnahmen für die Analyse dar. Die weißen Linien und blauen Zahlen geben die Regioneneinteilung für diese Analyse wieder. Der gelb umrandete Bereich wurde als Vergleich zum injizierten Bereich der behandelten Tiere gewählt. Modifiziert nach (Klein et al. 2014).

Für die Flachpräparate wurde der nasale Bereich der Retina (siehe Abbildung 2.1 B) bei folgenden Tieren als Ganzes entnommen:

- A2 linkes Auge
- A3 rechtes Auge
- B2 linkes Auge
- B3 linkes Auge
- B5 linkes Auge
- B6 linkes Auge
- C1 rechtes Auge
- C2 rechtes Auge

Das gewünschte Retinastück wurde mit Hilfe eines Klingenbrechers und einem Stück einer Rasierklinge aus dem Auge ausgeschnitten. Für die vertikalen Schnitte wurde die Retina zusammen mit der Choroidea entnommen, damit auch das retinale Pigmentepithel untersucht werden konnte. Der restliche Augenbecher wurde im Anschluss in frische Sucroselösung gegeben und zur Aufbewahrung wieder eingefroren.

### **2.3.1.2 Anfertigung von vertikalen Gefrierschnitten**

Das entnommene Gewebe wurde für 10 Minuten in Einbettmedium (Jung Tissue Freezing Medium, Leica) bei 4° C vorinkubiert, um dieses an das Medium zu gewöhnen. Im Anschluss wurde frisches Einbettmedium auf einen mit Parafilm ummantelten Objektträger gegeben und das Gewebe flach auf diesen ausgebreitet, um es dann auf einen vorgefertigten Block aus Einbettmedium im Kryo-Staten bei -45°C aufzufrieren. Falls sich die Verbindung zwischen Neuroretina und retinalem Pigmentepithel (natürliche Sollbruchstelle) während der Präparation gelöst hatte, wurden die beiden Stücke direkt übereinander eingebettet (Sandwich-Einbettung). Die Blöcke wurden nun so zugeschnitten, dass die Orientierung des Gewebes sichtbar blieb. Im Anschluss wurde der Block mit einer weiteren Schicht Einbettmedium überzogen, um das Gewebe zusätzlich zu schützen. Bei einer Kammertemperatur von -21 °C und einer Objektträger-Temperatur von -18 °C wurden nun 16 µm dicke Schnitte angefertigt und diese auf Objektträger (Super Frost Plus, Menzel) aufgenommen. Der Rest des Blockes wurde in Parafilm und Aluminiumfolie verpackt und zusammen mit den fertigen Schnitten bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### **2.3.1.3 Färbung der Präparate mittels indirekter Immunfluoreszenz**

#### *2.3.1.3.1 Färbung von vertikalen Gefrierschnitten*

Die Gefrierschnitte wurden zunächst für dreimal zehn Minuten in Puffer gewaschen. Die Wahl des Puffers wurde durch die spätere Antikörperauswahl bestimmt. Standardmäßig wurde PB verwendet, bei den Opsinen hingegen PBS. Für einige Antikörper wurde TBS ebenfalls getestet (für genauere Angaben siehe Tabelle 4.1 und 4.2).

Anschließend wurden die Schnitte auf dem Objektträger mit einem Fettstift umrandet, um ein Auslaufen der Inkubationslösung und somit ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Nun wurden ca. 40 µl Primärantikörper (für genauere Angaben zu den einzelnen Antikörper siehe Tabelle 2.5, 4.1 und 4.2) verdünnt in

Antikörperinkubationslösung (3% NDS, 1%BSA und 0,5 % Triton X-100) auf jeden Schnitt gegeben und das Ganze über Nacht bei Raumtemperatur (RT) in einer feuchten Kammer inkubiert. Zur Verbesserung der Antikörperfärbung und zur Reduzierung von Hintergrundfärbung, erfolgte bei einigen Färbungen vor der Inkubation mit Primärantikörper eine Blockierung von freien Bindungsstellen mit Präinkubationslösung (10% NDS, 1% BSA und 0,5 % Triton X-100) für eine Stunde bei RT.

Am nächsten Tag wurde nach einem erneuten Waschgang der Sekundärantikörper (verdünnt 1:500 in derselben Inkubationslösung wie oben bereits beschrieben) eingesetzt und das Ganze wurde für eine Stunde bei RT lichtgeschützt in der feuchten Kammer zur Inkubation gelegt. Schließlich erfolgte ein weiterer Waschschrift und die Objektträger wurden im Anschluss mit Aqua Polymount eingedeckelt. Falls eine Zellkernfärbung notwendig war, wurde diese vor dem Eindeckeln zusätzlich durchgeführt. Hierfür wurde DAPI (verdünnt 1:1000 in PBS) für drei Minuten auf die Schnitte gegeben und die Reaktion dann durch einen Waschschrift unterbrochen.

#### *2.3.1.3.2 Färbung von Flachpräparaten zur Zapfenverteilungsanalyse*

Das entnommene Stück wurde in ein Schnappdeckelglas überführt und dann dreimal 15 Minuten in PBS auf dem Schüttler gewaschen. Anschließend folgte die Inkubation in einer Mixtur aus drei Zapfenmarkern (Blue Opsin, OPN1MW/MW2/LW und PNA 647, für weitere Informationen siehe Tabelle 2.5, 2.6 und 4.1)) gelöst in Antikörperinkubationslösung (1%NDS, 1% BSA, 1% Triton X-100 und 0,02% NaN<sub>3</sub>) für zwei Tage bei RT auf dem Schüttler. Die Inkubation wurde durch dreimaliges 15 minütiges Waschen in PBS unterbrochen. Nun wurden die Sekundärantikörper (Alexa Fluor 488 dkarb und Cy3 dkagt) 1:500 verdünnt in derselben Antikörperinkubationslösung wie oben zum Gewebe gegeben und es wurde für zwei Stunden lichtgeschützt bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nachdem die Reaktion durch einen erneuten Waschschrift abgebrochen wurde, wurde die Retina auf einem Deckglas vorsichtig ausgebreitet, mit einer ausreichenden Menge Eindeckmedium Aqua Polymount überschichtet und schließlich mit einem zweiten Deckglas eingedeckt. Zur Trocknung und Lagerung bis zur weiteren Verwendung wurden die Präparate auf einem Objektträger fixiert und bei 4° C aufbewahrt.

#### **2.3.1.4 Epifluoreszenzmikroskopie und konfokale Laserscanningmikroskopie**

Zur Auswertung der immunohistochemischen Färbungen standen verschiedene Epifluoreszenzmikroskope, sowie ein konfokales Laserscanningmikroskop zur Verfügung.

In der Regel erfolgten die Aufnahmen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop Axioskop 2 MOT mit LSM 5 Pascal Modul (Carl Zeiss). Je nachdem welche Vergrößerung notwendig war, wurden die Präparate mit einem Luft-Objektiv Plan-Apochromat 20x/0.8 (Carl Zeiss) oder mit einem der beiden Öl-Immersionsobjektive Plan Neofluar 40x/1.30 Oil (Carl Zeiss)/ Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil (Carl Zeiss) aufgenommen. Zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe diente ein Helium-Neon Laser (Wellenlänge 543 nm) und ein Argon-Laser (Wellenlänge 415-514 nm). Der Scanvorgang erfolgte sequentiell, um ein Überstehlen der beiden Kanäle untereinander zu verhindern. Zur Bedienung des Mikroskops sowie zum Export der Rohdaten wurde die Software LSM5 Pascal (Carl Zeiss) verwendet.

Um zusätzlich Phasenkontrastaufnahmen zu den Fluoreszenzaufnahmen zu erhalten, wurde die entsprechende Region erneut mit dem DIC II Filter des Mikroskops Axio Imager Z.1 (Carl Zeiss) aufgenommen. Als Objektive wurden hier die beiden Luft-Objektive Plan Apochromat 20x/0.8 und Plan Neofluar 40x/0.75 verwendet. Zur Bedienung dieses Mikroskops sowie zum Export der Rohdaten wurde die Software AxioVision (Carl Zeiss) benutzt.

Die Aufnahmen der Flachpräparate erfolgten mit einem Axioplan 2 imaging MOT Epifluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss). Für die Übersichtsaufnahmen wurde ein Luft-Objektiv Plan Neofluar 2.5x/0.075 (Carl Zeiss) und für die Detailaufnahmen ein Luft-Objektiv Plan Neofluar 10x/0.30 Ph1 (Carl Zeiss) verwendet. Dieses Mikroskop ist mit verschiedenen Filtern für die einzelnen verwendeten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 2.6 Verwendete Sekundärantikörper und fluoreszenzmarkierte Reagenzien) ausgestattet und als Lichtquelle dient eine Hochdruck-Quecksilberdampfampe (Osram). Auch hier erfolgte die Bedienung des Mikroskops sowie der Export der Rohdaten über die Software AxioVision (Carl Zeiss).

Des Weiteren wurde zur Erfolgskontrolle der Färbungen das Kompakt-Fluoreszenzmikroskop BZ-9000 (Keyence) verwendet.

#### **2.3.2 Bildbearbeitung und Ergebnisauswertung**

Nach Umwandlung der Mikroskop-Rohdaten in das Bildformat TIFF konnten diese mit Hilfe von Photoshop CS 5 Extended (Adobe) betrachtet und nachbearbeitet werden. Es

erfolgte eine Anpassung von Helligkeit, Kontrast und Tonwert, um eine optimale Darstellung der Strukturen zu erreichen. Die Anpassung erfolgte nur soweit, dass es zu keinerlei Fehlinterpretation der Informationen aus den Originaldaten kam.

Die Erstellung der Darstellungsgraphen sowie die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Sigma Plot 12 (Systat Software).

Zur Zusammenstellung der Abbildungen wurde sowohl Photoshop CS5 Extended als auch PowerPoint 2010 (Microsoft) verwendet.

Im Folgenden wird die Vorgehensweise bei den verschiedenen Analysen genauer beschrieben.

### **2.3.2.1 Analyse der Zapfenverteilung**

Das erfolgreich gefärbte Flachpräparat der nasalen Retina wurde mit Hilfe des Luft-Objektiv Plan Neofluar 2.5x/0.075 manuell so aufgenommen, dass mit Hilfe von Photoshop CS5 Extended eine Karte des Präparats (siehe Abbildung 2.1 C) erstellt werden konnte. Hierfür wurden einzelne Aufnahmen gemacht, die zum Teil überlappend waren, und im Anschluss im Bildbearbeitungsprogramm per Hand zusammengefügt.

Anschließend wurden diese Fotomontagen dazu genutzt, die Aufnahmepunkte (weiße Quadrate in Abbildung 2.1 C) für die Detailaufnahmen der Zapfen für die spätere Auszählung festzulegen. Pro Flachpräparat wurden je nach Beschaffenheit jeweils zwischen 92 und 114 Aufnahmen in den drei gefärbten Kanälen gemacht.

Die Auszählung der Bilder erfolgte mit dem manuellen Zählungswerkzeug der Software Photoshop CS5 Extended. Für die Analyse der S-Zapfenverteilung wurde die gesamte Bildfläche (0,597 mm<sup>2</sup>) ausgezählt und auf S-Zapfen pro mm<sup>2</sup> hochgerechnet. Die Auszählung der L/M-Zapfen geschah auf einem Teilstück von 0,06 mm<sup>2</sup> und wurde dann auf L/M-Zapfen pro mm<sup>2</sup> hochgerechnet. Die PNA-Färbung diente lediglich als interne Kontrolle und wurde nicht ausgewertet.

Basierend auf dem Verteilungsmuster der Aufnahmepunkte in den gesunden Tieren wurde für die erkrankten nicht behandelten Tiere für jedes Quadrat ein Mittelwert ermittelt. Hierfür wurde das jeweilige Flachpräparat über das Flachpräparat des Referenztieres gelegt und geschaut, welcher Analysepunkt auf der betroffenen Retina einem Analysepunkte auf der Retina des gesunden Tiers entspricht. Lag eine Wildtypaufnahme zwischen zwei Aufnahmen in den erkrankten Tieren wurde interpoliert. Die beiden Datensätze der gesunden Tiere wurden ebenfalls für jedes Quadrat gemittelt.

Um die Ergebnisse aus den Zapfenanalysen graphisch besser darstellen zu können, wurden die Mittelwertdaten der untersuchten Retinae an Patrice Schlegel (Fachbereich Mathematik und Informatik, Arbeitsgruppe Computational Intelligence, Phillips Universität Marburg, Deutschland) zur Erstellung von Heatmaps weitergegeben. Die Vorgehensweise für dieses Verfahren ist in Klein et al. 2014 beschrieben.

### **2.3.2.2 Analyse der synaptischen Verbindungen in der OPL**

Für diese Analyse wurden pro Tier und Region (siehe Abbildung 2.1 B) je sechs Z-Ebenen-Aufnahmen mit jeweils vier Bildern (Abstand 1  $\mu\text{m}$ ) aufgenommen (drei Aufnahmen Doppelfärbung CtBP2 und PKC sowie drei Aufnahmen Doppelfärbung CtBP2 und Calbindin). Die Auswertung erfolgte mit dem Cell Counter Tool der Software Image J. Dabei wurde durch die Stack-Aufnahme gefahren und jede sich deutlich von der OPL abgesetzte CtBP2-positive Bandsynapse einmal gezählt. In der PKC $\alpha$  Färbung wurden zusätzlich die hochziehenden Bipolarzellendriten gezählt und in der Calbindin-Färbung die hochziehenden Fortsätze der Horizontalzellen. Es erfolgte eine Anpassung des Kontrastes und der Helligkeit, um die Synapsen bzw. die Zellfortsätze besser erkennen zu können. Es wurden Z-Ebenen-Aufnahmen ausgewertet, um die OPL möglichst vollständig beurteilen zu können.

Die Messung der ONL-Schichtdicke erfolgte mit Hilfe der Software LSM Image Browser auf denselben Aufnahmen wie oben. Hierfür wurden pro Aufnahme drei Messungen im Abstand von jeweils zehn  $\mu\text{m}$  vorgenommen und anschließend der Mittelwert gebildet.

### **2.3.2.3 Statistische Auswertung**

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse der Zapfenanalyse im Altersvergleich von zwei Jahren wurden die Flachpräparate jeweils in vier Regionen eingeteilt (siehe Abbildung 2.1 C) und ein Wilcoxon-Mann-Whitney-Test für die jeweilige Region durchgeführt. Dieser parameterfreie Test wurde gewählt, da der Shapiro-Wilk-Test, welcher die Normalverteilung für die Daten überprüft, für einige Datensätze ein  $p < 0,05$  aufwies.

Zum Vergleich der Zapfendichte vor und nach der Gentherapie wurden Daten von betroffenen und gesunden Tieren aus einem äquivalenten Bereich (Abbildung 2.1, gelb umrandete Quadrate) zum injizierten Bereich mit einem Teil der Daten aus dem behandelten Augen in einem ungepaarten t-Test verglichen.

Die Darstellung der beiden statistischen Analysen zur Zapfendichte erfolgte jeweils in Boxplots. Der untere Whisker gibt das 5% Perzentil und der obere Whisker das 95% Perzentil an.

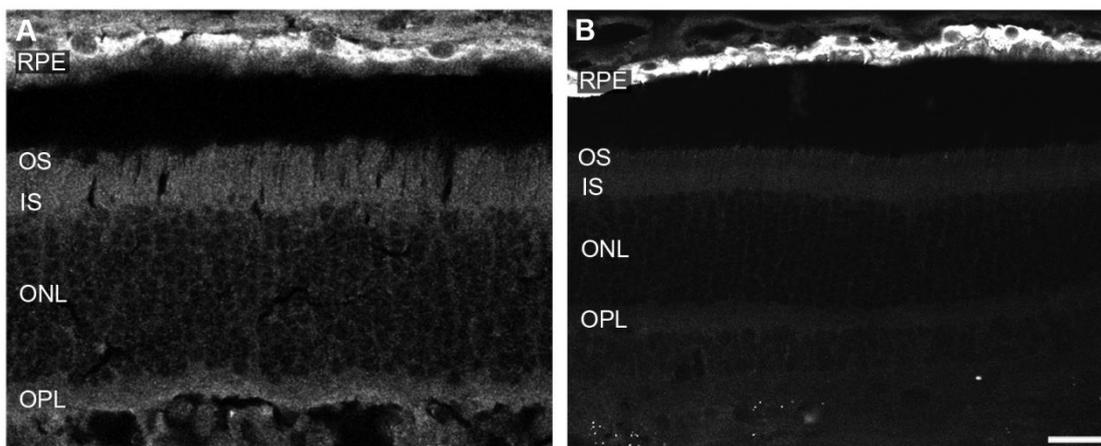
Zur statistischen Beurteilung der Daten aus der Analyse der synaptischen Verbindungen der OPL im Altersvergleich von zwei Jahren wurden die Datensätze der Wildtyptiere mit denen der *RPE65<sup>-/-</sup>* Hunde mittels eines ungepaarten t-Tests verglichen. Des Weiteren wurde eine nicht lineare Regressionsanalyse 1. Ordnung durchgeführt, um zu überprüfen ob ein Zusammenhang zwischen der ONL-Schichtdicke und dem Auftreten von delokalisierten Synapsen besteht. Diese Daten wurden mit Hilfe eines Scatterplots dargestellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Erstellung eines Zellmarkerkatalogs für die canine Retina

Zur Erstellung des Zellmarkerkatalogs für die canine Netzhaut wurden verschiedene Antikörper (AK) getestet (siehe Tabelle 2.5). Die AKs markieren die verschiedenen Strukturen in der Retina und im retinalen Pigmentepithel. Die Antikörpertests wurden in der gesunden Hunderetina durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten Mäuse- sowie Rattenretinae. Die Färbungen erfolgten nach einem Standardprotokoll (siehe Abschnitt 2.3.1.3.1). Die Ergebnisse aus den Tests in der caninen Netzhaut sind in den Abbildung 3.1 bis Abbildung 3.9 dargestellt.

In Abbildung 3.1 sind zwei verschiedene Antikörper gegen RPE65 gezeigt. RPE65 ist die Isomerohydrolase des klassischen visuellen Zyklus (siehe Abschnitt 1.3). Mit diesen beiden Antikörpern kann man das Protein innerhalb des retinalen Pigmentepithels detektieren.

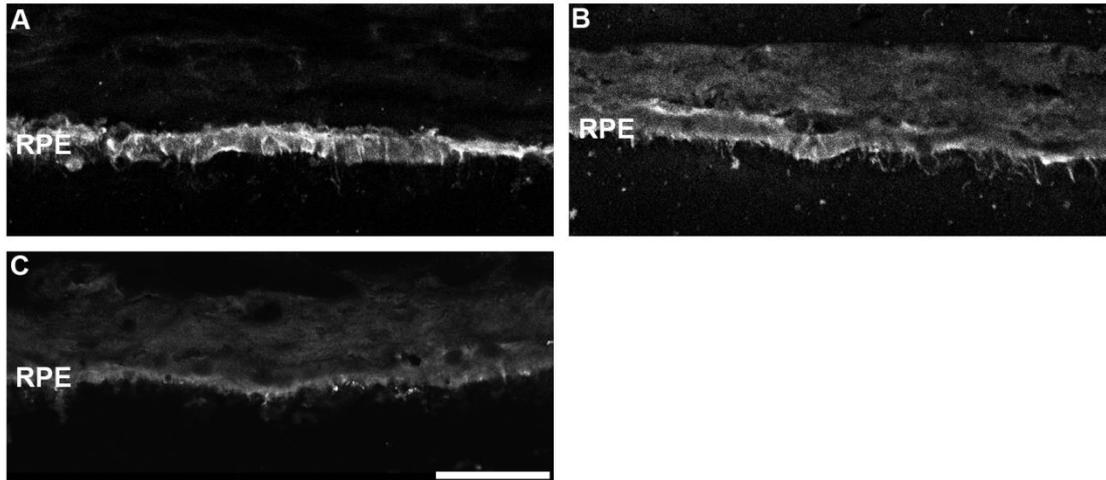


**Abbildung 3.1 RPE65-Antikörper**

*RPE65 ist nur im RPE lokalisiert. (A) RPE65 (INSERM) (B) RPE65 (NB100-355). RPE: Retinales Pigmentepithel; OS: Außensegmente; IS Innensegmente; ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht. Maßstabsbalken 25 µm.*

In Abbildung 3.2 sind weitere Marker des RPEs und des visuellen Zyklus dargestellt. CRALBP ist ein Transportprotein für die Retinoide während des Recyclens von 11-cis ROL (siehe Abschnitt 1.3). Sowohl der Mausantikörper (NB100-74392) (Abbildung 3.2 A) als auch der Kaninchenantikörper (sc-28193) (Abbildung 3.2 B) zeigen ein deutlich positives Ergebnis, wobei der Mausantikörper ein klares Signal produziert. RDH5 stellt das Enzym zur Umwandlung von all-trans RAL zu all-trans-

ROL dar (siehe Abschnitt 1.3). Die Anfärbung dieses Enzyms ist in der Abbildung 3.2 C dargestellt. Es zeigt sich, dass dies nur in geringen Mengen im RPE exprimiert wird.



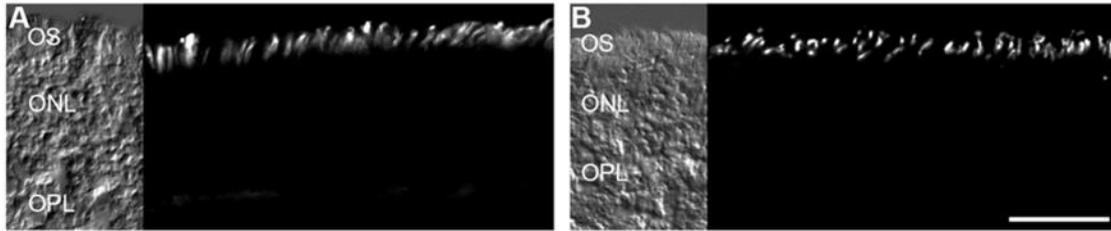
**Abbildung 3.2 RPE Marker**

*(A/B) CRALBP wird im RPE exprimiert. (A) CRALBP (NB100-74392) (B) CRALBP (sc-28193) (C) RDH5 ist ebenfalls im RPE exprimiert. CRALBP: zelluläres retinales Bindeprotein; RPE: retinalen Pigmentepitel; RDH5: Retinalaldehydehydogenase 5. Maßstabsbalken 20 µm.*

In den Abbildung 3.3 bis Abbildung 3.5 werden verschiedene Marker gezeigt, um die Photorezeptoren der Retina anzufärben.

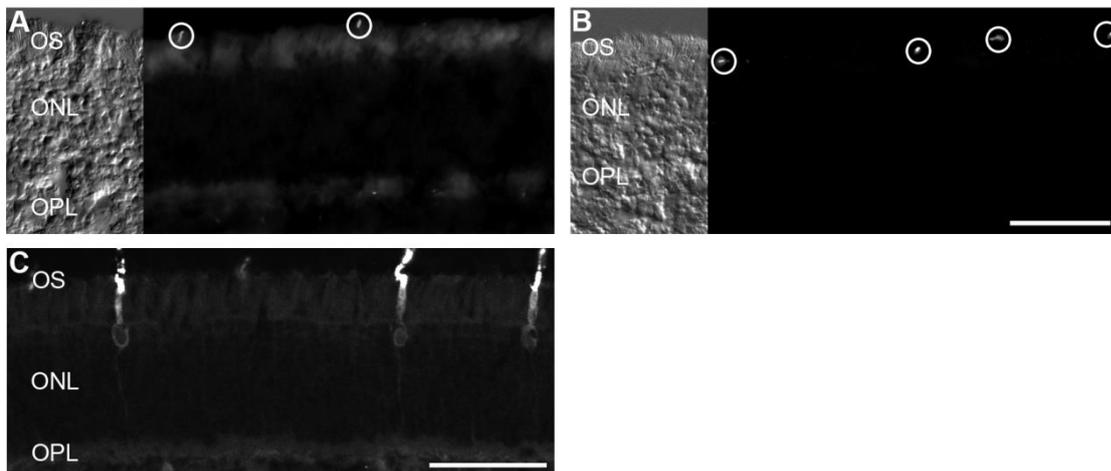
Zum einen kann man das Opsin der Photorezeptoren anfärben, um somit die verschiedenen Zellarten zu unterscheiden. Die Rotgrünzapfen lassen sich durch Marker darstellen, welche das L/M-Opsin detektieren. In Abbildung 3.3 werden zwei unterschiedliche Antikörper zeigt, welche beide gleich gut diesen Zapfentyp anfärben. Die Markierung erfolgt nur in den Außensegmenten der Zellen.

Abbildung 3.4 zeigt die Anfärbung der Blauzapfen mit Hilfe des S-Opsins. Es wurden drei verschiedene Antikörper getestet, welche unterschiedliche Ergebnisse aufwiesen. Die Antikörper in (A) und (B) zeigen eine optimale Färbung des Opsin in den Außensegmenten. Der Antikörper in (C) hingegen zeigt eine Anfärbung des Außensegments, des Innensegments und des Somas der S-Zapfen.



### Abbildung 3.3 L/M-Opsin

Die Antikörper erkennen nur das L/M-Opsin in der Außensegmenten der Rotgrünzäpfel. (A) Opsin JH492. (B) OPN1MW/MW2/LW. OS: Außensegmente; ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht Maßstabsbalken 20  $\mu\text{m}$

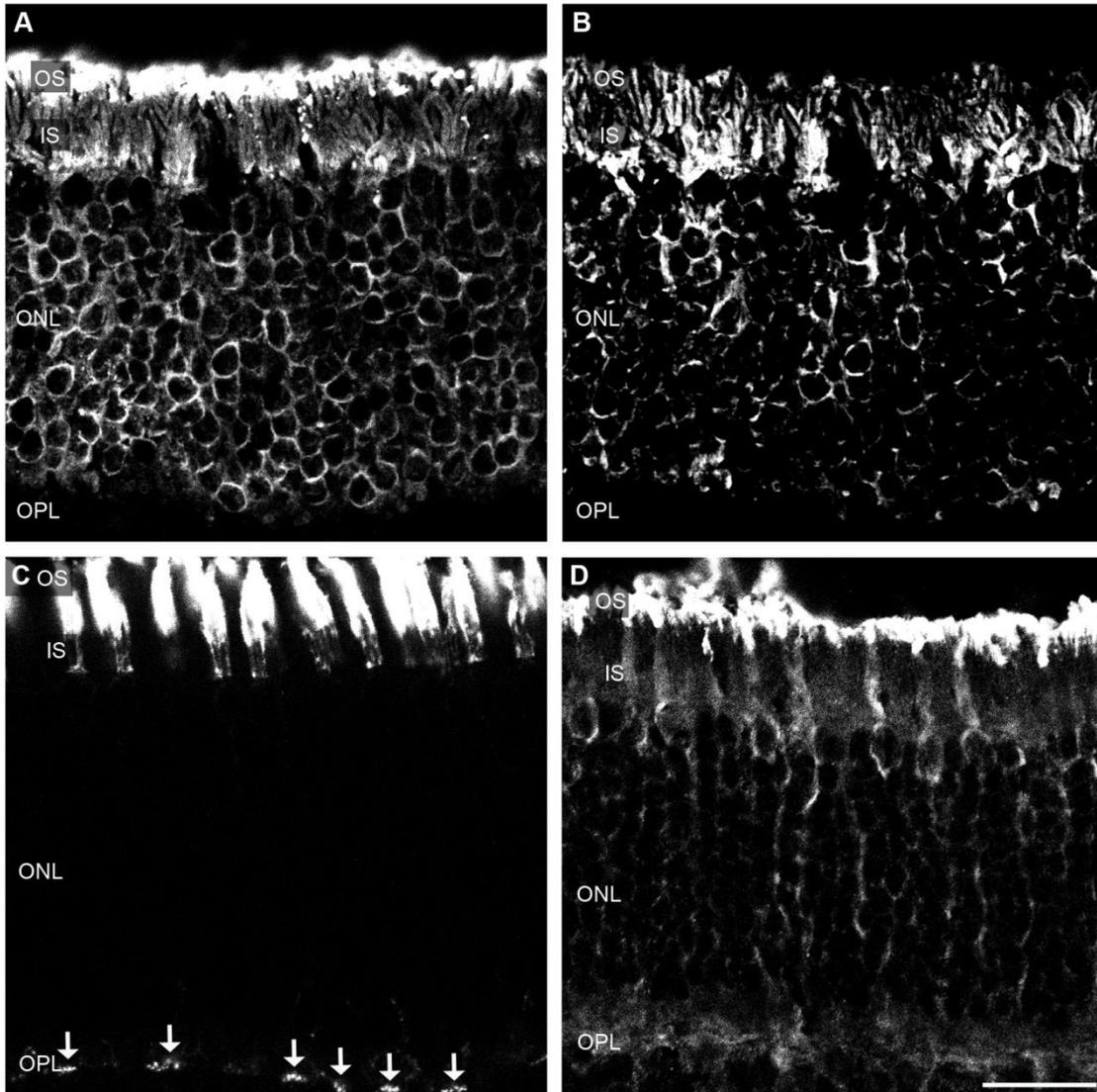


### Abbildung 3.4 S-Opsin

(A/B) S-Opsin (weiße Kreise) ist nur in den Außensegmenten der Blauzäpfel exprimiert. (C) Der Antikörper färbt das Außensegment, das Innensegment und das Soma der S-Zäpfel an. (A) Blue Opsin. (B) OPN1SW. (C) Opsin JH 455. OS: Außensegmente; ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht. Maßstabsbalken 20  $\mu\text{m}$ .

Auch die Stäbchen lassen sich durch ihr Opsin darstellen (Abbildung 3.5 A). Hier ist das Rhodopsin zwar deutlich in den Außensegmenten lokalisiert, aber zusätzlich noch etwas schwächer in den Innensegmenten und den Somata der Zellkerne.

Als weitere Photorezeptormarker können die Transducine dieser Zellen herangezogen werden. Das  $G\alpha_{t1}$  ist das Transducin der Stäbchen und wird ähnlich dem Rhodopsin in diesen Zellen exprimiert (Abbildung 3.5 B).  $G\alpha_{t2}$  ist das Transducin der Zapfen und wird ebenfalls im gesamten Zapfen exprimiert, wobei es vermehrt in den Außensegmenten zu finden ist (Abbildung 3.5 D). Für die Zapfen steht noch ein weiterer Marker zur Verfügung. Es handelt sich dabei um Peanut-Agglutinin (PNA). Dieses Isolectin markiert die Zapfenmatrix sowie die Zapfenendfüßchen (Abbildung 3.5 C). Bei der Zapfenmatrix handelt es sich um die extrazelluläre Interphotorezeptormatrix der Zapfen, welche sich von den Innensegmenten bis zur Spitze des retinalen Pigmentepithels erstreckt (Long & Aguirre 1991)

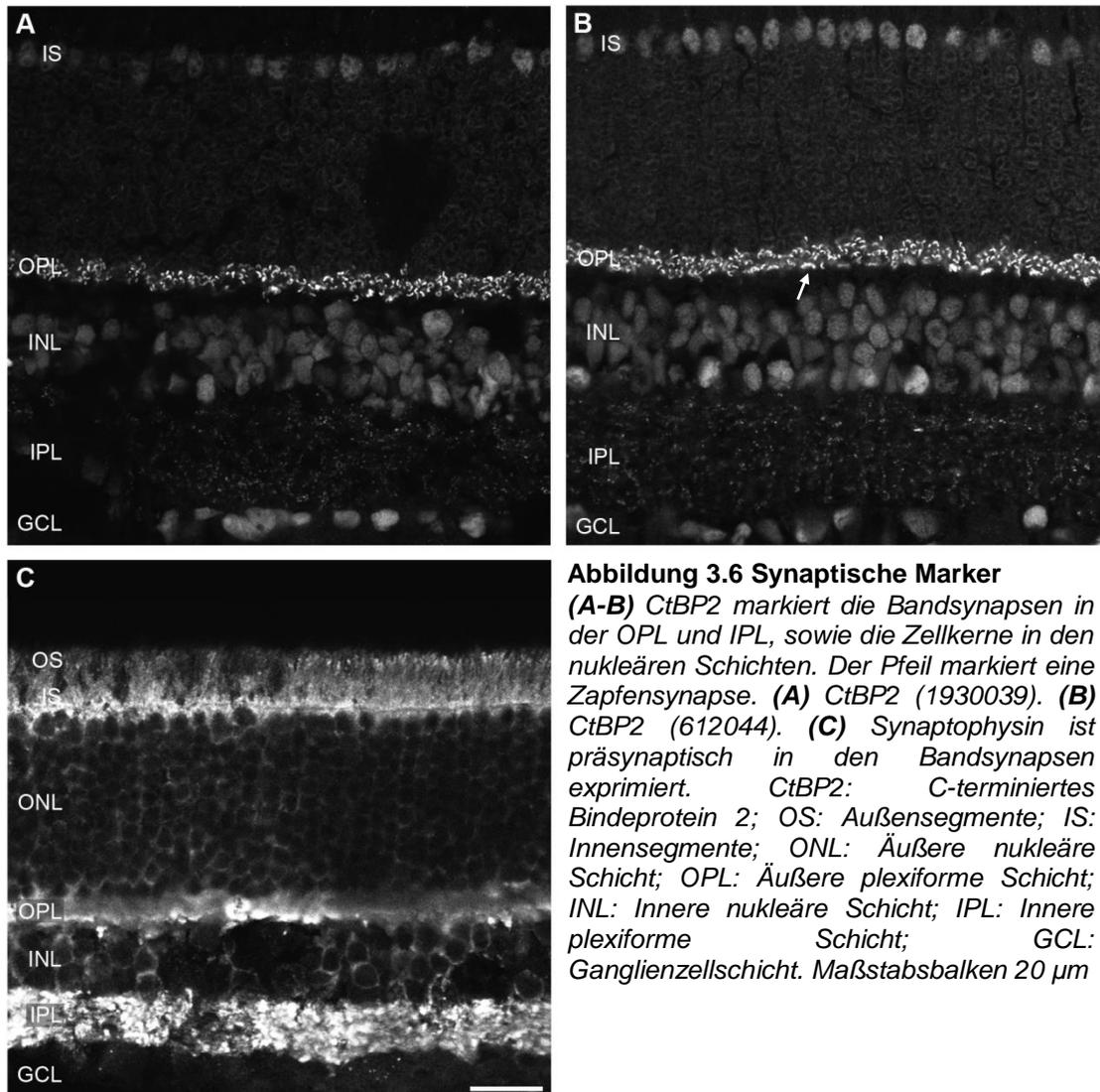


**Abbildung 3.5 Weitere Photorezeptorenmarker**

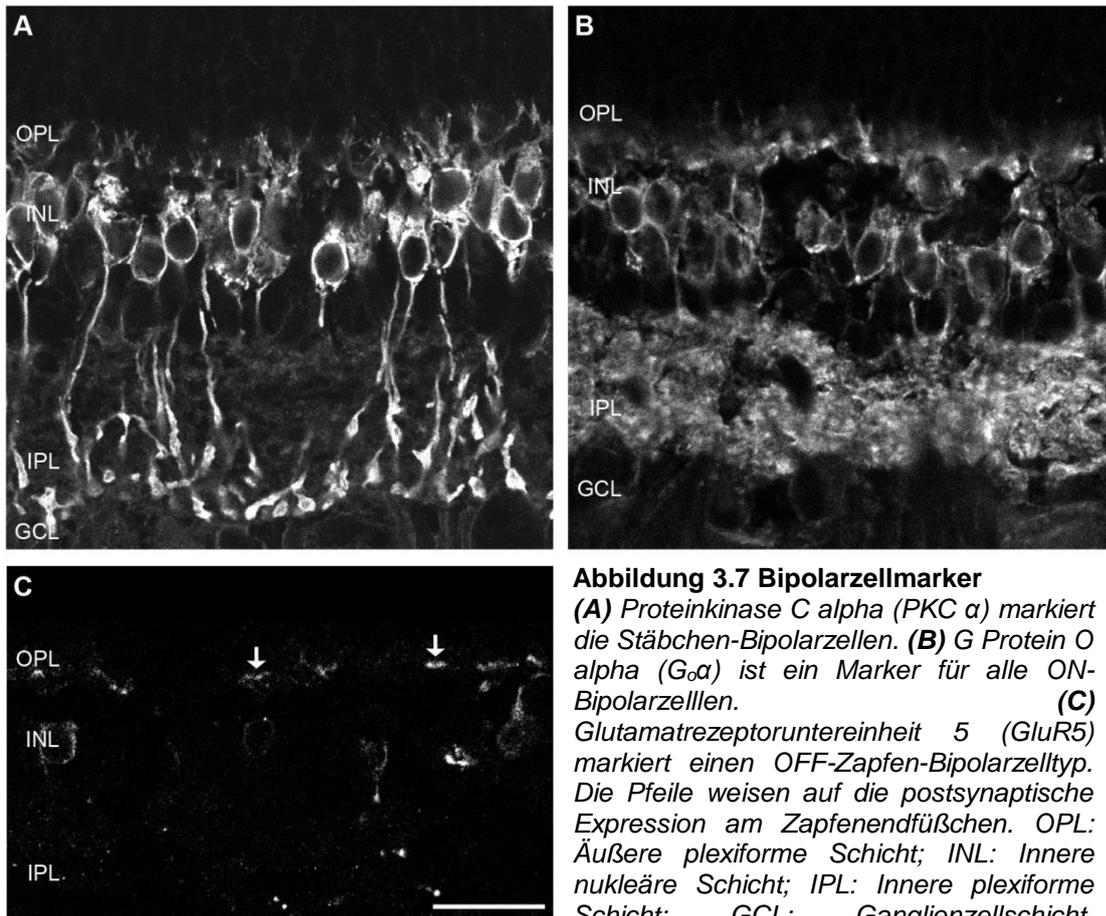
(A) Rhodopsin ist in den Stäbchen exprimiert. Es färben sich die Außensegmente, Innensegmente und die Somata der Zellkerne an. (B)  $G\alpha_{11}$  ist das Transducin der Stäbchen und ist im gesamten Photorezeptor enthalten. (C) Peanut-Agglutinin färbt die Zapfenmatrix und die Zapfenendfüßchen (Pfeile) an. (D)  $G\alpha_{12}$  ist das Transducin der Zapfen und ist im gesamten Photorezeptor enthalten. OS: Außensegmente; IS: Innensegmente; ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL Äußere plexiforme Schicht. Maßstabsbalken 20  $\mu\text{m}$ .

Um die Verbindungen der Photorezeptoren mit den nachgeschalteten Zellen (Bipolar- und Horizontalzellen) untersuchen zu können, wurden Marker der Synapsen getestet. Ein einzigartiger Bestandteil der Synapsen in der Retina ist das Synapsenband, welches sich präsynaptisch befindet. Ein Protein dieses Bandes ist das C-terminierte Bindeprotein 2 (CtBP2), dessen Anfärbung in Abbildung 3.6 A und B zu sehen ist. Die Synapsen der Stäbchen in der OPL sind zahlreich und stellen sich als hufeisenförmige Strukturen dar. Die Zapfensynapsen sind eher rar und befinden sich als flache Bänder (Pfeil 3.6 B) an der Basis der OPL. CtBP2 wird auch in den Bandsynapsen der Bipolarzellen in der IPL exprimiert sowie als Transkriptionsfaktor in den Zellkernen der

ONL und INL. Als weiterer synaptischer Marker wurde Synaptophysin positiv getestet (3.6 C), welches präsynaptisch in den Photorezeptor- und Bipolarzellterminalien (OPL und IPL) exprimiert wird. Zusätzlich markiert es auch die Außensegmente der Photorezeptoren.



Die Bipolarzellen gliedern sich in Stäbchen- und Zapfenbipolarzellen. Die Stäbchenbipolarzellen lassen sich mit Proteinkinase C alpha (PKC  $\alpha$ ) anfärben (Abbildung 3.7 A). Stäbchenbipolarzellen sind ON-Bipolarzellen und lassen sich somit ebenfalls mit dem ON-Bipolarzellmarker G Protein O alpha ( $G_{\alpha o}$ ) markieren.  $G_{\alpha o}$  färbt jedoch auch die Zapfen-ON-Bipolarzellen (Abbildung 3.7 B). Eine Gruppe von Zapfen-OFF-Bipolarzellen exprimiert die Glutamatrezeptoruntereinheit 5 (GluR5) (Abbildung 3.7 C). Mit GluR5 ist sowohl eine Darstellung des postsynaptischen Elements der Bandsynapse (Pfeil) möglich als auch die Anfärbung der Somata dieses OFF-Zapfenbipolarzelltyps.

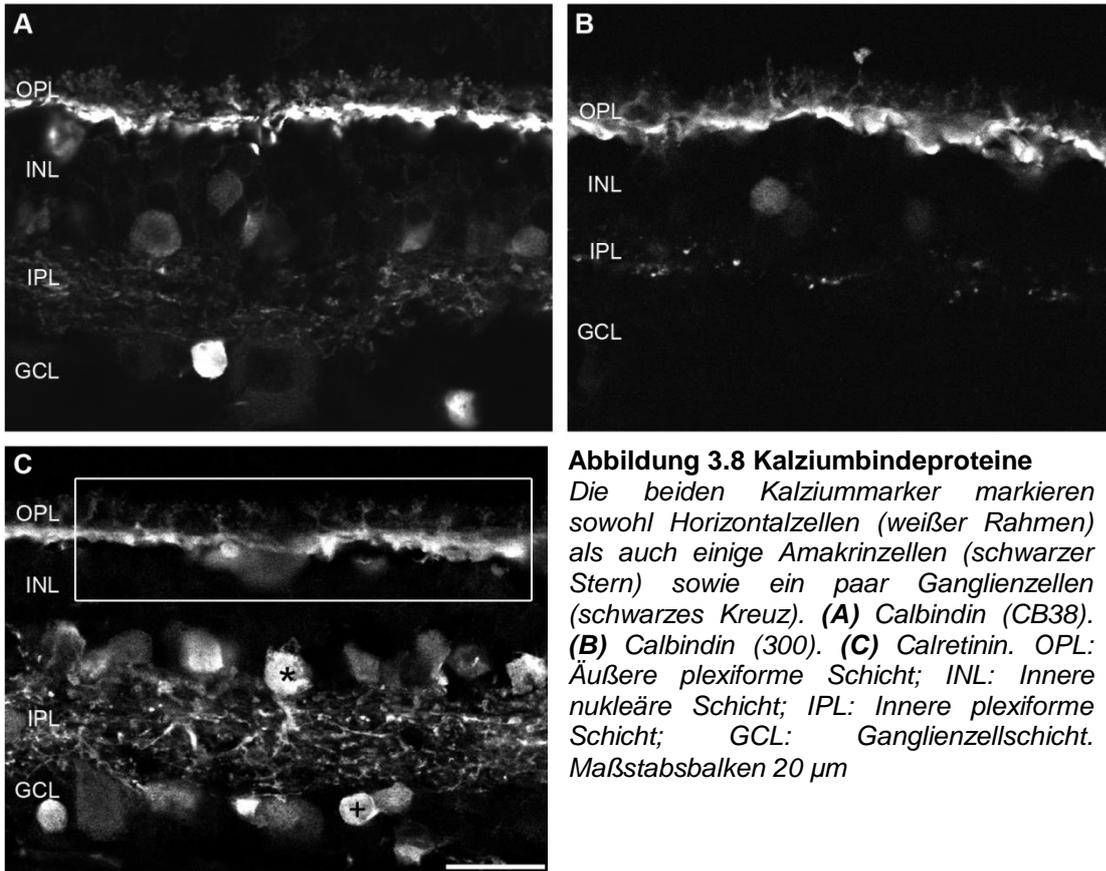


**Abbildung 3.7 Bipolarzellmarker**

(A) *Proteinkinase C alpha (PKC  $\alpha$ )* markiert die Stäbchen-Bipolarzellen. (B) *G Protein O alpha ( $G_{\alpha}$ )* ist ein Marker für alle ON-Bipolarzellen.

(C) *Glutamatrezeptoruntereinheit 5 (GluR5)* markiert einen OFF-Zapfen-Bipolarzelltyp. Die Pfeile weisen auf die postsynaptische Expression am Zapfenendfüßchen. OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht; IPL: Innere plexiforme Schicht; GCL: Ganglienzellschicht. Maßstabsbalken 20  $\mu$ m.

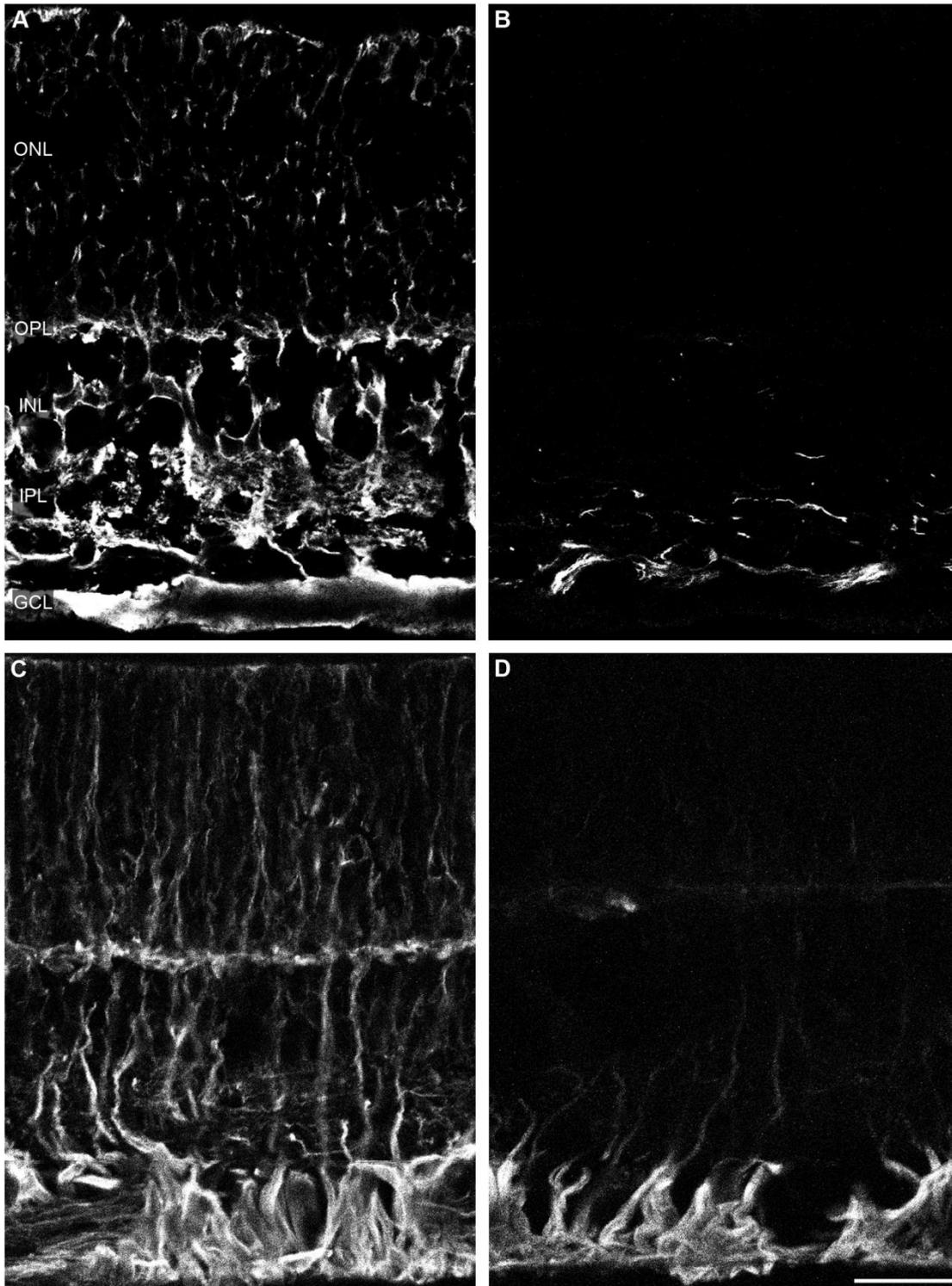
Zur weiteren Markierung der Retina stehen verschiedene Kalziumbindepoteine zur Verfügung (Abbildung 3.8). Die hier Getesteten sind Calbindin und Calretinin. Sie werden in Horizontalzellen, in einigen Amakrinzellen und wenigen Ganglienzellen exprimiert. Das Expressionsmuster dieser Proteine ist sehr ähnlich, deshalb wurde für weitere Untersuchungen nur Calbindin eingesetzt.



**Abbildung 3.8 Kalziumbindeproteine**

Die beiden Kalziummarker markieren sowohl Horizontalzellen (weißer Rahmen) als auch einige Amakrinzellen (schwarzer Stern) sowie ein paar Ganglienzellen (schwarzes Kreuz). **(A)** Calbindin (CB38). **(B)** Calbindin (300). **(C)** Calretinin. OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht; IPL: Innere plexiforme Schicht; GCL: Ganglienzellschicht. Maßstabsbalken 20  $\mu\text{m}$

Die Gliazellen der Retina lassen sich vor allem über die Gliafilamentproteine Vimentin und *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) markieren. GFAP wird sowohl basal in den Müllerzellen, als auch in den Astrozyten exprimiert (Abbildung 3.9 B). Vimentin hingegen findet sich nur in den Müllerzellen (Abbildung 3.9 C und D). Als weiterer Marker für die Müllerzelle steht Glutamin-Synthetase (GS) zur Verfügung. Dieses Protein wird in der gesamten Müllerzelle exprimiert und färbt somit einen großen Teil der Retina an (Abbildung 3.9 A).



**Abbildung 3.9 Müllerzellmarker**

**(A)** Glutamin-Synthetase ist in der kompletten Müllerzelle exprimiert. **(B)** Glia Filament Acid Protein ist basal in den Müllerzellen lokalisiert und in den Astrozyten. **(C/D)** Vimentin ist ebenfalls ein Filamentprotein und in den Müllerzellen lokalisiert. Der Vimentinantikörper (5741) **(C)** färbt aber mehr von der Müllerzelle an als der Vimentinantikörper (ab8089) **(D)**. ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht; IPL: Innere plexiforme Schicht; GCL: Ganglienzellschicht. Maßstabsbalken 20  $\mu$ m.

## 3.2 Vergleichende Analysen von Wildtyp- und *RPE65<sup>-/-</sup>*-Hunden im jungen adulten Alter

Für die Analysen in diesem Abschnitt wurden zwei Wildtyptiere im Alter von 18 Monaten (A2 und A3) mit erkrankten Tieren im Alter zwischen 24 und 30 Monaten (B1-B6) verglichen. Für weitere Details zu den Tieren siehe Tabelle 2.1.

### 3.2.1 Photorezeptoren

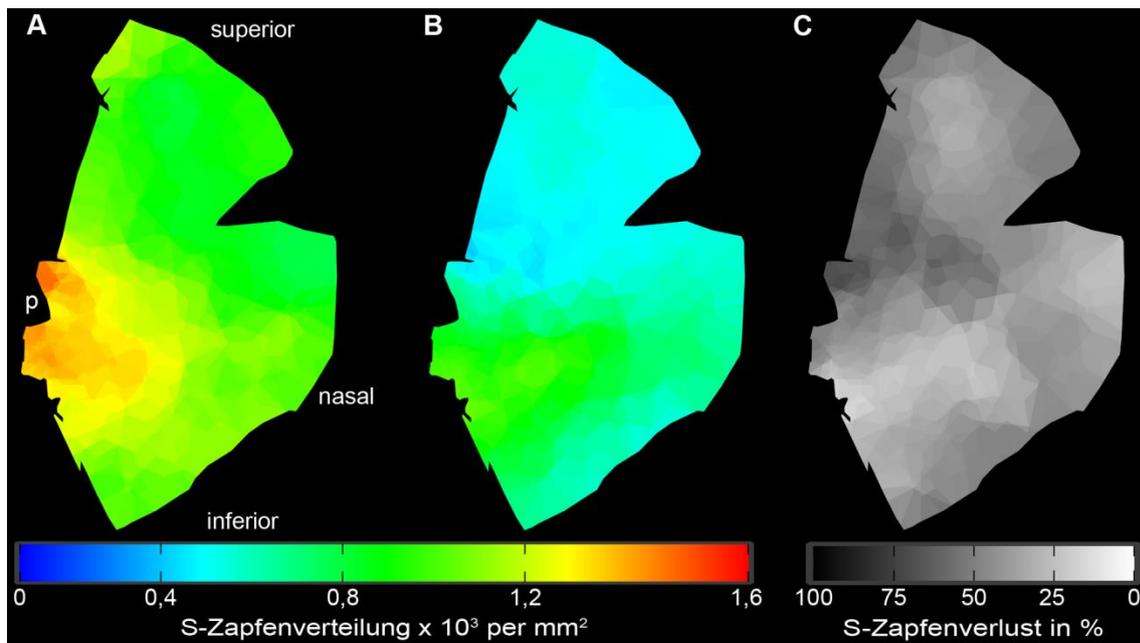
Die Zapfen wurden auf zwei unterschiedliche Weisen betrachtet. Zum einem wurde die Verteilung der Zellen im Flachpräparat analysiert (Abbildung 3.10 und 3.11) und zum anderen die Morphologie der Zellen im Vertikalschnitt beurteilt (Abbildung 3.13). Des Weiteren wurde eine quantitative Analyse der Zapfenverteilung durchgeführt (Abbildung 3.12). Bei den Stäbchen erfolgte nur eine Untersuchung des Opsins im Vertikalschnitt (Abbildung 3.14).

#### 3.2.1.1 Zapfenverteilung

Die Heatmaps der Wildtyptiere sind eine Mittelwertdarstellung der zwei untersuchten Tiere (Abbildung 3.10 A und 3.11 A). Die Zapfendichte in der normalen Hunderetina weist einen abfallenden Gradienten von zentral nach peripher hin auf. Die S-Zapfendichte liegt in der gesunden Retina zwischen 616 und 1526 Zapfen pro  $\text{mm}^2$  (Abbildung 3.10 A). Die L/M-Zapfendichte ist etwa zehnfach höher und liegt im Bereich zwischen 6567 und 18935 Zapfen pro  $\text{mm}^2$  (Abbildung 3.11 A). Die Darstellung der Werte für die einzelnen Tiere befindet sich in den Zusatzabbildung 1 und 2 im Anhang. Die leichte Abweichung der Zahlen der beiden Tiere ist durch den natürlich vorkommenden individuellen Unterschied zu erklären.

Bei den dargestellten Heatmaps handelt es sich um eine Mittelwertdarstellung der Werte von den vier untersuchten betroffenen Tieren (Abbildung 3.10 B und 3.11 B). In der *RPE65<sup>-/-</sup>* Retina zeigt sich ein Zellverlust in beiden Zapfentypen. Die S-Zapfendichte (Abbildung 3.10 B) liegt hier in einem Bereich von 292-969 Zapfen pro  $\text{mm}^2$  und die L/M-Zapfendichte (Abbildung 3.11 B) in einem Bereich von 2737-5928 Zapfen pro  $\text{mm}^2$ . Die S-Zapfen zeigen den größten Verlust im superioren Bereich (Abbildung 3.10 C). Im inferioren Bereich ist der Verlust geringer. Die L/M-Zapfen hingegen zeigen eine gleichmäßige Abnahme über die gesamte Retina (Abbildung 3.11 C). Die Darstellung der einzelnen Tiere befindet sich in der Zusatzabbildung 3 und 4. Hier ist zu erkennen, dass die Tiere individuelle Unterschiede im Verlust ihrer Zapfen

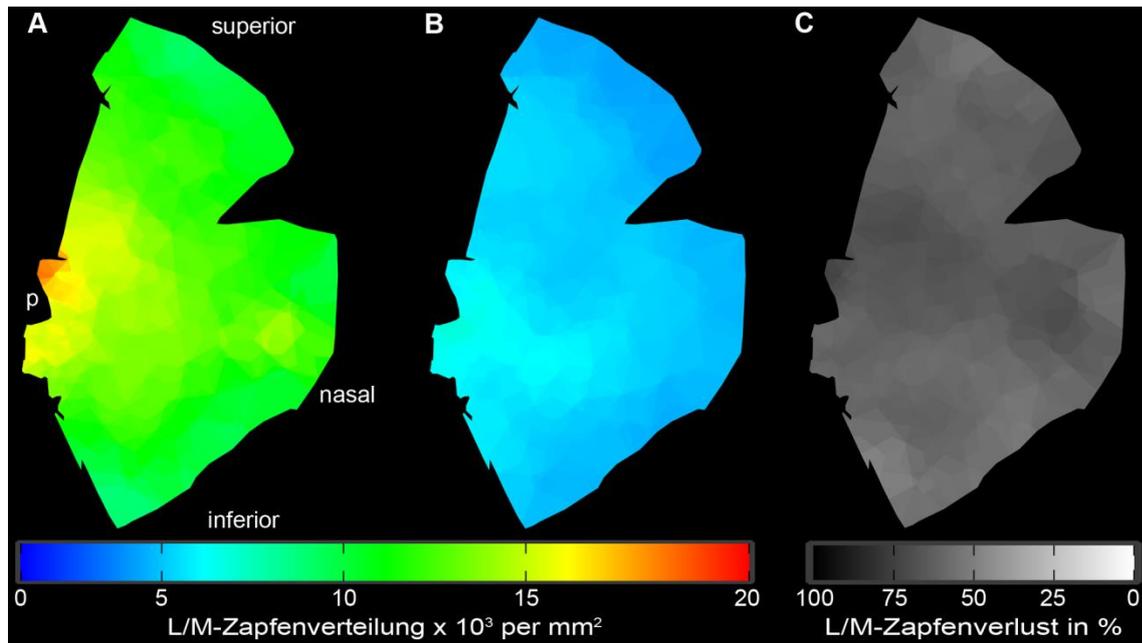
zeigen. Dies lässt sich durch einen unterschiedlich schnellen Verlauf der Erkrankung erklären.



**Abbildung 3.10 Heatmapdarstellung der S-Zapfenverteilung**

**(A)** Mittelwertgrafik der S-Zapfendichte [ $\text{mm}^2$ ] der zwei Wildtyptiere. **(B)** Mittelwertgrafik der S-Zapfendichte [ $\text{mm}^2$ ] der vier untersuchten RPE65<sup>-/-</sup> Tiere. **(C)** Verlustdarstellung von (B) im Vergleich zu (A) in %. Im gesunden Hund nimmt die S-Zapfendichte zur Peripherie hin ab. Im erkrankten Tier ist die höchste Zelldichte im zentralen inferioren Bereich zu sehen. Der größte Zellverlust (dunkle Bereiche in C) findet somit im zentralen superioren Bereich statt. P: Papille. Modifiziert nach (Klein et al. 2014).

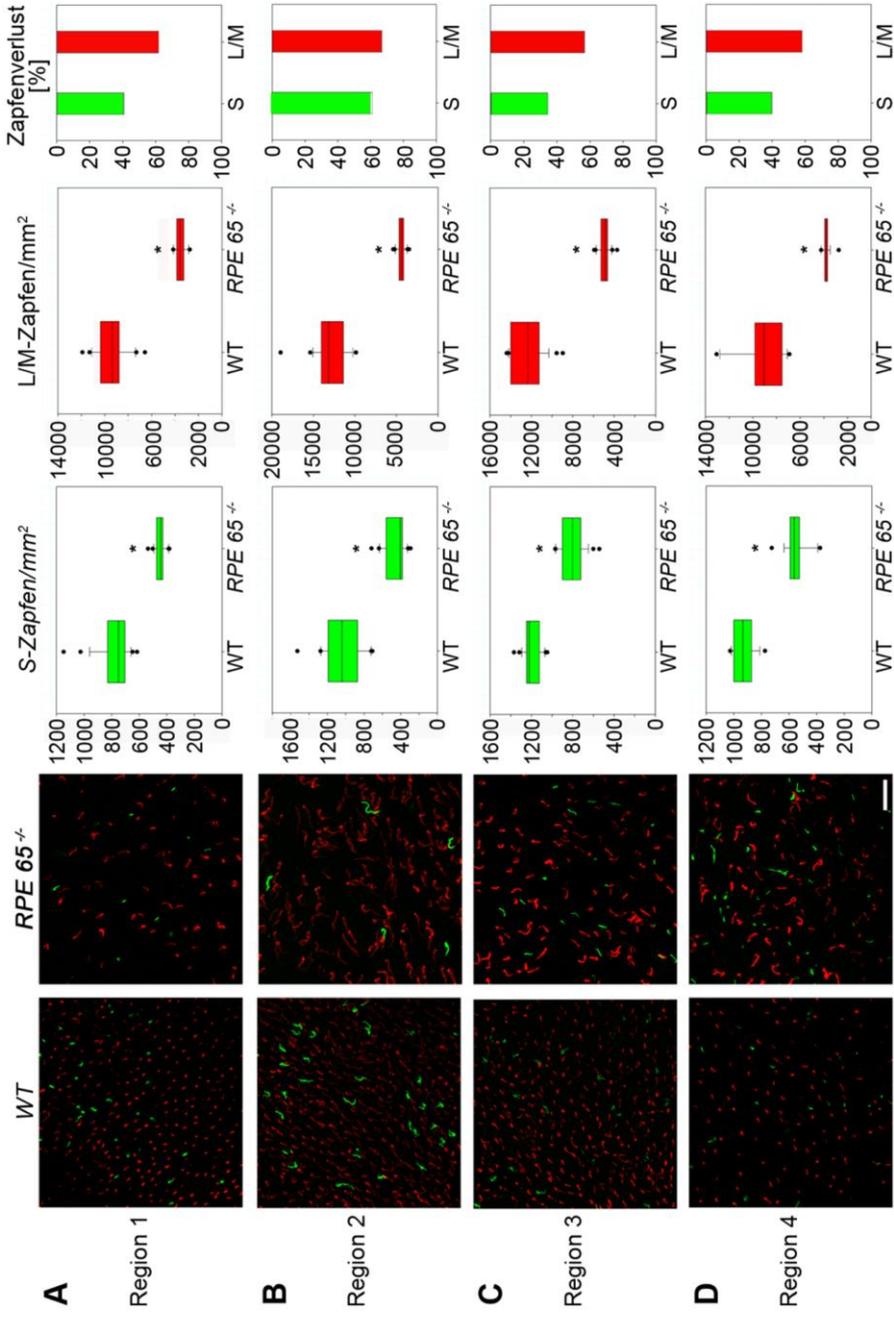
Die Abnahme der Zapfen wurde ebenfalls quantitativ analysiert. Hierzu wurde der untersuchte Retinateil in vier Regionen unterteilt (siehe Abbildung 2.1) und anschließend die Datensätze der erkrankten Tiere gemittelt und mit den gemittelten Datensätzen der gesunden Tiere verglichen (Abbildung 3.12). Die Boxplots in der Mitte der Abbildung 3.12 zeigen die Variation der Zapfendichte in den vier analysierten Regionen. Die grünen Boxplots stehen für die S-Zapfen und die roten Boxplots für die L/M-Zapfen. Es zeigte sich, dass bei beiden Zelltypen in jeder Region ein statistisch signifikanter Unterschied (\*,  $p = < 0,001$ ) zwischen den Wildtypdaten und denen der betroffenen Tiere besteht. Mit Hilfe von Balkendiagrammen wurde der mediane Verlust der RPE65<sup>-/-</sup> Hunde gegenüber den gesunden Tieren dargestellt (Abbildung 3.12 rechts). Auch hier stehen die grünen Diagramme für die S-Zapfen und die Roten für die L/M-Zapfen. Der größte Verlust in beiden Zapfentypen (S-Zapfen 59,2%, L/M-Zapfen 58,6 %) hat im superioren zentralen Bereich (Region 2) stattgefunden. Der geringste Zapfenverlust (S-Zapfen 36,5%, L/M-Zapfen 43,1%) findet sich in der Region 4.



**Abbildung 3.11 Heatmapdarstellung der L/M-Zapfenverteilung**

**(A)** Mittelwertgrafik der L/M-Zapfendichte [ $mm^2$ ] der zwei Wildtyptiere. **(B)** Mittelwertgrafik der L/M-Zapfendichte [ $mm^2$ ] der vier untersuchten RPE65<sup>-/-</sup> Tiere. **(C)** Verlustdarstellung von (B) im Vergleich zu (A) in %. Im gesunden Hund und erkrankten Tier nimmt die L/M-Zapfendichte zur Peripherie hin ab. Es findet somit ein recht einheitlicher L/M-Zapfenverlust über die Retina statt. P: Papille. Modifiziert nach (Klein et al. 2014).

Abbildung 3.12 zeigt auf der linken Seite eine Übersicht über das Aussehen der Zellen innerhalb der vier Regionen im Flachpräparat. Auch hier sieht man eine deutliche Veränderung der Zellen. Die Zapfen stellen sich in den betroffenen Tieren als länger ausgeprägte Strukturen dar und ihre Anzahl ist bereits auf den ersten Blick vermindert. Der individuelle Verlust der einzelnen untersuchten Tiere ist in der Zusatzabbildung 5 in Form von Boxplots dargestellt. Hier sieht man, dass der mediane Verlust in drei Regionen für die L/M-Zapfen (rot) der vier betroffenen Tiere gleich ist. Lediglich in Region 2 weicht ein Tier von den drei übrigen ab. Bei den S-Zapfen (grün) hingegen sind in allen vier Regionen für alle vier Tiere individuelle Schwankungen bei der Abnahme der Zellen zu verzeichnen.



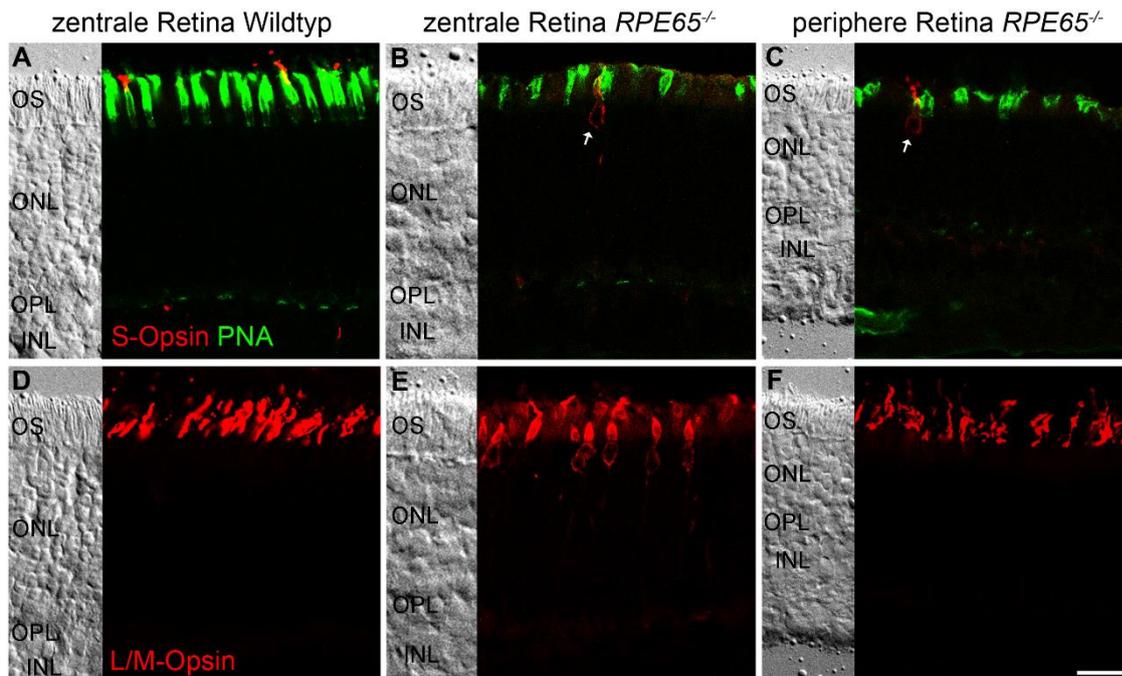
**Abbildung 3.12 Quantitative Analyse der Zapfenverteilung**

(A-D) S-Zapfen (grün) und L/M-Zapfen (rot) Verteilung und Quantifizierung in gesunden und erkrankten Hunden. Die Boxplots zeigen die Verteilung der S- und L/M-Zapfen in den vier definierten Regionen aus Abbildung 2.1. Für die statistische Auswertung wurde der Mann Whitney U-Test verwendet und die signifikanten Unterschiede mit einem \* markiert ( $p < 0,001$ ). Die Balkendiagramme zeigen den prozentualen medianen Verlust bei den betroffenen Tieren im Vergleich zum Wildtyp. Beide Zapfentypen zeigen in allen vier Regionen einen signifikanten Verlust. Die L/M-Zapfen weisen zusätzlich eine Veränderung in ihrer Struktur bei den betroffenen Tieren auf. Sie sehen wurmartig aus. WT: Wildtyp. Maßstabsbalken 25  $\mu\text{m}$ . Modifiziert nach (Klein et al. 2014).

### 3.2.1.2 Opsinlokalisierung

In Abbildung 3.13 sind die beiden Zapfentypen im Querschnitt dargestellt. Abbildung 3.13 A-C zeigt die S-Zapfen in einer Doppelfärbung mit PNA. Die Abbildung 3.13 A zeigt die Situation im Wildtyptier im zentralen Bereich der Retina. Hier ist das S-Opsin nur in den Außensegmenten zu finden. Durch das PNA lässt sich ebenfalls die Struktur der Zapfen beurteilen. In A sind die Zapfen gleichmäßig und ordentlich angeordnet und die Zapfenendfüßchen sind ebenfalls sichtbar. Abbildung 3.13 B zeigt die S-Zapfen im zentralen Retinabereich im betroffenen Tier. Hier ist zu sehen, dass das S-Opsin nicht nur im Außensegment lokalisiert ist, sondern auch im Innensegment und im Zellkern zu finden ist. Die gleiche Situation findet sich auch in Abbildung 3.13 C. Hierbei handelt es sich um die Peripherie der betroffenen Retina. Die Struktur der Zapfen ist im betroffenen Tier ebenfalls verändert. Die Zapfen wirken verwaschen und kugelig als im Wildtyptier.

In Abbildung 3.13 D-F sind die L/M-Zapfen mittels des Antikörpers L/M-Opsin angefärbt. Abbildung 3.13 D zeigt die Situation in der Wildtypretina. Hier ist das L/M-Opsin regulär nur in den Außensegmenten lokalisiert. In E der Abbildung 3.13 ist der zentrale Retinabereich bei einem betroffenen Tier dargestellt. Das L/M-Opsin befindet sich sowohl in den Außensegmenten als auch im restlichen Photorezeptor, bis hin zu den Endfüßchen. In der Peripherie hingegen (Abbildung 3.13 F) zeigt sich, dass das L/M-Opsin normal in den Außensegmenten exprimiert wird.

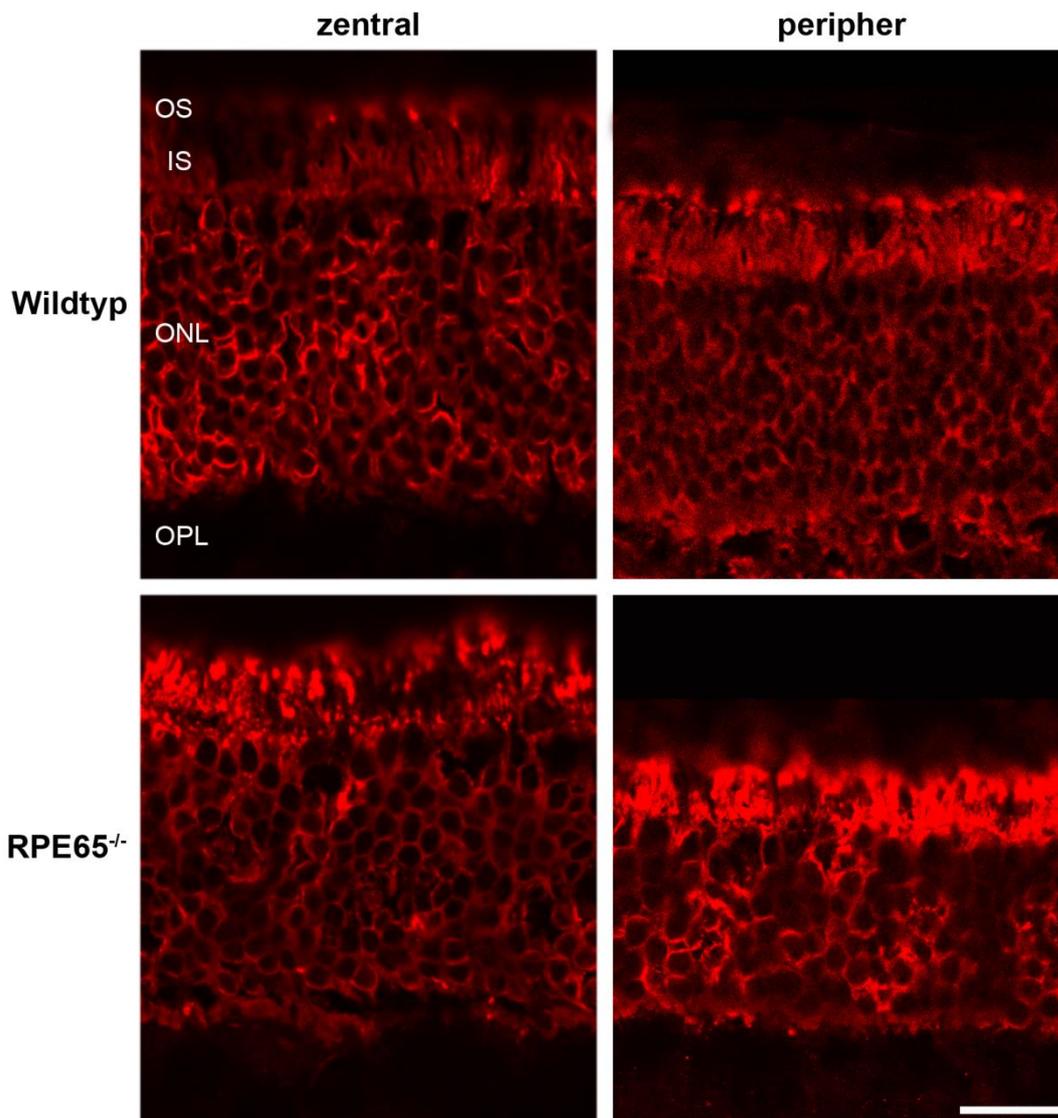


**Abbildung 3.13 Zapfenopsine im Vergleich im Alter von zwei Jahren**

(A-C) S-Opsin (rot) und PNA (grün). (A) Das S-Opsin ist nur in den Außensegmenten lokalisiert und PNA färbt die Zapfenmatrix sowie die Zapfenendfüßchen. (B/C) Das S-Opsin befindet sich sowohl im Außensegment als auch im Innensegment und im Zellkern. Die Zapfenmatrix ist in ihrer Struktur verändert. (D-F) L/M-Opsin. (D) Das Opsin ist nur in den Außensegmenten zu finden. (E) Das Opsin ist im gesamten Zapfen zu sehen. (F) Das Opsin ist in den Außensegmenten lokalisiert. OS: Außensegmente; ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht. Maßstabsbalken 20  $\mu$ m.

Die Stäbchen werden mit Hilfe ihres Opsins Rhodopsin dargestellt (Abbildung 3.14). Zentral sind keine deutlichen Unterschiede zwischen der Wildtypretina und der Retina eines betroffenen Tieres zu erkennen (Abbildung 3.14 A und C). In der Peripherie ist die ONL-Schichtdicke im *RPE65*<sup>-/-</sup> Hund reduziert (Abbildung 3.14 B).

Die Lokalisation der Opsine in den Stäbchen und Zapfen wurde sowohl superior als auch inferior untersucht. Hierbei konnten keine Unterschiede im Expressionsmuster der Opsine zwischen superior und inferior festgestellt werden, dementsprechend sind hier nur jeweils zwei Regionen aus der superioren Retina pro Färbung graphisch dargestellt (Abbildung 3.13 und 3.14).



**Abbildung 3.14 Rhodopsin im Alter von zwei Jahren im Vergleich**

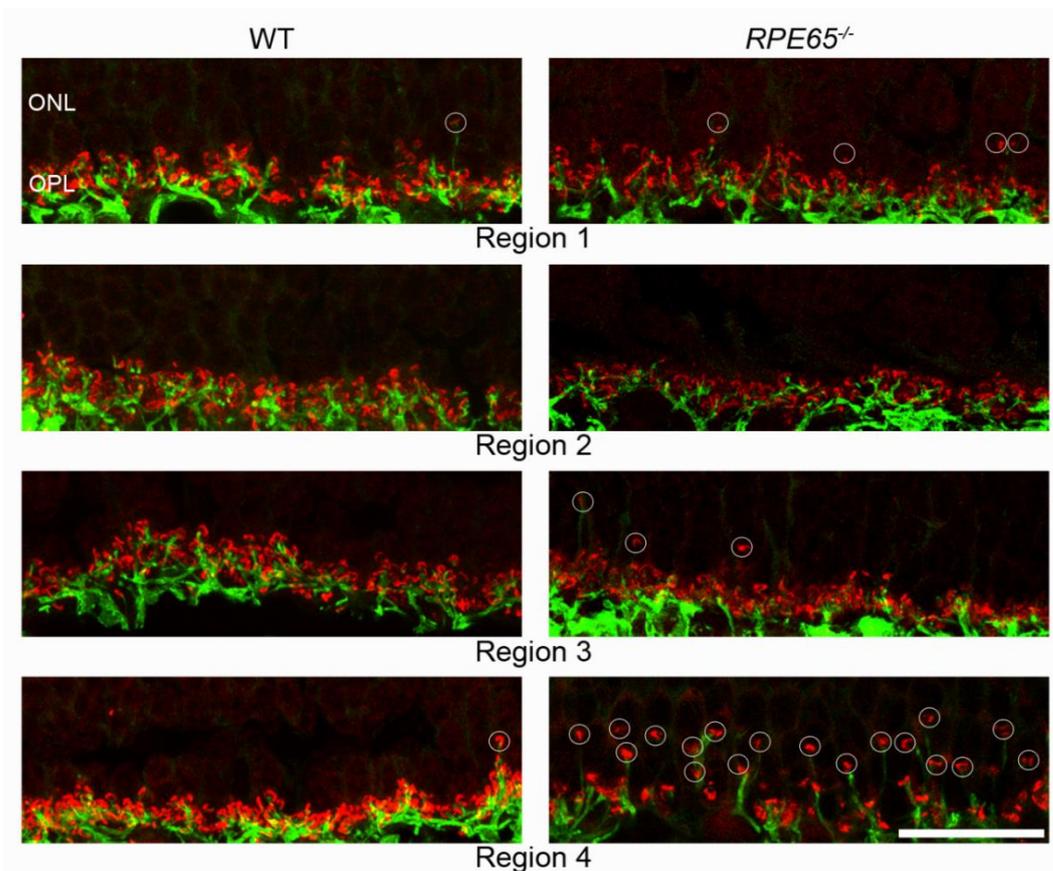
Das Rhodopsin wird sowohl in den Außensegmenten als auch in den Somata der Stäbchen angefärbt. Im zentralen Bereich besteht kein Unterschied zwischen der gesunden und betroffenen Retina. In der Peripherie ist die ONL-Schichtdicke im betroffenen Tier im Vergleich zum Wildtyp tier vermindert. OS: Außensegmente; IS: Innensegmente; ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht. Maßstabsbalken 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.2 Synaptische Verbindungen in der OPL

Um die Erhaltung der retinalen Struktur besser beurteilen zu können, wurde eine quantitative Analyse der synaptischen Verbindungen der Stäbchen in der äußeren plexiformen Schicht durchgeführt. Hierfür wurden die Photorezeptoren präsynaptisch angefärbt und die nachgeschalteten Stäbchenbipolarzellen (Abbildung 3.15) sowie Horizontalzellen (Abbildung 3.16) gegengefärbt. Ausgewertet wurde das Auftreten von delokalisierten Synapsen außerhalb der äußeren plexiformen Schicht. Dieses Phänomen wird *sprouting* genannt. Es wurden zwei Wildtyp Tiere mit vier betroffenen

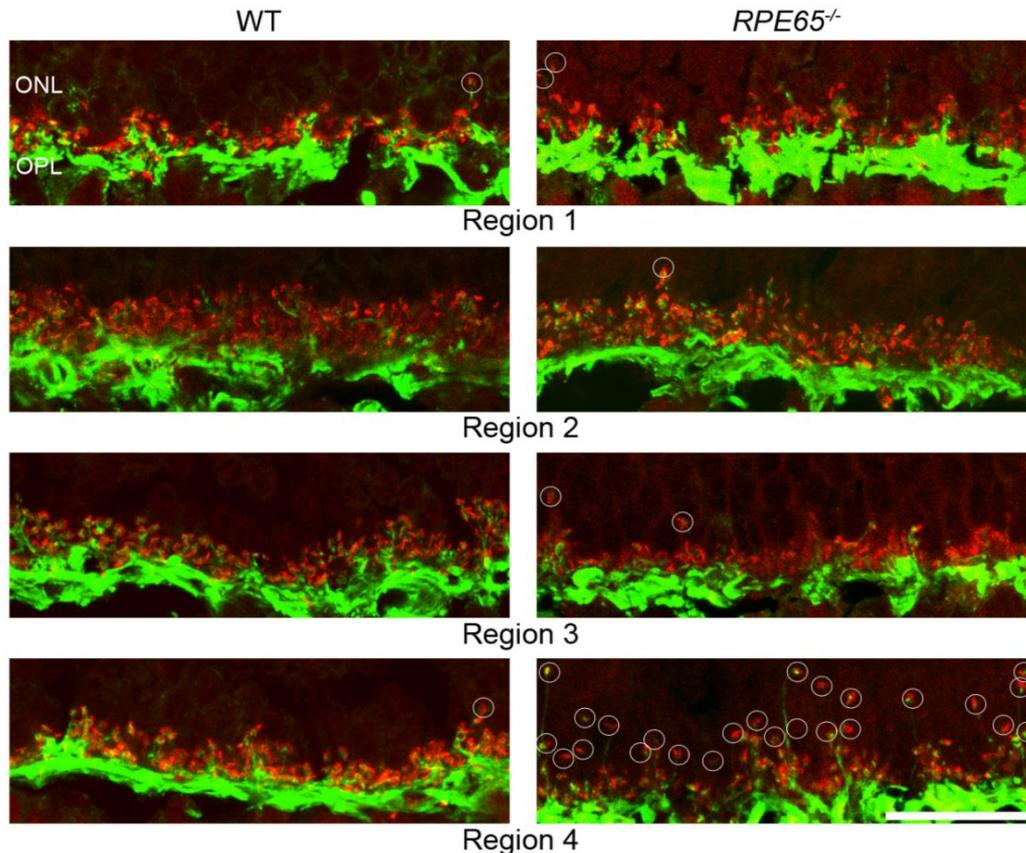
Tieren in jeweils vier Regionen verglichen (Abbildung 3.17). Die Einteilung der Regionen ist in Abbildung 2.1 gezeigt.

Eine Darstellung des Sproutingphänomens sowie ein Aufzeigen der ausgewerteten Bilder findet sich in Abbildung 3.15 und 3.16. Die meisten delokalisierten Synapsen, sogenannte *sprouting events*, findet man bei den betroffenen Tieren in Region 4. Dieses Phänomen findet sich zwar auch im Wildtyp, wobei es hier nicht so zahlreich auftritt. Im zentralen Bereich der Retina (Region 2 und 3) sind nur sehr wenige *sprouting events* sowohl im Wildtyptier als auch im mutierten Tier zu finden. Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Stäbchenterminalien und die nachgeschalteten Zellen (Bipolar- und Horizontalzellen) immer zusammen ihre normale Position verlassen.



### Abbildung 3.15 Synapsenanalyse Stäbchenbipolarzellen

Die Stäbchenbipolarzellen sind mittels PKC  $\alpha$  (grün) und die Bandsynapsen mittels CtBP2 (rot) angefärbt. Die linke Spalte zeigt die Wildtypretina in den vier Regionen. Hier sind nur wenige delokalisierte Bandsynapsen mit invaginierenden Bipolarzellen zu sehen (weißer Kreis). Die rechte Spalte zeigt die RPE65<sup>-/-</sup> Retina in den vier Regionen. Hier treten zahlreiche delokalisierte Bandsynapsen und Stäbchenbipolarzellfortsätze innerhalb der ONL auf (weiße Kreise). WT: Wildtyp; ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht. Maßstabsbalken 20  $\mu$ m. Modifiziert nach (Klein et al. 2014).

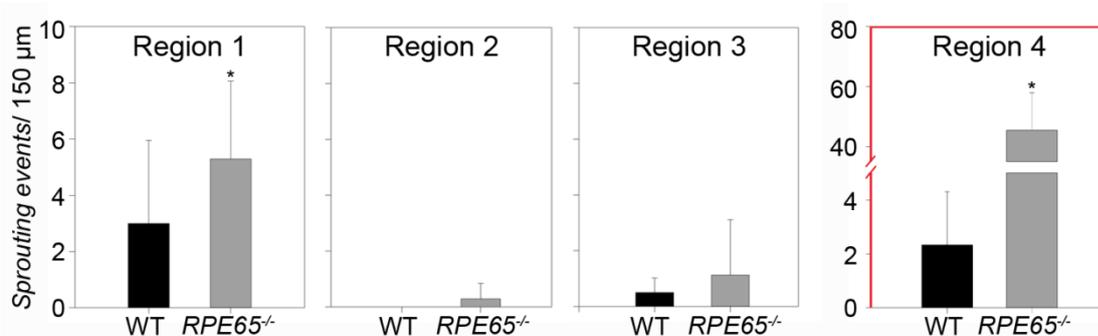


### Abbildung 3.16 Synapsenanalyse Horizontalzellen

Die Horizontalzellen sind hier mit Calbindin in grün angefärbt und die Bandsynapsen mit CtBP2 in rot. Die linke Spalte zeigt die Wildtypretina in den vier Regionen. Hier sind nur wenige delokalisierte Bandsynapsen mit invaginierenden Horizontalzellen zusehen (weißer Kreis). Die rechte Spalte zeigt die RPE65<sup>-/-</sup> Retina in den vier Regionen. Hier treten deutlich mehr delokalisierte Bandsynapsen sowie Horizontalzellfortsätze in der ONL auf (weiße Kreise). WT: Wildtyp; ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht. Maßstabsbalken 20 µm. Modifiziert nach (Klein et al. 2014).

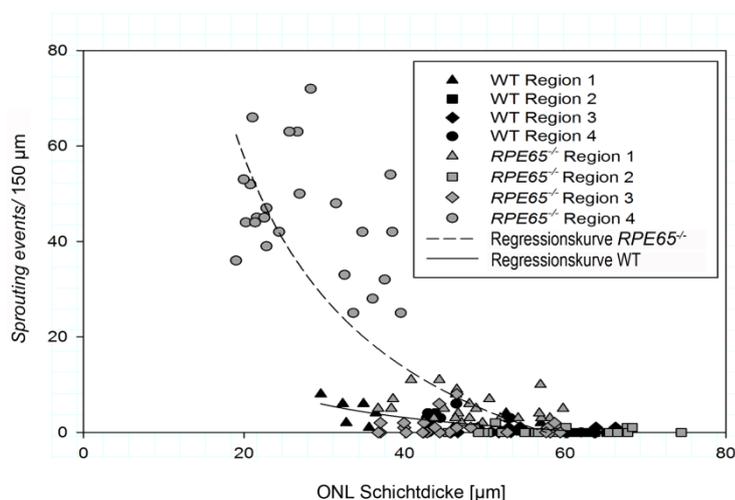
Im Vergleich mit den Wildtyptieren ist die Anzahl der auftretenden *sprouting events* bei den betroffenen Tieren in der Peripherie statistisch signifikant erhöht (Abbildung 3.17). In der Region 1 liegt der p-Wert bei 0,029 und in der Region 4 bei < 0,001, somit ist der Unterschied in Region 4 höher aber in beiden Regionen deutlich.

Um zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen der ONL-Schichtdicke und dem Auftreten des Sproutingphänomens gibt, wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 3.18 in Form eines Scatterplots mit entsprechenden Regressionskurven dargestellt. Sowohl im gesunden als auch im erkrankten Tier besteht eine Beziehung zwischen der ONL-Schichtdicke und der Anzahl der auftretenden *sprouting events*. Je dünner die ONL wird, desto mehr *sprouting events* treten auf. Dieses Phänomen ist im erkrankten Tier stärker ausgeprägt als im Wildtyptier.



**Abbildung 3.17 Balkendiagramm zur Synapsenanalyse**

Die schwarzen Balken zeigen die auftretenden sprouting events pro 150 µm in der Wildtypretina ( $n=12$  Bilder pro Region aus zwei Tieren). Zentral ist dieses Phänomen so gut wie nicht vorhanden. In der Peripherie hingegen tritt eine geringe Anzahl an sprouts auf. Die grauen Balken zeigen die auftretenden sprouting events pro 150 µm in der RPE65<sup>-/-</sup> Retina ( $n=24$  Bilder pro Region aus vier Tieren). Zentral sind nur wenige sprouting events zu sehen. In der Peripherie tritt das sprouting deutlich häufiger auf und der Unterschied zum Wildtyp ist signifikant (Region 1  $p=0,029$ , Region 4  $p<0,001$ ). WT: Wildtyp. Modifiziert nach (Klein et al. 2014).



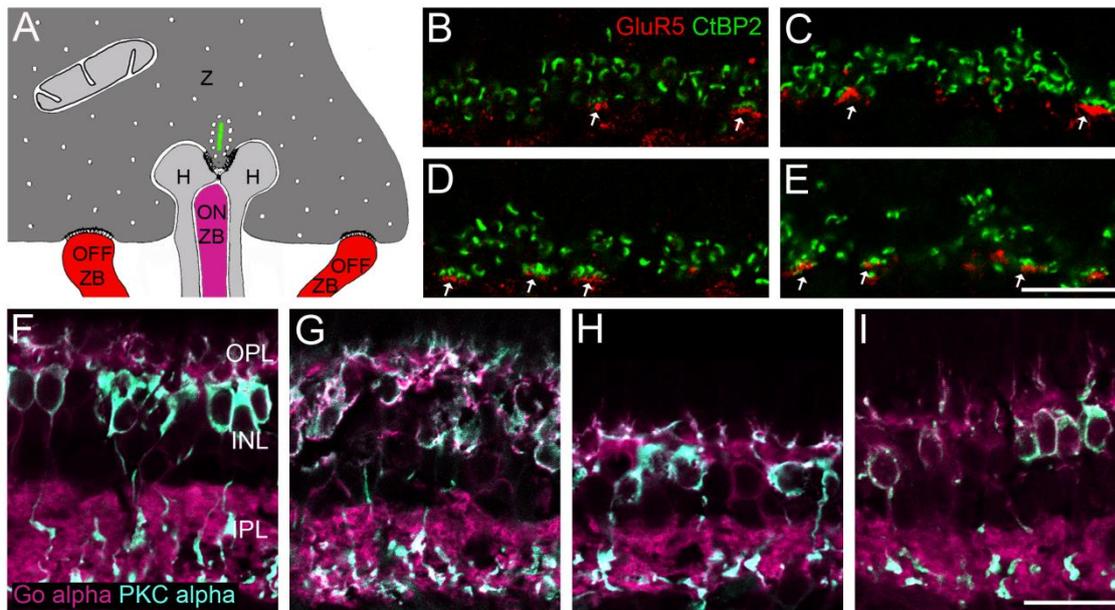
**Abbildung 3.18 Scatterplot zur Synapsenanalyse**

Darstellung des Zusammenhangs zwischen auftretenden sprouting und der Abnahme der ONL-Schichtdicke für die Wildtypretina (schwarz) und die RPE65<sup>-/-</sup> Retina (grau). Die Regressionskurve der Wildtypdaten ist als durchgezogene Linie und die der betroffenen Tiere als gestrichelte Linie dargestellt. WT: Wildtyp; ONL: Äußere nukleäre Schicht. Modifiziert nach (Klein et al. 2014).

Für die Zapfenbipolarzellen der caninen Retina stehen nur wenige funktionierende Marker zur Verfügung. Eine Subpopulation der OFF-Zapfenbipolarzellen wurde mit GluR5 dargestellt, um die Verbindung dieser Zellen zu den Zapfensynapsen zu analysieren (Abbildung 3.19 B-E). Hier konnten sowohl zentral als auch peripher keine Veränderungen festgestellt werden. Die Zapfensynapsen befinden sich in ihrer normalen basalen Lage in der OPL, und das präsynaptische Element (grün) und das postsynaptische Element (rot) der Synapse liegen einander an (Pfeile).

Um die ON-Zapfenbipolarzellen zu beurteilen, wurde eine Ausschlussfärbung mit PKC  $\alpha$  und Go  $\alpha$  durchgeführt (Abbildung 3.19 F-I). Go  $\alpha$  ist ein Marker für alle ON-

Bipolarzellen und PKC  $\alpha$  färbt nur Stäbchenbipolarzellen. Somit konnten Zellen, welche nur Go  $\alpha$  positiv (magenta) sind als ON-Zapfenbipolarzellen identifiziert werden. Diese Zellen zeigen kein Herauswachsen ihrer Dendriten in die ONL im betroffenen Tier (Abbildung 3.19 G und I).



**Abbildung 3.19 Zapfensynapsen und Zapfenbipolarzellen**

(A) Schematische Darstellung der Zapfensynapse. (B-E) Die Bandsynapsen sind mit CtBP2 (grün) und die dendritischen Spitzen einiger Zapfen-OFF-Bipolarzellen mit GluR5 (rot) angefärbt. In allen gezeigten Regionen (B Wildtyp zentral, C Wildtyp peripher, D RPE65<sup>-/-</sup> zentral, E RPE65<sup>-/-</sup> peripher) befinden sich die Zapfensynapsen basal in der OPL (weiße Pfeile) und es besteht eine Assoziation zwischen dem präsynaptischen CtBP2 und dem postsynaptischen GluR5 der OFF-Bipolarzellen. (F-I) Anfärbung von ON-Zapfenbipolarzellen. Um sich die Reaktion der ON-Zapfenbipolarzellen anzusehen, wurde eine Ausschlußfärbung mit PKC alpha (cyan) und Go alpha (magenta) durchgeführt. Zellen, die sich ausschließlich in magenta anfärben, sind ON-Zapfenbipolarzellen. Diese Zellen ziehen in keiner der gezeigten Regionen (F Wildtyp zentral, G Wildtyp peripher, H RPE65<sup>-/-</sup> zentral, I RPE65<sup>-/-</sup> peripher) in die ONL hinein. H: Horizontalzelle; OFF ZB: OFF-Zapfenbipolarzelle; ON ZB: ON-Zapfenbipolarzelle; Z: Zapfen; OPL: Äußere plexiforme Schicht; IPL: Innere plexiforme Schicht. Maßstabsbalken für B-E in E 20  $\mu$ m. Maßstabsbalken für F-I in I 20  $\mu$ m.

Zusammenfassend lassen sich folgende Veränderungen in der caninen RPE65<sup>-/-</sup> Retina zum Zeitpunkt von zwei Jahren mit Hilfe der Immunhistochemie feststellen:

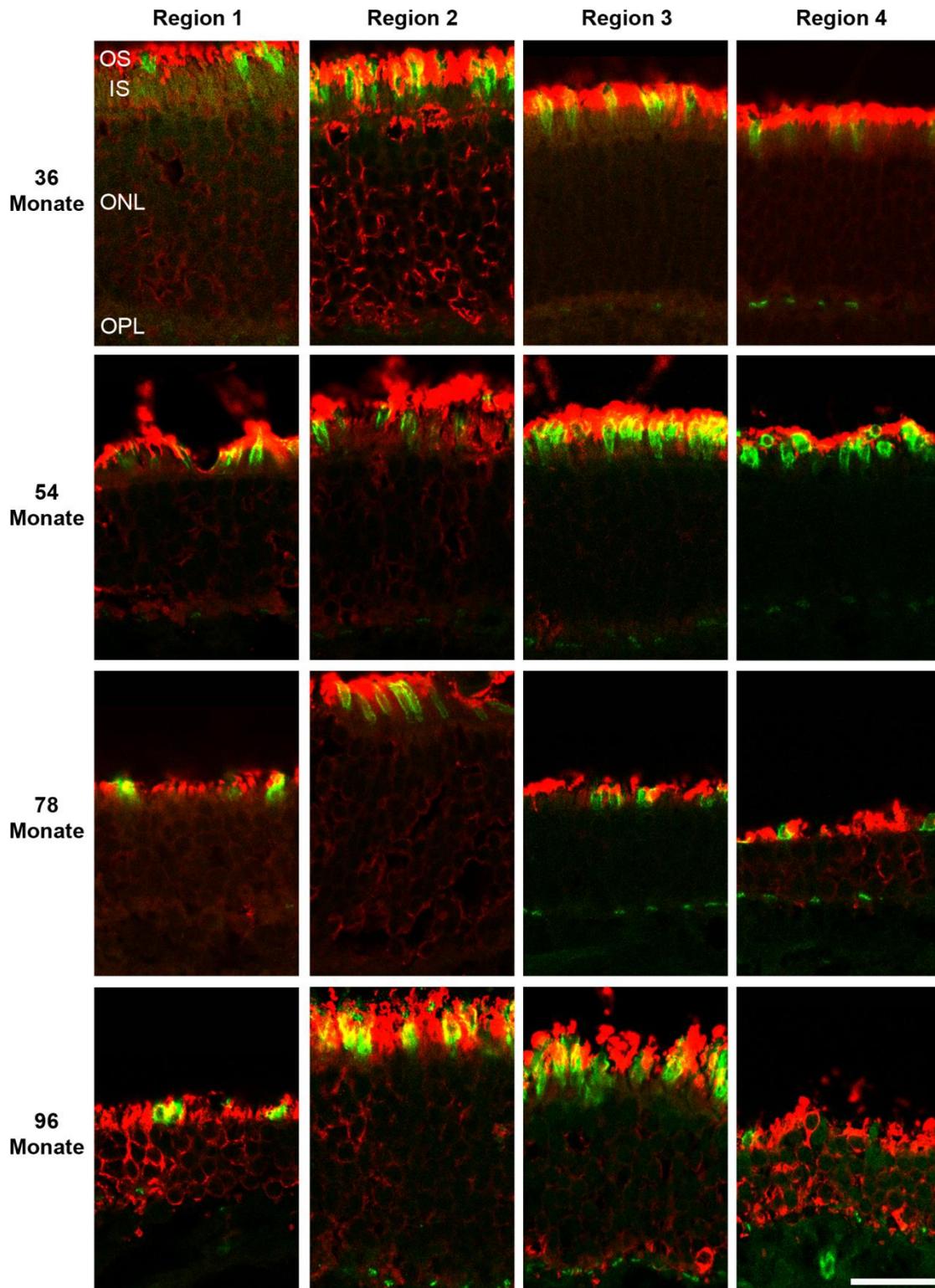
- Deutliche Abnahme der S-Zapfendichte im zentralen superioren Bereich
- Einheitliche Verluste der L/M-Zapfen über den gesamten untersuchten Bereich
- Expression von Zapfenopsinen außerhalb der Außensegmente der Photorezeptoren
- Vermehrtes Auftreten von *sprouting events* in der ONL in der peripheren Retina

## **3.3 Retinale Strukturen im zeitlichen Verlauf der Erkrankung**

Um den Verlauf der Erkrankung besser charakterisieren zu können, wurden Tiere im Alter von drei bis acht Jahren untersucht. Hierfür wurden vier verschiedene Regionen der Retina pro Altersstufe analysiert (Einteilung, siehe Abbildung 2.1). Es erfolgte eine Untersuchung der Photorezeptoren sowie der nachgeschalteten Bipolar- und Horizontalzellen.

### **3.3.1 Photorezeptoren**

Die Photorezeptoren wurden mit zwei verschiedenen Markern in den unterschiedlichen Altersstadien markiert (Abbildung 3.20). Für die Stäbchen wurde Rhodopsin verwendet und für die Zapfen PNA. Es zeigte sich, dass es mit fortschreitendem Alter und somit mit dem Fortschreiten der Erkrankung zu einer Abnahme beider Photorezeptortypen kommt. Die ONL-Schichtdicke nimmt mit zunehmendem Alter ab. Dies ist bereits im Altersstadium von 54 Monaten zu sehen; wird aber ab 78 Monaten erst richtig deutlich. Die Degeneration findet zuerst in der Peripherie und vor allem im inferioren Bereich statt (Region 4). In den älteren Tieren (78 und 96 Monate) ist auch zentral ein Zellverlust sichtbar (Region 2 und 3). Die Zapfenfärbung ist im Alter von 36 Monaten noch recht klar und deutlich. Mit steigendem Alter wird die Darstellung dieser Zellen immer unklarer und die Zellgrenzen sind zunehmend verwaschen. Es lassen sich nur noch wenige Zapfen anfärben. Dies ist vor allem in der Peripherie (Region 1 und 4) deutlich zusehen.



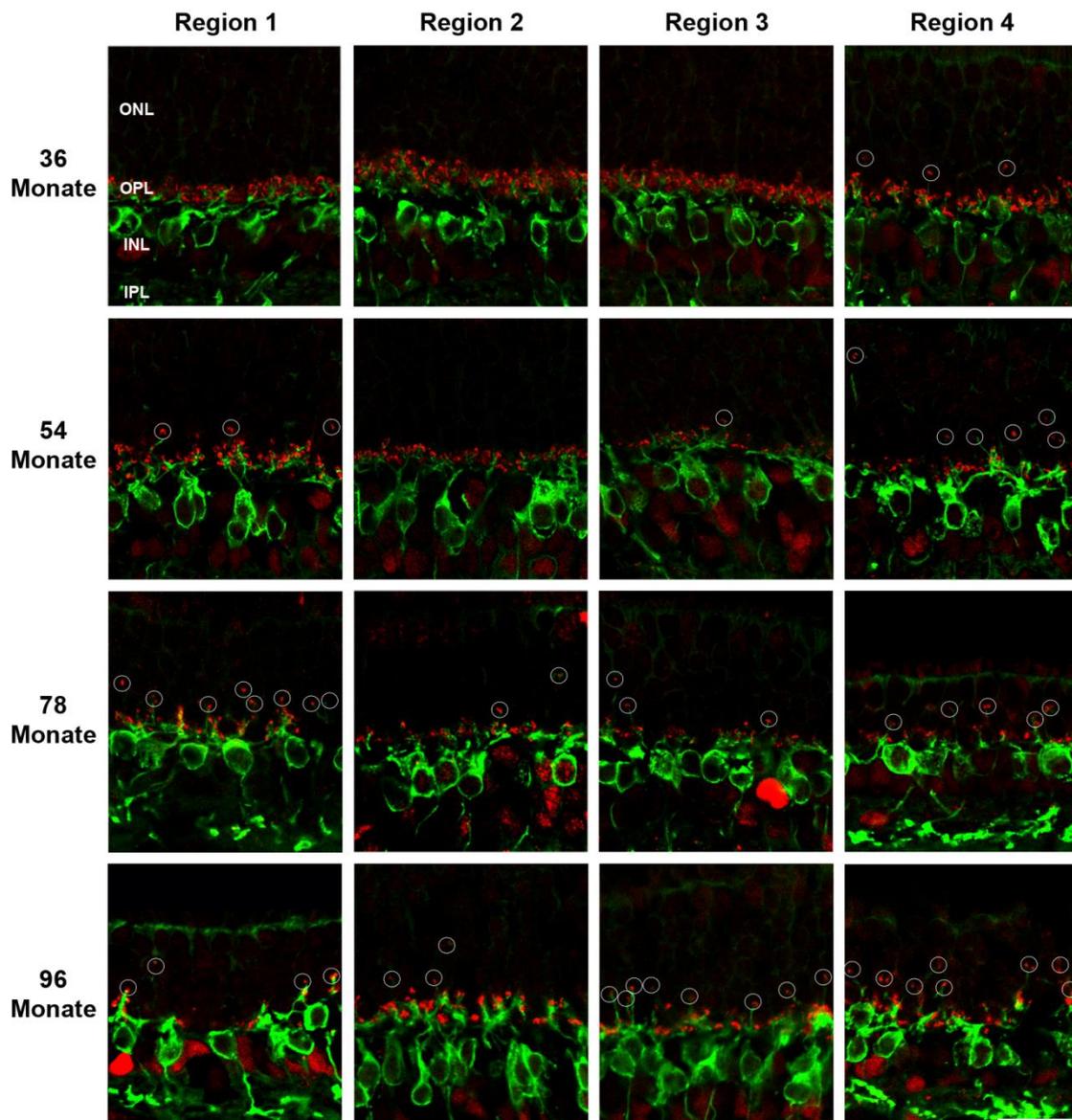
**Abbildung 3.20 Photorezeptoren im zeitlichen Verlauf der Erkrankung**

Darstellung der Photorezeptoren mit Rhodopsin (rot) für die Stäbchen und PNA (grün) für die Zapfen. Es ist ein Verlust von Photorezeptoren im Verlauf der Erkrankung festzustellen. In der Peripherie (Region 1 und 4) sind die Verluste höher als im zentralen Retinabereich (Region 2 und 3). OS: Außensegmente; IS: Innensegmente; ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht. Maßstabsbalken 20  $\mu\text{m}$

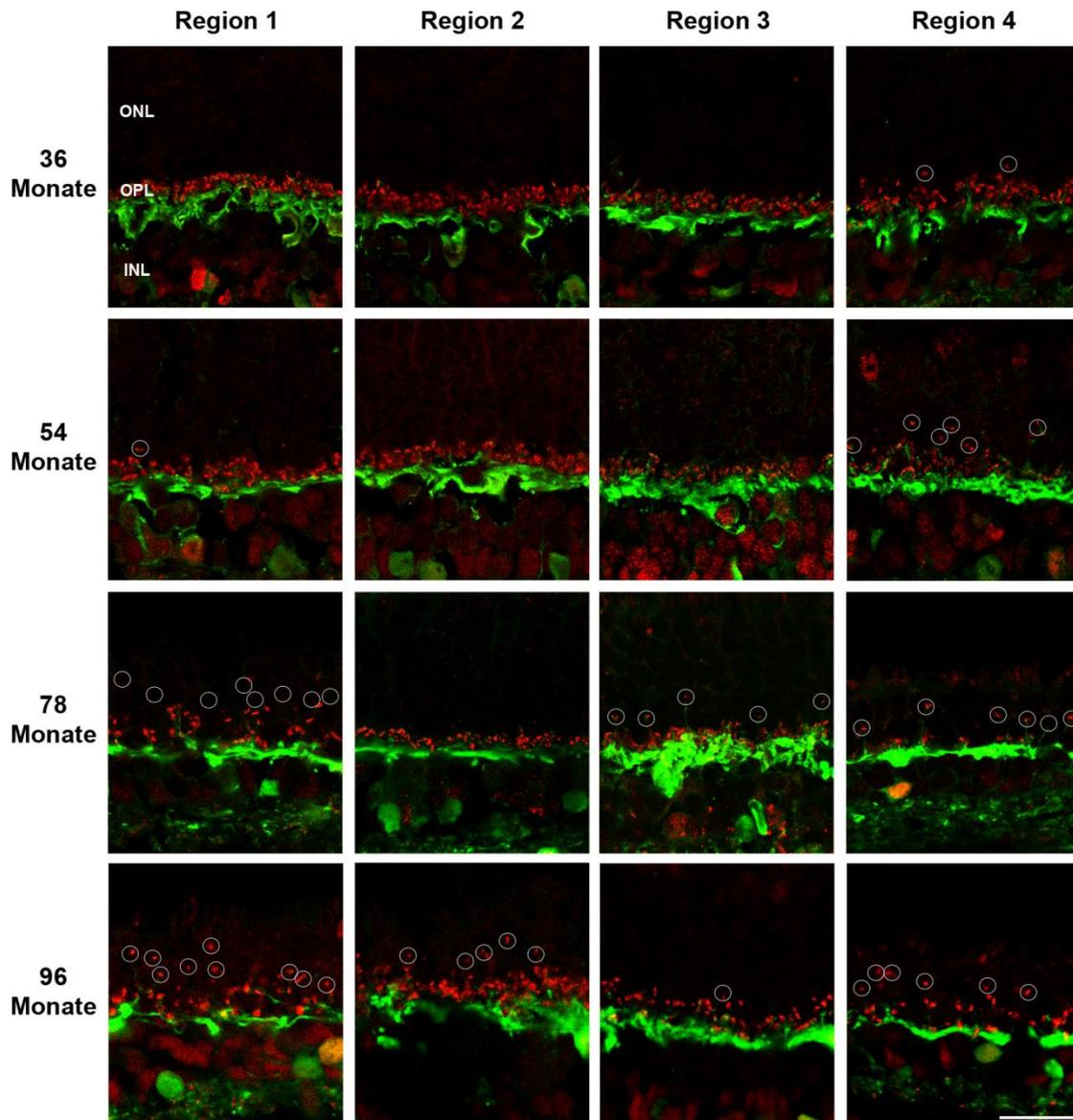
### 3.3.2 Synaptische Verbindungen in der OPL

Genau wie im Altersvergleich bei zwei Jahren wurden die Stäbchenbipolarzellen mit PKC  $\alpha$  markiert und die Gegenfärbung erfolgte mit CtBP2 für die Bandsynapsen (Abbildung 3.21). Im Alter von drei Jahren ist ein auffälliges *sprouting* nur in Region 4 zu beobachten. Im späteren Verlauf der Erkrankung findet man in allen vier untersuchten Regionen delokalisierte Bandsynapsen und Fortsätze der Bipolarzellen in der ONL. Es ist auch zu sehen, dass die ONL-Schichtdicke mit fortschreitendem Alter abnimmt.

Die Auswertung der mit Calbindin angefärbten Horizontalzellen (Abbildung 3.22) zeigt ein ähnliches Ergebnis wie die zuvor beschriebene Stäbchenbipolarzellefärbung. Zu Beginn sieht man delokalisierte Synapsen lediglich in Region 4 (36 Monate) und im späteren Verlauf der Erkrankung ebenfalls in den restlichen Regionen.



**Abbildung 3.21 Stäbchen-Bipolarzellen im zeitlichen Verlauf der Erkrankung**  
 Anfärbung der Stäbchenbipolarzellen mit PKC  $\alpha$  (grün) und der Bandsynapsen mit CtBP2 (rot). Das Sproutingphänomen (weiße Kreise) nimmt mit steigendem Alter über alle Regionen deutlich zu. ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht; IPL: Innere plexiforme Schicht. Maßstabsbalken 20  $\mu$ m



**Abbildung 3.22 Horizontalzellen im zeitlichen Verlauf der Erkrankung**

Anfärbung der Horizontalzellen mit Calbindin (grün) und der Bandsynapsen mit CtBP2 (rot). Das Sproutingphänomen (weiße Kreise) nimmt mit steigendem Alter über alle Regionen deutlich zu. ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht; IPL: Innere plexiforme Schicht. Maßstabsbalken 20  $\mu$ m.

Zusammenfassend lässt sich über den Verlauf der Erkrankung sagen, dass die Veränderungen in allen untersuchten Zellarten (Stäbchen, Zapfen, Stäbchenbipolarzellen und Horizontalzellen) zuerst peripher auftreten und sich später schließlich auch zentral manifestieren.

## **3.4 Retinale Strukturen nach erfolgreicher Gentherapie**

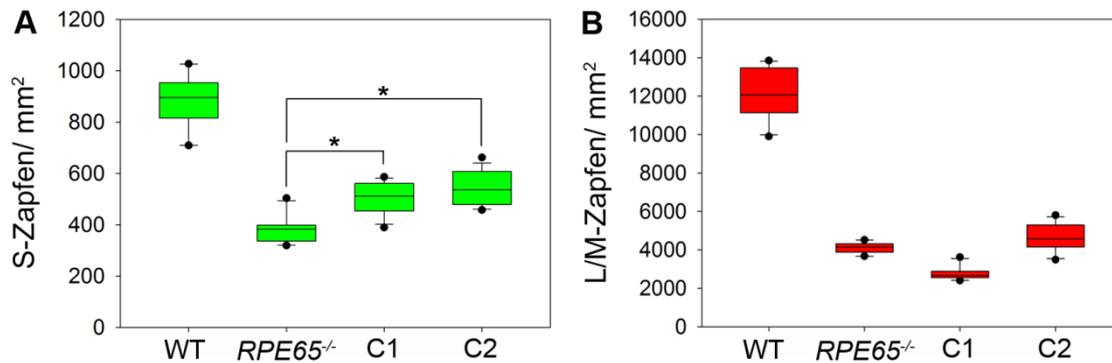
Für die immunohistochemischen Untersuchungen nach erfolgreicher Gentherapie wurden die Augen von Tieren verwendet, die eine unilaterale subretinale Injektion superior des optischen Nervs erhalten hatten. Es wurden immer die rechten Augen mittels eines AAV-Vektors, welcher eine korrekte Kopie des RPE65-Gens enthält, behandelt. Detaillierte Angaben zu den einzelnen Tieren sind in Tabelle 2.1 zu finden. Für die Zapfendichtebestimmung wurde der nasale Teil der Retina (äquivalent zu den vorherigen Untersuchungen im Abschnitt 3.2, siehe Abbildung 2.1) zweier Tiere (C1 und C2) untersucht. In der Schnittanalyse wurden drei verschiedene Bereiche von vier Tieren (C1- C4) beurteilt: Der superiore Bereich des unbehandelten linken Auges (erste Spalte in der Abbildung 3.24 bis 3.27), der superiore injizierte Bereich des rechten Auges (zweite Spalte in der Abbildung 3.24 bis 3.27) sowie der nicht injizierte inferiore Bereich des rechten Auges (dritte Spalte in der Abbildung 3.24 bis 3.27). Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen sind in den folgenden Unterabschnitten beschrieben.

### **3.4.1 Zapfen nach Gentherapie**

Analog zu den vorherigen Untersuchungen wurden auch hier die Zapfen auf zwei unterschiedliche Weisen betrachtet. Zum einem wurde erneut eine Verteilungsanalyse im Flachpräparat der zwei verschiedenen Zapfentypen durchgeführt; zum anderen wurden diese beiden Zelltypen im Vertikalschnitt untersucht. Des Weiteren wurde zur Kontrolle des Erfolges der Gentherapie Immunfluoreszenzfärbungen des RPE65 Proteins (Abbildung 3.25) durchgeführt.

#### **3.4.1.1 Zapfenverteilung**

Um die Ergebnisse der Auszählung der Zapfenverteilung zu quantifizieren wurden die Daten aus dem behandelten Bereich mit den Daten aus einem vergleichbaren Bereich der Augen von Wildtyptieren und den unbehandelten Augen der betroffenen Tiere (Abbildung 2.1 gelb umrandete Quadrate) verglichen (Abbildung 3.23). Es konnte eine statistisch signifikante Zunahme der S-Zapfen im injizierten Bereich im Vergleich zu den unbehandelten Augen nachgewiesen werden (Abbildung 3.23 A, \*  $p < 0,001$ ). Zusätzlich ist anhand der Boxplots zu erkennen, dass die S-Zapfendichte in den behandelten Augen (C1 und C2) deutlich geringer ist als im Wildtyptier. Im Falle der L/M-Zapfen konnte kein Unterschied in der L/M-Zapfendichte zwischen den behandelten Tieren und den betroffenen Tieren gezeigt werden (Abbildung 3.23 B).



**Abbildung 3.23 Zapfen im Vergleich vor und nach Gentherapie**

Darstellung der Zapfendichten in der superioren Retina beim Wildtyp (Mittelwert,  $n=2$ ), betroffenen unbehandelten Tieren (Mittelwert,  $n=4$ ) und zwei behandelten Tieren (C1 und C2) (A) S-Zapfen. Nach erfolgreicher Therapie ist eine signifikante ( $*p<0,001$ ) Zunahme der S-Zapfen in den behandelten Tieren zu erkennen. Die Werte der behandelten Tiere liegen jedoch deutlich unter den Werten im Wildtyp (B) L/M-Zapfen. Durch die Therapie kam es zu keiner Zunahme der L/M-Zapfendichte. WT: Wildtyp.

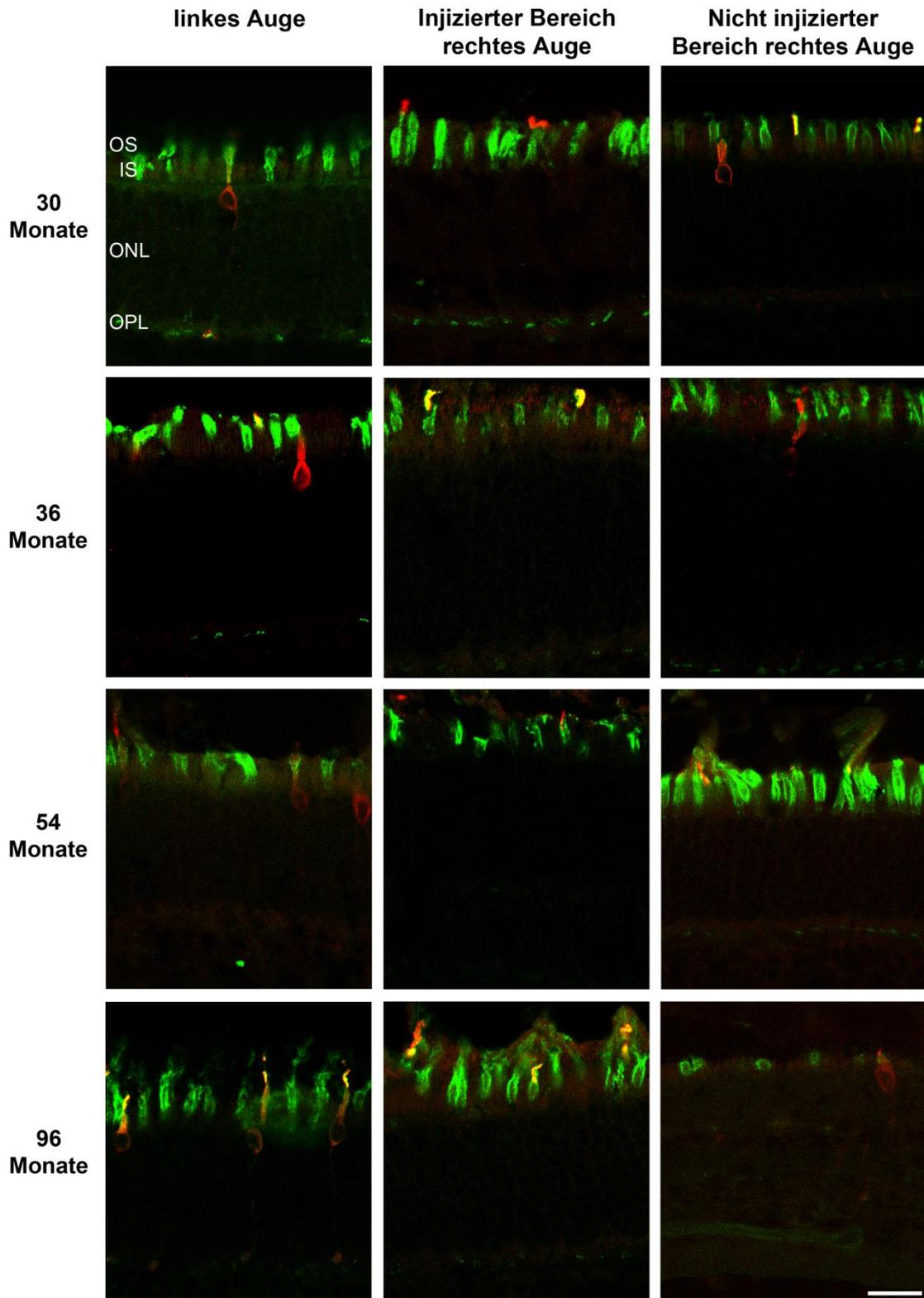
### 3.4.1.2 Opsinlokalisierung

Um untersuchen zu können, ob die Therapie Auswirkungen auf die Lokalisation der Opsine innerhalb der Photorezeptoren hat, wurden die verschiedenen Opsine im Vertikalschnitt mit spezifischen Antikörpern angefärbt.

Die Anfärbung der S-Zapfen erfolgte zusammen mit PNA, um ebenfalls beurteilen zu können, ob es zu einer Veränderung der Zapfenmorphologie gekommen ist (Abbildung 3.24). Im injizierten Bereich (mittlere Spalte) zeigt sich in allen untersuchten Altersstadien, dass das S-Opsin nur in den Außensegmenten der S-Zapfen zu finden ist. Im nicht injizierten Bereich (rechte Spalte), sowie im linken unbehandelten Auge (linke Spalte) findet man das S-Opsin bei den meisten gezeigten Zellen auch im Innensegment und im Zellkern der S-Zapfen. Bis zu einem Alter von 54 Monaten sind keine Unterschiede in der Morphologie der Zapfen in den drei Bereichen sichtbar. Erst bei einem Alter von 96 Monaten ist eine Veränderung der Zapfenmorphologie im nicht injizierten Bereich des rechten Auges erkennbar. Die Zapfen sind hier deutlich vermindert und nur noch als kleine Kugeln wahrnehmbar.

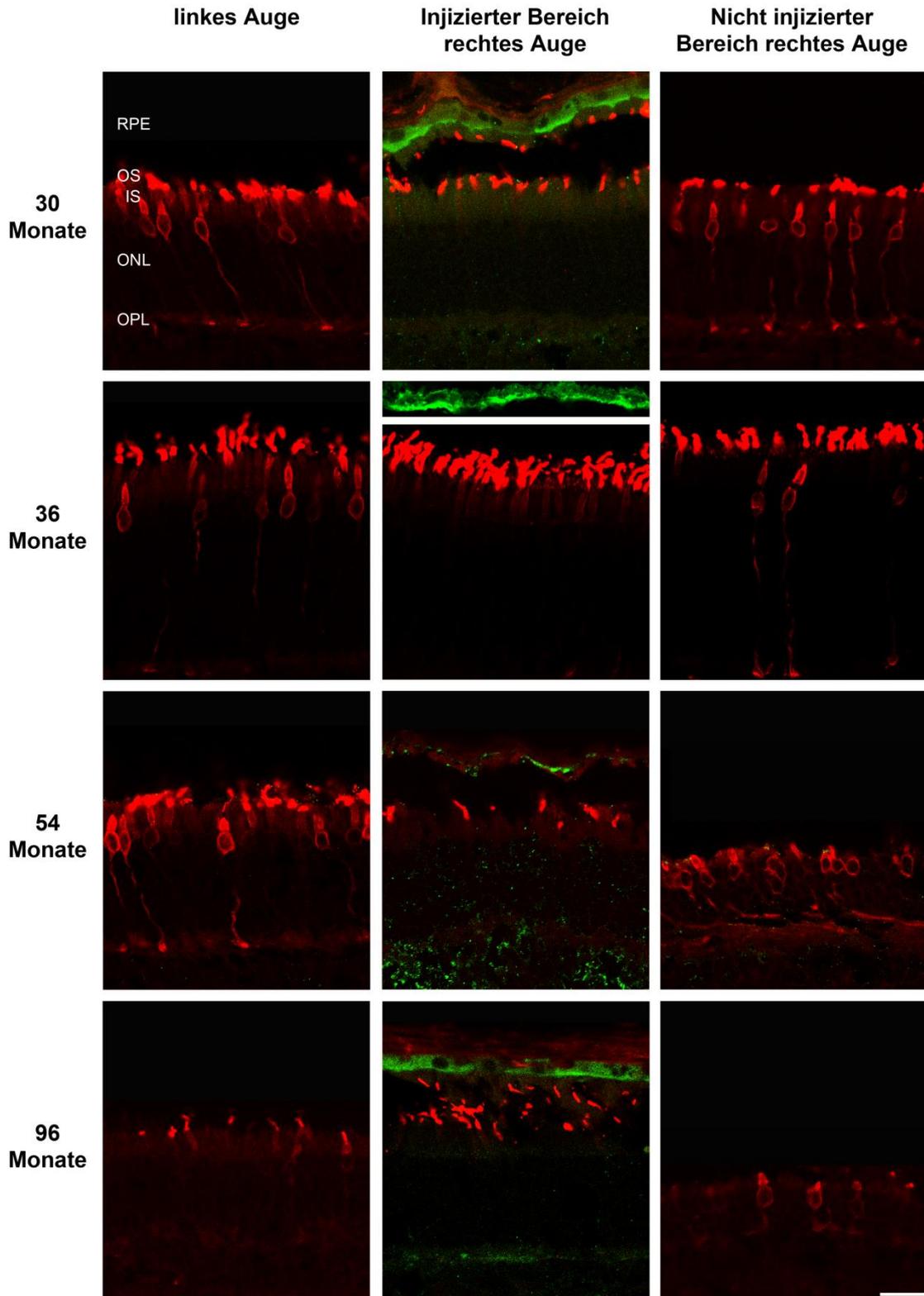
Das L/M Opsin wurde in einer Doppelfärbung mit einem Antikörper gegen das Protein RPE65 verwendet, da es nach erfolgreicher Therapie zu einer Expression von RPE65 im retinalen Pigmentepithel kommen soll. (Abbildung 3.25). Im therapierten Bereich (mittlere Spalte) wird das L/M-Opsin regulär in den Außensegmenten exprimiert. Zusätzlich ist in diesen Bildern das retinale Pigmentepithel dargestellt, in dem das rekombinante RPE65 angefärbt ist. Bei den Tieren im Alter von 30, 36 und 96 Monaten zeigt sich eine starke Expression des Proteins. Lediglich bei dem Tier im Alter von 54

Monaten ist die Expression weniger stark ausgeprägt. Sowohl in den nicht injizierten Bereichen der rechten Augen (rechte Spalte) als auch in den linken Augen, ist das L/M-Opsin im gesamten Photorezeptor zu finden. Dies ist zwar nicht bei allen gezeigten Photorezeptoren der Fall, aber bei der Mehrheit der L/M-Zapfen.



**Abbildung 3.24 S-Zapfen nach Genterapie**

Das S-Opsin (rot) ist in den behandelten Bereichen in den Außensegmenten lokalisiert. Im nicht injizierten Bereich und im unbehandelten Auge findet sich S-Opsin in weiteren Teilen der S-Zapfen. Die Gesamtheit der Zapfen ist mit PNA (grün) angefärbt. Im nicht behandelten Bereich im Alter von 96 Monaten sind die Zapfen kürzer und kugelig als in den restlichen Aufnahmen. OS: Außensegmente; IS: Innensegmente; ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht. Maßstabsbalken 20 µm.



**Abbildung 3.25 L/M Zapfen nach Gentherapie**

Das L/M-Opsin (rot) ist in den behandelten Bereichen in den Außensegmenten lokalisiert. Im nicht injizierten Bereich und im unbehandelten Auge ist das L/M Opsin im gesamten Photorezeptor zu finden. Das rekombinante RPE65 (grün) wird in den behandelten Bereichen im RPE exprimiert. RPE: Retinales Pigmentepithel; OS: Außensegmente; IS: Innensegmente; ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht. Maßstabsbalken 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.4.2 Synaptische Verbindungen in der OPL

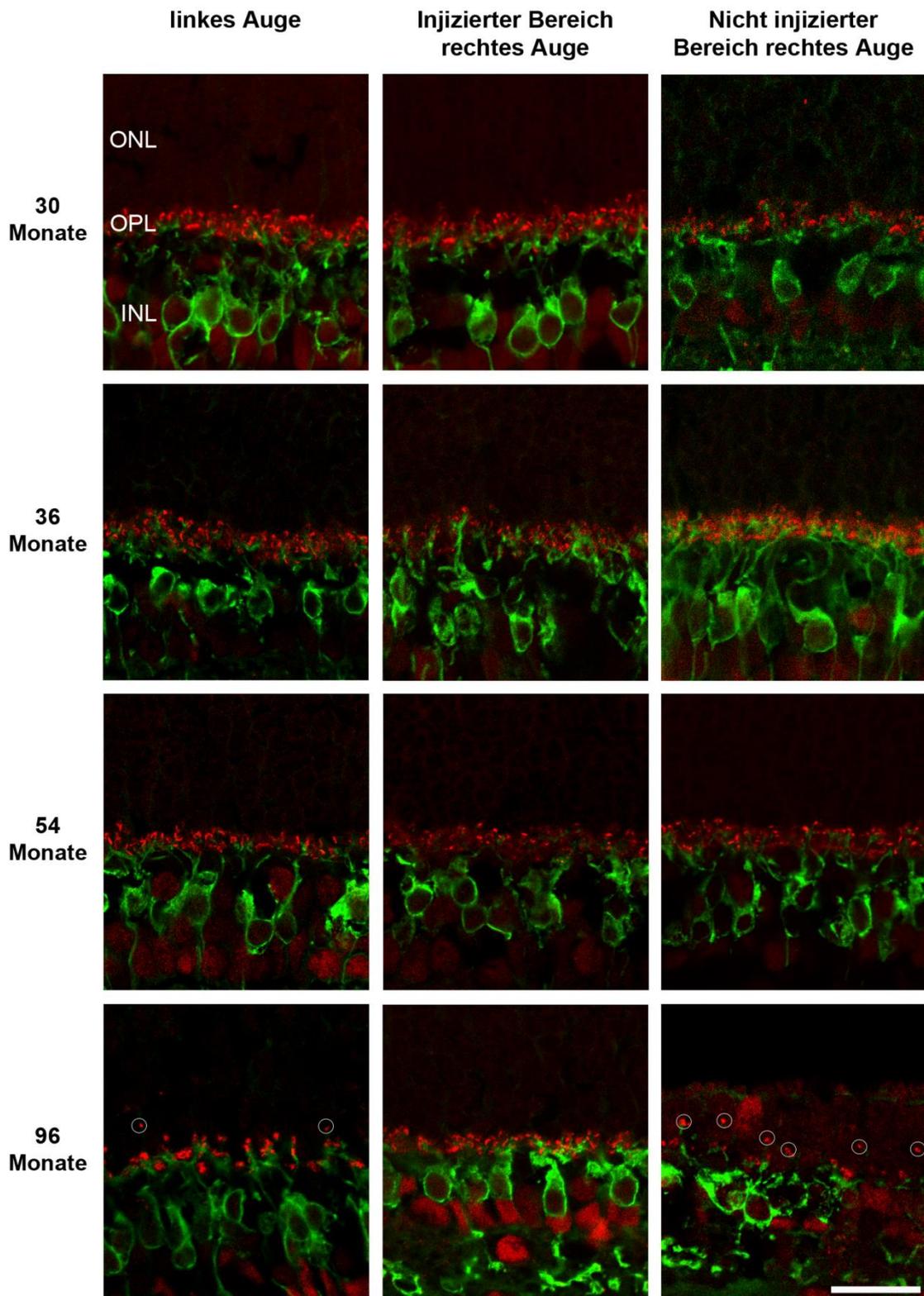
Der Therapieeinfluss auf die Verbindung der Photorezeptoren mit den nachgeschalteten Zellen wurde mit CtBP2 und PKC  $\alpha$  sowie CtBP2 und Calbindin untersucht.

Die Stäbchenbipolarzellen nach der Gentherapie sind in Abbildung 3.26 dargestellt. In den Bildern der injizierten Bereiche (mittlere Spalte) sind keine Veränderungen in der OPL sichtbar. Sie weist eine normale Struktur auf (zum Vergleich siehe Abbildung 3.15) und es finden sich keine ektopischen Synapsen in der ONL. Erst im Alter von 96 Monaten (unterste Reihe) sind die ersten *sprouting events* im nicht behandelten Bereich sowie im kontralateralen Auge sichtbar. Der behandelte Bereich hingegen zeigt zu diesem Zeitpunkt kein Auftreten von *sprouting*.

Ein ähnliches Bild wie die Stäbchenbipolarzellen zeigen die Horizontalzellen nach der Therapie (Abbildung 3.27). Auch hier sind vergleichbare Unterschiede erst im Alter von 96 Monaten (unterste Reihe) sichtbar.

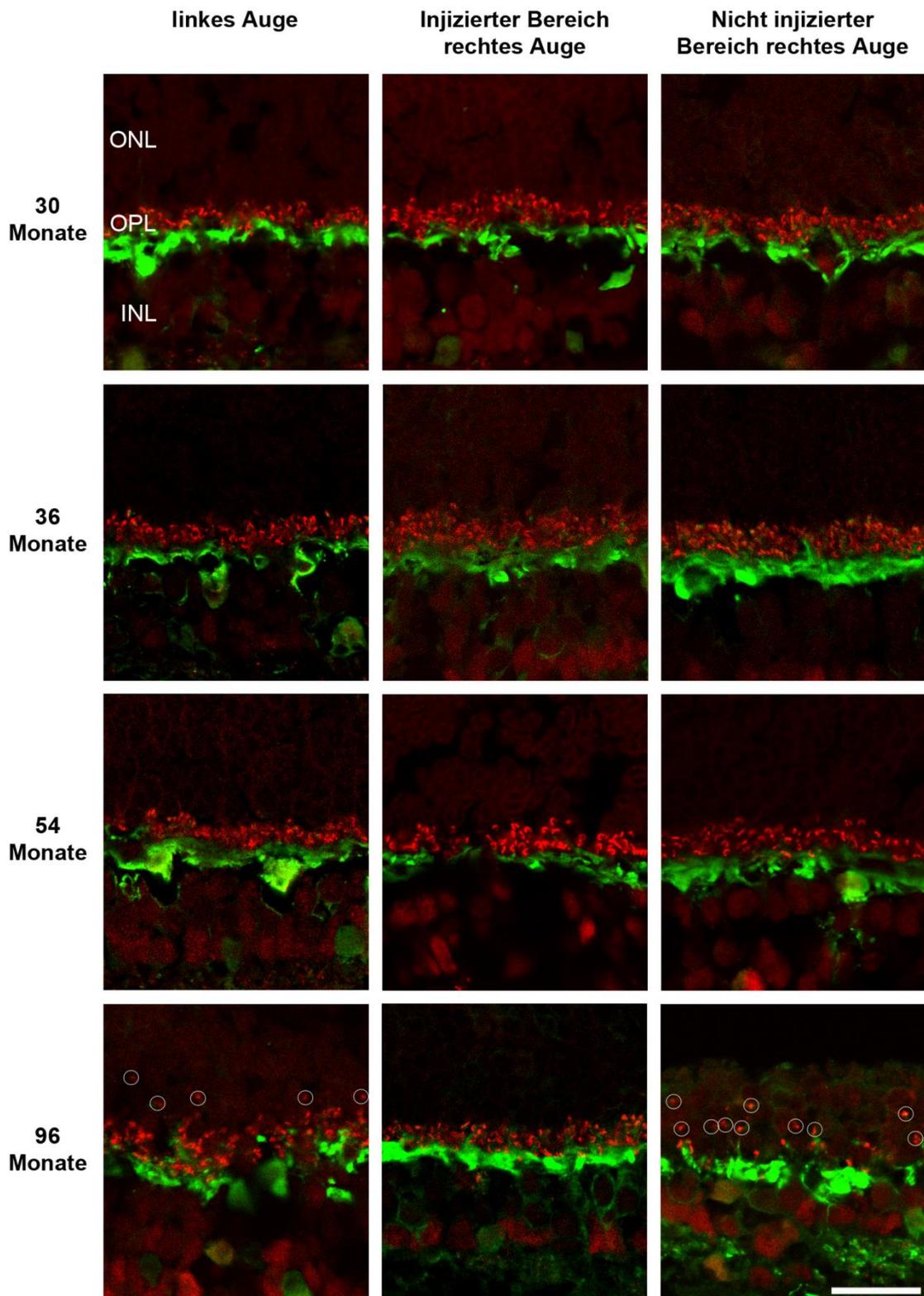
Die Therapieerfolge innerhalb des behandelten Bereichs der Retina auf immunohistochemischer Ebene lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Expression von rekombinanten RPE65 im RPE
- Geringere S-Zapfendegeneration und Relokalisation von S-Opsin in die Außensegmente der Zapfen
- Relokalisation von L/M-Opsin in die Außensegmente der Zapfen
- Reduzierung des *sprouting* der Stäbchenbipolar- und Horizontalzellen



**Abbildung 3.26 Bipolarzellen nach Gentherapie**

Darstellung der Stäbchenbipolarzellen mittels PKC alpha (grün) und der Bandsynapsen mittels CtBP2 (rot). Die Behandlung zeigt keinen Einfluss auf die Struktur der Bipolarzellen innerhalb der OPL bis zu einem Alter von 54 Monaten. Im Alter von 96 Monaten zeigt sich, dass es durch die Therapie zu einer verminderten Ausprägung von sprouting events (weiße Kreise) kommt. ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht. Maßstabsbalken 20 µm



**Abbildung 3.27 Horizontalzellen nach Genterapie**

Darstellung der Horizontalzellen mittels Calbindin (grün) und der Bandsynapsen mittels CtBP2 (rot). Die Behandlung zeigt keinen Einfluss auf die Struktur der Horizontalzellen innerhalb der OPL bis zu einem Alter von 54 Monaten. Im Alter von 96 Monaten zeigt sich, dass es durch die Therapie zu einer verminderten Ausprägung von sprouting events (weiße Kreise) kommt. ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht. Maßstabsbalken 20 µm

## 4 Diskussion

### 4.1 Zellmarkerkatalog

Als erstes Ziel dieser Arbeit sollte ein Zellmarkerkatalog für die canine Netzhaut erstellt werden. Es sollten möglichst viele Marker gefunden werden, damit sämtliche retinale Strukturen in Zukunft mit der Immunohistochemie beurteilt werden können. Die in Tabelle 4.1 aufgeführten Antikörper zeigten für verschiedene Strukturen der Netzhaut ein positives Ergebnis. Zusammen mit den bereits von anderen Arbeitsgruppen erfolgreich getesteten Antikörpern (Beltran et al. 2006; Hernández et al. 2010) stehen nun Marker für die wichtigsten Zellen der Retina zur Verfügung.

**Tabelle 4.1 Positiv getestete Antikörper**

Name (Bestell-Nr.)	Struktur	Verdünnung	Puffer	Referenzquelle
Blue Opsin (AB5407)	S-Zapfen	1:2000	PBS	(Beltran et al. 2006)
Calbindin (300)	Horizontal- und Amakrinzellen	1:2000	PB	(Haverkamp & Wässle 2000)
Calbindin (CB38)	Horizontal- und Amakrinzellen	1:5000	PB	
Calretinin (CR7699/3H)	Horizontal und Amakrinzellen	1:2000	PB	
CRALBP (NB100-74392)	Retinales Pigmentepithel	1:100	PBS	(Crabb et al. 1991)
CRALBP (sc-28193)	Retinales Pigmentepithel	1:50	PBS	
CtBP2 (612044)	Bandsynapsen in der OPL und IPL	1:10000	PB	(Haverkamp et al. 2006)
CtBP2 (1930039)	Bandsynapsen in der OPL und IPL	1:5000	PB	
G <sub>α1</sub> (sc-389)	Stäbchen	1:100	PBS	(Kostic et al. 2011)
G <sub>α2</sub> (sc-390)	Zapfen	1:100	PBS	(Bemelmans et al. 2006)
GFAP (AB5804)	Müllerzellen	1:1000	PB	(Beltran et al. 2006)
GluR5 (sc-7616)	OFF-Zapfenbipolarzellen	1:100	PB	(Qin & Pourcho 2001)
Glutamin-Synthetase (610517)	Müllerzellen	1:5000	PB	(Haverkamp & Wässle 2000)
Go α (MAB3073)	ON-Bipolarzellen	1:500	PB	(Haverkamp & Wässle 2000)
OPN1MW/MW2/LW (sc-22117)	L/M-Zapfen	1:600	PBS	(Jacobson et al. 2007)

OPN1SW (sc-14363)	S-Zapfen	1:600	PBS	(Peichl 2005)
Opsin JH 455	S-Zapfen	1:5000	PBS	(Wang et al. 1992)
Opsin JH 492	L/M-Zapfen	1:2000	PBS	
PKC $\alpha$ (P4334)	Stäbchenbipolarzellen	1:10000	PB	(Haverkamp et al. 2006)
RDH5 (sc-98348)	Retinales Pigmentepithel	1:50	PBS	(Huang et al. 2009)
Rhodopsin (MAB5356)	Stäbchen	1:500	PBS	(Molday & MacKenzie 1983)
RPE65 (NB100-355)	Retinales Pigmentepithel	1:250	PBS	(Jacobson et al. 2007)
RPE65	Retinales Pigmentepithel	1:100	PBS	(Le Meur et al. 2007)
Synaptophysin (S5768)	Präsynaptischer Marker	1:100	PB	(Hernández et al. 2010)
Vimentin (ab8069)	Müllerzellen	1:1000	PB	
Vimentin (5741)	Müllerzellen	1:200	PB	

*OPL: Äußere plexiforme Schicht; IPL: Innere plexiforme Schicht; PB: Phosphatpuffer; PBS: Phosphat-gepufferte Salzlösung*

Es wurden verschiedene Quellen als Referenzen für ein positives Ergebnis herangezogen. Folgende Antikörper wurden bereits vorher erfolgreich in der caninen Netzhaut verwendet: Opsinantikörper (S-Opsin, L/M-Opsin und Rhodopsin), Marker für die Müllerzellen (Glutamin-Synthetase, GFAP und Vimentin), Bipolarzellmarker (PKC  $\alpha$  und Go  $\alpha$ ), Horizontalzellmarker (Calbindin und Calretinin) und RPE65. Bei diesen Antikörpern musste noch sichergestellt werden, welche Konzentration für das verwendete Färbeprotokoll eingesetzt werden muss. Bei den RPE-Markern, den Transducinen und GluR5 lagen bis dato keine Referenzen für die canine Netzhaut vor. Hier wurde auf andere Tierarten als Referenzquelle zurückgegriffen. Die murine Retina ist hierfür ein gutes Modell, da es sehr viele Mausmodelle für retinale Erkrankungen gibt, bei denen die Immunohistochemie eingesetzt wird. Auf Grund dieser Tatsache wurden Mausretinaschnitte als Vergleich zur Hunderetina bei den entsprechenden Markern mitgefärbt und diese dann mit der Literatur verglichen. Somit konnte auch hier ein positives Ergebnis validiert werden.

Allein für die einzelnen Subtypen der Zapfenbipolarzellen konnten keine Marker gefunden werden, welche es ermöglichen würden die Zellen voneinander zu unterscheiden. Es wurden zwar mehrere Antikörper getestet, welche in anderen Tierarten zu dem gewünschten Ergebnis führen, dies blieb jedoch ohne Erfolg (Tabelle 4.2). Als Begründung für das Fehlschlagen dieser Färbungen sind mehrere Faktoren möglich. Zum einen ist es bei manchen Antikörpern notwendig die Fixationszeit sehr niedrig (< 15 Minuten) zu halten. Dies war aber bei dem hier zu Verfügung gestellten

Material nicht möglich, da eine geringere Fixationszeit auch immer mit einer geringeren Strukturhaltung einhergeht. Als weiterer wichtiger Punkt muss beachtet werden, dass evolutionsbedingte Unterschiede im Aufbau der Proteine bei den verschiedenen Spezies existieren. Aufgrund von Homologien ähneln sich viele Proteine bei Säugetieren, nichts desto trotz kommt es zur Abweichungen in der Aminosäuresequenz bei den einzelnen Spezies. Ist ein Antikörper nun gegen ein Epitop gerichtet, welches nicht in der zu untersuchenden Spezies konserviert vorliegt, so kann es sein, dass der Antikörper das gewünschte Protein nicht erkennen kann. Des Weiteren ist es möglich, dass nicht jede Tierart in den gleichen Zellen die gleichen Proteine exprimiert und somit mit manchen Markern die gewünschten Zellen nicht dargestellt werden können.

**Tabelle 4.2 Negativ getestet Antikörper**

Name	Struktur	Verdünnung	Puffer	Referenzquelle
A20	AAV2-Vektorpartikel	1:50	PB, PBS, TBS	(Kuck et al. 2007)
ADK4	AAV4-Vektorpartikel	1:2	PB, PBS, TBS	
Calretinin (MAB1568)	Horizontal und Amakrinzellen	1:1000	PB, PBS	(Haverkamp & Wässle 2000)
ChAT (AB144P)	Cholinerge Amakrinzellen	1:200	PB, PBS	
ChAT (AB143)	Cholinerge Amakrinzellen	1:500	PB, PBS	
HCN4 (APC-052)	OFF-Bipolarzellen	1:500	PB, PBS	(Mataruga et al. 2007)
LRAT (sc-101391)	Retinales Pigmentepithel	1:50	PBS	(O'Byrne et al. 2005)
mGluR6 (GP13105)	metabotrope Glutamatrezeptor Untereinheit 6	1:150	PB	(Sulaiman et al. 2013)
NOS (N7280)	OFF-Bipolarzellen, Amakrinzellen	1:100	PB	(Haverkamp & Wässle 2000)
PSD95 (MABN68)	präsynaptisch in Photorezeptoren	1:500	PB, PBS	(Haverkamp et al. 2003)

*PB: Phosphatpuffer; PBS: Phosphat-gepufferte Salzlösung; TBS: Tris-gepufferte Salzlösung*

Es wurden ebenfalls Antikörper gegen die AAV-Vektorpartikel getestet. Trotz der Testung verschiedener Inkubationsbedingungen konnte keine erfolgreiche immunohistochemische Färbung gezeigt werden. Hier ist anzuführen, dass die verwendeten Antikörper für die Verwendung im ELISA (Kuck et al. 2007) und Western Blot (Wistuba et al. 1997) entwickelt wurden. Bei diesen Untersuchungsmethoden

liegen die Vektoren im denaturierten Zustand vor. Ein negatives Ergebnis ist dementsprechend damit zu erklären, dass die Antikörper möglicherweise in der nativen dreidimensionalen Struktur nicht an das Epitop binden können.

Bei den Antikörpern gegen das S-Opsin waren die Ergebnisse der Färbungen nicht einheitlich (Abbildung 3.4). Zwei (Blue Opsin und OPN1SW) der angewendeten Antikörper markierten das Opsin nur in seiner normalen Lokalisation in den Außensegmenten der S-Zapfen. Der Antikörper JH 455 hingegen färbt den gesamten S-Zapfen an. Es ist zu vermuten, dass durch den JH 455 Antikörper bereits Vorstufen des eigentlichen Opsins erkannt werden. Somit kam dieser Antikörper für die weiteren Untersuchungen nicht in Frage.

## 4.2 Status quo im Alter von 2 Jahren

Die Retina von *RPE65*<sup>-/-</sup> Hunden wurde bereits von verschiedenen Gruppen im frühen Stadium der Erkrankung (Tiere im Alter von bis 1,5 Jahren) untersucht. Die Ergebnisse waren nicht einheitlich. Wrigstad und Kollegen fanden mit Hilfe von klassischen histologischen Untersuchungen heraus, dass es zu morphologische Veränderungen in Form einer Abnahme der ONL-Schichtdicke in der peripheren Retina bereits bei Tieren im Alter von sieben Monaten kommt (Wrigstad et al. 1994). Da 95 % der Photorezeptoren in der caninen Retina Stäbchen sind, kann man mit der klassischen Histologie keine Aussage über die Zapfen treffen. Hernández und Kollegen hingegen untersuchten betroffene Tiere immunohistochemisch und fanden keine Veränderungen in den Photorezeptoren außer der Delokalisation des Rhodopsins in die Zellkerne der Stäbchen bei Tieren in einem Alter von bis zu 17 Monaten (Hernández et al. 2010).

Durch die hier gemachten umfangreichen immunohistochemischen Untersuchungen der *RPE65*<sup>-/-</sup> Retina konnten neue Erkenntnisse über die Erkrankung, insbesondere über den Einfluss auf die Zapfen, gewonnen werden.

Durch die Verteilungsanalyse der Zapfen über die Retina zeigte sich, dass es bereits in diesem frühen Stadium (Alter der Tiere lag bei zwei Jahren) der Erkrankung zu deutlichen Veränderungen in der Dichte der Zapfen kommt. Insbesondere stellte sich heraus, dass sich die Veränderungen der beiden Zapfentypen nicht einheitlich vollziehen. Die L/M-Zapfen zeigen einen durchschnittlichen Verlust über den gesamten analysierten Bereich von rund 60 %, (Abbildung 3.12 rote Balkendiagramme). Bei den S-Zapfen hingegen findet man den größten Verlust im superioren zentralen Bereich (mittlerer Verlust bei 60%). In der Peripherie und im inferioren Bereich liegt der Verlust der S-Zapfen maximal bei 40 %, wobei sogar in einigen Teilen der inferioren Peripherie

ein Verlust von höchstens 10 % zu verzeichnen ist (Abbildung 3.12 grüne Balkendiagramme).

Es scheint so, als ob die S-Zapfen im inferioren Bereich und in der superioren Peripherie durch einen Mechanismus nicht so stark von der Degeneration betroffen sind. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen kann das vorhandene Tapetum lucidum im superioren zentralen Bereich der Retina sein. Das Tapetum dient den nacht- und dämmerungsaktiven Tieren dazu, auch bei schlechten Lichtverhältnissen besser zu sehen (Abschnitt 1.2.2). Für die Reflexion des Lichts durch das Tapetum enthält dieses spezifische Stoffe, welche beim Hund Zinkcysteine sind (Weitzel et al. 1955). Bei der Katze geschieht die Reflexion hauptsächlich durch Riboflavin (Elliott & Futterman 1963). Riboflavin absorbiert kurzwelliges Licht und fluoresziert bei einer Wellenlänge von 520 nm, was nahe an dem Absorptionsmaximum der Stäbchen (500nm) liegt. Ein ähnlicher jedoch ein wenig abgewandelter Mechanismus könnte auch beim Hund vorhanden sein, was dazu führen würde, dass insbesondere die S-Zapfen neben den Stäbchen ein zweites Mal angeregt werden. Dies könnte zu stärkerem oxidativen Stress führen und somit eine erhöhte Degenerationsrate im Bereich des Tapetums erklären. Laut Ollivier et al. ist die Reflexionseigenschaft des Tapetums abhängig von der Anordnung des reflektierenden Materials innerhalb der Tapetalzellen. Dieses Material befindet sich in sogenannten Rodlets, welche an die Zellmembran gebunden sind. Bei Katzen hat man eine viel kompaktere Anordnung der Rodlets als bei Hunden. Man geht davon aus, dass diese Anordnung einen Einfluss auf die reflektierte Wellenlänge hat (Ollivier et al. 2004). Somit könnten sowohl die Reflexionseigenschaften der Zinkcysteine als auch ihre Anordnung innerhalb der Tapetalzellen für die Schädigung der S-Zapfen in diesem Bereich verantwortlich sein. Eingehende Untersuchungen hierzu liegen allerdings bislang nicht vor.

Eine weitere mögliche Erklärung für das unterschiedliche Degenerationsverhalten der beiden Zapfentypen ist die unterschiedliche Reaktion dieser Zellen auf zellulären Stress (Zhang et al. 2011). Zhang und Kollegen untersuchten *in vitro* COS7 Zellen, welche mit den humanen Zapfenopsinen als auch den murinen Zapfenopsinen transfiziert wurden, und *in vivo* das *LRAT*<sup>-/-</sup> Mausmodell. Unter der Abwesenheit von 11-cis RAL zeigen die L/M- und S-Zapfen unterschiedliche Aggregationseigenschaften des Opsins im endoplasmatischen Retikulum. Dies führt zu einer Aktivierung der *unfolded protein response* (UPR), die Apoptose auslösen kann. Es wurde gezeigt, dass mehr S-Opisin im Vergleich zum L/M-Opisin in den Innensegmenten und der ONL akkumuliert und dieses mit Ubiquitin colokalisiert ist (Zhang et al. 2011). Eine ähnliche Reaktion könnte auch unter der Abwesenheit von RPE65 stattfinden und somit die

Unterschiede in der Kinetik des Opsinverlustes der beiden Zapfentypen in der vorliegenden Studie erklären.

In der Studie von Hernández und Kollegen konnte keine Verringerung der Zapfenzahl im Alter von 17 Monaten festgestellt werden (Hernández et al. 2010). Die Beurteilung der Zapfen erfolgte hier allerdings durch das Anfärben der Zellkerne mit humanem Zapfenarrestin. Eine fehlende Reduzierung von Zapfenarrestin und eine reduzierte Opsinproduktion im vergleichbaren Altersstadium spricht für einen Erhalt der Zellkörper der Zapfen bei bereits eingeschränkter Funktion dieser Zellen durch fehlende Opsinproduktion.

In einer weiteren Studie konnte im Vergleich von betroffenen Tieren im Alter von drei Monaten und 6,5 Jahren keine Verringerung der L/M-Zapfendichte, allerdings eine deutliche Abnahme der S-Zapfen über diesen Zeitraum festgestellt werden (Mowat et al. 2013). Da hier jedoch die Zapfendichte im Vertikalschnitt bestimmt wurde und zusätzlich Daten aus Wildtypen in den selben Altersstadien fehlen, ist ein Vergleich mit den Ergebnissen aus der hiesigen Studie nicht möglich.

Die Untersuchung der Photorezeptoren im Vertikalschnitt hat gezeigt, dass es durch die Erkrankung zu einer Delokalisation der Zapfenopsine kommt. Eine Delokalisation des Opsin weist auf einen gestörten Transport des Opsin von seinem Entstehungsort (Innensegment) zu seinem Einsatzort (Außensegment) hin. Dies kann durch Zellstress und damit verbundene Apoptose ausgelöst werden (Zhang et al. 2008; Fan et al. 2008). Im Falle des S-Opsin konnte über die gesamte Retina eine Lokalisation des Opsins in den Außensegmenten, den Innensegmenten, und den Zellkernen gezeigt werden. Die Anfärbung der S-Zapfen in den Vertikalschnitten erfolgte in der hiesigen Studie mit einem Antikörper von Santa Cruz. Hernández und Kollegen fanden mit den von ihnen verwendeten Antikörper (AB5407 von Millipore) kein delokalisiertes S-Opsin (Hernández et al. 2010). Färbungen mit dem S-Opsinantikörper von Millipore ergaben auch bei den hier untersuchten betroffenen Tieren nur eine Anfärbung des S-Opsins im Außensegment. Auch im *LRAT<sup>-/-</sup>* Mausmodell konnte mit dem Milliporeantikörper kein delokalisiertes Opsin festgestellt werden (Zhang et al. 2011). Somit könnten die Unterschiede in den beiden Studien auf den verwendeten Antikörper zurückzuführen sein.

Im Falle des L/M-Opsins konnte eine Delokalisation des Opsin im gesamten Photorezeptor nur im zentralen bis midperipheren Bereich der Retina, sowohl superior als auch inferior, festgestellt werden. Warum es in der Peripherie nicht zu einer Fehlagerung des Opsins kommt ist unklar. Andere Gruppen haben die Opsinexpression in den L/M-Zapfen ebenfalls untersucht (Hernández et al. 2010;

Mowat et al. 2013). In diesen beiden Untersuchungen wurde jeweils ein L/M-Opsinantikörper von Millipore verwendet. Hernández und Kollegen fanden keine Veränderung in der Opsinexpression, während Mowat und Kollegen hingegen mit demselben Antikörper delokalisiertes Opsin in allen von ihnen untersuchten Regionen bei erkrankten Tieren detektieren konnten. Mowat et al. analysierten die Retina in der Mitte des Auges von der Ora serrata bis hin zum optischen Nerv. Aufgrund der Unterschiede in diesen Regionen und den unterschiedlichen Antikörper lassen sich die hier gemachten Beobachtungen nur schwer mit den Literaturdaten vergleichen. Es kann sein, dass die verschiedenen Ergebnisse auf die unterschiedlichen Antikörper zurückzuführen sind, da es wie beim S-Opsin beschrieben, zu solchen Problemen kommen kann.

Bei der Betrachtung der Stäbchen im Vertikalschnitt zeigte sich, dass es zu einer sichtbaren Abnahme der ONL-Schicht in der Peripherie bereits in diesem frühen Stadium der Erkrankung kommt (Abbildung 3.14). Die ONL-Schicht im zentralen Bereich hingegen zeigt keinen sichtbaren Unterschied zum Wildtyp. Da in der caninen Retina 90 % aller Photorezeptoren Stäbchen sind, spricht diese Reduzierung der ONL für einen Stäbchenverlust. Somit bestätigen die hier gefundenen Ergebnisse die bereits veröffentlichten Untersuchungen von Wrigstad und Kollegen (Wrigstad et al. 1994).

Der in der vorliegenden Studie verwendete Rhodopsinantikörper (Millipore) färbt bereits im gesunden Hund die Außensegmente, die Innensegmente und die Somata der Zellkerne der Stäbchen (Abbildung 3.14). Somit ist eine Beurteilung, ob es zu einer Delokalisation des Rhodopsins durch die Erkrankung kommt nicht möglich. Hernández und Kollegen verwendeten für ihre Untersuchungen einen anderen Rhodopsinantikörper, welcher nicht freikäuflich zu erwerben ist, und konnten mit diesem eine Delokalisation von Rhodopsin im erkrankten Tier feststellen (Hernández et al. 2010). Da es in der vorliegenden Studie um die Beurteilung der ONL-Schichtdicke ging, um einen Stäbchenverlust feststellen zu können, wurde der kommerzielle Antikörper von Millipore für die Färbungen verwendet.

Durch das Anfärben der synaptischen Verbindungen der OPL konnte gezeigt werden, dass es zu Veränderungen sowohl des präsynaptischen Elements (Stäbchen) als auch der postsynaptischen Elemente (Bipolar- und Horizontalzellen) in der caninen *RPE65*<sup>-/-</sup> Retina kommt. Bei der quantitativen Analyse des *sproutings* zeigten sich die stärksten Veränderungen in der inferioren Peripherie (Region 4). Hier fanden sich die meisten *sprouting events* und die größte Abnahme der ONL-Schichtdicke (Abbildung 3.17, ganz rechtes Balkendiagramm). Ein Zusammenhang zwischen Abnahme der ONL-

Schichtdicke und dem zunehmenden Auftreten von *sprouting* konnte durch die Regressionsanalyse gezeigt werden (Abbildung 3.18).

Das Auftreten von *sprouting* wurde auch bei Tieren und Menschen höheren Alters als vorkommendes Ereignis beschrieben (Eliasieh et al. 2007; Liets et al. 2006). In der Studie von Eliasieh et al. wurde die Anzahl der Photorezeptoren von jungen und alten Menschen verglichen und es zeigte sich, dass es zu einer Abnahme der Zellen mit steigendem Alter kommt, was vor allem zentral deutlicher zu sehen ist (Eliasieh et al. 2007). Die durch die Analyse erzielten Ergebnisse in Region 1 und 4 übersteigen in ihrer Anzahl jedoch die durch natürliche Alterung auftretenden, da es sich hier um recht junge Tiere handelt. Somit ist das hier beschriebene Sproutingphänomen auf die Erkrankung zurückzuführen.

Mit dem Verlust von Photorezeptoren, entweder durch Alterung der Retina oder durch eine Erkrankung, kommt es zu einer Reorganisation der verbleibenden Zellen. Warum dies in Form des *sproutings* geschieht, ist noch nicht geklärt. Des Weiteren ist bislang unklar, ob dieser Prozess von den Photorezeptoren (präsynaptisches Element) oder den Bipolar- und Horizontalzellen (postsynaptische Elemente) gesteuert wird.

In der menschlichen alternden Retina wurde das *sprouting* ebenfalls bei ON-Zapfenbipolarzellen beobachtet (Eliasieh et al. 2007). Dies konnte beim Hund nicht gefunden werden (Abbildung 3.19). Hier sind die Zapfensynapsen an ihrer ursprünglichen basalen Position in der OPL lokalisiert und die invaginierenden ON-Zapfenbipolarzellen zeigen keine Veränderungen. Auch bei der Untersuchung einer OFF-Zapfensubpopulation mit GluR5 fanden sich keine Unterschiede zur Wildtypretina. Diese Diskrepanz zwischen Hund und Mensch lässt sich bisher allerdings nicht erklären.

Hernández und Kollegen untersuchten ebenfalls die Stäbchenbipolarzellen hinsichtlich der Ausbreitung ihrer Dendriten über die OPL hinaus (Hernández et al. 2010). Sie konnte eine milde Form von *sprouting* der Stäbchenbipolarzellen in die ONL feststellen. Eine Gegenfärbung des präsynaptischen Elements wurde nicht durchgeführt, und es wurde lediglich die Mittelachse des Auges vom optischen Nerv bis zur Ora serrata untersucht.

## 4.3 Morphologische Veränderungen im Verlauf der Erkrankung

Durch die fehlende Produktion von RPE65 treten die ersten funktionellen Veränderungen im Hundemodell für EOSRD bereits kurz nach der Geburt auf (Cideciyan 2010). Die Tiere können sich unter schwachen Lichtbedingungen nur schlecht oder gar nicht orientieren. Bei Tageslicht zeigen diese Hunde eine eingeschränkte Sehkraft bis hin zu einem totalen Sehverlust. ERG Ableitungen sind von Geburt an unter skotopischen Bedingungen (Stäbchenreaktion) nicht möglich und unter photopischen Bedingungen (Zapfenreaktion) im subnormalen Bereich. Mit zunehmendem Alter sind dann keinerlei ERG-Ableitungen bei den betroffenen Tieren mehr möglich (Abbildung 1.13) (Le Meur et al. 2007)

Die morphologischen Veränderungen treten aber erst mit der Zeit auf. Wrigstad und Kollegen fanden erste strukturelle Abweichungen in Form der Abnahme der ONL-Schichtdicke in der peripheren Retina ab einem Alter von sieben Monaten. (Abbildung 1.14) (Wrigstad et al. 1994; Wrigstad et al. 1992). Mit zunehmendem Alter schreitet die Degeneration der ONL fort und breitet sich auch in den zentralen Retinabereich aus. Lichtmikroskopische Untersuchungen lassen aber nur eine grobe Übersicht über das Aussehen der Zellen zu, und es lässt sich keine Aussage über die Funktionalität der Zellen machen. In einer OCT-Studie konnte gezeigt werden, dass die ONL-Schichtdicke im gesamten untersuchten Bereich bei betroffenen Tieren bis zu einem Alter von fünf Jahren keinen Unterschied zum Wildtyp aufweist (Cideciyan et al. 2013). Erst danach treten Zellverluste vor allem im inferioren Bereich der Retina auf. Die zentrale Retina ist erst ab einem Alter von sieben Jahren von der Degeneration betroffen. Mit der OCT-Methode ist es allerdings nur möglich vom optischen Nerv aus jeweils 30° der Retina nach superior und inferior darzustellen. Ein großer Teil der Retina bleibt somit unberücksichtigt. Die Immunohistochemie ermöglicht es durch Anfärbung verschiedener zellspezifischer Stoffe, einen Rückschluss auf deren Funktion sowie die Zellen in ihrem Detail darzustellen, und dies bis an den äußersten Rand der Retina.

Durch die Markierung der beiden Photorezeptortypen mittels Peanut-Agglutinin (Zapfen) und Rhodopsin (Stäbchen) konnte gezeigt werden, dass es zu deutlichen Veränderungen in beiden Zelltypen kommt. Die Zapfen sind in ihrer Morphologie bereits im Alter von zwei Jahren im Vergleich zum Wildtyp verändert (Abbildung 3.13). Ihre Struktur wirkt verwaschen. Im weiteren Verlauf der Erkrankung bleibt dieses Phänomen erhalten (Abbildung 3.20). Ab einem Alter von 54 Monaten verändert sich die Morphologie der Zapfen weiter. Im späten Stadium (78 und 96 Monate) sind in der

Peripherie nur noch wenige Zapfen übrig. Im zentralen Bereich hingegen, besonders im inferioren Teil der Retina (Region 3) sind noch viele Zapfen vorhanden.

Bereits im Altersvergleich von zwei Jahren zeigte sich ein Stäbchenverlust in der Peripherie (Abschnitt 4.2, Abbildung 3.14). Mit steigendem Alter (ab 54 Monaten) nimmt die Schichtdicke der ONL in der Peripherie weiter ab und es sind erste Veränderungen in dieser Schicht auch im zentralen inferioren Bereich (Region 3) sichtbar (Abbildung 3.20).

Auch in den nachgeschalteten Zellen der Photorezeptoren, den Bipolar- und Horizontalzellen, zeigen sich Veränderungen in Verbindung mit der fortschreitenden Degeneration (Abbildung 3.21 und 3.22). Mit abnehmender Schichtdicke der ONL treten vermehrt ektopische Synapsen und Dendriten in der ONL auf. Im zentralen Bereich lassen sich erst spät (ab 78 Monaten) deutliche Veränderungen feststellen. In der Peripherie treten diese Veränderungen hingegen schon zu einem frühen Zeitpunkt der Erkrankung auf (siehe Abschnitt 3.2 und 0). Ab einem Alter von 78 Monaten ist in den peripheren Regionen keine gut abgrenzbare OPL mehr sichtbar. Die Synapsen und Dendriten der nachgeschalteten Zellen befinden sich meistens in der ONL-Schicht. Mit steigendem Alter (hier 96 Monate) zeigt sich zentral ein ähnliches Bild, wobei vor allem im superioren Bereich der Ansatz einer kompakten OPL noch sichtbar ist.

Es handelt sich somit um eine früheinsetzende fortschreitende Degeneration, welche beide Photorezeptortypen betrifft und sich von peripher hin nach zentral ausweitet, wobei der inferiore zentrale Bereich (Region 3) früher von der Degeneration betroffen ist als der zentrale superiore Bereich (Region 1). Somit bestätigen die gefundenen Ergebnisse die bereits veröffentlichten Untersuchungen von Wrigstad und Kollegen zu welchem Zeitpunkt die Degeneration einsetzt (Wrigstad et al. 1994).

Bei Menschen kommt es im frühen Stadium der Erkrankung sowohl zu funktionellen Veränderungen in Form des nicht mehr messbaren ERG sowie auch zu morphologischen Veränderungen der zentralen Retina, welche sich durch die Abnahme der ONL-Schichtdicke im OCT zeigen (Lorenz et al. 2000; Jacobson et al. 2008). In der caninen Retina degeneriert die zentrale superiore Retina erst spät im Verlauf der Erkrankung; lediglich der inferiore Retinateil zeigt einen gewissen Grad der Degeneration im frühen Stadium der Erkrankung. Somit sind die Veränderungen in der humanen Netzhaut am ehesten mit dem inferioren Teil der caninen Retina zu vergleichen, da hier bereits erste neurodegenerative Prozesse aktiv sind.

## 4.4 Genterapeutische Effekt auf die Zellen der Retina

Bislang liegen nur wenige Daten zur Auswirkung der RPE65 Genterapie auf die einzelnen Zellenarten der Retina vor. Zwar konnte schon in anfänglichen Studien gezeigt werden, dass es nach erfolgter Therapie zur Expression von RPE65 im retinalen Pigmentepithel kommt, jedoch wurde bei diesen behandelten Retinae ansonsten lediglich die grobe Struktur der Netzhaut im Durchlicht beurteilt (Acland et al. 2001; Narfstrom 2003a). In weiteren Studien wurde die Expression von Rhodopsin vor und nach der Genterapie untersucht, wobei keine Veränderungen festgestellt wurden (Acland et al. 2005; Le Meur et al. 2007). Erst im letzten Jahr wurde eine Studie mit immunohistochemischen Untersuchungen der Zapfenopsine nach Genterapie veröffentlicht (Mowat et al. 2013). Hier konnte gezeigt werden, dass nur die S-Zapfen durch die Therapie in ihrer Dichte weniger stark abnehmen. Die L/M-Zapfendichte blieb unverändert. Es wurde lediglich eine verminderte Delokalisation des L/M-Opsins festgestellt. In dieser Studie wurden jedoch nur Dichtebestimmungen innerhalb des behandelten Auges durchgeführt.

Erst in der hier vorliegenden Analyse wurden Datensätze aus behandelten Augen mit Daten aus unbehandelten Augen und Wildtypdaten verglichen. Es zeigte sich, dass die Therapie einen größeren Effekt auf die S-Zapfen als auf die L/M-Zapfen hat. Die S-Zapfendichte nimmt im behandelten Bereich im Vergleich zum unbehandelten Auge signifikant zu, wobei sie jedoch weit unter den Werten der gesunden Tiere liegt. Weiterhin konnte eine Relokalisation des S-Opsins in die Außensegmente der S-Zapfen festgestellt werden. Auf die L/M-Zapfendichte hatte die Therapie keinen Einfluss. Es konnte allerdings eine Relokalisation des L/M-Opsins in die Außensegmente der Photorezeptoren festgestellt werden. Dies spricht für eine verbesserte Funktionalität der verbleibenden L/M-Zapfen nach der Therapie. Der eingeschränkte therapeutische Effekt auf die Zapfen könnte damit zusammenhängen, dass die Bereitstellung des Chromophors der Zapfen wahrscheinlich über einen alternativen Zyklus zum klassischen visuellen Zyklus abläuft (Wang & Kefalov 2011) (Abschnitt 1.3.). In diesem Zyklus ist noch nicht eingehend geklärt, welche Rolle RPE65 spielt. Es könnte jedoch auch sein, dass die produzierte Menge an rekombinanten RPE65 nach Therapie für die Zapfen, insbesondere die L/M-Zapfen, nicht ausreicht und es somit zu diesem eingeschränkten Effekt kommt.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass durch die Genterapie erzielte Effekte auf die Lokalisation der Zapfenopsine über einen Zeitraum von drei Jahren nach Injektion hinaus erhalten bleiben.

Die erzielten Erfolge der Gentherapie beim Menschen beschränken sich bislang auf den Bereich der Stäbchen und waren zudem nicht objektiv messbar (Abschnitt 1.5.3). Der behandelte Bereich beim Menschen lag meistens im zentralen Teil der Retina, da hier die Zellen am besten erhalten sind. Die zentrale Retina, vor allem die Fovea, besteht beim Menschen überwiegend aus Zapfen. Zusätzlich existiert ein Blauzapfen freier Bereich innerhalb der Fovea (Bumsted & Hendrickson 1999). Die Diskrepanz zwischen den caninen und humanen Studien könnte somit durch die anatomischen Gegebenheiten zustande kommen. Dies postulieren auch bereits Mowat und Kollegen (Mowat et al. 2013).

Durch die Untersuchung eines Tieres im weit fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung (96 Monate) konnte auch demonstriert werden, dass die Therapie das *sprouting* von Stäbchenbipolar- und Horizontalzellen im zentralen superioren Bereich der Retina vermindern kann. Dies spricht für eine geringere Degeneration von Zellen im behandelten Bereich. OCT-Studien bei behandelten Tieren vergleichbaren Alters und Zeitpunkt nach Therapie kamen zu demselben Ergebnis für die Injektion im superioren Bereich der Retina (Cideciyan et al. 2013). Es zeigten sich nur geringe Unterschiede in der ONL-Schichtdicke zwischen dem behandelten Bereich der betroffenen Tiere und dem äquivalenten Bereich in der gesunden Hundenetzhaut.

In der Studie von Cideciyan und Kollegen wurde ebenfalls ein Tier mittels OCT untersucht, bei dem die Behandlung zum größten Teil im inferioren Retinabereich stattgefunden hat. Bei diesem Tier konnte man eine verminderte Abnahme der ONL-Schichtdicke im Vergleich zum kontralateralen nicht behandelten Auge feststellen. Im Vergleich mit der gesunden Retina hingegen ist die ONL-Schichtdicke, vor allem in der Peripherie, vermindert (Cideciyan et al. 2013). Daraus lässt sich schließen, dass der therapeutische Effekt auf Zellen beschränkt ist, die sich nicht in einem aktiven neurodegenerativen Stadium befinden, was beim Hund in der zentralen superioren und inferioren Retina im Alter von bis zu 2 Jahren (überwiegend genutzter Zeitraum zur Behandlung) der Fall ist. Diese Theorie lässt sich dadurch bestätigen, dass bei Hunden, welche zu einem späteren Zeitpunkt (Alter zwischen 4 und 6 Jahren) der Erkrankung behandelt wurden, nur ein funktioneller Therapieeffekt im ERG messbar war. Es konnte sowohl immunohistochemisch als auch im OCT kein positiver Effekt durch die Therapie auf die Anzahl der Stäbchen und Zapfen bzw. die Dicke der ONL festgestellt werden (Cideciyan et al. 2013; Annear et al. 2013).

In den gentherapeutischen Studien beim Menschen fanden die Behandlungen in einem Alter zwischen fünf und 45 Jahren statt (Bainbridge et al. 2008; Maguire et al. 2009; Jacobson et al. 2012). Da es bei Patienten mit Mutationen im RPE65 Gen früh zu morphologischen Veränderungen kommt (Lorenz et al. 2000), befanden sich die

Netzhäute der Patienten bereits in einem aktiven neurodegenerativen Zustand. Von daher kann es sein, dass die Photorezeptoren trotz erfolgreicher Therapie weiterhin aufgrund des zuvor aktivierten Apoptosemechanismus degenerieren. Hierfür spricht die Untersuchung von erfolgreich behandelten Patienten mittels OCT (Cideciyan et al. 2013). Es zeigte sich bei diesen Patienten, dass es trotz erfolgreicher Therapie zu einer fortlaufenden Abnahme der ONL-Schichtdicke im injizierten Bereich kommt.

## 4.5 Fazit

Die hier durchgeführte Studie hat gezeigt, dass es im caninen Modell für RPE65-Mutationen bereits im frühen Stadium der Erkrankung zu erheblichen Veränderungen in der Netzhaut kommt, die sich im weiteren Verlauf der Erkrankung verstärken. Durch die Gentherapie können diese Veränderungen nur zum Teil aufgehalten werden.

Um eine Verbesserung der Therapie zu erhalten, ist es notwendig die Abläufe im visuellen Zyklus der Zapfen besser zu verstehen, um den therapeutischen Effekt auf diese Zellen zu maximieren. Des Weiteren ist ein verbessertes Verständnis der Degenerationsmechanismen der Zellen bei retinalen Erkrankungen erforderlich, um den degenerativen Progress frühzeitig aufzuhalten, eventuell durch zusätzliche protektive Stoffe zur Gentherapie.

Es konnte erstmals gezeigt werden, dass das Degenerationsmuster der retinalen Zellen stark von der Lokalisation im Hundeauge beeinflusst ist. Um einen besseren Vergleich zur Situation im menschlichen Auge zu erhalten, ist es ratsam Hunde im Alter von etwa zwei Jahren in der inferioren Retina gentherapeutisch zu behandeln und genauer zu untersuchen.

## 5 Zusammenfassung

Die frühkindliche Netzhautdegeneration, welche eine seltene Form von Blindheit beim Menschen darstellt, wird unter anderem durch Mutationen im RPE65 Gen ausgelöst. Sie ist durch verschiedene visuelle Einschränkungen innerhalb der ersten Lebensjahre charakterisiert. Der schwedische Briard ist ein natürlich vorkommendes Hundemodell für diese Erkrankung. Adenoassoziierte Viren (AAV) vermittelte Gentherapie führt bei diesen Hunden zur Wiederherstellung der Stäbchen- und Zapfenfunktion im behandelten Auge. Bei humanen Patienten hingegen ist der therapeutische Effekt gering. Das Ziel dieser Studie war es eine ausführliche immunohistochemische Untersuchung der caninen *RPE65*<sup>-/-</sup> Retina vor und nach erfolgreicher AAV vermittelter Gentherapie durchzuführen, um ein besseres Verständnis der Erkrankung zu erhalten. Es wurden die Retinae von 14 Hunden (n=21) untersucht, wobei drei Wildtyptiere und 11 betroffene Tiere verwendet wurden. Vier der betroffenen Tiere hatten zuvor eine unilaterale Injektion eines Vektors erhalten, welcher eine Kopie des humanen RPE65 Gens beinhaltet. Die Hunde wurden im Alter zwischen drei und 96 Monaten euthanasiert. Es wurden verschiedene Marker als Primärantikörper verwendet, um die unterschiedlichen Zellarten der Retina zu untersuchen

Im Alter von zwei Jahren weisen die betroffenen Tiere einen einheitlichen Verlust von L/M-Zapfen über die gesamte Retina auf. Die S-Zapfen hingegen sind vor allem im zentralen superioren Retinabereich vermindert. Innerhalb beider Zapfentypen kommt es zu einer Delokalisation der Opsine. In der peripheren Retina kommt es zur Delokalisation von Bandsynapsen in die äußere nukleäre Schicht. Im weiteren Verlauf der Erkrankungen breiten sich die gefundenen Veränderungen über die gesamte Retina aus. Nach erfolgreicher Gentherapie ist eine Relokalisation der Zapfenopsine zu erkennen. Im behandelten Bereich kommt es zur Reduzierung des S-Zapfenverlust und der Delokalisation der Bandsynapsen.

Bereits im frühen Stadium der Erkrankung treten somit massive Veränderungen in der Retina aus. Die Veränderungen verschlimmern sich im weiteren Verlauf der Erkrankung und können nicht alle durch die Gentherapie aufgehalten werden. Der therapeutische Effekt auf die S-Zapfen ist höher als auf die L/M-Zapfen. Beim Menschen allerdings wird die zentrale Sehschärfe durch die L/M-Zapfen bestimmt. Der eingeschränkte therapeutische Effekt auf die L/M-Zapfen könnte somit eine Erklärung für die unterschiedlichen Therapieerfolge bei Hund und Mensch darstellen.

## 6 Summary

Mutations in the RPE65 gene are associated with early onset severe retinal dystrophy, a rare form of blindness in humans that is characterized by severe visual impairment within the first years of life. The Swedish Briard dog is a naturally occurring animal model for this disease. Adeno-associated virus (AAV) mediated gene therapy in these dogs resulted in tremendous treatment benefits in terms of restoration of function in both, rods and cones. However, treatment benefit in humans is less pronounced. The aim of the study was to do an extensive immunohistochemical analysis of the canine *RPE65*<sup>-/-</sup> retina before and after successful AAV mediated gene therapy in order to obtain a better understanding of the disease.

Retinae from 14 dogs (n=21) were used in this study, three unaffected and 11 affected animals. Four of the affected dogs were treated unilaterally with AAV vector carrying the human RPE65 gene. Dogs were euthanized at various ages, between three and 96 months. Different markers were used as primary antibodies to mark diverse cells in the retina.

At two years of age in the affected dogs L/M-cone opsin expression was uniformly reduced over the whole retina however S-cone opsin expression loss was limited to superior central part of the retina. Opsin delocalization was observed in L/M and S cones. Delocalization of ribbon synapses to the outer nuclear layer was founded in the peripheral retina. In the further progression of the disease, these changes were determined in the entire retina. After successful gene therapy relocalization of cone opsins were discovered in both L/M and S cones. Reduction of both S cone loss and delocalization of ribbon synapses was observed in the treated area.

There are remarkable changes in the retina at early stage of the disease. The changes extend with age and cannot all delayed by gene therapy. While S cones have a strong treatment effect, in contrast L/M cones seem to benefit less efficiently from gene therapy. In humans the central visual acuity is L/M cone dependent. The limited effect on L/M cones might be an explanation of the discrepancy between the canine and human gene therapy studies.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

11-cis RAL	11-cis Retinal
11-cis ROL	11-cis Retinol
AAV	Adenoassoziierte Viren
AK	Antikörper
all-trans RAL	all-trans Retinal
all-trans ROL	all-trans Retinol
Aqua dest	destilliertes Wasser
BSA	Bovines Serum Albumin
CC	Verbindungscilium
CRALBP	zelluläres Retinaldehydrobindeprotein
CtBP2	C-terminiertes Bindepotein 2
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DES1	Dihydroceramidedesaturase-1
dk	Donkey; Esel
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EOSRD	frühkindliche Netzhautdegeneration
ERG	Elektroretinogramm
GABA	gamma-Aminobuttersäure
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GluR5	Glutamatrezeptoruntereinheit 5
gp	Guinea pig; Meerschweinchen
GS	Glutamin-Synthetase
gt	Goat; Ziege
HCl	Salzsäure
ILM	Innere limitierende Membran
INL	Innere nukleäre Schicht
IPL	Innere plexiforme Schicht
IS	Innensegment
ITR	inverted terminal repeat
KCl	Kaliumchlorid
L/M-Zapfen	Rotgrünzapfen
LCA	Lebersche kongenitale Amaurose
LRAT	Lecithin Retinol Acyltransferase
L-Zapfen	Rotzapfen
ms	Mouse; Maus
M-Zapfen	Grünzapfen
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	Di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NDS	Normal Donkey Serum
OCT	Optische Kohärenztomographie
OLM	Äußere limitierende Membran
ONL	Äußere nukleäre Schicht
OPL	Äußere plexiforme Schicht
OS	Außensegment
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PNA	Peatnut Agglutinin

rb .....Rabbit ; Kaninchen  
RDH..... *Retinaldehydrogenase*  
RPE ..... *Retinales Pigmentepithel*  
RT ..... *Raumtemperatur*  
S-Zapfen..... *Blauzapfen*  
TBS..... *Tris-gepufferte Salzlösung*  
TRIS..... *Tris(hydroxymethyl)-aminomethan*

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Schematische Darstellung des menschlichen Auges .....	2
Abbildung 1.2 Aufbau der Säugetierretina .....	3
Abbildung 1.3 Die Aufgaben des retinalen Pigmentepithels .....	4
Abbildung 1.4 Tapetum lucidum fibrosum .....	5
Abbildung 1.5 Schematische Darstellung der Photorezeptoren .....	7
Abbildung 1.6 Spektrale Sensitivität der Photorezeptoren beim Primaten .....	8
Abbildung 1.7 Zapfendichte in der Hunderetina .....	9
Abbildung 1.8 Bipolarzelltypen.....	10
Abbildung 1.9 Kalziumbindeproteine in der Mausretina .....	12
Abbildung 1.10 Müllerzellen in der Mausretina.....	14
Abbildung 1.11 Visueller Zyklus.....	16
Abbildung 1.12 Optische Kohärenztomographie bei einem augengesunden Probanden und einem RPE65 Patienten.....	19
Abbildung 1.13 Funktionelle Untersuchungen der Hundenetzhaut im Alter von 2 Jahren .....	20
Abbildung 1.14 Histologische Untersuchung der <i>RPE65<sup>-/-</sup></i> Retina .....	21
Abbildung 1.15 Gentherapeutische Studien im Jahr 2012 im Überblick.....	23
Abbildung 1.16 Schematische Darstellung der Gentherapie .....	25
Abbildung 1.17 Erfolgreiche Gentherapie beim <i>RPE65<sup>-/-</sup></i> Hund .....	28
Abbildung 2.1 Präparationsschema des Hundeauges .....	44
Abbildung 3.1 RPE65-Antikörper.....	51
Abbildung 3.2 RPE Marker.....	52
Abbildung 3.3 L/M-Opsin.....	53
Abbildung 3.4 S-Opsin .....	53
Abbildung 3.5 Weitere Photorezeptorenmarker .....	54
Abbildung 3.6 Synaptische Marker .....	55
Abbildung 3.7 Bipolarzellmarker .....	56
Abbildung 3.8 Kalziumbindeproteine .....	57
Abbildung 3.9 Müllerzellmarker.....	58
Abbildung 3.10 Heatmapdarstellung der S-Zapfenverteilung .....	60
Abbildung 3.11 Heatmapdarstellung der L/M-Zapfenverteilung.....	61
Abbildung 3.12 Quantitative Analyse der Zapfenverteilung .....	62
Abbildung 3.13 Zapfenopsine im Vergleich im Alter von zwei Jahren .....	64
Abbildung 3.14 Rhodopsin im Alter von zwei Jahren im Vergleich.....	65
Abbildung 3.15 Synapsenanalyse Stäbchenbipolarzellen .....	66

Abbildung 3.16 Synapsenanalyse Horizontalzellen .....	67
Abbildung 3.17 Balkendiagramm zur Synapsenanalyse .....	68
Abbildung 3.18 Scatterplot zur Synapsenanalyse .....	68
Abbildung 3.19 Zapfenendfüßchen und Zapfenbipolarzellen.....	69
Abbildung 3.20 Photorezeptoren im zeitlichen Verlauf der Erkrankung .....	71
Abbildung 3.21 Stäbchen-Bipolarzellen im zeitlichen Verlauf der Erkrankung.....	73
Abbildung 3.22 Horizontalzellen im zeitlichen Verlauf der Erkrankung .....	74
Abbildung 3.23 Zapfen im Vergleich vor und nach Gentherapie .....	76
Abbildung 3.24 S-Zapfen nach Gentherapie .....	78
Abbildung 3.25 L/M Zapfen nach Gentherapie.....	79
Abbildung 3.26 Bipolarzellen nach Gentherapie .....	81
Abbildung 3.27 Horizontalzellen nach Gentherapie .....	82

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Virale Vektoren für den Einsatz am Auge.....	24
Tabelle 1.2 Zellulärer Tropismus der rAAV-Serotypen.....	26
Tabelle 1.3 Überblick der ersten drei Phase I-Studien.....	29
Tabelle 2.1 Versuchstiere .....	32
Tabelle 2.2 Verwendete Chemikalien und Reagenzien .....	33
Tabelle 2.3 Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	34
Tabelle 2.4 Puffer und Lösungen.....	35
Tabelle 2.5 Getestete Primärantikörper.....	36
Tabelle 2.6 Verwendete Sekundärantikörper und fluoreszenzmarkierte Reagenzien ..	39
Tabelle 2.7 Verwendete Geräte und Hilfsmittel .....	40
Tabelle 4.1 Positiv getestete Antikörper .....	83
Tabelle 4.2 Negativ getestet Antikörper.....	85

## 10 Literaturverzeichnis

Acland, G.M. et al., 2001. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nature genetics*, 28(1), pp.92–5.

Acland, G.M. et al., 2005. Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 12(6), pp.1072–82.

Aguirre, G.D. et al., 1998. Congenital stationary night blindness in the dog: common mutation in the RPE65 gene indicates founder effect. *Molecular vision*, 4(October), p.23.

Ahnelt, P., Keri, C. & Kolb, H., 1990. Identification of pedicles of putative blue-sensitive cones in the human retina. *The Journal of comparative neurology*, 293(1), pp.39–53.

Alexander, J.J. & Hauswirth, W.W., 2008. Adeno-associated viral vectors and the retina. *Advances in experimental medicine and biology*, 613, pp.121–8.

Amado, D. et al., 2010. Safety and efficacy of subretinal readministration of a viral vector in large animals to treat congenital blindness. *Science translational medicine*, 2(21), p.21ra16.

Annear, M.J. et al., 2011. Gene therapy in the second eye of RPE65-deficient dogs improves retinal function. *Gene therapy*, 18(1), pp.53–61.

Annear, M.J. et al., 2013. Successful Gene Therapy in Older Rpe65-Deficient Dogs Following Subretinal Injection of an Adeno-Associated Vector Expressing RPE65. *Human gene therapy*, 24(10), pp.883–93.

Bainbridge, J.W.B. et al., 2008. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *The New England journal of medicine*, 358(21), pp.2231–9.

Batten, M.L. et al., 2004. Lecithin-retinol acyltransferase is essential for accumulation of all-trans-retinyl esters in the eye and in the liver. *The Journal of biological chemistry*, 279(11), pp.10422–32.

- Båvik, C.O. et al., 1993. The retinal pigment epithelial membrane receptor for plasma retinol-binding protein. Isolation and cDNA cloning of the 63-kDa protein. *The Journal of biological chemistry*, 268(27), pp.20540–6.
- Beltran, W. a et al., 2006. A frameshift mutation in RPGR exon ORF15 causes photoreceptor degeneration and inner retina remodeling in a model of X-linked retinitis pigmentosa. *Investigative ophthalmology & visual science*, 47(4), pp.1669–81.
- Bemelmans, A.-P. et al., 2006. Lentiviral gene transfer of RPE65 rescues survival and function of cones in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *PLoS medicine*, 3(10), p.e347.
- Berson, D.M., Dunn, F.A. & Takao, M., 2002. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5557), pp.1070–3.
- Bloomfield, S.A. & Miller, R.F., 1982. A physiological and morphological study of the horizontal cell types of the rabbit retina. *The Journal of comparative neurology*, 208(3), pp.288–303.
- Bok, D., 1993. The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *Journal of cell science. Supplement*, 17, pp.189–95.
- Bonilha, V.L. et al., 2011. Histopathology and functional correlations in a patient with a mutation in RPE65, the gene for retinol isomerase. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(11), pp.8381–92.
- Boycott, B.B. & Hopkins, J.M., 1981. Microglia in the retina of monkey and other mammals: its distinction from other types of glia and horizontal cells. *Neuroscience*, 6(4), pp.679–88.
- Boycott, B.B. & Wässle, H., 1991. Morphological Classification of Bipolar Cells of the Primate Retina. *The European journal of neuroscience*, 3(11), pp.1069–1088.
- Boycott, B.B. & Wässle, H., 1974. The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina. *The Journal of physiology*, 240(2), pp.397–419.

- Buch, P.K. et al., 2006. In contrast to AAV-mediated Cntf expression, AAV-mediated Gdnf expression enhances gene replacement therapy in rodent models of retinal degeneration. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 14(5), pp.700–9.
- Bumsted, K. & Hendrickson, A., 1999. Distribution and development of short-wavelength cones differ between Macaca monkey and human fovea. *The Journal of comparative neurology*, 403(4), pp.502–16.
- Cajal, R. y, 1911. *Histologie du System Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*,
- Cavazzana-Calvo, M. et al., 2000. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5466), pp.669–72.
- Chen, C., Thompson, D.A. & Koutalos, Y., 2012. Reduction of all-trans-retinal in vertebrate rod photoreceptors requires the combined action of RDH8 and RDH12. *The Journal of biological chemistry*, 287(29), pp.24662–70.
- Chijiwa, T., Ishibashi, T. & Inomata, H., 1990. Histological study of choroidal melanocytes in animals with tapetum lucidum cellulosum. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology*, 228(2), pp.161–8.
- Chun, M.H. et al., 1996. The synaptic complex of cones in the fovea and in the periphery of the macaque monkey retina. *Vision research*, 36(21), pp.3383–95.
- Cideciyan, A. V et al., 2008. Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(39), pp.15112–7.
- Cideciyan, A. V et al., 2013. Human retinal gene therapy for Leber congenital amaurosis shows advancing retinal degeneration despite enduring visual improvement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(6), pp.E517–25.
- Cideciyan, A. V, 2010. Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations and its treatment with gene therapy. *Progress in retinal and eye research*, 29(5), pp.398–427.

- Cideciyan, A. V et al., 2009. Vision 1 year after gene therapy for Leber's congenital amaurosis. *The New England journal of medicine*, 361(7), pp.725–7.
- Conley, S.M. & Naash, M.I., 2010. Nanoparticles for retinal gene therapy. *Progress in retinal and eye research*, 29(5), pp.376–97.
- Crabb, J.W. et al., 1991. Topological and epitope mapping of the cellular retinaldehyde-binding protein from retina. *The Journal of biological chemistry*, 266(25), pp.16674–83.
- Deng, W.-T. et al., 2005. Adeno-associated virus-mediated expression of vascular endothelial growth factor peptides inhibits retinal neovascularization in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Human gene therapy*, 16(11), pp.1247–54.
- Dowling, J.E., 2012a. Retinal Cells and Information Processing. In *The Retina*. The Belknap Press of Harvard University Press, pp. 17–51.
- Dowling, J.E., 2012b. Wiring of the Retina. In *The Retina*. The Belknap Press of Harvard University Press, pp. 52–95.
- Dowling, J.E. & Boycott, B.B., 1966. Organization of the primate retina: electron microscopy. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain)*, 166(2), pp.80–111.
- Dreher, Z., Robinson, S.R. & Distler, C., 1992. Müller cells in vascular and avascular retinæ: a survey of seven mammals. *The Journal of comparative neurology*, 323(1), pp.59–80.
- Eliasieh, K., Liets, L.C. & Chalupa, L.M., 2007. Cellular reorganization in the human retina during normal aging. *Investigative ophthalmology & visual science*, 48(6), pp.2824–30.
- Elliott, J.H. & Futterman, S., 1963. Fluorescence in the Tapetum of the Cat's Eye. Identification, Assay and Location of Riboflavin in the Tapetum and a proposed Mechanism by which it may facilitate Vision. *Archives of ophthalmology*, 70, pp.531–4.

- Euler, T. et al., 2009. Eyecup scope--optical recordings of light stimulus-evoked fluorescence signals in the retina. *Pflügers Archiv: European journal of physiology*, 457(6), pp.1393–414.
- Fan, J. et al., 2008. Rpe65<sup>-/-</sup> and Lrat<sup>-/-</sup> mice: comparable models of leber congenital amaurosis. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(6), pp.2384–9.
- Fliegauf, M., Benzing, T. & Omran, H., 2007. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(11), pp.880–93.
- Ford, M. et al., 2003. Gene transfer in the RPE65 null mutation dog: relationship between construct volume, visual behavior and electroretinographic (ERG) results. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*, 107(1), pp.79–86.
- Gallego, A., 1971. Horizontal and amacrine cells in the mammal's retina. *Vision research*, Suppl 3, pp.33–50.
- Ginn, S.L. et al., 2013. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. *The journal of gene medicine*, 15(2), pp.65–77.
- Gouras, P., 1971. The function of the midget cell system in primate color vision. *Vision research*, Suppl 3(3), pp.397–410.
- Gouras, P. & Ekesten, B., 2004. Why do mice have ultra-violet vision? *Experimental eye research*, 79(6), pp.887–92.
- Grehn, F., 1995. Das Auge. In *Augenheilkunde*. Heidelberg: Springer, pp. 3–10.
- Grimm, C. et al., 2002. HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nature medicine*, 8(7), pp.718–24.
- Gu S., Thompson D., Srikumari C.R, 1997. Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nature*.
- Hack, I. & Peichl, L., 1999. Horizontal cells of the rabbit retina are non-selectively connected to the cones. *The European journal of neuroscience*, 11(7), pp.2261–74.
- Hartong, D.T., Berson, E.L. & Dryja, T.P., 2006. Retinitis pigmentosa. *Lancet*, 368(9549), pp.1795–809.

- Hauswirth, W.W. et al., 2008. Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. *Human gene therapy*, 19(10), pp.979–90.
- Haverkamp, S. et al., 2003. Immunocytochemical description of five bipolar cell types of the mouse retina. *The Journal of comparative neurology*, 455(4), pp.463–76.
- Haverkamp, S. et al., 2006. Synaptic plasticity in CNGA3(-/-) mice: cone bipolar cells react on the missing cone input and form ectopic synapses with rods. *The Journal of neuroscience*, 26(19), pp.5248–55.
- Haverkamp, S. & Wässle, H., 2000. Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *The Journal of comparative neurology*, 424(1), pp.1–23.
- Hecht, S., Schlaer, S. & Pirenne, M.H., 1942. ENERGY, QUANTA, AND VISION. *The Journal of general physiology*, 25(6), pp.819–40.
- Hernández, M. et al., 2010. Altered expression of retinal molecular markers in the canine RPE65 model of Leber congenital amaurosis. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(12), pp.6793–802.
- Huang, J., Possin, D.E. & Saari, J.C., 2009. Localizations of visual cycle components in retinal pigment epithelium. *Molecular vision*, 15(December 2008), pp.223–34.
- Jacobs, G.H. et al., 1993. Photopigments of dogs and foxes and their implications for canid vision. *Visual neuroscience*, 10(1), pp.173–80.
- Jacobs, G.H., 2008. Primate color vision: a comparative perspective. *Visual neuroscience*, 25(5-6), pp.619–33.
- Jacobson, S.G. et al., 2009. Defining the residual vision in leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations. *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(5), pp.2368–75.
- Jacobson, S.G. et al., 2012. Gene therapy for leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years. *Archives of ophthalmology*, 130(1), pp.9–24.

- Jacobson, S.G. et al., 2007. Human cone photoreceptor dependence on RPE65 isomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(38), pp.15123–8.
- Jacobson, S.G. et al., 2008. Photoreceptor layer topography in children with leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(10), pp.4573–7.
- Jeon, C.J., Strettoi, E. & Masland, R.H., 1998. The major cell populations of the mouse retina. *The Journal of neuroscience*, 18(21), pp.8936–46.
- Jin, M. et al., 2005. Rpe65 is the retinoid isomerase in bovine retinal pigment epithelium. *Cell*, 122(3), pp.449–59.
- Kaylor, J.J. et al., 2013. Identification of DES1 as a vitamin A isomerase in Müller glial cells of the retina. *Nature chemical biology*, 9(1), pp.30–6.
- Kiser, P.D. & Palczewski, K., 2010. Membrane-binding and enzymatic properties of RPE65. *Progress in retinal and eye research*, 29(5), pp.428–42.
- Klein, D. et al., 2014. Immuno-histochemical analysis of rod and cone reaction to RPE65 deficiency in the inferior and superior canine retina. *PloS one*, 9(1), p.e86304.
- Kolb, H., 2009. Cone Pathways through the Retina. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*, 6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11529/>.
- Kolb, H., 2003. How the Retina Works. *American Scientist*, 91(1), p.28.
- Kolb, H., 2007a. Inner Plexiform Layer. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11536/>.
- Kolb, H., 2007b. Outer Plexiform Layer. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*, (1885). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11518/>.
- Kostic, C. et al., 2011. Gene therapy regenerates protein expression in cone photoreceptors in Rpe65(R91W/R91W) mice. *PloS one*, 6(2), p.e16588.

- Kuck, D., Kern, A. & Kleinschmidt, J. a, 2007. Development of AAV serotype-specific ELISAs using novel monoclonal antibodies. *Journal of virological methods*, 140(1-2), pp.17–24.
- Lai, C.C. et al., 2001. Suppression of choroidal neovascularization by adeno-associated virus vector expressing angiostatin. *Investigative ophthalmology & visual science*, 42(10), pp.2401–7.
- Lau, D. et al., 2000. Retinal degeneration is slowed in transgenic rats by AAV-mediated delivery of FGF-2. *Investigative ophthalmology & visual science*, 41(11), pp.3622–33.
- Lesiuk, T.P. & Braekevelt, C.R., 1983. Fine structure of the canine tapetum lucidum. *Journal of anatomy*, 136(Pt 1), pp.157–64.
- Leventhal, A.G., Rodieck, R.W. & Dreher, B., 1981. Retinal ganglion cell classes in the Old World monkey: morphology and central projections. *Science (New York, N.Y.)*, 213(4512), pp.1139–42.
- Lewin, A.S. et al., 1998. Ribozyme rescue of photoreceptor cells in a transgenic rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nature medicine*, 4(8), pp.967–71.
- Liets, L.C. et al., 2006. Dendrites of rod bipolar cells sprout in normal aging retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(32), pp.12156–60.
- Long, K.O. & Aguirre, G.D., 1991. The cone matrix sheath in the normal and diseased retina: cytochemical and biochemical studies of peanut agglutinin-binding proteins in cone and rod-cone degeneration. *Experimental eye research*, 52(6), pp.699–713.
- Lorenz, B. et al., 2008. A comprehensive clinical and biochemical functional study of a novel RPE65 hypomorphic mutation. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(12), pp.5235–42.
- Lorenz, B. et al., 2012. Chromatic pupillometry dissects function of the three different light-sensitive retinal cell populations in RPE65 deficiency. *Investigative ophthalmology & visual science*, 53(9), pp.5641–52.

- Lorenz, B. et al., 2000. Early-onset severe rod-cone dystrophy in young children with RPE65 mutations. *Investigative ophthalmology & visual science*, 41(9), pp.2735–42.
- Lorenz, B. et al., 2004. Lack of fundus autofluorescence to 488 nanometers from childhood on in patients with early-onset severe retinal dystrophy associated with mutations in RPE65. *Ophthalmology*, Aug 111(8), pp.1585–94.
- Lorenz, B., Preising, M. & Stieger, K., 2010. Retinal blinding disorders and gene therapy--molecular and clinical aspects. *Current gene therapy*, 10(5), pp.350–70.
- Ma, J. et al., 1998. Cloning and localization of RPE65 mRNA in salamander cone photoreceptor cells<sup>1</sup>. *Biochimica et biophysica acta*, 1443(1-2), pp.255–61.
- MacNeil, M.A. & Masland, R.H., 1998. Extreme diversity among amacrine cells: implications for function. *Neuron*, 20(5), pp.971–82.
- Maguire, A.M. et al., 2009. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*, 374(9701), pp.1597–605.
- Maguire, A.M. et al., 2008. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *The New England journal of medicine*, 358(21), pp.2240–8.
- Masland, R.H., 2012. The tasks of amacrine cells. *Visual neuroscience*, 29(1), pp.3–9.
- Mataruga, A., Kremmer, E. & Müller, F., 2007. Type 3a and type 3b OFF cone bipolar cells provide for the alternative rod pathway in the mouse retina. *The Journal of comparative neurology*, 502(6), pp.1123–37.
- McGee Sanftner, L.H. et al., 2001. Glial cell line derived neurotrophic factor delays photoreceptor degeneration in a transgenic rat model of retinitis pigmentosa. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 4(6), pp.622–9.
- Le Meur, G. et al., 2007. Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. *Gene therapy*, 14(4), pp.292–303.

- Moiseyev, G. et al., 2005. RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(35), pp.12413–8.
- Molday, R.S. & MacKenzie, D., 1983. Monoclonal antibodies to rhodopsin: characterization, cross-reactivity, and application as structural probes. *Biochemistry*, 22(3), pp.653–60.
- Mori, K. et al., 2002. AAV-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science*, 43(6), pp.1994–2000.
- Mowat, F.M. et al., 2013. RPE65 gene therapy slows cone loss in Rpe65-deficient dogs. *Gene therapy*, 20(5), pp.545–55.
- Mowat, F.M. et al., 2008. Topographical characterization of cone photoreceptors and the area centralis of the canine retina. *Molecular vision*, 14(December), pp.2518–27.
- Narfstrom, K., 2003a. Functional and Structural Recovery of the Retina after Gene Therapy in the RPE65 Null Mutation Dog. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(4), pp.1663–1672.
- Narfstrom, K., 2003b. In Vivo Gene Therapy in Young and Adult RPE65<sup>-/-</sup> Dogs Produces Long-Term Visual Improvement. *Journal of Heredity*, 94(1), pp.31–37.
- Narfström, K. et al., 2005. Assessment of structure and function over a 3-year period after gene transfer in RPE65<sup>-/-</sup> dogs. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*, 111(1), pp.39–48.
- Narfström, K., Wrigstad, A. & Nilsson, S.E., 1989. The Briard dog: a new animal model of congenital stationary night blindness. *The British journal of ophthalmology*, 73(9), pp.750–6.
- Nathans, J., Thomas, D. & Hogness, D.D., 1986. Molecular genetics of human color vision: the genes encoding blue, green, and red pigments. *Science*, 232(4747), pp.193–202.

- Nicoletti, A. et al., 1995. Molecular characterization of the human gene encoding an abundant 61 kDa protein specific to the retinal pigment epithelium. *Human molecular genetics*, 4(4), pp.641–9.
- O'Byrne, S.M. et al., 2005. Retinoid absorption and storage is impaired in mice lacking lecithin:retinol acyltransferase (LRAT). *The Journal of biological chemistry*, 280(42), pp.35647–57.
- Ogden, T.E., 1978. Nerve fiber layer astrocytes of the primate retina: morphology, distribution, and density. *Investigative ophthalmology & visual science*, 17(6), pp.499–510.
- Ollivier, F.J. et al., 2004. Comparative morphology of the tapetum lucidum (among selected species). *Veterinary ophthalmology*, 7(1), pp.11–22.
- OMIM, 2014. Online Mendelian Inheritance in Man. *McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD)*, 02.04.2014. Available at: <http://omim.org/>.
- Pang, J.-J. et al., 2005. Retinal degeneration 12 (rd12): a new, spontaneously arising mouse model for human Leber congenital amaurosis (LCA). *Molecular vision*, 11(August 2004), pp.152–62.
- Parker, R.O. & Crouch, R.K., 2010. Retinol dehydrogenases (RDHs) in the visual cycle. *Experimental eye research*, 91(6), pp.788–92.
- Peichl, L., 2005. Diversity of mammalian photoreceptor properties: adaptations to habitat and lifestyle? *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*, 287(1), pp.1001–12.
- Peichl, L., 1992. Topography of ganglion cells in the dog and wolf retina. *The Journal of comparative neurology*, 324(4), pp.603–20.
- Petersen-Jones, S.M., 2012. Viral vectors for targeting the canine retina: a review. *Veterinary ophthalmology*, pp.1–6.
- Puller, C., 2009. *Die synaptische Architektur der äußeren plexiformen Schicht der Säugetierretina*. Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.

- Qin, P. & Pourcho, R.G., 2001. Immunocytochemical localization of kainate-selective glutamate receptor subunits GluR5, GluR6, and GluR7 in the cat retina. *Brain research*, 890(2), pp.211–21.
- Raviola, E. & Gilula, N.B., 1975. Intramembrane organization of specialized contacts in the outer plexiform layer of the retina. A freeze-fracture study in monkeys and rabbits. *The Journal of cell biology*, 65(1), pp.192–222.
- Redmond, T.M. et al., 2005. Mutation of key residues of RPE65 abolishes its enzymatic role as isomerohydrolase in the visual cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(38), pp.13658–63.
- Redmond, T.M. et al., 1998. Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. *Nature genetics*, 20(4), pp.344–51.
- Reichenbach, A. & Bringmann, A., 2013. New functions of Müller cells. *Glia*, 61(5), pp.651–78.
- Sagara, H. & Hirosawa, K., 1991. Monoclonal antibodies which recognize endoplasmic reticulum in the retinal pigment epithelium. *Experimental eye research*, 53(6), pp.765–71.
- Samardzija, M. et al., 2008. R91W mutation in Rpe65 leads to milder early-onset retinal dystrophy due to the generation of low levels of 11-cis-retinal. *Human molecular genetics*, 17(2), pp.281–92.
- Sieving, P.A. et al., 2006. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(10), pp.3896–901.
- Sparkes, R.S. et al., 1992. Assignment of the gene (RLBP1) for cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP) to human chromosome 15q26 and mouse chromosome 7. *Genomics*, 12(1), pp.58–62.
- Stieger, K. & Lorenz, B., 2008. [The treatment of inherited dystrophies and neovascular disorders of the retina by rAAV-mediated gene therapy]. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, 225(12), pp.1009–23.

- Stieger, K. & Lorenz, B., 2014. Spezifische Gentherapie bei erblichen Netzhauterkrankungen—ein Update. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*.
- Strauss, O., 2005. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological reviews*, 85(3), pp.845–881.
- Sulaiman, P. et al., 2013. Kir2.4 surface expression and basal current are affected by heterotrimeric G-proteins. *The Journal of biological chemistry*, 288(10), pp.7420–9.
- Tang, P.H. et al., 2012. New insights into retinoid metabolism and cycling within the retina. *Progress in retinal and eye research*, (October), pp.1–16.
- Tang, P.H., Buhusi, M.C., et al., 2011. RPE65 is present in human green/red cones and promotes photopigment regeneration in an in vitro cone cell model. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(50), pp.18618–26.
- Tang, P.H., Wheless, L. & Crouch, R.K., 2011. Regeneration of photopigment is enhanced in mouse cone photoreceptors expressing RPE65 protein. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(28), pp.10403–11.
- Tessitore, A. et al., 2006. Preferential silencing of a common dominant rhodopsin mutation does not inhibit retinal degeneration in a transgenic model. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 14(5), pp.692–9.
- Testa, F. et al., 2013. Three-Year Follow-up after Unilateral Subretinal Delivery of Adeno-Associated Virus in Patients with Leber Congenital Amaurosis Type 2. *Ophthalmology*, 120(6), pp.1283–91.
- Veske, a et al., 1999. Retinal dystrophy of Swedish briard/briard-beagle dogs is due to a 4-bp deletion in RPE65. *Genomics*, 57(1), pp.57–61.
- Wang, J.-S. & Kefalov, V.J., 2011. The cone-specific visual cycle. *Progress in retinal and eye research*, 30(2), pp.115–28.
- Wang, Y. et al., 1992. A locus control region adjacent to the human red and green visual pigment genes. *Neuron*, 9(3), pp.429–40.

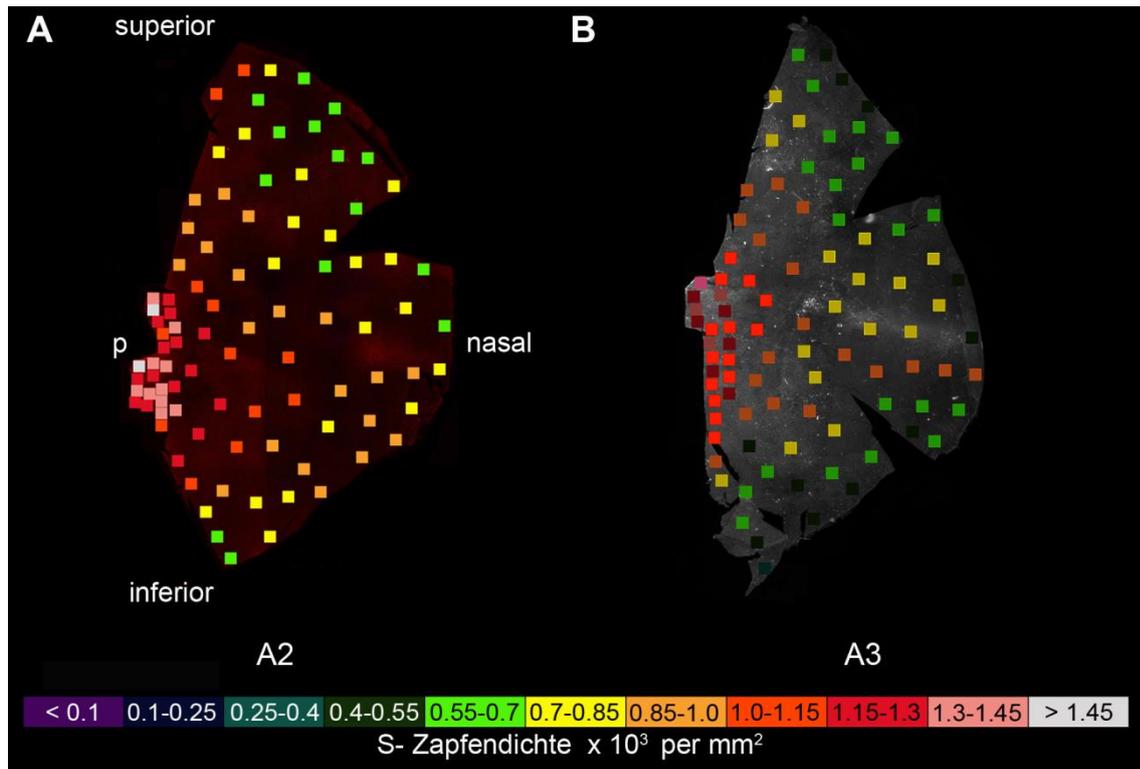
- Wässle, H., 2004. Parallel processing in the mammalian retina. *Nature reviews. Neuroscience*, 5(10), pp.747–57.
- Weber, M., 2003. Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery. *Molecular Therapy*, 7(6), pp.774–781.
- Weitzel, G. et al., 1955. Struktur der im Tapetum lucidum von Hund und Fuchs enthaltenen Zinkverbindung. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 299(Jahresband), pp.193–213.
- Wistuba, a et al., 1997. Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 assembly. *Journal of virology*, 71(2), pp.1341–52.
- Wright, A.F. et al., 2010. Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nature reviews. Genetics*, 11(4), pp.273–84.
- Wrigstad, A., Narfström, K. & Nilsson, S.E., 1994. Slowly progressive changes of the retina and retinal pigment epithelium in Briard dogs with hereditary retinal dystrophy. A morphological study. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*, 87(4), pp.337–54.
- Wrigstad, A., Nilsson, S.E. & Narfström, K., 1992. Ultrastructural changes of the retina and the retinal pigment epithelium in Briard dogs with hereditary congenital night blindness and partial day blindness. *Experimental eye research*, 55(6), pp.805–18.
- Wu, S.M., 1992. Feedback connections and operation of the outer plexiform layer of the retina. *Current opinion in neurobiology*, 2(4), pp.462–8.
- Wu, Z., Asokan, A. & Samulski, R.J., 2006. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 14(3), pp.316–27.
- Young, R.W., 1971. The renewal of rod and cone outer segments in the rhesus monkey. *The Journal of cell biology*, 49(2), pp.303–18.
- Zhang, H. et al., 2008. Trafficking of membrane-associated proteins to cone photoreceptor outer segments requires the chromophore 11-cis-retinal. *The*

*Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(15), pp.4008–14.

Zhang, T. et al., 2011. Cone opsin determines the time course of cone photoreceptor degeneration in Leber congenital amaurosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(21), pp.8879–84.

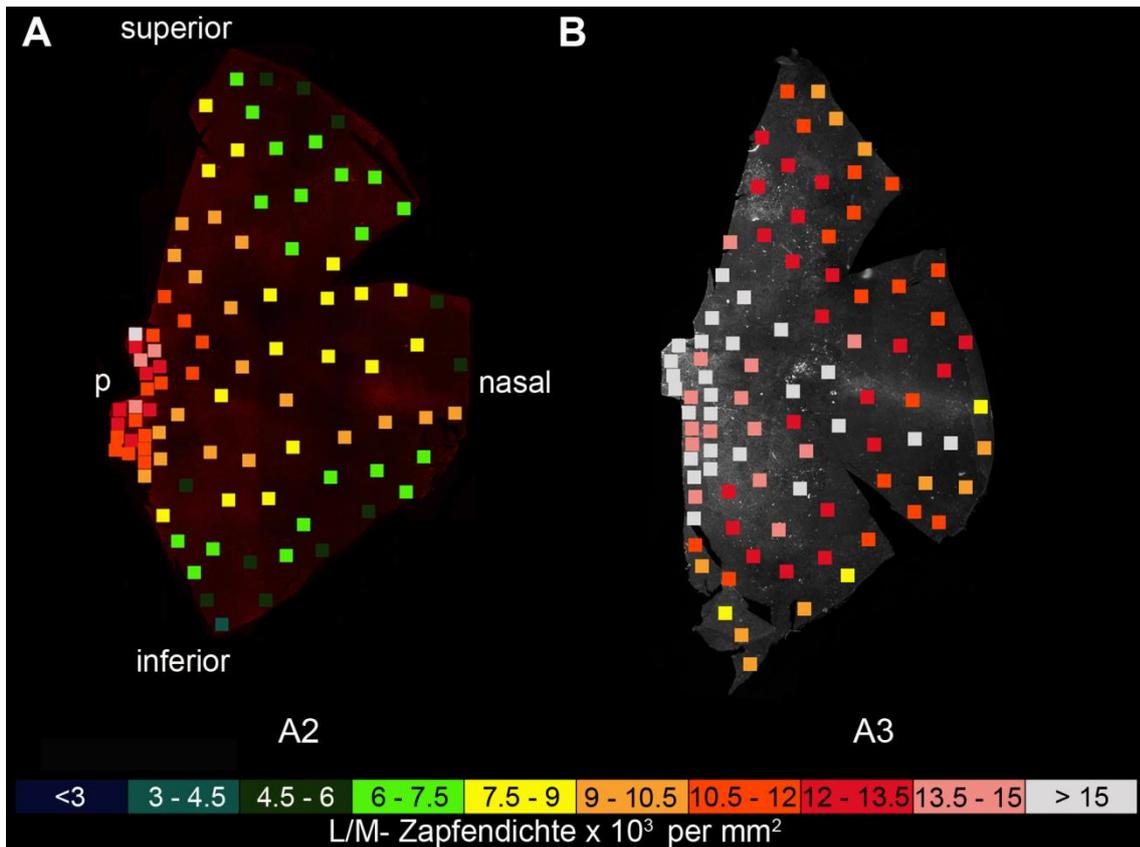
Znoiko, S.L. et al., 2002. Identification of the RPE65 protein in mammalian cone photoreceptors. *Investigative ophthalmology & visual science*, 43(5), pp.1604–9.

## 11 Anhang



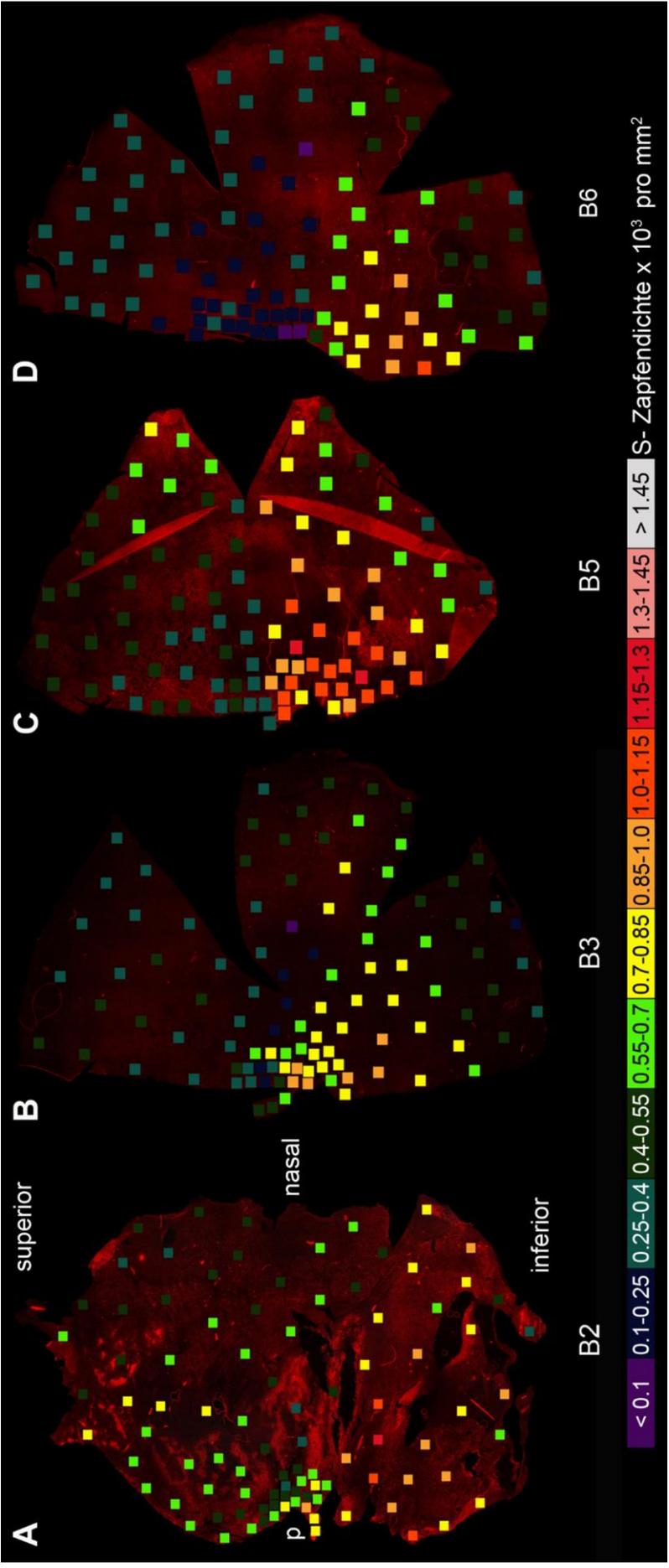
### Zusatzabbildung 1 S-Zapfenverteilung in den einzelnen Wildtyptieren

Darstellung der Flachpräparate der nasalen Retina der beiden untersuchten Wildtyptiere. Die S-Zapfendichte ist in der zentralen Retina am höchsten und nimmt zur Peripherie hin ab. Zwischen den zwei untersuchten Tieren bestehen individuelle Unterschiede in der Dichte der Zellen.



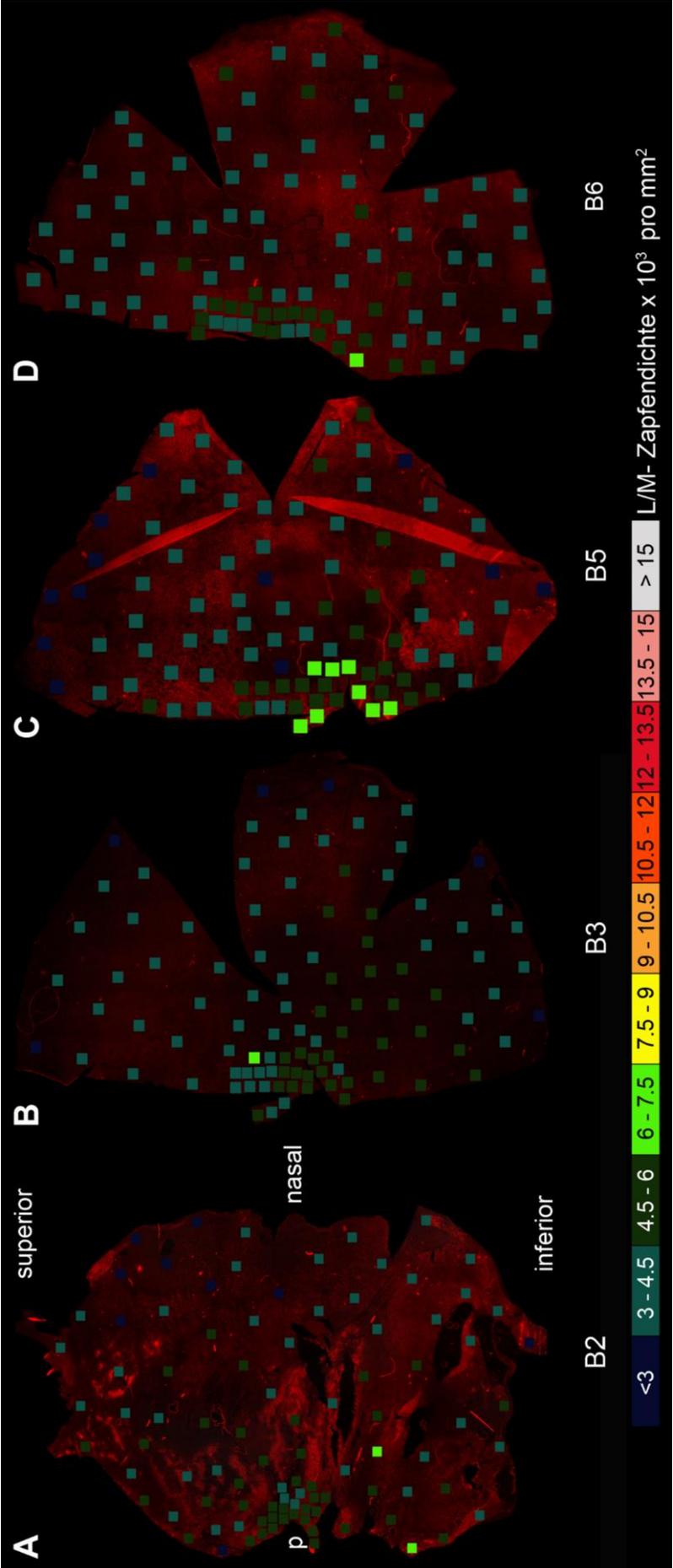
**Zusatzabbildung 2 L/M-Zapfenverteilung der einzelnen Wildtyptiere**

*Darstellung der Flachpräparate der nasalen Retina der beiden untersuchten Wildtyptiere. Die L/M-Zapfendichte ist in der zentralen Retina am höchsten und nimmt zur Peripherie hin ab. Zwischen den zwei untersuchten Tieren bestehen individuelle Unterschiede in der Dichte der Zellen.*

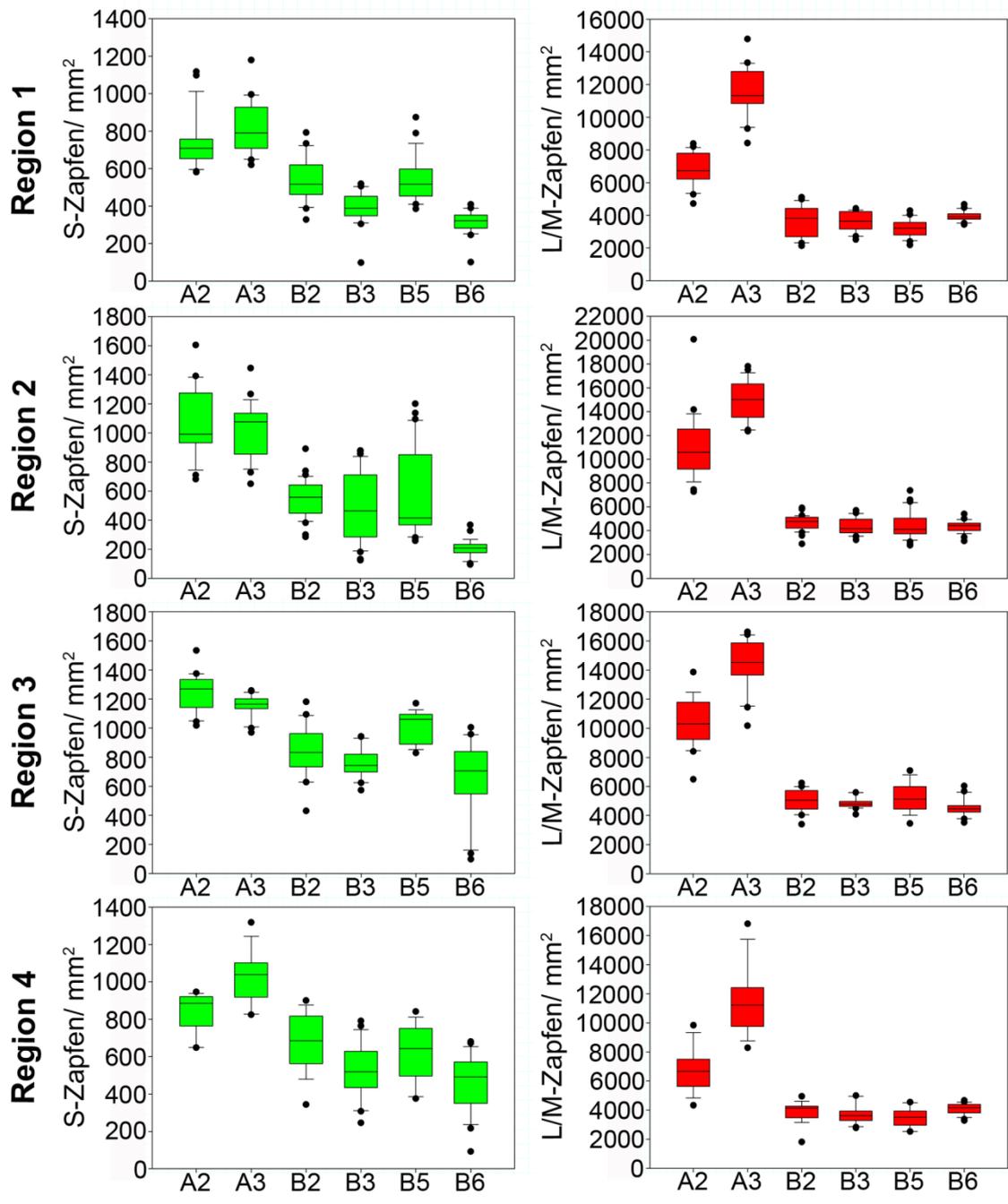


**Zusatzabbildung 3 S-Zapfenverteilung der einzelnen betroffenen Tiere**

Darstellung der Flachpräparate der nasalen Retina der vier untersuchten betroffenen Tiere. Es zeigt sich ein Verlust von S-Zapfen im superiores zentralen Bereich der Retina im Vergleich zum Wildtypier. Zwischen den einzelnen Hunden bestehen individuelle Unterschiede in der Abnahme der S-Zapfendichte.



**Zusatzabbildung 4 L/M-Zapfenverteilung der einzelnen betroffenen Tiere**  
 Darstellung der Flachpräparate der nasalen Retina der vier untersuchten betroffenen Tiere. Es zeigt sich ein gleichmäßiger Verlust von L/M-Zapfen über die gesamte untersuchte Retina im Vergleich zum Wildtypier. Es sind geringe individuelle Unterschiede in der Abnahme der LM-Zapfendichte zu erkennen.



**Zusatzabbildung 5 Boxplots zur Zapfenanalyse der einzelnen Tiere**

Sowohl in der S-Zapfendichte (grüne Boxplots) als auch in der L/M-Zapfendichte sind in den vier analysierten Regionen individuelle Schwankungen zu erkennen. Dies gilt für die Wildtyptiere (A2 und A3) sowie für die betroffenen Tiere (B2, B3, B5 und B6). Die Werte der RPE65<sup>-/-</sup> liegen in allen Bereichen für beide Zapfentypen unter den Werten der gesunden Tiere. Im Falle der L/M-Zapfen ist dieser Unterschied aber deutlicher, da es hier zu einem höheren Verlust kommt.

## 12 Publikationen und Präsentationen

### 12.1 Publikationen

2014 Klein D, Mendes-Madeira A, Schlegel P, Rolling F, Lorenz B, Haverkamp S, Stieger K; Immuno-Histochemical Analysis of Rod and Cone Reaction to RPE65 Deficiency in the Inferior and Superior Canine Retina; Plos One; 9(1), p.e86304

### 12.2 Präsentationen

#### 12.3 Vorträge

2010 Klein D; Analysis of the retinal morphology in the canine model for EOSRD due to mutations in the *RPE65* gene following AAV mediated gene therapy.; Jährliches Research Retreat der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen

2011 Klein D; Analyse der retinalen Morphologie am Briard Hundemodell für EOSRD aufgrund von *RPE65* Mutation vor und nach AAV vermittelter Gentherapie; Jährliches Research Retreat der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen

2012 Klein D; Morphologische Analyse von caninen *RPE65*<sup>-/-</sup> Retinae; Jährliches Research Retreat der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen

2012 Stieger K, Klein D, Rolling F, Haverkamp S, Lorenz B; Analyse quantitative et qualitative de la dégénérescence des cônes dans la rétine des chiens *RPE65*<sup>-/-</sup>; Réunion d'automne de la Société de Génétique Ophtalmologique Francophone, Genf Schweiz

2013 Klein, D; Untersuchungen der äußeren caninen *RPE65*<sup>-/-</sup> Retina vor und nach Gentherapie; Jährliches Research Retreat der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen

## 12.4 Poster

2011 Klein D, Giers B, Rolling F, Lorenz B, Haverkamp S, Stieger K; Immunohistochemical characterization of the outer plexiform layer in animal models of retinal degeneration and gene transfer; Pro Retina Meeting, Potsdam

2011 Stieger K, Klein D, Mendes-Madeira A, Rolling F, Lorenz B, Haverkamp S; Immunohistochemical characterization of the retina and the outer plexiform layer in Briard dogs with RPE65 deficiency; Annual Meeting ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology), Ford Lauderdale USA

2012 Klein D, Mendes-Madeira A, Rolling F, Lorenz B, Haverkamp S, Stieger K; Early S- and L/M-Cone Loss and L/M-Cone Opsin Delocalization in the Canine Model of RPE65 Deficiency; Annual Meeting ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology), Ford Lauderdale USA (Reisestipendium der Pro Retina Stiftung)

2012 Stieger K, Klein D, Mendes-Madeira A, Rolling F, Lorenz B, Haverkamp S; Early S- and L/M-Cone Loss and L/M-Cone Opsin Delocalization in the Canine Model of RPE65 Deficiency; Biennial Meeting of the International Society for Eye Research (ISER), Berlin Deutschland

2013 Stieger K, Klein D, Mendes-Madeira A, Rolling F, Lorenz B, Haverkamp S; Changes in S and L/M cone opsin expression in the RPE65 dog model following AAV mediated gene addition therapy; Annual Meeting ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology), Seattle USA

## 13 Ehrenwörtliche Erklärung

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

Gießen, den 06.04.2014

The image shows a handwritten signature in black ink on a white rectangular background. The signature reads "Daniela Klein" in a cursive script.

## 14 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dr. Knut Stieger für die großartige Betreuung meiner Arbeit, die Überlassung des interessanten Themas und die hilfreichen wissenschaftlichen Gespräche. Ich möchte mich auch für die immer offene Bürotür und das Vertrauen in meine Person bedanken.

PD Dr. Silke Haverkamp danke ich herzlichst für die hervorragende Einarbeitung in die Immunohistochemie und die Fluoreszenzmikroskopie sowie für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit. Ihre Geduld und kritische Hinterfragung der Ergebnisse haben mir sehr geholfen.

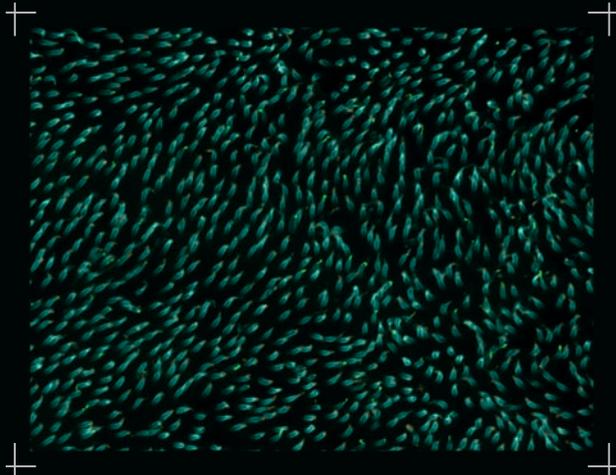
Bei Prof. Dr. Birgit Lorenz möchte ich mich herzlichst für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die wissenschaftliche Unterstützung in der gesamten Zeit bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Leo Peichl für die Einführung in die Anatomie des Hundeauges und die späteren Fachgespräche zu meiner Arbeit bedanken.

Ich danke Dr. Fabienne Rolling und ihrem Team für die Überlassung der Hundeaugen.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Labors für molekulare Ophthalmologie und dessen Leiter PD Dr. Markus Preising sowie allen Mitarbeitern der ehemaligen Abteilung Neuroanatomie des Max-Planck Institut für Hirnforschung, hier insbesondere Sonja Neumann, für die gute Zusammenarbeit, den wissenschaftlichen Austausch und das harmonische Arbeitsklima.

Zum Schluss möchte ich noch meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere meinen Eltern und meinem Partner Markus, vom ganzen Herzen dafür danken, dass sie mir uneingeschränkt während der gesamten Zeit zur Seite standen.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6289-7



9 783835 196289 7