

**Untersuchungen am caninen Modell für frühkindliche
Netzhautdegeneration nach erfolgreicher Gentherapie
mit verschiedenen AAV-Vektoren**

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

vorgelegt von Mariela Huthmacher
aus Bad Soden am Taunus

Gießen 2016

Aus der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Direktorin: Prof. Dr. Birgit Lorenz

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Knut Stieger
Gutachter: PD Dr. Hahn

Tag der Disputation: 20.06.2017

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
-------------------------	---

1 Einleitung	1
---------------------------	----------

1.1	Anatomie des Auges.....	2
1.2	Aufbau der Säugetiernetzhaut	3
1.2.1	Retinales Pigmentepithel	4
1.2.2	Tapetum lucidum	5
1.2.3	Photorezeptoren	5
1.2.4	Bipolarzellen	7
1.2.5	Horizontalzellen	8
1.2.6	Amakrinzellen	9
1.2.7	Ganglienzellen.....	10
1.2.8	Gliazellen.....	10
1.2.9	Reaktive Gliose.....	13
1.3	Phototransduktionskaskade und Visueller Zyklus	14
1.4	Erkrankungen aufgrund von Mutationen im RPE65 Gen.....	15
1.4.1	RPE65 Mangel beim Menschen.....	16
1.4.2	Kongenitale stationäre Nachtblindheit und RPE65 Mutation beim Hund	17
1.5	Gentherapie.....	19
1.5.1	Gentherapievektoren	20
1.5.2	Regulierbare Expression von Transgene	23
1.5.3	Gentherapie beim RPE65-Hundemodell	24
1.5.4	Gentherapie beim Menschen mit RPE65 Mutationen.....	26
1.6	Zielsetzung	27

2 Material und Methoden	29
--------------------------------------	-----------

2.1	Materialien	29
-----	-------------------	----

2.1.1	Versuchstiere und Injizierter Vektor	29
2.1.2	Weitere Materialien	31
2.2	Methodik der Vorarbeiten.....	37
2.2.1	Subretinale Injektion	37
2.2.2	Erfolgs- und Verlaufskontrollen	37
2.2.3	Vorbereitende Präparation der Augen.....	38
2.3	Methodik der eigenen Arbeit	38
2.3.1	Vorbereitende Maßnahmen für die Immunhistochemiefärbungen.....	38
2.3.1.1	Entnahme und Präparation der Retina.....	39
2.3.1.2	Herstellung von vertikalen Gefrierschnitten.....	40
2.3.2	Immunhistochemiefärbungen der Präparate	40
2.3.2.1	Färbung von vertikalen Gefrierschnitten.....	40
2.3.2.2	Flatmount Färbungen.....	41
2.3.3	Epi- und konfokale Laser Scanning Fluoreszenzmikroskopie	42
2.3.4	Bildbearbeitung und -auswertung.....	43
3	Ergebnisse	44
3.1	Morphologische Veränderungen bei Adeno-assoziiierter Virus-vermittelter Gentherapie bei kontinuierlicher Transgenexpression	44
3.1.1	Behandlung mit dem AAV2/2.pRPE65.rpe65-Vektor	48
3.1.2	Behandlung mit dem AA2/4.CMV.rpe65-Vektor	49
3.1.3	Behandlung mit dem AA2/4.pRPE.rpe65-Vektor.....	50
3.1.3.1	Gliosefärbungen	50
3.1.3.2	Synaptische Verbindungen in der OPL	51
3.2	Morphologische Veränderungen bei Adeno-assoziiierter Virus vermittelter Gentherapie durch das Tet-ON/OFF- System	54
3.2.1	Behandlung mit dem AAV2/4.TetOff.rpe65-Vektor	56

3.2.1.1	Gliosefärbungen	56
3.2.2	Behandlung mit dem AAV2/4.TetOn.rpe65-Vektor	57
3.2.2.1	Gliosefärbungen	57
3.2.2.2	Synaptische Verbindungen in der OPL	58
3.2.2.3	Färbungen der Zapfen	61
3.3	Quantifizierung.....	64
4	Diskussion.....	68
4.1	Gliosefärbungen	68
4.2	Synaptische Verbindungen in der OPL	69
4.3	Untersuchungen der Zapfen	71
4.4	Fazit.....	75
5	Zusammenfassung	77
6	Summary	79
	Abkürzungsverzeichnis.....	80
	Abbildungsverzeichnis.....	82
	Tabellenverzeichnis.....	84
	Literaturverzeichnis.....	85
	Anhang	95
A	Ehrenwörtliche Erklärung	95
B	Danksagung	96

1 Einleitung

Die frühkindliche Netzhautdegeneration (EOSRD), eine der schwersten klinischen Formen der degenerativen Erkrankungen der Retina, ist eine seltene Erkrankung, die mit schweren visuellen Einschränkungen innerhalb der ersten 2 Lebensjahre verbunden ist und zu einer vollständigen Erblindung noch vor dem 20. Lebensjahr führt. Sind die Symptome bereits bei der Geburt vorhanden und tritt die Erblindung innerhalb der ersten 2 Lebensjahre auf, dann wird die Krankheit als Lebersche kongenitale Amaurose (LCA) bezeichnet.

Beim Menschen wurden bis heute 22 Gene als Ursache für eine EOSRD/LCA identifiziert, unter anderem das Gen RPE65. Das Protein RPE65 ist im retinalen Pigmentepithel (RPE) lokalisiert und spielt als zentrales Enzym des visuellen Zyklus eine große Rolle bei der Wiederherstellung des zentralen Sehpigments. Im Hundemodell führte das Einschleusen einer korrekten Kopie des mutierten Gens in das RPE im Rahmen Adeno-assoziiierter Virus (AAV) vermittelter Gentherapie erfolgreich zur Wiederherstellung des Sehvermögens. Die beim Menschen durchgeführten klinische Phase I/II Studien in den USA und England konnten die Sehleistung nur teilweise verbessern. Für diese Diskrepanz gibt es keine Erklärung.

Im Rahmen dieser Studie sollen die Auswirkungen des retinalen Gentransfers am natürlich vorkommenden Hundemodell untersucht werden. Es handelt sich hierbei um Hunde der Rasse Briard, welche eine spontane Deletionsmutation im RPE65-Gen aufweisen. Durch diese Nullmutation wird kein Protein mehr produziert. Klinisch fallen die Hunde initial durch Nachtblindheit auf, haben aber von Geburt an ein eingeschränktes Sehvermögen und nur geringe Elektroretinogramm (ERG) Ableitungen. Für die durchgeführten Analysen wurden komplette Augen von Tieren zur Verfügung gestellt, die im Rahmen präklinischer Studien im INSERM (Institut national de la santé et de la recherche médicale) Labor U649 in Nantes (Frankreich), unter der Leitung von Dr. Fabienne Rolling, erfolgreich gentherapeutisch behandelt wurden. Untersucht wurden sowohl Augen, die das fragliche Protein nach Behandlung kontinuierlich exprimieren, als auch Augen, bei denen die Expression durch ein Tet-On/Off-System (Tetracyclin-abhängiges System) über die Anwesenheit (TetOn) oder Abwesenheit (TetOff) von Tetracyclin reguliert worden ist. Leiter der detaillierten histomorphologischen und immunohistochemischen Untersuchungen der verschiedenen Netzhäute ist Professor Dr. Dr. Knut Stieger für experimentelle Ophthalmolo-

gie in der Klinik und Poliklinik Gießen. Im Rahmen des Dissertationsprojektes von Frau Dr. Daniela Klein wurden bereits einige Erkenntnisse am Hundemodell für EOSRD gewonnen. Dabei ergaben sich jedoch weitere Fragen, welche nun durch weitere Studien geklärt werden sollen. Es sollen insbesondere die Veränderungen in der Retina nach erfolgreicher Gentherapie mittels der verschiedenen eingesetzten Vektoren verglichen und untersucht werden, ob die Therapie womöglich einen negativen Einfluss auf die Netzhaut hat, z.B. in Form der reaktiven Gliose.

1.1 Anatomie des Auges

Die Augen aller Säugetiere ähneln sich sehr stark. Der Augapfel liegt gut geschützt in der knöchernen Augenhöhle (Schlote 2004). Nach vorne liegt dem Augapfel die schützende Kornea (Hornhaut) auf, welche im Bereich des hinteren Auges in die Sklera (Lederhaut) übergeht. Dieser äußeren Augenhaut folgt die mittlere Augenhaut mit der Choroidea (Aderhaut), dem Ziliarkörper und der Iris (Regenbogenhaut) sowie die innere Augenhaut mit der Retina (Netzhaut) und dem retinalen Pigmentepithel. Dabei gibt es zwei besondere Regionen auf der Netzhaut. Durch den Austritt des Nervus opticus (optischer Nerv), welcher am hinteren Pol, etwas medial der Augenachse, das Auge verlässt, entsteht der blinde Fleck. Hier sind keine Photorezeptoren, die zu einer Informationsweitergabe führen können, vorhanden. Etwas lateral davon befindet sich die Fovea centralis, welche als Stelle des schärfsten Sehens bekannt ist.

Fallen nun Lichtstrahlen auf unser Auge, so werden diese durch den optischen Apparat bestehend aus Kornea, Kammerwasser, Linse und Glaskörper gebrochen. Die Lichtstrahlen können durch eine Öffnung in der Iris, die man als Pupille bezeichnet und deren Durchmesser verändert werden kann, durch die Linse und den Glaskörper auf die verschiedenen Schichten der Retina treffen. Hier erfolgt die Erregung der Photorezeptoren und die Umwandlung des Lichtes in ein elektrisches Signal. Die erste Station der Sehbahn liegt also schon in den Photorezeptoren (1. Neuron) und setzt sich dann im Nervus opticus fort. Nach Durchquerung des Canalis opticus erreicht der Nervus opticus in der mittleren Schädelgrube das Chiasma opticum (Sehnervenkreuzung). Hier kreuzen sich die aus der nasalen Retinahälfte stammenden Nervenfasern auf die Gegenseite, während die Fasern der temporalen Retinahälfte weiterhin ungekreuzt verlaufen. Ab hier bezeichnet man die Sehbahn als Tractus opticus, welcher bis zum Corpus geniculatum laterale (seitlicher Kniehöcker), einem

Teil des Thalamus (Zwischenhirn), läuft. Dort erfolgt eine erneute Umschaltung (4. Neuron) und die Weiterleitung des Signals zur Area Striata (Sehrinde) im Cortex (Großhirnrinde) (Huppelsberg 2009; Campell 2006).

1.2 Aufbau der Säugetiernetzhaut

Die Netzhaut der Säugetiere zeigt im histologischen Schnitt einen gut erkennbaren Schichtenaufbau. Diesen, sowie die einzelnen Zellen innerhalb der Schichten, zeigt Abbildung 1. Auf die einzelnen Zellarten wird in den kommenden Abschnitten näher eingegangen. Dem retinalen Pigmentepithel aufliegend befinden sich die Außensegmente (OS) der Photorezeptoren und nachfolgend die Innensegmente (IS) dieser Zellen. Die äußere nukleäre Schicht (ONL) wird von den Zellkernen der Photorezeptoren gebildet. In der äußeren plexiformen Schicht (OPL) stellen die Axone der Photorezeptoren (Neurone 1. Ordnung) eine Verbindung zu den Bipolar- und Horizontalzellen (Neurone der 2. Ordnung) her. Der OPL folgt die innere nukleäre Schicht (INL), welche aus den Zellkernen der Amakrin-, Bipolar- und Horizontalzellen besteht. In der folgenden inneren plexiformen Schicht (IPL) erfolgt die Verschaltung der Bipolar- und Horizontalzellen mit den Ganglienzellen (Neurone der 3. Ordnung). Die Ganglienzellschicht (GCL) wird von den Zellkernen der Ganglienzellen gebildet. Deren Axone verlaufen zum N. opticus und werden als Nervenfaserschicht bezeichnet (Lang 2008).

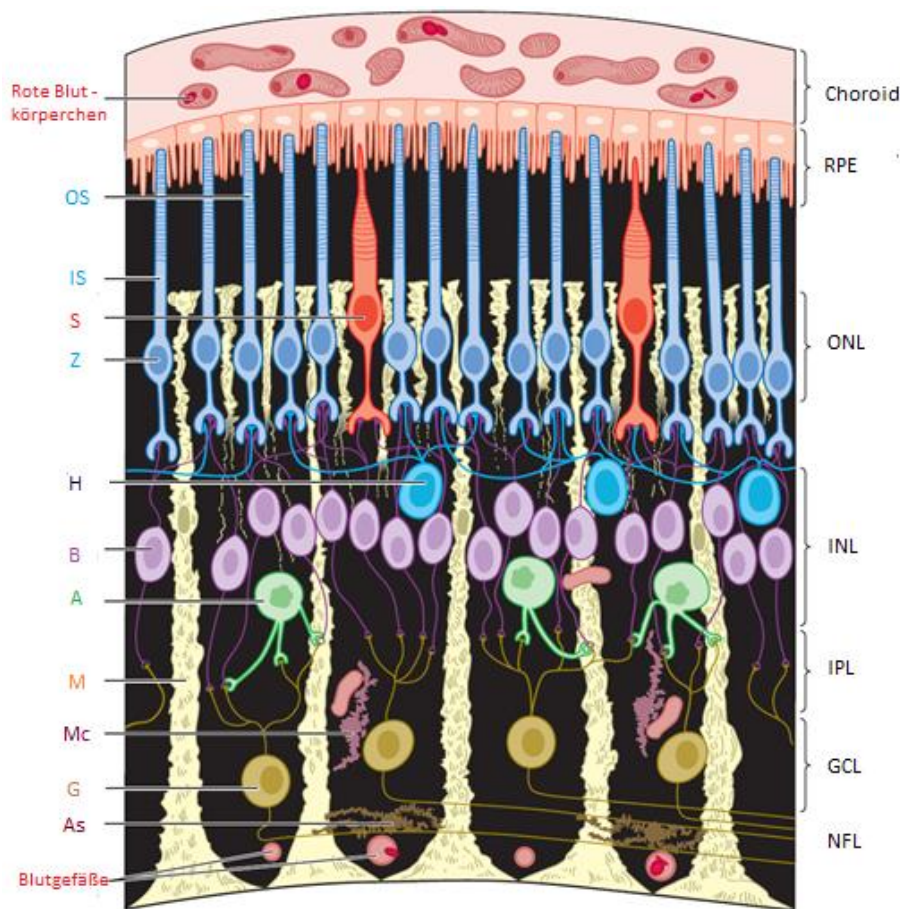


Abbildung 1: Aufbau der Säugetierretina

Schematischer Aufbau der Säugetierretina. RPE Retinales Pigmentepithel. OS: Außensegmente; IS: Innensegmente; ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht; IPL: Innere plexiforme Schicht; GCL: Ganglienzellschicht; NFL: Nervenfaserschicht; S: Stäbchen; Z: Zapfen; B: Bipolarzelle; H: Horizontalzelle; A: Amakrinzelle; Mc: Mikrogliazelle; G: Ganglienzelle; As: Astrozyten; M: Müllerzelle. (Modifiziert nach Bramall et al. 2010).

1.2.1 Retinales Pigmentepithel

Das retinale Pigmentepithel (RPE) liegt eingebettet zwischen der Choroidea und den Photorezeptoren der Retina. Dabei führen die zahlreichen Einfaltungen der apikalen Zellmembran der Pigmentepithelzellen zur Einbettung der Außensegmente der Photorezeptoren. Dies führt zu einer funktionellen Kopplung und mechanischen Verbindung beider Schichten, die eigentlich nicht miteinander verwachsen sind. Nach heutigem Verständnis ist das RPE essentiell für den Sehvorgang und die normale Photorezeptor-Funktion (Strauss 2005). Durch die Absorption von Streulicht dient das RPE dem Schutz der Retina. Es transportiert verschiedene Nährstoffe in die äußeren Retinaschichten und spielt durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren und immunsuppressiven Faktoren eine große Rolle bei immunologischen Reak-

tionen des Körpers auf Stress. Als Teil der Blut-Retina-Schranke sorgt es für eine Aufrechterhaltung der Homöostase.

Während der Phototransduktion entsteht in den Photorezeptoren all-trans-retinal. Zur Rückführung in 11-cis-retinal wird das all-trans-retinal in das RPE transportiert, da in den Photorezeptoren keine Rückisomerisierung stattfinden kann (siehe Abschnitt 1.3). Eine weitere wichtige Rolle spielt das RPE im Rahmen der Phagozytose von durch photo-oxidativem Stress geschädigten Außensegmenten der Photorezeptoren (Strauss 2005).

1.2.2 Tapetum lucidum

Das Tapetum lucidum findet man vor allem bei dämmerungsaktiven Tieren, da es ein besseres Sehen im Dunkeln ermöglicht. Es ist auch die Ursache für das charakteristische Aufleuchten von Tieraugen, die in der Dunkelheit angestrahlt werden. Beim Hund nennt man diese reflektierende Struktur Tapetum lucidum fibrosum. Es befindet sich zwischen dem RPE und der Choroidea. Das Tapetum lucidum besteht aus verschiedenen Schichten mit Materialien aus hohem und niedrigem Brechungsindex, deren Dicken mit der Wellenlänge des Lichts kompatibel sind (Ollivier et al. 2004). Es befindet sich nur im superioren Bereich und besteht im Zentrum aus mehreren Zellschichten, die zur Peripherie hin abnehmen (Lesiuk & Braekevelt 1983). Das einfallende Licht passiert die Netzhaut, wird durch das Tapetum lucidum fibrosum gebeugt sowie reflektiert und passiert die Netzhaut erneut, so dass es zu einer zweiten Anregung der Photorezeptoren kommt. Bei Hunden sorgen Kristalleinlagerungen (Zinkcysteine) für die Reflektion. Dies erklärt, warum es zu einer besseren Anregung der Photorezeptoren in der Dämmerung kommt, als dies z.B. bei uns Menschen möglich ist.

1.2.3 Photorezeptoren

Man unterscheidet bei den Säugetieren zwei Gruppen von Photorezeptoren, die Stäbchen und die Zapfen. Beide grenzen mit ihrem Außensegment an das RPE. Das andere Ende der Photorezeptoren ist über synaptische Verbindungen mit den nachgeschalteten Horizontalzellen bzw. den Bipolarzellen verbunden. Jeder Photorezeptor kann in drei Teile untergliedert werden. Die schon erwähnten Außensegmente bestehen aus erneuerbaren Einstülpungen der Plasmamembran. An der

Basis der Photorezeptoren werden stetig neue Disks produziert, während die alten Disks von den Pigmentepithelzellen phagozytiert werden. In der Lipiddoppelschicht dieser Disks befinden sich die verschiedenen Sehpigmente. Dem Außensegment folgt das sogenannte Connecting cillium (CC), welches Außen- und Innensegment miteinander verbindet. Im Innensegment befinden sich alle Zellorganellen, die Vielzahl vor allem an Mitochondrien weist auf die dort zahlreich stattfindenden Stoffwechselprozesse hin. Dem Innensegment folgt der Zellkern und das Terminal oder synaptische Ende, welches die oben genannten synaptischen Verbindungen eingeht (siehe Abbildung 2).

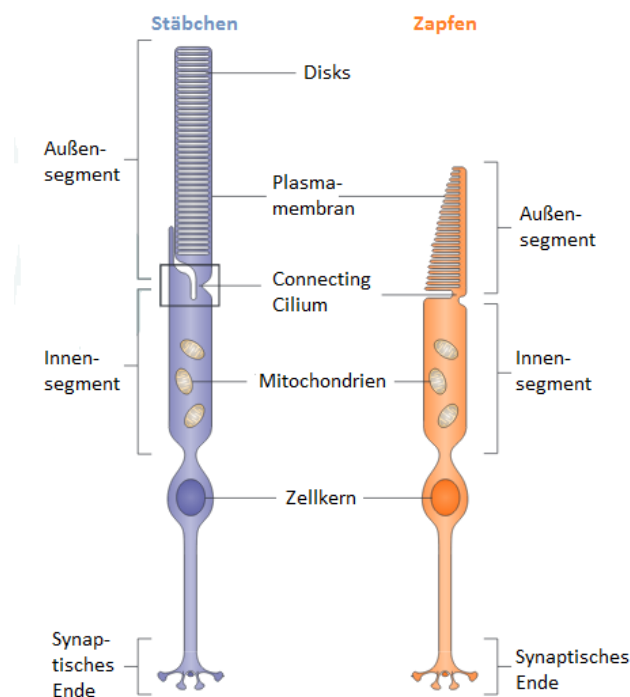


Abbildung 2: Aufbau der Photorezeptoren

Die Graphik zeigt den unterschiedlichen Aufbau von Stäbchen und Zapfen, die sich vor allem im Aufbau ihrer Außensegmente und dem synaptischen Ende unterscheiden. Jeder Photorezeptor untergliedert sich in ein Außensegment, ein Innensegment, den Zellkern (Nucleus) und sein synaptisches Ende. ER: Endoplasmatisches Redikulum. (Modifiziert nach Wright et al. 2010)

Stäbchen und Zapfen unterscheiden sich in ihrer Morphologie und so auch in ihrer Aufgabe. Während die Außensegmente der Stäbchen aus vielzähligen Membranstapeln bestehen und sich zylindrisch langgezogen darstellen, zeigt sich die Plasmamembran der Zapfen als kontinuierliche Einstülpung, kürzer und spitz zulaufend. Zapfen sind für das photopische Sehen, d.h. das Sehen bei Tageslicht und Farbensehen, zuständig. Den Stäbchen dagegen unterliegt das skotopische Sehen, das Nacht-Sehen sowie Schwarz-Weiß-Sehen (Huppelsberg 2009). Der Sehfärbstoff der

Stäbchen ist das Rhodopsin, welches sein Absorptionsmaximum bei etwa 508 nm hat (Jacobs et al. 1993). Zapfen dagegen enthalten jeweils einen von drei möglichen Subtypen von Sehfärbstoffen (Zapfen-Opsine). Man unterscheidet die Blauzapfen, welche ihr Absorptionsmaximum im Bereich von kurzwelligem Licht, sogenannte S-Zapfen, haben, die Grünzapfen mit einem mittleren Wellenlängenbereich (M-Zapfen) und die Rotzapfen im langwelligen Bereich, auch als L-Zapfen, bezeichnet. Beim Hund zeigen sich nur Blauzapfen und die Rot-/Grünzapfen (L/M-Zapfen) als Mischform (Jacobs et al. 1993).

Die Verteilung der Zapfen und Stäbchen weist einige Besonderheiten auf. Bei Primaten und den Menschen befindet sich im Bereich der Fovea centralis die größte Dichte an Zapfen, sodass die Ortsauflösung hier am Stärksten ist (Curcio et al. 1990). Man findet diese Region lateral des optischen Nerven. Zur Peripherie ist die Zahl der Zapfen abnehmend (Mowat et al. 2008). Die Stäbchen haben ihre größte Dichte 20° rings um die Fovea. (Curcio et al. 1990). Das Hundeauge zeigt ähnlich der Fovea einen Bereich mit erhöhter Zapfendichte und ist verantwortlich für die Sehschärfe, die sogenannte Area centralis (Mowat et al. 2008). Des Weiteren ergaben Untersuchungen des Hundeauges die Entdeckung des sogenannten *Visual Streak*. Dieser superior vom optischen Nerv liegende Bereich zeichnet sich durch eine höhere Ganglienzelldichte aus (Peichl 1992). An der Austrittsstelle des optischen Nerven befinden sich weder Stäbchen noch Zapfen, daher wird dieser Bereich auch blinder Fleck genannt.

1.2.4 Bipolarzellen

Die Zellkörper der Bipolarzellen bilden die Innere nukleäre Schicht und stellen durch ihren bipolaren Aufbau eine Verbindung zwischen den Photorezeptoren und den Ganglienzellen dar. So kann das elektrische Signal kodiert und weitergeleitet werden. Man kann die Bipolarzellen in Stäbchen-gesteuerte Bipolarzellen und in Zapfen-gesteuerte Bipolarzellen einteilen (Puller 2009). Von Ersteren gibt es nur eine Art und zwar eine ON-Bipolarzelle. Die Zapfen-gesteuerten Bipolarzellen werden in ON- und OFF-Bipolarzellen unterteilt, hier gibt es unterschiedlich viele Arten. Beim Menschen existieren zehn verschiedene Zapfen-gesteuerte Bipolarzellen (Kolb 2011). Man spricht von ON-Bipolarzellen, wenn diese bei einem Lichtreiz depolarisieren. OFF-Bipolarzellen hingegen werden erst bei einsetzender Dunkelheit erregt (Puller 2009). Ein weiterer Unterschied ist die unterschiedliche Stratifizierung der Axonter-

minale. Die Axone der OFF-Bipolarzellen enden in den äußeren Schichten der IPL, die Axone der ON-Bipolarzellen dagegen in den inneren Schichten der IPL (Masland 2001). OFF-Bipolarzellen führen zur Bildung von flachen Synapsen an der Basis der Photorezeptorsynapsen, die Dendriten der ON-Bipolarzellen dagegen invaginieren den Photorezeptor.

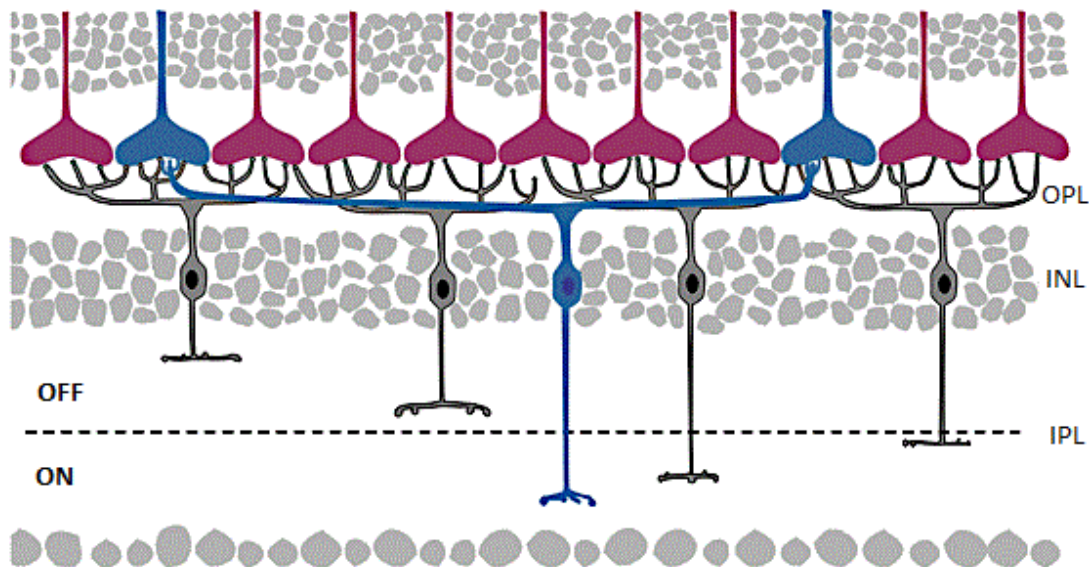


Abbildung 3: Die Stratifizierung der Bipolarzellen

Die Abbildung zeigt fünf verschiedene Typen von Bipolarzellen. Die Axone der OFF-Bipolarzellen enden in den äußeren Schichten der IPL, die der ON-Bipolarzellen dagegen in den inneren Schichten der IPL. Die blau dargestellte Bipolarzelle in der Mitte kontaktiert nur Blauzapfen. Man erkennt die Dendriten der Bipolarzelle, welche synaptische Verbindungen mit den Photorezeptoren eingehen und so die OPL (äußere plexiforme Schicht) bilden. Die Zellkerne der Bipolarzellen bilden in ihrer Gesamtheit die INL (innere nukleäre Schicht) und ihre synaptischen Verbindungen mit den Ganglienzellen die IPL (innere plexiforme Schicht). (Modifiziert nach Masland 2001).

1.2.5 Horizontalzellen

Die Kerne der Horizontalzellen bilden zusammen mit den Kernen der Bipolar- und Amakrinzellen die innere nukleäre Schicht. Ihre Aufgabe ist die seitliche Verschaltung des Informationsflusses von den Photorezeptoren auf die Bipolarzellen. Sie leiten ihre Informationen durch transmembranäre Spannungsänderung weiter, indem sie wahrscheinlich den inhibitorischen Neurotransmitter Gamma-Aminobuttersäure (GABA) auf das nachgeschaltete Neuron ausschütten. Trotz jahrzehntelanger Forschung ist der genaue Übertragungsweg weiterhin ungeklärt (Kramer & Davenport 2015). Es kommt zu einer Hemmung des Signals. Durch diese sogenannte laterale Hemmung entsteht eine Kontrastverstärkung des Bildes und damit die Grundlage für die räumliche Orientierung (Wu 2010). Die meisten Säuge-

tiere besitzen 2 Arten von Horizontalzellen, die A- und B-Horizontalzellen, die man vor allem an der Katze untersucht hat (Kolb 2011). Diese zeigen völlig unterschiedlich große Dendritenbäume. Die A-Horizontalzellen bedecken dabei einen Bereich von 150 – 250 μm . Der Dendritenbaum der B-Horizontalzellen zeigt sich mit einem Durchmesser von 75 – 150 μm etwas kleiner, zeigt dafür aber ein etwa 300 μm langes Axon, welches als sogenanntes *axon terminal* eine Verbindung zu den Stäbchen eingeht. Die Dendriten beider Horizontalzelltypen gehen eine Verbindung mit den Zapfen ein.

1.2.6 Amakrinzellen

Amakrinzellen erhielten ihren Namen vom dem spanischen Mediziner Santiago Felipe Ramón y Cajal, der davon ausging, dass diese Zellen kein definiertes Axon besitzen, sondern auf ihren Dendriten lediglich Ein- und Ausgangssynapsen zu finden seien (Cajal 1892). Mittlerweile hat man aber auch Amakrinzellen mit einem Axon entdeckt. Untersuchungen ergaben bisher 30 verschiedene Amakrinzellen, man geht aber davon aus, dass möglicherweise noch mehr Arten existieren (Masland 2012). Wie oben erwähnt bilden die Kerne der Amakrinzellen zusammen mit den Kernen der Horizontal- und Bipolarzellen die innere nukleäre Schicht. Wobei einige Zellkörper der Amakrinzellen auch außerhalb dieser Schicht liegen. Die Unterscheidung der verschiedenen Amakrinzelltypen erfolgt durch die unterschiedliche Größe und Stratifizierung ihres Dendritenbaums. D.h., es erfolgt eine Einteilung der IPL in unterschiedliche Schichten. Die Benennung richtet sich nach der Stratifizierung der Schichten. Stratifiziert eine Zelle z.B. nur in eine Schicht, so nennt man diese monostatifizierender Typ, stratifiziert sie in alle Schichten, diffuser Typ (Kolb 2012). Amakrinzellen interagieren synaptisch mit den Axonen der Bipolarzellen und den Dendriten der Ganglienzellen und bilden so mit diesen Zellen die innere plexiforme Schicht. Aufgrund ihres Aufbaus und ihrer großen Diversität geht man davon aus, dass Amakrinzellen zahlreiche Aufgaben übernehmen, die aber noch nicht alle verstanden sind (Masland 2012). Sie spielen ebenso wie die Horizontalzellen eine Rolle bei der lateralen Inhibition des elektrischen Signals.

1.2.7 Ganglienzellen

Die Zellkerne der Ganglienzellen bilden die Ganglienzellschicht, deren Axone die Nervenfaserschicht, welche zum Nervus opticus zusammenläuft und die Information bis zur Sehrinde weiterleitet. In der IPL erfolgt die Verschaltung der Bipolar- und Horizontalzellen auf die Ganglienzellen. Ähnlich den Amakrinzellen gibt es mehr als 25 verschiedene Zellarten, die nach ihrer Zellgröße, ihrem Dendritenbaum und dessen Verzweigung und Stratifizierung unterteilt werden. Und auch bei den Ganglienzellen unterscheidet man ON- und OFF-Zellen (Kolb 2012). Eine weitere Einteilung der primaten und humanen Retina erfolgt in die parasol und die midget Ganglienzelle (Leventhal et al. 1981). Die midget Ganglienzellen haben kleinere Zellkörper und sind wahrscheinlich für das Detailsehen verantwortlich. Da sie in die parvozellulären Schichten des lateralen Kniehöckers projizieren, werden sie auch P-Zellen genannt. Die parasol Ganglienzellen können Bewegungen und Kontraste gut wahrnehmen und haben größere Zellkörper als die P-Zellen. Da hier eine Projektion in die magnozellanulären Schichten des lateralen Kniehöckers erfolgt, nennt man sie auch M-Zellen (Kolb 2011).

1.2.8 Gliazellen

Der Begriff Gliazellen beschreibt zunächst eine ganz heterogene Gruppe von nicht-neuronalen Zellen im Nervensystem (Spektrum 2000). In der Netzhaut befinden sich hauptsächlich 3 verschiedene Typen von Gliazellen: die Müllerzellen, Astrozyten und die Mikrogliazellen (Bringmann 2006; Vecino et al. 2016). Gelegentlich finden sich in der Kaninchen Netzhaut noch die Oligodendrozyten.

Die größte Bedeutung hat die Müllerzelle, die sich über die gesamte Neuroretina, von der Membrana limitans interna zur Membrana limitans externa, welche als siebartige Platte aus Gliafortsätzen besteht (Bringmann 2006). Die Müllerzelle ist über Desmosome mit den Photorezeptoren verbunden, was ihr mechanischen Zusammenhalt sowie Schutz gegen Scherkräfte bietet. Die Müllerzellen untereinander sind auch über Desmosome sowie über Gap junctions miteinander verbunden. Gap junctions dienen der elektrischen Kopplung, so können über direkte Diffusion Ionen oder kleine Moleküle übertragen werden (Kolb 2013). Die Fortsätze der Müllerzellen berühren den extrazellulären Raum und umhüllen Neurone und Blutgefäße. Jede Müllerzelle bildet den Kern einer Säule und bildet so die kleinste funktionelle Einheit

der Informationsverarbeitung. Diese Säule enthält pro Müllerzelle einen Zapfen sowie unterschiedlich viele Stäbchen und Neurone (Reichenbach 2013). Die Müllerzelle interagiert mit den Neuronen ihrer Säule in einer Art symbiotischen Beziehung: Sie transportiert Nährstoffe, Abfallprodukte, Ionen und Wasser zwischen retinalen Gefäßen und Neuronen und unterstützt die Funktion und den Stoffwechsel retinaler Neurone. Sie hält die innere Blut-Retina-Schranke, den Blutfluss und das Gleichgewicht des Extrazellularraums aufrecht, indem sie Kalium transportiert und das Säure-Basen-Gleichgewicht aufrechterhält. Durch die Freisetzung von Gliotransmittern (z.B. Glutamat oder Adenosintriphosphat [ATP]) unterstützt sie die synaptische Aktivität. Weiterhin stabilisiert sie die Struktur der Retina und trägt zur Leitung des Lichts bei. Ihr trichterförmiger Endfuß agiert dabei als Lichtsammler. Wenn Licht die Müllerzelle passiert, wird dieses über die Neurone und Blutgefäße zurück gestreut. Durch den unterschiedlichen Brechungsindex innerhalb der Müllerzelle und zum umliegenden Gewebe findet eine Anpassung zwischen dem Glaskörper und der Retina statt. Müllerzellen wirken einerseits neuroprotektiv, können aber andererseits auch zu neuronaler Degeneration beitragen (Reichenbach 2013).

Nach einer retinalen Verletzung differenzieren und proliferieren Müllerzellen, generieren aber auch neue neuronale Stammzellen, welche zum beschädigten Ort wandern. Müllerzellen vom Huhn haben sogar das Potential, sich zu allen retinalen Neuronen zu regenerieren (Fischer 2001). Die Müllerzelle spielt auch eine wichtige Rolle, wenn es um den Schutz der Zelle vor metabolischem Stress, wie z.B. Sauerstoff- oder Kohlenhydratmangel, geht. Tritt dieser auf, schützen sich Photorezeptoren und Neurone durch α -Ketoglutarat, Glutamin, Lactat und Alanin, welche durch die Müllerzellen über Glutamat und Kalium reguliert und bereitgestellt wird (Reichenbach 2013).

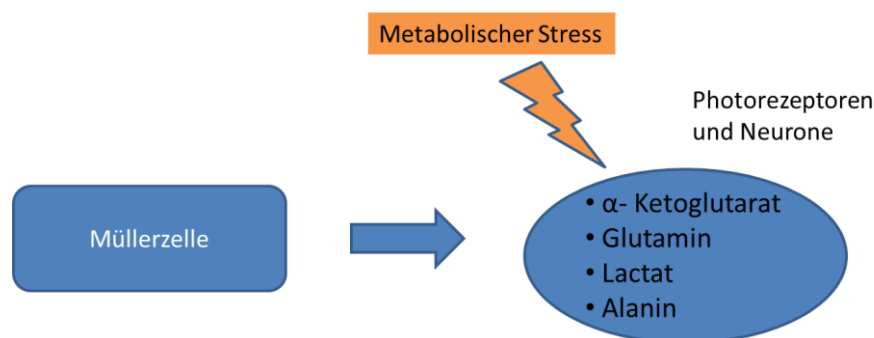


Abbildung 4: Die Rolle der Müllerzelle bei metabolischem Stress

Photorezeptoren und Neurone schützen sich bei metabolischem Stress durch α -Ketoglutarat, Glutamin, Lactat und Alanin. Diese Stoffe werden von der Müllerzelle reguliert und bereitgestellt.

Darüber hinaus stellt die Müllerzelle den größten Teil von Neurotransmitter Vorstufen her. Durch das Enzym Glutamin-Synthetase (GS) kann sie Glutamat in Glutamine umwandeln. Glutamine dient z.B. als Vorstufe für die Synthese von GABA (Gamma-Amino-Buttersäure), welche von Neuronen und Amakrinzellen aufgenommen wird (Reichenbach 2013) (siehe Abbildung 5). Somit ist ein Nachweis der Müllerzelle über die Aktivität der GS möglich. Eine pharmakologische Blockade der GS in Müllerzellen führt bei Tieren zur funktionellen Blindheit (Barnett et al. 2000). Eine weitere wichtige Funktion haben die Müllerzellen im Rahmen der reaktiven Gliose (siehe Kapitel: Reaktive Gliose).

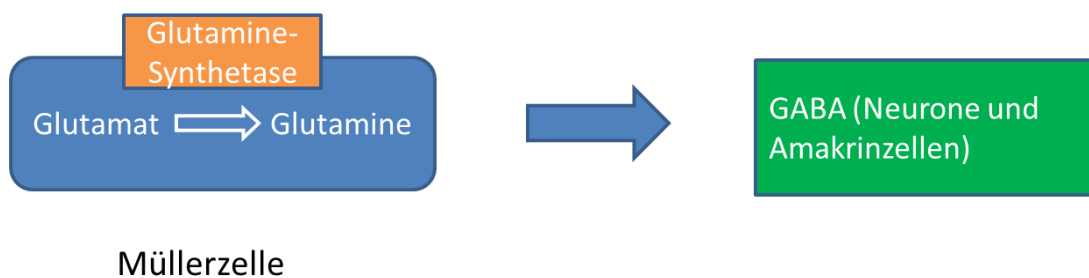


Abbildung 5: Die Rolle der Glutamin-Synthetase in der Müllerzelle

Die in der Müllerzelle sich befindende Glutamin-Synthetase wandelt Glutamat in Glutamine um. Glutamine dient Neuronen und Amakrinzellen zur Herstellung von GABA.

Astrozyten befinden sich vor allem in der Ganglienzellschicht. Sie sind über den optischen Nerv eingewandert und zeigen eine ortsabhängige charakteristische Morphologie. In der peripheren Retina haben sie eine symmetrische sternartige Form und nahe des optischen Nerts eher eine längliche Form. Astrozyten bilden eine Hülle um die Axone der Ganglienzellen und Gefäße, daher nimmt man an, dass sie einen Part der Blut-Gehirn-Schranke übernehmen. Zudem enthalten sie viel Glycogen und dienen daher vermutlich als Glucosespeicher für Neurone. Auch spielen sie eine Rolle in der Ionen Homöostase durch extrazelluläre Kalium und Neurotransmitter (GABA) Regulation (Kolb 2013; Vecino et al. 2016).

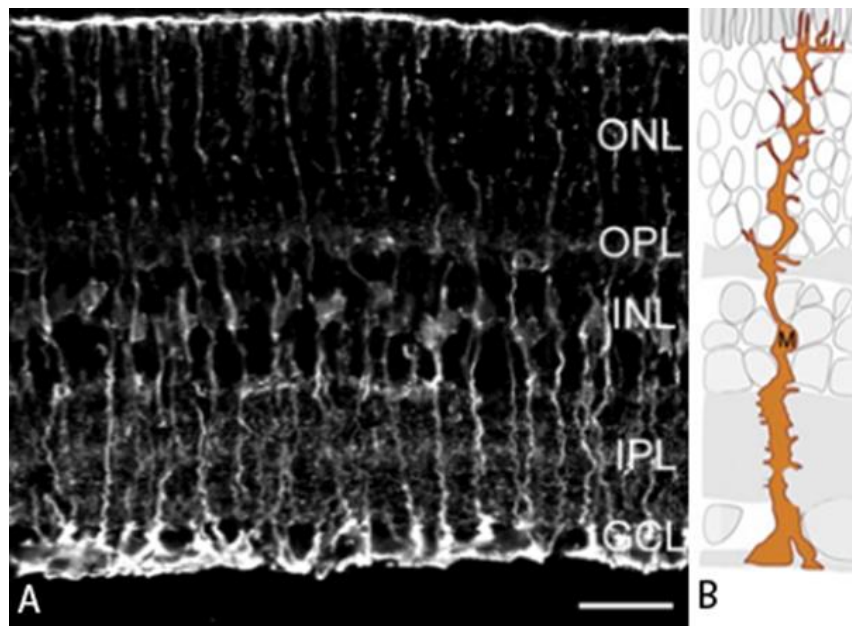


Abbildung 6: Die Müllerzelle

A: Die Müllerzelle lässt sich über die Aktivität der Glutamin-Synthetase darstellen. Man erkennt gut, wie sich die Müllerzelle über die gesamte Neuroretina erstreckt. B: Schematische Darstellung der Müllerzelle (M). ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht; IPL: Innere plexiforme Schicht; GCL: Ganglienzellschicht. Maßstabsbalken 25 µm. A: (Modifiziert nach Haverkamp & Wässle 2000); B: (Modifiziert nach Euler et al 2009).

Mikrogliazellen sind in jeder Schicht der Retina anzutreffen, befinden sich aber vor allem in erkrankter Retina. Nach einem Trauma können sie sich in Makrophagen umwandeln, um degenerierte Neurone zu phagozytieren, oder auch mit anderen Gliazellen und Neuronen interagieren, indem sie Wachstumsfaktoren sezernieren (Vecino et al. 2016).

1.2.9 Reaktive Gliose

Die reaktive Gliose stellt den Versuch dar, retinales Gewebe vor noch mehr Schäden zu bewahren, Reparaturvorgänge zu fördern und Gewebeumbau zu begrenzen (Bringmann 2011). Ein früher Indikator für retinalen Stress ist die Hochregulierung von Intermediärfilamenten, wie z.B. Vimentin und dem sauren Gliafaserprotein (GFAP = Glial fibrillary acidic protein) (Bringmann 2011). Dies ermöglicht den immunhistochemischen Nachweis dieser Intermediärfilamente und lässt damit indirekt eine Aussage über die reaktive Gliose einer Zelle zu. Vimentin und GFAP haben einen großen Einfluss auf die biomechanischen Eigenschaften einer Zelle. Ihr Fehlen führt zu erhöhter Brüchigkeit der Müllerzelle, die vor allem ihre Endfüße betrifft (Lundkvist et al. 2004). Die Zunahme von Intermediärfilamenten erhöht die Steifig-

keit der Zelle. So könnte die therapeutische Unterdrückung der zunehmenden Hochregulierung von Intermediärfilamenten die Regeneration von verletztem Gewebe erleichtern (Reichenbach 2013). Zusätzlich führt ein Schaden an der Retina zu Hypertrophie und Proliferation der Müllerzelle sowie zur Differenzierung von Vorläuferzellen (Bringmann 2011). Außerdem stellte man eine Abnahme von CRALBP (cellular retinaldehyde-binding protein/ zelluläres Retinaldehydebinderprotein), welches normalerweise eine Rolle im visuellen Zyklus spielt, und Glutamin-Synthetase fest. Beides führt zur Unterbrechung der Interaktionen zwischen Gliazellen und Neuronen im Photopigment und dem Recycling von Neurotransmittern. Man stellte außerdem eine Abnahme der Carbonanhydrase und von Kaliumkanälen (Kir) fest, sodass es zu Störungen im Säure-Basen-Haushalt sowie dem Ionen- und Wasserhaushalt kommt (Bringmann 2011).

1.3 Phototransduktionskaskade und Visueller Zyklus

Die Zellen der Retina wandeln Lichtreize des auf die Retina produzierten Bildes in Aktionspotentiale um und leiten diese an das Gehirn weiter, um Informationen aus der Umwelt zu liefern. Mit der Lichtabsorption beginnt die Signaltransduktionskaskade. Dabei sind die Photorezeptoren im Dunkeln, also im nicht erregten Zustand, leicht depolarisiert (Huppelsberg 2009). Grund hierfür sind die im Dunkeln geöffneten Natriumkanäle (CNG Kanäle) im Außensegment des Photorezeptors. Bei Belichtung schließen sich diese, das Membranpotential wird negativer, sodass es zur Hyperpolarisation der Zelle kommt. Durch einen Lichtreiz ändert das Chromophor 11-cis-Retinal, welches in der Diskmembran der Stäbchen lokalisiert ist, seine Konformation zur trans-Form. Im Dunkeln bilden das Chromophor 11-cis-Retinal und das Apo-Opisin eine funktionelle Einheit, das Sehpigment. Durch die Konformationsänderung geht Rhodopsin in seinen aktiven Zustand über, bindet an das G-Protein Transduzin und löst eine Enzymkaskade aus, in der es zur Hydrolyse von cGMP in GMP kommt und dadurch zum Verschließen der CNG Kanäle und so zur Hyperpolarisation der Zelle. Um bei wiederholtem Lichtreiz erneut starten zu können, wird all-trans-Retinal im klassischen visuellen Zyklus zurück in seine 11-cis Form geführt (Wang 2011). Dabei wird es zunächst von dem Opisin getrennt und dann durch zwei Retinaldehydrogenasen (RDH), RDH8 und RDH12, zu all-trans-Retinol (all-trans-ROL) umgewandelt (Chen et al. 2012). All-trans-ROL wird durch das Transportprotein Interphotorezeptorbindeprotein (IRBP) zum apikalen RPE

transportiert und bindet dort an das zelluläre Retinolbindende Protein (CRBP1). Dieses sorgt für den Transport von der apikalen Seite des RPE zum Zellkörper des RPE (Napoli 2000). Hier erfolgt eine Veresterung durch das Enzym Lecithin Retinol Acyltransferase (LRAT) zu all-trans-Retinylester (all-trans-RE) (Wang 2011). All-trans-RE wird anschließend durch die Isomerohydrolase RPE65 in 11-cis-Retinol (11-cis-ROL) isomerisiert (Redmond et al. 2005). Über die Bindung an das zelluläre Retinaldehydbindeprotein (CRALBP) wird 11-cis-ROL wahrscheinlich durch die RDH5 und RDH10 (Parker & Crouch 2010) zu 11-cis-RAL umgewandelt und wieder zur apikalen Seite des RPE transportiert. Durch IRBP wird es wieder zu den Außensegmenten gebracht und steht einer erneuten Signaltransduktionskaskade zur Verfügung (Wang 2011).

Mehrere Studien ergaben die Hypothese, dass es in Zapfen einen alternativen Weg gibt, der unabhängig vom RPE ist, und in dem stattdessen die Umwandlung von all-trans-ROL zurück in 11-cis-RAL in der Müllerzelle stattfindet (Yang et al 2015). Die Reaktionen im Zapfen Außensegment sind in beiden Zyklen sehr ähnlich. Auch im Zapfenspezifischen Zyklus wird 11-cis-RAL über all-trans-RAL zu all-trans-ROL umgewandelt. All-trans-ROL wird dann allerdings über das IRBP nicht ins RPE transportiert, sondern gelangt in die Müllerzelle. Nun gibt es zwei mögliche Wege, die erfolgen können: All-trans-ROL wird über die Dihydroceramide Desaturase-1 (DES1) direkt in 11-cis-ROL umgewandelt, oder die Umwandlung erfolgt über einen Zwischenschritt. Hierbei wird all-trans-ROL zunächst mit Hilfe von Acyl-Retinol-Acyltransferase (ARAT) in all-trans-Retinylester (all-trans-RE) umgewandelt, und erst dann erfolgt die Isomerisierung durch die Isomerohydrolase (IMH) in 11-cis-ROL. Allerdings kann all-trans-RE auch durch die Retinylesterhydrolase (REH) zurück geführt werden in all-trans-ROL. Anschließend erfolgt die Umwandlung über Retinoldehydrogenasen zur 11-cis-RAL, welche über IRBP und CRALBP wieder zurück in den Photorezeptor gebracht werden (Yang et al 2015).

1.4 Erkrankungen aufgrund von Mutationen im RPE65 Gen

RPE65 ist, wie schon beschrieben, ein wichtiges Enzym im visuellen Zyklus. Es wandelt als Isomerohydrolase all-trans Retinylester zu 11-cis Retinol um. Man findet es im RPE und in den Zapfen der Säugetierretina. Im Zebrafisch konnte man es auch in den Müllerzellen lokalisieren (Takahashi et al 2011). In der Hunderetina hat

man es nur im Pigmentepithel detektiert (Acland et al. 2005). Seinen Namen erhielt es durch seine Größe in der SDS-Page bei 65 kDa (Kiser & Palczewski 2010).

1.4.1 RPE65 Mangel beim Menschen

Mutationen im RPE65-Gen stellen in 6-16% die Ursache für die Lebersche kongenitale Amaurose (LCA) dar (<https://sph.uth.edu/RetNet/disease.htm#01.101d>, Stand Februar 2016). Die LCA wird beim Menschen autosomal rezessiv vererbt. Sie ist eine besonders schwere Form der frühkindlichen Netzhautdegeneration (early onset severe retinal dystrophy, EORS), bei der die Symptome schon bei der Geburt oder innerhalb der ersten zwei Lebensjahre auftreten (Lorenz et al. 2010). Da verschiedene Mutationen ursächlich sein können, herrscht eine große Variabilität des Phänotyps. Es zeigen sich folgende Symptome:

- Sehschwäche bei schwachen Lichtverhältnissen bis hin zur Nachtblindheit
- Hochgradige Visusminderung bis hin zur Blindheit
- Augenzittern (Nystagmus)
- Schielen (Strabismus)
- Reduziertes bzw. unterhalb der Nachweisgrenze liegendes Elektroretinogramm (ERG)
- Minimale oder fehlende Fundusautofluoreszenz (FAF)

(Lorenz et al. 2008; Lorenz et al. 2010; Jacobson et al. 2009; Hollander et al. 2008).

Die frühzeitige Sehschwäche bei schwachen Lichtverhältnissen lässt sich dadurch erklären, dass zunächst die Stäbchen von der Erkrankung betroffen sind. Als Ursache für die minimale oder fehlende FAF gilt das Fehlen von aktivem Chromophor, wodurch die Außensegmente der Photorezeptoren auch nur mit unbeladenem Opsin aufgebaut werden und bei der Phagozytose durch das RPE ohne Bildung von Lipofuzin abgebaut werden. Eine FAF kann sich ohne Lipofuzin nicht ausbilden (Lorenz 2009; Preising & Lorenz 2009). In der optischen Kohärenztomographie (OCT) zeigt sich eine Verminderung der äußeren Retina sowie des RPEs (Lorenz et al. 2010; Preising et al. 2014) (siehe Abbildung 7).

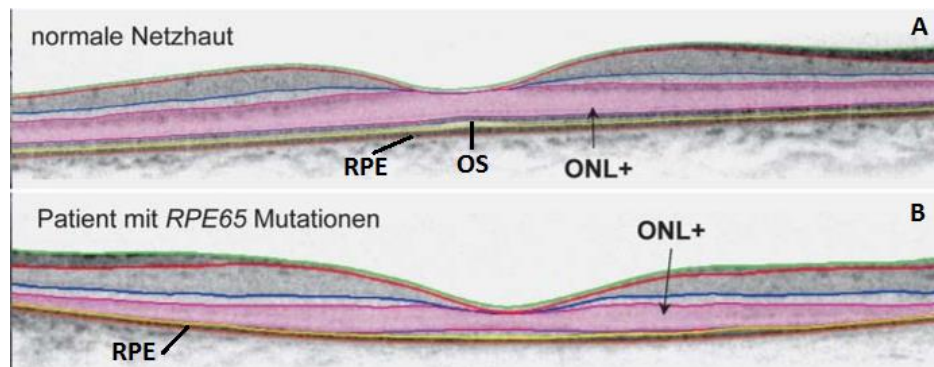


Abbildung 7: Vergleich von OCT-Aufnahmen einer normalen Netzhaut mit einer Netzhaut eines Patienten mit RPE65 Mutation

In A ist die morphologische Darstellung einer normalen Netzhaut mit Hilfe einer OCT Aufnahme dargestellt. In B sieht man die OCT Aufnahme eines Patienten mit RPE65 Mutation. Die ONL + stellt sich verdünnt dar, die Außensegmente (OS) sind nur noch im Bereich der Fovea zu sehen und auch das RPE stellt sich verschmälert dar. ONL+ = OPL + ONL + OML + IS; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere nukleäre Schicht; OLM: äußere Begrenzungsmembran; IS: innere Segmente; RPE: Retinales Pigmentepithel. (Modifiziert nach Preising et al. 2014).

Neben den klinischen Untersuchungsergebnissen gibt es eine postmortale, histologische Untersuchung von einer Patientin mit homozygoter RPE65 Mutation (Bonilha et al. 2011).

Dabei zeigt sich ein Verlust von Stäbchen und Zapfen in fast allen Bereichen der Retina, besonders betont aber in der Peripherie. Außerdem zeigen sich eine Verdünnung der retinalen Gefäße, eine Atrophie des RPE sowie ödematöse Veränderungen im Bereich der Makula in beiden Augen.

1.4.2 Kongenitale stationäre Nachtblindheit und RPE65 Mutation beim Hund

Zwischen dem menschlichen Auge und dem Hundeaugen bestehen große Ähnlichkeiten in Bezug auf die klinischen Merkmale einer RPE65 Gen Mutation. An der Hunderasse Briard wurden viele Untersuchungen durchgeführt, die zu einer Beschreibung ihrer Erkrankung als kongenitale stationäre Nachtblindheit führte (Narfström et al. 1989). Dabei zeigten die Untersuchungen, dass die Tiere nachtblind sind und ein nicht nachweisbares ERG aufweisen. Aus der Analyse des Stammbaumes schloss man, dass es sich um einen autosomal rezessiven Erbgang handeln muss. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen von zwei Generationen von Briards im Alter von 5 Wochen bis 7 Jahren mit kongenitaler stationärer Nachtblindheit zeigten, dass es vor allem in der Peripherie zu einem Verlust

von Photorezeptoren kommt, im weiteren Verlauf aber auch die zentralen Areale betroffen sind. Somit handelt es sich um eine fortschreitende Dystrophie (Wrigstad et al. 1994). Cideciyan und Kollegen untersuchten erkrankte Tiere im Alter von 5 und 8 Jahren mit dem OCT. Dabei zeigte sich im Alter von 5 Jahren eine nahezu normal dicke ONL, mit einer leichten Verdünnung in der Peripherie. Im Alter von 8 Jahren wurde eine erhebliche Ausdünnung der ONL sichtbar, die sich nun auch zentral zeigte. Somit bestätigten sich die Ergebnisse von Wrigstad und seinen Kollegen (Cideciyan et al. 2013).

Als Ursache für die Erkrankung konnte eine Nullmutation im RPE65 Gen festgestellt werden. Es kommt dabei zur homozygoten Deletion von vier Basenpaaren im Exon 5, was zur einem Stoppcodon führt, sodass mehr als zwei Drittel der Wildtyp- Polypeptidkette fehlen und so das mutierte Protein hergestellt wird (Veske et al. 1999).

Bisher haben verschiedene Gruppen immunhistochemische Untersuchungen am Hundemodell durchgeführt um die Auswirkungen der Erkrankung auf die canine Netzhaut näher zu beschreiben. Hernández und Kollegen untersuchten die Expression verschiedener Marker im superioren Bereich der Retina, indem sie Tiere im Alter von 4 und 17 Monaten untersuchten. Die Anzahl der Zapfen und der Zapfenopsinproduktion stellte sich unverändert dar, allerdings zeigte sich eine Abnahme der Stäbchenanzahl und somit eine verringerte ONL-Schichtdicke, das Stäbchen Opsin dagegen zeigte sich delokalisiert. Bipolarzellen zeigten leichte Veränderungen in ihren terminalen Axons. In den Müllerzellen zeigte sich eine Dislokalisierung von in den Müllerzellen exprimierten CRALBP, sowie eine Zunahme von GFAP und Vimentin in den vor allem noch jungen, erkrankten Tieren (Hernández et al. 2010). Auch Mowat und Kollegen konnten in ihren Untersuchungen die Veränderungen in den Stäbchen bestätigen. Sie untersuchten den superioren Bereich, die Area Centralis und den Visual Streak der Retina, allerdings mit Tieren in 2 verschiedenen Altersgruppen: im Alter von 3 und 65,5 Monaten. Beide Altersgruppen zeigten delokalisiertes Zapfenopsin, was Hernández und seine Kollegen nicht feststellen konnten. In beiden Altersgruppen zeigte sich eine Abnahme der Zapfenopsine, besonders aber in der älteren Gruppe, außerdem zeigte sich eine schnellere Abnahme von S-Zapfen im Vergleich zu LM-Zapfen oder Stäbchen. (Mowat et al. 2013).

Klein und Kollegen untersuchten zum ersten Mal auch den inferioren Bereich der caninen Retina und verglichen diesen mit dem superioren Bereich. Dabei zeigte sich vor allem im inferioren Bereich eine deutliche Zunahme des Sproutingphänomens,

als Zeichen von Photorezeptor Degeneration. Alle Bereiche wiesen eine Abnahme der S-Zapfen Dichte auf, im inferioren Bereich allerdings ein geringerer. In allen Regionen, die mit dem RPE in Verbindung stehen, sah man einen geringeren Verlust von S-Zapfen. Die L/M-Zapfen Konzentration zeigte eine Abnahme in allen Bereichen (Klein 2014).

1.5 Gentherapie

Ganz generell bedeutet Gentherapie in der Medizin das Einfügen von Genen in Zellen oder Gewebe eines Menschen, um bestimmte Erbkrankheiten oder Gendefekte zu behandeln. Therapeutische Möglichkeiten im Rahmen spezifischer Gentherapie sind mittlerweile für einen Teil der Patienten mit erblichen Netzhautdegenerationen möglich geworden. Vor allem die Behandlung mit Mutationen im RPE65-Gen zeigten sich am weitesten fortgeschritten (Stieger & Lorenz 2014). Bei der spezifischen Gentherapie muss das mutierte Gen bekannt sein. Die Behandlung kann auf zwei unterschiedliche Arten erfolgen. Einmal durch die *gene addition therapy* sowie durch die *gene silencing* Technik. Bei Ersterer wird eine funktionelle Kopie des ursächlich mutierten Gens mit Hilfe eines Vektors in die Zelle eingeführt. Dies erfolgte bei Fällen, in denen die Mutation zur Reduktion der Proteinfunktion geführt hat. Nach erfolgreicher Injektion kann das funktionelle Protein wieder produziert werden, und die Zelle kann ihre ursprüngliche Funktion wieder ausführen. Diese Technik wird vor allem bei autosomal rezessiven Mutationen angewendet. Die *gene silencing* Technik wendet man an, wenn durch die dominant negative Mutation ein Protein in den Zellen produziert wird, das eine für die Zellen schädigende Wirkung entwickelt. Daher reguliert man zunächst die Expression der mutierten Genkopie herunter, um dann das korrekte Protein nach erfolgtem Gentransfer produzieren zu können (Stieger & Lorenz 2008). Um die Produktion des mutierten Proteins zu stoppen, findet auf RNA-Ebene eine Blockierung durch Ribozyme oder small interfering RNA (siRNA) statt (Tessitore et al. 2006; Stieger & Lorenz 2008). Ist das zu therapierende Gen nicht bekannt, kann die unspezifische Gentherapie angewendet werden. Hierbei sollen verschiedene Faktoren, wie z.B. neuroprotektive Faktoren, die Neurone vor dem Zelltod schützen. Bei der Behandlung von neovaskulären Erkrankungen können auch antiangiogene Faktoren zum Einsatz kommen, um die Entstehung neuer Gefäße zu unterdrücken. Die unspezifische Gentherapie ist eine rein symp-

tomatische Therapie, bei der die Ursache nicht behandelt wird (Stieger & Lorenz 2008).

1.5.1 Gentherapievektoren

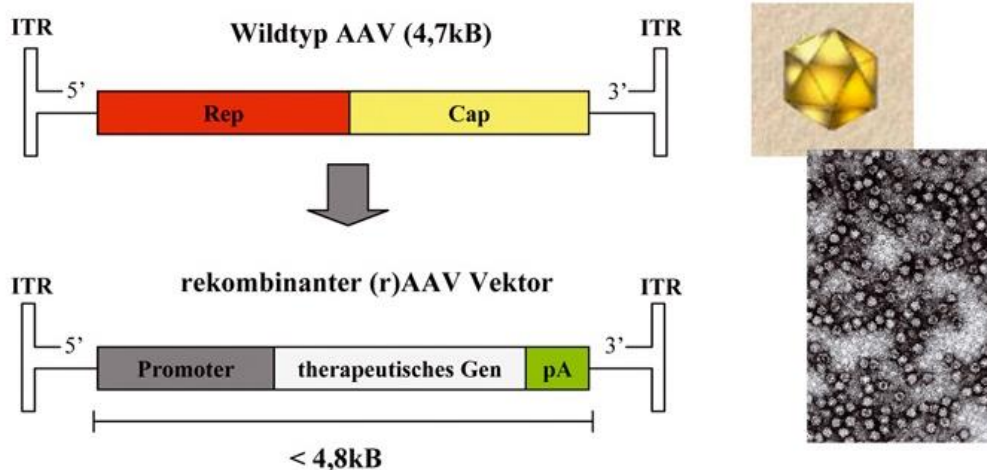
Die Gentherapie erfolgt durch die Applikation des therapeutischen Gens oder deren Teilen in die defekte Zelle. Dieser Gentransfer erfolgt mit Hilfe eines Vektors. Seine Wahl hängt dabei maßgeblich von der Größe des therapeutischen Gens und seiner Zielzelle ab. Vor allem werden virale Vektoren wie Adenoviren, AAV, Retroviren, Herpes Simplex Viren, Lentiviren und Pockenviren verwendet. Aber auch nicht virale Vektoren wie Nanopartikel, Lipofektion oder nackte DNA werden benutzt (Ginn et al. 2013). Es ist wichtig, dass die Vektoren nicht replizierend sind, keine unerwünschte Immunreaktion auslösen und eine Integration in spezifische Regionen erfolgt, um eine Tumorgenese zu verhindern (Petersen-Jones 2012). Der Standardvektor für den retinalen Gentransfer stellt momentan der AAV-Vektor dar. AAV gehören als Untergruppe der Dependoviren zur Familie der Parvoviren und wurden als Kontamination von Adenovirus Kulturen entdeckt, von denen sie abhängig sind (Alexander & Hauswirth 2008). Das einzelsträngige DNA-Genom wird durch die zwei offenen Leseraster Rep und Cap gebildet. Die durch Rep codierten vier Rep-Proteine sorgen für die Replikation des Virus und die Integration in das Genom der Wirtszelle. Cap codiert drei Capsidproteine. Begrenzt wird das 4,7kB große Genom von je einem *inverted terminal repeat* (ITR) am 5'- und am 3'-Ende. Bisher wurden 12 verschiedene Serotypen entdeckt, die sich durch ihre serologischen und molekularbiologischen Eigenschaften sowie unterschiedliche zelluläre Tropismen unterscheiden. Die Benennung der Viren erfolgt nach einem bestimmten Schema. Die erste Zahl zeigt die Herkunft der ITR an und die zweite Zahl steht für die Herkunft des Capsids.

Tabelle 1: Zellulärer Tropismus von rAAV-Serotypen in der Retina

RPE: retinales Pigmentepithel; PR: Photorezeptor; IKS: Innere Körnerschicht; GZ: Ganglienzellen; MZ: Müllerzellen; n.u.: nicht untersucht. (Modifiziert nach Stieger & Lorenz 2008).

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

Durch die kleine Genomgröße können auch Sequenzen von relativ geringer Größe übertragen werden. Diese Limitation stellt einen großen Nachteil von AAV dar (Stieger & Lorenz 2014). Mit Hilfe von Lentiviren lassen sich größere Gensequenzen transferieren. Beide Vektoren führen zu einer mehrjährigen Expression in RPE-Zellen und den Photorezeptoren.

**Abbildung 8: Herstellung eines rekombinanten (r)AAV-Vektors**

Zu sehen ist der Aufbau eines AAV-Vektors, welcher aus den zwei offenen Leserahmen Cap und Rep sowie den beiden *inverted terminal repeats* (ITR) am 5'- und am 3'-Ende besteht. Zur Herstellung eines rekombinanten (r)AAV-Vektors werden die kodierenden Sequenzen des Wildtyp-AAVs komplett entfernt und durch einen Promotor, ein therapeutisches Gen und eine Poly-A-Sequenz (pA) ersetzt. Im Bild oben rechts ist die hexagonale, dreidimensionale Struktur des viralen Capsids dargestellt. Im Bild unten rechts sieht man einen Teil des elektronenmikroskopischen Bildes von einem einzelnen Virus. ITR: inverted terminal repeats; pA: Poly-A-Sequenz; AAV: Adenoassoziiierter Virus. (Modifiziert nach Stieger & Lorenz 2008).

Nanopartikel haben den Vorteil, dass sie bisher noch nie zu Immunreaktion gegen die viralen Capside geführt haben. Allerdings ist ihre Effizienz und ihre Lebensdauer deutlich geringer. Um einen Vektor herzustellen, wird der gesamte für Rep- und Cap-Proteine codierende Teil der DNA durch eine Expressionskassette, d.h. einer Promotorsequenz, dem therapeutischen Gen und einer Poly-A-Sequenz, ersetzt (Stieger & Lorenz 2008) (siehe Abbildung 8).

Der Transfer des erfolgreich hergestellten rekombinanten AAV-Vektors erfolgt via subretinaler oder intravitraler Applikation. Bei der meist durchgeführten subretinalen Injektion werden die Vektoren im Spalt zwischen RPE und Photorezeptor deponiert und führen zunächst im Injektionsbereich zu einer Blase aus Injektionsflüssigkeit. Innerhalb von 24 bis 48 Stunden kommt es aber zu einer Rücklagerung der Retina an das RPE (Stieger & Lorenz 2008). Innerhalb von 24 Stunden werden die Vektoren von den angrenzenden Zellen aufgenommen, es kommt zum Transfer der cDNA in den Zellkern und zur Expression von mRNA, welche innerhalb von einigen Tagen bis Wochen nachgewiesen werden kann (Stieger & Lorenz 2014) (siehe Abbildung 9).

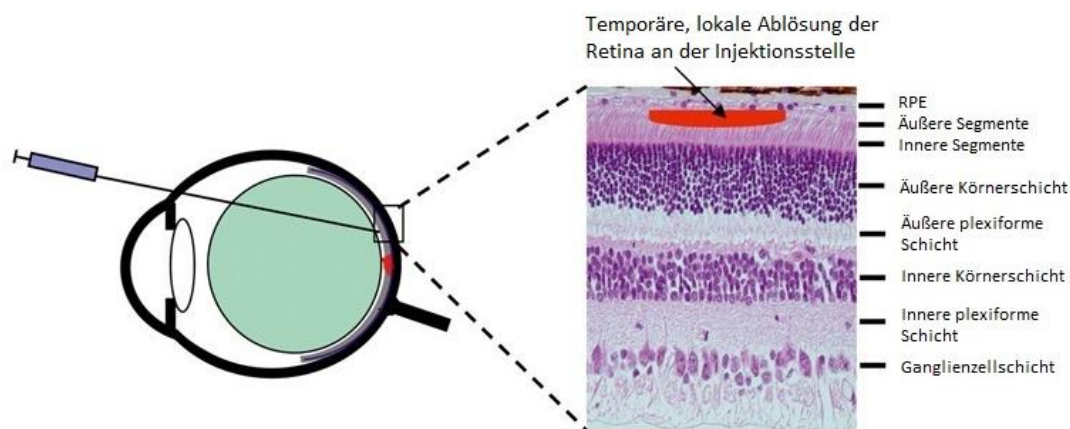


Abbildung 9: Die Subretinale Injektion eines AAV-Vektors in die Retina

Die Graphik zeigt die subretinale Injektion eines AAV-Vektors in die Retina, dadurch löst sich diese temporär an der Injektionsstelle ab. Innerhalb von 24 – 48 Stunden kommt es wieder zur Anlagerung. (Modifiziert nach Stieger & Lorenz 2008).

Um verschiedene rekombinante AAVs herzustellen, werden im Labor die ITRs und die Rep-Proteine des einen Virus mit den Capsiden eines anderen Virus kombiniert. Dieses Verfahren nennt man *cross packing* (Alexander & Hauswirth 2008). Um die Spezifität eines rekombinanten Vektors weiter zu erhöhen, werden zellspezifische Promotoren zur Kontrolle der Genexpression eingesetzt. Ein Beispiel wäre der Cytomegalievirus Promotor, der schon sehr früh eingesetzt wurde. Es gibt auch einen

Promotor für das RPE65 Gen oder spezifische Promotoren für die Müllerzelle, z.B. den Promotor für das „*glial fibrillary acidic protein*“-Gen (GFAP-Gen) (Stieger & Lorenz 2008).

1.5.2 Regulierbare Expression von Transgenen

Um ungewollte Nebeneffekte bei lang anhaltender Expression zu minimieren, werden verschiedene Regulationssysteme entwickelt. Die therapeutischen Gene sollen nur in einem bestimmten therapeutischen Fenster exprimiert werden. Dies geschieht meist durch Anwesenheit von bestimmten aktivierenden Molekülen, welche zu jedem beliebigen Zeitraum für eine definierte Zeitdauer oral oder intravenös appliziert werden (Stieger & Lorenz 2008). Die wichtigsten Vertreter solcher Regulationssysteme stellen die molekülgesteuerten Systeme, das Tetracyclin-abhängige System und das Rapamycin-abhängige System, sowie ein durch Sauerstoffgehalt im Gewebe reguliertes System (hypoxia-regulated system, HRE), dar. Der Vektor für das Tetracyclin-abhängige System besteht aus 2 Expressionskassetten, dem therapeutischen Gen und einem Gen, welches für ein Aktivitätsprotein codiert (Transaktivator rtTA). Dieser kontinuierlich produzierte Transaktivator besitzt eine bakterielle und eine virale Domäne. Er führt entweder in Anwesenheit (TetOn) oder in Abwesenheit (TetOff) von Tetracyclin oder seinem Derivat Doxycyclin (Dox) zur Expression des therapeutischen Gens. Das TetOff-System eignet sich vor allem zur Anwendung in der Klinik, wenn das zu exprimierende Protein die längste Zeit im angeschalteten Modus verbleiben soll, um nicht die ganze Zeit Dox applizieren zu müssen. Soll ein Protein nur kurzzeitig angeschaltet werden, stellt das TetOn-System die bessere Wahl dar.

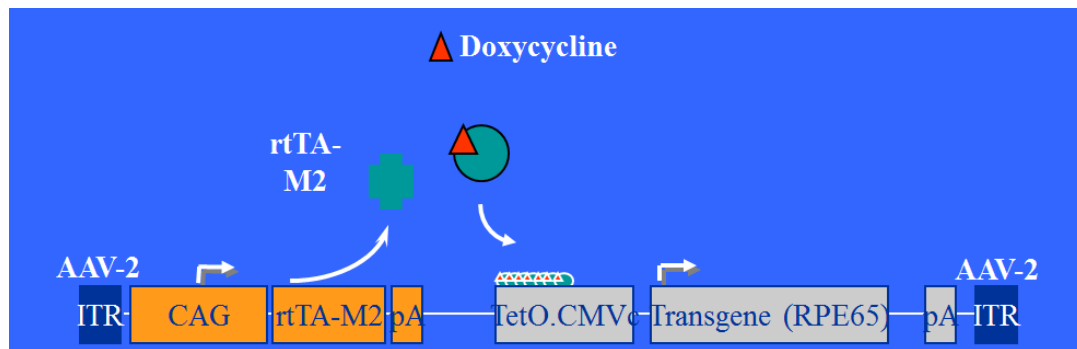


Abbildung 10: Struktur eines TetOn Vektors zur Regulation der Expression von RPE65

Die Abbildung zeigt die Struktur der beiden Expressionskassetten im TetOn System eines Vektors. In der ersten Kasse befindet sich der Transaktivator (rtTA-M2), der durch den viralen CAG-Promotor kontrolliert wird, und eine Polyadenylierungssequenz (pA). Die zweite Kasse besteht aus dem Transportgen RPE65 unter Kontrolle eines CMV-Promotors, der mit TetO-Sequenzen fusioniert ist. Neben dem Transgene folgt eine weitere pA. Das rtTA-Protein wird kontinuierlich produziert. Da der CMV-Promotor inaktiv ist, wird kein Transgene produziert. Fehlt Doxycyclin (Dox), ist das rtTA Protein inaktiv und löslich. Bei der Applikation von Dox, bindet es an das rtTA-Protein und verändert seine Konformation, sodass es nun an die TetO-Sequenzen andocken kann. Dies führt zur Aktivierung des Promotors und zur Expression von RPE65. Wird Dox abgesetzt, führt dies zur Lösung des rtTA-Proteins von den TetO-Sequenzen, und die Expression von RPE65 wird eingestellt. (Modifiziert nach Stieger & Lorenz 2008).

Die Testung eines TetOn System wurde sowohl bei Ratten als auch bei Primaten nach erfolgtem rAAV-Gentransfer getestet. Bei den Primaten wurden die Expression von EPO als Reportergen gesteuert. Dox wurde intravenös oder oral verabreicht, und nach 2 bis 4 Tagen zeigte sich ein 20-facher Anstieg der EPO-Konzentration im Kammerwasser. Es dauerte maximal 2 Wochen bis die Konzentration auf ihre Ursprungswerte zurückgegangen war, nachdem die Applikation beendet wurde. Bei Affen schaltete man das Regulationssystem über 6 Monate an und konnte eine stabile EPO-Expression nachweisen. Dabei wurden keine ungewollten Nebeneffekte bemerkt. Während des Verlaufes von 4 Jahren zeigte sich die EPO-Konzentration stabil und es wurden keine humoralen oder zellulären Immunreaktionen beobachtet (Stieger & Lorenz 2008).

1.5.3 Gentherapie beim RPE65-Hundemodell

Acland und Kollegen waren die Ersten, die Versuche an einer kleinen Gruppe von Hunden durchführten (Acland et al. 2001). Sie injizierten dabei subretinal einen rAAV2-Vektor mit einer korrekten Kopie des Gens RPE65 kontrolliert durch einen „chicken beta actin (CBA)“-Promotor. Der Erfolg der Therapie zeigte sich durch positive ERG-Signale am therapierten Auge sowie der erfolgreichen Absolvierung

eines Hindernisparcours 4 Monate nach der Injektion und einem positiven Effekt auf den Pupillenreflex. Außerdem konnte post mortem die Expression des rRPE65 mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen werden.

Im Laufe der Jahre wurden die Studiendesigns angepasst, indem man den AAV-Serotyp oder regulatorische Sequenzen veränderte. Bennicelli und Kollegen konnten positive ERG-Signale nach der Injektion eines AAV2.RPE65-Vektors bei Hunden nachweisen (Bennicelli et al 2008). Sie dokumentieren außerdem einen verbesserten Pupillenreflex sowie reduzierten Nystagmus. Es konnten weder das RPE65 Protein noch das AAV2-Capsid in Serumproben nachgewiesen werden. Auch im untersuchten Kammerwasser zeigte sich kein AAV2-Capsid. Parallel zu diesen Forschungen entwickelten Le Meur und Kollegen einen AAV4-Serotyp-Vektor, der zielgerichtet das RPE transduziert sowie einen zellspezifischen Promotor für das RPE65 Gen (Le Meur et al. 2007). Auch hier zeigte sich nach der Injektion der Tiere in einem Alter von 8 bis 11 Monaten ein Therapieerfolg, der durch messbare ERG Ableitungen sowie die Absolvierung eines Hindernisparcours unter schwachen Lichtbedingungen bestätigt werden konnte. Nur ein Tier im Alter von 30 Monaten bei Injektion zeigte keine Verbesserung seiner Sehfunktionen. Langzeituntersuchungen von AAV-vermittelter Gentherapie an Hunden erfolgten durch die Gruppe um Narfstrom (Narfstrom 2003b; Narfstrom 2003a). Sie zeigten, dass die verbesserten ERG Ableitungen über längere Zeit stabil blieben. 80% der untersuchten Tiere zeigten postoperativ eine Uveitis, die sich aber nach ein paar Wochen erfolgreich behandeln ließ.

Auch Acland und Kollegen führten weitere Untersuchungen durch. Sie konnten im Blutserum und Kammerwasser keine Antikörperantwort auf RPE65 feststellen. Die Untersuchung von extraokulärem Gewebe auf die Expression von RPE65 cDNA fiel ebenso negativ aus (Acland et al. 2005). Annear und Kollegen untersuchten erstmalig die Augen von behandelten Tieren im Alter zwischen 2 und 6 Jahren. Trotz des relativ hohen Alters konnten verbesserte ERG Messungen sowie Sehleistungen mit Hilfe eines Parcours nachgewiesen werden. Wahrscheinlich stellt die Anzahl der verbliebenen Photorezeptoren keinen limitierenden Faktor für den Erfolg der Therapie dar (Annear et al. 2013). Diese Aussage steht im starken Widerspruch zu den Untersuchungen von Le Meur und Kollegen. Die Frage, ob das Alter einen limitierenden Faktor für die gentherapeutische Behandlung darstellt, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden.

Die Testung von Regulationssystemen, wie das Tetracyclin-abhängige System, wurde auch beim RPE65 erkrankten Hund durchgeführt. Eine Gruppe um Lhériveau entwickelte dafür drei verschiedene Vektoren: AAV2/4TetOff.rpe65, AAV2/4TetOn.rpe65 und AAV2/4CMV.rpe65. Die Untersuchungen nach der Injektion zeigten einen normalen Fundus, eine normale Schichtdicke im OCT sowie keine Antikörper gegen die Transaktivatoren. Zum ersten Mal wurde gezeigt, dass es möglich ist, mit einem Doxycyclin-abhängigen System die Photorezeptorfunktion über die Expression von therapeutischen RPE65 Genen zu regulieren. Dabei zeigte der Vektor unter dem CMV-Promotor die schwächste Wirkung. Allerdings zeigten sich bei allen regulierbaren Vektoren viel schwächere ERG-Signale als bei den nicht regulierbaren Vektoren mit gleichem Studiendesign (Lhériveau et al. 2010).

1.5.4 Gentherapie beim Menschen mit RPE65 Mutationen

Die ersten 3 klinischen Studien zur AAV-vermittelten Gentherapie wurden 2007 von 3 unterschiedlichen Gruppen unabhängig voneinander begonnen: NCT00481546 (Cideciyan et al. 2009), NCT00516477 (Maguire et al. 2008), NCT00643747 (Bainbridge et al. 2008).

Bainbridge und seine Kollegen untersuchten 3 Patienten, die mit einem AAV2/2.hRPE65.hRPE65 behandelt wurden. Dabei erfolgte die Injektion in das Auge mit dem schlechteren Visus. Es traten keine Nebenwirkungen auf, allerdings auch keine positiven ERG Messungen. Die Lichtsensitivität zeigte sich verbessert und ein Hindernisparcours konnte besser durchlaufen werden (Bainbridge et al. 2008). Mittlerweile nehmen an der offenen Studie 12 Personen im Alter von 6 bis 23 Jahren teil und die bis dato vorliegenden Ergebnisse wurden 2015 nach 3 Jahren Dauer veröffentlicht (Bainbridge et al. 2015). Auch hier konnten keine ERG Ableitungen gemessen werden. Es zeigten sich eine leicht verbesserte Netzhautempfindlichkeit in unterschiedlichem Ausmaß, die ihren Höchststand nach 6 bis 12 Monaten erreichte und sich dann abfallend zeigte. Es konnte eine Korrelation zur Dosishöhe beobachtet werden. 3 Patienten erlitten eine Uveitis und bei zwei Patienten ergab sich eine Verschlechterung der Sehschärfe.

Die Untersuchungen von 12 Patienten durch Maguire und Kollegen, welche durch Injektion des Auges mit dem schlechteren Visus, mit einem AAV2/2.modCBA.hRPE65 Vektor behandelt wurden, ergaben auch keinen ERG

Effekt. Es zeigten sich keine schädlichen Nebenwirkungen, eine deutlich verbesserte Lichtempfindlichkeit sowie eine Reduzierung des Nystagmus. Außerdem konnten die Patienten alleine einen Hindernisparcours bei schwachen Lichtverhältnissen durchlaufen, und 5 Patienten zeigten einen verbesserten Visus. Die Studie befindet sich derzeit in Phase 3 (NCT00999609). 3 der Patienten erhielten eine zusätzliche Behandlung des zweiten Auges (Bennet et al. 2012). Hierbei zeigten sich eine Verbesserung des Pupillenreflexes sowie eine bessere Orientierung im Dämmerungslicht. Eine Immunantwort wurde auch durch die zweite Gabe nicht ausgelöst.

Die dritte Gruppe bestand aus 15 Patienten, deren eines Auge mit dem AAV2/2.modCBA.hRPE65-Vektor behandelt wurde. Neben einer retinalen Verdünnung in der Makula bei einem Patienten zeigten sich keine schweren Nebenwirkungen. Die Lichtempfindlichkeit verbesserte sich bei allen Patienten, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß. Die Studie befindet sich noch in der Phase 1 (NCT00481546) (Jacobsen et al. 2012).

Anfang 2016 veröffentlichte die Gruppe um Testa die Ergebnisse eines italienischen Teenagers mit Leberischer kongenitaler Amaurose, der nicht nur eine unilaterale Injektion erhielt, sondern bei dem die Injektion in beide Augen erfolgte (NCT01208389) (Testa et al. 2016). Ein Jahr nach der Behandlung des zweiten Auges zeigte sich eine Verbesserung der Sehleistung von beiden Augen. Diese wurde anhand der Bestimmung der Sehschärfe („Best Corrected Visual Acuity“), der Bestimmung des Gesichtsfeldes („Goldman perimetry“), der Mikroperimetrie („microperimetric testing“) und des Binokularesehens (Esternan computerized binocular visual field) untersucht. Durch die Therapie des zweiten Auges zeigte sich vor allem eine Verbesserung des Binokularesehens. Insgesamt wurde im Gegensatz zu vorherigen Studien eine Verlangsamung der Retinadegeneration festgestellt (Testa et al. 2016).

1.6 Zielsetzung

Die bisherigen Ergebnisse der Gentherapie bei Patienten mit RPE65 Mutationen weichen stark von den erfolgreichen Studien am Hundemodell ab. Um diese Diskrepanz besser verstehen zu können, ist eine gründliche Untersuchung der caninen Netzhaut nötig.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, immunhistochemische Untersuchungen am caninen Modell für frühkindliche Netzhaut-Degeneration nach erfolgreicher Gentherapie mit AAV-Vektoren durchzuführen. Dazu müssen zunächst die optimalen Antikörperkonzentrationen ermittelt werden.

Dann sollen sowohl Augen, die das fragliche Protein nach Behandlung kontinuierlich exprimieren, als auch Augen, bei denen die Expression durch ein Tet-ON/OFF-System über Doxyzyklin reguliert worden ist, untersucht werden. Bei der kontinuierlich exprimierten Behandlung soll auch geschaut werden, ob es einen Unterschied zwischen den verschiedenen eingesetzten Vektoren gibt.

Außerdem soll untersucht werden, ob die Therapie auch einen negativen Einfluss auf die Netzhaut hat, z.B. in Form der reaktiven Gliose.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Versuchstiere und Injizierter Vektor

Als Untersuchungsmaterial dieser Arbeit dienten Hunde der Rasse Briard mit einer homozygoten Nullmutation im RPE65 Gen. Das Tier A1 wurde nicht behandelt und diente als Positivkontrolle. Die behandelten Tiere mit RPE65 Mutation lassen sich in vier Gruppen einteilen:

Bei den Tieren B1 und B2 erfolgte eine unilaterale Injektion mit Hilfe des AAV2/2.pRPE65.rpe65-Vektors, welcher das RPE sowie die Photorezeptoren transduziert (siehe Tabelle 1). C1 erhielt eine unilaterale und C2 eine bilaterale Injektion mit dem AAV2/4.pRPE65.rpe65-Vektor. C3 erhielt eine unilaterale Injektion in das linke Auge mit dem gleichen Vektor. Das Tier D1 wurde als Einziges mit einem CMV-Vektor behandelt (AAV2/4.CMV.rpe65).

Die Tiere E1 - E4 wurden mit Hilfe des Tet-On/Off-Systems behandelt. Ihre Expression kann über Doxycyclin reguliert werden.

Die genauen Angaben zu den einzelnen Tieren sind in der Tabelle 2 aufgeführt.

Ursprünglich stammen die Tiere aus dem Boisbonne Center der veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Nantes in Frankreich. Die Haltung der Hunde erfolgte 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.

Tabelle 2: Versuchstiere

WT: Wildtyp; OD: rechtes Auge; OS: linkes Auge; Dox: Doxycyclin

Hund	Status	Auge	Vektor	Zeitpunkt Injektion [Monate]	Induk- tion Dox	Zeitpunkt Euthanasie [Monate]	
A1	WT	OD	unbehandelt			18	
B1	RPE 65-/-	OD	AAV2/2.pRPE65.rpe65	7		54	
		OS	unbehandelt				
B2		OD	AAV2/2.pRPE65.rpe65	11		96	
		OS	unbehandelt				
C1		OD	AAV2/4.pRPE65.rpe65	18		36	
		OS	unbehandelt				
C2		OD	AAV2/4.pRPE65.rpe65	6		66	
		OS		18			
C3		OS	AAV2/4.pRPE65.rpe65	8		54	
D1		OD	AAV2/4.CMV.rpe65	10		30	
		OS	unbehandelt				
E1		OD	AAV2/4.TetOff.rpe65	10		-	30
		OS	unbehandelt				
E2		OD	AAV2/4.TetOff.rpe65	10		+	
		OS	unbehandelt				
E3		OD	AAV2/4.TetOn.rpe65	10		+	
		OS	unbehandelt				
E4		OD	AAV2/4.TetOn.rpe65	10		-	
		OS	unbehandelt				

2.1.2 Weitere Materialien

Die für die Arbeit verwendeten Chemikalien, Materialien, Geräte und andere Hilfsmittel sind in Tabelle 3, Tabelle 4, Tabelle 6, Tabelle 7 und Tabelle 8 aufgeführt.

Die Auflistung der eigenhändig hergestellten Lösungen und Puffer sind in der Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenz	Bezugsquelle
Aqua Poly-Mount	Polysciences Europe, Eppelheim, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA) Fraktion V	Serva, Heidelberg, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat (Na_2HPO_4)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Immersion Oil –Type-F	Olympus, Hamburg, 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 %ig (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland

Chemikalien/Reagenz	Bezugsquelle
Sucrose	Serca, Heidelberg, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Aluminiumfolie	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Deckgläser 24 x 50 mm	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Fettstift	Dako, Hamburg, Deutschland
Parafilm M	VWR, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen, div. 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, unsterile, verschiedene	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sterilfilter 150 ml	Corning Inc., New York, USA
SuperFrost Ultra Plus Objektträger	Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland

Tabelle 5: Puffer und Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
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_3 in PBS
Natriumazid Stammlösung	5 % NaN_3 in Aqua dest.
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), 0,2 M, pH 7,4	43,42 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 5,24 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ In 1 L Aqua dest.
Präinkubationslösung	10 % NDS 1 % BSA 0,5 % Triton X-100 in PBS
Sucrose, 30 %ig	30 g Sucrose 0,5 mL 5 % NaN_3 auf 100 g in PB lösen
Triton X-100 Stammlösung	5 % Triton X-100 in PBS

Tabelle 6: Getestete Primärantikörper

Ms: Maus; rb: Kaninchen; got: Ziege; AS: Aminosäure

Name (Bestell-Nr.)	Wirt	Immunogen	Bezugsquelle	Verdün- nung
Blue Opsin (AB5407)	rb	Rekombinantes humanes blau-sensitives Opsin	Chemicon, CA, USA	1:2000
CRALBP (sc-28193)	rb	N-terminales Peptid des humanen zellulären Retinaldehydebinderproteins (CRALBP) (AS-1-100)	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA	1:100
CtBP2 (612044)	ms	Peptid des c-terminiertes Bindeprotein 2 (CtBP2) der Maus (AS 361-445)	BDTransduktion Laboratories, NY, USA	1:10000
GFAP (AB5804)	rb	Aufgereinigtes bovines Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	Chemicon, CA, USA	1:1000
Glutamin-Synthetase (610517)	ms	Aufgereinigte Glutamin-Synthetase des Schafs (AS 1-373)	BDTransduction Laboratories, NY, USA	1:5000
OPN1MW/MW2/LW (sc-22117)	gt	Peptid der extrazellulären Domäne des humanen rot-sensitiven Opsins	Santa Cruz Biotechnology	1:600
OPN1SW (sc-14363)	gt	N-terminales Peptid des humanen blau-sensitiven Opsins	Santa Cruz Biotechnology	1:600
PKC α (P4334)	rb	C-terminales Peptid der V5 Region der Protein-kinase C alpha (PKC α) der Ratte (AS 659-672 mit Lys am N-Terminus)	Sigma-Aldrich, MO, USA	1:10000
RDH5 (sc-98348)	rb	Peptid der humanen Retinol-Dehydrogenase 5 (RDH5) (AS 111-150)	Santa Cruz Biotechnology	1:50
RPE65 (NB100-355)	ms	Bovine mikrosomale Membranproteine des retinalen Pigmentepithels	Novus Biologicals, Cambridge, UK	1:250
Vimentin (5741)	rb	Synthetisches Peptid des humanen Vimentins	Cell Signaling, CA, USA	1:1000

Tabelle 7: Verwendete Sekundärantikörper und fluoreszenzmarkierte Reagenzien

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

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

Tabelle 8: Verwendete Geräte und Hilfsmittel

Gerät/Hilfsmittel	Bezugsquelle
Analysewaage, ACC-110.4	Satorius, Göttingen, Deutschland
Digitales Fluoreszenzmikroskop BZ8000	Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland
Excel 2010	Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
Färbekammer, schwarz	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glasgefäße Duran, div. Ausführungen	VWR, Darmstadt, Deutschland
Klingenbrecher nach Castroviejo 13 cm	Gebr. Martin, Tuttlingen, Deutschland
Konfokales LaserScan Mikroskop Fluoview FV10i	Olympus, Hamburg, Deutschland
Kryostat CM 3050	Leica, Nussloch, Deutschland
Luft-Objektive: 10x/0,4	Olympus, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer	IKA, Staufen, Deutschland
Messpipetten Duran, div. Ausführungen	VWR, Darmstadt, Deutschland
Öl-Immersionsobjektiv: 60x/1,35	Olympus, Hamburg, Deutschland
pH Meter, Seven Easy S20	Mettler Toledo, Schwerzenbach, Schweiz
Photoshop CS 4 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

Gerät/Hilfsmittel	Bezugsquelle
Software FV10-ASW Image Acquisition	Olympus, Hamburg, Deutschland
Stereomikroskop SMZ168	Motic, Wetzlar, Deutschland
Word 2010	Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
Zentrifuge 1-15 PK	Sigma, München, Deutschland

2.2 Methodik der Vorarbeiten

Am INSERM UMR 1089 Institut de Recherche Thérapeutique 1 der Universität Nantes in Frankreich erfolgten alle vorher durchgeführten Vorarbeiten durch das dortige Personal.

2.2.1 Subretinale Injektion

Weber und Kollegen etablierten ein standardisiertes Verfahren zur subretinalen Injektion. Die subretinale Injektion erfolgte unter Isoflurannarkose und nach dem transvitrealen Ansatz. Hierbei wurde eine 44-Gauge Kanüle in den Glaskörperhohlraum eingebracht, unter mikroskopischer Kontrolle eine Retinotomie in der peripheren Netzhaut erzeugt und anschließend eine gezielte Menge Vektorlösung in den subretinalen Raum injiziert. Damit sich diese Vektorlösung im superioren zentralen Bereich der Retina ausbreitet, wurde die Injektionsstelle einige mm oberhalb des optischen Nerven gewählt. Bis zum 6. postoperativen Tag erfolgte die Behandlung mit Prednisolon und eine antibiotische (Fluorchinolone) oder antiphlogistische (Tolfenaminsäure) Behandlung (Weber et al. 2003). Zur graphischen Darstellung der subretinalen Injektion siehe Abbildung 9.

2.2.2 Erfolgs- und Verlaufskontrollen

Nach erfolgter subretinaler Injektion wurden verschiedenen Erfolgs- und Verlaufskontrollen durchgeführt. Die fundoskopische Untersuchung der Augen, die Fluoreszein Angiographie, die Optische Kohärenztomographie (OCT), das Ganzfeld-

Elektroretinogramm (ERG), das multifokale Elektroretinogramm (mfERG) sowie die Durchlaufung eines Hindernisparcours bei guten und schwachen Lichtverhältnissen (Le Meur et al. 2007).

2.2.3 Vorbereitende Präparation der Augen

Die Entnahme der Augen erfolgte nach einer Überdosis von Anästhetika, welche den Tieren direkt zuvor gegeben wurde. In Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) erfolgte unter stereomikroskopischer Kontrolle die Präparation der Augenbecher. Entlang der Ora serrata wurden die Augen eröffnet, sodass Augenkammer, Linse und Glaskörper entfernt werden konnten. Zur Fixierung der Augenbecher kamen diese für 15 bzw. 30 Minuten mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) in einen Phosphatpuffer auf den Schüttler. Es folgten die Waschung in PBS und der ordnungsgemäße Transport nach Gießen.

2.3 Methodik der eigenen Arbeit

Die Technik der Immunhistochemie mit allen damit verbundenen Arbeitsschritten konnte von Dr. Daniela Klein im Labor für molekulare Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der JLU Gießen erlernt und weitergeführt werden. Auch ein Epifluoreszenzmikroskop sowie ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop wurden durch das Labor bereitgestellt.

2.3.1 Vorbereitende Maßnahmen für die Immunhistochemiefärbungen

Um die Augen einfrieren zu können, mussten diese zunächst in aufsteigende Sucrosereihe bei 4°C überführt werden. Die erste halbe Stunde erfolgte in 10 % Sucrose, anschließend folgt eine Stunde in 20 % Sucrose, und über Nacht wurden sie dann in 30 % Sucrose mit jeweils 0,02 % Natriumazid (NaN_3) gegeben. Sucrose wurde als Gefrierschutz des Gewebes eingesetzt und Natriumazid sorgte dafür, dass sich weder Bakterien noch Pilze ansiedeln. Nun konnten die Hundeaugen entweder direkt präpariert oder in 30 % Sucrose mit 0,02 % NaN_3 bei -20°C eingefroren und gelagert werden.

2.3.1.1 Entnahme und Präparation der Retina

Die Präparation der Augenbecher erfolgte in einer Plastischale mit 30 %iger Sucroslösung mit 0,02 % NaN_3 , die Augenbecher wurden dabei nur mit der Pinzette gehalten. Mit einem Klingenbrecher sowie einem Stück einer kleinen abgebrochenen Rasierklinge wurden die Schnitte für die Immunhistofärbungen entnommen. Dabei wurde strengstens darauf geachtet, dass das Auge die ganze Zeit von der Lösung bedeckt wurde, um eine Austrocknung zu verhindern. Die Retina für die Flatmount Färbungen wurde dann nur mit Hilfe eines Pinsels entnommen und in die 4 Well-Platte mit 30 % Sucroslösung gebracht. Für die vertikalen Schnitte wurden die Retina mit dem RPE entnommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße (Eppis) mit 30 % Sucroslösung aufbewahrt. Auf der Abbildung 11 sind die Entnahmestellen zu erkennen. Dabei wurden für die Flatmount Färbungen zwei Stücke nach den blauen Kästchen mit dem römischen Ziffern (I und II) entnommen, und für die vertikalen Schnitte erfolgte die Entnahme nach den Kästchen mit den arabischen Zahlen (1–3). Nach der Flatmount Färbung erfolgten jeweils 10 Aufnahmen pro Flatmount Schnitt, die jeweils einzeln ausgezählt wurden (siehe Kapitel Epi- und konfokale Laser Scanning Fluoreszenzmikroskopie).

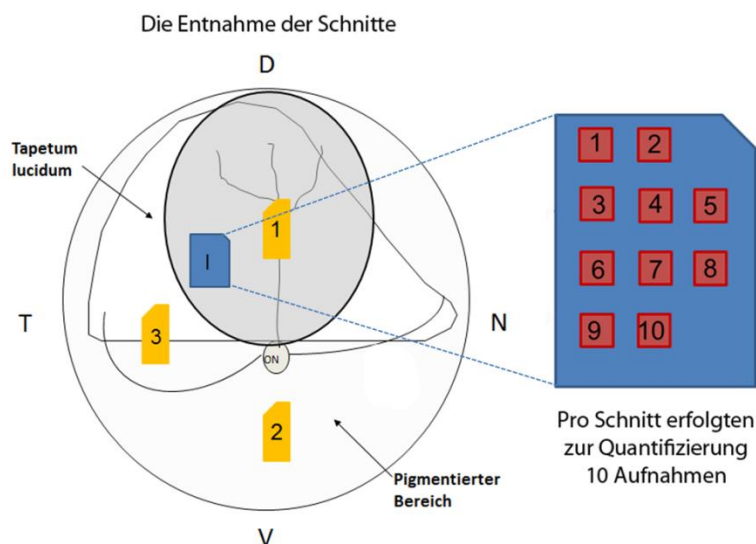


Abbildung 11: Präparationsschema Hundeauge

Die graphische Darstellung zeigt das Präparationsschema der Hundeaugen. Die blauen Kästchen zeigen dabei die Entnahmestellen für die Flatmount Färbungen. Römisch I ist dabei die Entnahme aus dem behandelten Bereich und II aus dem unbehandelten Bereich. Dabei erfolgten nach den Flatmount Färbungen pro Flatmount 10 Aufnahmen, die für die Quantifizierung jeweils einzeln ausgezählt wurden. Die gelben Kästchen zeigen die Entnahmestellen für die vertikalen Schnitte. Arabisch 1 ist aus dem therapierten Bereich und 2 sowie 3 aus den unbehandelten Bereichen. D: Dorsal; V: Ventral; T: Temporal; N: Nasal.

2.3.1.2 Herstellung von vertikalen Gefrierschnitten

Zur Herstellung von vertikalen Gefrierschnitten wurden zunächst Blöcke hergestellt, die dann geschnitten und auf einen Objektträger gebracht werden. Dazu benutzt man einen Kryostaten, die Objektträgertemperatur wurde zunächst auf -50°C und die Kammertemperatur auf -20°C eingestellt. Das Gewebe musste zunächst an das Einbettmedium (Jung Tissue Freezing Medium, Leica) gewöhnt werden, daher wurde dieses zunächst für 10 Minuten auf einem Objektträger bei 4°C vorinkubiert. Auch hier wurde die Retina mit dem RPE nur mit einem dünnen Pinsel berührt. Nun wurde ein neuer Objektträger mit Parafilm umwickelt und das zuvor auf den Tellerhalter gegebene Einbettmedium mit Hilfe einer Waage und diesem Objektträger geglättet, bis dieser entstandene Block eingefroren war. Der Objektträger wurde wieder gelöst und ein frischer Tropfen Einbettmedium auf ihn gebracht. Das vorinkubierte Gewebe konnte nun auf diesen Tropfen gegeben werden und wurde kopfüber auf den vorgefertigten Block eingefroren. Falls es zu einer Lösung zwischen Retina und RPE gekommen war, wurden beide Stücke direkt übereinander eingebettet (Sandwicheinbettung). Das Blöckchen wurde nun mit einer Rasierklinge zurecht geschnitten und zum Schutz mit einer weiteren Schicht Einbettmedium überzogen. Nach der Lösung des Blöckchens vom Tellerhalter wurde dieser mit neuem Einbettmedium beschichtet und das Blöckchen seitlich aufgebracht. Bei einer Objektträgertemperatur von -18°C und einer eingestellten Schnittgröße von $16\text{ }\mu\text{m}$ wurden die Schnitte hergestellt und auf die Objektträger (Super Frost Plus, Menzel) aufgenommen. Das restliche Blöckchen wird in Parafilm und Alufolie eingewickelt und mit den Schnitten bei -20°C gelagert.

2.3.2 Immunhistochemiefärbungen der Präparate

2.3.2.1 Färbung von vertikalen Gefrierschnitten

Im ersten Schritt zur Färbung der Gefrierschnitte wurden diese für 3×10 Minuten in $0,01\text{ M}$ PBS bei einem pH Wert von 7,40 auf dem Schüttler bei ca. 30 Speed gewaschen. Dabei wurden die Gefrierschnitte aufrecht in eine Küvette (Glashalter) gestellt oder gelegt. Zum Wechseln der Lösung wurden immer und in allen folgenden Schritten Pipetten verwendet. Die Schnitte wurden anschließend getrocknet, in eine mit feuchten Tüchern ausgelegte Inkubationsbox gelegt und mit einem Fettstift um-

randet. Dies verhindert ein Auslaufen der Inkubationslösung und somit ein Austrocknen der Schnitte. Die Schnitte wurden dann mit 40 µl Präinkubationslösung (siehe Tabelle 4) bei Raumtemperatur (RT) für eine Stunde inkubiert. So kommt es zur Blockierung von freien Bindungsstellen, damit sich die Präinkubationslösung besser an die Zielstruktur binden kann. Nun folgte über Nacht bei RT die Inkubation mit dem Primärantikörper, der entsprechend seiner Verdünnung in der Antikörper Inkubationslösung 3 % NDS, 1 % BSA und 0,5 % Triton X-100 in PBS gelöst wurde. Manchmal war es nötig, eine Vorverdünnungslösung herzustellen, diese bestand aus PBS und 0,025 % NaAzid. Die Schnitte wurden am nächsten Tag erneut für 3x10 Minuten in 0,01 M (Molare Masse) PBS auf dem Schüttler gewaschen. Anschließend wurde für eine Stunde und unter Lichtschutz die Inkubation mit der Sekundärantikörperinkubationslösung bei RT in der Feuchtkammer durchgeführt. Die Herstellung erfolgte durch die Lösung der Sekundärantikörper entsprechend ihrer Verdünnung in der gleichen Antikörper Inkubationslösung wie bereits beschrieben. Die Eppis wurden dabei für 5 Minuten bei 13000 g und 20°C zentrifugiert. Wieder erfolgte für 3x10 Minuten unter Lichtschutz ein Waschgang in PBS. Zum Anfärben der Zellkerne wurde DAPI mit einer Verdünnung von 1:5000 für 3 Minuten in der Dunkelkammer aufgetragen. Nach einem letzten Waschgang für 3x10 Minuten in PBS bei RT wurden die Schnitte an der Luft getrocknet, mit einem Tropfen Aqua Poly Mount Medium bedeckt und anschließend mit einem Deckgläschen eingedekelt. Die Schnitte wurden bei 4°C gelagert und frühestens nach 24 Stunden mikroskopiert.

Zur Herstellung der Kontrollschnitte wurde am ersten Tag anstelle des primären Antikörpers reine Inkubationslösung aufgetragen, und am zweiten Tag erfolgte alles wie bereits beschrieben.

2.3.2.2 Flatmount Färbungen

Die Flatmount Färbungen dienten zur Zählung der Zapfenopsine. Die 4 Well-Platte mit der Retina wurde zunächst für 3x15 Minuten in 0,01 PBS bei einem pH Wert von 7,40 auf dem Schüttler bei ca. 30 Speed gewaschen. Es folgte die lichtdichte Inkubation der vorher hergestellten Präinkubationslösung aus 10 % NDS, 1 % BSA und 1% Triton X-100 in 0,01 PBS für 2 Stunden auf dem Schüttler bei Raumtemperatur (RT). Anschließend wurde die Präinkubationslösung durch die Zapfenantikörperlösung (S Opsin blue sowie L/M Opsin) in 3 % NDS, 1 % BSA und 1 % Triton X-100

mit 0,02 % NaAzid in PBS (Antikörperinkubationslösung) (siehe für nähere Informationen Tabelle 4-6) ersetzt. Die Inkubation in dieser erfolgte über zwei Nächte bei RT und unter Lichtschutz. Es folgten drei Waschgänge unter Lichtschutz für je 15 Minuten in PBS. Zur Herstellung der Sekundärantikörperinkubationslösung wurden die Sekundärantikörper 488Dα rb und Cy3Dα gt mit einer Verdünnung von 1:500 in derselben Antikörperinkubationslösung wie oben beschrieben mit Hilfe der Zentrifuge gelöst. Diese wurde für 2 Stunden auf dem Schüttler unter RT und Lichtschutz inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschgang für 3x15 Minuten in PBS unter RT und Lichtschutz. Anschließend wurde die Retina vorsichtig auf einem Objektträger ausgebreitet, die restliche Flüssigkeit mit einem Papierstreifen vorsichtig ohne Berührung der Retina abgesaugt, mit einem Tropfen Aqua Poly Medium bedeckt und einem Deckplättchen geschützt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Erst bei ausreichender Trocknung, frühestens nach 3 Tagen, wurden die Schnitte mikroskopiert.

2.3.3 Epi- und konfokale Laser Scanning Fluoreszenzmikroskopie

Die Aufnahmen der Flatmount Färbungen erfolgten alle mit dem Digitalen Fluoreszenzmikroskop BZ8000 (Keyence). Dabei wurde mit dem 20er Objektiv mikroskopiert (Plan Fluor ELWD DM 20xC NAO 45 Objektiv). Die Belichtung erfolgte immer bei einer Exposure Time von 1:10 - 1:60. Pro Flatmount wurden 10 Aufnahmen gemacht und darauf geachtet, dass es zu keinen Überschneidungen kommt (siehe Abbildung 11).

Die Aufnahmen der vertikalen Gefrierschnitte erfolgten zunächst auch mit dem Digitalen Fluoreszenzmikroskop BZ8000 (Keyence). Als Objektive wurden das Plan Fluor ELWD DM 20xC NAO45 und das Plan Apo VC60xHNM40 Oil benutzt.

Um noch genauere Bilder erzeugen zu können, erfolgte die Aufnahme aller Bilder erneut mit dem konfokalen Laser Scan Mikroskop Fluoview FV10i (Olympus), das zu Beginn meiner Doktorarbeit noch nicht zur Verfügung stand. Zur Übersicht und Orientierung wurde zunächst das 10er Objektiv verwendet, und anschließend erfolgten alle Aufnahmen mit dem 60er Objektiv. Je nach Färbung wurden die Präparate mit den Lasern Cy3 und Alexa Fluor 488 oder den Lasern 594 und Alexa Fluor 488 aufgenommen. Zur Bedienung und zum Export der Rohdaten wurde die Software Image Acquisition benutzt (Olympus).

2.3.4 Bildbearbeitung und -auswertung

Zunächst wurden die Mikroskop-Rohdaten in das Bildformat TIFF übertragen. Nun konnte eine Bearbeitung der Bilder mit Hilfe von Photoshop CS 4 Extended (Adobe) erfolgen. Hier wurden nur Anpassungen vorgenommen, die zu keiner Fehlinterpretation der Originaldaten führten. Es wurden die Parameter Helligkeit, Kontrast und Tonwert optimiert. Zur Darstellung der Abbildungen und deren Zusammenstellung wurde Photoshop CS4 Extended sowie PowerPoint 2010 (Microsoft) verwendet.

Die Auszählung der Zapfenfärbungen erfolgte mit dem manuellen Zählungswerkzeug der Software Photoshop CS4 Extended. Für die Analyse der Zapfenverteilung wurde die gesamte Bildfläche (359,83mm x 270,93mm) ausgezählt und auf Zapfen pro mm² hochgerechnet. Ihre graphische Darstellung erfolgte mit Sigma Plot 12 (Systat Software).

3 Ergebnisse

3.1 Morphologische Veränderungen bei Adeno-assoziiierter Virus-vermittelter Gentherapie bei kontinuierlicher Transgenexpression

Zur Darstellung der Müllerzelle erfolgte die Färbung mit Antikörpern gegen GFAP und Glutamin-Synthetase. GFAP ist das Glia Filament Acid Protein und ist basal in den Müllerzellen vor allem bei reaktiver Gliose sowie in den Astrozyten lokalisiert. Man sieht sehr gut, wie die GS dagegen in der kompletten Müllerzelle exprimiert wird, sich also über die gesamte Neuroretina erstreckt.

Die Färbungen erfolgten bei gesunden, erkrankten unbehandelten sowie gentherapeutisch behandelten Tieren mit kontinuierlicher Transgenexpression, durch den AAV2/2.pRPE65.rpe65-, AAV2/4.pRPE65.rpe65- und AAV2/4.CMV.rpe65-Vektor.

Außerdem erfolgte die Untersuchung in unterschiedlichen Regionen des Auges (siehe Abbildung 11). Da die Injektionsstelle für die Vektorlösung einige mm oberhalb des optischen Nervs gewählt wurde, steht nur Region 1 für den behandelten Bereich. Dieser wurde zur besonderen Heraushebung grau hinterlegt.

Wie in dem Kapitel reaktive Gliose beschrieben, stellt GFAP einen Marker für retinalen Stress dar. Dabei kommt es zur Hochregulierung von GFAP und einer Abnahme von GS. Um zu schauen, ob eine gentherapeutische Behandlung oder die Erkrankung selbst zu einer reaktiven Gliose führt und diese durch die Behandlung reduziert wird, wurden die Zellen mit GFAP und GS gefärbt. Darüber hinaus wurde nach Differenzen zwischen den unterschiedlichen Vektoren geschaut.

In der Abbildung 12 wurde zum Vergleich ein gesundes, unbehandeltes Tier in einer Doppelfärbung mit Antikörpern gegen GS und GFAP dargestellt. Um die unterschiedlichen Färbungen besser erkennen zu können, erfolgte zunächst die Darstellung der Einzelfärbungen. GFAP, grün dargestellt, färbt dabei nur basal die Müllerzellen und Astrozyten an, daher zeigt sich nur im Bereich der Ganglienzellschicht ein Signal. Bei der Färbung durch die Antikörper gegen die GS, rot dargestellt, sieht man dagegen eine Färbung der kompletten Müllerzellen. Das Signal reicht von der GCL bis zum Ende der ONL. Die Doppelfärbung ganz rechts in der Abbildung zeigt

die gegensätzliche Anfärbung von GFAP und GS. Es ist ersichtlich, dass GFAP und GS nicht die gleichen Strukturen der Müllerzelle anfärben, sondern in Ergänzung zueinander die Müllerzelle bzw. die Astrozyten abbilden.

Die Abbildung 13, 14 und 15 zeigen Einzel- sowie Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen GFAP und GS bei einem behandelten und einem unbehandelten Tier im Vergleich. Dabei steht nur Region 1 für den behandelten Bereich, da die Injektion einige mm oberhalb des optischen Nerven gewählt wurde und nur dies Region 1 entspricht. Die Behandlung erfolgte mit unterschiedlichen Vektoren: In Abbildung 13 erfolgte die Injektion mit einem AAV2/2.pRPE65.rpe65-Vektor, in Abbildung 14 mit einem AAV2/4.CMV.rpe65-Vektor und in Abbildung 15 mit einem AAV2/4.pRPE65.rpe65-Vektor. Die Färbung mit Antikörpern gegen GFAP, grün dargestellt, zeigt bei allen Tieren und in allen Regionen die basale Färbung der Müllerzellen bzw. der Astrozyten in der GCL. Dabei sieht man keine Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten Tieren sowie zwischen den unterschiedlichen Regionen. Die Anfärbung durch Antikörper gegen die GS, rot dargestellt, weist ebenfalls keine Unterschiede auf. Es färbt sich im Gegensatz zur GFAP Färbung die gesamte Müllerzelle an. Auch die Doppelfärbung bei diesen Tieren zeigt die unterschiedliche, sich ergänzende Anfärbung der Müllerzellen bzw. Astrozyten durch Antikörper gegen GFAP und GS.

Die Tabelle 9 gibt einen Überblick über die untersuchten Tiere bei kontinuierlicher Transgenexpression und einem gesunden Tier, inklusive ERG-Signal und Sehkraft nach Therapie.

Tabelle 9: Versuchstiere

WT: Wildtyp; OD: rechtes Auge; OS: linkes Auge; Dox: Doxycyclin; na: nicht angegeben.

Hund	Sta- tus	Auge	Vektor	Zeitpunkt Injektion [Monate]	Zeitpunkt Euthana- sie [Monate]	ERG Max. [μV]	Sehkraft nach Therapie
A1	WT	OD	unbehandelt		18	?	na
B1	RPE 65-/-	OD	AAV2/2.pRPE65.rpe65	7	54	?	+
		OS	unbehandelt			0	na
B2		OD	AAV2/2.pRPE65.rpe65	11	96	76	+
		OS	unbehandelt			0	na
C1		OD	AAV2/4.pRPE65.rpe65	18	36	>100	na
		OS	unbehandelt			0	na
C2		OD	AAV2/4.pRPE65.rpe65	6	66	80	+
		OS		18		65	+
C3		OS	AAV2/4.pRPE65.rpe65	8	54	?	+
D1		OD	AAV2/4.CMV.rpe65-	10	30	60	-
	OS	unbehandelt		0		na	

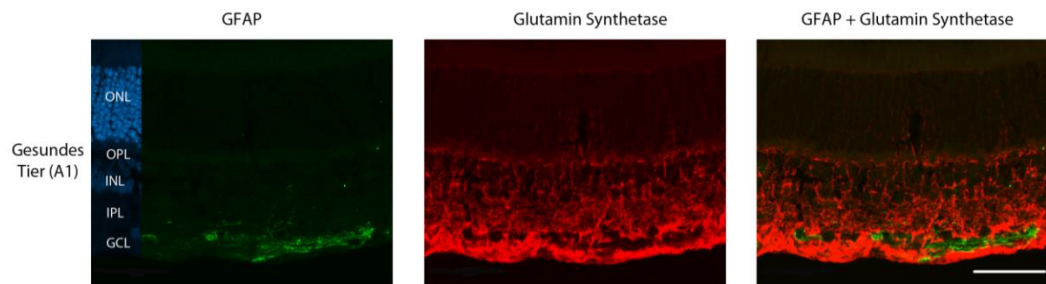


Abbildung 12: Müllerzelle nach GFAP und GS Färbung bei einem gesunden Tier

Die Abbildung zeigt bei einem gesunden Tier die Darstellung der Müllerzellen sowie Astrozyten durch GFAP und Glutamin-Synthetase (GS) zunächst im Einzelnen und dann in der Doppelfärbung. GFAP färbt dabei nur basal die Müllerzellen und Astrozyten an, GS zeigte eine Färbung der kompletten Müllerzellen. Die Doppelfärbung zeigt die gegensätzliche Anfärbung von GS und GFAP. ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht; IPL: Innere plexiforme Schicht; GCL: Ganglienzellschicht; GFAP: Glia Filament Acid Protein. Maßstabsbalken 50 μm .

3.1.1 Behandlung mit dem AAV2/2.pRPE65.rpe65-Vektor

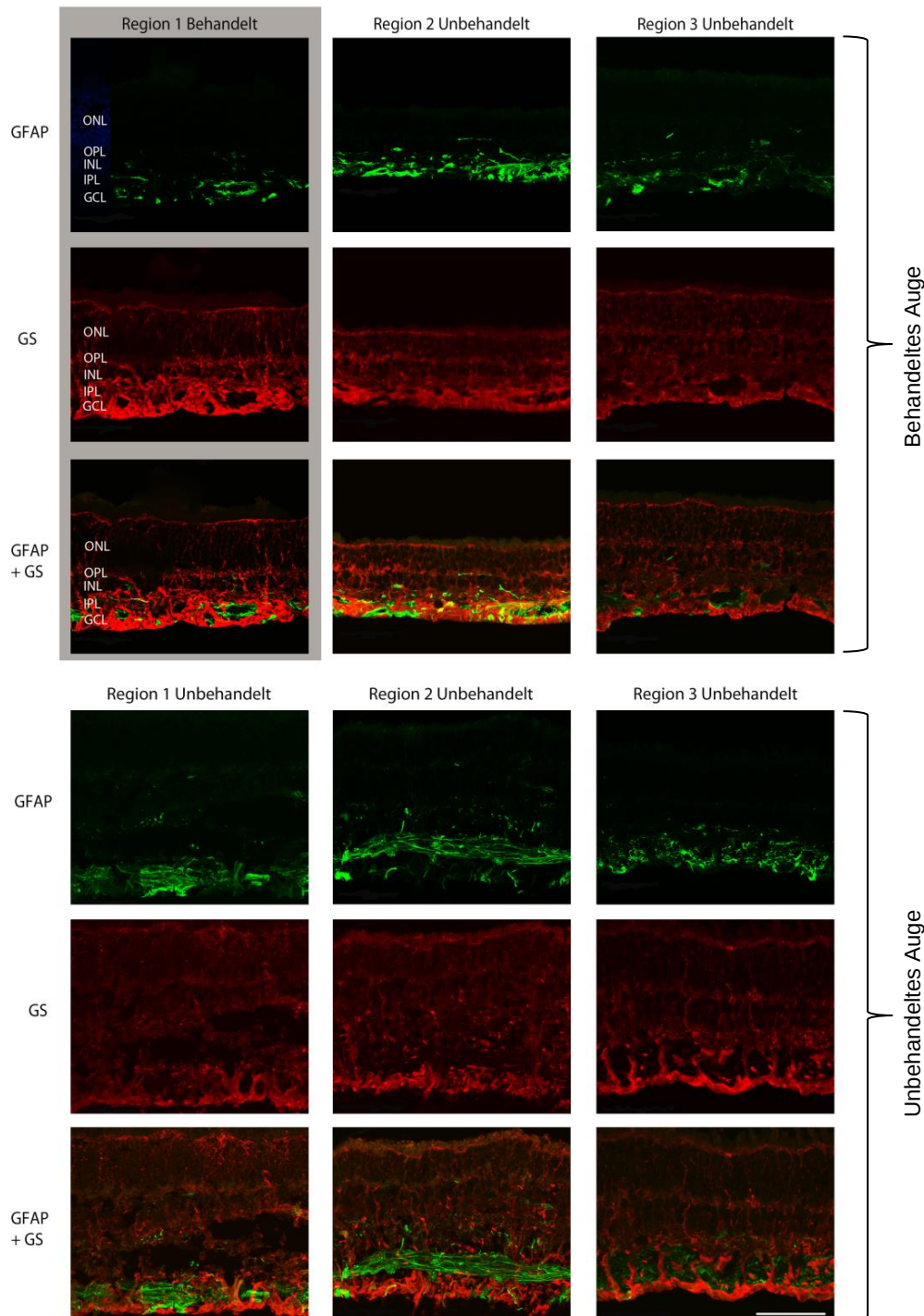


Abbildung 13: Müllerzelle nach GFAP und GS Färbung im Vergleich bei Injektion mit einem AAV2/2.pRPE65.rpe65-Vektor und dem unbehandelten Auge

Die Abbildung zeigt die Darstellung der Müllerzellen sowie der Astrozyten durch die Färbung mit GFAP und GS bei Injektion mit einem AAV2/2.pRPE65.rpe65-Vektor einzeln sowie in der Doppelfärbung. GFAP färbt dabei nur basal die Müllerzellen an, GS zeigte eine Färbung der kompletten Müllerzellen und Astrozyten. Die Doppelfärbung zeigt die konträre Anfärbung von GFAP und GS. ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht; IPL: Innere plexiforme Schicht; GCL: Ganglienzellschicht; GFAP: Glia Filament Acid Protein. Maßstabsbalken 50 µm.

3.1.2 Behandlung mit dem AA2/4.CMV.rpe65-Vektor

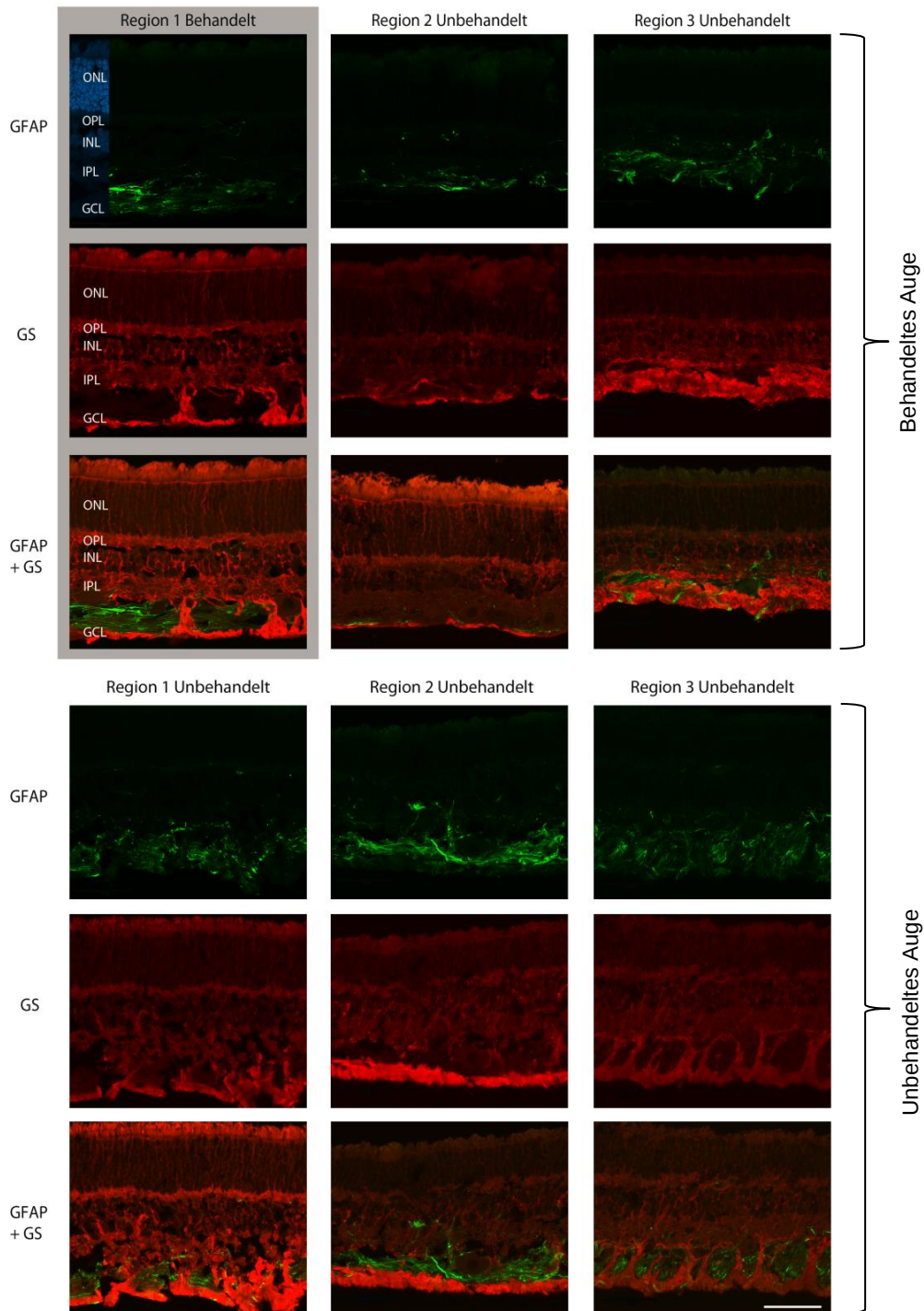


Abbildung 14: Müllerzelle nach GFAP und Glutamin-Synthetase Färbung im Vergleich bei Injektion mit einem AAV2/4.CMV.rpe65-Vektor und dem unbehandelten Auge

Anfärbung der Müllerzellen und Astrozyten nach Injektion mit einem AAV2/4.CMV.rpe65-Vektor im Vergleich zu einem kranken, unbehandelten Tier mit Hilfe von GFAP und GS. GFAP führt zu einer Färbung der basalen Müllerzellen und Astrozyten. GS wird in der kompletten Müllerzelle exprimiert. Die Doppelfärbung zeigt die konträre Anfärbung von GS und GFAP. ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht; IPL: Innere plexiforme Schicht; GCL: Ganglienzellschicht; GFAP: Glia Filament Acid Protein; GS: Glutamin-Synthetase. Maßstabsbalken 50 µm.

3.1.3 Behandlung mit dem AAV2/4.pRPE.rpe65-Vektor

3.1.3.1 Gliosefärbungen

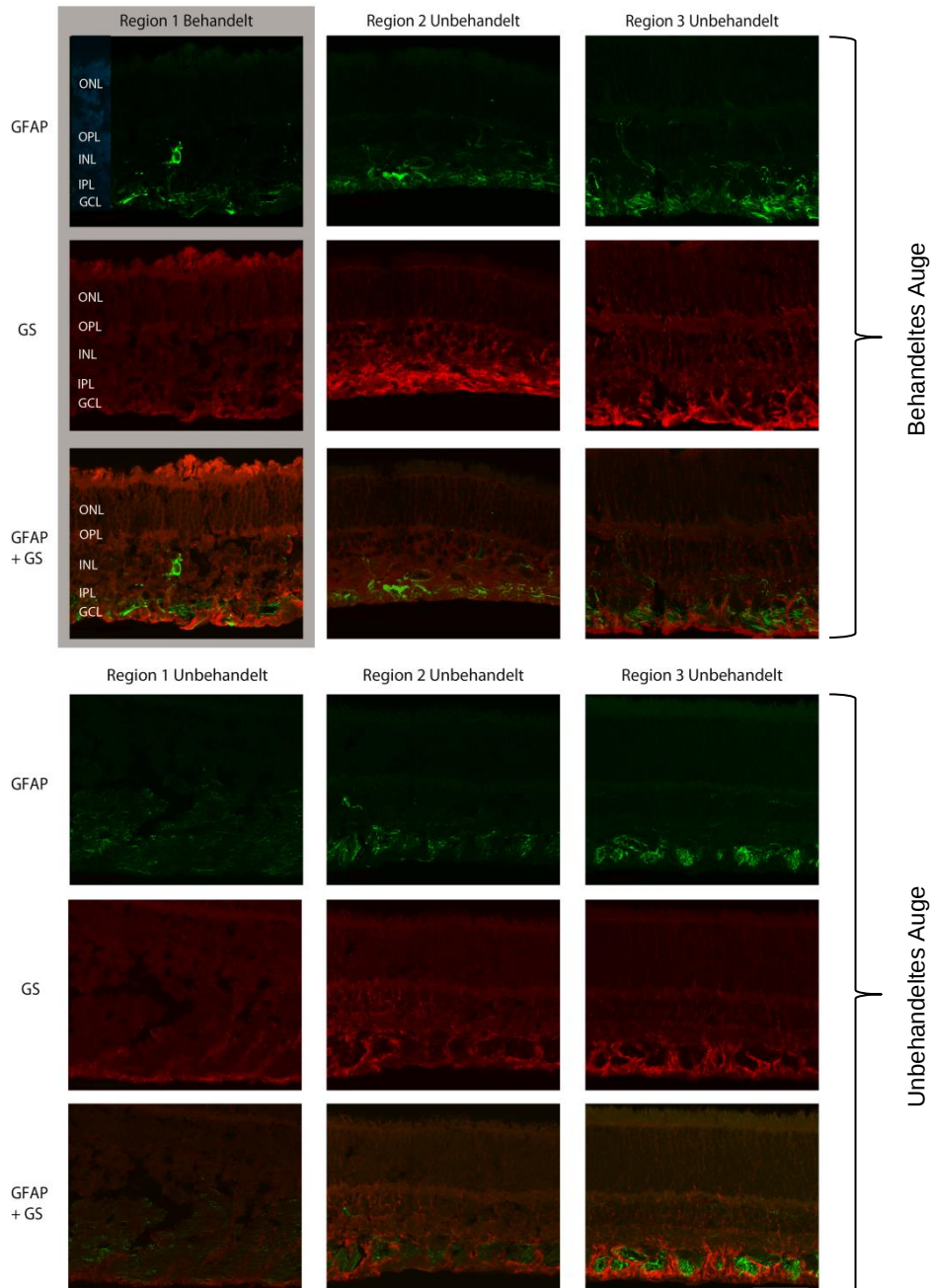


Abbildung 15: Müllerzelle nach GFAP und Glutamin-Synthetase Färbung im Vergleich bei Injektion mit einem AAV2/4.pRPE65.rpe65-Vektor und dem unbehandelten Auge

GFAP färbt basal die Müllerzellen sowie Astrozyten an, GS wird in der kompletten Müllerzelle exprimiert. Die Doppelfärbung zeigt die konträre Anfärbung von GS und GFAP. Es erfolgte die Injektion mit einem AAV2/4.pRPE65.rpe65-Vektor im Vergleich mit einem unbehandelten, erkrankten Tier. ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht; IPL: Innere plexiforme Schicht; GCL: Ganglienzellschicht; GFAP: Glia Filament Acid Protein; GS: Glutamin-Synthetase. Maßstabsbalken 50 μ m.

3.1.3.2 Synaptische Verbindungen in der OPL

Zur Untersuchung der retinalen Strukturen nach erfolgter Gentherapie wurden die synaptischen Verbindungen der Stäbchen in der äußeren plexiformen Schicht gefärbt. Die Stäbchenbipolarzellen wurden dabei mittels PKC α und die Ribbonsynapsen mittels CtBP2 angefärbt. Zur Darstellung der Horizontalzellen sowie Ribbonsynapsen erfolgte die Färbung mit Calbindin und CtBP2. Dabei wurde geschaut, ob es zum sogenannten *sprouting* gekommen ist, einem Auftreten von Synapsen außerhalb der äußeren plexiformen Schicht.

Da die Färbung der erkrankten Tiere, die mit den AAV2/2.pRPE65.rpe65- und AAV2/4.CMV.rpe65-Vektoren behandelt wurden, schon durch Dr. Daniela Klein erfolgte, wurde nur die Auswirkung des AAV2/4.pRPE.rpe54-Vektors und des Tet-On/Off-Systems getestet (siehe nachfolgendes Kapitel: 3.2 Morphologische Veränderungen bei Adeno-assoziiierter Virus vermittelter Gentherapie durch das Tet-ON/OFF-System).

Es wurden immer erkrankte, behandelte Tiere mit unbehandelten Tieren verglichen. Außerdem erfolgte die Untersuchung in unterschiedlichen Regionen des Auges (siehe Abbildung 11). Da die Injektionsstelle für die Vektorlösung einige mm oberhalb des optischen Nerven gewählt wurde, steht nur Region 1 für den behandelten Bereich. Dieser wurde zur besonderen Heraushebung grau hinterlegt.

Die Abbildung 16 zeigt die Färbung der Horizontalzellen und Ribbonsynapsen mit Calbindin und CtBP2 im Vergleich bei Injektion mit einem AAV2/4.pRPE65.rpe65-Vektor und einem unbehandelten Tier, die Horizontalzellen werden dabei grün dargestellt und die Ribbonsynapsen rot. Es können keine delokalisierten Synapsen außerhalb der plexiformen Schicht im unbehandelten Tier festgestellt werden. Auch zeigen sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Regionen. Region 1 im behandelten Tier zeigt vereinzelte *sprouting* Phänomene. Abbildung 17 zeigt die präsynaptische Färbung der Photorezeptoren mit CtBP2 (rot dargestellt) und die nachgeschalteten Stäbchenbipolarzellen mit PKC α (grün dargestellt). Hierbei zeigen sich vor allem im inferioren Bereich vereinzelte, delokalisierte Synapsen. Der Vergleich der behandelten Region mit den restlichen Regionen zeigt keinen Rückgang der *sprouting events*.

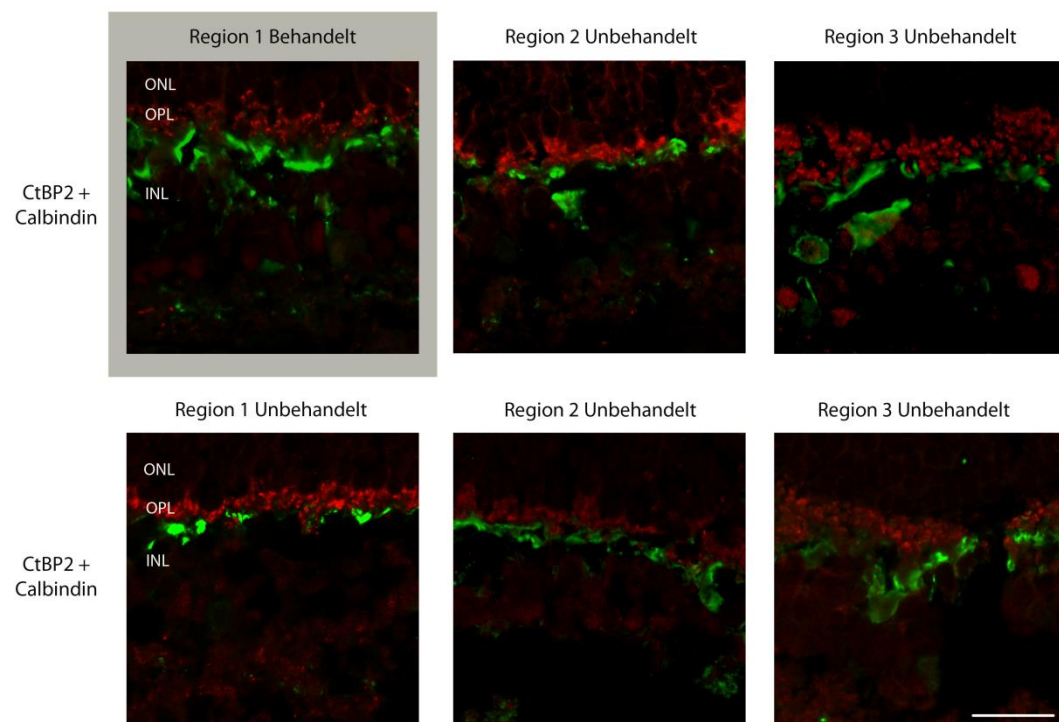


Abbildung 16: Färbung der Horizontalzellen und Ribbonsynapsen mit Calbindin und CtBP2 im Vergleich bei Injektion mit einem AAV2/4.pRPE65.rpe65-Vektor und dem unbehandelten Auge

Es erfolgte eine Anfärbung der Horizontalzellen und Ribbonsynapsen mit Calbindin und CtBP2. Dabei wurde ein behandeltes Tier durch einen AAV2/4.pRPE65.rpe65-Vektor mit einem unbehandelten erkrankten Tier verglichen. ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht. Maßstabsbalken 30 μm .

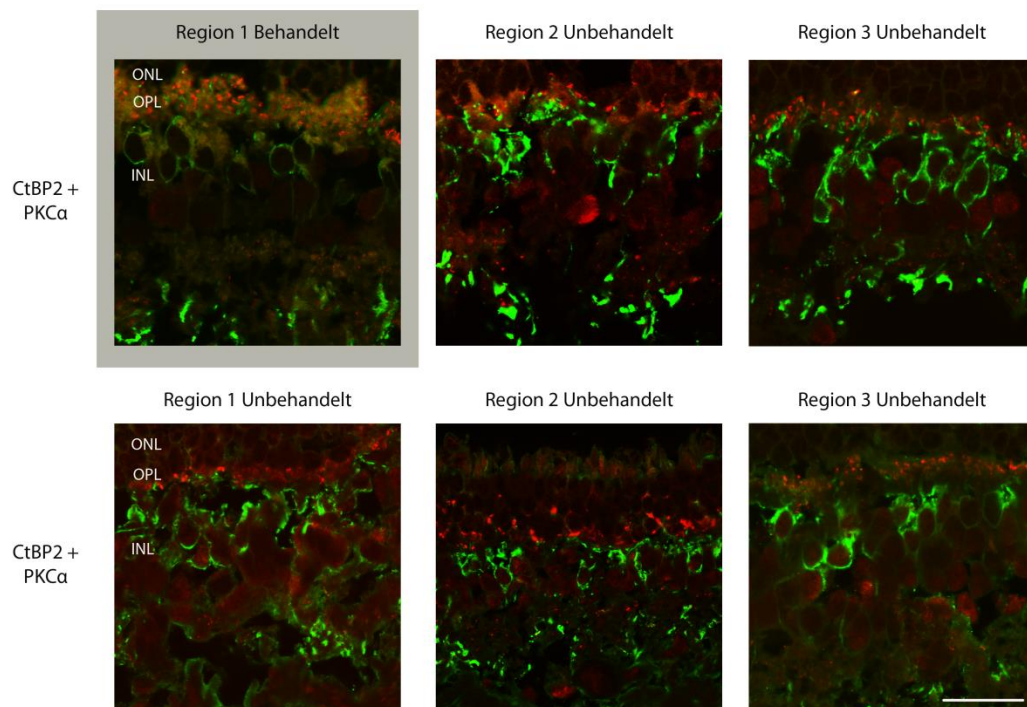


Abbildung 17: Färbung der Stäbchenbipolarzellen und Ribbonsynapsen mittels PKC α und CtBP2 im Vergleich bei Injektion mit einem AAV2/4.pRPE65.rpe65-Vektor und dem unbehandelten Auge

Es erfolgte eine Anfärbung der Stäbchenbipolarzellen und Ribbonsynapsen mit Calbindin und PKC α . Dabei wurde ein behandeltes Tier durch einen AAV2/4.pRPE65.rpe65-Vektor mit einem unbehandelten erkrankten Tier verglichen. ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht. Maßstabsbalken 30 μ m.

3.2 Morphologische Veränderungen bei Adeno-assoziiierter Virus vermittelter Gentherapie durch das Tet-ON/OFF-System

In Anlehnung an die Gliosefärbungen der behandelten Tiere bei kontinuierlicher Transgenexpression wurden die Färbungen mit GFAP und GS auch bei den Tieren mit Gentherapie durch das Tet-On/Off-System durchgeführt. GFAP als Glia Filament Acid Protein (grün) ist basal in den Müllerzellen sowie in den Astrozyten lokalisiert. Die Glutamin-Synthetase (rot) wird dagegen in der kompletten Müllerzelle exprimiert.

Da die beiden Färbungen sich auch hier kaum überlagern, erfolgte zur besseren Darstellung dieses Phänomens zunächst die Abbildungen der Einzelfärbungen und dann der Doppelfärbungen. Die Doppelfärbungen zeigen die unterschiedliche Anfärbung von GFAP und GS.

Die Untersuchungen erfolgten auch hier in drei unterschiedlichen Regionen des Hundeauges. Region 1 steht für den behandelten Bereich, da dieser Bereich aber nur im Tet-On-System bei Euthanasie der Tiere angeschaltet gewesen war, wurde auch nur dieser grau hinterlegt.

Abbildung 18 und 19 zeigen die Einzel- sowie Doppelfärbungen nach Färbung mit Antikörpern gegen GFAP und GS im Vergleich bei an- und abgeschalteter Expression eines AAV2/4.TetOff.rpe65-Vektors und AAV2/4.TetOn.rpe65-Vektors. Die Einzelfärbungen durch GFAP, grün dargestellt, färben dabei nur basal die Müllerzellen und Astrozyten an, es zeigt sich nur im Bereich der Ganglienzellschicht ein Signal. Die Einzelfärbungen durch GS, rot dargestellt, zeigen dagegen eine Färbung der kompletten Müllerzellen, von der GCL bis zum Ende der ONL. Die Doppelfärbungen ganz rechts in den Abbildungen zeigen die gegensätzliche Anfärbung von GFAP und GS. Es können keine unterschiedlichen Anfärbungen zwischen der angeschalteten Region und den unbehandelten Regionen sowie zwischen den verschiedenen Vektoren festgestellt werden.

In Tabelle 10 sind alle Tiere, welche mit dem Tet-ON/OFF-System behandelt wurden, aufgelistet, inklusive ERG-Signal und Sehkraft nach Therapie.

Tabelle 10: Versuchstiere mit Tet-ON/OFF-System

WT: Wildtyp; OD: rechtes Auge; OS: linkes Auge; Ind: Induktion; Dox: Doxycyclin; na: nicht angegeben

Hund	Au-ge	Vektor	Zeitpunkt Injektion [Monate]	Ind. Dox	Zeitpunkt Euthanasie [Monate]	ERG Max. [μV]	Sehkraft nach Therapie
E1	OD	AAV2/4.TetOff.rpe65	10	-	30	40	-
	OS	unbehandelt				0	na
E2	OD	AAV2/4.TetOff.rpe65	10	+		5	-
	OS	unbehandelt				0	na
E3	OD	AAV2/4.TetOn.rpe65	10	+		45	-
	OS	unbehandelt				0	na
E4	OD	AAV2/4.TetOn.rpe65	10	-		5	-
	OS	unbehandelt				0	na

3.2.1 Behandlung mit dem AAV2/4.TetOff.rpe65-Vektor

3.2.1.1 Gliosefärbungen

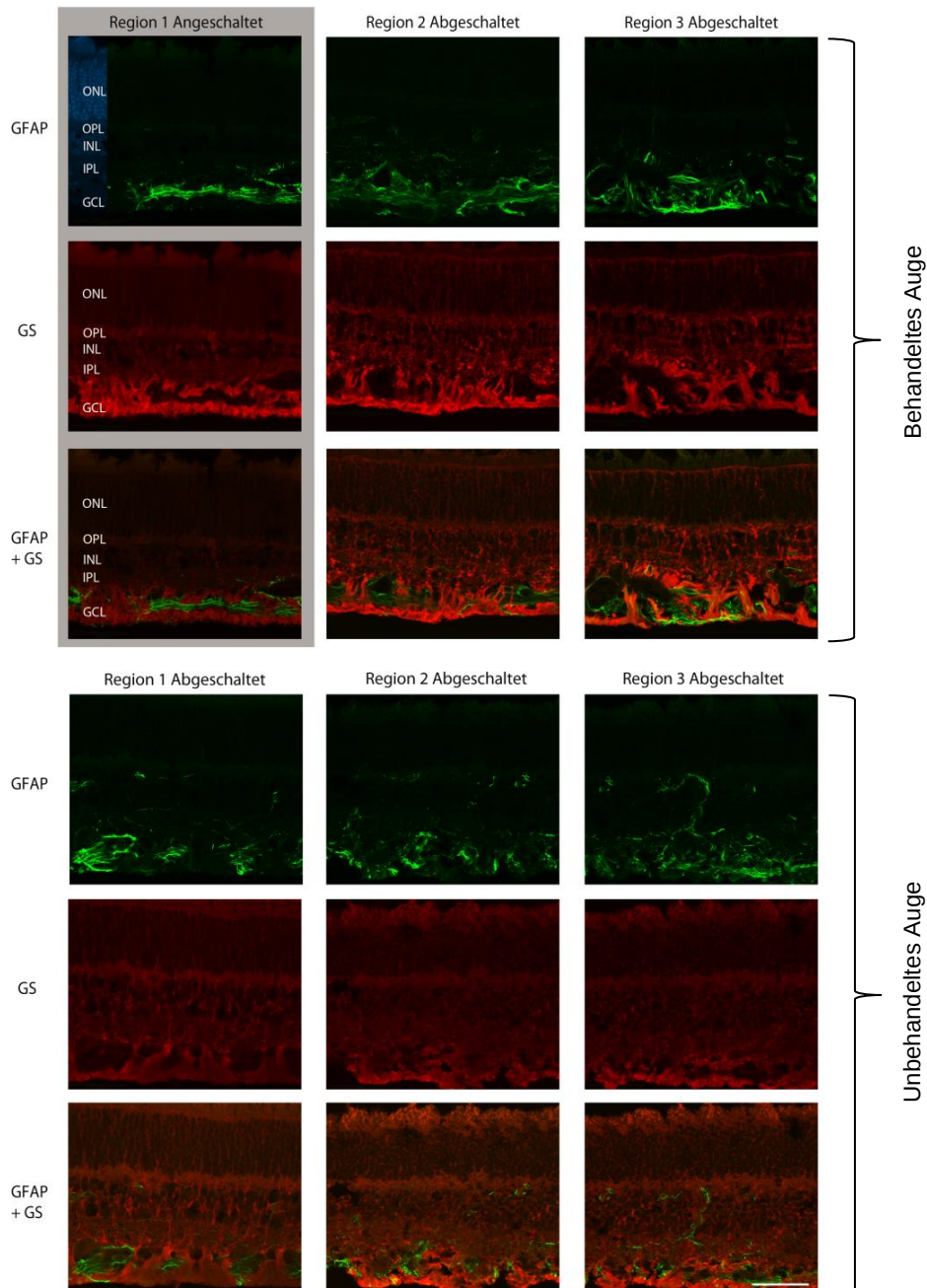


Abbildung 18: Müllerzelle nach GFAP und GS Färbung im Vergleich bei an- und abgeschalteter Expression eines AAV2/4.TetOff.rpe65-Vektors

Anfärbung der Müllerzellen und Astrozyten nach Injektion mit einem AAV2/4.TetOff.rpe65-Vektor mit Hilfe von GFAP und GS im Vergleich zu einem kranken, unbehandelten Tier. GFAP führt zu einer Färbung der basalen Müllerzellen und Astrozyten. GS wird in der kompletten Müllerzelle exprimiert. Die Doppelfärbung zeigt die konträre Anfärbung von GFAP und GS. ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht; IPL: Innere plexiforme Schicht; GCL: Ganglienzellschicht; GFAP: Glia Filament Acid Protein; GS: Glutamin-Synthetase Maßstabsbalken 50 µm.

3.2.2 Behandlung mit dem AAV2/4.TetOn.rpe65-Vektor

3.2.2.1 Gliosefärbungen

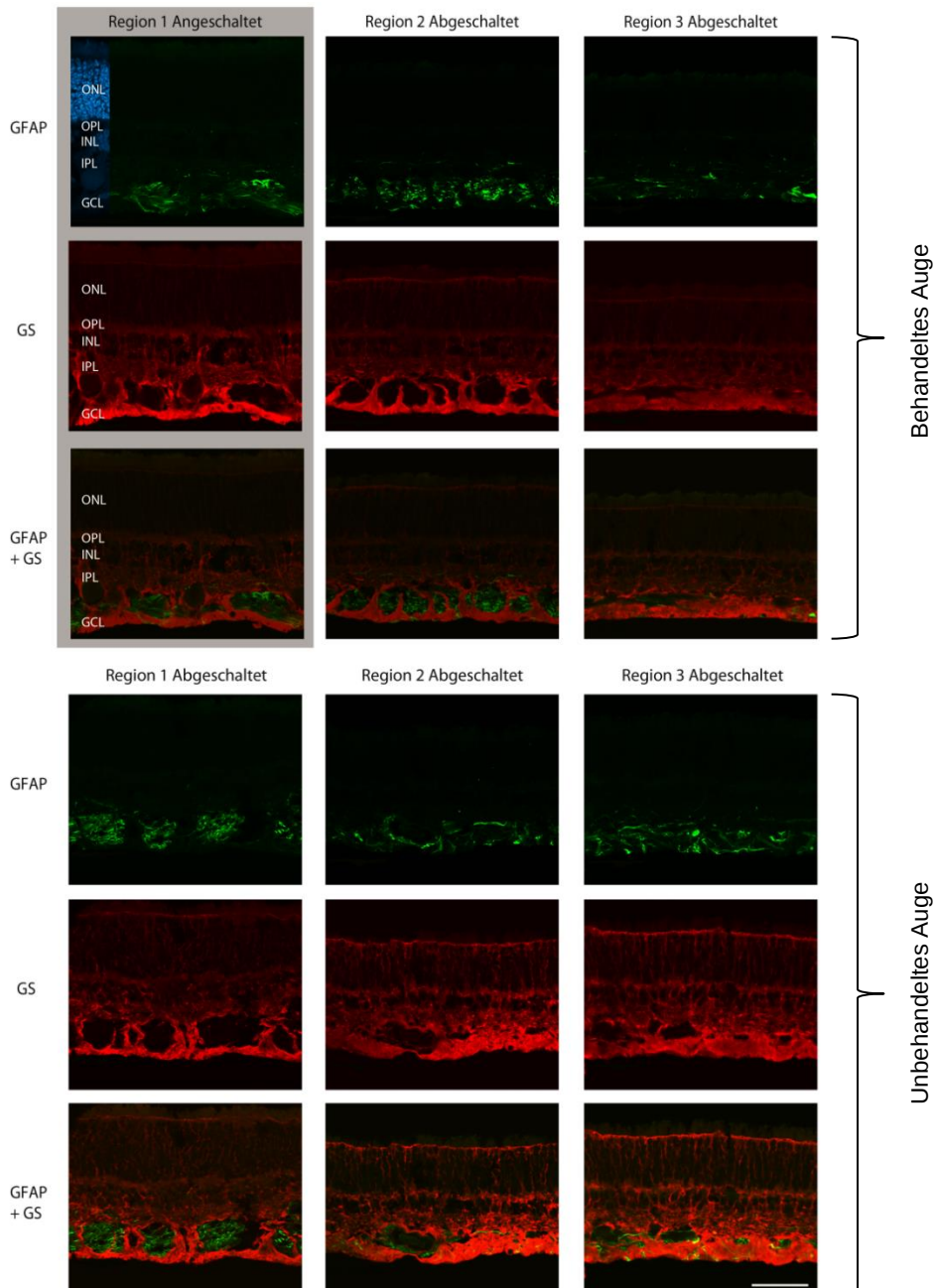


Abbildung 19: Müllerzelle nach GFAP und GS Färbung im Vergleich bei an- und abgeschalteter Expression eines AAV2/4.TetOn.rpe65-Vektors

Die Abbildung zeigt die Darstellung der Müllerzellen sowie der Astrozyten durch die Färbung mit GFAP und GS bei Injektion mit einem AAV2/4.TetOn.rpe65-Vektor einzeln sowie in der Doppelfärbung. GFAP färbt basal die Müllerzellen an, GS zeigte eine Färbung der kompletten Müllerzellen und Astrozyten. Die Doppelfärbung zeigt die konträre Anfärbung von GFAP und GS. ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht; IPL: Innere plexiforme Schicht; GCL: Ganglienzellschicht; GFAP: Glia Filament Acid Protein. Maßstabsbalken 50 µm.

3.2.2.2 Synaptische Verbindungen in der OPL

Zur Untersuchung der synaptischen Verbindungen der Stäbchen in der äußeren plexiformen Schicht sowie dem Vorkommen des *Sprouting* Phänomens bei gentherapeutisch behandelten Tieren mit dem Tet-On/Off-System, wurden die Stäbchenbipolarzellen mittels Antikörper gegen PKC α (grün) und die Ribbonsynapsen mittels Antikörper gegen CtBP2 (rot) angefärbt. Zur Darstellung der Horizontalzellen sowie Ribbonsynapsen erfolgte die Färbung mit Antikörpern gegen Calbindin (grün) und CtBP2 (rot).

Zur Untersuchung hinsichtlich eines Unterschieds zwischen dem Tet-On-System und dem Tet-Off-System wurden beide Systeme miteinander verglichen. Die Euthanasie der Tiere erfolgte dabei bei angeschaltetem Tet-On-System. Da die Injektionsstelle für die Vektorlösung einige mm oberhalb des optischen Nervs gewählt wurde, steht nur Region 1 für den behandelten Bereich. Nur im Tet-On-System ist dieser Bereich angeschaltet gewesen und wurde daher grau hinterlegt.

Die Entnahme der Retina in unterschiedlichen Regionen des Auges zeigt Abbildung 11.

Abbildung 20 zeigt die Färbung der präsynaptischen Photorezeptoren und der nachgeschalteten Horizontalzellen. Nur im Tet-Off-System lassen sich, vor allem im inferioren Bereich, vereinzelte delokalisierte Synapsen außerhalb der äußeren plexiformen Schicht nachweisen. Der behandelte Bereich, sowie Region 2 und 3, zeigen keine *sprouting events* im Tet-On-System.

In Abbildung 21 erfolgte die Darstellung der präsynaptischen Photorezeptoren und der nachgeschalteten Bipolarzellen. Es zeigen sich in Region 2 und 3 im Tet-Off-System und in Region 3 im Tet-On-System vereinzelte, delokalisierte Synapsen.

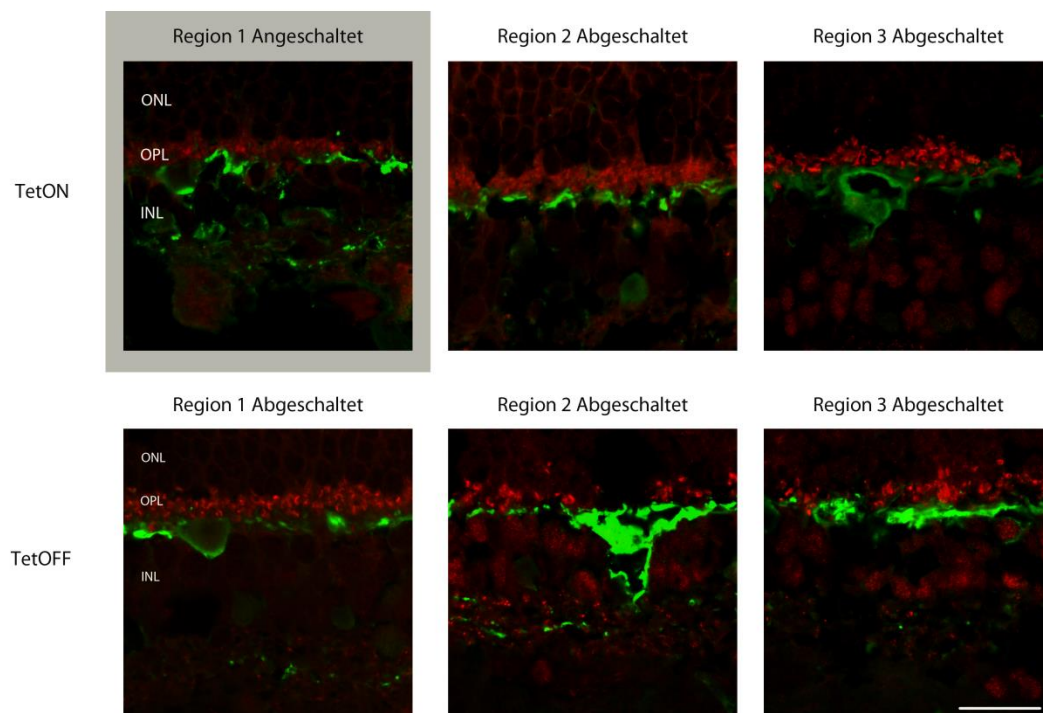


Abbildung 20: Horizontalzellen nach Gentherapie mit einem Tet-On/Off-System

Die Horizontalzellen wurden mit Calbindin (grün) und die Ribbonsynapsen mit CtBP2 (rot) angefärbt. Region 1 steht für den behandelten Bereich, da nur hier die Injektion erfolgte, und ist nur beim Tet-On-System grau hinterlegt, da nur dieser Bereich während der Euthanasie angeschaltet gewesen war. Nur im Tet-Off-System lassen sich vereinzelte *sprouting events*, vor allem in Region 2, feststellen. ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht. Maßstabsbalken 30 μm .

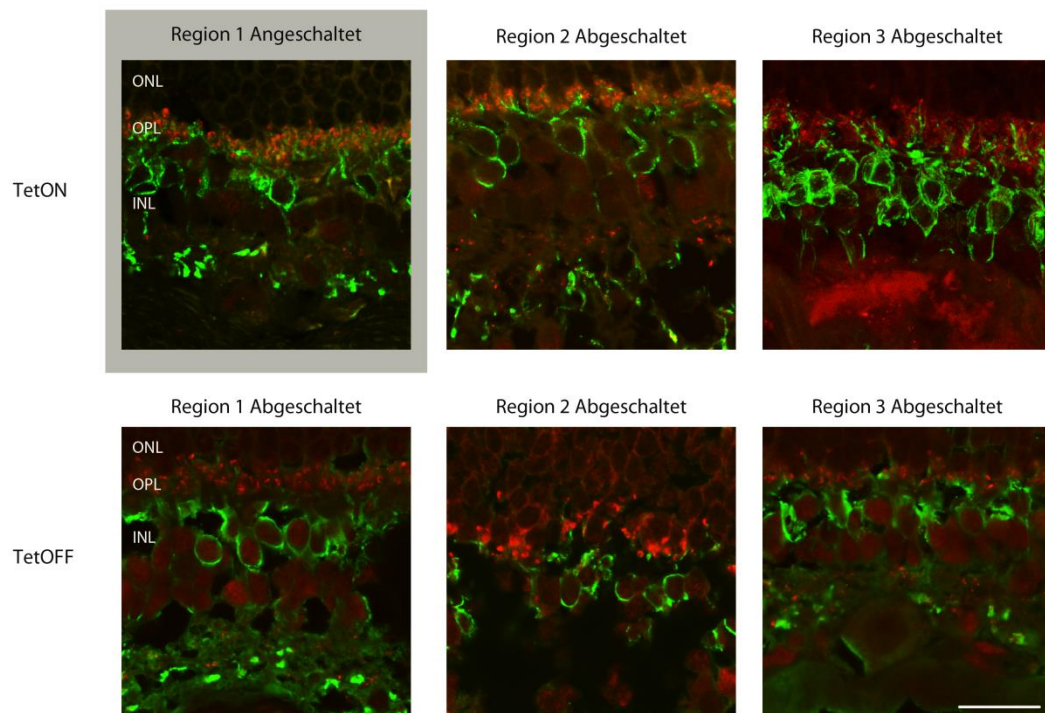


Abbildung 21: Bipolarzellen nach Therapie mit dem Tet-On/Off-System

Die Stäbchenbipolarzellen wurden mit PKC α (grün) und die Ribbonsynapsen mit CtBP2 (rot) angefärbt. Der grau hinterlegte Bereich zeigt die angeschaltete Region, sodass nur dieser Bereich als behandelter Bereich angesehen werden kann. Es zeigen sich in Region 2 und 3 im Tet-Off-System und in Region 3 im Tet-On-System vereinzelte, delokalisierte Synapsen. ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht. Maßstabsbalken 30 μm .

3.2.2.3 Färbungen der Zapfen

Zur Untersuchung der Opsinlokalisierung nach erfolgter Gentherapie mit dem Tet-On/Off-System wurden die Opsine im Vertikalschnitt mit spezifischen Antikörpern angefärbt. Es erfolgte eine Doppelfärbung mit PNA 488, welches die Zapfenmatrix und die Zapfenendfüßchen färbt (grün), und eine Färbung mit S-Opsin (rot), welches nur in den Außensegmenten lokalisiert ist (Abbildung 22).

Außerdem erfolgte die Untersuchung in unterschiedlichen Regionen des Auges (siehe Abbildung 11). Region 1 steht für den behandelten Bereich, da nur dieser Bereich der Injektionsstelle für die Vektorlösung entspricht. Er wurde nur im Tet-On-System grau hinterlegt, da nur dieser Bereich bei Euthanasie der Tiere angeschaltet gewesen war.

Die Untersuchungen zeigen, dass sowohl im nicht therapierten Bereich als auch im therapierten Bereich das S-Opsin im Außensegment und im Innensegment sowie im Zellkern lokalisiert ist. Im nicht behandelten Bereich zeigen sich die Zapfen kürzer und kugelig als in den behandelten Aufnahmen (Abbildung 22).

Außerdem erfolgte eine Färbung der L/M-Zapfen nach erfolgter Gentherapie mit dem Tet-On/Off-System. Hierbei zeigt sich im angeschalteten Tet-On Bereich (Region 1), die reguläre Expression von L/M-Opsin in den Außensegmenten. In den nicht therapierten Bereichen wird das L/M-Opsin im gesamten Photorezeptor exprimiert (Abbildung 23).

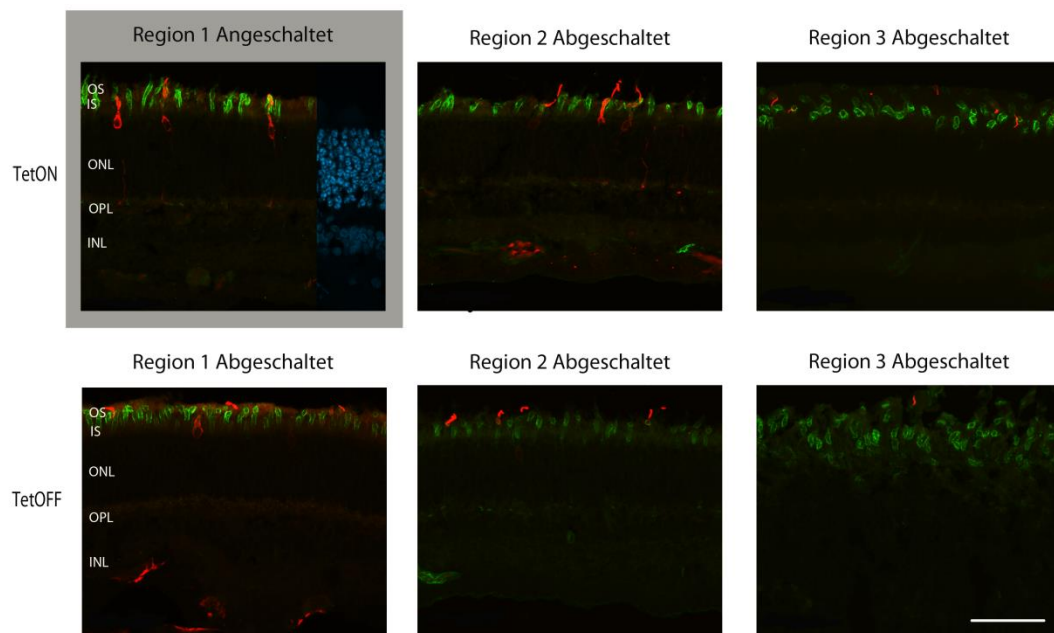


Abbildung 22: S-Zapfen nach Gentherapie mit dem Tet-On/Off-System

Die Abbildung zeigt die Doppelfärbung mit Antikörpern gegen PNA 488 (grün) und S-Opsin (rot). Sowohl im nicht therapierten Bereich bzw. abgeschalteten Bereich als auch im therapierten Bereich sieht man, dass das S-Opsin nicht nur im Außensegment lokalisiert ist, sondern auch im Innensegment, im Zellkern. Außerdem zeigen sich die nicht behandelten Zapfen kürzer und kugelig als in den behandelten Aufnahmen. Nur der grau hinterlegte Bereich steht für die behandelte Region, da die Euthanasie der Tiere nur im Tet-On-System bei angeschalteter Expression erfolgte. OS: Außensegment; IS: Innensegment; ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht. Maßstabsbalken 50 μm .

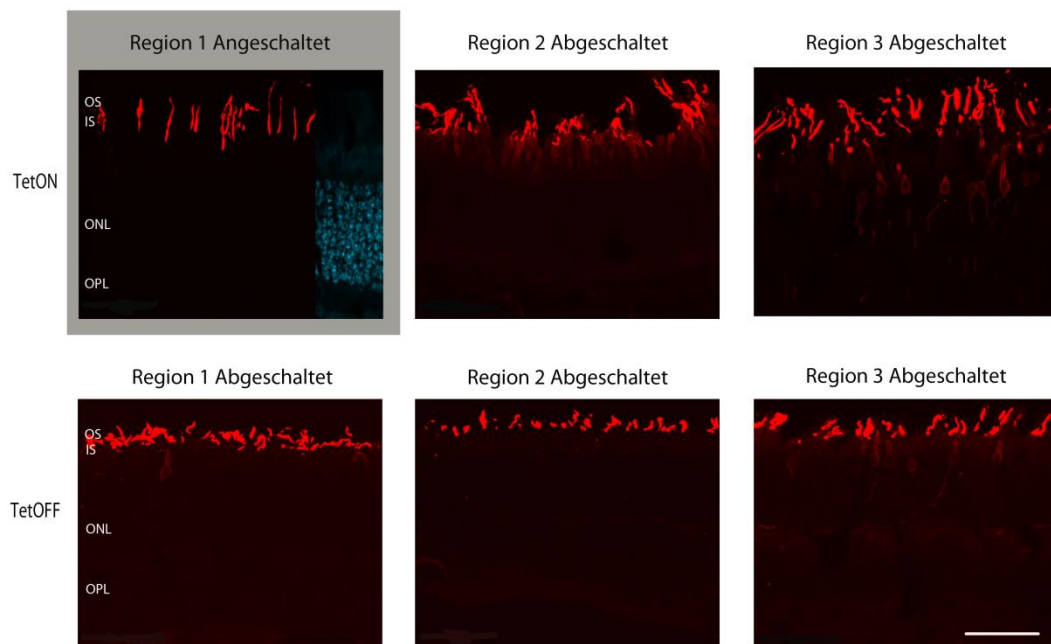


Abbildung 23: L/M-Zapfen nach Gentherapie mit dem Tet-On/Off-System

Die Abbildung zeigt die Färbung von Antikörpern gegen das L/M-Opsin. Dieses ist im angeschalteten Tet-On-System nur im OS lokalisiert. In den nicht behandelten Bereichen dagegen im gesamten Photorezeptor. Nur der grau hinterlegte Bereich steht für die behandelte Region, da die Euthanasie der Tiere nur im Tet-On-System bei angeschalteter Expression erfolgte. OS: Außensegment; IS: Innensegment; ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht. Maßstabsbalken 50 μm .

3.3 Quantifizierung

Zur Untersuchung der Verteilung und Quantifizierung der S-Zapfen sowie der L/M-Zapfen nach erfolgreicher Gentherapie erfolgte die Färbung der Schnitte mit S-Opsin und L/M-Opsin. Nach der Auszählung der Zapfen erfolgte die Darstellung in Boxplots. Dabei erfolgten die Darstellungen der S-Zapfen in grünen Boxplots und die der L/M-Zapfen in roten Boxplots.

Die Abbildung 24 zeigt die behandelten Bereiche der S-Zapfen nach erfolgreicher Gentherapie mit verschiedenen Vektoren im Vergleich mit den linken unbehandelten Augen. Die Boxplots lassen gut erkennen, dass es bei allen eingesetzten Vektoren zu einer Zunahme der S-Zapfen nach erfolgter Gentherapie gekommen ist. Die linken, unbehandelten Augen zeigen eine deutlich geringere Anzahl an S-Zapfen.

In der Abbildung 25 erfolgt die Darstellung der ausgezählten L/M-Zapfen nach erfolgreicher Gentherapie im Vergleich mit den linken, unbehandelten Augen. Die Behandlung mit dem AAV2/4.CMV.rpe65-Vektor, dem AAV2/2.pRPE65.rpe65-Vektor sowie dem Tet-Off-System zeigt eine Zunahme der L/M-Zapfen im Vergleich zu den unbehandelten Augen. Die Behandlung mit dem AAV2/4.pRPE65.rpe65-Vektor sowie dem AAV2/4.TetOn.rpe65-Vektor (E3) kann diese Zunahme nicht bestätigen.

Die Abbildung 26 zeigt beispielhaft die Struktur der S-Zapfen- sowie L/M-Zapfen-Opsine im Vergleich der behandelten versus nicht behandelten Augen. Dabei zeigt sich vor allem bei den L/M-Zapfen-Opsine im unbehandelten Auge eine deutlich veränderte Struktur. Sie zeigen sich länglicher, geschwungener sowie wurmartiger und in ihrer Anzahl vermehrt.

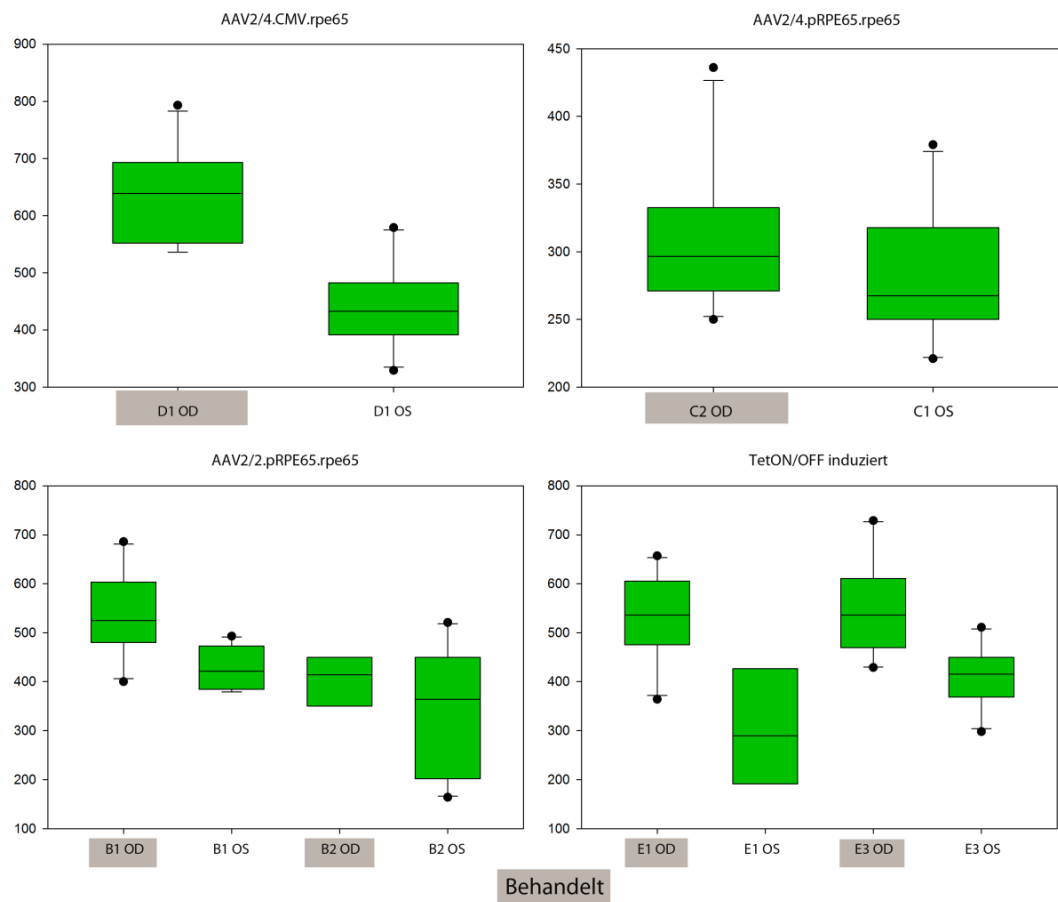


Abbildung 24: Vergleich der behandelten Bereiche der S-Zapfen mit den unbehandelten Augen

Zur Darstellung der ausgezählten S-Zapfen wurden Boxplots gewählt. Diese zeigen eine Zunahme der S-Zapfen im therapierten Bereich des behandelten Auges (grau hinterlegt). Alle linken, unbehandelten Augen zeigen eine deutlich verringerte Anzahl der S-Zapfen. OD: rechtes Auge; OS: linkes Auge.

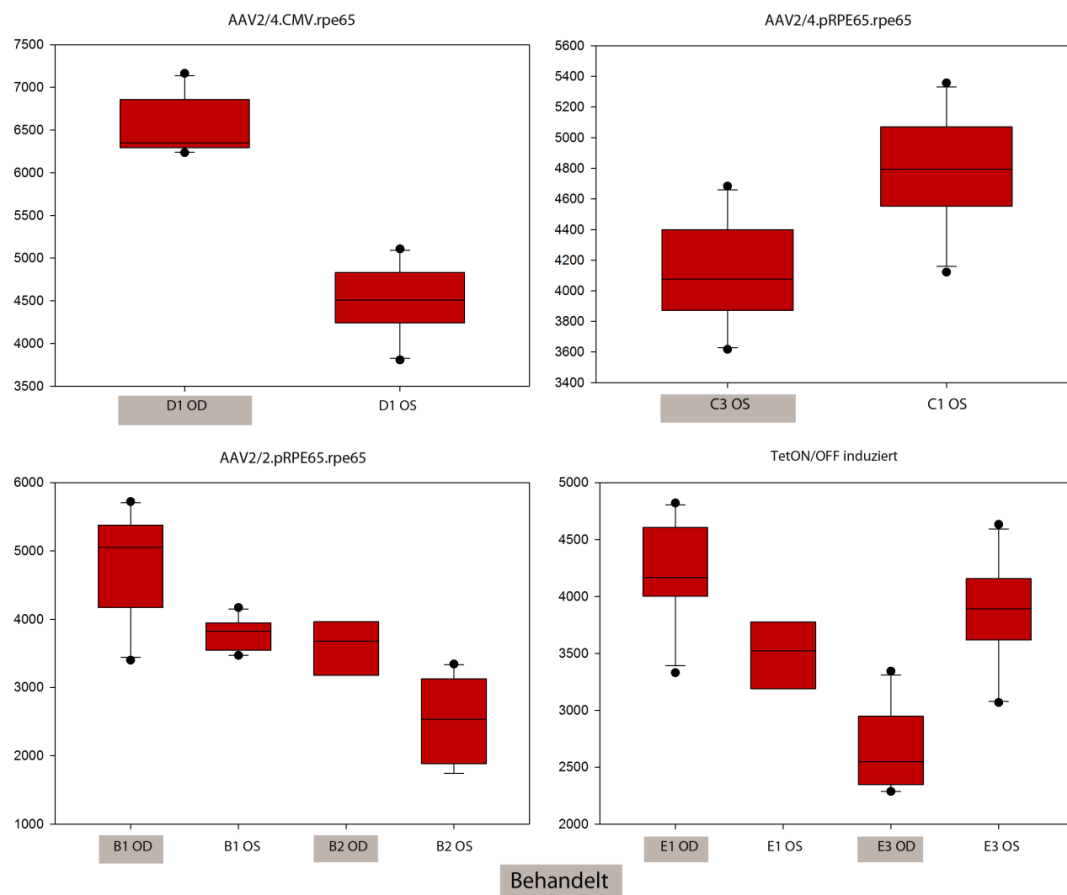


Abbildung 25: Vergleich der behandelten Bereiche der L/M-Zapfen mit den unbehandelten Augen

Die Boxplots dienen zur Darstellung der ausgezählten L/M-Zapfen. Dabei wurden die rechten, behandelten Augen (grau hinterlegt) mit den linken, unbehandelten Augen verglichen. Die Behandlung mit dem AAV2/4.CMV.rpe65-Vektor, dem AAV2/2.pRPE65.rpe65-Vektor sowie dem Tet-Off-System zeigt eine Zunahme der L/M-Zapfen im Vergleich zu den unbehandelten Augen. Die Behandlung mit dem AAV2/4.pRPE65.rpe65-Vektor sowie dem AAV2/4.TetOn.rpe65-Vektor kann diese Zunahme nicht bestätigen.

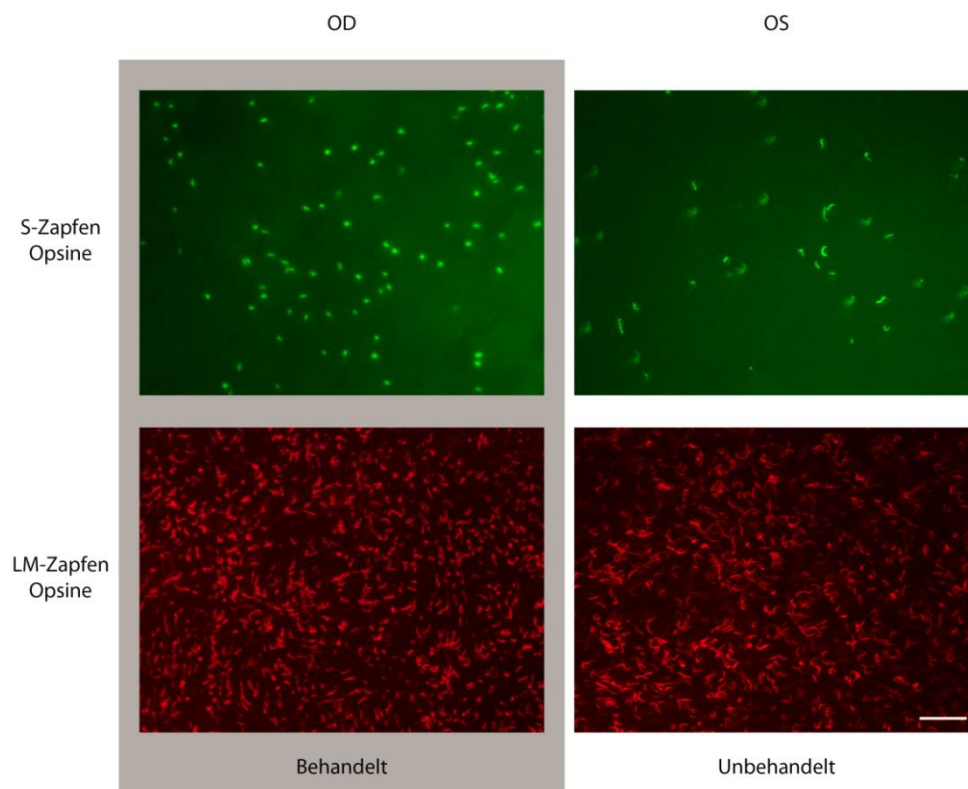


Abbildung 26: S-Zapfen- sowie L/M-Zapfenanzahl und -struktur im unbehandelten sowie behandelten Auge

Im behandelten Auge zeigte sich eine vermehrte Anzahl an S-Zapfen sowie L/M-Zapfen. Die unbehandelten S-Zapfen sowie L/M-Zapfen zeigen sich länglicher und wurmartiger. OD: rechtes Auge; OS: linkes Auge. Maßstabsbalken 50 μm .

4 Diskussion

4.1 Gliosefärbungen

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Untersuchung der Müllerzellen und Astrozyten auf retinalen Stress in Form einer reaktiven Gliose bei unbehandelten Tieren sowie erstmalig nach Adeno-assoziiierter Virus (AAV) vermittelter Gentherapie. Dazu erfolgte die Färbung mit dem Saure Gliafaserprotein (GFAP = Glial fibrillary acidic protein) sowie der Glutamin-Synthetase (GS).

In den vorliegenden Untersuchungen konnte durch die Therapie keine Zu- oder Abnahme von GFAP oder GS zwischen unbehandelten oder behandelten Tieren nachgewiesen werden. Auch kann kein Unterschied in den verschiedenen Regionen festgestellt werden, sodass man davon ausgehen kann, dass die Therapie weder zu einer reaktiven Gliose geführt hat, noch dass sie zu Minderung einer reaktiven Gliose beigetragen hat, falls diese schon vorher stattgefunden haben sollte.

Allerdings zeigte die Doppelfärbung von GFAP und GS, dass GFAP genau die Bereiche färbt, die von der GS nicht gefärbt worden waren. Eine Erklärung hierfür bietet die Annahme, dass GFAP vor allem die Astrozyten gefärbt hat. GFAP stellt zwar auch einen Marker für die Müllerzellen dar, aber dies vor allem bei reaktiver Gliose.

Gerade nach retinalem Stress zeigt sich eine starke Umhüllung von Ganglienzellen und Gliazellen, die vielleicht die Bildung von Synapsen und die Erhaltung von neuronalen Funktionen gewährleisten soll (Hernández et al. 2010; Vecino et al. 2016). Möglicherweise zeigt die Doppelfärbung von GS und GFAP die enge Interaktion von Müllerzellen und Astrozyten.

Bringmann und Wiedemann untersuchten die Netzhäute von Ratten nach starker Lichtbestrahlung auf retinale Schäden in Form der reaktiven Gliose. Sie stellten dabei eine Hochregulierung von GFAP und eine Abnahme der GS fest (Bringmann 2011). Vecino und Kollegen stellten dagegen eine Zunahme von GS bei untersuchten Netzhäuten von Ratten mit Glaukom fest (Vecino 2016).

Untersuchungen am caninen RPE65 Model bei LCA wurden durch Hernández und Kollegen durchgeführt (Hernández et al. 2010). Sie untersuchten gesunde Tiere im Alter von 18 Monaten sowie erkrankte Tiere im Alter von 4 und 15 Monaten durch immunhistochemische Färbung mit GFAP. Im Vergleich zu gesunden Tieren konnte

bei jungen, erkrankten Tieren eine Zunahme von GFAP beobachtet werden. Ältere, erkrankte Tiere zeigten dagegen eine schwächere Zunahme von GFAP. Therapierte Tiere wurden nicht untersucht, und es erfolgte auch keine Färbung der Zellen mit GS.

Bisher liegen auch von keinen anderen Gruppen Untersuchungen über die Auswirkungen einer erfolgreichen Gentherapie mit AAV-Vektoren auf die Zu- oder Abnahme von GFAP oder GS vor.

Untersuchungen von Hernández und Kollegen ergaben eine Zunahme von Vimentin, vor allem bei jungen, aber auch bei älteren erkrankten Tieren. CRALBP dagegen zeigte sich in den jungen erkrankten Tieren nicht vermehrt exprimiert, in den älteren erkrankten Tieren sogar vermindert. Wahrscheinlich lag zum Zeitpunkt der Untersuchung noch kein fortgeschrittenes Stadium der Erkrankung vor. Therapierte Tiere wurden auch hier nicht untersucht.

Histologische Untersuchungen am Menschen erfolgten bisher nur bei einer Patientin mit homozygoter RPE65 Mutation, hier erfolgten allerdings nur Untersuchungen der Stäbchen und Zapfen und keine Färbungen mit Gliosemarkern (Bonilha et al. 2011). Histologische Untersuchungen von therapierten Patienten liegen bisher nicht vor.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch die Injektion eines AAV-Vektors es zu keiner reaktiven Gliose gekommen ist. Die bisher vorliegenden klinischen Daten nach erfolgter Gentherapie bei Hunden scheinen dies zu bestätigen (siehe Kapitel: Gentherapie beim RPE65-Hundemodell).

4.2 Synaptische Verbindungen in der OPL

Zur Untersuchung des *sprouting* Phänomens erfolgten Doppelfärbungen der Stäbchenbipolarzellen mittels PKC α und der Ribbonsynapsen mittels CtBP2 sowie der Horizontalzellen und Ribbonsynapsen mittels Calbindin und CtBP2. Das *sprouting* Phänomen bezeichnet das Auftreten von Synapsen außerhalb der äußeren plexiformen Schicht. Ein Prozess der mit zunehmendem Alter oder durch Erkrankung auftritt. Warum diese Reorganisation der Zellen in Form des *sproutings* stattfindet ist noch unklar.

Bei der Färbung durch CtBP2 fällt auf, dass sich neben den Ribbonsynapsen auch teilweise die Kerne der Bipolar- und Horizontalzellen darstellen lassen. Dies lässt

sich dadurch erklären, dass CtBP2 für zwei verschiedene Proteine codiert: für einen Transkriptionsrepressor und für die Ribbonsynapsen. Ersterer sitzt im Kern der Zelle und färbt sie daher mit an (National Center for Biotechnology Information 2016).

Es wurden erkrankte, unbehandelte Tiere mit behandelten Tieren verglichen. Da behandelte Tiere mit dem AAV2/2.pRPE65.rpe65 und AAV2/4.CMV.rpe65 Vektor bereits durch Klein erfolgten, wurde nur die Auswirkung des AAV2/4.pRPE.rpe54 Vektors und des TetOn/Off Systems in unterschiedlichen Regionen beschrieben (Klein 2014). Es konnte keine Minderung des *sprouting* Phänomens nachgewiesen werden. Allerdings zeigten sich auch bei den unbehandelten Tieren nur vereinzelte *sprouting events*, diese überwiegend im inferioren Bereich.

Umfangreiche Untersuchungen zum Auftreten von Synapsen außerhalb der äußeren plexiformen Schicht wurden durch Klein und Kollegen durchgeführt (Klein et al. 2014). Dabei wurden Retinae von RPE65^{-/-} Hunden im Alter von 2 Jahren in verschiedenen Regionen der Retina, sowie im zeitlichen Verlauf der Erkrankung und nach Therapie mit den AAV2/2.pRPE65.rpe65- und AAV2/4.CMV.rpe65-Vektoren analysiert. Es zeigte sich besonders im inferioren Bereich und mit zunehmendem Alter, vor allem bei erkrankten Tieren im Alter von 78 und 96 Monaten, eine deutliche Zunahme der *sprouting events*. Bei den behandelten Tieren zeigte sich in dieser Arbeit kein Einfluss auf die Therapie bis zu einem Alter von 54 Monaten. Untersuchungen an Mäusen und Menschen zeigten, dass im zunehmenden Alter die Dendriten von Horizontal- sowie Bipolarzellen sich über die OPL hinaus bis in die ONL erstrecken (Eliasie et al. 2007; Liets et al. 2006).

Der Grund für den fehlenden Nachweis einer Verminderung des *sprouting* Phänomens in dieser Arbeit könnte durch das Alter der untersuchten Tiere bedingt sein. Die untersuchten unbehandelten Tiere sowie die Tiere bei kontinuierlicher Transgenexpression waren nicht älter als 66 Monate und die durch das Tet-On-/Tet-Off-System 30 Monate alt. Der Zeitpunkt der Injektion bei den behandelten Tieren lag zwischen 6 und 18 Monaten. Vielleicht war es zu diesem Zeitpunkt der Erkrankung noch zu keinem Verlust der Photorezeptoren gekommen. Daher ließen sich generell wenige *sprouting events* nachweisen. Dass die meisten *sprouting events im inferioren Bereich* gefunden wurden, deckt sich mit den Untersuchungen von Klein (Klein 2014).

OCT Untersuchungen von RPE65-/- Hunden ergaben, dass Hunde im Alter von 5 Jahren eine fast normale ONL Schichtdicke aufweisen. Erst ab einem Alter von 8 Jahren zeigte sich eine erhebliche Minderung der ONL Schichtdicke, also somit eine Abnahme der Photorezeptoren (Cideciyan et al. 2013). Erst mit abnehmender Schichtdicke der ONL tritt eine Vermehrung von ektopischen Synapsen und Dendriten auf. Warum die Abnahme der Photorezeptoren zu einer Reorganisation in Form des *sproutings* kommt, ist bisher unklar. Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass es bei den hier untersuchten Tieren noch zu keinem großen Verlust der Photorezeptoren gekommen ist.

Weitere Untersuchungen über *sprouting events* wurden durch Hernández und Kollegen durchgeführt. Sie untersuchten die Stäbchenbipolarzellen mit Hilfe von Go α , einem Marker für ON-Bipolarzellen. Dabei zeigte sich eine leichte Ausbreitung der Dendriten über die OPL hinaus bei jüngeren (4 Monate) und etwas älteren betroffenen Tieren (15 Monate) (Hernández et al. 2010). Durch die unterschiedlich verwendeten Marker und damit unterschiedliche Anfärbung von Zellen ist es schwer, diese Untersuchungen zu vergleichen, könnten aber den Grund dafür geben, warum schon bei jüngeren Tieren eine Ausbreitung der Dendriten festgestellt werden konnte.

4.3 Untersuchungen der Zapfen

Die Untersuchung der Zapfen erfolgte auf zwei unterschiedliche Arten. Zur Untersuchung der Zapfenopsine erfolgte die Anfärbung der Vertikalschnitte erstmalig nach erfolgter Gentherapie mit dem Tet-On/Off-System. Untersuchungen über behandelte Tiere nach kontinuierlicher Transgenexpression wurden schon durch Klein durchgeführt. Außerdem erfolgte zur Quantifizierung der Zapfen die Färbung der Flatmounts mit S- und L/M-Opsin bei behandelten und unbehandelten Tieren.

Es konnte nicht nachgewiesen werden, dass die Therapie zur Rückführung der Delokalisation der S-Opsine führt. Das L/M-Opsin zeigte dagegen im angeschalteten, therapierten Bereich eine reguläre Expression in den Außensegmenten, wohingegen es in den nicht therapierten Bereichen im gesamten Photorezeptor exprimiert wird.

Untersuchungen von Klein hatten gezeigt, dass es bei erkrankten Tieren im Alter von 2 Jahren zu einer Delokalisation der S-Zapfenopsine im zentralen und periphe-

ren Bereich der Retina kommt. Eine Delokalisation der LM-Zapfenopsine konnte nur für den zentralen Bereich nachgewiesen werden. Es wurde dabei der gleiche Antikörper benutzt. Normalerweise werden die Opsine vom Innensegment, wo sie entstehen, zu ihrem Einsatzort, dem Außensegment, transportiert. Durch Zellstress kann dieser Transport unterbunden werden, sodass sich das Opsin neben dem Außensegment auch im Innensegment und Zellkern befindet (Fan et al. 2008; Zhang et al. 2008; Klein 2014).

Hérmández und Kollegen konnten weder in jungen noch in älteren erkrankten Tieren eine Delokalisation der Zapfen-Opsine feststellen, sie verwendeten aber auch einen anderen Antikörper (AB5407 von Millipore), was die Ursache für die fehlende Delokalisation der Zapfen-Opsine sein könnte (Hérmández et al. 2010). Allerdings konnten Mowat und seine Kollegen mit demselben Antikörper, den auch Hérmández und Kollegen benutzt hatten, eine Delokalisation von S- und LM-Opsinen von der Ora serrata bis zum optischen Nerv feststellen (Mowat et al. 2013).

Die durchgeführten Untersuchungen erfolgten in drei unterschiedlichen Regionen des Hundeauges. Region 1 steht für den behandelten Bereich, da aber nur im Tet-On-System dieser Bereich bei Euthanasie der Tiere angeschaltet gewesen war, kann auch nur dieser als therapiert Bereich angesehen werden. Die Ergebnisse der unbehandelten Regionen zeigen fast alle eine Delokalisation der S- sowie LM-Opsine, vergleichbar mit den Ergebnissen von Klein und Mowat. Die Region 2 im Tet-Off behandelten Tier zeigt keine Delokalisation des LM-Opsins (Abbildung 23). Das hier entnommene Retinastück erfolgte aufgrund eines Risses der Retina sehr peripher und deckt sich daher mit den erhobenen Befunden von Klein (Klein 2014).

Die ersten immunhistochemischen Untersuchungen der Zapfenopsine nach erfolgter Gentherapie wurden durch Mowat und seine Kollegen durchgeführt (Mowat et al. 2013). Dabei wurde eine verminderte Delokalisation der L/M-Opsine sowie teilweise auch der S-Opsine nach Therapie festgestellt. Die Untersuchungen von Klein ergaben sowohl einen Rückgang der delokalisierten L/M-Opsine als auch der S-Opsine.

Diese Ergebnisse decken sich mit den hier durchgeführten Untersuchungen der L/M-Opsine nach Behandlung mit dem Tet-On/Off-System. Ein Effekt auf die S-Opsine konnte allerdings nicht festgestellt werden. Sowohl im angeschalteten Bereich des Tieres (Region 1) nach Behandlung mit einem Tet-On-Vektor als auch in den unbehandelten Regionen zeigte sich eine Delokalisation der S-Opsine. Dies

widerspricht den Befunden von Klein, bei der es nach Therapie zu einer Relokalisation gekommen ist. Da es bei Mowat und Kollegen nur teilweise zu einer Relokalisation der S-Opsine gekommen ist, ist der Widerspruch hierzu etwas geringer. Bei den Untersuchungen von Klein wurde der gleiche Antikörper verwendet wie auch in den hier durchgeführten Untersuchungen, sodass der Antikörper keine Erklärung für die Diskrepanz der unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der S-Opsine gibt. Auch das Alter kann keine Erklärung bieten, da Klein Tiere in verschiedenen Altersgruppen untersuchte und auch die Tiere im vergleichbaren Alter von 30 Monaten eine Relokalisation zeigten. Der einzige Unterschied liegt in der Behandlung mit unterschiedlichen Vektoren. Die hier durchgeführten Untersuchungen erfolgten alle nach Behandlung mit einem Tet-On/Off-System. Mowat und Klein untersuchten Tiere, die alle mittels Gentherapie bei kontinuierlicher Transgenexpression behandelt wurden. Derzeit liegen keine histologischen Untersuchungen mit behandelten Tieren durch das Tet-On/Off-System vor, die man zum Vergleich heranziehen könnte.

Bei der morphologischen Betrachtung der Zapfen fällt auf, dass die Zapfen unbehandelter Tiere sich kleiner, kugelig und teilweise wurmartiger zeigen. Diese Auffälligkeiten konnten auch durch die Untersuchungen von Klein nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der ausgezählten Flatmount Färbungen wurden in Boxplots dargestellt und nach den unterschiedlich eingesetzten Vektoren differenziert. Dabei kann bei allen untersuchten S-Zapfen eine deutliche Zunahme der Zapfendichte beobachtet werden. Besonders deutlich zeigt sich dies durch die Behandlung mit dem AAV2/4.CMV.rpe65-Vektor und bei Behandlung mit dem Tet-On/Off-System. Neben der Nichtübereinstimmung der Vektoren könnte das unterschiedliche Alter bei Injektion und Euthanasie eine Erklärung für die unterschiedlich starke Zunahme der S-Zapfen bieten. Die mit dem AAV2/4.CMV.rpe65-Vektor sowie Tet-On/Off-System behandelten Tiere waren bei Euthanasie alle 30 Monate alt. C1 mit einer im Vergleich hohen Zapfendichte 36 Monate, und alle anderen waren im Alter von 54 bis 96 Monaten. B2 mit einem Alter von 96 Monaten zeigt tatsächlich den geringsten Effekt auf die Zapfendichte. Das Injektionsalter reicht von 6 bis 18 Monate und korreliert nicht immer mit der erhobenen Zapfendichte. Das Injektionsalter bei Behandlung mit dem AAV2/4.CMV.rpe65-Vektor sowie die mit dem Tet-On/Off-System behandelten Tieren betrug 10 Monate. Der Unterschied zu 11 Monaten bei B2 kann keine Erklärung für den geringeren Effekt auf die Zapfendichte bieten. Auch Unter-

suchungen von Cideciyan und Kollegen zeigten bei älteren therapierten Hunden auch einen geringeren Effekt auf die ONL Schichtdicke durch OCT Untersuchungen im Vergleich zu jungen therapierten Hunden (Cideciyan et al. 2013).

Der Effekt auf die LM-Zapfendichte konnte nicht bei allen Vektoren nachgewiesen werden. Die Behandlung mit dem AAV2/4.CMV.rpe65-Vektor, dem AAV2/2.pRPE65.rpe65-Vektor sowie dem Tet-Off-System zeigt eine deutliche Zunahme der L/M-Zapfen im Vergleich zu den unbehandelten Augen. Dieser Effekt konnte bei Behandlung mit dem AAV2/4.pRPE65.rpe65-Vektor sowie dem Tet-On-System nicht nachgewiesen werden. Das Alter bei Euthanasie sowie das Alter bei Injektion geben keine ausreichende Erklärung dafür. Allerdings konnte die Auszählung von E3 OS nicht nach dem Schema aller anderen Hunde erfolgen, da der größte Teil der Retina bereits durch Klein untersucht worden war und nicht mehr genug Retina übrig war, um einen eigenen Schnitt anfertigen zu können. Daher wurden zur Quantifizierung Kleins Daten für die Zapfendichte übernommen. Die etwas unterschiedliche Lokalisation im Auge könnte ein Grund für die abweichenden Daten bieten. Bei allen anderen Augen erfolgte die Entnahme der Retina jeweils an der gleichen Stelle und die Färbung und Auszählung wurde selbst durchgeführt (siehe Abbildung 11).

Die Zapfenverteilungsanalyse von Klein ergab, dass es im zeitlichen Verlauf der Erkrankung zu einem Zapfenverlust kommt, welcher in der Peripherie ausgeprägter erscheint als im zentralen Retinabereich. Außerdem konnte eine signifikante Zunahme der S-Zapfen nach Gentherapie mit dem AAV2/4.CMV.rpe65- und dem AAV2/4.pRPE65.rpe65-Vektor festgestellt werden. Ein Effekt auf die Gentherapie der L/M-Zapfen konnte nicht nachgewiesen werden (Klein 2014).

Auch die Untersuchungen von Mowat und Kollegen ergaben, dass lediglich die S-Zapfendichte von der Therapie profitiert. Die LM-Zapfendichte zeigte dagegen keine Veränderung. Die Injektion erfolgte dabei mit einem rekombinanten rAAV2/2-Vektor. Der Effekt anderer Vektoren wurde nicht untersucht (Mowat et al. 2013).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich der S-Zapfendichte entsprechen den vorliegenden Befunden. Die Effekte auf die L/M-Zapfen sind etwas unklar, da diese nicht einheitlich nachgewiesen werden konnten und nicht zu den Ergebnissen von Klein und Mowat sowie Kollegen passen, da diese nur eine verminderte Relokalisation der L/M-Zapfen nachweisen konnten.

Weitere Untersuchungen nach erfolgter Gentherapie mit einem rekombinanten rAAV2/2-Vektor erfolgten durch Annear und Kollegen (Annear et al. 2013). Sie untersuchten Tiere im Alter von 2 bis 6 Jahren und fanden bei fast allen Tieren eine Verbesserung der Zapfen- und Stäbchenfunktion durch ERG Messungen und Testung der Sehfunktion. Diese Ergebnisse korrelierten allerdings nicht mit den histologischen Untersuchungen der Zapfen- und Stäbchendichte. Auch ergaben sich kaum Unterschiede zwischen den therapierten und nicht therapierten Augen bezüglich der erhobenen Zapfendichte. Daher postulieren Annear und Kollegen, dass der Verlust von Photorezeptoren nicht der einzige limitierende Faktor sein kann.

Die vorliegenden ERG Daten zu den untersuchten Tieren wurden unter skotopische Bedingungen gemessen und geben daher nur eine Aussage über die Stäbchenfunktion wieder. Daher lassen sie sich nicht mit den Ergebnissen der Zapfendichte vergleichen. Die Testung der Sehleistung erfolgte unter schwachen Lichtbedingungen durch Absolvierung eines Hindernisparcours. Somit wird auch hier vor allem die Funktion der Stäbchen abgebildet, was möglicherweise erklärt, warum es bei D1 zu keiner Verbesserung der Sehleistung gekommen ist, obwohl die Untersuchungen eine deutliche Zunahme der S- sowie LM-Zapfen zeigt (Le Meur 2007).

Insgesamt bestätigen die erhobenen Befunde der Zapfen die Daten aus der Literatur und zeigen die positive Wirkung einer Gentherapie beim Hund, auch durch die Verwendung eines Tet-On/Off-Systems.

Histologisch untersuchte Augen stehen nur von einer an homozygoter RPE65 Mutation erkrankten Patientin zur Verfügung (Bonilha et al. 2011). Dabei zeigt sich ein Verlust von Stäbchen und Zapfen in fast allen Bereichen der Retina, vor allem aber in der Peripherie. Ergebnisse nach erfolgter Gentherapie beim Menschen liegen bisher nur als ERG Messungen, OCT Untersuchungen oder der Bestimmung der Sehstärke vor. Histologische Untersuchungen wurden noch nicht durchgeführt.

4.4 Fazit

Die hier durchgeführten Untersuchungen konnten keine reaktive Gliose nach erfolgreicher Gentherapie am caninen Modell für RPE65 Mutationen feststellen. Dies wird durch die vorliegenden klinischen Daten bestätigt. Erstmals wurden auch mit dem Tet-On/Off-System therapierte Hunde immunhistochemisch untersucht. Hierbei konnte weder eine Abnahme der reaktiven Gliose als therapeutischer Effekt, noch

eine Zunahme der reaktiven Gliose, durch die Therapie an sich verursacht, festgestellt werden.

Die Untersuchungen der synaptischen Verbindungen konnten keinen Therapieeffekt auf *sprouting events* nachweisen, wurden hier allerdings bei recht jungen Tieren durchgeführt. Daher sollten weitere Untersuchungen bei älteren Tieren erfolgen, welche besser die Situation im menschlichen Auge widerspiegeln, da sie sich schon in einem degenerativen Stadium befinden (Cideciyan et al. 2013).

Die Analyse der Zapfendichte bzw. Opsinlokalisierung konnte einen Therapieeffekt nachweisen. Erstmals wurde dies auch bei Therapie mit einem Tet-On/Off-System untersucht und bestätigt. In Zukunft sollten weitere Untersuchungen der Stäbchen bei Tieren, die mit einem Tet-On/Off-System behandelt wurden, folgen.

5 Zusammenfassung

Die frühkindliche Netzhautdegeneration (EOSRD) ist eine seltene Erkrankung, die mit schweren visuellen Einschränkungen innerhalb der ersten 2 Lebensjahre verbunden ist und zu einer vollständigen Erblindung noch vor dem 20. Lebensjahr führen kann. Als Ursache wurde u.a. das Gen RPE65 identifiziert. Im Hundemodell führte das Einschleusen einer korrekten Kopie des mutierten Gens in das retinale Pigmentepithel (RPE) im Rahmen Adeno-assoziiierter Virus (AAV) vermittelter Gentherapie erfolgreich zur Wiederherstellung des Sehvermögens. Die beim Menschen durchgeführten klinische Phase I/II Studien konnten die Sehleistung nur teilweise verbessern. Die Ursache dieser Diskrepanz ist bisher unklar. Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen des retinalen Gentransfers am caninen Modell zu untersuchen.

Es wurden dabei die Retinae von 11 Hunden untersucht: 1 unbehandeltes Tier, 6 Tiere, die das fragliche Protein nach Behandlung mit verschiedenen AAV-Vektoren kontinuierlich exprimieren und 4 Tiere, die durch Expression mit einem Tetracyclin-abhängigem System (Tet-On/Off-System) über die Anwesenheit (Tet-On) oder Abwesenheit (Tet-Off) von Tetracyclin reguliert worden sind. Zur Untersuchung dienten verschiedene Marker, die als Primärantikörper verwendet wurden, um unterschiedliche Zellarten der Retina darzustellen.

Die durchgeführten Untersuchungen konnten weder eine reaktive Gliose durch die subretinale Injektion, noch eine Minderung dieser durch die Therapie feststellen. Erstmals wurde dies mit dem gleichen Ergebnis auch an Hunden untersucht, die mit dem Tet-On/Off-System behandelt worden sind. Zur Untersuchung des Sprouting Phänomens, also dem Auftreten von Synapsen außerhalb der äußeren plexiformen Schicht, erfolgte die Begutachtung der synaptischen Verbindungen. Dabei konnte durch die Gentherapie kein Effekt nachgewiesen werden. Allerdings wiesen auch die erkrankten Tiere wenig *sprouting events* auf. Durch die Behandlung zeigte sich eine Zunahme sowohl von S- als auch von L/M-Zapfen. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Therapie zur Rückführung der Delokalisation der L/M-Opsine führt. Erstmals wurde dies auch bei der Therapie mit einem Tet-On/Off-System untersucht und bestätigt.

Das Fehlen einer reaktiven Gliose wird durch die bisher vorliegenden klinischen Daten nach erfolgter Gentherapie bei Hunden bestätigt. Bis dato liegen keine histo-

logischen Untersuchungen über die Auswirkungen der Gentherapie in Form der reaktiven Gliose bei behandelten Hunden vor, die die hier erbrachten Ergebnisse bestätigten könnten. Die fehlende Minderung bzw. die geringe Anzahl von sprouting events bei den hier untersuchten Tieren, lässt sich durch ihr junges Alter erklären. Der Therapieeffekt auf die Zapfendichte sowie Opsinlokalisierung bestätigt die vorhandenen Daten aus der Literatur.

6 Summary

Early onset severe retinal dystrophy is a rare disease, which is associated with severe visual impairments within the first two years of life and can lead to complete blindness before reaching the age of 20 years. One form is caused by mutations in the RPE65 gene. In RPE65 mutant dogs a single subretinal injection of AAV viral vectors improved visual function. Human clinical trials couldn't show better visual acuity. The reason for this discrepancy is unclear. The aim of this study was to investigate the effects of retinal gene transfer on canine model

Retinae from 11 dogs were used, 1 unaffected dog, 6 dogs treated unilaterally with different AAV vectors carrying the human RPE65 gene and 4 dogs treated with tetracycline-regulatable AAV Vectors. For the analyses different markers were used as primary antibodies for representing diverse cells in the retina.

The analysis could not detect reactive gliosis after subretinal injection. This has been examined the first time in dogs treated with tetracycline-regulatable AAV vectors. To examine *sprouting*, synapses located outside the outer plexiform layer (OPL), synaptic connections were analysed. No effect was detected by gene therapy. But also the affected, non-treated dogs showed only a small number of sprouting events. The treatment with AAV Vectors showed increased numbers of S- and LM-cones. Furthermore the treatment reduces the extent of LM-opsin mislocalization. For the first time this was examined in dogs treated with tetracycline-regulatable AAV vectors.

Clinical data from the dogs confirm the absence of reactive gliosis after gene therapy. So far there are no histological studies about the effect of gene therapy in form of reactive gliosis, which might confirm these results. The lack of reduction or the presence of only a few sprouting events in the examined animals, can be explained by their young age. The therapeutic effect on the cone density and the opsin localization confirmed the existing data from the literature.

Abkürzungsverzeichnis

11-cis RAL	11-cis Retinal
11-cis ROL	11-cis Retinol
AAV	Adeno-assoziierte Viren
AK	Antikörper
all-trans RAL .	All-trans Retinal
All-trans ROL	All-trans Retinol
ARAT	Acyl-Retinol-Acyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat
AAV	Adeno-assoziiierter Virus
CRALBP	zelluläres Retinaldehydebinderprotein
DES1	Dihydroceramidedesaturase-1
EOSRD	frühkindliche Netzhautdegeneration
EPPI	Eppendorf-Reaktionsgefäß
ERG	Elektroretinogramm
FAF	Fundusautofluoreszenz
GFAP	glial fibrillary acidic protein
HRE	Hypoxia-regulated system
IMH	Isomerohydrolase
INL	Innere nukleäre Schicht
IPL	Innere plexiforme Schicht
IRBP	Interphotorezeptorbindeprotein
IS	Innensegment
LCA	Lebersche kongenitale Amaurose
LRAT	Lecithin Retinol Acyltransferase
mfERG	multifokale Elektroretinogramm
NaN3	Natriumazid
OCT	optischen Kohärenztomographie

ONL	Äußere nukleäre Schicht
OPL	Äußere plexiforme Schicht
OS	Außensegment
pA	Polyadenylierungssequenz
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RDH	Retinal-Dehydrogenase/ Retinol-Dehydrogenase
REH	Retinylesterhydrolase
RPE	Retinales Pigmentepithel
rtTA	Transaktivator
RT	Raumtemperatur

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Säugetierretina	4
Abbildung 2: Aufbau der Photorezeptoren.....	6
Abbildung 3: Die Stratifizierung der Bipolarzellen.....	8
Abbildung 4: Die Rolle der Müllerzelle bei metabolischem Stress.....	11
Abbildung 5: Die Rolle der Glutamin-Synthetase in der Müllerzelle	12
Abbildung 6: Die Müllerzelle	13
Abbildung 7: Vergleich von OCT-Aufnahmen einer normalen Netzhaut mit einer Netzhaut eines Patienten mit RPE65 Mutation	17
Abbildung 8: Herstellung eines rekombinanten (r)AAV-Vektors	21
Abbildung 9: Die Subretinale Injektion eines AAV-Vektors in die Retina	22
Abbildung 10: Struktur eines TetOn Vektors zur Regulation der Expression von RPE65	24
Abbildung 11: Präparationsschema Hundeauge	39
Abbildung 12: Müllerzelle nach GFAP und GS Färbung bei einem gesunden Tier.....	47
Abbildung 13: Müllerzelle nach GFAP und GS Färbung im Vergleich bei Injektion mit einem AAV2/2.pRPE65.rpe65-Vektor und dem unbehandelten Auge	48
Abbildung 14: Müllerzelle nach GFAP und Glutamin-Synthetase Färbung im Vergleich bei Injektion mit einem AAV2/4.CMV.rpe65-Vektor und dem unbehandelten Auge	49
Abbildung 15: Müllerzelle nach GFAP und Glutamin-Synthetase Färbung im Vergleich bei Injektion mit einem AAV2/4.pRPE65.rpe65-Vektor und dem unbehandelten Auge	50
Abbildung 16: Färbung der Horizontalzellen und Ribbonsynapsen mit Calbindin und CtBP2 im Vergleich bei Injektion mit einem AAV2/4.pRPE65.rpe65-Vektor und dem unbehandelten Auge	52
Abbildung 17: Färbung der Stäbchenbipolarzellen und Ribbonsynapsen mittels PKC α und CtBP2 im Vergleich bei Injektion mit einem AAV2/4.pRPE65.rpe65-Vektor und dem unbehandelten Auge	53
Abbildung 18: Müllerzelle nach GFAP und GS Färbung im Vergleich bei an- und abgeschalteter Expression eines AAV2/4.TetOff.rpe65-Vektors	56
Abbildung 19: Müllerzelle nach GFAP und GS Färbung im Vergleich bei an- und abgeschalteter Expression eines AAV2/4.TetOn.rpe65-Vektors.....	57
Abbildung 20: Horizontalzellen nach Gentherapie mit einem Tet-On/Off-Systems	59
Abbildung 21: Bipolarzellen nach Therapie mit dem Tet-On/Off-System	60
Abbildung 22: S-Zapfen nach Gentherapie mit dem Tet-On/Off-System	62
Abbildung 23: L/M-Zapfen nach Gentherapie mit dem Tet-On/Off-System.....	63
Abbildung 24: Vergleich der behandelten Bereiche der S-Zapfen mit den unbehandelten Augen	65

Abbildung 25: Vergleich der behandelten Bereiche der L/M-Zapfen mit den unbehandelten Augen	66
Abbildung 26: S-Zapfen- sowie L/M-Zapfenanzahl und -struktur im unbehandelten sowie behandelten Auge	67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zellulärer Tropismus von rAAV-Serotypen in der Retina	21
Tabelle 2: Versuchstiere.....	30
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	31
Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	32
Tabelle 5: Puffer und Lösungen	33
Tabelle 6: Getestete Primärantikörper	34
Tabelle 7: Verwendete Sekundärantikörper und fluoreszenzmarkierte Reagenzien	35
Tabelle 8: Verwendete Geräte und Hilfsmittel	36
Tabelle 9: Versuchstiere.....	46
Tabelle 10: Versuchstiere mit Tet-ON/OFF-System	55

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.

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

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. 883–893.

Bainbridge, J.W.B. et al., 2015. Long-term effect of gene therapy on Leber's congenital amaurosis. *The New England journal of medicine*, 372(20), pp. 1887–1897.

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.2231–2239.

Barnett, N. L. et al., 2000. Inhibition of Müller cell glutamine synthetase rapidly impairs the retinal response to light. *Glia*, 30(1), pp. 64–73.

Bennet, J. et al, 2012. AAV2 gene therapy readministration in three adults with congenital blindness. *Science translational medicine*, 4(120), pp. 120ra15

Bennicelli, J. et al., 2008. Reversal of blindness in animal models of leber congenital amaurosis using optimized AAV2-mediated gene transfer. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 16(3), pp. 458–465.

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.

Bramall, A. N. et al., 2010. The genomic, biochemical, and cellular responses of the retina in inherited photoreceptor degenerations and prospects for the treatment of these disorders. *Annual review of neuroscience*, 33, pp. 441–472.

Bringmann, A. et al, 2006. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in retinal and eye research*, 24(4), pp. 397–424.

Bringmann, A. & Wiedermann, P., 2011. Müller glial cells in retinal disease. *Ophthalmologica*, 227(1), pp. 1–19.

Cajal, S.R., 1972. The Structure of the Retina. In: Thorpe, S.A. and Glickstein, M., Translators. Thomas, Springfield.

Campbell, Neil A. & Reece, Jane B., 2006. *Biologie*. München: Pearson Studium, pp. 1270–1276

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.

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.

Curcio, C.A., Sloan, K.R., Kalina, R.E. & Hendrickson, A.E., 1990. Human photoreceptor topography. *The Journal of comparative neurology*, 292(4), pp. 497–523.

Dreher, Z. et al, 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.

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^{-/-} and Lrat^{-/-} mice: comparable models of leber congenital amaurosis. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(6), pp.2384–9.

Fischer, A. J. & Reh, T. A., 2001. Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nature neuroscience*, 4(3), pp. 247–252.

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.

Grehn, F., 1995. Das Auge. In *Augenheilkunde*. Heidelberg: Springer, pp. 3–10.

Haverkamp, S. & Wässle, H., 2000. Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *The Journal of comparative neurology*, 424(1), pp.1–23.

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.

Hollander, A. et al., 2008. Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms

Huppelsberg, J., 2009. *Kurzlehrbuch Physiologie*. Freiburg und Halle: Thieme, pp. 317–334.

Jacobs, G.H. et al., 1993. Photopigments of dogs and foxes and their implications for canid vision. *Visual neuroscience*, 10(1), pp.173–80.

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.

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., 2014. Morphologische Analyse von caninen RPE65-/- Retinae vor und nach AAV-vermittelter Gentherapie. Justus-Liebig-Universität Gießen.

Klein, D. et al., 2014. Immuno-histochemical analysis of rod and cone reaction to RPE65 deficiency in the inferior and superior canine retina. T. Langmann, ed. *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/> (16.04.2016).

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/> (16.04.2016).

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/> (16.04.2016).

Kramer, Richard H. & Davenport, Christopher M., 2015. Lateral Inhibition in the Vertebrate Retina: The Case of the Missing Neurotransmitter. *PLoS biology*, 13(129); e1002322.

Landkvist, A. et al., 2004. Under stress, the absence of intermediate filaments from Müller cells in the retina has structural and functional consequences. *The journal of cell science*, 117(16), pp. 3481–3488.

Lang, G.K. et al, 2008. Augenheilkunde. Ulm: Thieme, pp. 293–298

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.

Lesiuk, T.P. & Braekevelt, C.R., 1983. Fine structure of the canine tapetum lucidum. *Journal of anatomy*, 136(1), pp.157–164.

Lh riteau, E. et al., 2010. Regulation of retinal function but nonrescue of vision in RPE65-deficient dogs treated with doxycycline-regulatable AAV vectors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(6), pp. 1085–1093.

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.

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., 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.

Maguire, A. et al., 2009. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet (London, England)*, 374(9701), pp. 1597–1605.

Masland, R. H., 2001. The fundamental plan of the retina. *Nature neuroscience*, 4(9), pp. 877–886.

Masland, R.H., 2012. The tasks of amacrine cells. *Visual neuroscience*, 29(1), pp.3–9.

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.

Mowat, F.M. et al., 2012. RPE65 gene therapy slows cone loss in Rpe65-deficient dogs. *Gene therapy*, 20(5), pp.545–55.

Napoli, J. L., 2000. A gene knockout corroborates the integral function of cellular retinol-binding protein in retinoid metabolism. *Nutrition reviews*, 58(8), pp. 230–236.

Narfström, K. et al., 1989. The Briard dog: a new animal model of congenital stationary night blindness. *The British journal of ophthalmology*, 73(9), pp. 750–756.

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-/- 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-/- dogs. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*, 111(1), pp.39–48.

National Center for Biotechnology Information (NCBI), 2016. CTBP2 C-terminal binding protein 2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1488> (08.04.2016).

Ollivier, F.J. et al., 2004. Comparative morphology of the tapetum lucidum (among selected species). *Veterinary ophthalmology*, 7(1), pp.11–22.

Peichl, L., 1992. Morphological types of ganglion cells in the dog and wolf retina. *The Journal of comparative neurology*, 324(4), pp. 590–602.

Peichl, L., 1992. Topography of ganglion cells in the dog and wolf retina. *The Journal of comparative neurology*, 324(4), pp. 603–620.

Petersen-Jones, S.M., 2012. Viral vectors for targeting the canine retina: a review. *Veterinary ophthalmology*, pp.1–6.

Preising, M. et al., 2014. Genetik ophthalmologischer Erkrankungen. Teil 1: Genetische Grundlagen und Phänotypen. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, 231(2), pp. 177–89.

Preising, M. et al., 2014. Genetik ophthalmologischer Erkrankungen. Teil 2: Diagnostik und Therapiekonzepte. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, 231(2), pp. e1–15.

Puller, C., 2009. Die synaptische Architektur der äußeren plexiformen Schicht der Säugetierretina. *Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main*.

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.

Reichenbach, A. & Bringmann, A., 2013. New functions of Müller cells. *Glia*, 61(5), pp.651–78.

Sachsenweger, M., 2002. *Augenheilkunde. Duale Reihe*. Landshut: Thieme, pp. 4–7, 248–251.

Schlote, T. et al., 2004. *Taschenatlas Augenheilkunde* (ISBN 3-13-131481-8). Stuttgart: Georg Thieme Verlag, pp. 2–14.

Spektrum, Lexikon der Neurowissenschaft, 2000. Gliazellen. Available at: <http://www.spektrum.de/lexikon/neurowissenschaft/gliazellen/4781> (16.04.2016).

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*, 231(3), pp. 210–215.

Stieger, K. et al. 2009. In vivo gene regulation using tetracycline-regulatable systems. *Advanced drug delivery reviews*, 61(7-8), pp. 527–541.

Strauss, O., 2005. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological reviews*, 85(3), pp.845–881.

Takahashi, Y. et al, 2011. An alternative isomerohydrolase in the retinal Müller cells of a cone-dominant species. *The FEBS journal*, 278(16), pp. 2913–2926

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.

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., 2016. Evaluation of Ocular Gene Therapy in an Italian Patient Affected by Congenital Leber Amaurosis Type 2 Treated in Both Eyes. *Advances in experimental medicine and biology*, 854, pp. 533–539.

Triviño, A. et al., 1996. Immunohistochemical study of human optic nerve head astroglia. *Vision Research*, 36(14), pp 2015–2028.

Vecino, Elena et al., 2016. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Progress in retina and eye research*, 51(1), pp.1–40.

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.

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.

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., 2010. Synaptic Organization of the Vertebrate Retina: General Principles and Species-Specific Variations. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(3), pp 1264–1274.

Yang, G.-Q. et al., 2015. Recent advances in the dark adaptation investigations. *International journal of ophthalmology*, 8(6), pp. 1245–1252.

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, 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.

Anhang

A 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 nicht-veröffentlichten 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.“

Ort, Datum

Unterschrift

B Danksagung

Bei Frau Prof. Dr. Birgit Lorenz möchte ich mich ganz herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Knut Stieger für die Vergabe des Themas, die stets freundliche sowie wissenschaftliche Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit. Ich bedanke mich ebenfalls für die immer offene Bürotür, die stets positive Einstellung und den durchgängigen Optimismus.

Frau Dr. Daniela Klein danke ich für die sehr gute Einführung, Unterstützung und die wissenschaftliche Zusammenarbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Brigitte Müller für jegliche Hilfestellungen und Problemlösungsstrategien sowie die Einarbeitung in die konfokale Lasermikroskopie bedanken.

Ebenfalls danken möchte ich Bettina Gill für ihre große Unterstützung am konfokalen Lasermikroskop.

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

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an alle Mitarbeiter/-innen des Labors für molekulare Ophthalmologie und dessen Leiter Dr. rer. medic. med. habil. Markus Preising für die gute Zusammenarbeit, das harmonische Miteinander und die Labor Meetings. Im Besonderen geht mein Dank an Frau Annabella Janise, dem Herz des Labors, die mir bei allen Laborarbeiten und sonstigen Nöten stets mit Rat und Tat bei Seite stand. Auch bei Jessica Grebe und Fei Song möchte ich mich für das rege Interesse und die seelische Unterstützung bedanken.

Schließlich geht mein Dank an meine Familie und meine Freunde, insbesondere meinen Eltern, meinem Bruder und meinem Partner Johannes für ihre uneingeschränkte Unterstützung. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

