

**Morphologische Analyse der caninen Netzhaut bei
RPE65-Mangel mit und ohne gentherapeutischer Intervention**

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

vorgelegt von Melekidou, Wassiliki
aus Stuttgart

Gießen 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Aus der Arbeitsgruppe experimentelle Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für
Augenheilkunde

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Knut Stieger

Gutachterin: PD Dr. Ahlemeyer

Tag der Disputation: 05.10.2023

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Anatomie des Auges	2
1.2	Aufbau der Säugetiernetzhaut	2
1.2.1	Retinales Pigmentepithel.....	3
1.2.2	Tapetum lucidum.....	5
1.2.3	Neurosensorische Netzhaut	6
1.2.3.1	Photorezeptoren	6
1.2.3.2	Bipolarzellen	10
1.2.3.3	Horizontalzellen	11
1.2.3.4	Amakrinzellen	12
1.2.3.5	Ganglienzellen	12
1.2.3.6	Gliazellen.....	13
1.3	Visueller Zyklus	14
1.3.1	Zapfenspezifischer Retinolzyklus	15
1.3.2	Eigenschaften und Vorkommen von RPE65.....	15
1.3.3	Phototransduktion	16
1.4	Erkrankungen aufgrund von Mutationen im RPE65-Gen	17
1.4.1	Lebersche kongenitale Amaurose und Frühkindliche Netzhautdegeneration beim Menschen	17
1.4.2	RPE65-Mutation und kongenitale stationäre Nachtblindheit beim Hund	18
1.5	Gentherapie	21
1.5.1	Gentherapievektoren.....	22
1.5.2	Gentherapie beim RPE65 ^{-/-} -Hundemodell	23
1.5.3	Klinische Studien der Gentherapie beim Menschen mit RPE65- Mutationen	25
1.6	Die optische Kohärenztomographie als bildgebendes Verfahren	27
1.7	Zielsetzung	29
2	MATERIAL UND METHODEN	30
2.1	Materialien	30
2.1.1	Versuchstiere	30
2.1.2	DiOCTA layer segmentation.....	32
2.1.3	Weitere Materialien	33
2.2	Methodik der Vorarbeit	36
2.2.1	Subretinale Injektionen.....	36
2.2.2	Erfolgs- und Verlaufskontrollen	36
2.2.3	Präparation der Augenbecher	36

2.2.4	Paraffineinbettung.....	37
2.3	Methodik der eigenen Arbeit.....	38
2.3.1	Segmentierung der OCT-Aufnahmen mit DiOCTA	38
2.3.1.1	Statistische Auswertung.....	42
2.3.2	Histologische und immunhistochemische Analyse	43
2.3.2.1	Retinapräparation	43
2.3.2.2	Herstellung von Kryostatschnitten.....	44
2.3.2.3	Färbung mittels indirekter Immunfluoreszenz.....	44
2.3.2.4	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	46
2.3.2.5	Mikroskopie	46
2.3.2.6	Bildbearbeitung.....	47
3	ERGEBNISSE	48
3.1	Vergleich der Schichtdicken von RPE65^{-/-}-Retinae in behandelten und unbehandelten Augen miteinander und mit den Werten des gesunden Kontrolltieres.....	48
3.1.1	Analyse der temporalen und nasalen Schichtdicken der ONL+	49
3.1.1.1	Vergleich der ONL+ Schichtdicke von A1, A2 und A3 mit NA	52
3.1.2	Analyse der temporalen und nasalen Schichtdicken der ISe+	53
3.1.2.1	Vergleich der ISe+ Schichtdicke von A1, A2 und A3 mit NA	55
3.1.3	Analyse der temporalen und nasalen Schichtdicken der gesamten Retina	56
3.1.3.1	Vergleich der Schichtdicken der gesamten Retina von A1, A2 und A3 mit NA	58
3.2	Vergleichende Analysen retinaler Strukturen der RPE65^{-/-}-Hunde und des gesunden Kontrolltieres	59
3.2.1	Immunhistochemischer Nachweis der AAV-vermittelten RPE65-Gentherapie	59
3.2.2	Histologischer Nachweis struktureller Veränderungen der Retina bei RPE65-Mangel.....	65
3.2.3	Zusammenfassender Vergleich retinaler Strukturen von HE- und immunhistochemisch gefärbten Kryostatschnitten mit korrespondierenden OCT-Aufnahmen.....	67
4	DISKUSSION.....	71
4.1	Morphologische Veränderungen der ONL+ Schicht im Zusammenhang mit der RPE65-Gentherapie.....	71
4.2	Gentherapeutischer Effekt auf das RPE und Bedeutung der GFAP-Färbung.....	76
4.3	Untersuchung der ISe-Schicht.....	77
4.4	Untersuchung der gesamten Retina.....	78
4.5	Fazit.....	79

5	ZUSAMMENFASSUNG	81
6	SUMMARY	82
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	83
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	84
9	TABELLENVERZEICHNIS	86
10	LITERATURVERZEICHNIS.....	87
11	ANHANG	96
12	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	100
13	DANKSAGUNG	101

1 Einleitung

Hereditäre Netzhautdystrophien bilden eine heterogene Gruppe genetischer Erkrankungen, die eine Verschlechterung der Sehschärfe gemeinsam haben. Die Lebersche kongenitale Amaurose, die zu einer Degeneration der Photorezeptoren der Netzhaut führt, stellt eine der schwersten Formen der Stäbchen-Zapfen-Dystrophien dar. Die Betroffenen weisen schon bei Geburt eine hochgradige Minderung der Sehschärfe auf und erblinden noch innerhalb der ersten Lebensmonate. Einen leicht milderen Verlauf nimmt die Erkrankung bei der frühkindlichen Netzhautdegeneration. Beiden Formen kann eine Mutation mehrerer Gene zugrunde liegen, wobei die Mutation des RPE65-Gens etwa 5-10% dieser Erkrankungen ausmacht und deshalb in den letzten 20 Jahren eingehend erforscht wurde. Das Protein RPE65 ist im retinalen Pigmentepithel lokalisiert und spielt eine entscheidende Rolle im visuellen Zyklus. Die Gentherapie mittels adeno-assoziierten viralen Vektoren, bei der eine gesunde Kopie des Gens in die Retina eingebracht wird, zeigte am natürlich vorkommenden RPE65^{-/-}-Hundemodell schon deutliche Erfolge. Die darauffolgenden klinischen Studien der Phase I, II und III am Menschen konnten jedoch nicht in diesem Ausmaß daran anknüpfen. Aufgrund der dennoch nachgewiesenen Verbesserung der Lichtempfindlichkeit wurde im Dezember 2017 in den USA und im November 2018 in der EU das Medikament LUXTURNA von Spark Therapeutics für die Therapie der biallelischen Mutation des RPE65-Gens zugelassen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den Auswirkungen der AAV-vermittelten Gentherapie am RPE65^{-/-}-Hundemodell. Die untersuchten Aufnahmen der Retinae, die mittels optischer Kohärenztomographie (OCT) erstellt wurden, stammen von Briard Hunden, die an der Universität Nantes im Forschungslabor INSERM UMR 1089 gentherapiert und dann dem Labor für experimentelle Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Universität Gießen unter Leitung von Prof. Dr. Dr. Knut Stieger zur Verfügung gestellt wurden. Der Erfolg der Therapie wird anhand der Schichtdickenveränderungen einzelner Netzhautschichten in OCT-Aufnahmen und zusätzlich anhand von histologischen und immunhistochemischen Paraffin- und Gefrierschnitten, die von diesen Augen angefertigt wurden, gemessen.

1.1 Anatomie des Auges

Das Auge ist ein kugelförmiges, lichtempfindliches Sehorgan, welches geschützt in der knöchernen Orbita (Augenhöhle) liegt. Die Augen von Säugetieren haben einen ähnlichen Aufbau. So kann die Hülle des Bulbus oculi (Augapfels) in drei Schichten unterteilt werden. Die äußerste ist die Tunica fibrosa bulbi, die sich aus der Sklera (Lederhaut) und Cornea (Hornhaut) zusammensetzt. Die Sklera bietet eine Schutzfunktion und gewährleistet durch ihren strukturellen Aufbau die Formstabilität des Bulbus oculi. Nach vorne geht die Sklera in die transparente Cornea über, die einen wesentlichen Anteil an der Brechung des auftreffenden Lichts einnimmt. Als nächstes folgt die Tunica vasculosa bulbi, auch Uvea genannt. Diese umfasst die Iris, den Ziliarkörper und die Choroidea. Die Iris funktioniert wie eine Blende am Fotoapparat und kann durch Veränderung ihrer Öffnungsweite den Lichteinfall durch die Pupille regulieren. Die Choroidea (Aderhaut) enthält Blutgefäße, die für die Versorgung der Retina verantwortlich sind. Der Ziliarkörper ist an der Kammerwasserproduktion beteiligt und kann über den Zug der am Ziliarmuskel befestigten Zonulafasern die Brechkraft der Linse modulieren. Die Tunica interna bulbi besteht aus der Retina (Netzhaut) (Kolb 2007a; Drenckhahn et al. 2004).

1.2 Aufbau der Säugetiernetzhaut

Die Retina ist in zwei Teile gegliedert, die Pars optica, die Sinnes- und Nervenzellen enthält, und die Pars caeca, die aus zweischichtigem Epithel besteht. Diese beginnt auf Höhe der Ora serrata und bedeckt nur die Rückfläche von Iris und Ziliarkörper. Die Pars optica, die den Augenhintergrund größtenteils auskleidet, lässt sich wiederum zunächst in das Stratum pigmentosum, welches ausschließlich aus retinalen Pigmentepithelzellen besteht, und das Stratum nervosum, das Nervengewebe, unterteilen (Welsch und Deller 2011). Letzteres setzt sich aus mehreren Schichten zusammen.

In enger Verbindung zum retinalen Pigmentepithel (RPE) stehen die Photorezeptoren (erstes Neuron) mit ihren Außensegmenten (OS) und Innensegmenten (IS). Die Zellkerne der Photorezeptoren bilden die äußere nukleäre Schicht (ONL). In der darauffolgenden äußeren plexiformen Schicht (OPL) gehen die Photorezeptoren Synapsen mit Bipolarzellen (zweites Neuron) und Horizontalzellen ein. Die Zellkerne der Bipolar-, Horizontal-, Müller- und Amakrinzellen machen die innere nukleäre Schicht (INL) aus. Die Bipolarzellen werden wiederum in der inneren plexiformen Schicht (IPL) mit den Ganglienzellen verschaltet, deren Zellkerne die Ganglienzellschicht (GCL) formen. Die Fasern der Ganglienzellen bilden die Nervenfaserschicht (NFL). Müller-Gliazellen bilden die innere und äußere Gliagrenzmembran (Zhu et al. 2012).

Die Photorezeptoren bilden somit das erste Neuron der Sehbahn und leiten die neuronalen Signale weiter an die Bipolarzellen (zweites Neuron), welche wiederum mit den Ganglienzellen in Verbindung stehen (drittes Neuron). Die Axone aller Ganglienzellen laufen in der Papilla n. optici (Sehnervenpapille) zusammen und verlassen als N. opticus (Sehnerv) die Augenhöhle. Die Austrittsstelle des N. opticus bildet ein physiologisches Skotom, den sogenannten blinden Fleck. Im darauffolgenden Chiasma opticum kreuzen Fasern der nasalen Retinahälfte, die für die Wahrnehmung des temporalen Gesichtsfeldes verantwortlich sind, jeweils auf die Gegenseite. Die Nervenfasern der temporalen Netzhautregionen, welche die Information der nasalen Gesichtsfeldhälfte tragen, verbleiben auf der ipsilateralen Seite. Nach dem Chiasma opticum verlaufen die Nervenfasern als Tractus opticus weiter und enden größtenteils im Corpus geniculatum laterale (CGL, seitlicher Kniehöcker), einem thalamischen Kern (Drenckhahn et al. 2004). Die Neurone des CGL bilden das vierte Neuron der Sehbahn und projizieren als Radiatio optica (Sehstrahlung) auf die primäre Sehrinde (Area striata/Area V1) der okzipitalen Großhirnrinde (Ungewiss et al. 2020; Huggenberger et al. 2019).

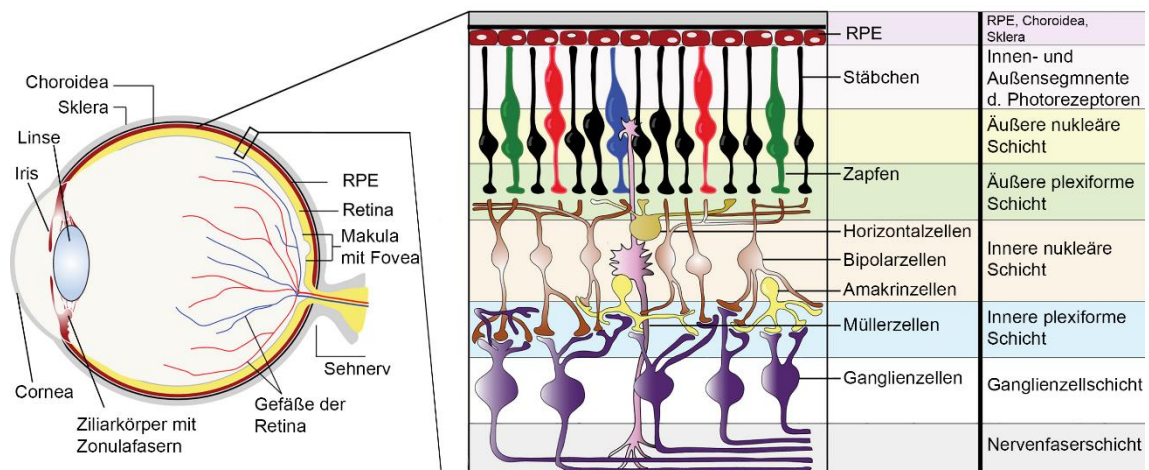


Abbildung 1: Aufbau des menschlichen Auges und schematische Darstellung der Retina
 Modifiziert nach (Kroeger et al. 2019).

1.2.1 Retinales Pigmentepithel

Das retinale Pigmentepithel (RPE) ist ein einschichtiges Epithel aus hexagonal kubischen Zellen, welches die Neuroretina mit der Choroidea verbindet und somit einen Teil der Blut-Retina-Schranke bildet. Es geht mit den Photorezeptoren eine funktionelle Einheit ein und ist für die visuelle Fähigkeit unverzichtbar (Sparrow et al. 2010).

An der apikalen Seite des Epithels erstrecken sich Mikrovilli zwischen den äußeren Segmenten der Photorezeptoren. So wird eine intensive Verbindung zwischen den zwei Strukturen ermöglicht. Die Phagozytose der abgestoßenen Membranscheiben aus den Spitzenabschnitten der Außensegmente der Photorezeptoren durch das RPE spielt eine wichtige Rolle in der Erhaltung der Funktionalität dieser und im Allgemeinen für den visuellen Zyklus.

In den Photorezeptoren entsteht bei der Phototransduktion all-trans-Retinal (siehe Abschnitt 1.3 und 1.3.3). Das RPE ist für die Reisoomerisierung von gebleichtem all-trans-Retinal in lichtsensitives 11-cis-Retinal, dem lichtempfindlichen Bestandteil des Sehpigments Rhodopsin, verantwortlich (Bok 1993).

Die Zellen des retinalen Pigmentepithels erfüllen eine Schutzfunktion durch die Absorption von Streulicht. Dies ist möglich durch deren hohen Gehalt an Melanosomen mit dem Pigment Melanin. Zusätzlich können Melanosome gewebetoxische freie Radikale, die aufgrund von oxidativem Stress anfallen, reduzieren (Peters und Schraermeyer 2001). Ein weiteres Pigment, welches sie enthalten, ist das autofluoreszierende Lipofuszin. Es soll zunächst als absorbierendes Pigment den Schutz der Retina unterstützen, kann aber bei Akkumulation im Alter phototoxisch wirken. Die Wärme, die bei der Lichtabsorption entsteht, wird über die RPE-Zellen an die stark durchblutete Choroidea abgeleitet.

Eine weitere Funktion des Pigmentepithels ist der transepitheliale Transport. Dabei werden wichtige Nährstoffe wie Wasser, Ionen, Glucose und Retinol aus den Blutgefäßen der Choroidea zu den Photorezeptoren transportiert und im Gegenzug metabolische Endprodukte aus dem subretinalen Raum in Richtung der Kapillaren der Choroidea abtransportiert (Strauss 2005).

Außerdem werden Wachstumsfaktoren ausgeschüttet, die die Strukturintegrität der angrenzenden Gewebe gewährleisten (Kharitonov et al. 2018).

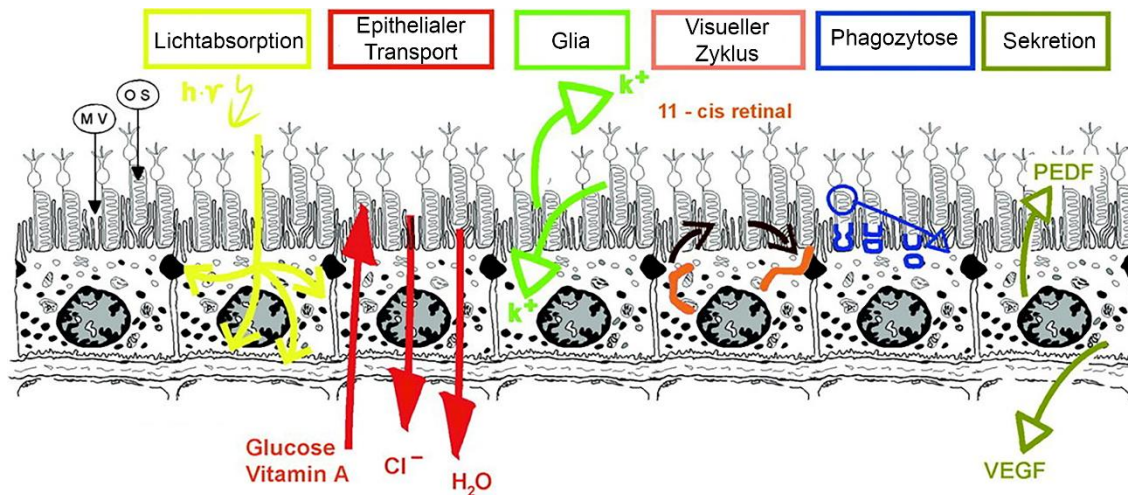


Abbildung 2: Aufgaben des retinalen Pigmentepithels

Die Zellen des retinalen Pigmentepithels reichen mit ihren Mikrovilli zwischen die Photorezeptoren und bilden mit ihnen eine funktionelle Einheit. Das RPE spielt darüber hinaus für den Funktionserhalt der gesamten Retina eine entscheidende Rolle. (MV: Mikrovilli; OS: Außensegment; Cl: Chlorid, H₂O: Wasser; VEGF: vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor; PEDF: Pigmentepithel-assoziiertes Faktor). Modifiziert nach (Strauss 2005).

1.2.2 Tapetum lucidum

Das Tapetum lucidum ist eine reflektierende Schicht, die unter anderem bei einigen Fischen, Huf- und Raubtieren vorkommt. Sie liegt zwischen dem RPE und der Choroidea und dient der optimalen Lichtausbeute bei Dämmerung (Yamaue et al. 2015). Das sogenannte Tapetum lucidum cellulosum beim Hund ist von der Form her ein gleichseitiges Dreieck, wobei die Spitze des Dreiecks nach oben zeigt und die Basis horizontal ausgerichtet ist. Es nimmt ungefähr 30 % der superioren Retina ein und setzt sich im Zentrum aus circa 18-20 Zellschichten rechteckiger Zellen zusammen. Die Anzahl der Schichten nimmt zur Peripherie hin ab. Die Zellen enthalten eine hohe Konzentration an Zinkcystein-Kristallen, die das Licht reflektieren (Ollivier et al. 2004). So kommt es zu einer erneuten Stimulation der Photorezeptoren, ein Vorgang, der es diesen Tieren ermöglicht bei schlechten Lichtverhältnissen zu sehen. Über dem Tapetum ist das retinale Epithel nicht pigmentiert, um die Lichtpassage zum Tapetum und die darauffolgende Reflexion nicht zu behindern. Das RPE, an welches kein Tapetum angrenzt, ist pigmentiert (Slijkerman et al. 2015).

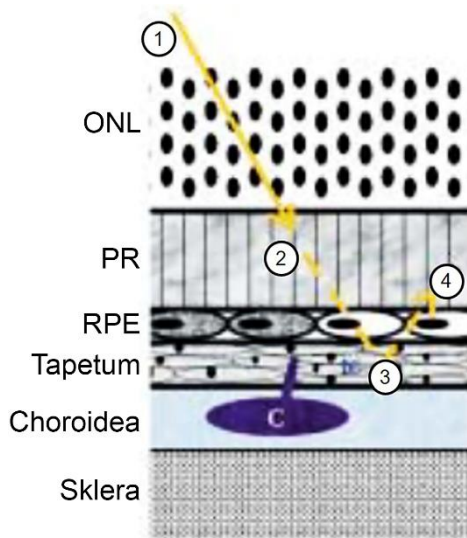


Abbildung 3: Tapetum lucidum cellulosum

Das Tapetum lucidum cellulosum beim Hund liegt zwischen dem RPE und der Choroidea. Ein Lichtstrahl (1) stimuliert beim Durchtritt durch die Retina die Photorezeptoren (PR), wird an dem Tapetum reflektiert (3) und regt sie ein zweites Mal an (4).

(ONL: äußere nukleäre Schicht; PR: Photorezeptoren; RPE: retinales Pigmentepithel)

Modifiziert nach (Ollivier et al. 2004).

1.2.3 Neurosensorische Netzhaut

1.2.3.1 Photorezeptoren

Photorezeptoren setzen sich aus fünf Hauptbestandteilen zusammen: Außensegment (OS), Connecting cilium (CC), Innensegment (IS), Zellkern und entweder Stäbchen-Endknöpfchen oder Zapfen-Endfuß (siehe Abbildung 4) (Drenckhahn et al. 2004).

Die Außensegmente stehen in enger Verbindung zum RPE. Aufgrund der hohen Lichtintensität, der sie ausgesetzt sind, entstehen bei Stoffwechselprozessen während der Phototransduktion (siehe Abschnitt 1.3.3) als Nebenprodukte schadhafte Proteine und Lipide. Zusätzlich sammeln sich freie Radikale durch oxidativen Stress an. Diese Anhäufung kann zu einer Schädigung der Photorezeptoren führen und sie in ihrer Funktion einschränken. Deshalb werden täglich die Membranscheiben der Spitzen der Außensegmente abgestoßen und vom RPE phagozytiert. Eine vollständige Erneuerung der Außensegmente erfolgt alle zehn Tage (Young und Bok 1969; Strauss 2005). Die Innensegmente lassen sich unterteilen in ein äußeres, den Außensegmenten zugewandtes Ellipsoid, welches reich an Mitochondrien ist, und ein inneres Myoid, welches für Proteinbiosyntheseprozesse reich an Ribosomen, endoplasmatischen Retikula und Golgi-Apparaten ist (Spaide und Curcio 2011). Über das Verbindungsstück, das Connecting cilium (CC), gelangen diese Syntheseprodukte zum Außensegment (Fliegau et al. 2007). Die Zellkerne der Photorezeptoren sind in der äußeren nukleären Schicht (ONL) verteilt.

Photorezeptoren werden nach ihrer Funktion und der Struktur ihrer Außensegmente in Stäbchen und Zapfen unterteilt.

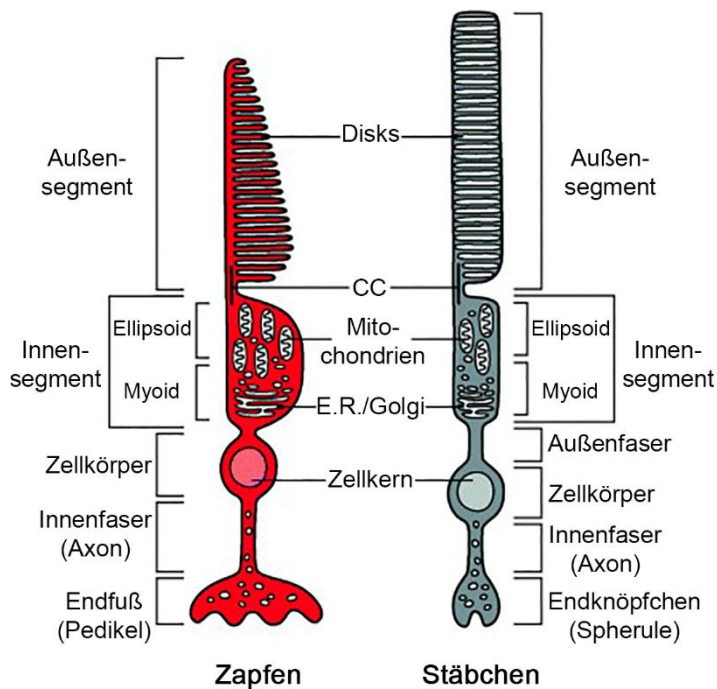


Abbildung 4: Struktur der Photorezeptoren

Photorezeptoren sind zusammengesetzt aus dem Außensegment, Connecting cilium (CC), Innensegment, Zellkern und entweder Stäbchen-Endknöpfchen oder Zapfen-Endfüßchen.

Die Außensegmente der Zapfen (rot) und Stäbchen (grau) enthalten die Sehpigmente und alle für die Phototransduktion nötigen Komponenten, deren Proteinbiosynthese in den Innensegmenten stattfindet und die über das Connecting Cilium zu den Außensegmenten transportiert werden.

Modifiziert nach (Mavlyutov et al. 2002).

Stäbchen haben eine charakteristisch lange, zylindrische Erscheinung, während Zapfen im Vergleich kürzer sind und eine konische Form aufweisen. Bei Stäbchen bestehen die Außensegmente aus gestapelten Membranscheiben, sogenannten Disks, die nach extrazellulär durch eine durchgängige Zellmembran getrennt sind. Die Außensegmente der Zapfen hingegen setzen sich aus Einfältelungen der gesamten Plasmamembran zusammen (Ahnelt 1998; Mustafi et al. 2009).

Elektromagnetische Wellen, die in einem Bereich von etwa 400-780 nm liegen, können von den Photorezeptoren wahrgenommen werden. Dies ist der Bereich des sichtbaren Lichts für Menschen (Palczewski 2012).

Stäbchen enthalten in ihren Außensegmenten das Sehpigment Rhodopsin, das sein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von ungefähr 500 nm hat, und reagieren bereits auf eine geringe Lichtintensität sehr empfindlich (Swaroop et al. 2010). Deshalb sind sie für das Sehen bei Dämmerung und Dunkelheit (skotopisches Sehen) verantwortlich. Bei Stäbchen reicht bereits ein Photon aus um eine verlässliche Antwort, eine Potentialänderung, zu generieren (siehe Abschnitt 1.3.3). Für die vergleichbare Reaktion würde man bei Zapfen 100 Photonen benötigen (Mustafi et al. 2009).

Zapfen sind für das photopische Sehen, das Sehen bei Tageslicht, zuständig. Darüber hinaus sind sie auch verantwortlich für das Farbsehen und das hohe Auflösungsvermögen (Swaroop et al. 2010). Letzteres wird durch die 1:1:1 Verschaltung

von Zapfenrezeptor zu Bipolarzelle und anschließend zu Ganglienzelle gewährleistet (Provis et al. 2013).

Das Farbsehen wird durch die sogenannten Zapfenopsine ermöglicht, dem Sehpigment in den Außensegmenten der Zapfen. Diese lassen sich anhand ihrer spektralen Absorptionsmaxima in drei Gruppen unterteilen. Das Sehpigment der Blauzapfen, auch S-Zapfen genannt für *short wavelength*, reagiert auf kurzwelliges Licht mit einer Wellenlänge von etwa 420 nm, Grünzapfen auch M-Zapfen (*medium wavelength*) genannt, sind empfindlich für Licht mittlerer Wellenlänge von ungefähr 530 nm und Rotzapfen absorbieren langwelliges Licht in einem Bereich von 560 nm (L-Zapfen für *long wavelength*) (Mustafi et al. 2009; Heermann 2017). Menschen sind folglich Trichromaten.

Die menschliche Retina enthält etwa 77-107 Millionen Stäbchen und 4-5,3 Millionen Zapfen, wobei ihre Verteilung nicht gleichmäßig ist. Zapfen weisen in der Fovea, der Stelle des schärfsten Sehens, ihre höchste Dichte auf. An diesem Punkt kommen keine Stäbchen vor. Die Stäbchendichte ist parafoveal am höchsten und nimmt in Richtung Peripherie hin langsam ab. Außerhalb der Fovea nimmt die Zapfendichte deutlich ab (Curcio et al. 1990).

Die Fovea, die sich im Zentrum der Makula (gelber Fleck) und damit temporal des Sehnervs befindet, stellt beim Menschen eine charakteristische Vertiefung der Netzhaut dar. Diese entsteht dadurch, dass in diesem Bereich alle Schichten der Retina bis auf die Zapfen zur Seite gedrängt sind, sodass das Licht direkt auf jene treffen kann (Provis et al. 2013).

Hunde haben wie die meisten Säugetierarten eine stäbchendominierte Retina und ein dichromates Farbsehen. Sie besitzen demnach nur zwei Zapfentypen mit unterschiedlichen Farbpigmenten: S-Zapfen, die ihr Absorptionsmaximum im kurzwelligen blauvioletten Bereich bei 429 nm haben, und rot-grün empfindliche L/M-Zapfen, die im langwelligen Bereich von 555 nm liegen. Die Stäbchen der Hunderetina haben ihr Absorptionsmaximum bei 508 nm (Jacobs et al. 1993; Mowat et al. 2008). Weiterhin besitzen Hunde eine sogenannte Area centralis, die als Äquivalent zur menschlichen Fovea gilt, jedoch im Gegensatz zu dieser keine Vertiefung aufweist. Die Area centralis befindet sich in der superioren Retina temporal der Sehnervenpapille. Ein weiterer Unterschied ist, dass sich hier nicht ausschließlich Zapfen, sondern auch einige Stäbchen befinden. Zusätzlich dazu besitzen Hunde eine weitere besondere Struktur, den *visual streak*, der je nach Rasse mäßig oder markant ausgeprägt sein kann. Dieses horizontale Band erstreckt sich superior der Sehnervenpapille und breitet sich sowohl

nasal als auch verstärkt temporal aus. In dessen temporalem Bereich liegt die Area centralis. Beide Strukturen liegen im tapetalen Fundus und sind gekennzeichnet durch eine erhöhte Anzahl an Photorezeptoren und Ganglienzellen (Beltran et al. 2014; Peichl 1992; Mowat et al. 2008).

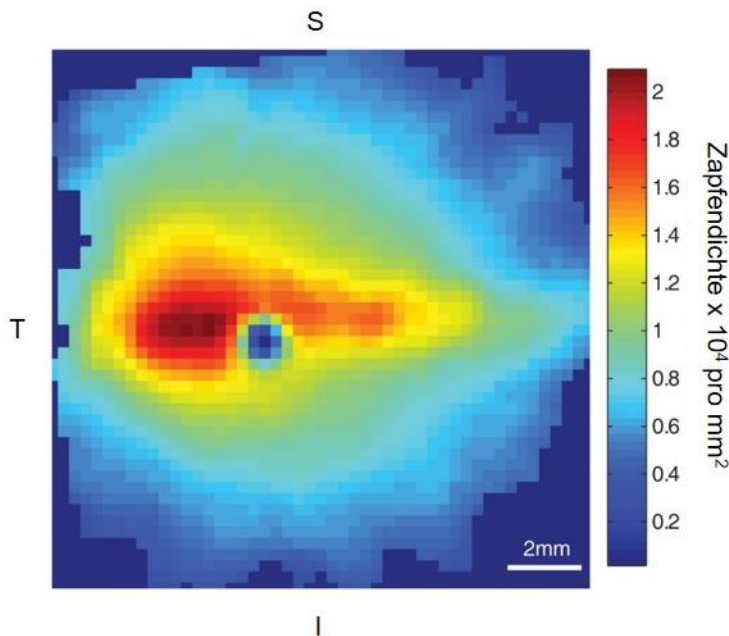


Abbildung 5: Verteilung der Zapfendichte in der Hunderetina

Im sogenannten *visual streak* (rotgelber Bereich) befindet sich eine erhöhte Anzahl an Zapfenrezeptoren mit einem Maximum in der Area centralis (dunkelroter Bereich), die leicht superior und temporal des Sehnervenkopfes (dunkelblauer punktförmiger Bereich) liegt (S: superior; I: inferior; T: temporal) Modifiziert nach (Mowat et al. 2008).

Die Photorezeptoren sind untereinander über elektrische Synapsen mit sogenannten *gap junctions* verbunden. Dabei bilden L- und M-Zapfenendfüßchen zu ihren direkt benachbarten Zapfen- und Stäbchenterminalen Synapsen aus, wohingegen S-Zapfen kaum solche Verbindungen eingehen. Diese Verschaltung erlaubt es ungeordnetes Rauschen einzelner Zapfen zu minimieren und damit die Antwort auf Lichtreize zu verbessern.

Darüber hinaus gehen die Photorezeptoren zahlreiche Synapsen mit weiteren Zellen ein. Die Zapfenendfüßchen enthalten präsynaptisch 20 bis 50 sogenannter Synapsenbänder, um die sich transmittergefüllte Vesikel befinden. Invaginationen der Membran ermöglichen die Bildung sogenannter Triaden. Diese bestehen aus zwei Fortsätzen von Horizontalzellen und einem zentral gelegenen Fortsatz einer ON-Zapfenbipolarzellen. OFF-Zapfenbipolarzellen bilden flache Synapsen an der Basis der Endfüßchen aus. Jedes Zapfenendfüßchen kann bis zu 500 Synapsen eingehen.

Das Stäbchenendknöpfchen enthält nur ein präsynaptisches Band, das von Vesikeln umgeben wird und an die Invagination grenzt. Die ausgebildeten Synapsen ähneln einer Triade, wobei es auch bei Stäbchen zwei laterale Horizontalzellfortsätze gibt, jedoch ein bis drei zentrale Fortsätze von Stäbchenbipolarzellen. Eine Stäbchenbipolarzelle kann

20-80 Synapsen mit Stäbchenendknöpfchen eingehen. Auch in diesem Fall bilden OFF-Zapfenbipolarzellen flache Synapsen an der Basis aus (Wässle 2004).

1.2.3.2 Bipolarzellen

Bipolarzellen bilden das zweite Neuron der Sehbahn und sind in der äußeren plexiformen Schicht (outer plexiform layer, OPL) über ihre Dendriten mit Stäbchenendknöpfchen und Zapfenendfüßchen verbunden. Ihre Zellkörper liegen in der inneren nukleären Schicht (inner nuclear layer, INL) und mit ihren Axonen reichen sie bis in die unterschiedlichen Zonen der inneren plexiformen Schicht (inner plexiform layer, IPL), in der sie Synapsen mit Ganglienzellen und Amakrinzellen eingehen.

Bipolarzellen lassen sich in Stäbchenbipolarzellen und Zapfenbipolarzellen einteilen. Während es nur einen Typ an Stäbchenbipolarzellen gibt, lassen sich Zapfenbipolarzellen in Zwerg-, S- und diffuse Bipolarzellen unterscheiden. Photorezeptoren sind bei Dunkelheit depolarisiert und setzen kontinuierlich den Neurotransmitter Glutamat frei. Trifft jedoch Licht auf die Photorezeptoren, hyperpolarisieren diese und die Ausschüttung von Glutamat versiegt (siehe Abschnitt 1.3.3). Die postsynaptischen Bipolarzellen lassen sich auch anhand ihrer Reaktion auf diese Potenzialänderung in ON-Bipolarzellen, welche depolarisieren, und OFF-Bipolarzellen, die mit einer Hyperpolarisation antworten, einteilen. Die Ursache dieser gegensätzlichen Reaktion auf Glutamat sind verschiedene Glutamatrezeptoren der Bipolarzellen. ON-Bipolarzellen exprimieren den metabotropen Glutamatrezeptor mGluR6, während OFF-Bipolarzellen einen ionotropen Glutamatrezeptor besitzen (Wässle 2004).

Stäbchenbipolarzellen sind sogenannte ON-Bipolarzellen und werden durch einen Lichtstimulus depolarisiert. Dabei bilden sie 20-80 Synapsen mit mehreren Stäbchenendknöpfchen aus. Je weiter diese von der Fovea entfernt sind, desto mehr Verbindungen sind nachweisbar. Ihre Axone enden in der proximalen IPL nahe der Ganglienzellschicht. Jedoch gehen die Stäbchenbipolarzellen keinen direkten Kontakt mit Ganglienzellen ein, sondern senden ihre Signale über Synapsen mit Amakrinzellen (Typ AII) an ON- oder OFF-Zapfenbipolarzellen weiter, die wiederum in Verbindung mit Ganglienzellen stehen. Stäbchenendknöpfchen können ihre Signale auch über elektrische Synapsen mit Zapfenendfüßchen oder über flache Synapsen mit OFF-Zapfenbipolarzellen weiterleiten. Demnach sind die Stäbchenrezeptoren für ihre Informationsweiterleitung auf die Verschaltungen der Zapfenbipolarzellen angewiesen (Euler et al. 2014; Wässle 2004; Lee et al. 2019).

Die menschliche Retina weist zehn verschiedene Arten von Zapfenbipolarzellen auf, von denen sieben zu den diffusen Bipolarzellen gehören. Diese weisen keine Farbspezifität auf, bündeln Informationen von 5-20 Zapfenrezeptoren und reichen mit ihren Axonen entweder bis in die ON- oder OFF-Schichten der IPL. Die restlichen drei gehen mit einzelnen Zapfenrezeptoren Synapsen ein und sind deshalb auch als Zwergbipolarzellen (*midget bipolar cells*) und S-Bipolarzellen, die blauzapfenspezifisch sind, bekannt (Kolb 2007c). Zwergbipolarzellen sind entweder mit einem L- oder M-Zapfen verbunden, wobei OFF-Zwergbipolarzellen Dendriten des flachen Typs aufweisen und Synapsen an der Basis der Zapfenendfüßchen bilden und ON-Zwergbipolarzellen mit ihren invaginierenden Synapsen einen Teil der Triaden-Struktur bilden. Dieser *midget pathway* spielt vor allem in der Fovea eine wichtige Rolle und ist für eine hohe räumliche Auflösung wichtig. S-Zapfenbipolarzellen kontaktieren selektiv 1-5 Blauzapfenendfüßchen und sind ON-Bipolarzellen (Wässle 2004).

1.2.3.3 Horizontalzellen

Horizontalzellen liegen mit ihren Zellkernen in der INL und bilden ausschließlich in der OPL Synapsen mit Photorezeptoren und Bipolarzellen aus. Die meisten Säugetiere besitzen zwei Arten von Horizontalzellen, Typ A und Typ B. Bei Primaten werden diese als H1 und H2 bezeichnet. Horizontalzellen vom Typ A sind mit Zapfenendfüßchen verschaltet, während Zellen vom Typ B mit ihren Dendriten Zapfen kontaktieren und zusätzlich mit ihrem Axon Informationen der Stäbchenendknöpfchen aufnehmen. Letztere können mit den H1-Horizontalzellen der Primaten verglichen werden, die zusätzlich eine farbliche Selektivität aufweisen. H1-Horizontalzellen gehen bevorzugt Synapsen mit Rot- und Grünzapfen ein und seltener mit Blauzapfen. Ihr Axonterminal zieht ebenso zu den Stäbchen. H2-Horizontalzellen kontaktieren vor allem Blauzapfen mit ihren Dendriten und ihrem Axonterminal (Puller und Haverkamp 2011). Horizontalzellen sammeln Informationen mehrerer Photorezeptoren und beeinflussen die Weiterleitung an Bipolarzellen über hemmendes Feedback an die Photorezeptoren selbst und über direkten Kontakt mit den Bipolarzellen. Sie hemmen differenziert die Reizweiterleitung von Photorezeptoren, um eine verbesserte Kontrastwahrnehmung gewährleisten zu können, die an verschiedene Lichtverhältnisse angepasst ist (Masland 2001; Kolb 2003). Es wird angenommen, dass der inhibitorische Neurotransmitter GABA (Gamma-Aminobuttersäure) von Horizontalzellen ausgeschüttet wird und so die laterale Inhibition ermöglicht. In den vergangenen Jahren wurden auch andere Hypothesen diskutiert, die zu dieser Hemmung führen könnten (Wässle 2004).

1.2.3.4 Amakrinzellen

Amakrinzellen gehen in der IPL Synapsen mit benachbarten Amakrin-, Bipolar- und Ganglienzellen ein. Ihre Zellkerne liegen zum größten Teil in der INL, jedoch gibt es einen kleinen Anteil, der in der GCL liegt, weshalb diese auch als deplatzierte Amakrinzellen bezeichnet werden (Wässle und Boycott 1991). Diese Zellen stellen wichtige Interneurone dar, die durch laterale Inhibition die Signalweiterleitung an Ganglienzellen modulieren. Sie können in etwa 40 Subtypen unterteilt werden und besitzen statt eines langen Axons zahlreiche Dendriten, mit denen sie Synapsen eingehen (Kolb 2007d). Sie werden anhand ihrer Dendritenmorphologie, dem Durchmesser ihres Dendritenbaums und ihrer Stratifikation innerhalb der IPL unterschieden. Die IPL ist in fünf gleichgroße Teilschichten gegliedert, wovon die äußeren distalen zwei Schichten als OFF-Schichten und die proximalen drei, welche an die Ganglienzellschicht grenzen, als ON-Schichten definiert sind (Wässle 2004). Amakrinzellen mit Dendriten in zwei nebeneinanderliegenden Schichten werden als breitstratifizierend klassifiziert, während solche mit Dendriten in weiter auseinanderliegenden Schichten als bistratifizierend bezeichnet werden. Bei diffusen Amakrinzellen reichen die Dendriten in alle IPL-Schichten (Kolb 2007b). Fast alle Amakrinzellen schütten inhibitorische Transmitter wie GABA oder Glyzin aus. Darüber hinaus setzen viele auch einen zweiten Transmitter wie zum Beispiel Acetylcholin frei (Diamond 2017).

1.2.3.5 Ganglienzellen

Die Zellkerne der Ganglienzellen definieren die Ganglienzellschicht und mit ihren Dendriten nehmen sie in der IPL Informationen der Bipolarzellen auf. Ihre Axone bilden die Nervenfaserschicht, verlassen an der Sehnervenpapille als N. opticus die Augenhöhle und ziehen zur Sehrinde.

Die Primatenretina enthält drei Ganglienzellgruppen, die den Großteil der Projektionen zum Thalamus ausmachen und die sowohl ON- als auch OFF-Zellen sein können. Parasol-Ganglienzellen leiten Signale von Stäbchen und L-/M-Zapfen weiter. Sie projizieren in die magnozellulären Schichten des Corpus geniculatum laterale und werden deshalb auch als M-Zellen bezeichnet. Sie sind für die Bewegungs- und nicht-farbspezifische Wahrnehmung verantwortlich. Ein zweiter Weg führt über die *midget*-Ganglienzellen, die Informationen einzelner L- oder M-Zapfen weiterleiten. Sie sind somit für die Weiterleitung der rot-grün spezifischen Informationen und aufgrund ihrer speziellen Verschaltung in der Fovea, für ein hohes räumliches Auflösungsvermögen verantwortlich. Diese Zellen, die etwa 80 % aller Ganglienzellen ausmachen, projizieren

in die parvozellulären Schichten des Corpus geniculatum laterale und werden entsprechend auch als P-Zellen bezeichnet. Eine dritte Gruppe verarbeitet die Signale, die vor allem von S-Zapfen (blauspezifisch) und seltener L-/M-Zapfen produziert werden. Dies sind kleine bistratifizierte Zellen, von denen angenommen wird, dass sie in die koniozellulären Schichten des CGL projizieren (Lee et al. 2010; Szmajda et al. 2008; Callaway 2005).

Darüber hinaus gibt es auch melanopsinhaltige Ganglienzellen, die lichtempfindlich sind und mit ihren Axonen bis zum Ncl. suprachiasmaticus sowie der Area pretectalis, beide im Zwischenhirn (Diencephalon) gelegen, reichen. Sie spielen eine wichtige Rolle für die Regulation der zirkadianen Rhythmik und den Pupillenlichtreflex (Wässle 2004).

In der Säugetierretina erfolgt die Einteilung der Ganglienzellen in α -, β -, γ - und δ -Zellen anhand ihrer Dendritenmorphologie, der Größe ihres Zellkörpers und der Schicht des CGL, in die sie projizieren (Wässle und Boycott 1991).

1.2.3.6 Gliazellen

Die Gliazellen in der Retina lassen sich in Mikro- und Makroglia unterteilen, wobei letztere aus Müllerzellen und Astrozyten bestehen.

Müllerzellen machen mit etwa 90 % die vorherrschende Gliaform in der Retina aus. Sie sind radiär angeordnet, liegen mit ihren Zellkernen in der INL und erstrecken sich von der inneren (inner limiting membrane, ILM) bis zur äußeren Gliagrenzmembran (outer limiting membrane, OLM). Da sie durch die gesamte Neuroretina verlaufen, besteht ihre Aufgabe vor allem in der Aufrechterhaltung der Strukturintegrität und Homöostase der Retina. Müllerzellen helfen bei der Regulation des extrazellulären Kaliumspiegels und dem Austausch vieler Nährstoffe, Abfallprodukte, Ionen, Wasser und anderer Moleküle zwischen den Neuronen und Blutgefäßen. Darüber hinaus sind sie auch für die Instandhaltung der Blut-Retina-Schranke mitverantwortlich (Goldman 2014; Reichenbach und Bringmann 2020). Müllerzellen spielen auch eine entscheidende Rolle im visuellen Zyklus von Zapfenrezeptoren (siehe Abschnitt 1.3.1). Astrozyten sind auf die innersten Schichten der Retina beschränkt und tragen ebenso zu einer Vielzahl homöostatischer Funktionen und der Aufrechterhaltung der Blut-Retina-Schranke bei (Vecino et al. 2016). Zellen der Mikroglia hingegen sind bevorzugt in der GCL, den plexiformen Schichten und perivaskulär zu finden. Sie übernehmen eine Phagozytose- und immunmodulatorische Funktion (Reichenbach und Bringmann 2020).

1.3 Visueller Zyklus

Der visuelle Zyklus wird auch Retinolzyklus bezeichnet und dient der Wiederherstellung der Lichtempfindlichkeit der chromophoren Gruppe 11-cis-Retinal von Rhodopsin in Stäbchen und derjenigen der drei unterschiedlichen Opsine in Zapfen. Rhodopsin ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor mit sieben Transmembranhelices und besteht aus einem Apo-Protein, dem Opsin und dem lichtempfindlichen Chromophor 11-cis-Retinal (Lamb und Pugh 2006). Zapfenrezeptoren sind zusätzlich Teil eines intraretinalen visuellen Zyklus (siehe Abschnitt 1.3.1) (Tang et al. 2013). Die Wiederverwertung des 11-cis-Retinals ist deshalb so wichtig, weil über den Blutstrom nur eine geringe Aufnahme von Vitamin A in Form von all-trans-Retinol erfolgt (Strauss 2005).

Der klassische visuelle Zyklus findet in den Außensegmenten der Photorezeptoren und dem RPE statt. Die Absorption von Licht führt zur Isomerisierung des 11-cis-Retinals in eine all-trans-Form. Rhodopsin wird dadurch aktiviert und kann die Phototransduktionskaskade starten (siehe Abschnitt 1.3.3). Nach dessen Inaktivierung wird all-trans-Retinal vom Opsin getrennt und zunächst zu all-trans-Retinol reduziert. Dies erfolgt durch eine kombinierte Wirkung der Retinoldehydrogenasen (RDH) RDH8 und RDH12 (Chen et al. 2012). Im nächsten Schritt wird all-trans-Retinol von den Photorezeptoren in die Interphotorezeptormatrix abgegeben, wo es von dem Interphotorezeptorretinoid bindenden Protein (IRBP) gebunden und zum RPE transportiert wird. Das IRBP hat sowohl Bindungsstellen für all-trans- als auch 11-cis-Retinal und ist somit auch für den Rücktransport verantwortlich (Travis et al. 2007). Im RPE wird es von dem zellulären Retinolbindepotein-1 (CRBP1) entgegengenommen und zum endoplasmatischen Retikulum geführt (Kiser und Palczewski 2016), wo es durch die Lecithin-Retinol-Acyl-Transferase (LRAT) verestert wird (Batten et al. 2004). Der entstandene all-trans-Retinylester ist das Substrat für die Isomerohydrolase RPE65. RPE65 wandelt nun diesen all-trans-Retinylester in 11-cis-Retinol um (Moiseyev et al. 2005).

In einem letzten Schritt wird 11-cis-Retinol hauptsächlich mithilfe der RDH5, ergänzend auch durch die RDH10 und RDH11, in 11-cis-Retinal oxidiert (Parker und Crouch 2010) und dann gebunden an CRALBP (entspricht RLBP1, zelluläres Retinaldehyd bindende Protein) zur apikalen Seite des RPE transportiert. Der Zyklus schließt ab mit dem Transport des wieder lichtempfindlichen Chromophors 11-cis-Retinal zurück zu den Photorezeptoren (Daruwalla et al. 2018).

1.3.1 Zapfenspezifischer Retinolzyklus

Jüngere Studien deuten auf einen zweiten intraretinalen visuellen Zyklus, der ausschließlich für die Wiederherstellung von 11-cis-Retinal in Zapfenrezeptoren verantwortlich ist (Tang et al. 2013). Nach der lichtinduzierten Isomerisierung von 11-cis-Retinal in all-trans-Retinal wird in den Zapfenaußensegmenten ebenso wie im klassischen visuellen Zyklus all-trans-Retinal mithilfe der RDH8 in all-trans-Retinol reduziert. Dieses wird daraufhin mithilfe des IRBP durch die Interphotorezeptormatrix (IPM) transportiert, jedoch nicht zum RPE sondern zu den Müllerzellen (Kaylor et al. 2014). In den Müllerzellen wird all-trans-Retinol direkt in 11-cis-Retinol isomerisiert. Es wird angenommen, dass die Dihydroceramide Desaturase-1 (DES1) diese Aufgabe übernimmt (Tsin et al. 2018). 11-cis-Retinol kann nun entweder an CRALBP gebunden aus der Müllerzelle in die IPM abgegeben werden oder es wird mithilfe der multifunktionalen O-Acyltransferase (MFAT) zu 11-cis-Retinylolester verestert. Der Retinylolester kann bei Bedarf hydrolysiert werden und steht dann als 11-cis-Retinol dem visuellen Zyklus wieder zur Verfügung (Kaylor et al. 2014). An IRBP gebunden wird 11-cis-Retinol zurück zu den Zapfenrezeptoren gebracht. Diese sind in der Lage den letzten Oxidationsschritt mithilfe einer noch unbekannteren RDH durchzuführen. 11-cis-Retinal steht nun als lichtempfindliches Chromophor wieder zur Verfügung und schließt den zapfenspezifischen visuellen Zyklus (Wang und Kefalov 2011).

1.3.2 Eigenschaften und Vorkommen von RPE65

RPE65 ist ein im RPE reichlich vorhandenes Protein, welches zuerst von der Arbeitsgruppe um Dr. T.M. Redmond identifiziert und kloniert wurde (Tang et al. 2013). Aufgrund seines Molekulargewichts von 65 kDa in der SDS-Page und seines Auftretens im RPE wurde dieses Protein als RPE65 benannt (Hamel et al. 1993). Beim Menschen liegt das Gen für RPE65 auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (1p31). Schon bei dessen Entdeckung wurde der Verdacht geäußert, dass RPE65 bei hereditären Netzhauterkrankungen eine entscheidende Rolle spielen könnte (Hamel et al. 1994). Die spezifische Aufgabe, die RPE65 im visuellen Zyklus übernimmt, wurde entdeckt, nachdem die Retinae von RPE65^{-/-}-Mäusen beobachtet wurden. Ein Mangel an RPE65 führte zum Abbruch des visuellen Zyklus und damit zu einem Mangel an 11-cis-Retinal und einer Anhäufung von all-trans-Retinylolester im RPE. Darüber hinaus zeigten sich auch keine oder verminderte Antworten im Stäbchen-ERG (Redmond et al. 1998). Im Jahr 2005 kamen drei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander zum Schluss, dass RPE65 die Isomerohydrolase ist, die im Verbund mit anderen Retinyl-bindenden Proteinen und Dehydrogenasen für die Umwandlung von all-trans-Retinylolester in 11-cis-

Retinol im RPE verantwortlich ist (Jin et al. 2005; Moiseyev et al. 2005; Redmond et al. 2005).

RPE65 gehört zur Proteinfamilie der carotinoidspaltenden Oxigenasen, die typischerweise ihr Carotinoid-Substrat oxidieren, um dadurch Apocarotinoid-Produkte zu erhalten. Fast alle Mitglieder dieser Familie besitzen eine Gruppe von vier Histidinresten und drei Glutamatresten, die für die Bindung eines Eisenkofaktors verantwortlich sind, welcher für die katalytische Funktion unentbehrlich ist. Sequenzen, die zur RPE65-Gruppe gehören, weisen eine hohe Konservierung auf und haben eine charakteristische Länge von 533 ± 2 Aminosäureresten (Kiser und Palczewski 2016).

Bei einigen Säugetierarten wurde RPE65 zusätzlich zum RPE auch in den Außensegmenten der Zapfen nachgewiesen, vor allem in den basalen Regionen. Dies ist auch beim Menschen der Fall. Jedoch ist die Funktion von RPE65 in den Zapfenaußensegmenten noch nicht eindeutig geklärt. Es konnte ausgeschlossen werden, dass RPE65 die Rolle einer Isomerohydrolase wie im RPE übernimmt. Es wird vermutet, dass es eine Funktion als Retinol-bindendes Protein ausführen könnte, welches 11-cis-Retinol nach seinem Transport von den Müllerzellen zurück zu den Außensegmenten, durch diese befördert. Eine andere mögliche Funktion könnte die Bindung von 11-cis-Retinylestern sein, um deren Hydrolyse zu erleichtern, oder etwa die Förderung der Oxidation von 11-cis-Retinol durch das Anregen einer Interaktion mit einer noch unbekanntem zapfenspezifischen Retinoldehydrogenase (Kolesnikov et al. 2018).

1.3.3 Phototransduktion

Bei dem Prozess der Phototransduktion wird Licht in ein elektrisches Signal umgewandelt. Dies findet in den Außensegmenten der Photorezeptoren statt. Die Absorption von Licht führt zur Isomerisierung von Rhodopsin in einen aktivierten Zustand, der Metarhodopsin II bezeichnet wird. Metarhodopsin II aktiviert das G-Protein Transducin, welches wiederum eine Phosphodiesterase (PDE) aktiviert. Die PDE hydrolysiert cGMP in GMP und erniedrigt damit die intrazelluläre cGMP Konzentration. Kationenkanäle an der Außenmembran der Photorezeptoren werden durch eine erhöhte intrazelluläre cGMP Konzentration offengehalten, sodass Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen entlang des elektrochemischen Gradienten in die Zellen einströmen können. Dieser kontinuierliche Einstrom, der die Plasmamembran depolarisiert, erfolgt in Dunkelheit und wird deshalb auch als Dunkelstrom bezeichnet. Er ist für die kontinuierliche Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat verantwortlich (Wang und Kefalov 2011). Die Absorption von Licht und die sich daraus ergebende verminderte cGMP-

Konzentration führen folglich zur Schließung der Kationenkanäle und zur Unterbrechung des Dunkelstroms. Die Plasmamembran der Photorezeptoren wird somit hyperpolarisiert und infolgedessen reduziert sich die Ausschüttung von Glutamat. Dies ermöglicht nun eine Signalweiterleitung auf die postsynaptischen Neurone (Lamb und Pugh 2006). Dieser Prozess ist hier vereinfacht beschrieben worden; die einzelnen Schritte und biochemischen Regelkreise sind im Gegensatz zu dieser Darstellung viel komplexer.

1.4 Erkrankungen aufgrund von Mutationen im RPE65-Gen

1.4.1 Lebersche kongenitale Amaurose und Frühkindliche Netzhautdegeneration beim Menschen

Hereditäre Netzhautdystrophien bilden eine heterogene Gruppe genetischer Erkrankungen, die eine Degeneration der Retina gemeinsam haben.

Die Lebersche kongenitale Amaurose LCA (Leber congenital amaurosis) ist eine Stäbchen-Zapfen-Dystrophie, die auf einer Dysfunktion und Degeneration der Photorezeptoren und des RPE beruht und insgesamt etwa 5 % aller hereditären Netzhautdystrophien ausmacht (Kumaran et al. 2018a; Cideciyan et al. 2013). Sie wurde erstmals vom deutschen Ophthalmologen Theodor Leber im Jahre 1869 beschrieben, der in den darauffolgenden Jahren auch eine mildere Form dieser Erkrankung die sogenannte frühkindlichen Netzhautdegeneration, EOSRD (Early-Onset Severe Retinal Dystrophy), davon differenzierte (Kumaran et al. 2017). In den vergangenen 20 Jahren wurden 25 Gene identifiziert, die eine LCA/EOSRD verursachen können und 70-80 % der Erkrankungen ausmachen (Kumaran et al. 2020b). Die LCA zeigt einen autosomal rezessiven Erbgang, wobei auch ein paar Familien mit autosomal dominantem Erbgang beschrieben wurden (Lorenz et al. 2000). Charakteristisch für die LCA ist eine hochgradige Visusminderung bei Geburt oder im Laufe der ersten Lebensmonate. Weitere klinische Symptome sind wandernde Augenbewegungen oder Nystagmus (Augenzittern), ein fehlender oder abgeschwächter Pupillenreflex, Lichtscheue und das okulodigitale Phänomen, bei dem die Betroffenen ihre Augen reiben und eindrücken (Kumaran et al. 2018b; Salmon und Kanski 2020). Der Fundus (Augenhintergrund) kann zunächst unauffällig erscheinen oder eine Vielzahl pathologischer Veränderungen aufweisen. Ein weiteres bedeutendes Merkmal ist das Fehlen der Fundusautofluoreszenz. Diese entsteht normalerweise durch die Anhäufung von Lipofuszin und dessen Fluorophoren. Lipofuszin wird bei der Phagozytose der abgestoßenen Disks der Photorezeptoren, die auch Überreste von all-trans-Retinyl-Molekülen enthalten, im RPE gebildet. Wird dieser Prozess unterbrochen, kann sich

folglich kein Lipofuszin ansammeln (Lorenz et al. 2004; Cideciyan 2010). Darüber hinaus ist das Elektretinogramm (ERG), welches elektrische Potentiale der Retina ableitet, bei Betroffenen typischerweise reduziert oder liegt unter der Nachweisgrenze (Jacobson et al. 2009). Die optische Kohärenztomographie (OCT) bietet ein weiteres Verfahren an, um krankheitsspezifische Veränderungen zu diagnostizieren. Mittels der Aufnahmen können Änderungen einzelner Schichtdicken in der Retina beurteilt werden (siehe Abschnitt 1.6). Die Schichtdickenveränderungen unterliegen interindividuellen Schwankungen. Anhand einer Untersuchung von neun RPE65-LCA-Patienten im Alter von 6-17 Jahren wurde festgestellt, dass die ONL-Schichtdicke in Bereichen inferior der Fovea stärker abnimmt als superior davon. Diese Erkenntnisse wurden im Jahr 2008 von der Arbeitsgruppe um Dr. Samuel G. Jacobson gewonnen. Innerhalb des ersten Lebensjahrzehnts kommt es bei Patienten mit LCA in der Regel zu einem deutlichen Verlust der Photorezeptoren in der Retina, was sich dann als verdünnte ONL darstellt. Jedoch können Regionen ausgemacht werden, die im Vergleich zur restlichen Retina eine besser erhaltene Zahl an Photorezeptoren besitzen. Dies ist vor allem im fovealen und parafovealen Bereich der Fall. Da die LCA zunächst eine Degeneration der Stäbchen bedingt, kommt es vor allem in der Peripherie zu einem Verlust der Photorezeptoren (Jacobson et al. 2008).

Im Gegensatz zur LCA beginnt die EOSRD in der Zeit vom Säuglingsalter bis vor dem 5. Lebensjahr. Oft ist eine bessere Restsehkraft vorhanden und je nach Schwere dieser Erkrankung variable Antworten im ERG nachweisbar (Kumaran et al. 2017). In den ersten drei Lebensjahrzehnten tritt zusätzlich eine zunehmende Gesichtsfeldeinschränkung aufgrund der Degeneration der Retina auf (Kumaran et al. 2018b).

Ein RPE65-Mangel kann beide Krankheitsformen verursachen und ist für etwa 5-10 % aller LCA2/EOSRD-Fälle verantwortlich (Kumaran et al. 2020a). Da Zapfen einen eigenen RPE65 unabhängigen visuellen Zyklus aufweisen, kann das Sehen bei Tageslicht zu Beginn der Erkrankung noch eingeschränkt vorhanden sein, während das stäbchenbasierte Sehen bei Dämmerung und in der Nacht wegfällt. Im weiteren Verlauf führt die Erkrankung zur Erblindung der Betroffenen.

1.4.2 RPE65-Mutation und kongenitale stationäre Nachtblindheit beim Hund

Die zunächst als kongenitale stationäre Nachtblindheit diagnostizierte retinale Dystrophie (retinale Pigmentepitheldystrophie, RPED: retinal pigment epithelial

dystrophy) schwedischer Hunde der Rasse Briard zeigte Ähnlichkeiten mit der gleichen Erkrankung beim Menschen (Narfström et al. 1989). Es wurde festgestellt, dass sie autosomal rezessive vererbt wird (Veske et al. 1999). Die Hunde hatten eine ausgeprägte Visusminderung, die im Alter von fünf bis sechs Wochen diagnostiziert werden konnte. Der Fundus, zunächst unauffällig, zeigte nach drei bis vier Jahren erste pathologische Änderungen. Das ERG war unter der Nachweisgrenze, lediglich die Zapfenantwort, die eine reduzierte Amplitude aufwies, konnte noch aufgezeichnet werden. Überraschenderweise zeigten die Photorezeptoren zu Beginn keine dem Ausmaß der Erkrankung entsprechenden morphologischen Veränderungen (Aguirre et al. 1998). Jedoch zeigten sich im Laufe der Erkrankung deformierte und unregelmäßig gestaltete Stäbchenaußensegmente, die nach Jahren verkümmerten. Die Zapfenmorphologie blieb über einen längeren Zeitraum erhalten. Die RPE-Zellen zeigten sich teils hypertrophiert und wiesen vor allem in der tapetalen Retina vermehrt Lipideinschlüsse auf (Wrigstad et al. 1992; Wrigstad et al. 1994). Die anfänglichen Studien erfolgten nur mit jüngeren Tieren, weshalb man zunächst von einer stationären Erkrankung ausging (Narfström et al. 1989; Wrigstad et al. 1994). Erst mit der Untersuchung älterer Hunde konnten die klinischen Symptome vollständig beschrieben werden. Schließlich wurde diese Erkrankung als langsam fortschreitende Dystrophie erkannt (Narfström 1999).

Ursächlich für diese Erkrankung ist eine homozygote Deletion von vier Basenpaaren (485delAAGA) in Exon 5 des caninen RPE65-Gens. Die Deletion führt zu einem Frameshift (Leserahmenverschiebung) und daraus resultierenden vorzeitigen Stopcodon. Folglich ist das mutierte Protein nicht funktionsfähig (Veske et al. 1999). Diese Mutation wurde nicht nur bei schwedischen Briard Hunden festgestellt, sondern kommt auch bei Artgenossen in Frankreich, den USA und Großbritannien vor (Narfström et al. 1989).

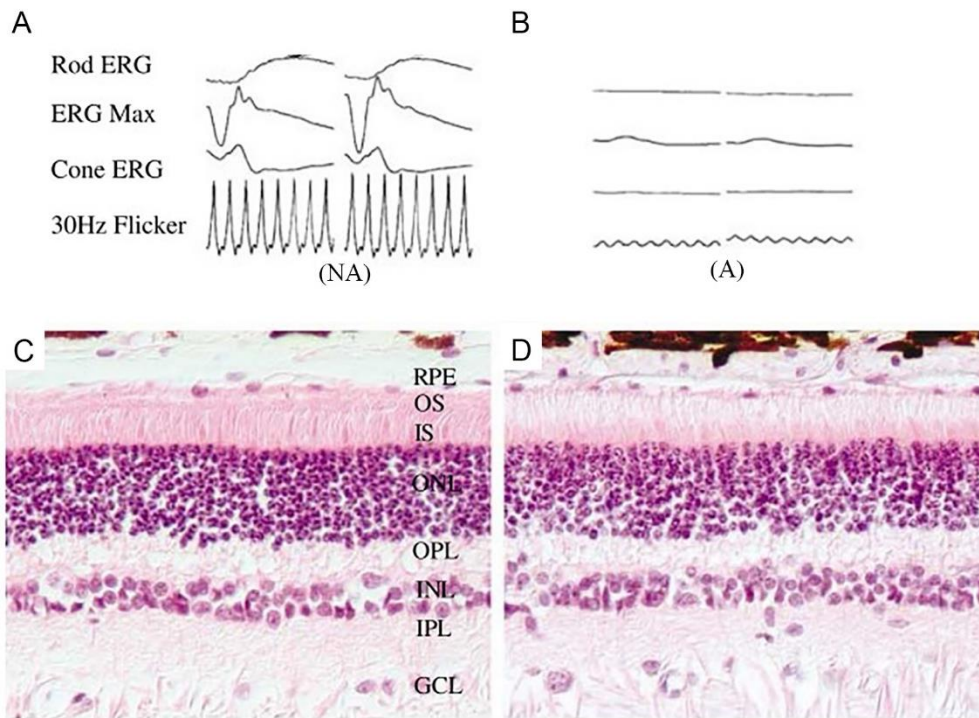


Abbildung 6: Bilaterale ERG-Messungen und HE-Schnittpräparate eines gesunden und eines RPE65^{-/-}-Briard Hundes

A ERG-Aufnahmen eines gesunden Briard Hundes. **B** Im Vergleich zu A sieht man in B das ERG eines RPE65^{-/-}-Briard Hundes, welches unter der Nachweisgrenze liegt. **C** HE-Schnitt der Retina eines gesunden Briard Hundes. **D** HE-Schnitt der Retina eines RPE65^{-/-}-Briard Hundes. Die Schicht der Photorezeptoren und vor allem der ONL zeigen sich bei jungen Tieren noch nicht verdünnt. Die äußeren Segmente der Photorezeptoren zeigen sich jedoch blasser und deformiert. (NA: Non-affected, gesunder Wildtyp; A: Affected, Briard mit RPE65-Mutation; Rod: Stäbchen; Cone: Zapfen; RPE: retinales Pigmentepithel; OS: Außensegment; IS: Innensegment; ONL: äußere nukleäre Schicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; INL: innere nukleäre Schicht; IPL: innere plexiforme Schicht; GCL: Ganglienzellschicht). Modifiziert nach (Le Meur et al. 2007).

In einer Studie von Mowat und Kollegen wurde die Fehllokalisierung der Zapfenopsine bei jungen und älteren Hunden beobachtet. Zudem wurde gezeigt, dass ein RPE65-Mangel zu einem schnellen S-Zapfenverlust führt, während Stäbchen und L/M-Zapfen langsamer degenerieren (Mowat et al. 2013; Klein et al. 2014). Weitere Erkenntnisse ergab die im Jahr 2020 veröffentlichte Studie von Gardiner und Kollegen, in welcher die ONL-Schichtdicke von RPE65^{-/-}-Hunden in unterschiedlichen Altersstufen beurteilt wurde. Die ONL-Schichtdicke spiegelt die Funktionsfähigkeit und Integrität der Photorezeptoren wider. Wie in bisherigen Studien (Cideciyan et al. 2013; Le Meur et al. 2007) schon dargestellt, konnte bestätigt werden, dass RPE65^{-/-}-Hunde im Alter von einem Jahr eine ONL-Schichtdicke aufweisen, die von der eines Wildtyps nicht zu unterscheiden ist. Ebenso bestätigte sich, dass bei älteren Hunden, in diesem Fall neun Jahre alt, die gesamte Retina von der Degeneration schwer gezeichnet ist. Dennoch besaßen einige Augen entlang des *visual streak* noch ein paar erhaltene Photorezeptoren. Neue Erkenntnisse konnten bei Hunden im Alter von fünf bis sechs

Jahren gewonnen werden. Es zeigte sich, dass die Verteilung der ONL-Schichtdicke großen interindividuellen Schwankungen unterliegt und schwer zu kalkulieren war. Sie reichte von gut erhalten bis zu stark degeneriert. Dabei zeigten sich typischerweise die Innensegmente verkürzt und die Außensegmente unregelmäßig. Zusätzlich fielen bemerkenswerte intraretinale Unterschiede in Bezug auf die Schwere der Degeneration auf. Dabei wurde für die inferiore Retina eine früher einsetzende und schneller verlaufende Degeneration festgestellt (Gardiner et al. 2020).

1.5 Gentherapie

Gentherapeutische Behandlungen bauen entweder auf eine spezifische oder unspezifische Gentherapie auf, wobei erstere weiter in *gene addition* (Gen-Additionstherapie), *gene silencing* (Gen-Stillegung) und *genome editing* (Genom-Editierung) unterteilt werden kann.

Voraussetzung für eine spezifische Gentherapie ist, dass das mutierte Gen bekannt sein muss. Die Behandlung hereditärer Netzhautdystrophien, die autosomal rezessiv vererbt werden, wie der LCA, beruht auf der *gene addition therapy*. Da das mutierte Gen vor Therapie für ein funktionsloses Genprodukt kodiert, kann durch Zuführen einer intakten Kopie des Gens mittels geeigneter Vektoren die Produktion dessen wieder aufgenommen werden. Das funktionslose Genprodukt darf dabei keine zusätzlichen toxischen Effekte auf die Zelle ausüben. Die Technik des *gene silencing* beruht auf das Unterdrücken mutierter Gene, deren kodierte Proteine eine zellschädigende Restaktivität besitzen. Anschließend wird ein funktionelles Gen eingebracht. Dies ist oft bei autosomal dominant vererbten Erkrankungen der Fall (Stieger et al. 2011, S. 193–201; Stieger und Lorenz 2008). *Genome editing* beruht auf einem Verfahren, bei dem in der DNA mithilfe von sogenannten Genschere wie CRISPR-Cas Doppelstrangbrüche indiziert werden. Dabei kann das Genom durch das Entfernen oder Einfügen von einzelnen Basenpaaren oder Sequenzen modifiziert werden (Yanik et al. 2017).

Ist das für die Erkrankung verantwortliche Gen unbekannt, kann die unspezifische Gentherapie nützlich sein. Mithilfe neuroprotektiver Faktoren, wie z. B. *fibroblast growth factor* und *glial cell line derived growth factor*, kann der Krankheitsprogress eventuell verlangsamt werden (Stieger und Lorenz 2008).

1.5.1 Gentherapievektoren

Grundsätzlich stehen zum Transport der funktionellen Genkopie virale und nicht-virale Vektoren zur Verfügung. Virale Vektoren können Adenoviren, Lentiviren oder adenoassoziierte Viren sein. Letztere haben sich in den vergangenen Jahren als Goldstandard in der retinalen Gentherapie etabliert. Nicht-virale Vektoren wie Nanopartikel weisen bestimmte Einschränkungen auf und haben momentan noch keine Relevanz auf diesem Gebiet (Stieger und Lorenz 2020).

Adenoassoziierte Viren (AAV) gehören zur Familie der Parvoviren. Sie sind klein, unbehüllt und bestehen aus einzelsträngiger DNA. Ihr Genom hat eine Größe von 4700 Basenpaaren und wird von zwei sogenannten *inverted terminal repeats* (ITR) flankiert. Zur Herstellung eines rekombinanten Vektors wird die gesamte kodierende Sequenz, die für vier Rep-Proteine und drei Cap-Proteine kodiert, entfernt und durch die benötigte Expressionskassette ersetzt. Die üblicherweise verwendeten rekombinanten AAV-Vektoren (rAAV) sind vom Serotyp 2, da diese in der Lage sind eine effiziente und langanhaltende Expression von Proteinen in einer Vielzahl von Geweben zu ermöglichen. Sie können je nach Zielzelle in ein Kapsid eines anderen Serotyps integriert werden. Somit wird rAAV2 im Kapsid des Serotyps 4 als rAAV2/4 bezeichnet und transduziert ausschließlich das RPE. Diese Zusammensetzung wird *cross-packaging* genannt und ermöglicht anhand der verschiedenen Tropismen der Serotypen unterschiedliche Zielzellen zu erreichen (Rolling 2004; Rabinowitz et al. 2002).

Die subretinale Injektion des Vektors stellt aktuell die effizienteste Applikationsmethode dar, weil dieser direkt an die zu transduzierenden Zellen gelangt. Jedoch kommt es bei dieser Methode durch die Injektion zwischen RPE und Photorezeptoren zu einer Ablösung der Neuroretina vom RPE, die sich innerhalb von 24 bis 48 Stunden nach Injektion wieder anlagert. Die Mikrovilli, die vom RPE ausgehen und für die Interaktion mit den Photorezeptoren verantwortlich sind, benötigen jedoch Monate zur Wiederherstellung dieser funktionellen Einheit. Ein weiterer Nachteil ist, dass nur die im Injektionsbereich liegenden Zellen die Möglichkeit haben den Vektor aufzunehmen und der erwünschte Effekt nicht die gesamte Retina betrifft. Trotzdem zeigt sich die subretinale Injektion erfolgreicher als die intravitreale oder suprachoroidale Applikation (Stieger und Lorenz 2020; Stieger und Lorenz 2008).

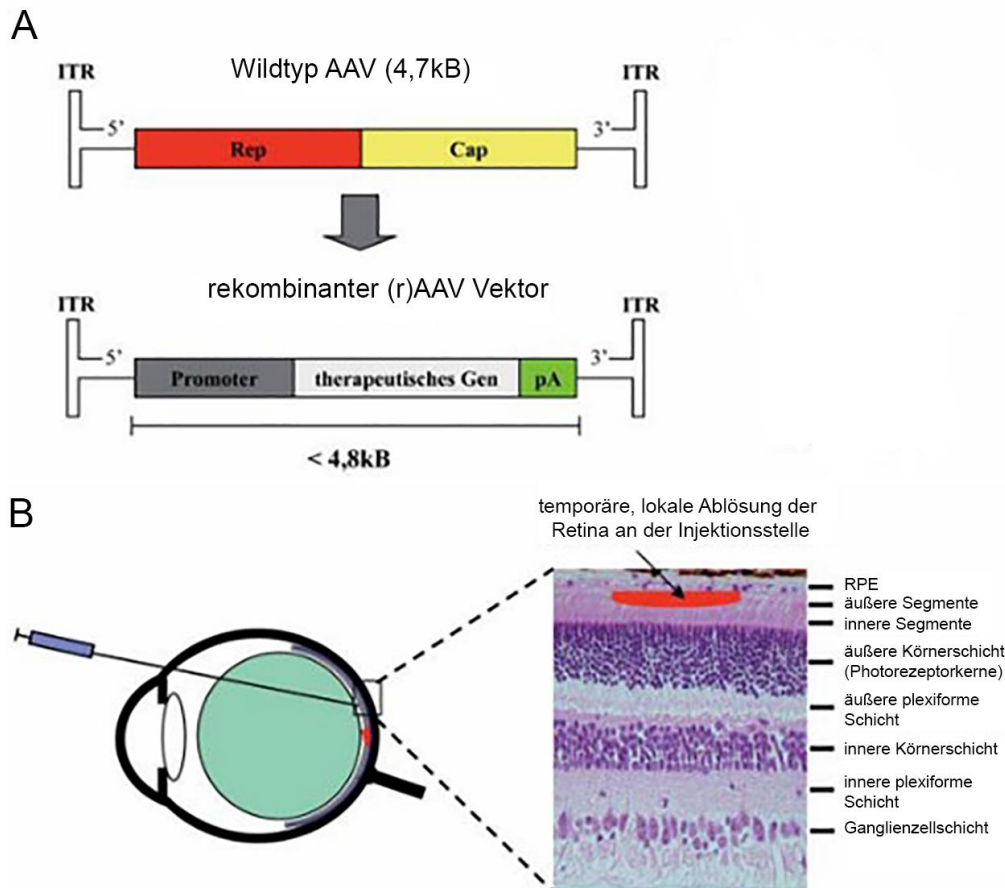


Abbildung 7: Zusammensetzung eines rAAV-Vektors und subretinale Injektion des Vektors
A Die kodierende Sequenz des Genoms der AAV-Viren wird durch eine Expressionskassette, bestehend aus einem Promotor, dem therapeutischen Gen und einer Polyadenylierungssequenz ersetzt. **B** Die subretinale Applikation des Vektors zwischen dem RPE und den Photorezeptoren führt zu einer lokalen Ablösung. Modifiziert nach (Stieger und Lorenz 2008).

1.5.2 Gentherapie beim RPE65^{-/-}-Hundemodell

Ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur klinischen Studie am Menschen war die erfolgreiche *gene addition therapy* von RPE65^{-/-}-Hunden. Der Briard eignet sich besonders gut als Tiermodell, da es eine Hunderasse mit natürlich vorkommender RPE65-Mutation ist. Darüber hinaus ähnelt das Hundeauge von der Größe her dem menschlichen, die Netzhaut ist stäbchendominiert, besitzt eine foveaähnliche Struktur und das klinische Bild ähnelt der LCA/EOSRD des Menschen (Slijkerman et al. 2015). Acland und Kollegen stellten 2001 erstmals eine Studie vor, in welcher drei Briard Hunde mit RPE65-Mangel unilateral mit einem rekombinanten AAV2-Vektor, der eine gesunde Kopie des caninen RPE65-Gens enthielt, behandelt wurden. Die Applikation erfolgte subretinal oder intravitreal im Alter von vier Monaten. Die immunhistochemische Untersuchung zeigte eine erfolgreiche Aufnahme des RPE65-Gens und Expression des Proteins in zuvor RPE65^{-/-}-Zellen. Auch im ERG zeigten sich im Gegensatz zum kontralateralen nicht behandelten Auge niedrige dennoch messbare Amplituden. Die Ausnahme bildeten die intravitreal injizierten Augen, bei denen es zu keiner

Verbesserung der ERG-Antworten kam. Vier Monate nach Injektion durchliefen die Hunde einen Hindernisparcours, bei dem abwechselnd das behandelte und nicht behandelte Auge abgeklebt wurde. Sowohl bei hellem Licht als auch unter schwachen Lichtverhältnissen konnten die Tiere mit dem behandelten Auge Objekten gezielt ausweichen. War das behandelte Auge jedoch abgeklebt scheiterten sie an dieser Aufgabe (Acland et al. 2001). Diese Erkenntnisse konnten durch darauffolgende Studien von weiteren Arbeitsgruppen bestätigt werden (Narfström et al. 2003b; Ford et al. 2003; Acland et al. 2005). Dabei wurde zusätzlich festgestellt, dass die verbesserten ERG-Antworten nach Gentherapie langfristig nachweisbar waren.

In einer weiteren Untersuchung wurde gezeigt, dass Injektionen im Bereich der superioren Retina eine größere ERG-Antwort als Injektionen in inferioren Bereichen hervorrufen. Zusätzlich war im frühen Stadium der Erkrankung keine Verdünnung der nukleären Schichtdicken im Vergleich zu gesunden Retinae messbar (Acland et al. 2005).

In einer Studie von Le Meur und Kollegen wurden sechs Briards mit einem rAAV2/4-Vektor, zwei mit einem rAAV2/2-Vektor unilateral therapiert. Beide Vektoren trugen einen RPE65-Promotor, eine Kopie des humanen RPE65-Gens und wurden subretinal injiziert. Bis auf den ältesten Hund, der die Therapie im Alter von 30 Monaten erhielt, zeigten alle eine deutliche Verbesserung ihrer ERG-Antworten und konnten einen Hindernisparcours erfolgreich durchlaufen. Dabei zeigte die Therapie mit dem rAAV2/4-Vektor einen noch effizienteren Erhalt der Funktion der Photorezeptoren als mit rAAV2/2. Zusätzlich erfolgte mithilfe des rAAV2/4-Vektors die eindeutige und auf das RPE begrenzte immunhistochemische Markierung von RPE65 im behandelten Bereich. Diese Untersuchung warf die Frage auf, ob es ein therapeutisches Fenster für die Behandlung des Funktionserhalts der Photorezeptoren und des RPEs und der Verlangsamung der degenerativen Komponente dieser Erkrankung gibt (Le Meur et al. 2007).

Ein weiterer wichtiger Aspekt wurde von Annear und Kollegen untersucht. In ihrer Studie wurde in einem Zeitraum von 85-180 Tagen nach gentherapeutischer Behandlung des ersten Auges der gleiche Vektor auch in das zweite Auge injiziert. Daraufhin wurden neutralisierende Antikörper gegen Proteine des viralen Capsids im Serum aller behandelten Tiere gefunden, was jedoch keinen negativen Einfluss auf die Wirksamkeit der Therapie des zweiten Auges zeigte. Es gab keinen Hinweis für eine Immunreaktion gegen das transgene Protein (Annear et al. 2011).

Gardiner und Kollegen fanden in einer aktuellen Studie heraus, dass auch Bereiche der Retina im behandelten Auge, die nicht in Berührung mit der Injektionsflüssigkeit kamen, eine bessere Erhaltung der Photorezeptoren und damit auch der ONL-Schichtdicke zeigten als korrespondierende Stellen in den kontralateralen nicht behandelten Augen

und dies, obwohl keine RPE65-Expression in diesen Bereichen erfolgte. In ihrer Studie, in der sie Hunde unterschiedlicher Altersstufen über mehrere Jahre beobachteten, stellten sie zudem fest, dass mindestens ein Anteil von 63 % der normalen Anzahl an Photorezeptoren eines Wildtyps in den RPE65^{-/-}-Retinae vorhanden sein muss, um mithilfe einer gentherapeutischen Behandlung nicht nur die Funktion dieser zu erhalten, sondern auch die Degeneration der Retina über einen längeren Zeitraum aufzuhalten (Gardiner et al. 2020).

1.5.3 Klinische Studien der Gentherapie beim Menschen mit RPE65-Mutationen

Nach den erfolgreichen und vielversprechenden Gentherapien am RPE65^{-/-}-Hundemodell folgten 2007 die ersten klinischen Phase I Studien am Menschen. Dabei ging es zunächst darum, die Verträglichkeit und Sicherheit des injizierten Vektors und potenzielle Nebenwirkungen festzustellen. Dies erfolgte parallel in drei unabhängigen Studien (NCT00516477 (Maguire et al. 2008), NCT00643747 (Bainbridge et al. 2008), NCT00481546 (Hauswirth et al. 2008)). In diesen erhielten jeweils drei Probanden eine einmalige unilaterale Injektion eines rAAV2-Vektors mit einer Kopie des humanen RPE65-Gens. Die Untersuchungen unterschieden sich im verwendeten Vektor und dem injizierten Volumen. Die Applikation erfolgte subretinal in das Auge mit der schlechteren Sehschärfe. Es traten keine schweren Nebenwirkungen auf, lediglich zwei Patienten entwickelten ein asymptomatisches Makulaforamen, einen runden Netzhautdefekt in der Makula. Dies entstand nicht in Zusammenhang mit dem Vektor, sondern vermutlich aufgrund des chirurgischen Eingriffs. Trotz der subjektiven Besserung der Sehschärfe vor allem auch unter schwachen Lichtverhältnissen, konnten mit Ausnahme von drei Patienten keine signifikanten Änderungen festgestellt werden. Im Gegensatz zu den deutlichen Verbesserungen der ERG-Antwort im Tiermodell, waren in diesen Untersuchungen keine Veränderungen nachweisbar. Jedoch stellte sich eine Reduzierung des Nystagmus und ein verbesserter Pupillenreflex ein.

Im weiteren Verlauf wurde die Teilnehmerzahl zum Teil erweitert und die bisher gewonnenen Erkenntnisse konnten bestätigt werden. Weitere klinische Studien der Phase I und II folgten, unter anderem am Nantes University Hospital (NCT01496040). Zur Gentherapie bei RPE65-Mutation sind aktuell neun aktive und zehn abgeschlossene Studien auf der Webseite des National Institutes of Health (clinicaltrials.gov) gelistet (Stand 06.2022).

Im November 2012 startete die erste randomisierte kontrollierte Phase III Studie (NCT00999609), die gemeinsam vom Children's Hospital of Philadelphia, der University of Iowa und Spark Therapeutics durchgeführt wurde. Voraussetzung zur Teilnahme war, dass die Probanden eine RPE65-Mutation auf beiden Allelen aufwiesen, älter waren als drei Jahre und einen Visus von 20/60 oder schlechter hatten. Von den insgesamt 29 Probanden waren 20 in der Interventionsgruppe und erhielten eine subretinale Injektion mit dem AAV2-hRPE65v2-Vektor (voretigen neparvovec-rzyl). Das zweite Auge wurde 6-18 Tage nach dem ersten Eingriff auch behandelt. Der Erfolg der Therapie wurde an mehreren Tests gemessen. Dabei war das Laufen durch einen speziell für diese Studie entworfenen Hindernisparcours MLMT (*multi-luminance mobility test*) bei unterschiedlichen Lichtverhältnissen entscheidend. Die Untersuchungen erfolgten im Abstand von mehreren Monaten nach Behandlung mit der abschließenden Untersuchung ein Jahr nach Injektion. 13 der 20 behandelten Probanden gelang es nach Therapie diesen bei niedrigen Lichtverhältnissen zu meistern, was für einen deutlichen Erfolg der Therapie des stäbchenvermittelten skotopischen Sehens spricht. Der sogenannte *full-field light sensitivity threshold*, der die niedrigste noch wahrnehmbare Lichtempfindlichkeit über das gesamte Gesichtsfeld misst, zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Steigerung der Lichtempfindlichkeit. Zusätzlich kam es zu einer Zunahme der Gesichtsfeldweite. Die Verbesserung der sogenannten BCVA (*best corrected visual acuity*) wurde nicht ausführlich untersucht, da sich diese auf das zapfenbasierte Sehen der Fovea stützt, welche nicht einheitlich im injizierten Bereich lag. Es wurden auch in dieser Studie keine schweren Nebenwirkungen beobachtet (Russell et al. 2017).

Die nachgewiesenen klinischen Fortschritte führten im Dezember 2017 zur Genehmigung des Medikaments LUXTURNA™ (voretigene neparvovec-rzyl) von Spark Therapeutics durch die FDA (U.S. Food and Drug Administration) zur Behandlung von Netzhautdystrophien, die auf einer biallelischen Mutation des RPE65-Gens beruhen. Im November 2018 wurde es von der Europäischen Arzneimittelbehörde (EMA) zugelassen (Darrow 2019; Fischer et al. 2019).

Aktuelle Publikationen beschreiben eine perifoveale chorioretinale Atrophie als seltene Komplikation nach subretinaler Gabe von LUXTURNA. Die Atrophiezonen korrelieren dabei zum Teil mit der Einstichstelle, befinden sich bogenförmig an der äußeren Begrenzung der Injektionsblase oder gänzlich außerhalb des therapierten Bereiches. Inwieweit die operativen Maßnahmen mit kurzzeitiger Unterbrechung der Intaktheit der Netzhaut durch die Injektionsblase, die Geschwindigkeit und der Druck mit dem der Vektor subretinal injiziert wird, eine mögliche Toxizität oder Entzündungsreaktion nach

Vektorgabe ursächlich sind oder dies dem natürlichen Krankheitsverlauf entspricht muss noch weiter erforscht werden (Gange et al. 2022; Reichel et al. 2022).

1.6 Die optische Kohärenztomographie als bildgebendes

Verfahren

Die optische Kohärenztomographie (OCT) stellt ein nichtinvasives Verfahren zur Darstellung von In-vivo-Schnittbildern verschiedener Gewebe dar. Mit einer axialen Auflösung von 4-7 μm eignet es sich kleinste morphologische Veränderungen der einzelnen Netzhautschichten darzustellen (Hüttmann et al. 2009). Huang und Kollegen beschrieben im Jahr 1991 erstmals das Prinzip der *low-coherence interferometry* für die optische Kohärenztomographie (Huang et al. 1991). Seit der ersten kommerziellen Einführung der OCT im Jahr 1996 fanden bedeutende Entwicklungen auf diesem Gebiet statt (Beutelspacher, 2009). So stellten Heidelberg Engineering im Jahr 2006 ihr erstes Spectral-Domain-OCT (SD-OCT) Spectralis vor, ein Gerät der 4. Generation (Aumann et al. 2019).

Das Prinzip der optischen Kohärenztomographie basiert auf der sogenannte Michelson-Interferometrie. Im Folgenden wird nur schematisch auf die Funktionsweise der SD-OCT, auch Fourier-Domain-OCT genannt, eingegangen. Eine Lichtquelle, meist eine Superlumineszenzdiode, deren Wellenlänge im nahinfraroten Spektralbereich liegt, emittiert einen Lichtstrahl, der auf einen Strahlenteiler, einen halbdurchlässigen Spiegel, trifft. Dort wird der Lichtstrahl in einen Referenzstrahlengang und einen Analysestrahlengang geteilt. Der Lichtstrahl des Referenzarms wird an einem stationär fixierten Spiegel reflektiert. Somit ist die Laufzeitverzögerung des Referenzstrahls bekannt. Die Laufzeit des Analysestrahlengangs ändert sich jedoch je nach Gewebetiefe, von welcher der Lichtstrahl zurückgeworfen wird. Beide reflektierten Lichtstrahlen werden nun am Strahlenteiler zusammengeführt und überlagert als Interferenzsignal von einem Detektor erfasst. Die Besonderheit der SD-OCT liegt in dem Auftreffen der wieder überlagerten Strahlen auf ein Prisma oder Gitter, durch welches sie anhand ihrer Frequenzen sortiert und dann von einem Spektrometer erkannt werden. Mithilfe der sogenannte Fourier-Analyse der entstandenen Interferenz kann das Signal verarbeitet werden und nun Aufschluss über die Gewebetiefe geben. Durch die Messung eines Punktes der Netzhaut entsteht zunächst ein eindimensionaler Linienscan, ein sogenanntes Tiefenprofil, das als A-Scan bezeichnet wird. Die Aneinanderreihung mehrerer A-Scans lässt ein zweidimensionales Bild entstehen, auch B-Scan genannt, und mehrere hintereinanderliegende B-Scans wiederum bilden ein dreidimensionales Modell des untersuchten Gewebes, welches auch C-Scan genannt wird (Tiziani 2005;

Aumann et al. 2019; Kaschke et al. 2014). Die Aufnahmen werden entweder in Graustufen oder Falschfarben dargestellt, um die verschiedenen Netzhautschichten zu unterscheiden.

Es wurde in mehreren Studien belegt, dass die Schichtdickenmessung im OCT mit der aus der Histologie übereinstimmt (Huber et al. 2009; Anger et al. 2004). Die Zuordnung der retinalen Schichten im OCT mit der Histologie weist jedoch einige Besonderheiten auf.

So untersuchten Spaide und Curcio in ihrer Studie die hyperreflektiven Banden der äußeren Retina und stellten fest, dass die ISe aufgrund ihres Mitochondrienreichtums im OCT eine stark reflektierende Schicht darstellt (Spaide und Curcio 2011).

Während in der Histologie bestimmte Strukturen eindeutig abgrenzbar sind, können in OCT-Aufnahmen die Schichtgrenzen verschmelzen. Dies trifft zum Beispiel auf den Übergang zwischen den Spitzen der Photorezeptoraußensegmente und dem retinalen Pigmentepithel zu (Koinzer 2014).

Wie sich die Erkrankung der LCA in der OCT-Aufnahme darstellt, ist in Abbildung 8 gezeigt. Zusätzlich zu der Schichtdickenabnahme der ONL sind auch Änderungen der ISe charakteristisch für die Degeneration der Photorezeptoren. Die sonst gut zu differenzierende Schicht wird im Laufe der Erkrankung zunehmend dünner und ungenau abgrenzbar. Dies spiegelt den Funktionsverlust und die Degeneration der Photorezeptoren wider (Birch et al. 2013).

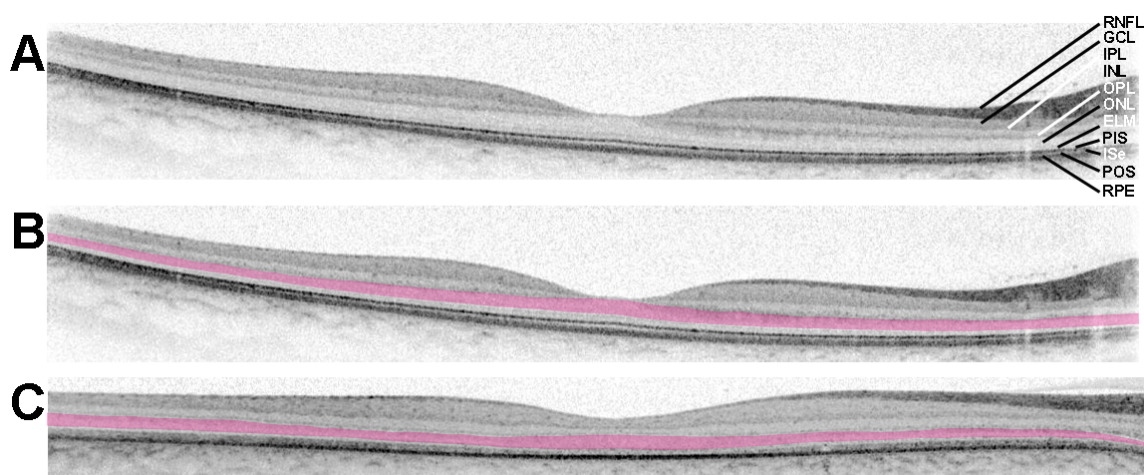


Abbildung 8: Darstellung der Retina mithilfe der optische Kohärenztomographie (OCT)
A OCT-Aufnahme mit Beschriftung der einzelnen Netzhautschichten. **B** OCT der Netzhaut eines augengesunden 8-Jährigen mit Visus 1,0. Die ONL ist violett hinterlegt. **C** Im Vergleich zu B erscheint die ONL+ (ONL+: ONL+ELM) eines 7-jährigen Patienten mit RPE65-Mutation deutlich dünner (Visus 0,2). (RNFL: retinale Nervenfaserschicht; GCL: Ganglienzellschicht; IPL: innere plexiforme Schicht; INL: innere nukleäre Schicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere nukleäre Schicht; ELM: äußere limitierende Membran; PIS: Photorezeptor- Innensegment; ISe:

Ellipsoid der Innensegmente; POS: Photorezeptor- Außensegment; RPE: retinales Pigmentepithel). Mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Markus Preisling.

1.7 Zielsetzung

Die bisherigen gentherapeutischen Studien an Menschen mit RPE65-Mangel erzielten im Vergleich zu den entsprechenden caninen Untersuchungen nicht die erhofften Ergebnisse. Ziel dieser Arbeit ist es durch Segmentierung einzelner Netzhautschichten und histologischen wie auch immunhistochemischen Untersuchungen des caninen RPE65^{-/-}-Modells weitere Erkenntnisse für die Therapie der Leberschen kongenitalen Amaurose und der frühkindlichen Netzhautdegeneration zu gewinnen. Dazu wurden zunächst OCT-Aufnahmen der Retinae gentherapeutisch behandelter Briard Hunde segmentiert, um Veränderungen der Schichtdicken im Verlauf der Erkrankung festzustellen. Diese wurden mit den entsprechenden Werten der kontralateralen nicht therapierten Retinae der erkrankten Hunde und der gesunden Retinae eines Wildtyps verglichen. Als nächstes wurden Paraffin- und Gefrierschnitte dieser Augen angefertigt, um strukturelle und morphologische Veränderungen nachzuweisen. Eine zusätzliche immunhistochemische Darstellung diente zur Kontrolle des Erfolgs der AAV-basierten RPE65-Gentherapie.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Versuchstiere

Die in dieser Arbeit verwendeten Hundeaugen stammen von Versuchstieren aus dem Forschungslabor INSERM UMR 1089, Laboratoire de Thérapie Génique der Universität Nantes, Frankreich. Die Behandlung der Tiere erfolgte gemäß der Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere, dem ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Visual Research und den Regelungen der Tierversuchskommission der Universität Nantes.

Die zu untersuchenden Hunde gehören alle der Rasse Briard an, wobei drei (A1-A3) eine homozygote Nullmutation im RPE65-Gen aufweisen. Bei diesen Hunden wurde jeweils das rechte Auge gentherapeutisch behandelt, während das linke als interne Negativkontrolle diente. Diesen erkrankten Hunden wurde das heterozygote Kontrolltier (NA) gegenübergestellt.

Von den Hunde-Retinae wurden OCT-Aufnahmen zu mehreren Zeitpunkten erstellt. Diese erfolgten mit SPECTRALIS (Heidelberg Engineering). Die genauen Angaben sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Die Augen wurden nach Beendigung gentherapeutischer Studien vor mehreren Jahren (2010-2012) entnommen und nach Präparation der Augenbecher dem Forschungslabor für Experimentelle Ophthalmologie der Universitätsaugenklinik Gießen zur Verfügung gestellt.

Tabelle 1: Versuchstiere

Hund	Geburtsdatum	Status	Tag der Injektion	Alter bei Injektion	Injiziertes Auge	Vektor	Injiziertes Volumen	Alter bei OCT-Aufnahme
A1	11.07.10	RPE65 ^{-/-}	24.10.11	15 Monate	RA	AAV2/4.phRPE65.long RPE65.human	290 µl	34, 46 und 56 Monate
A2	11.07.10		24.10.11	15 Monate	RA	AAV2/4.phRPE65.long RPE65.human	430 µl	34, 46 und 57 Monate
A3	24.06.11	RPE65 ^{+/-}	29.06.12	12 Monate	RA	AAV2/4.phRPE65.long RPE65.human	290 µl	23, 35 und 45 Monate
NA	10.04.13		10.04.13	-	-	-	-	8 und 24 Monate

Die OCT-Aufnahme wurden mit einem SPECTRALIS OCT (Heidelberg Engineering) durchgeführt.
 Alle in dieser Arbeit ausgewerteten OCT-Aufnahmen für A1, A2 und A3 wurden nach Therapie erstellt.
 A: Affected; NA: Nonaffected; RA: rechtes Auge.

2.1.2 DiOCTA layer segmentation

Dr. biol. hom. Alexander Ehnes entwickelte 2014 im Rahmen seiner Dissertationsarbeit an der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen eine Software, die in der Lage ist, geräteübergreifende OCT-Aufnahmen zu erkennen und zu analysieren. Der Entstehungsprozess dieser Software und die angewandten Methoden wurden bereits veröffentlicht (Ehnes et al. 2014).

Seit der Entdeckung der optischen Kohärenztomographie und der Möglichkeiten, die sich damit auf dem Gebiet der Augenheilkunde eröffneten, verbesserte sich die Leistung der OCT-Geräte kontinuierlich und viele verschiedene Hersteller wie Carl Zeiss Meditec Inc., Heidelberg Engineering und Topcon Corporation beteiligten sich an der Entwicklung neuer Geräte. Die kommerziellen OCT-Geräte verfügen zwar über eine Software zur Analyse der Netzhautdicke, jedoch bezieht sich diese meist auf die gesamte Netzhaut. Die Analyse einzelner intraretinaler Schichten ist damit nicht möglich, wäre aber für die Diagnose und Therapiekontrolle verschiedener Netzhauterkrankungen wie der LCA oder Retinitis pigmentosa von Vorteil. Zudem werden je nach Hersteller unterschiedliche Analysealgorithmen verwendet, wobei unter anderem die Grenzen der Retina nicht einheitlich definiert werden. So ergeben sich auch für die Berechnung der gesamten Netzhautdicke je nach Hersteller und OCT-Gerät leicht abweichende Werte (Giani et al. 2010).

Um OCT-Aufnahmen von Geräten unterschiedlicher Hersteller miteinander vergleichen und einzelne Retinaschichten definieren zu können, entwickelte Dr. A. Ehnes einen Schichtsegmentierungsalgorithmus für eine Software namens DiOCTA (Device independent OCT-Analysis). DiOCTA ermöglicht es OCT-Scans einschließlich einzelner Netzhautschichten automatisch zu segmentieren. Diese können im Anschluss zusätzlich manuell verändert werden. Dabei können die OCT-Aufnahmen in Graustufen oder Falschfarben dargestellt werden. Je höher der Grad der Reflektivität in der Graustufendarstellung ist, desto dunkler erscheint die jeweilige Schicht. In der Falschfarbendarstellung werden hochreflektive Schichten rot oder weiß wiedergegeben, mittelreflektive Schichten gelb oder grün und niedrigreflektive erhalten eine blaue Farbe (Hörle 2008). Zusätzlich wurde für DiOCTA eine Thickness-Mapping-Software entwickelt, die es ermöglicht die Dicke der gesamten Retina oder einzelner segmentierter Schichten farbkodiert auf dem Fundusbild abzubilden. Somit können auch Veränderungen einer Schichtdicke, die in einem B-Scan aufgefallen sind, über den gesamten gescannten Bereich beurteilt werden. Als Grundlage für die Analyse der Thickness-Maps dient ein ETDRS-Grid (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study) (Ehnes et al. 2014)

2.1.3 Weitere Materialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien, Geräte/Hilfsmittel, Chemikalien, Lösungen/Puffer und Software sind in den Tabellen 2 bis 6 zusammengetragen. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in den Tabelle 7 und 8 aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Aluminiumfolie	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dako Pen	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Deckgläser	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einmalhandschuhe, Nitril	Ansell, München, Deutschland
Färbeküvette 50 ml	VWR, Darmstadt, Deutschland
Mikrotomklingen	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Objektträgerkasten mit 100 Stellplätzen	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Olympus IMMOIL-F30CC Immersion Oil Type-F	Olympus, Hamburg, Deutschland
Parafilm M	VWR, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen, diverse Ausführungen	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland; Corning Inc., New York, USA
PP Test Tubes 50 ml Cellstar	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße, verschiedene	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
ROTI®Histokitt II	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Skalpellklingen, unsteril, verschiedene	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SuperFrost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Tissue Freezing Medium	Reichert Jung, Unterschleißheim/München, Deutschland
Tissue-Tek® Cryomold®	Sakura Finetek, Staufen, Deutschland
6 Well Multiwell Platte	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

Tabelle 3: Geräte und Hilfsmittel

Geräte und Hilfsmittel	Hersteller
Digitales Fluoreszenzmikroskop BZ-8100E	Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland
Färbekammer für Objektträger	Science Services, München, Deutschland
Glasgefäße Duran, diverse Ausführungen	VWR, Darmstadt, Deutschland
Konfokales Laser Scanning Mikroskop Fluoview FV10i	Olympus, Hamburg, Deutschland
Kryostat MEV	SLEE medical, Mainz, Deutschland
Magnetrührer	IKA, Staufen, Deutschland
Mikrowelle	Siemens, München, Deutschland

pH Meter, Seven Easy S20	Mettler Toledo, Schwerzenbach, Schweiz
Pipetten, diverse Ausführungen	Brand, Wertheim, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Schüttler Certomat H	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Stereomikroskop SMZ168	Motic, Wetzlar, Deutschland
Vortexmischer	VWR, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge 1-15 PK	Sigma, München, Deutschland
Zentrifuge, Mini Star	VWR, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig (X883.1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, absolute	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hämatoxilinlösung nach Gill II (T864.1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat- Heptahydrat (NaH ₂ PO ₄ ·7H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat- Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Normal Donkey Serum (NDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Paraffin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Salzsäure-rauchend, 37 % (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sucrose	Serva, Heidelberg, Deutschland
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol (Isomere)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 5: Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	DAPI Stammlösung 0,1 mg/ml 1:1000 in PBS
Antikörperinkubationslösung	3 % NDS 1 % BSA 0,5 % Triton X-100 0,02 % NaN ₃ in PBS
Paraformaldehyd (PFA) 4 %	4 g PFA in 100 ml PBS (pH 7,4)
Sucrose, 10/20/30%ig	10/20/30 g Sucrose 0,5 ml 5 % NaN ₃ auf 100 g in PB lösen

Triton X-100 Stammlösung	5 % Triton X-100 in PB/PBS
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), 0,1 M, pH 7,4	2,07 g NaH ₂ PO ₄ 5,84 g NaCl 22,786 g Na ₂ HPO ₄ + 7 H ₂ O auf 1 L mit Aqua dest. auffüllen
Natriumcitrat Puffer	Trinatriumcitrat (Dihydrat) 2,94 g Aqua dest. 1000 ml pH mit 1N HCl (400 µl + 2 x 50 µl 37%ige) anpassen 0,5 ml Tween 20 (10 mM Natriumcitrat, 0,05 % Tween 20, pH 6,0)

Tabelle 6: Verwendete Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop 2020	Adobe Systems Software, San Jose CA, USA
DiOCTA layer segmentation	UKGM Augenlinik Gießen, Deutschland
Fluoview FV10-ASW Version 04.01.02.02	Olympus Deutschland, Hamburg, Deutschland
IBM SPSS Statistics Version 26.0.0.0	IBM Corporation, NY, USA
Keyence BZ-II Analyzer	Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland
Keyence BZ-II Viewer	Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland
Microsoft 365 (Word, Powerpoint, Excel)	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA

Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper

Name (Bestell-Nr.)	Wirt	Immunogen	Bezugsquelle	Verdünnung
GFAP (AB5804)	rb	Aufgereinigtes bovines Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	Chemicon, CA, USA	1:1000
RPE65 (NB100-355)	ms	Bovine mikrosomale Membranproteine des retinalen Pigmentepithels	Novus Biologicals, Cambridge, UK	1:100

rb: Kaninchen; ms: Maus

Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper

Konjugat	Art	Hersteller	Verdünnung
Alexa Fluor 488	dk α ms	Molecular Probes, Eugene, USA	1:500
Alexa Fluor 594	dk α rb		
DAPI	-		1:1000

α: anti; dk: Esel; ms: Maus; rb: Kaninchen

2.2 Methodik der Vorarbeit

Die subretinale Injektion der Augen, postoperative Verlaufskontrollen und die Präparation der Augenbecher erfolgten im Forschungslabor INSERM UMR 1089, Laboratoire de Thérapie Génique der Universität Nantes, Frankreich. Die Präparation der Retina von A2 und NA und die Paraffineinbettung dieser wurden von Dr. rer. nat. Brigitte Müller, die Herstellung der Paraffinschnitte und deren Färbung von Frau Bettina Gill, durchgeführt. Beide sind Mitarbeiterinnen des Labors für experimentelle Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Universität Gießen.

2.2.1 Subretinale Injektionen

Das Protokoll zur gentherapeutischen Intervention der Hunde wurde von dem *Animal Care and Use Committee* der Universität Nantes genehmigt. Die subretinale Injektion erfolgte transvitreal nach Vitrektomie und unter Inhalationsanästhesie mit Isofluran. Dabei wurde eine 44-Gauge Kanüle, die mit einem System zur Injektion visköser Flüssigkeit gekoppelt war, unter mikroskopischer Kontrolle transskleral durch den Glaskörper bis zur Injektionsstelle geführt. Die Injektion erfolgte an der superioren Retina in den subretinalen Raum, wobei A1 und A3 290 µl und A2 430 µl des rAAV2/4.phRPE.long.RPE65human Vektors erhielten. A1 und A2 waren bei Injektion 15 Monate, A3 hingegen 12 Monate alt. Die Flüssigkeit, die dabei eine sogenannte Injektionsblase zwischen dem RPE und den Photorezeptoren bildete, war nach 24-48 Stunden vollständig vom Gewebe absorbiert. Nach dem Eingriff wurden die Hunde für die folgenden sechs Tage mit subkutanen Antibioseinjektionen und der zusätzlichen oralen Gabe eines Glucocorticoids behandelt (Weber et al. 2003; Le Meur et al. 2007).

2.2.2 Erfolgs- und Verlaufskontrollen

OCT-Aufnahmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Therapie dienten zur Evaluation dieser (siehe Tabelle 1). Neben zusätzlichen ERG-Messungen, Untersuchungen des Augenhintergrundes und Fluoreszenzangiographien wurde geprüft, ob die Hunde einen Hindernisparcours erfolgreich durchlaufen können. Der Ablauf und die Ergebnisse dieser Studien wurden bereits veröffentlicht (Le Meur et al. 2007).

2.2.3 Präparation der Augenbecher

Nachdem die Tiere euthanasiert wurden, erfolgte die Entnahme der Augen. Um die für die weiteren Untersuchungen benötigte Retina zu gewinnen, wurden die Augen entlang der Ora serrata präpariert und Hornhaut, Iris, Linse, gemeinsam mit Ziliar- und

Glaskörper vorsichtig entfernt. Dies erfolgte in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) und unter stereomikroskopischer Kontrolle. Die so erhaltenen Augenbecher wurde mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) in Phosphatpuffer (PB) für 15 bzw. 30 Minuten auf den Schüttler gestellt. Nach dieser Fixierung wurden die Augen in PBS gewaschen und nach Gießen verschickt.

2.2.4 Paraffineinbettung

Die Retinae der Hunde A2 und NA wurden in Paraffin eingebettet, um strukturelle und morphologische Unterschiede zwischen dem behandelten und unbehandelten Auge des RPE65^{-/-}-Hundes mit dem gesunden Kontrolltier vergleichen zu können. Die Präparation der Retina und Paraffineinbettung erfolgte durch Dr. Brigitte Müller, das Schneiden der Präparate durch Frau Bettina Gill in dem Labor der Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Im Anschluss wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Sowohl bei A2 als auch bei NA wurde die Retina zunächst entlang der Sehnervenpapille in einen superioren und einen inferioren Bereich geteilt. Da die OCT-Scans der Hunde die zentrale superiore Retina darstellen, wurde in diesem Bereich ein großes Gewebestück präpariert. Die inferioren und peripheren Anteile der Retina wurden zusätzlich bearbeitet, sind für die Auswertung und den Vergleich mit den OCT-Aufnahmen jedoch unbedeutend.

Die folgenden Schritte wurden manuell durchgeführt. Zunächst wurden die Präparate für 30 Minuten in 4 % Paraformaldehyd fixiert und im Anschluss durch die aufsteigende Ethanolreihe bei Raumtemperatur entwässert. Dafür lagen diese am ersten Tag jeweils eine Stunde lang in 50 % Ethanol, der nach einer Stunde ausgetauscht und über Nacht so belassen wurde. Am darauffolgenden Tag wurden die Präparate jeweils für eine Stunde in zweimal 70 % und dann einmal in 80 %, 90 % und 96 % Ethanol gelegt. Für die letzten zwei Entwässerungsschritte wurden die Präparate in Ethanol absolut gelegt, der nach einer Stunde ausgetauscht wurde. Der nächste Schritt bestand aus der Entfernung des Alkohols durch das Intermedium Xylol. Dafür wurden die Präparate in Ethanol und Xylol im Verhältnis 1:1 für eine Stunde und darauffolgend zweimal für eine Stunde nur in Xylol inkubiert. Im nächsten Schritt wurde Paraffin hinzugefügt, sodass eine Xylol-Paraffinlösung im Verhältnis 1:1 entstand, die nach einer Stunde durch reines Paraffin ersetzt wurde, welches zwei Stunden später ein letztes Mal ausgetauscht wurde. Die Paraffinlösung wurde zuvor im Brutschrank bei 60 Grad zum Schmelzen gebracht. Schließlich wurden die Gewebe in eine Einbettform überführt.

Der nächste Arbeitsschritt bestand aus der Anfertigung von Paraffinschnitten. Dazu wurden die Paraffinblöcke in ein Mikrotom eingespannt und die Schnitte angefertigt. Die

Schnittdicke betrug bei dem rechten Auge von A2 und NA 7 μm , bei dem linken 5 μm . Diese wurden aufgefangen und in ein warmes Wasserbad überführt, in dem sie sich ausbreiten konnten, um dann auf einen Objektträger aufgezogen zu werden. In den folgenden Tagen wurden sie zum Trocknen gelegt, um daraufhin mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt zu werden (Färbung siehe Abschnitt 2.3.2.4).

Bei der Beurteilung der Präparate und dem Vergleich mit OCT-Aufnahmen wurde die Schrumpfung des Gewebes von 8-20 % beachtet (Arndt und Rothhämel 2012; Riedelsheimer et al. 2015).

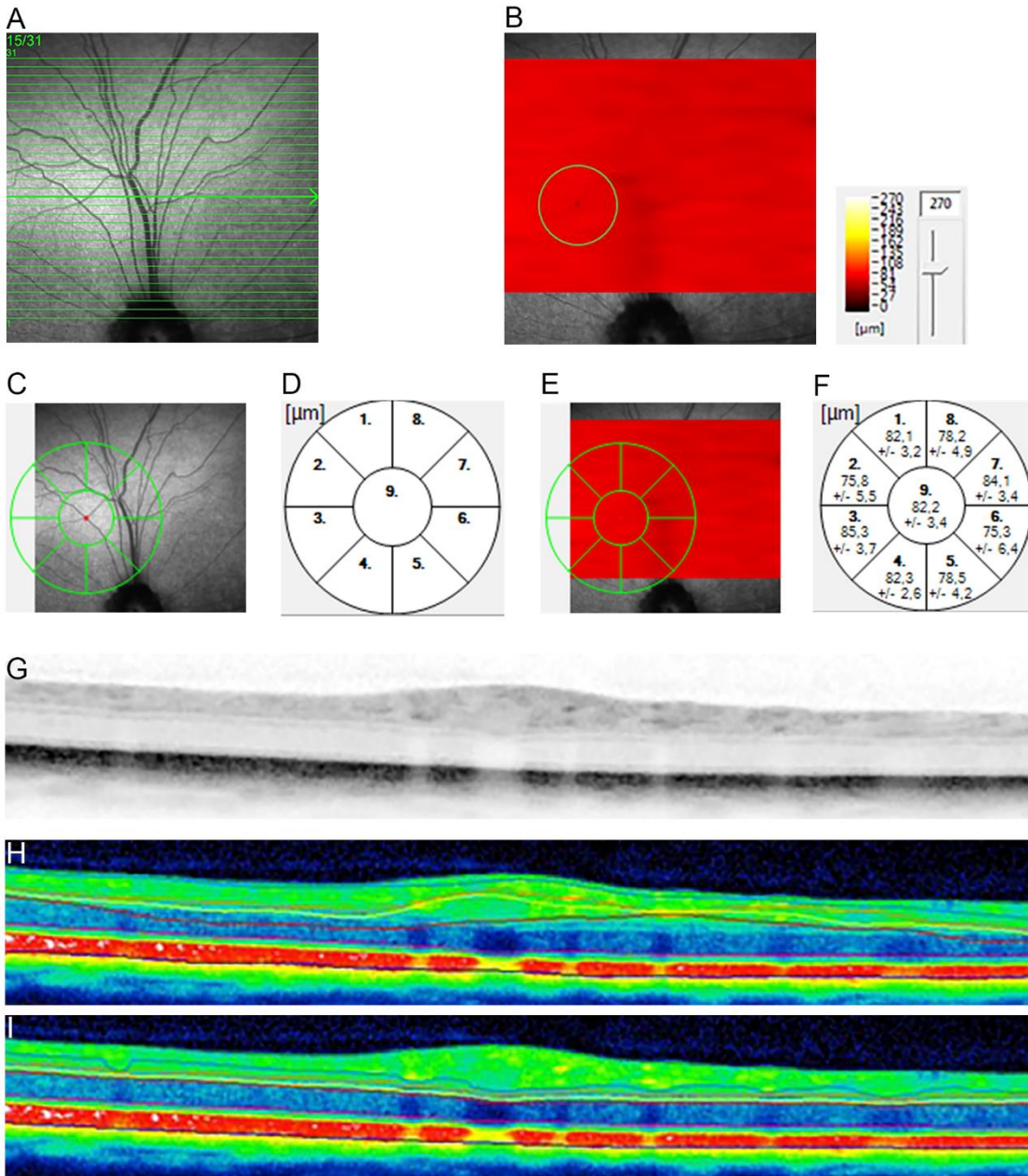
2.3 Methodik der eigenen Arbeit

2.3.1 Segmentierung der OCT-Aufnahmen mit DiOCTA

Die für diese Arbeit zur Verfügung gestellten OCT-Aufnahmen wurden bei den Hunden A1, A2 und A3 nach Therapie im Forschungslabor der Universität Nantes angefertigt. Zu jedem der zwei oder drei Untersuchungszeitpunkte nach Therapie wurden zwei Volumenscans mit einer variablen Anzahl an Einzelscans erstellt. Dies traf auch auf die Aufnahmen von NA zu.

Alle Volumenscans wurden mit DiOCTA segmentiert. Die Schichtdickenwerte der Volumenscans mit der größeren Anzahl an Einzelscans wurden zur Auswertung übernommen. Das Segmentieren entsprechender Areale in den kleinen Volumenscans diente zur Kontrolle. Die Darstellung der gesamten Retina und der einzelnen Schichten mit der Thickness-Map diente als zusätzliche Evaluation, da auf diese Weise Unregelmäßigkeiten in der Segmentierung auffallen und korrigiert werden konnten. Die Volumenscans begrenzen sich bei allen Hunden auf die superiore Retinahälfte, da diese für A1, A2 und A3 dem injizierten Bereich entsprach. Jedoch muss bei der Auswertung beachtet werden, dass die superiore Retina bei Hunden mit dem Tapetum lucidum eine zusätzliche reflektierende Schicht aufweist. Dies erschwerte die automatische Segmentierung mit DiOCTA, sodass eine manuelle Korrektur aller Scans nötig war. Zudem wurde mit der Falschfarbendarstellung gearbeitet, da sie eine deutlichere Unterscheidung der Schichtgrenzen ermöglichte. Von den elf möglichen Schichten, die mit DiOCTA segmentiert werden können, wurden in dieser Arbeit zur Vereinfachung mehrere zusammengefasst. So ergeben sich die folgenden sechs Schichteinteilungen: NFL (Nervenfaserschicht), GCL+IPL (Ganglienzellschicht und Innere plexiforme Schicht), INL (Innere nukleäre Schicht), OPL (Äußere plexiforme Schicht), ONL+OLM+IS (Äußere nukleäre Schicht, Äußere Gliagrenzmembran und Innensegment) und ISe+OS+RPE+TL (Innensegmentellipsoid, Außensegment,

retinales Pigmentepithel und Tapetum lucidum). Die untere Begrenzung erfolgte an der Choroidea (siehe Abbildung 9). Zur Auswertung einer dieser sechs Schichten oder der gesamten Retina wurde ein kreisförmiges Grid mit 2,2 mm Durchmesser in den gescannten Bereich gelegt. Das Programm berechnete daraufhin einen Mittelwert mit Standardabweichung für die ausgewählte Schicht in diesem Bereich. Durch das Platzieren dieses Grids an Gefäßkreuzungen war es möglich bei aufeinanderfolgenden Scans immer den gleichen Bereich zu untersuchen. Da sich die Injektionsblase bei allen behandelten Augen in einem Großteil des gescannten Bereichs ausgebreitet hatte, wurden für die statistische Analyse der Daten Bereiche temporal und nasal der Sehnervenpapille gewählt. Dies ermöglichte die Beurteilung mehrerer Netzhautareale. In Abbildung 10 sind die Thickness-Maps der temporalen Werte für die drei Untersuchungszeitpunkte von A1 beispielhaft dargestellt.



Einteilung der Netzhautschichten

- 0 ■ NFL
- 1 ■ GCL+IPL
- 2 ■ INL
- 3 ■ OPL
- 4 ■ ONL+OLM+IS
- 5 ■ ISe+OS+RPE+TL
- 6 ■ Choroidea

Abbildung 9: Segmentierung mit DiOCTA

Segmentierung mit DiOCTA beispielhaft gezeigt an einem Volumenscan von NA. In **A** sieht man das Fundusbild, wobei Scan 15 zur Segmentierung ausgesucht wurde. In der Thickness-Map Darstellung (**B**) konnte mithilfe eines Grids (grüner Kreis) der Mittelwert der Schichtdicken in diesem Bereich berechnet werden, hier beispielhaft an der ONL+ Schichtdicke gezeigt (ONL+: ONL+OLM+IS). **C** zeigt die Positionierung des Grids an einer Gefäßkreuzung. In **D** sieht man, dass für das Grid noch keine Schichtdickenwerte berechnet werden konnten. In **E** und **F** hingegen kann mit der Thickness Map-Funktion die entsprechende Schicht, hier ONL+, ausgewählt werden und das Grid zeigt die segmentierten Schichtdickenwerte an. In **G** ist der B-Scan in Graustufen dargestellt. Die Unterscheidung der einzelnen Schichten ist in dieser Darstellung erschwert. Deswegen wurde mit der Falschfarbendarstellung gearbeitet. **H** zeigt die automatische

Segmentierung von DiOCTA, die noch fehlerhaft ist. In I ist der Scan nach manueller Korrektur gezeigt. G, H und I zeigen nur einen Ausschnitt des B-Scans.

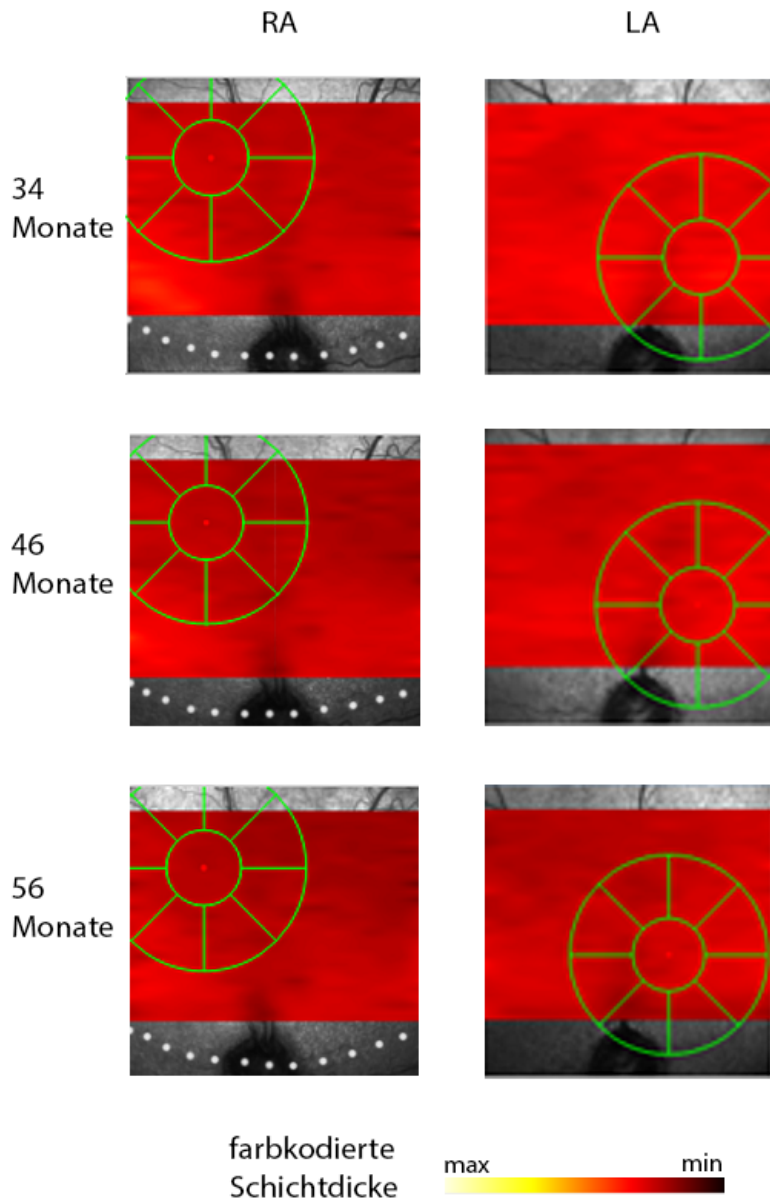


Abbildung 10: Thickness-Maps der ONL+ (ONL+: ONL+OLM+IS) von A1 zu den drei Untersuchungszeitpunkten

Das grüne Grid zeigt den Bereich, der für die Werte temporal der Sehnervenpapille ausgesucht wurde. Aus der statistischen Analyse (Abschnitt 3.1.1) wird deutlich, dass die Werte für das rechte Auge von dem ersten Untersuchungszeitpunkt bis zum dritten um etwa 6,40 μm abnehmen, für das linke Auge liegt dieser Wert bei etwa 11,49 μm . In den Thickness-Map-Aufnahmen kann man erkennen, dass zum dritten Untersuchungszeitpunkt die farbkodierte Schichtdicke einen leicht dunkleren Rotton besitzt und somit die Abnahme in der Schichtdicke widerspiegelt. Für die Auswertung wurde nur der Wert des inneren grünen Kreises des Grids genutzt. Die gepunktete Linien markiert die Grenze der Injektionsblase. IS: Innensegment der Photorezeptoren; OLM: Äußere Gliagrenzmembran; ONL: Äußere nukleäre Schicht; RA: rechtes Auge; LA: linkes Auge.

2.3.1.1 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit IBM SPSS 26.0.0.0.

Die untersuchten Augen lassen sich grundsätzlich in drei Gruppen unterteilen. Zum einen sind das die betroffenen und unbehandelten Augen, somit das jeweils linke Auge von A1, A2 und A3, zum anderen die betroffenen und behandelten Augen, also das jeweils rechte Auge von A1, A2 und A3, und die dritte Gruppe bildet das rechte und linke Auge des gesunden Kontrolltieres NA.

Um die Entwicklung der ETDRS-Grid-bezogenen Schichtdicken über die Zeit zu beschreiben, wurde das Effektstärkemaß r , auch Pearsons Korrelationskoeffizient genannt, berechnet. Es ist ein Maß für den statistischen Zusammenhang zweier Datensätze (Rosenthal 1991). Dabei wurden die Richtlinien von Cohen zur Interpretation verwendet. Ab einem Wert von $r=0,10$ spricht man von einem schwachen Effekt, ab $r=0,30$ von einem mittleren Effekt und ab $r=0,50$ von einem großen Effekt (Field 2013). Die Schichtdicke der ONL+ (ONL+: ONL+OLM+IS) und der gesamten Retina wurden getrennt betrachtet. Dabei wurde die Messung eines Zeitpunktes mit der jeweils vorausgehenden verglichen (siehe Anhang Tabelle 15). Zuvor wurde der t-Test für unabhängige Daten mit der Welch-Korrektur für Varianzheterogenität angewandt. Beim Vorhandensein von drei Messzeitpunkten wurde der Wert der Schichtdicke zum ersten mit dem zweiten Zeitpunkt verglichen und wiederum der zweite mit dem dritten. Bei nur zwei Messzeitpunkten wurde dies entsprechend durchgeführt. Der berechnete t-Wert und die Freiheitsgrade (df) wurden zur Berechnung des Korrelationskoeffizienten r benötigt.

Schließlich legte die Datenstruktur die Durchführung einer ANCOVA, auch Kovarianzanalyse genannt, nahe. Dabei wurden die Schichtdicke der ONL+ (ONL+: ONL+OLM+IS), der ISe+ (ISe+: ISe+OS+RPE+TL) und der gesamten Retina getrennt betrachtet. Die Varianzanalyse kann als ein Verfahren beschrieben werden, das die Wirkung einer oder mehrerer unabhängiger Variablen in Bezug auf eine oder mehrere abhängige Variablen, wie in diesem Fall der Schichtdicke, untersucht (Backhaus et al. 2018). Ist eine Kovariate wie in dieser Studie das Alter der Tiere vorhanden, also eine erklärende Variable, die zusätzlich Einfluss auf die abhängige Variable der Schichtdicke ausübt, ist es sinnvoll diese, in die Analyse miteinzubeziehen. Dabei wird die Differenz zwischen den Mittelwerten der zu untersuchenden Stichproben analysiert. Es wurden die Veränderungen der Schichtdickenwerte der Hunde A1, A2 und A3 untersucht und zur Veranschaulichung im Streudiagramm die Werte des gesunden Kontrolltieres NA ergänzt.

Das Bestimmtheitsmaß R^2 , auch Determinationskoeffizient genannt, ist ein Maß der Varianzaufklärung, ein Maß der Stärke des Zusammenhangs und gibt den Anteil der erklärten Streuung an der Gesamtstreuung wider (Backhaus et al. 2018). Der Wert von R^2 liegt zwischen Null und Eins. Dabei spricht man von einer schwachen Varianzaufklärung ab einem $R^2=0,02$, von einer moderaten Varianzaufklärung ab $R^2=0,13$ und von einer starken Varianzaufklärung ab $R^2=0,26$ (Cohen 1977). Die gleiche Einteilung kann für das partielle Eta-Quadrat genutzt werden. Die weiteren Parameter der ANCOVA werden im Ergebnisteil erklärt.

Die Grundlagen der Analyse mit SPSS wurden von dem Statistiker Dr. rer. soc. Johannes Herrmann erlernt, selbständig fortgeführt und vertieft.

2.3.2 Histologische und immunhistochemische Analyse

Während die Retinae der Hunde NA und A2 in Paraffin eingebettet wurden, erfolgte für die Retinae von A1 und A3 eine Kryopräparation.

2.3.2.1 Retinapräparation

Für den Transport waren die Augen in 4 % Paraformaldehyd fixiert worden und erhielten durch Zugabe von Natriumazid einen Schutz gegen das Wachstum von Bakterien und Pilzen. Zunächst wurden die insgesamt vier Augenbecher der Hunde A1 und A3 jeweils in eine Petrischale mit 0,1 M (Molare Masse) Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gelegt. Dabei wurde darauf geachtet, dass sie vollständig von der Flüssigkeit umgeben waren, um eine Austrocknung zu verhindern. Unter stereomikroskopischer Kontrolle erfolgte die Zerteilung der Retina. Bei A1 mussten zuvor noch Reste des Glaskörpers mit einer chirurgischen Pinzette und einer feinen Schere entfernt werden. Die Zerteilung der Retina erfolgte für alle vier Augen nach dem gleichen Schema. Dabei wurde diese zunächst mit einem Skalpell unterhalb der Sehnervenpapille in einen superioren und inferioren Teil getrennt. Da in den entsprechenden OCT-Aufnahmen der superioren Bereich über der Papille gescannt wurde, wurde bei der Präparation darauf geachtet diesen recht groß zu halten, um einen späteren Vergleich zwischen OCT und Histologie zu ermöglichen. Dieser zentrale superioren Ausschnitt aller vier Augen ist für die vorliegende Arbeit von Bedeutung. Zusätzlich wurden auch die peripheren und inferioren Bereiche der Retina mitpräpariert, sind jedoch für die Auswertung in dieser Arbeit irrelevant. Während der gesamten Präparation wurde darauf geachtet die Ausrichtung der nasalen und temporalen Retinahälfte beizubehalten, um den späteren Vergleich mit

den OCT-Aufnahmen zu erleichtern, dabei half auch die Orientierung am Gefäßverlauf, der zuvor photographisch dokumentiert wurde.

Zur Durchführung der aufsteigenden Sucrosereihe, die als Gefrierschutz für das Gewebe dient, wurden die Präparate in zwei 6-Well-Platten mit PBS überführt. Dabei wurden sie für zwei Stunden in eine Lösung von 10 % Sucrose in PBS gestellt, die danach für weitere zwei Stunden mit 20 % Sucrose in PBS ersetzt wurde. Das Überziehen der Platten mit Parafilm verhinderte ein Verdunsten der Flüssigkeit. Die Präparate von A3 wurden auf den Schüttler gestellt, die von A1 nicht, da sich hier die Retina an den Ecken abzulösen begann. Schließlich wurden sie in 30 % Sucrose in PBS über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Am darauffolgenden Tag wurden die Präparate in einer Lösung aus 30 % Sucrose in PBS und dem Gefriermedium Tissue-Tek im Verhältnis 1:1 für zwei Stunden auf den Schüttler gelegt. Diese Lösung wurde danach für eine Stunde mit reinem Tissue-Tek ersetzt. Nach einer weiteren Stunde wurden die Präparate mit einer Pinzette aus der Platte in ein mit Gefriermedium gefülltes Cryomold-Schälchen gelegt. Das Präparat wurde von Medium bedeckt, wobei darauf geachtet wurde eingeschlossene Luftblasen zu vermeiden. Schließlich wurde das Cryomold für wenige Minuten in flüssigem Stickstoff gekühlt, sodass ein Gefrierblöckchen entstand. Dieses konnte bis zur Anfertigung der Kryostatschnitte bei -20 °C in einer luftdichten Verpackung gelagert werden.

2.3.2.2 Herstellung von Kryostatschnitten

Zur Herstellung der Kryostatschnitte wurden die Gefrierblöckchen aus den Cryomolds gedrückt und auf einen Objektträger mit zusätzlichem Gefriermedium befestigt. Dabei wurde zwischen Objektträger und dem Präparat ein Filterpapier gelegt, auf dem die temporale und nasale Seite der Retina beschriftet werden konnte. Der Kryostat wurde auf eine Kammertemperatur von -15 °C und die Schnittdicke auf 15 µm eingestellt. Eine zusätzliche Objektkühlung war nur nach längerer Schneidedauer nötig, um das Objekt für einen kurzen Moment stärker zu kühlen. Die Schnitte wurden auf SuperFrost-Objektträgern aufgenommen und ebenso wie die Blöckchen bei -20 °C gelagert. Ab dem Papillenende wurden alle Schnitte aufgenommen, da jeder Schnitt für die Berechnung der entsprechenden Höhe in der OCT-Aufnahme benötigt wurde.

2.3.2.3 Färbung mittels indirekter Immunfluoreszenz

Bei der immunhistochemischen Färbung wurde das Prinzip der indirekten Immunmarkierung angewandt. Dabei bindet zunächst ein spezifischer Primärantikörper an das zu lokalisierende Antigen, der wiederum von einem fluorochromgekoppelten

Sekundärantikörper erkannt wird. Letzterer kann anhand seines fluoreszierenden Farbstoffs mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops nachgewiesen werden. Die Kern-Gegenfärbung erfolgte mit DAPI (Diamino-Phenylindol), einem Farbstoff, der an die DNA-Doppelhelix bindet. Die zu färbenden Objektträger wurden zunächst für 45 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und alle Schnitte auf einem Objektträger mit einem Fettstift (PAP-Pen) umrandet, um ein Auslaufen der Inkubations- und Antikörperlösung zu verhindern. Daraufhin wurden die Objektträger nacheinander zehn Minuten in 0,1 M PBS und in Citratpuffer gewaschen.

Da die Augen vor Anfertigung der Schnitte formalinfixiert waren, folgte zunächst die sogenannte Antigendemaskierung (Antigen Retrieval). Darunter versteht man das Aufbrechen von Vernetzungen des zu untersuchenden Gewebes, die beim Prozess der vorausgehenden Fixierung entstanden sind. Um den Zugang des primären Antikörpers an seine Zielstruktur zu erleichtern, können diese Verbindungen gelockert werden (Eberhart et al. 2012). Dafür wurden die Objektträger in einer 80 ml Hellendahl Küvette in PBS gewaschen und anschließend zwei Mal für fünf Minuten in Citratpuffer. Daraufhin erfolgte die Mikrowellenbehandlung bei 700 Watt. Nach zehn Sekunden wurde eine Pause von 50 Sekunden eingelegt, bis eine Temperatur von 75 °C erreicht wurde. Die Küvette wurde im Wasserbad abgekühlt und die Objektträger noch einmal in PBS gewaschen. Als nächstes wurde die Permeabilisierungslösung bestehend aus PBS mit 0,5 % Tween für eine Stunde aufgetragen. Nach einem erneuten Waschen in PBS wurde auf den Objektträgern der Negativkontrollen eine reine Antikörperinkubationslösung (3 % NDS, 1 % BSA und 0,5 % Triton X-100) aufgetragen. Die restlichen Objektträger erhielten zusätzlich zu der Antikörperinkubationslösung die verdünnten Primärantikörper. Da eine Kolo-kalisation der primären Antikörper möglich war, wurde der Mausantikörper RPE65_(ms) (NB100-355) im Verhältnis 1:100 verdünnt und der Kaninchenantikörper GFAP_(rb) (AB5804) 1:1000. Die Objektträger wurden jeweils mit einem Streifen Parafilm abgedeckt, um ein Verdunsten der Lösung zu verhindern und schließlich bei Raumtemperatur zur Inkubation über Nacht in eine feuchte Färbekammer gelegt.

Am nächsten Tag folgte ein dreifacher Waschgang in PBS für jeweils 15 Minuten, bevor der zweite Antikörper auf alle Objektträger aufgetragen wurde. Die zweite Antikörperlösung war aus den benötigten Alexa Fluorochromen (Alexa Fluor 594 dk α rb, Alexa Fluor 488 dk α ms), DAPI und Antikörperinkubationslösung zusammengesetzt und wurde vor dem Auftragen zentrifugiert, um eine Präzipitatbildung zu vermeiden. Die Inkubation erfolgte auch für diesen Schritt in einer lichtdichten Färbekammer, jedoch nur für eine Stunde. Es folgten drei weitere Waschschrirte von jeweils 15 Minuten im Dunkeln, um ein Ausbleichen der Fluorochrome zu verhindern, wobei die Küvetten

abgedeckt wurden. Schließlich wurden die Objektträger getrocknet und mit einem Eindeckmedium eingedeckelt. Bis zur mikroskopischen Untersuchung wurden sie im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

2.3.2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Darstellung der Gewebestrukturen wurden einige Objektträger mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Hämatoxylin ist ein Naturfarbstoff, der in seiner basischen Form als Hämalan basophile (saure) Strukturen wie Zellkerne blau anfärbt. Eosin, ein synthetischer Farbstoff, dient zur roten Färbung acidophiler (basischer) Strukturen wie dem Zytoplasma und Kollagen. Zunächst wurden die Objektträger für 30 Minuten zum Auftauen und Antrocknen bei Raumtemperatur gelagert. Nach zwei Waschschrritten in PBS für jeweils zehn Minuten wurden die Objektträger einzeln für 30 Sekunden in eine Küvette mit der Färbelösung Hämatoxylin gestellt. Das anschließende Waschen unter Leitungswasser führt durch Anhebung des pH-Wertes zum typischen Bläuen der Gewebestrukturen. Nach dem Gegenfärben mit 0,5 % Eosinlösung mit Eisessig wurden die Objektträger ein weiteres Mal mit Wasser gespült. In der darauffolgenden aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Präparate zunächst entwässert, indem sie für drei Minuten zwei Mal in eine Küvette mit 70 % Ethanol und jeweils einmal in 80 % und 90 % Ethanol gestellt wurden. Darauf folgten 96 % Ethanol und zwei Mal Ethanol absolut für je drei Minuten. Schließlich wurden die Objektträger für zwei Mal fünf Minuten in Xylol gelegt, bevor sie mit dem Roti-Histokit II eingedeckt wurden.

2.3.2.5 Mikroskopie

Die immunhistochemisch behandelten Schnitte wurden mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop Fluoview FV10i betrachtet. Die Vorteile der konfokalen Mikroskopie sind die Reduktion der störenden Hintergrundinformationen durch Fokussierung auf die Ebene des Fluoreszenzsignals und eine erhöhte optische Auflösung (Wegerhoff 2015). Die Aufnahmen erfolgten mit 10-facher und 60-facher Vergrößerung (10x und 60x UIS2 SAPO Objektive), letztere unter Verwendung von Olympus Immersion Oil. Das Mikroskop arbeitet mit vier Lasern und zwei Photomultiplier-Detektoren, um auch schwache Signale detektieren zu können. Es wurden mit der entsprechenden Fluoview Software vier bis 17 Z-Stack-Aufnahmen zu Bildern überlagert, wobei die Antikörperfärbung, der Phasenkontrast und das DAPI-Bild getrennt gespeichert wurden, um die spätere Bearbeitung mit Photoshop zu erleichtern.

Die Aufnahmen der HE-gefärbten Kryostatschnitte von A1 und A3 und der HE-gefärbten Paraffinschnitte von A2 und NA erfolgten mit dem Digitalen Fluoreszenzmikroskop BZ-

8100E. Da nur Gewebestrukturen von Interesse waren, wurden alle Fluoreszenzkanäle ausgeschaltet und nur mit der Halogen-Lichtquelle gearbeitet. Die Aufnahmen erfolgten mit 4-facher und 20-facher Vergrößerung (PlanApo 4x NA0.20, PlanFluor ELWD DM 20xC NA0.45 Objektiv). Mithilfe der LUT Correction erfolgte eine leichte Farbkorrektur. Die Z-Stack-Aufnahmen wurden mit dem Keyence BZ-II Analyzer zu einem Bild fokussiert und mithilfe des ImageMerge-Tools wurden mehrere Aufnahmen zu einer zusammengefügt.

Da ab der Sehnervenpapille alle Schnitte beim Schneiden aufgenommen wurden, konnte der Abstand zur Papille berechnet werden. Dieser wurde genutzt, um den entsprechenden OCT-Scan für den Vergleich zu finden. Der Abstand zwischen den einzelnen B-Scans konnte in den Einstellungen von DiOCTA abgelesen werden.

2.3.2.6 Bildbearbeitung

Die Bildbearbeitung erfolgte mit Adobe Photoshop 2020. Es wurden die Tonwerte der Aufnahmen automatisch korrigiert und die Unschärfe automatisch reduziert. Die Anpassung führte zu keiner Veränderung des Informationsgewinns, der aus den Originalaufnahmen entnommen werden konnten. Einige sich teilweise überschneidende Aufnahmen wurden mit dem ImageMerge-Tool zu einer zusammengefasst, um die komplette Retina auf einem Bild darstellen zu können. Zur besseren Übersicht der einzelnen Schichten wurde neben der Antikörperfärbung ein Ausschnitt aus der entsprechenden DAPI-Aufnahme ausgeschnitten und seitlich angefügt.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich der Schichtdicken von RPE65^{-/-}-Retinae in behandelten und unbehandelten Augen miteinander und mit den Werten des gesunden Kontrolltieres

Durch die Segmentierung der OCT-Daten mit DiOCTA und der darauffolgenden Grid-Analyse (siehe Abschnitt 2.3.1) konnten für die jeweiligen Schichten und die gesamte Retina Mittelwerte berechnet werden. Zusammenfassend werden im Folgenden (Abschnitt 3.1.1 bis 3.1.3) die Ergebnisse der betroffenen und unbehandelten somit linken Augen von A1, A2 und A3 und der betroffenen und behandelten somit rechten Augen von A1, A2 und A3 verglichen und denen des gesunden Kontrolltieres NA gegenübergestellt. Die Datenstruktur legte die Durchführung einer ANCOVA nahe, wobei die abhängige Variable die Schichtdicke darstellte und das Alter der Tiere als Kovariate diente. Es wurde untersucht, wie sich die Schichtdicke im Verlauf der Erkrankung ändert und ob Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Retinae bestehen.

Zuvor wurde der t-Test für unabhängige Daten mit der Welch-Korrektur für Varianzheterogenität angewandt. Der Mittelwert in μm , der für ein Grid berechnet wurde, setzte sich aus 2612 bis 2759 Einzelmessungen zusammen. Da bei sehr hohen Fallzahlen, in diesem Zusammenhang die Einzelmessungen betreffend, kleinste Unterschiede hoch signifikant werden, wurde der p-Wert für die t-Tests ignoriert. Stattdessen wurde das standardisierte Effektstärkemaß r berechnet, ein Maß für den statistischen Zusammenhang zweier Datensätze (siehe Anhang Tabelle 15).

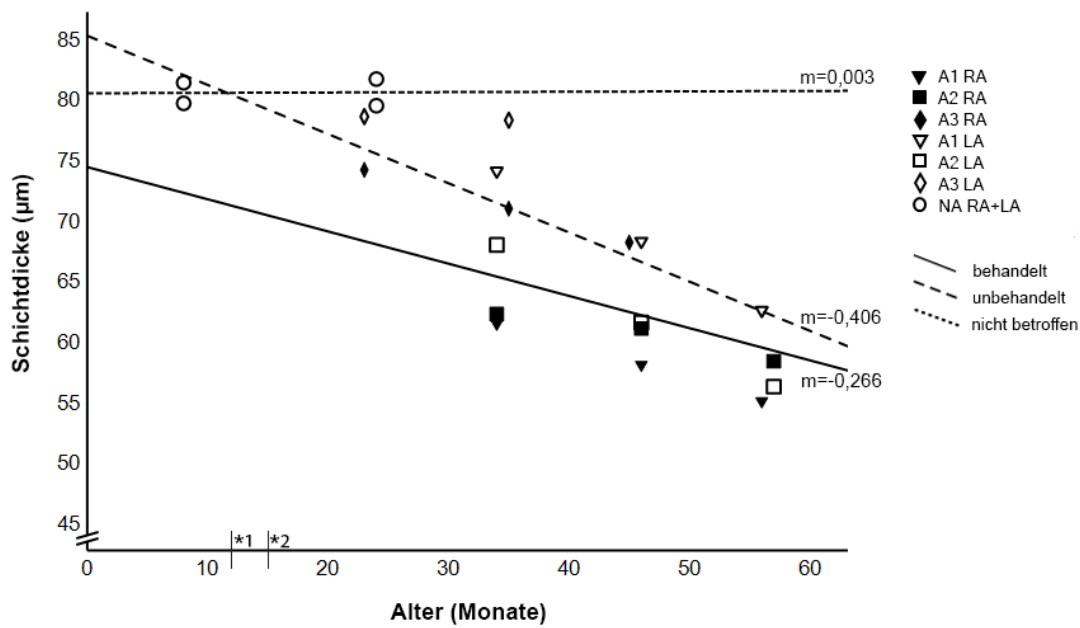
Bezüglich der ONL+ Schicht lagen mit Ausnahme des temporalen und nasalen Wertes des linken Auges von A3 zum ersten Messzeitpunkt alle Werte der Hunde A1, A2 und A3 bei $r > 0,1$. Dies beweist, dass der Zusammenhang, der über das standardisierte Effektstärkemaß r berechnet wurde, bedeutsam ist. Im Falle des gesunden Tieres NA, bei dem keine Veränderung der Schichtdicke über die Zeit erwartet wurde, lagen die berechneten r -Werte für die ONL+ des rechten und linken Auges sowohl nasal als auch temporal bei $r < 0,1$.

Bei der r -Wert-Berechnung der gesamten Retina der Hunde A1, A2 und A3 fielen sieben von 15 Werte in die Kategorie $r < 0,1$, wohingegen die Werte des Kontrolltieres NA bei $r > 0,1$ lagen. Bei der ETDRS-Grid-bezogenen Schichtdicke der gesamten Retina muss beachtet werden, dass auch das Tapetum lucidum miteinberechnet ist, da die Schichtgrenze zwischen RPE und Tapetum lucidum in den OCT-Aufnahmen nicht zu

unterscheiden war. Dieses weist in der zentralen superioren Retina eine einheitliche Dicke auf, jedoch können auch Unregelmäßigkeiten auftreten, die sich in der Gesamtdicke der Netzhaut widerspiegeln.

3.1.1 Analyse der temporalen und nasalen Schichtdicken der ONL+

A Streudiagramm mit Trendgeraden der ONL+ Schichtdicke für die temporalen Werte



B Streudiagramm mit Trendgeraden der ONL+ Schichtdicke für die nasalen Werte

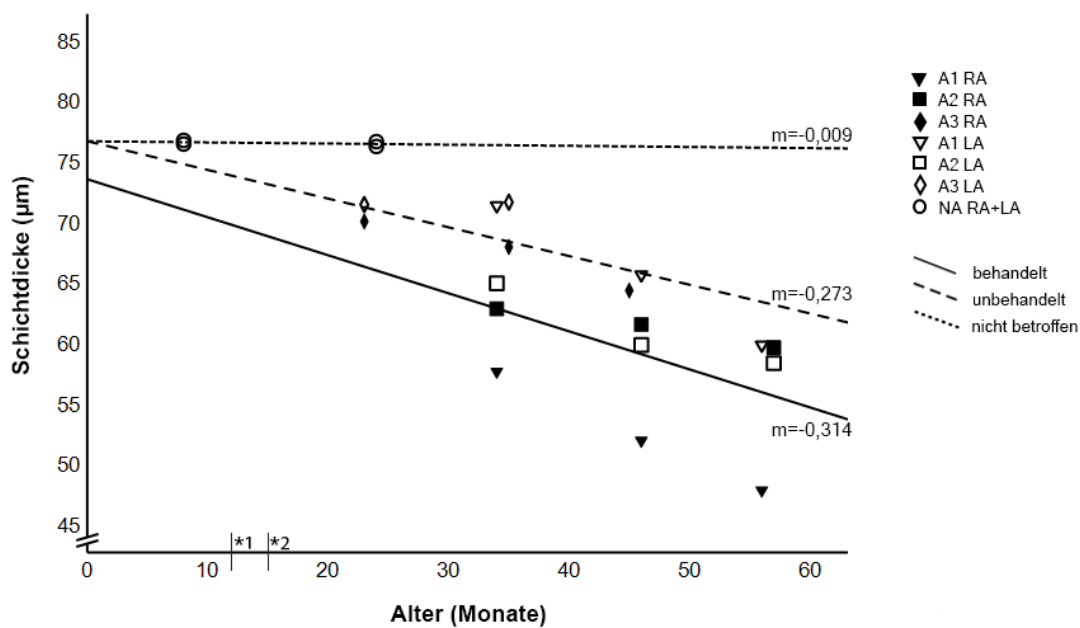


Abbildung 11: Streudiagramm mit Trendgeraden der ONL+ Schichtdicke für die temporalen und nasalen Werte

Darstellung der Schichtdickenveränderungen der ONL+ (ONL+: ONL+OLM+IS). Die schwarz ausgefüllten Symbole stehen für die RPE65^{-/-}-Augen, die genterapeutisch behandelt wurden (▼A1■A2♦A3). Die nicht ausgefüllten, schwarz umrandeten Symbole (▽A1□A2◇A3) repräsentieren die RPE65^{-/-}-Augen, die nicht behandelt wurden. Im Vergleich dazu die Schichtdicke der ONL+ des gesunden Kontrolltieres NA (○). Für NA wurden die Werte des rechten und linken Auges zusammengefasst und als vier Werte dargestellt.

A Steigung m der Geraden für behandelte Retinae m=-0,266, für unbehandelte Retinae m=-0,406 und für NA m=0,003.

B Steigung m der Geraden für behandelte Retinae m=-0,314, für unbehandelte Retinae m=-0,273 und für NA m=-0,009.

*1 genterapeutische Intervention des RA von A3 im Alter von 12 Monaten; *2 genterapeutische Intervention des RA von A1 und A2 im Alter von 15 Monaten; ONL: Äußere nukleäre Schicht; OLM: Äußere limitierende Membran; IS: Innensegment der Photorezeptoren; RA: rechtes Auge; LA: linkes Auge.

	Signifikanz-niveau	Partielles Eta-Quadrat		
Interaktion Schichtdicke mit Behandlung und Alter	0,275	0,107		
Interaktion Schichtdicke und Alter	0,001	0,655		
R ² des kompletten Modells R ² =0,911				
	Regressions-koeffizient B	95 % Konfidenzintervall Untergrenze	Obergrenze	Partielles Eta-Quadrat
Interaktion unbehandelte Retinae mit Alter	-0,406	-0,618	-0,193	0,616
Interaktion behandelte Retinae mit Alter	-0,266	-0,473	-0,059	0,421

Tabelle 9: Wichtige Parameter der ANCOVA für ONL+ temporal

	Signifikanz-niveau	Partielles Eta-Quadrat		
Interaktion Schichtdicke mit Behandlung und Alter	0,827	0,005		
Interaktion Schichtdicke und Alter	0,022	0,390		
R ² des kompletten Modells R ² =0,753				
	Regressions-koeffizient B	95 % Konfidenzintervall Untergrenze	Obergrenze	Partielles Eta-Quadrat
Interaktion unbehandelte Retinae mit Alter	-0,273	-0,593	0,047	0,243
Interaktion behandelte Retinae mit Alter	-0,314	-0,626	-0,003	0,309

Tabelle 10: Wichtige Parameter der ANCOVA für ONL+ nasal

Bei der Durchführung der ANCOVA mit der Schichtdicke als abhängige Variable und dem Alter des Tieres als Kovariate zeigte sich, dass die Entwicklung der Schichtdicke

für ONL+ temporal über die Zeit nicht signifikant unterschiedlich ist für erkrankte behandelte und erkrankte nicht behandelte Retinae mit $p=0,275$. Die zugehörige Varianzaufklärung mit 10,7 % kann als mittelstarker Effekt interpretiert werden. Der Zusammenhang zwischen Alter und Schichtdicke ist jedoch insgesamt über beide Gruppen, behandelte und unbehandelte Retinae, hoch signifikant und stark. Dies bedeutet, dass sich die Werte für die Schichtdicke signifikant über die Zeit hinweg mit $p=0,001$ ändern, mit einer Varianzaufklärung von 65,5 %. Das Signifikanzniveau wurde auf $p\leq 0,05$ festgelegt.

Der bei der ANCOVA zusätzlich berechnete Regressionskoeffizient B ist ein Maß der Stärke des Zusammenhangs, der die Steigungen der im Diagramm dargestellten Geraden angibt. Er drückt bei negativem Vorzeichen aus, um wie viel μm die Schichtdicke pro Monat abnimmt, bei positivem Vorzeichen gibt er die Zunahme pro Monat an. Für die Werte der ONL+ Schichtdicke temporal der nicht behandelten Retinae ergibt sich ein Wert von -0,406 (95%-Konfidenzintervall: Untergrenze -0,618 und Obergrenze -0,193), während für die behandelten Retinae der Wert von -0,266 (95%-Konfidenzintervall: Untergrenze -0,473 und Obergrenze -0,059) berechnet wurde. Zwar zeigt sich somit deskriptiv eine stärkere Abnahme im nicht behandelten Auge, da jedoch $p=0,275$ für die Interaktion ist, kann der Unterschied der beiden Steigungen nicht als statistisch gesichert angesehen werden. Das Bestimmtheitsmaß R^2 gibt an, dass insgesamt 91,1 % der Daten durch dieses Model erklärt werden können.

Für die nasalen Werte genauso wie für die temporalen gilt, dass die Entwicklung der Schichtdicke über die Zeit nicht signifikant unterschiedlich für erkrankte behandelte und erkrankte nicht behandelte Retinae mit $p=0,827$ ist. Die entsprechende Varianzaufklärung mit 0,5 % deutet auf einen schwachen Effekt hin. Der Zusammenhang zwischen Alter und Schichtdicke ist jedoch, genauso wie temporal, insgesamt über beide Gruppen behandelte und unbehandelt Retinae signifikant und stark mit $p=0,022$ und der Varianzaufklärung von 39,0 %. Der Regressionskoeffizient B zeigte für die Werte der ONL+ Schichtdicke nasal für die nicht behandelten Retinae einen Wert von -0,273 (95%-Konfidenzintervall: Untergrenze -0,593 und Obergrenze 0,047). Für die behandelten Retinae wurde der Wert von -0,314 (95%-Konfidenzintervall: Untergrenze -0,626 und Obergrenze -0,003) berechnet. Da $p=0,827$ für die Interaktion beträgt, ist der Unterschied der beiden Steigungen nicht statistisch gesichert. Es können $R^2=75,3$ % der Daten insgesamt durch dieses Modell erklärt werden.

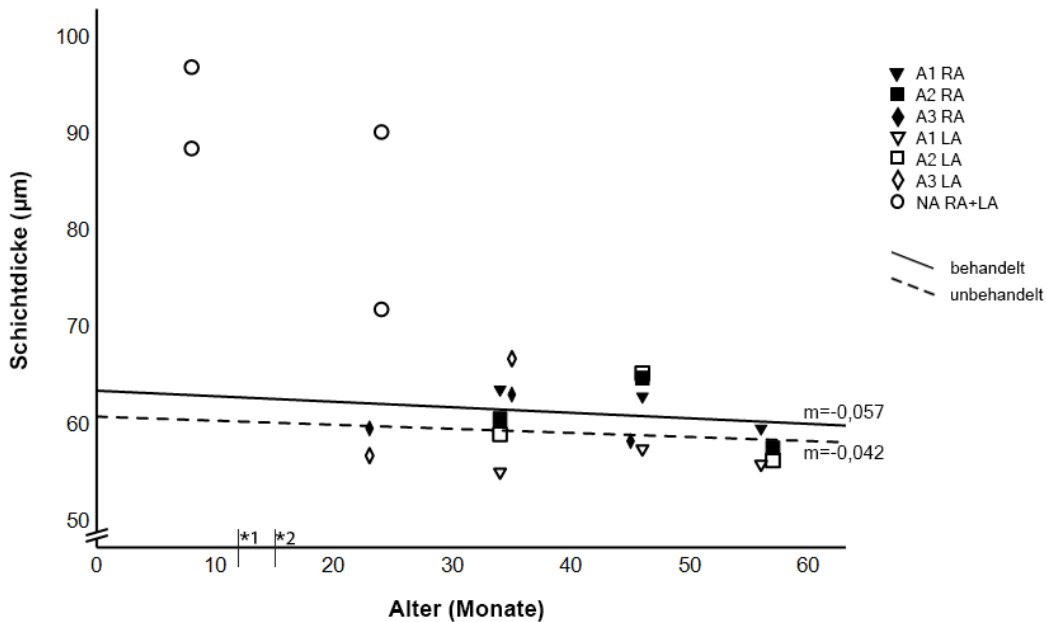
Um die Abhängigkeit in den Daten zu berücksichtigen, die sich dadurch ergeben, dass jedes Tier mit mehreren Messwerten in die Analyse eingeht, wurde Tier als fester Faktor mitmodelliert. Dies gilt für alle folgenden ANCOVA-Analysen.

3.1.1.1 Vergleich der ONL+ Schichtdicke von A1, A2 und A3 mit NA

Die Differenzierung zwischen rechtem und linkem Auge des gesunden Kontrolltiers NA war nicht relevant, weshalb die Werte zusammengefasst wurden. Sowohl die temporalen als auch nasalen Werte der ONL+ Schichtdicke des rechten und linken Auges von NA zeigen zu den zwei Untersuchungszeitpunkten nur kleinste Veränderungen, sodass von einer Nullentwicklung der Schichtdickendifferenz der Retinae ausgegangen werden kann. Die Steigung der Geraden beträgt für die temporalen Werte $m=0,003$ und für die nasalen $m=-0,009$. So können die Ergebnisse der ANCOVA-Berechnungen von A1, A2 und A3 gegen Null getestet werden, um einen Vergleich mit NA herzustellen. Dies entspricht den schon dargestellten Ergebnissen in Abschnitt 3.1.1.

3.1.2 Analyse der temporalen und nasalen Schichtdicken der ISe+

A Streudiagramm mit Trendgeraden der ISe+ Schichtdicke für die temporalen Werte



B Streudiagramm mit Trendgeraden der ISe+ Schichtdicke für die nasalen Werte

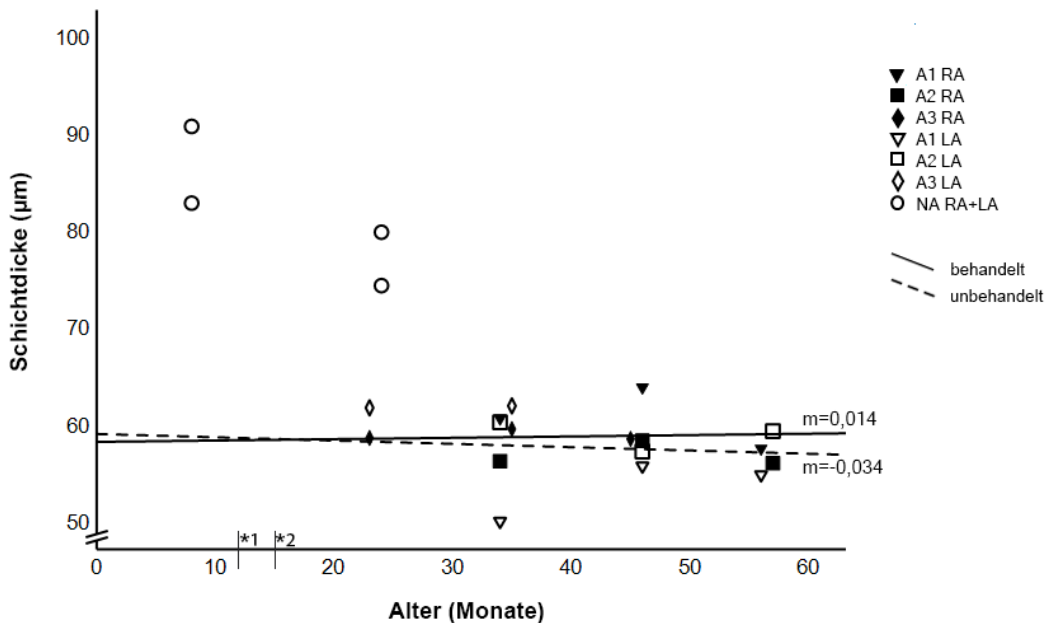


Abbildung 12: Streudiagramm mit Trendgeraden der ISe+ Schichtdicke für die temporalen und nasalen Werte

Darstellung der Schichtdickenveränderungen der ISe+ Schicht (ISe+: ISe+OS+RPE+TL). Die schwarz ausgefüllten Symbole stehen für die RPE65^{-/-}-Augen, die gentherapeutisch behandelt wurden (▼A1■A2◆A3). Die nicht ausgefüllten, schwarz umrandeten Symbole (▽A1□A2◇A3) repräsentieren die RPE65^{-/-}-Augen, die nicht behandelt wurden. Für NA wurden die Werte des rechten und linken Auges zusammengefasst und als vier Werte dargestellt (○).

A Steigung m der Geraden für behandelte Retinae $m=-0,057$, für unbehandelte Retinae

m=-0,042.

B Steigung m der Geraden für behandelte Retinae m=0,014, für unbehandelte Retinae m=-0,034.

*1 genterapeutische Intervention des RA von A3 im Alter von 12 Monaten; *2 genterapeutische Intervention des RA von A1 und A2 im Alter von 15 Monaten; ISe: Ellipsoid der Innensegmente; OS: Außensegment der Photorezeptoren; RPE: retinales Pigmentepithel; TL: Tapetum lucidum; RA: rechtes Auge; LA: linkes Auge.

	Signifikanz-niveau	Partielles Eta-Quadrat		
Interaktion Schichtdicke mit Behandlung und Alter	0,933	0,001		
Interaktion Schichtdicke und Alter	0,659	0,018		
R ² des kompletten Modells R ² =0,146				
	Regressionskoeffizient B	95 % Konfidenzintervall Untergrenze	Obergrenze	Partielles Eta-Quadrat
Interaktion unbehandelte Retinae mit Alter	-0,042	-0,359	0,275	0,008
Interaktion behandelte Retinae mit Alter	-0,057	-0,366	0,251	0,015

Tabelle 11: Wichtige Parameter der ANCOVA für ISe+ temporal

	Signifikanz-niveau	Partielles Eta-Quadrat		
Interaktion Schichtdicke mit Behandlung und Alter	0,767	0,008		
Interaktion Schichtdicke und Alter	0,915	0,001		
R ² des kompletten Modells R ² =0,184				
	Regressionskoeffizient B	95 % Konfidenzintervall Untergrenze	Obergrenze	Partielles Eta-Quadrat
Interaktion unbehandelte Retinae mit Alter	-0,034	-0,310	0,241	0,007
Interaktion behandelte Retinae mit Alter	0,014	-0,255	0,282	0,001

Tabelle 12: Wichtige Parameter der ANCOVA für ISe+ nasal

Die ANCOVA-Analyse für die Werte der ISe+ Schichtdicke temporal zeigte, dass die Entwicklung der Schichtdicke für erkrankte behandelte und erkrankte nicht behandelte Retinae mit p=0,933 über die Zeit nicht signifikant unterschiedlich ist und eine sehr schwache Varianzaufklärung von 0,1 % besteht. Für die nasalen Schichtdickenwerte gilt das Gleiche mit p=0,767 und einer sehr schwachen Varianzaufklärung von 0,8 %. Der Zusammenhang zwischen Alter und Schichtdicke für die temporalen Werte ist über beide Gruppen, behandelte und unbehandelte Retinae, nicht signifikant und schwach, d. h. die

Änderung der Werte für die Schichtdicke liegt im Zufallsbereich $p=0,659$ mit einer Varianzaufklärung von 1,8 %. Dies ist auch für die nasalen Werte der Fall mit $p=0,915$ und einer Varianzaufklärung von 0,1 %.

Die Werte für den Regressionskoeffizient B der temporalen Messungen lagen nahe beieinander, für die unbehandelten Retinae wurde ein Wert von $-0,042$ (95%-Konfidenzintervall: Untergrenze $-0,359$ und Obergrenze $0,275$) und für die behandelten Retinae ein Wert von $-0,057$ (95%-Konfidenzintervall: Untergrenze $-0,366$ und Obergrenze $0,251$) berechnet. Mit $p=0,933$ liegt der Unterschied der beiden Steigungen im Zufallsbereich. Für das gesamte Modell der temporalen Werte der ISe+ wurde ein R^2 von 14,6 % berechnet.

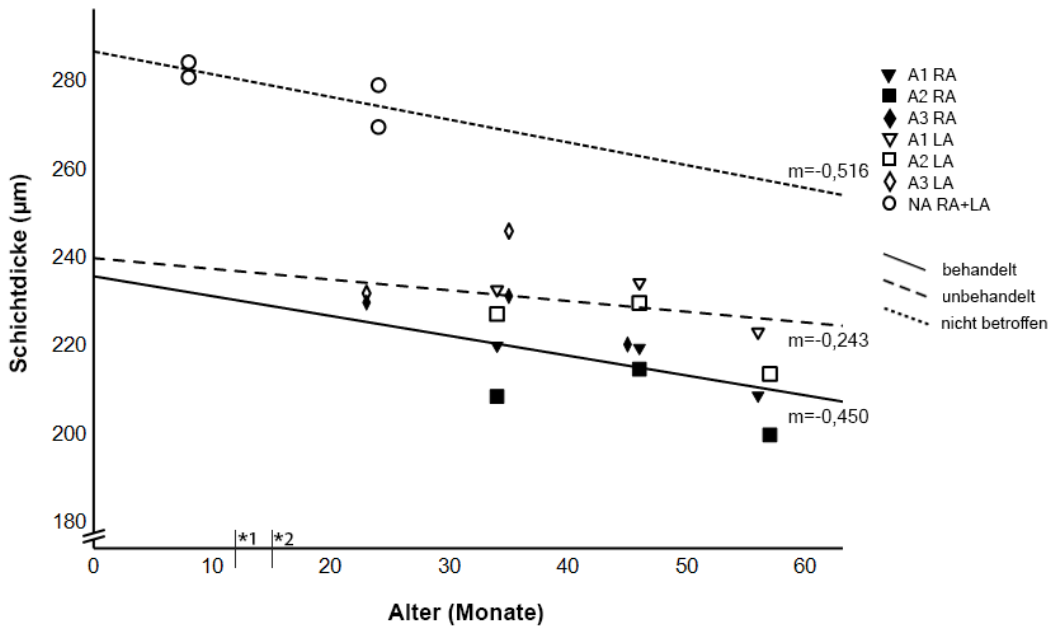
Der Regressionskoeffizient B zeigte für die Werte der ISe+ Schichtdicke nasal für die unbehandelten Retinae einen Wert von $-0,034$ (95%-Konfidenzintervall: Untergrenze $-0,310$ und Obergrenze $0,241$) und für die behandelten Retinae einen Wert von $0,014$ (95%-Konfidenzintervall: Untergrenze $-0,255$ und Obergrenze $0,282$). Mit $p=0,767$ für die Interaktion liegen die Werte im Zufallsbereich. Es können $R^2=18,4$ % der Daten durch dieses Modell für die nasalen Werte der ISe+ erklärt werden.

3.1.2.1 Vergleich der ISe+ Schichtdicke von A1, A2 und A3 mit NA

Die Unterscheidung der Schichtdickenwerte für die ISe+ des rechten und linken Auges des gesunden Kontrolltieres war für die Analyse nicht relevant, sodass sie zusammengefasst wurden. Es erfolgte lediglich die Einteilung in nasal und temporal. Da diese Werte jedoch zu den zwei Untersuchungszeitpunkten deutliche Veränderungen zeigten, wurde keine Trendgerade erstellt. Die berechnete Steigung für die temporalen Werte der ISe+ liegt bei $m=-0,73$, für die nasalen bei $m=-0,61$. Aufgrund der starken Heterogenität der Einzelwerte bei kleiner Messanzahl können diese Werte nicht für die Analyse genutzt werden. Somit kann hier kein Vergleich zwischen A1, A2 und A3 mit NA stattfinden.

3.1.3 Analyse der temporalen und nasalen Schichtdicken der gesamten Retina

A Streudiagramm mit Trendgeraden der Schichtdicke der gesamten Retina für die temporalen Werte



B Streudiagramm mit Trendgeraden der Schichtdicke der gesamten Retina für die nasalen Werte

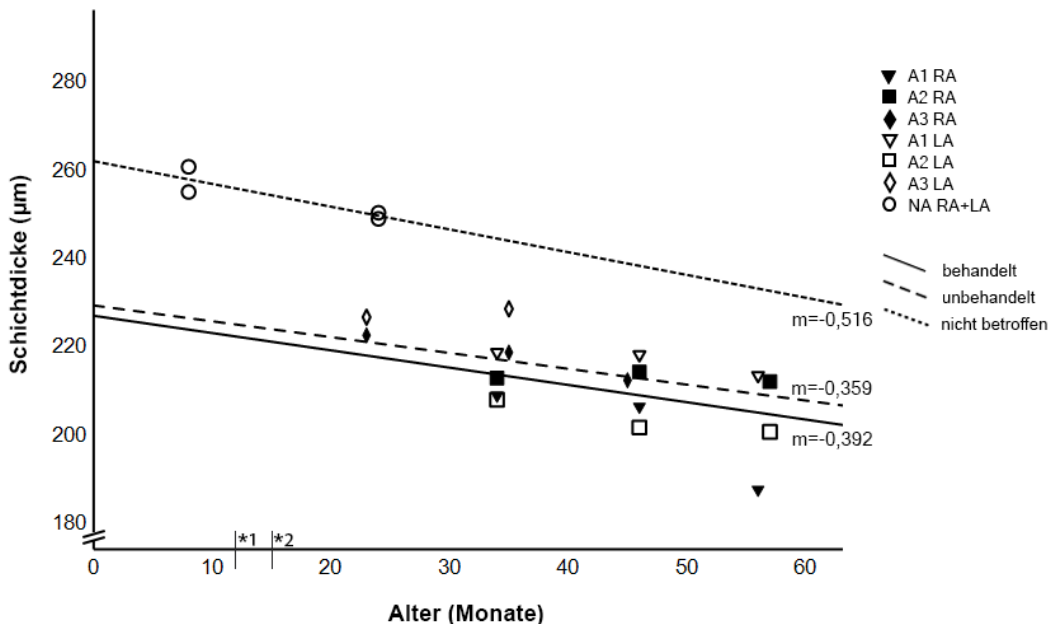


Abbildung 13: Streudiagramm mit Trendgeraden der Schichtdicke der gesamten Retina für die temporalen und nasalen Werte

Darstellung der Schichtdickenveränderungen der temporalen und nasalen Werte der gesamten Retina mit Tapetum lucidum. Die schwarz ausgefüllten Symbole stehen für die RPE65^{-/-}-Augen die gentherapeutisch behandelt wurden (▼A1■A2◆A3). Die nicht ausgefüllten, schwarz umrandeten Symbole (▽A1□A2◇A3) repräsentieren die RPE65^{-/-}-Augen, die nicht behandelt

wurden. Im Vergleich dazu die Schichtdicke der gesamten Retina des gesunden Kontrolltieres NA (○). Für NA wurden die Werte des rechten und linken Auges zusammengefasst und als vier Werte dargestellt. Sowohl nasal als auch temporal ist auffällig, dass die Dicke der gesamten Retina häufig vom ersten zum zweiten Untersuchungszeitpunkt der Tiere A1, A2 und A3 zunächst leicht zunimmt, bevor sie wieder abnimmt.

A Steigung m der Geraden für behandelte Retinae $m=-0,450$, für unbehandelte Retinae $m=-0,243$ und für NA $m=-0,516$.

B Steigung m der Geraden für behandelte Retinae $m=-0,392$, für unbehandelte Retinae $m=-0,359$ und für NA $m=-0,516$.

*1 gentherapeutische Intervention des RA von A3 im Alter von 12 Monaten; *2 gentherapeutische Intervention des RA von A1 und A2 im Alter von 15 Monaten; RA: rechtes Auge; LA: linkes Auge.

	Signifikanz-niveau	Partielles Eta-Quadrat		
Interaktion Schichtdicke mit Behandlung und Alter	0,465	0,050		
Interaktion Schichtdicke und Alter	0,061	0,283		
R ² des kompletten Modells R ² =0,808				
	Regressions-koeffizient B	95 % Konfidenzintervall Untergrenze	Obergrenze	Partielles Eta-Quadrat
Interaktion unbehandelte Retinae mit Alter	-0,243	-0,723	0,238	0,101
Interaktion behandelte Retinae mit Alter	-0,450	-0,919	0,018	0,290

Tabelle 13: Wichtige Parameter der ANCOVA für die gesamte Retina temporale Werte

	Signifikanz-niveau	Partielles Eta-Quadrat		
Interaktion Schichtdicke mit Behandlung und Alter	0,929	0,001		
Interaktion Schichtdicke und Alter	0,114	0,212		
R ² des kompletten Modells R ² =0,563				
	Regressions-koeffizient B	95 % Konfidenzintervall Untergrenze	Obergrenze	Partielles Eta-Quadrat
Interaktion unbehandelte Retinae mit Alter	-0,359	-0,990	0,273	0,124
Interaktion behandelte Retinae mit Alter	-0,392	-1,006	0,223	0,152

Tabelle 14: Wichtige Parameter der ANCOVA für die gesamte Retina nasale Werte

Die Analyse der Werte für die gesamte Retina temporal stellte die Entwicklung der Schichtdicke über die Zeit als nicht signifikant unterschiedlich zwischen erkrankten behandelten und erkrankten nicht behandelten Retinae dar mit $p=0,465$ und einer schwachen Varianzaufklärung von 5,0 %. Dies gilt auch für die Analyse der nasalen Werte der gesamten Retina mit $p=0,929$ und der Varianzaufklärung von 0,1 %, die als sehr schwacher Effekt interpretiert werden kann. Der Zusammenhang zwischen Alter

und Schichtdicke ist insgesamt über beide Gruppen behandelte und unbehandelt Retinae temporal, nicht signifikant und schwach, d. h. die Änderung der Werte für die Schichtdicke liegt im Zufallsbereich mit $p=0,061$ und mit einer Varianzaufklärung von 28,3 %. Die gleiche Aussage kann für die nasalen Werte mit $p=0,114$ und der Varianzaufklärung von 21,2 % getroffen werden.

Der Regressionskoeffizient B ergab für die temporalen Werte der Schichtdicke der gesamten Retina für die nicht behandelten Retinae einen Wert von -0,243 (95%-Konfidenzintervall: Untergrenze -0,723 und Obergrenze 0,238) und für die behandelten Retinae einen Wert von -0,450 (95%-Konfidenzintervall: Untergrenze -0,919 und Obergrenze 0,018). Mit $p=0,465$ für die Interaktion ist der Unterschied der beiden Steigungen nicht statistisch signifikant und liegt somit im Zufallsbereich. Durch dieses Modell konnten insgesamt 80,8 % der Daten erklärt werden.

Der Regressionskoeffizient B zeigte für die nasalen Werte der gesamten Retina für die nicht behandelten Retinae einen Wert von -0,359 (95%-Konfidenzintervall: Untergrenze -0,990 und Obergrenze 0,273), für die behandelten Retinae wurde der Wert von -0,392 (95%-Konfidenzintervall: Untergrenze -1,006 und Obergrenze 0,223) berechnet. Da $p=0,929$ für die Interaktion beträgt, ist der Unterschied der beiden Steigungen nicht statistisch gesichert und liegt somit auch für die nasalen Werte im Zufallsbereich. Es können hier $R^2=56,3$ % der Daten insgesamt durch dieses Modell erklärt werden.

3.1.3.1 Vergleich der Schichtdicken der gesamten Retina von A1, A2 und A3 mit NA

Ebenso wie für die Analyse der einzelnen Schichten war die Differenzierung zwischen rechtem und linkem Auge der gesamten Retina des gesunden Kontrolltieres NA nicht relevant.

Die Steigung der Geraden für die temporalen und nasalen Werte beträgt $m=-0,516$. Die Schichtdicke für die nasalen Werte ist jedoch um etwa 25 μm dünner. Da vier Werte, die sich stark unterscheiden, nicht ausreichend sind, um sichere Aussagen über die Entwicklung der Schichtdicke der gesamten Retina zu treffen, können auch hier die Werte von NA nicht mit denen von A1, A2 und A3 verglichen werden. Die Geraden in den Streudiagrammen gelten der Veranschaulichung.

3.2 Vergleichende Analysen retinaler Strukturen der RPE65^{-/-}- Hunde und des gesunden Kontrolltieres

3.2.1 Immunhistochemischer Nachweis der AAV-vermittelten RPE65-Gentherapie

Die Herstellung von Kryostatschnitten der Augen von A1 und A3 diente dem immunhistochemischen Nachweis des Erfolgs der AAV-basierten RPE65-Gentherapie. Um Aussagen über einen möglichst großen Bereich treffen zu können, wurden Schnitte mit unterschiedlich großem Abstand zur Sehnervenpapille ausgewählt. Für die behandelten rechten Augen lagen diese im transduzierten Bereich, der durch die Injektionsblase definiert wurde. Zusätzlich wurde die Einteilung in nasal und temporal der Sehnervenpapille, wie bereits aus der OCT-Auswertung bekannt, wenn möglich beibehalten.

Es wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen RPE65 und einem polyklonalen Antikörper gegen GFAP (glial fibrillary acidic protein) gearbeitet. Dabei erfolgte der spezifische Nachweis von RPE65, der Isomerohydrolase des klassischen visuellen Zyklus, im retinalen Pigmentepithel, da der Vektor rAAV2/4 nur das RPE transduziert. GFAP ist ein Protein, welches vor allem in den Intermediärfilamenten von Gliazellen vorkommt. Der Antikörper gegen GFAP färbt in der Retina somit Müllerzellen an, die sich von der inneren bis zur äußeren Gliagrenzmembran erstrecken. Zusätzlich exprimieren auch Astrozyten, die an der Aufrechterhaltung der Blut-Retina-Schranke beteiligt sind, GFAP und werden durch diese Färbung dargestellt. Die Färbung dient dem Nachweis der Veränderung dieser Zellen in Bezug auf die fortschreitende Erkrankung. So kann es bei einer reaktiven Gliose zu einer verstärkten GFAP-Produktion kommen. Für diese Arbeit war vor allem der Nachweis von RPE65 von Bedeutung, sodass bei der Erstellung der Z-Stacks mit dem Mikroskop nur ein Ausschnitt des 15 µm dicken Schnitts gezeigt wird. Deswegen besteht die Möglichkeit, dass die GFAP-Färbung nicht vollständig in den Abbildungen aufgenommen wurde.

In den Abbildungen 14, 15 und 17 sind repräsentative Färbungen der behandelten Augen zu sehen. Der Erfolg der Gentherapie wird durch die Expression des gesunden RPE65-Proteins gekennzeichnet, wobei nicht jede RPE-Zelle in dem behandelten Bereich das Protein exprimiert. Somit war innerhalb des behandelten Bereiches die Intensität und das Ausmaß der Färbung nicht homogen, sondern von Zelle zu Zelle verschieden. Wurde der Vektor von den Zellen aufgenommen, zeigt sich bei Bindung mit dem Antikörper eine einheitliche Färbung des gesamten Zytosols. In den unbehandelten RPE65^{-/-}-Augen hingegen, Abbildung 16 und 18, konnte in verschiedenen

Kryostatschnitten beider Hunde A1 und A3 kein RPE65 nachgewiesen werden. GFAP konnte in den Müllerzellen und Astrozyten aller Augen dargestellt werden. Färbungen ohne Primärantikörper dienten dem Ausschluss unspezifischer Färbeergebnisse der Alexa Fluorochrome. Jede Antikörper-Aufnahme wurde mit einem Ausschnitt der DAPI-Aufnahme, die die Zellkerne in den folgenden Abbildungen blau erscheinen lässt, am rechten seitlichen Bildrand überlagert. Dies diente zur besseren Orientierung innerhalb der Retina.

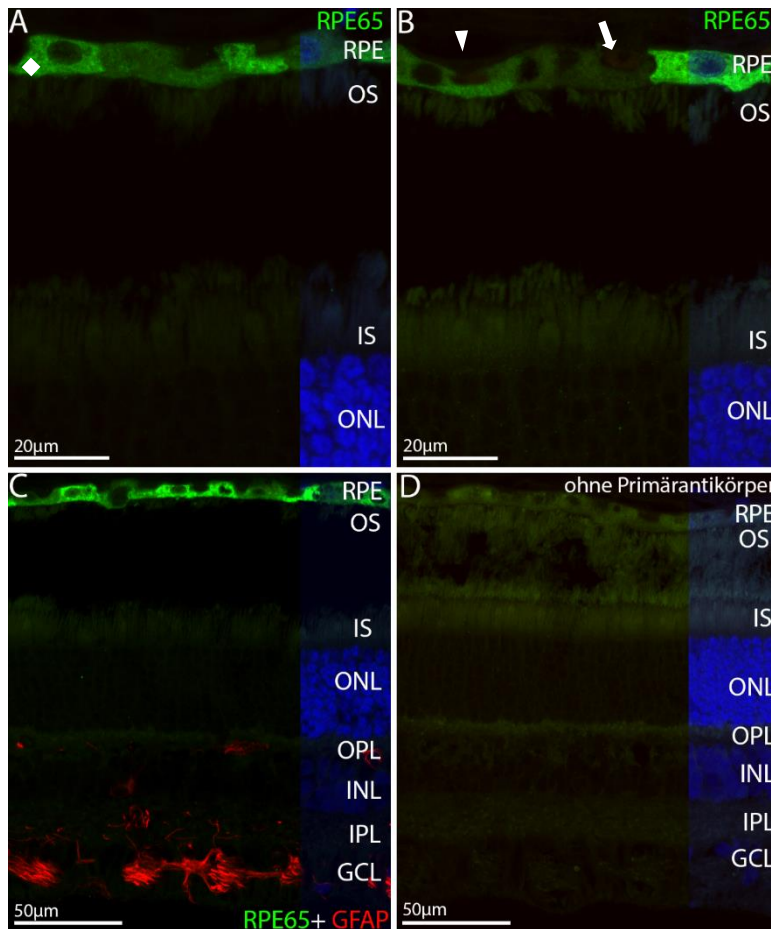


Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung mit RPE65 und GFAP (RA von A1; Teil 1)

A, B und **C** liegen etwa 3,0 mm superior der Papille, **D** bei 2,7 mm. **A** temporal und **B** nasal der Papille. Beide Aufnahmen zeigen, dass Zellen des RPE RPE65 exprimieren. In **C** (nasal) ist die gesamte Retina zu sehen. RPE65 ist in grün und GFAP in rot dargestellt. **D** (nasal) ohne Primärantikörper, um unspezifische Färbeergebnisse auszuschließen. **A** (◇) Zelle mit deutlicher RPE65-Expression; **B** (▽) dezente RPE65-Expression; (⇒) fehlende RPE65-Expression. DAPI-Färbung der Zellkerne in blau. RPE: Retinales Pigmentepithel; OS: Außensegment der Photorezeptoren; IS: Innensegment der Photorezeptoren; ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht; IPL: Innere plexiforme Schicht; GCL: Ganglienzellschicht; RA: rechtes Auge.

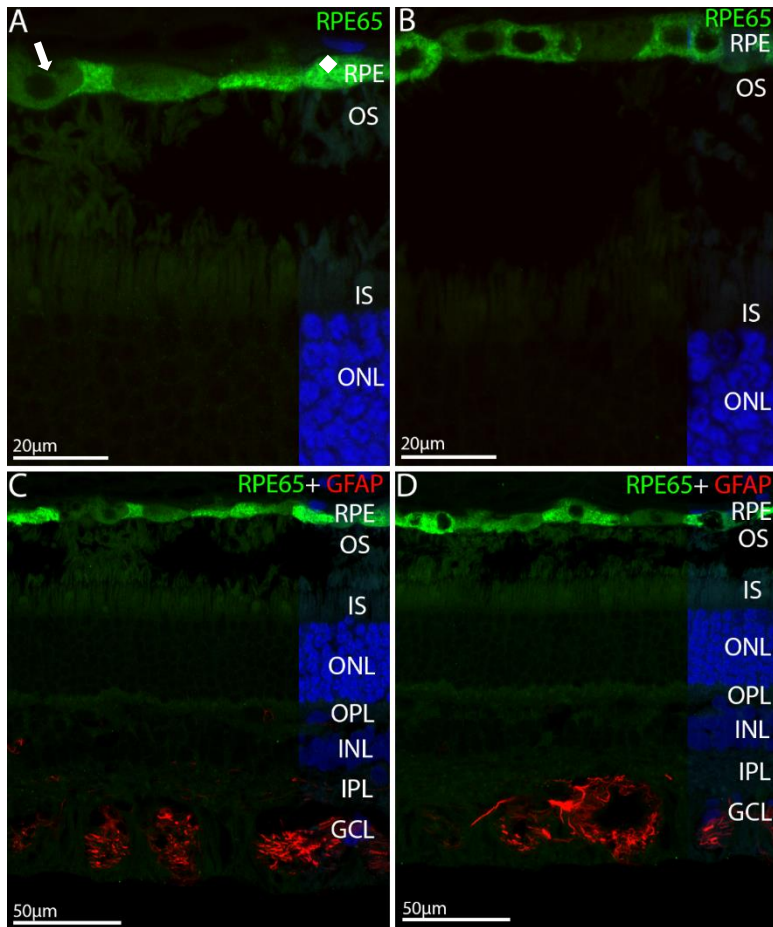


Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbung mit RPE65 und GFAP (RA von A1; Teil 2)

A, B, C und **D** liegen etwa 5,4 mm superior der Papille

A und **C** temporal der Papille

B und **D** nasal der Papille

RPE65 wird unterschiedlich stark von den RPE-Zellen exprimiert. **A** (◇) Zelle mit starker RPE65-Expression; (⇒) fehlende RPE65-Expression. GFAP-Signal der Müllerzellen in der GCL. RPE65 ist in grün und GFAP in rot dargestellt. Die DAPI-Färbung der Zellkerne ist blau dargestellt. RPE: Retinales Pigmentepithel; OS: Außensegment der Photorezeptoren; IS: Innensegment der Photorezeptoren; ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht; IPL: Innere plexiforme Schicht; GCL: Ganglienzellschicht; RA: rechtes Auge.

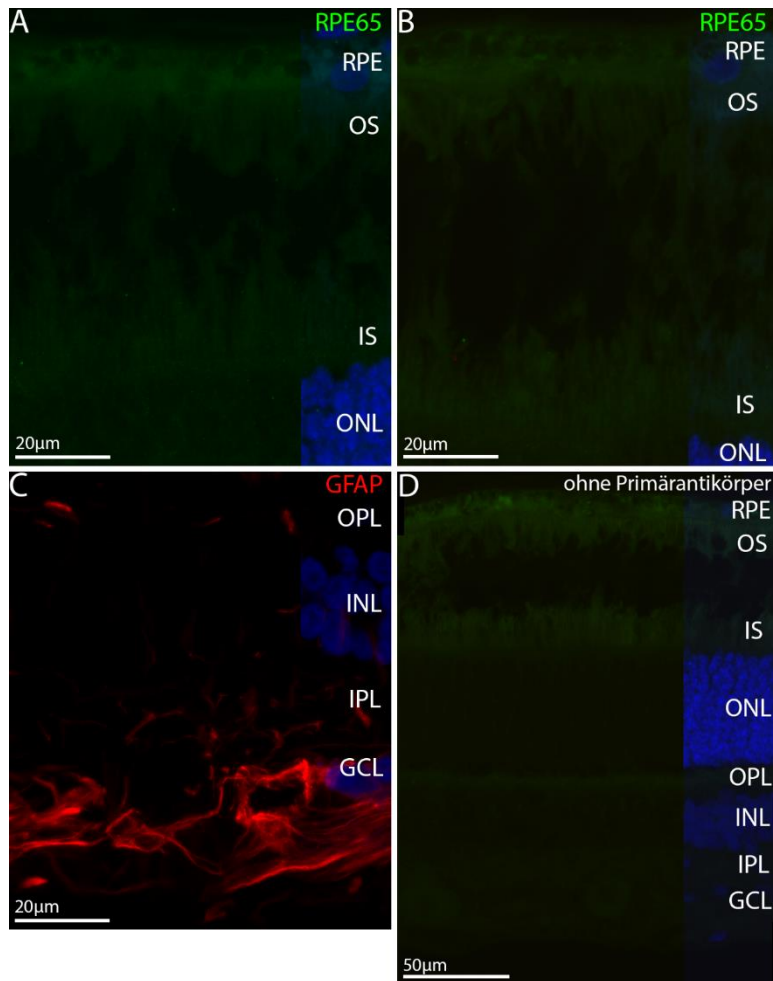


Abbildung 16: Immunfluoreszenzfärbung mit RPE65 und GFAP (LA von A1)

A, C und **D** liegen nasal der Sehnervenpapille, **B** temporal davon.

A und **C** liegen etwa 0,45 mm, **B** liegt 0,83 mm und **D** 0,38 mm superior der Sehnervenpapille.

Das linke Auge wurde nicht therapiert und zeigt hier (**A+B**) keine Expression von RPE65. In **C** ist das GFAP-Signal der Müllerzellen in der GCL zu erkennen. Die Image-Merge-Aufnahme in **D** dient der Darstellung der gesamten Retina, die ohne Primärantikörper unspezifische Färberegebnisse ausschließen sollte. Die DAPI-Färbung der Zellkerne ist blau dargestellt. RPE: Retinales Pigmentepithel; OS: Außensegment der Photorezeptoren; IS: Innensegment der Photorezeptoren; ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht; IPL: Innere plexiforme Schicht; GCL: Ganglienzellschicht; LA: linkes Auge.

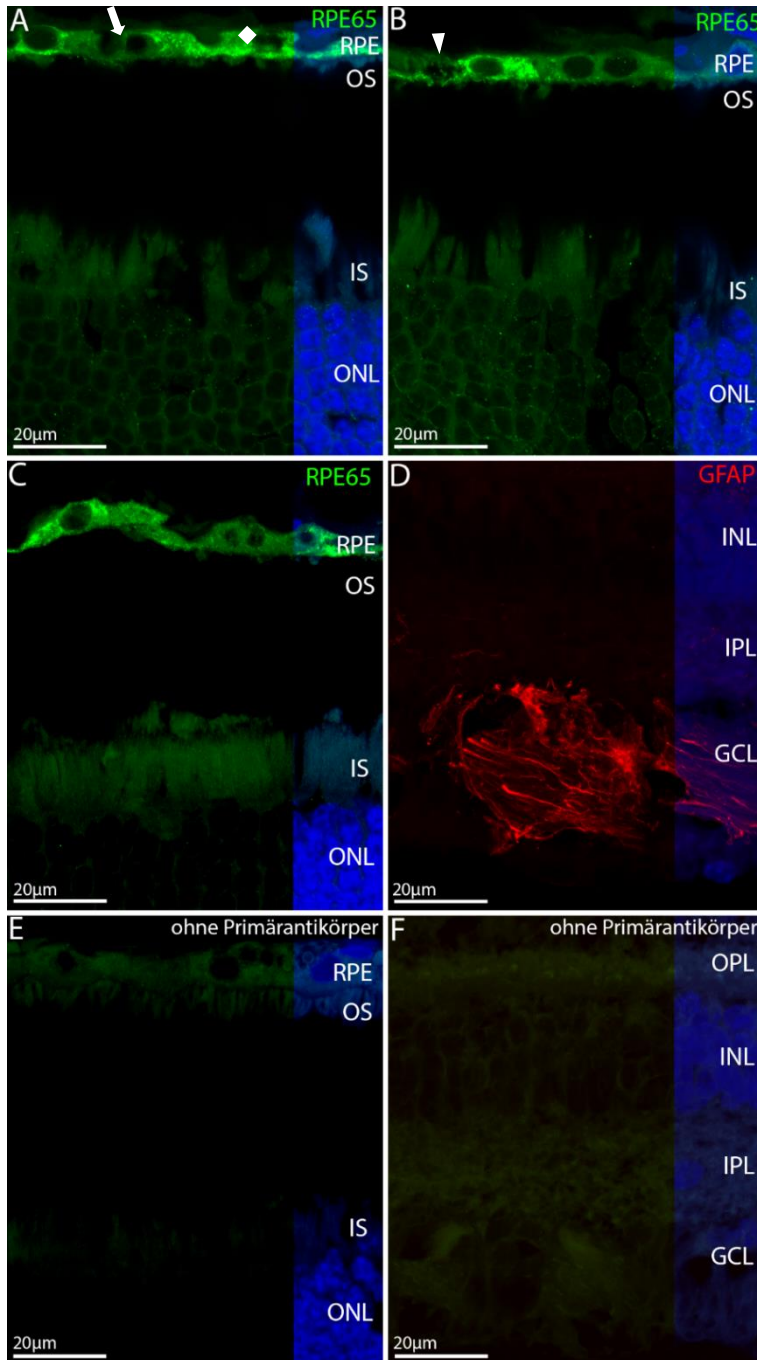


Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung mit RPE65 und GFAP (RA von A3)

Die RPE65-Gentherapie war auch in dem behandelten rechten Auge von A3 erfolgreich. RPE65 wird im transduzierten Bereich (**A**, **B**, **C**) exprimiert und grün dargestellt. **A** temporal und **B** nasal liegen etwa 2,16 mm, **C** temporal etwa 6,00 mm superior der Sehnervenpapille. Somit konnte nachgewiesen werden, dass alle Zellen, die in Kontakt mit dem rAAV2/4-Vektor gekommen sind und diesen aufgenommen haben, RPE65 exprimieren. **A** (◇) Zelle mit deutlicher RPE65-Expression; (⇒) fehlende RPE65-Expression **B** (▽) dezente RPE65-Expression. **D** nasal etwa 1,38 mm superior der Sehnervenpapille, zeigt die GFAP-Färbung (rot) der Müllerzellen in der GCL.

E und **F** (beide nasal) liegen etwa 0,78 mm superior der Sehnervenpapille, die Aufnahmen ohne Primärantikörper dienten dem Ausschluss unspezifischer Färbeergebnisse. Die DAPI-Färbung der Zellkerne ist blau dargestellt. RPE: Retinales Pigmentepithel; OS: Außensegment der Photorezeptoren; IS: Innensegment der Photorezeptoren; ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht; IPL: Innere plexiforme Schicht; GCL: Ganglienzellschicht; RA: rechtes Auge.

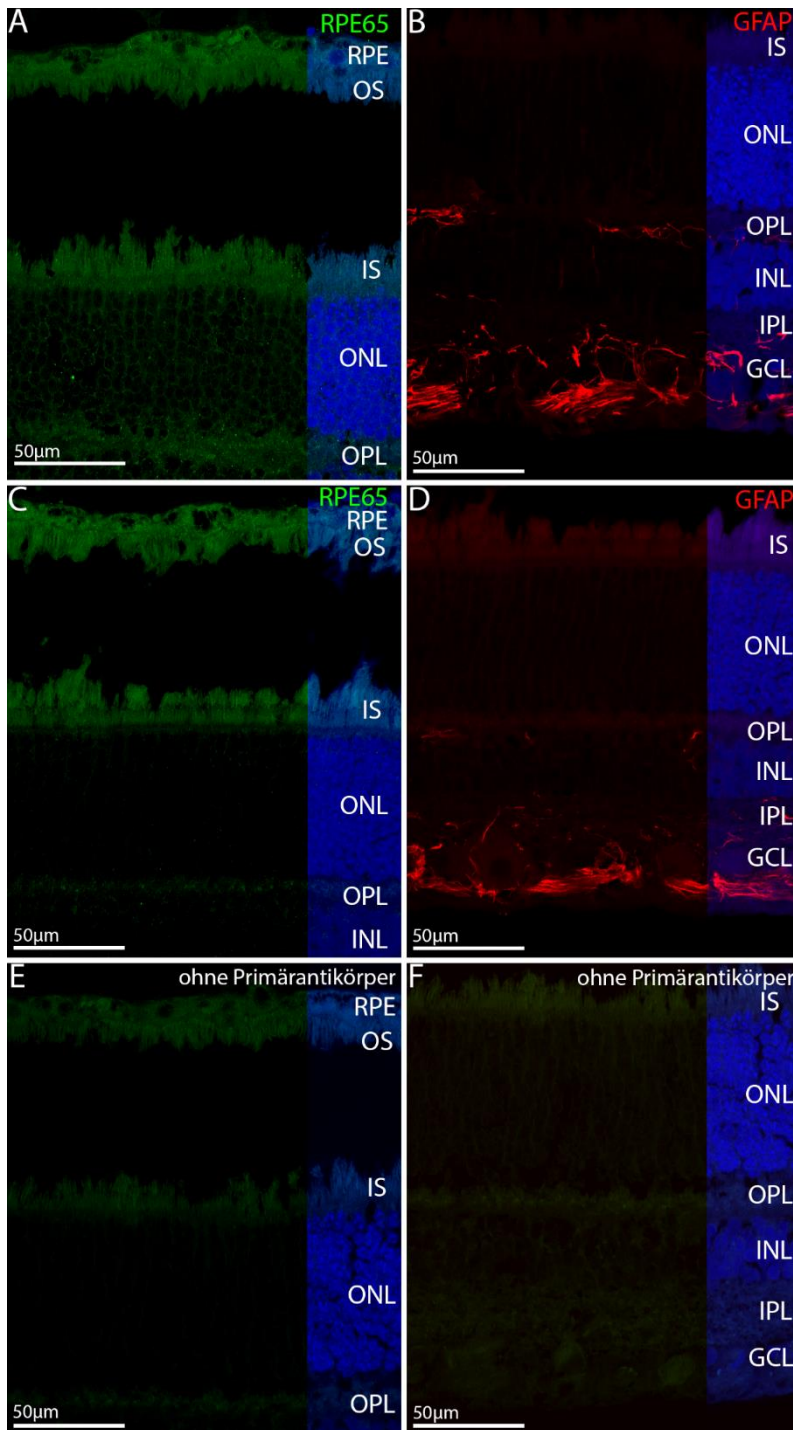


Abbildung 18: Immunfluoreszenzfärbung mit RPE65 und GFAP (LA von A3)

Das linke Auge von A3 wurde nicht therapiert und zeigt deutlich die Abwesenheit von RPE65 in den Aufnahmen **A** und **C**. In **B** und **D** ist das GFAP-Signal der Müllerzellen in der GCL und vereinzelt in der OPL zu erkennen. **A** und **B** beide Aufnahmen temporal 0,18 mm superior der Sehnervenpapille. **C** und **D** beide Aufnahmen nasal und 2,04 mm superior der Sehnervenpapille. **E** (RPE65) und **F** (GFAP) beide Aufnahmen nasal, liegen etwa 0,36 mm superior der Sehnervenpapille und Färbung ohne Primärantikörper, um unspezifische Färberegebnisse auszuschließen.

Die DAPI-Färbung der Zellkerne ist in blau dargestellt. RPE: Retinales Pigmentepithel; OS: Außensegment der Photorezeptoren; IS: Innensegment der Photorezeptoren; ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht; IPL: Innere plexiforme Schicht; GCL: Ganglienzellschicht; LA: linkes Auge.

3.2.2 Histologischer Nachweis struktureller Veränderungen der Retina bei RPE65-Mangel

Repräsentative Kryostat- und Paraffinschnitte wurden HE-gefärbt, um Veränderungen der Gewebestruktur darzustellen. Ein Mangel an RPE65 führt im zeitlichen Verlauf der Erkrankung zu einer Degeneration der Photorezeptoren. Dabei zeigen sich die Innensegmente der Photorezeptoren verkürzt und die Außensegmente blasser, deformierter und in ihrer Anordnung unregelmäßig. Dies kann vor allem in den Aufnahmen B und D der Abbildung 19 beobachtet werden. Der Vergleich der Retinastruktur innerhalb und außerhalb des transduzierten Bereichs mit korrespondierender OCT-Aufnahme ist in der Abbildung 22 im Anhang dargestellt.

Wie aus der Analyse der OCT-Schichtdicke der ONL+ bereits hervorgeht, kommt es bei erkrankten Tieren zu einer Verdünnung dieser Schicht. In Abbildung 19 ist zu erkennen, dass die ONL des gesunden Kontrolltieres NA (Aufnahme F) dicker ist als die der erkrankten Hunde A1, A2 und A3 (Aufnahmen A-E), unabhängig davon, ob das Auge therapiert wurde. In dem Paraffinschnitt von A2 (Aufnahme E) sind zusätzlich die typischen lipidreichen Einschlusskörperchen, die im Verlauf der Erkrankung vor allem in der tapetalen Retina entstehen und die Anhäufung von all-trans-Retinylestern repräsentieren, zu sehen.

Es ist zu beachten, dass Paraffinschnitte (Aufnahmen E und F) eine bessere Strukturhaltung des Gewebes zeigen als Kryostatschnitte (Aufnahmen A bis D). Ihre Qualität ist grundsätzlich auch von der Erfahrung des Präparators in Bezug auf Fixation, Einbettung und Schneidetechnik abhängig, sodass hier repräsentative Aufnahmen beschrieben werden.

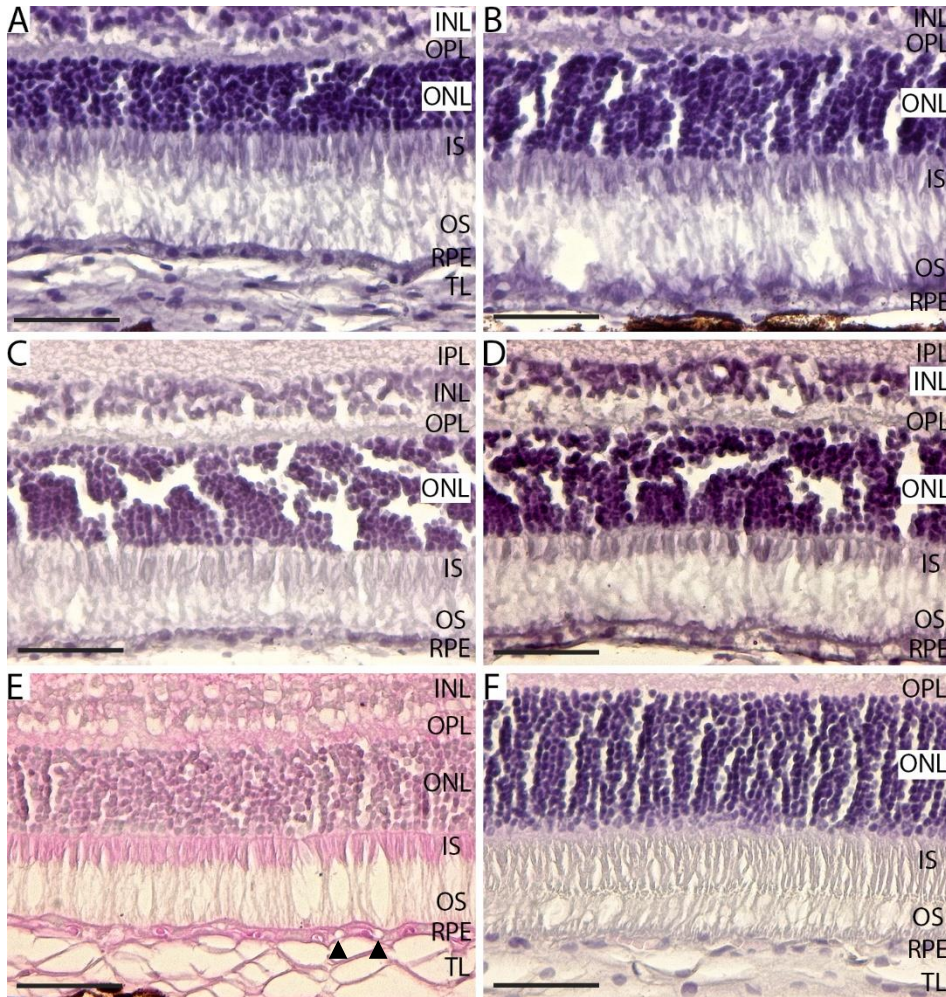


Abbildung 19: Repräsentative HE-Aufnahmen von A1, A2, A3 und NA

A und **B** zeigen Aufnahmen der Kryostatschnitte von A1, wobei **A** das rechte behandelte Auge und **B** das linke unbehandelte zeigt.

C und **D** zeigen Aufnahme der Kryostatschnitte von A3, wobei **C** innerhalb des transduzierten Bereiches liegt und **D** außerhalb.

E zeigt eine Paraffinschnitt-Aufnahme von A2 des rechten behandelten Auges. Die Pfeilspitzen (▲) markieren runde lipidreiche Vakuolen im RPE.

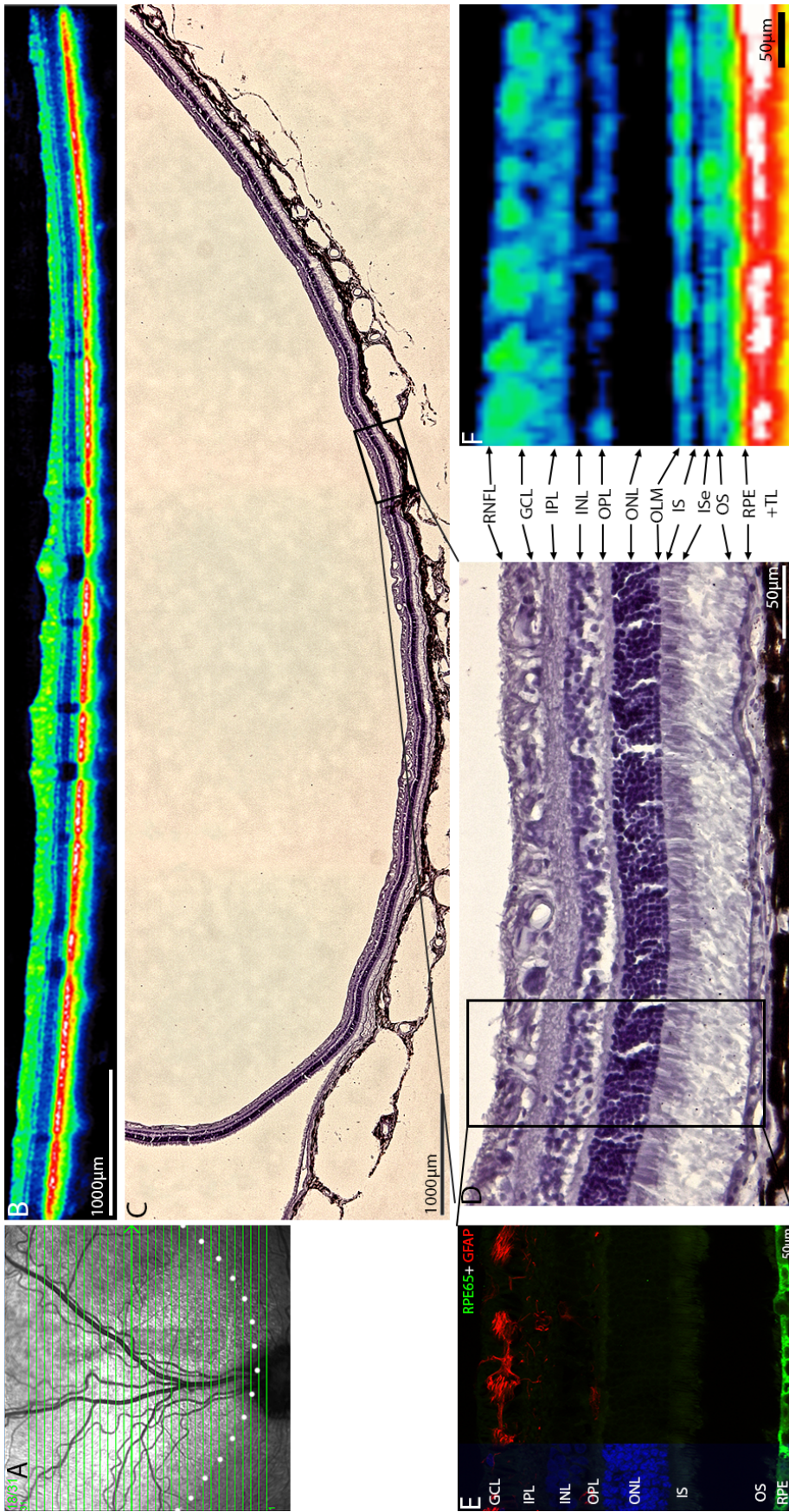
F zeigt eine Paraffinschnitt-Aufnahme des linken Auges des gesunde Kontrolltieres NA.

Da ein RPE65-Mangel hauptsächlich Auswirkungen auf die Photorezeptoren hat, sind hier nur die entsprechenden Schichten der Retina im Ausschnitt gezeigt. Man kann deutlich erkennen, dass die Schicht der ONL und der Photorezeptoren (IS und OS) der Retina des gesunde Kontrolltieres geordneter und dicker aussieht als die der erkrankten Hunde. RPE: Retinales Pigmentepithel; OS: Außensegment der Photorezeptoren; IS: Innensegment der Photorezeptoren; ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht; IPL: Innere plexiforme Schicht; Maßstabsbalken: 50 µm.

3.2.3 Zusammenfassender Vergleich retinaler Strukturen von HE- und immunhistochemisch gefärbten Kryostatschnitten mit korrespondierenden OCT-Aufnahmen

Die Differenzierung der Schichtgrenzen für die Segmentierung der OCT-Aufnahmen mit DiOCTA erwies sich für die behandelten Augen innerhalb des transduzierten Bereiches einfacher als außerhalb dieses Bereiches und in den unbehandelten Augen. Dies war vor allem für die ISe der Fall, die aus dicht gepackten Mitochondrienstapeln besteht und eine stark reflektierende Schicht in OCT-Aufnahmen darstellt. Ihre Intaktheit ist für die Funktionalität der Photorezeptoren entscheidend. Auch die äußeren retinalen Banden zeigten sich im behandelten Bereich insgesamt strukturierter und waren eindeutig voneinander abzugrenzen. In den Abbildungen 23 und 24 im Anhang wird gezeigt, wie unterschiedlich gut die ISe in behandelten und unbehandelten Bereichen zu differenzieren ist, wobei Abbildung 24 die Veränderung der ISe im Laufe der drei Untersuchungszeitpunkte darstellt. In den Abbildungen 20 und 21 ist der Vergleich zwischen OCT-, HE- und immunhistochemischer Aufnahme gezeigt. Je nach gewählter Methode zur Darstellung der Retina können andere Strukturen und Besonderheiten aufgezeigt und miteinander verglichen werden.

Für das rechte behandelte Auge von A1 (Abbildung 20) kann somit zusammengefasst werden, dass innerhalb des transduzierten Bereiches RPE65 exprimiert wird, die einzelnen Schichten in der OCT-Aufnahme eindeutig zu differenzieren sind und in der HE-Aufnahme die gesamte Retina und vor allem die Photorezeptoren einheitlicher aussehen als in dem linken unbehandelten Auge (Abbildung 21). Für das linke Auge kann ein Fehlen von RPE65 in der immunhistochemischen Aufnahme festgestellt werden, während in dem HE-Schnitt vor allem die Innensegmente der Photorezeptoren verkürzt erscheinen. Zusätzlich ist in der OCT-Aufnahme die Unterscheidung der einzelnen Schichten erschwert, was vor allem an der ISe deutlich wird.



Vergleich retinaler Strukturen von HE- und immunhistochemischen Aufnahmen mit korrespondierender OCT- Aufnahme (RA von A1)

Abbildung 20: Vergleich retinaler Strukturen von HE- und immunhistochemischen Aufnahmen mit korrespondierender OCT-Aufnahme (RA von A1)

A zeigt die OCT-Volumenscan-Fundusaufnahme des rechten behandelten Auges von A1, wobei Scan 18 von 31 ausgewählt wurde. Die weiß gepunktete Linie zeigt die Begrenzung der Injektionsblase an. In **B** sieht man den entsprechenden OCT-Scan von Scan 18. **C** zeigt den korrespondierenden HE-gefärbten Kryostatschnitt, aus dem ein Bereich in **D** vergrößert dargestellt ist. In **E** ist der korrespondierende immunhistochemische Schnitt mit Nachweis von RPE65 (grün) und GFAP (rot) und in **F** die Vergrößerung des zu **D** gehörenden OCT-Scans gezeigt. Die immunhistochemisch und HE-gefärbten Schnitte unterscheiden sich nur in einem Abstand von 75 µm, da benachbarte Objektträger gewählt wurden.

TL: Tapetum lucidum; RPE: Retinales Pigmentepithel; OS: Außensegment der Photorezeptoren; IS: Innensegment der Photorezeptoren; ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht; IPL: Innere plexiforme Schicht; GCL: Ganglienzellschicht; RNFL: Retinale Nervenfaserschicht; RA: rechtes Auge.

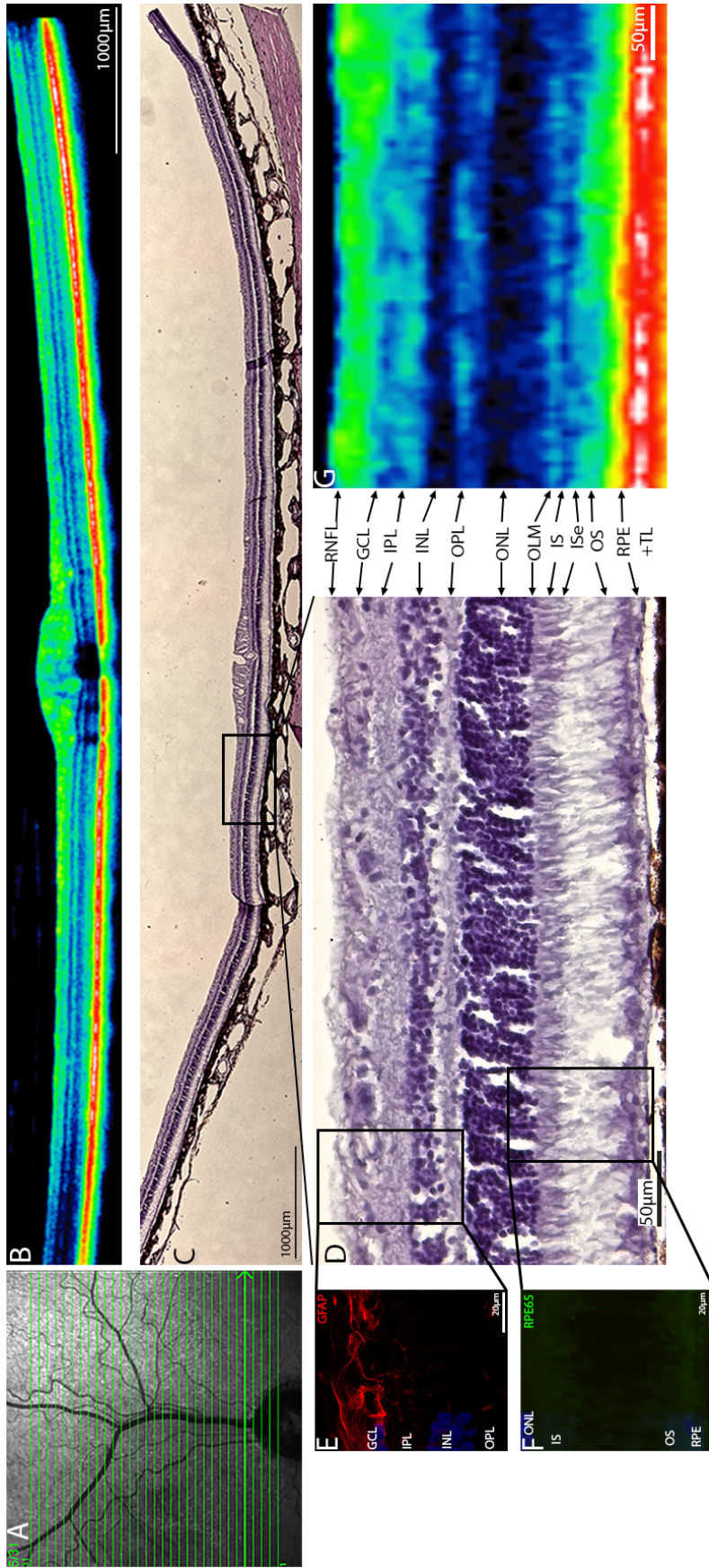


Abbildung 21: Vergleich retinaler Strukturen von HE- und immunhistochemischen Aufnahmen mit korrespondierender OCT- Aufnahme (LA von A1)

A zeigt die OCT-Volumenscan-Fundusaufnahme des linken unbehandelten Auges von A1, wobei Scan 5 von 31 ausgewählt wurde. In **B** sieht man den entsprechenden OCT-Scan von Scan 5. **C** zeigt den korrespondierenden HE-gefärbten Kryostatanschnitt, aus dem ein Bereich in **D** vergrößert dargestellt ist. In **E** und **F** sind der korrespondierende immunhistochemische Schnitt mit Nachweis von GFAP (rot) und Fehlen von RPE65 dargestellt und in **G** die Vergrößerung des zu **D** gehörenden OCT-Scans. Die immunhistochemische und HE-gefärbten Schnitte unterscheiden sich nur in einem Abstand von 75 µm, da benachbarte Objektträger gewählt wurden.

TL: Tapetum lucidum; RPE: Retinales Pigmentepithel; OS: Außensegment der Photorezeptoren; IS: Innensegment der Photorezeptoren; ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht; IPL: Innere plexiforme Schicht; GCL: Ganglienzellschicht; RNFL: Retinale Nervenfaserschicht; LA: linkes Auge.

4 Diskussion

In den vergangenen 20 Jahren erzielte die Genforschung auf dem Gebiet der Therapie bei RPE65-Mutation entscheidende Fortschritte, sodass die Zulassung für die erste Gentherapie einer hereditären Netzhauterkrankung erteilt wurde. Die Anwendung des Medikaments Voretigene neparvovec (Luxturna™) zur Behandlung bei biallelischer Mutation des RPE65-Gens, welches bei Mangel ursächlich ist für einen wichtigen Anteil der Erkrankungen an Leberscher kongenitaler Amaurose (LCA) und frühkindlicher Netzhautdegeneration (EOSRD), wurde 2017 in den USA zugelassen und im darauffolgenden Jahr in Europa genehmigt. Die Studien an Tieren, die einen wichtigen Beitrag zur Zulassung leisteten, erfolgten vor allem an Retinae von RPE65^{-/-}-Briard Hunden, die ein natürlich vorkommendes Hundemodell für diese Mutation darstellen und auch in dieser Arbeit untersucht wurden.

4.1 Morphologische Veränderungen der ONL+ Schicht im Zusammenhang mit der RPE65-Gentherapie

Das Krankheitsbild bei RPE65-Mangel zeigt sich bei Hunden mit einer ausgeprägten Minderung der Sehschärfe bei Tageslicht und einem kompletten Verlust unter schwachen Lichtverhältnissen bereits im Alter von 5 Wochen. Zusätzlich liegen die ERG-Antworten der Stäbchen, die für das skotopische Sehen verantwortlich sind, unter der Nachweisgrenze, während sich manchmal noch eine schwache Antwort der Zapfen für das photopische Sehen messen lässt.

Die anfänglichen Studien betrachteten zunächst die Auswirkungen der RPE65-Gentherapie bei Hunden jüngeren Alters, zwischen vier und 24 Monaten, die nach Therapie eine Steigerung der ERG-Antworten zeigten und mit dem behandelten Auge einen Hindernisparcours unabhängig der Lichtverhältnisse und ohne Anstoßen erfolgreich durchlaufen konnten (Acland et al. 2001; Ford et al. 2003; Narfström et al. 2003a). Diese positiven Resultate ließen auf ähnliche Ergebnisse beim Menschen hoffen. Obwohl die Probanden in mehreren klinischen Phase I und II Studien mit dem therapierten Auge einen Hindernisparcours erfolgreicher durchlaufen konnten als mit dem unbehandelten und zusätzlich eine subjektive Verbesserung ihres Visus angaben, zeigten sie keine Verbesserung der ERG-Antworten (Maguire et al. 2008; Bainbridge et al. 2008; Hauswirth et al. 2008).

Als die Diskrepanz zwischen dem Erfolg der Therapie bei Hunden und bei Menschen erkannt wurde, wurde nach den Ursachen des unterschiedlichen Ansprechens dieser gesucht. Eine Hypothese, die dabei aufgestellt wurde, nahm an, dass eventuell ein

therapeutisches Fenster existiere, um für eine erfolgreiche Therapie nicht nur die Funktionswiederherstellung des visuellen Zyklus, sondern auch das Aufhalten der degenerativen Komponente dieser Erkrankung zu erreichen und dieses sich bei Hunden und Menschen unterscheidet. Somit wurden die darauffolgenden Studien angepasst und ältere Hunde über einen längeren Zeitraum untersucht, um bessere Vergleiche zur Erkrankung beim Menschen ziehen zu können (Gardiner et al. 2020).

Die RPE65^{-/-}-Briard Hunde A1, A2 und A3, die in dieser Arbeit untersucht wurden, wurden im Alter von 12 und 15 Monaten mit einem rAAV2/4-Vektor, der eine Kopie des intakten RPE65-Gens enthält, auf dem rechten Auge therapiert. Der Hund A3, der mit 12 Monaten behandelt wurde, zeigt sowohl für die temporalen als auch nasalen Werte des rechten therapierten Auges höhere ONL+ (ONL+: ONL+OLM+IS) Schichtdickenwerte als die Hunde A1 und A2, die mit 15 Monaten die subretinale Injektion erhielten. Die ONL, die aus den Zellkernen der Photorezeptoren gebildet wird, spiegelt die Funktionsfähigkeit und Integrität dieser Strukturen wider. Unter Beachtung der interindividuellen Unterschiede bezüglich des Ausmaßes und des Fortschreitens der Degeneration der Retina bei RPE65-Mangel kann somit die Hypothese unterstützt werden, dass es ein therapeutisches Fenster geben kann, um neben der Funktionswiederherstellung die zusätzliche Degeneration aufzuhalten oder zumindest deutlich zu verlangsamen. Im vorher genannten Vergleich der Hunde ist anzumerken, dass ein Unterschied von drei Monaten ausschlaggebend sein kann, um dem degenerativen Prozess zuvorzukommen und im Verlauf besser erhaltene Schichtdickenwerte zu erzielen.

Bei der Betrachtung der behandelten und unbehandelten ONL+ Schichtdicken aller drei Hunde konnte zusammenfassend festgestellt werden, dass sich die Therapie positiv auf die Degeneration der Retina auswirkt. Obwohl der Vergleich der Schichtdickenänderung zwischen behandelten und unbehandelten Retinae nicht als statistisch signifikant gewertet werden kann, zeigte sich dennoch eine Tendenz zur geringeren Abnahme nach Therapie. Dies trifft für die temporal und nasal gemessenen Werte zu. Die Degeneration der Retina konnte in allen drei behandelten Augen jedoch nicht aufgehalten werden. Die Beobachtung der Schichtdicken mittels OCT über einen längeren Zeitraum nach Therapie hätte eventuell mehr Aufschluss geben können.

Annear und Kollegen, die Hunde im Alter von 2 bis 6 Jahren untersuchten, stellten die Hypothese auf, dass bei Hunden die Stäbchenrezeptoren langsamer degenerieren als bei Menschen. Grundsätzlich tritt die Degeneration der Retina bei Menschen zu einem

sehr frühen Zeitpunkt der Erkrankung ein. Dies kann als Ursache für das unterschiedlich gute Ansprechen der Therapie zwischen Hunden und Menschen gesehen werden.

Ein weiterer Aspekt, den Annear und Kollegen erwähnten, sind die zahlreichen Lipideinschlüsse, die im Verlauf der Erkrankung bei Hunden auftreten und das RPE in seiner Funktion zusätzlich beeinträchtigen können. Diese konnten auch in den HE-gefärbten Paraffinschnitten der vorliegenden Arbeit bei Hund A2 beobachtet werden. Somit ist die Degeneration nicht der einzige limitierende Faktor, der das Ansprechen der Therapie beeinflusst (Annear et al. 2013).

Mehrere Studien, die die morphologischen Veränderungen der Retina im Verlauf der Erkrankung betrachteten, kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich des Einsetzens der Degeneration. Wrigstad und Kollegen stellten fest, dass Briard Hunde schon in einem Alter von sieben Monaten eine Degeneration der Stäbchen aufweisen, wohingegen die Zapfen erst im weiteren Verlauf betroffen sind. Dabei sei zunächst die periphere Retina davon befallen (Wrigstad et al. 1992; Wrigstad et al. 1994). Gardiner und Kollegen hingegen fanden heraus, dass die Degeneration der Retina bei Hunden zwischen dem vierten und siebten Lebensjahr beginnt und daraufhin kontinuierlich voranschreitet (Gardiner et al. 2020). Sie bauten auf vorherige Studien von Cideciyan und Kollegen auf, die angaben, dass Briard Hunde im ersten Viertel ihres Lebens keine Degeneration aufweisen und ihre Retina von der eines Wildtyps nicht zu unterscheiden ist (Cideciyan et al. 2013).

Trotz der unterschiedlichen Erkenntnisse im Hinblick auf die degenerativen Prozesse der Retina ist es allgemein anerkannt, dass die Schwere des Krankheitsbildes bei Hunden in jungen Jahren nicht mit den morphologischen Veränderungen der Retina korreliert, die nur leicht oder gar nicht vorhanden sein können.

Cideciyan und Kollegen untersuchten die Auswirkungen der Gentherapie und die Prozesse der Degeneration auch beim Menschen. Sie stellten fest, dass die Degeneration der Photorezeptoren bei mehreren Probanden von dem natürlichen Verlauf der Erkrankung nicht zu unterscheiden ist. Die ONL-Schichtdicke nahm sowohl in behandelten als auch unbehandelten Netzhautarealen ab. Interessanterweise zeigten alle gentherapierten Probanden einen deutlichen Visusanstieg im therapierten Bereich (Cideciyan et al. 2013). Dies unterstützt die Theorie, dass durch Aufnahme des therapeutischen Gens, die Funktion wiederhergestellt werden kann, jedoch die Degeneration unaufhaltsam ist, sobald diese zu weit fortgeschritten ist. Individuelle Unterschiede in Bezug auf die Visusverbesserung könnten dadurch erklärt werden, dass der Vektor nicht gleichmäßig in die Zellen aufgenommen wurde.

Wie zuvor erwähnt soll vor allem die ONL junger RPE65^{-/-}-Hunde, derjenigen des Wildtyps entsprechen. Gardiner und Kollegen betonen in einer aktuellen Studie zudem, dass Hunde mittleren Alters mit 5 oder 6 Jahren eine unterschiedlich stark ausgeprägte Degeneration aufweisen, während mit 9 Jahren die gesamte Retina stark davon betroffen ist (Gardiner et al. 2020). In allen Fällen ist zunächst die Peripherie und die inferiore Retina von der Degeneration betroffen, da auch bei einem gesunden Hund die inferiore grundsätzlich dünner ist als die superiore tapetale Retina und damit anfälliger für die Degeneration (Cideciyan et al. 2013). Die Hunderetina enthält jedoch zwei Strukturen, die von der Degeneration weniger betroffen sind, den *visual streak* und die Area centralis. Der *visual streak*, der sich als horizontales Band oberhalb der Sehnervenpapille erstreckt, ist temporal meist etwas breiter und enthält an dieser Stelle die Area centralis, die als Äquivalent zur menschlichen Fovea gilt. Diese Region besitzt die höchste Dichte an retinalen Ganglienzellen und Zapfenrezeptoren. Entsprechend bleiben in der menschlichen Retina Photorezeptoren in der Fovea und in zentralen Regionen länger erhalten.

Diese Arbeit kommt zu dem Ergebnis, dass die Degeneration der Photorezeptoren und damit der ONL+ bereits früh einsetzt. Die erste OCT-Untersuchung von A3 im Alter von 23 Monaten und die ersten OCT-Untersuchungen von A1 und A2 im Alter von 34 Monaten zeigen bereits den Beginn der Degeneration vor dem vierten Lebensjahr. Dies steht im Gegensatz zur Arbeit von Gardiner und Kollegen, die die Veränderung der Retina erst ab diesem Zeitpunkt feststellten. Obwohl OCT-Aufnahmen der Hunde A1, A2 und A3 im Alter von wenigen Monaten nicht vorhanden sind, deuten die Ergebnisse dieser Arbeit eher auf die Erkenntnisse, die Wrigstad und Kollegen beobachteten. Im Vergleich zu den erkrankten Tieren sind die ONL+ Schichtdickenwerte des gesunden Kontrolltieres NA deutlich zu unterscheiden. Diese blieben im Laufe von zwei Untersuchungen und über einen Zeitraum von 16 Monaten wie erwartet konstant.

Die Hunde A1 und A3 erhielten mit 290 µl ein niedrigeres Volumen des Vektors als A2, für den das injizierte Volumen 430 µl betrug. Da A1 und A2 im gleichen Alter waren und zur gleichen Zeit, mit 15 Monaten, therapiert wurden, können sie in Bezug auf die Auswirkungen des unterschiedlichen Vektorvolumens auf den Erfolg der Erhaltung der Photorezeptoren verglichen werden. Es stellte sich heraus, dass ein höheres Volumen des Vektors den degenerativen Prozess positiver beeinflusst. A2 zeigte im Vergleich zu A1 höhere ONL+ Schichtdickenwerte sowohl für die nasale als auch die temporale Seite. Einen ähnlichen Effekt konnten Le Meur und Kollegen im Hinblick auf die Funktion der Photorezeptoren feststellen. In ihrer Studie zeigten Hunde, die eine höhere Dosis des

Vektors erhielten, eine bessere Erholung der Photorezeptoren im ERG, während der Hund, der das niedrigste Volumen appliziert bekam, auch eine deutlich schwächere Verbesserung der ERG-Antworten aufwies. Des Weiteren stellten sie fest, dass der Vektor rAAV2/4, der auch zur gentherapeutischen Behandlung der Hunde A1, A2 und A3 dieser Arbeit eingesetzt wurde, sich für den Transport des therapeutischen Gens wirksamer erwies als der Vektor rAAV2/2 (Le Meur et al. 2007). Für das unbehandelte linke Auge liegen die Werte von A1 jedoch über denen von A2. Gardiner und Kollegen stellten fest, dass nach Einsetzen der Degeneration, diese im weiteren Verlauf stark variieren kann. Dies trifft sowohl auf die einzelnen Augen eines Tieres als auch innerhalb der Retina zu. Mit zunehmendem Alter wird das Degenerationsareal größer bis es ab einem Alter von 9 Jahren die gesamte Retina umfasst (Gardiner et al. 2020).

Trotz des geringeren Vektorvolumens zeigte A3 bessere und im Verlauf der Erkrankung stabilere ONL+ Schichtdickenwerte als die beiden anderen Hunde. Dies kann mit dem jüngeren Alter bei Applikation der Therapie zusammenhängen.

Eine weitere wichtige Erkenntnis, die den Nutzen der rekombinanten AAV-vermittelten RPE65-Gentherapie bestärkt, ist die Feststellung von Gardiner und Kollegen, dass auch Photorezeptoren in den behandelten Augen, die nicht in dem transduzierten Bereich lagen, eine bessere Erhaltung aufzeigen als solche an korrespondierenden Stellen der unbehandelten Augen. Dies war auch an der ONL-Schicht zu erkennen, die in ihrer Dicke derjenigen in dem behandelten Areal ähnelte. Sie fanden heraus, dass ein Anteil von 63 % der normalen Anzahl an Photorezeptoren eines gesunden Tieres vorhanden sein müssen, um zusätzlich zur Verbesserung der Funktion und damit der ERG-Antworten, auch die Degeneration über einen längeren Zeitraum aufzuhalten (Gardiner et al. 2020).

Le Meur und Kollegen untersuchten neun Probanden mit RPE65-Mutation im Alter von 9 bis 42 Jahren, die den gleich aufgebauten Vektor erhielten wie die Briard Hunde in dieser Arbeit, nämlich rAAV2/4-RPE65-RPE65, also mit dem humanen Gen für RPE65 und einem RPE65-Promotor. Der Visus der Probanden verbesserte sich zwar, jedoch waren die Ergebnisse für die meisten nicht signifikant. Die Probanden wurden anhand ihres Visus vor Therapie in drei Gruppen aufgeteilt. Auffällig war, dass Probanden, die vor der Therapie in der Gruppe zwei mit dem für diese Erkrankung stark eingeschränkten Visus waren, eine deutliche Verbesserung nach Therapie zeigten, während die Probanden aus der Gruppe drei mit dem besseren Visus vor Therapie kaum Fortschritte machten. Dies kann jedoch auch an dem Nystagmus liegen, an dem die Probanden aus Gruppe zwei litten und der sich nach Therapie in seiner Amplitude reduzierte. Die Analyse der OCT-Aufnahmen von vier ausgewählten Probanden zeigten ein bis drei

Jahre nach Therapie nur eine sehr geringe Abnahme der Dicke der gesamten Retina. Auch sie betonten, dass der Therapieeffekt abhängig von der Dosis des Vektors und zusätzlich von dem Bereich ist, der von der Injektionsblase abgedeckt wird, sodass Probanden in dieser Studie mehrere subretinale Injektionen erhielten, um ein größtmögliches Retinaareal zu erreichen. Es gelang ihnen jedoch nicht, einen Zusammenhang zwischen Alter und Therapieerfolg aufzustellen. Ebenso konnten nach Therapie keine messbaren ERG-Antworten erfasst werden (Le Meur et al. 2018). Letzteres bestätigte die Erkenntnisse früherer Studien (Bainbridge et al. 2015; Cideciyan 2010).

Weitere klinische Studien mit dem Vektor Voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2), einem AAV2-Vektor, der das humane RPE65-Protein enthält und einen *chicken beta-actin* Promotor mit CMV Enhancerelement, führten zu einer deutlichen Verbesserung des Visus der Probanden und einer Steigerung ihrer Lichtempfindlichkeit. Zusätzlich wurden sie an einem Hindernisparcours bei unterschiedlichen Lichtverhältnissen getestet, den sie erfolgreich durchlaufen konnten. Diese klinischen Fortschritte waren zufriedenstellend und führten zur Zulassung des Medikamentes Luxturna (Voretigene neparvovec) für die Gentherapie bei biallelischer RPE65-Mutation (Russell et al. 2017; Kang und Scott 2020).

4.2 Gentherapeutischer Effekt auf das RPE und Bedeutung der GFAP-Färbung

Der Erfolg der RPE65-Gentherapie wird anhand der Expression von RPE65 im transduzierten Bereich gemessen. In den behandelten Augen aller drei Hunde wurde innerhalb des Bereiches der ehemaligen Injektionsblase RPE65 exprimiert. Es konnte anhand von immunhistochemisch gefärbten Kryostatschnitten in unterschiedlichem Abstand zur Papille bewiesen werden, dass der Vektor von den Zellen aufgenommen wurde. Die Expression von RPE65, wenn vorhanden, war innerhalb der Zelle im gesamten Zytosol homogen, jedoch variierte die Intensität des Fluoreszenzsignals.

Ebenso wie Cideciyan und Kollegen beschrieben auch Narfström und Kollegen die immunhistochemische Markierung mit monoklonalen Antikörpern gegen RPE65 nach Gentherapie, wie sie in dieser Arbeit festgestellt wurde. (Narfström et al. 2003b; Cideciyan et al. 2013).

Trotz der Expression von RPE65, die für einen funktionierenden visuellen Zyklus und damit eine Beseitigung des Mangels an 11-cis-Retinal steht, wurde die Degeneration der Retina nicht aufgehalten. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Gardiner und

Kollegen, die feststellten, dass zwar eine gute Korrelation zwischen der RPE65-Expression und dem Erhalt der Photorezeptoren vorhanden ist, jedoch auch Regionen mit guter Expression an einer fortschreitenden Degeneration leiden können (Gardiner et al. 2020). Im Gegensatz dazu zeigten die unbehandelten Augen keine Expression von RPE65.

Die Färbung mit GFAP, welche die Müllerzellen und Astrozyten in der Retina darstellt, erfolgte, um mögliche Veränderungen dieser Zellen festzustellen, die aufgrund der degenerativen Erkrankung entstehen. Es waren jedoch keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Retinae zu erkennen. Das Fluoreszenzmuster war größtenteils auf die Nervenfaserschicht und die Ganglienzellschicht begrenzt. Zudem gab es keine Anzeichen, dass es durch die subretinale Injektion bei Gentherapie und damit ausgelösten Abhebung der Neuroretina vom RPE zu einer Stressreaktion mit Strukturveränderungen gekommen wäre. Eine reaktive Gliose aufgrund der degenerativen Prozesse konnte ebenso nicht festgestellt werden.

Hernandez und Kollegen untersuchten unter anderem die Veränderungen von Ganglien- und Gliazellen in der Retina von gesunden und erkrankten Tieren mit RPE65-Mutation. Gliazellen, wie die Müllerzellen, umgeben die Ganglienzellen und fördern die Synapsenbildung und Aufrechterhaltung der neuronalen Funktionen. Dies kann bei retinalem Stress vermehrt der Fall sein (Vecino et al. 2016). Die Färbung mit GFAP in der Retina des Wildtyps stellte vor allem die Zellkörper und Fortsätze der Astrozyten eindeutig dar. Während sie in den untersuchten Retinae von jungen Hunden mit RPE65-Mutation eine Zunahme der GFAP-Färbung in der Nervenfaserschicht und den Fortsätzen der Müllerzellen feststellen konnten, war diese in der Retina von älteren Hunden geringer ausgeprägt. Damit konnten sie zeigen, dass die Müllerzellen auf die Degeneration, die vorwiegend die äußere Retina betrifft, reagieren, wenngleich diese Änderungen in ihrer Ausprägung nicht beständig waren (Hernández et al. 2010).

4.3 Untersuchung der ISe-Schicht

Der Schichtdickenvergleich zwischen behandelten und unbehandelten Augen für die ISe+ (ISe+: ISe+OS+RPE+TL) ließ keine präzise Aussage in Bezug auf den Erfolg nach der RPE65-Gentherapie zu. Zu beachten ist, dass das Tapetum lucidum in diese Schicht miteinberechnet wurde, da die Differenzierung der Grenze zwischen RPE und Tapetum lucidum in den OCT-Aufnahmen nicht möglich war. Das Tapetum lucidum als zusätzliche reflektierende Schicht besitzt in der superioren zentralen Retina eine einheitliche Dicke,

die erst Richtung Peripherie hin abnimmt. Trotzdem kann dies der Grund für die aussageschwachen Ergebnisse gewesen sein.

Die ISe, welche aus den Ellipsoiden der Innensegmente besteht, wurde als Schichtgrenze gewählt, da sie aus dicht gepackten Mitochondrienstapeln besteht und eine stark reflektierende Schicht in den OCT-Aufnahmen darstellt. Bei der Segmentierung der Schichten fiel auf, dass die ISe in den behandelten Retinae innerhalb des Bereiches der ehemaligen Injektionsblase besser zu differenzieren war als außerhalb oder in den unbehandelten Augen. Es muss beachtet werden, dass bei OCT-Aufnahmen die Reflexion des Lichtes aufgrund unterschiedlicher Winkel, in denen es vom Gewebe zurückgeworfen wird, zu Verzerrungen führen kann. Da jedoch die eindeutige Differenzierung in allen untersuchten Scans möglich war, kann die Aussage gemacht werden, dass sich die RPE65-Gentherapie positiv auf den Strukturhalt der ISe auswirkt. Die ISe wird als Schicht gesehen, die die Integrität der Photorezeptoren widerspiegelt, wobei ihre Intaktheit mit einem guten Visus korreliert. Dies kann zu der Annahme führen, dass sich die Photorezeptoren nach Therapie eventuell regeneriert haben könnten.

Beltran und Kollegen untersuchten die Retina von Hunden, die an Retinitis pigmentosa erkrankt waren, einer hereditäre Netzhautdystrophie, welche wie die Lebersche kongenitale Amaurose die Photorezeptoren und das RPE betrifft. Nach Gentherapie zeigten die OCT-Aufnahmen der Hunde in dem transduzierten Bereich ein eindeutiges und stärkeres Signal der ISe als außerhalb der ehemaligen Injektionsblase. Auch die Dicke der ONL-Schicht war innerhalb des behandelten Bereiches besser erhalten (Beltran et al. 2012).

Kumaran und Kollegen untersuchten in einer aktuellen Studie die Retina von 26 Probanden mit RPE65-Mutation. Sie untersuchten unter anderem die Veränderungen der Ellipsoidzone, welche mit der ISe gleichzusetzen ist. Dabei stellten sie fest, dass sich die Länge der Ellipsoidzone in den OCT-Aufnahmen im Laufe der Erkrankung verringerte und dies mit dem Visus der Probanden korrelierte. Dies kann als Zeichen der fortschreitenden Degeneration und des Verlustes von Photorezeptoren gesehen werden. Sie schlugen sogar vor, dass die Länge der Ellipsoidzone ein besserer Parameter sei, um die retinale Degeneration beim Menschen zu beurteilen als die Dicke der ONL-Schicht (Kumaran et al. 2020b).

4.4 Untersuchung der gesamten Retina

Ebenso wie für die ISe+ gilt für die gesamte Retina, dass zwischen unbehandelten und behandelten Augen keine aussagekräftige Bewertung zum Erfolg nach Gentherapie

gemacht werden konnte. Das Tapetum lucidum, das in die Berechnung mit aufgenommen wurde, kann auch hier der Grund gewesen sein, warum die Werte nicht aufschlussreicher waren. Für die temporalen Werte der gesamten Retina war jedoch auffällig, dass der zweite gemessene Wert immer eine Zunahme der Dicke anzeigte, bevor sie wieder im dritten Wert abnahm. Für die nasalen Werte traf dies bei drei von sechs Augen zu.

Jacobson und Cideciyan teilten im Rahmen ihrer Studien zu Behandlungsmöglichkeiten der Retina bei Retinitis pigmentosa diese in fünf Erkrankungsstadien, wobei Stadium 0 die Retina am Anfang der Erkrankung mit noch intakter Architektur repräsentiert und Stadium 4 die fortgeschrittenste Form dieser Erkrankung darstellt. Im ersten Stadium führten Veränderungen zu einer Zunahme der Dicke der Retina, jedoch mit noch intakter Schichteinteilung und Funktion (Jacobson und Cideciyan 2010). Der zweite Messzeitpunkt dieser Arbeit für die gesamte Retina könnte auf dieses Stadium zutreffen. Bramall und Kollegen beschreiben eine Form des retinalen Remodelings für Retinitis pigmentosa Patienten, bei dem eine verdünnte ONL von einer verdickten INL begleitet wird. Sie erwähnen weiterhin, dass eine Verdickung der INL als Marker für retinales Remodeling bei degenerativen Erkrankungen gesehen werden kann (Bramall et al. 2010).

Die untersuchten Retinae in dieser Arbeit haben trotz der teils dickeren Werte der zweiten Messung einen Trend zur Abnahme der Gesamtdicke gezeigt.

4.5 Fazit

Die hier durchgeführte Studie an der caninen Retina mit RPE65-Mangel untersuchte den Effekt der gentherapeutischen Intervention auf den Progress der Degeneration. Die Behandlung der erkrankten Retinae konnte eine Tendenz zur Verlangsamung der Degeneration der ONL+ Schicht zeigen, jedoch diese nicht aufhalten. Es ist anzunehmen, dass dieser Prozess der Degeneration zum Behandlungszeitpunkt bereits eingesetzt hatte. Daher kann das Ziel weiterer Studien sein die Therapie im Stadium der reinen Dysfunktion zu beginnen, um durch eine einmalige subretinale Injektion mit einem rekombinanten AAV2-Vektor, der ein intaktes RPE65-Gen enthält, die langfristige Erhaltung der Struktur der Photorezeptoren und des retinalen Pigmentepithels zu erreichen.

Ebenso wie in dieser Studie ist es bei humanen Studien meist der Fall, dass bei Therapiebeginn sowohl Dysfunktion als auch Degeneration vorhanden sind. Die

Zulassung von Luxturna (Voretigene neparvovec) bei biallelischer RPE65-Mutation aufgrund von Verbesserung des Visus und der Lichtempfindlichkeit der Probanden in klinischen Studien lässt auch auf weitere Erfolge hoffen. In diesem Sinne bedarf es weiterer Studien, um Erkenntnisse über die langfristigen Auswirkungen dieser Therapie zu bekommen und ein erweitertes Verständnis davon zu erhalten, wie in die degenerativen Prozesse eingeschritten werden kann.

Neben der Beurteilung der äußeren nukleären Schicht als Parameter der Degeneration kann es in weiteren Studien erkenntnisbringend sein, zusätzlich auf die Intaktheit der Innensegmentellipsoide zu achten, vor allem in Hinblick auf die Degeneration der humanen Retina.

5 Zusammenfassung

Hereditäre Netzhautdystrophien wie die Lebersche kongenitale Amaurose und die frühkindliche Netzhautdegeneration führen zu einer Dysfunktion und Degeneration der Photorezeptoren und des retinalen Pigmentepithels der Retina. Dies zeigt sich unter anderem als schwerwiegende Visusminderung in den ersten Lebensmonaten, die im weiteren Verlauf zur Erblindung führt. Eine Mutation des RPE65-Gens macht 5-10 % aller Erkrankungen aus. Das natürlich vorkommende Hundemodell des Briard Hundes mit RPE65-Mangel dient als passendes Tiermodell für die rekombinante adenoassoziierte (rAAV) Gentherapie.

In mehreren caninen Studien konnten bereits Erfolge erzielt werden. Neben einer Funktionswiederherstellung ergab sich bei frühzeitiger Applikation die Möglichkeit der Strukturhaltung der Retina über einen längeren Zeitraum. Im Gegensatz dazu konnte in den humanen Studien zwar eine Verbesserung des Visus und der Lichtempfindlichkeit festgestellt, jedoch die Degeneration nicht aufgehalten werden.

Das Ziel dieser Arbeit war es mithilfe der Segmentierung einzelner Netzhautschichten von OCT-Aufnahmen und der histologischen und immunhistochemischen Untersuchung der Retinae der RPE65^{-/-}-Hunde den Erfolg der rAAV2/4-Gentherapie zu evaluieren. Die Studie umfasste die Retinae von drei erkrankten Hunden und eines heterozygoten Wildtyps. Die erkrankten Hunde erhielten auf dem jeweils rechten Auge eine subretinale Injektion des Vektors, während das linke unbehandelte Auge als Kontrolle diente. Die Ergebnisse wurden denen des gesunden Kontrolltieres gegenübergestellt.

Die Segmentierung der Retina erfolgte mit DiOCTA und die immunhistochemische Untersuchung erfolgte mit Antikörpern gegen RPE65 und GFAP. Die Auswertung der ONL+ Schicht ergab eine Tendenz zur geringeren Schichtdickenabnahme nach Therapie. Somit wurde die Degeneration in den behandelten Retinae verlangsamt, wobei sich jedoch der Zusammenhang nicht als statistisch signifikant erwies. Die Segmentierung der ISe+ und der gesamten Retina lieferten keine aussagekräftigen Ergebnisse, vermutlich aufgrund des Tapetum lucidums, welches in diese Schichten miteinbezogen wurde. In der immunhistochemischen Untersuchung konnte im gesamten transduzierten Bereich der behandelten Augen RPE65 nachgewiesen werden, während in unbehandelten Augen keine Expression von RPE65 zu finden war. Zusätzlich konnte in dem transduzierten Bereich eine eindeutig definierte und damit besser erhaltene ISe ausgemacht werden. Die HE-gefärbten Paraffin- und Kryostatschnitte zeigten die stark verringerte Schichtdicke der ONL der erkrankten Tiere im Vergleich zu dem Kontrolltier. Durch die Nebeneinanderstellung von OCT-, HE- und immunhistochemischer Aufnahmen konnte das Krankheitsbild umfassend beurteilt werden.

6 Summary

Inherited retinal dystrophies such as Leber congenital amaurosis and Early Onset Severe Retinal Dystrophy cause dysfunction and degeneration of photoreceptors and retinal pigment epithelium. This manifests itself in severe impairment of visual acuity in early life and leads to blindness later on. RPE65 gene mutation is responsible for 5-10% of all cases. The naturally occurring RPE65^{-/-} Briard dog model serves as an accurate animal model for recombinant adeno-associated gene therapy.

Various canine studies were successful. Along with restoration of function the possibility of long-term structural preservation was possible when treated early. An improvement of visual acuity and light sensitivity could be noted in human studies; however, the degeneration could not be prevented.

This study's purpose included the evaluation of the success of rAAV2/4 gene therapy using the segmentation of individual retinal layers of OCT images and the histological and immunohistochemical analysis of RPE65^{-/-} dogs' retinæ. It contained the retinæ of three affected dogs and the ones of an heterozygous wildtype. The affected dogs were treated with a subretinal injection on their right eyes, leaving the left untreated ones as a control. The results were juxtaposed with those of the healthy control animal.

The segmentation of the retina was performed with DiOCTA and the immunohistochemical analysis was executed with antibodies against RPE65 and GFAP. The evaluation of the ONL+ layer showed a tendency to a smaller reduction in layer thickness after therapy. Therefore, the process of degeneration in the treated area decelerated although the interaction could not be proven to be statistically significant. The segmentation of ISe+ and the whole retina did not entail such meaningful results, probably due to the added tapetum lucidum. In the immunohistochemical staining RPE65 could be detected in the entire area of the former bleb of the treated eye while there was no expression of RPE65 in the untreated eye. Additionally, a better preserved ISe was noticeable in the entire treated area. The HE stained paraffin and cryosections revealed a strongly diminished ONL thickness of the affected dogs in contrast to the control animal. Juxtaposing the OCT, HE and immunohistochemical images the disease could be thoroughly examined.

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Affected (von der Mutation betroffener Hund)
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DES1	Dihydroceramide Desaturase-1
DiOCTA	Device independent OCT-Analysis
dk	Esel
EOSRD	Early Onset Retinal Dystrophy (frühkindliche Netzhautdegeneration)
ERG	Elektroretinogramm
ETDRS	Early Treatment Diabetic Retinopathy Study
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GCL	Ganglion cell layer (Ganglienzellschicht)
GFAP	Glial fibrillary acidic protein (saures Gliafaserprotein)
GMP	Guanosinmonophosphat
INL	Inner nuclear layer (innere nukleäre Schicht)
IPL	Inner plexiform layer (innere plexiforme Schicht)
IRBP	Interphotorezeptorretinoid bindendes Protein
IS	Inner segment (Innensegment)
ISe	Inner segment ellipsoid (Ellipsoid des Innensegments)
kDa	Kilodalton
LCA	Leber congenital amaurosis (Lebersche kongenitale Amaurose)
LRAT	Lecithin-Retinol-Acyl-Transferase
M	Molare Masse
MFAT	Multifunktionale O-Acyltransferase
ms	Maus
NA	Non-affected (Wildtyp)
OCT	Optische Kohärenztomographie
OLM	Outer limiting membrane (äußere Gliagrenzmembran)
ONL	Outer nuclear layer (äußere nukleäre Schicht)
OPL	Outer plexiform layer (äußere plexiforme Schicht)
OS	Outer segment (Außensegment)
PDE	Phosphodiesterase
rAAV	Rekombinante adeno-assoziierte Vektoren
RAL	Retinal
rb	Kaninchen
RDH	Retinoldehydrogenase
RNFL	Retinal nerve fiber layer (retinale Nervenfaserschicht)
ROL	Retinol
RPE	Retinal pigment epithelium (retinales Pigmentepithel)
SD-OCT	Spectral-Domain-OCT
TL	Tapetum lucidum

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des menschlichen Auges und schematische Darstellung der Retina	3
Abbildung 2: Aufgaben des retinalen Pigmentepithels	5
Abbildung 3: Tapetum lucidum cellulosum.....	6
Abbildung 4: Struktur der Photorezeptoren.....	7
Abbildung 5: Verteilung der Zapfendichte in der Hunderetina	9
Abbildung 6: Bilaterale ERG-Messungen und HE-Schnittpräparate eines gesunden und eines RPE65 ^{-/-} -Briard Hundes.....	20
Abbildung 7: Zusammensetzung eines rAAV-Vektors und subretinale Injektion des Vektors	23
Abbildung 8: Darstellung der Retina mithilfe der optische Kohärenztomographie (OCT)	28
Abbildung 9: Segmentierung mit DiOCTA.....	40
Abbildung 10: Thickness-Maps der ONL+ (ONL+: ONL+OLM+IS) von A1 zu den drei Untersuchungszeitpunkten	41
Abbildung 11: Streudiagramm mit Trendgeraden der ONL+ Schichtdicke für die temporalen und nasalen Werte.....	50
Abbildung 12: Streudiagramm mit Trendgeraden der ISe+ Schichtdicke für die temporalen und nasalen Werte.....	53
Abbildung 13: Streudiagramm mit Trendgeraden der Schichtdicke der gesamten Retina für die temporalen und nasalen Werte	56
Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung mit RPE65 und GFAP (RA von A1; Teil 1) .	60
Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbung mit RPE65 und GFAP (RA von A1; Teil 2) .	61
Abbildung 16: Immunfluoreszenzfärbung mit RPE65 und GFAP (LA von A1).....	62
Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung mit RPE65 und GFAP (RA von A3)	63
Abbildung 18: Immunfluoreszenzfärbung mit RPE65 und GFAP (LA von A3).....	64
Abbildung 19: Repräsentative HE-Aufnahmen von A1, A2, A3 und NA	66
Abbildung 20: Vergleich retinaler Strukturen von HE- und immunhistochemischen Aufnahmen mit korrespondierender OCT-Aufnahme (RA von A1)	69
Abbildung 21: Vergleich retinaler Strukturen von HE- und immunhistochemischen Aufnahmen mit korrespondierender OCT- Aufnahme (LA von A1).....	70
Abbildung 22: Vergleich der Retinastruktur innerhalb und außerhalb des transduzierten Bereiches (RA von A3)	97
Abbildung 23: OCT-Aufnahme mit Markierung des Übergangs von behandeltem zu unbehandeltem Bereich (RA von A1).....	98

Abbildung 24: OCT-Aufnahme mit Markierung des Übergangs von behandeltem zu
unbehandeltem Bereich (RA von A3)..... 98

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Versuchstiere.....	31
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien	33
Tabelle 3: Geräte und Hilfsmittel	33
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien.....	34
Tabelle 5: Lösungen und Puffer.....	34
Tabelle 6: Verwendete Software.....	35
Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper.....	35
Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper.....	35
Tabelle 9: Wichtige Parameter der ANCOVA für ONL+ temporal.....	50
Tabelle 10: Wichtige Parameter der ANCOVA für ONL+ nasal.....	50
Tabelle 11: Wichtige Parameter der ANCOVA für ISE+ temporal.....	54
Tabelle 12: Wichtige Parameter der ANCOVA für ISE+ nasal.....	54
Tabelle 13: Wichtige Parameter der ANCOVA für die gesamte Retina temporale Werte.....	57
Tabelle 14: Wichtige Parameter der ANCOVA für die gesamte Retina nasale Werte.....	57
Tabelle 15: Zusammenfassung der Berechnung des standardisierten Effektstärkemaßes r	99

10 Literaturverzeichnis

Acland, G.M. et al. (2001): Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. In: *Nature genetics* 28 (1), S. 92–95.

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. In: *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 12 (6), S. 1072–1082.

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

Ahnelt, P.K. (1998): The photoreceptor mosaic. In: *Eye (London, England)* 12 (Pt 3b), S. 531–540.

Anger, E.M. et al. (2004): Ultrahigh resolution optical coherence tomography of the monkey fovea. Identification of retinal sublayers by correlation with semithin histology sections. In: *Experimental eye research* 78 (6), S. 1117–1125.

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

Annear, M.J. et al. (2013): Successful gene therapy in older Rpe65-deficient dogs following subretinal injection of an adeno-associated vector expressing RPE65. In: *Human gene therapy* 24 (10), S. 883–893.

Arndt, T.; Rothhämel, S. (2012): Gewebepreparation. In: M. Jansohn und S. Rothhämel (Hg.): *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. 5. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, S. 275–276.

Aumann, S.; Donner, S.; Fischer, J.; Müller, F. (2019): Optical Coherence Tomography (OCT): Principle and Technical Realization. In: J.F. Bille (Hg.): *High Resolution Imaging in Microscopy and Ophthalmology: New Frontiers in Biomedical Optics*. Cham (CH), S. 59–63.

Backhaus, K.; Erichson, B.; Plinke, W.; Weiber, R. (2018): *Multivariate Analysemethoden*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 77, 164.

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

Bainbridge, J.W.B. et al. (2008): Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. In: *The New England journal of medicine* 358 (21), S. 2231–2239.

Batten, M.L. et al. (2004): Lecithin-retinol acyltransferase is essential for accumulation of all-trans-retinyl esters in the eye and in the liver. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (11), S. 10422–10432.

Beltran, W.A. et al. (2014): Canine retina has a primate fovea-like bouquet of cone photoreceptors which is affected by inherited macular degenerations. In: *PloS one* 9 (3), e90390.

Beltran, W.A. et al. (2012): Gene therapy rescues photoreceptor blindness in dogs and paves the way for treating human X-linked retinitis pigmentosa. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (6), S. 2132–2137.

- Birch, D.G.; Locke, K.G.; Wen, Y.; Locke, K.I.; Hoffman, D.R.; Hood, D.C. (2013): Spectral-domain optical coherence tomography measures of outer segment layer progression in patients with X-linked retinitis pigmentosa. In: *JAMA ophthalmology* 131 (9), S. 1143–1150.
- Bok, D. (1993): The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. In: *Journal of cell science. Supplement* 17, S. 189–195.
- Bramall, A.N.; Wright, A.F.; Jacobson, S.G.; McInnes, R.R. (2010): The genomic, biochemical, and cellular responses of the retina in inherited photoreceptor degenerations and prospects for the treatment of these disorders. In: *Annual review of neuroscience* 33, S. 441–472.
- Callaway, E. M. (2005): Structure and function of parallel pathways in the primate early visual system. In: *The Journal of physiology* 566 (Pt 1), S. 13–19.
- 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. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (29), S. 24662–24670.
- Cideciyan, A.V. (2010): Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations and its treatment with gene therapy. In: *Progress in retinal and eye research* 29 (5), S. 398–427.
- Cideciyan, A.V. et al. (2013): Human retinal gene therapy for Leber congenital amaurosis shows advancing retinal degeneration despite enduring visual improvement. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (6), E517-E525.
- Cohen, Jacob (1977): *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. New York: Academic Press, S 413-414.
- Curcio, C.A.; Sloan, K.R.; Kalina, R.E.; Hendrickson, A.E. (1990): Human photoreceptor topography. In: *The Journal of comparative neurology* 292 (4), S. 497–523.
- Darrow, J.J. (2019): Luxturna: FDA documents reveal the value of a costly gene therapy. In: *Drug discovery today* 24 (4), S. 949–954.
- Daruwalla, A.; Choi, E. H.; Palczewski, K.; Kiser, P. D. (2018): Structural biology of 11-cis-retinaldehyde production in the classical visual cycle. In: *The Biochemical journal* 475 (20), S. 3171–3188.
- Diamond, J.S. (2017): Inhibitory Interneurons in the Retina: Types, Circuitry, and Function. In: *Annual review of vision science* 3, S. 1–24.
- Drenckhahn, D.; Asan, E.; Benninghoff, A. (Hg.) (2004): *Herz-Kreislauf-System, lymphatisches System, endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut*. 16., völlig neu bearb. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer (Anatomie, makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie / Benninghoff; Drenckhahn; Bd. 2), S. 667-683, 685-687, 696.
- Eberhart, A.; Kimura, H.; Leonhardt, H.; Joffe, B.; Solovei, I. (2012): Reliable detection of epigenetic histone marks and nuclear proteins in tissue cryosections. In: *Chromosome research: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 20 (7), S. 849–858.
- Ehnes, A. et al. (2014): Optical Coherence Tomography (OCT) Device Independent Intraretinal Layer Segmentation. In: *Translational vision science & technology* 3 (1), S. 1.

- Euler, T.; Haverkamp, S.; Schubert, T.; Baden, T. (2014): Retinal bipolar cells: elementary building blocks of vision. In: *Nature reviews. Neuroscience* 15 (8), S. 507–519.
- Field, A. (2013): *Discovering statistics using IBM SPSS statistics. And sex and drugs and rock ,n' roll.* 4th edition. Los Angeles, London, New Delhi, Singapore, Washington DC: Sage, S. 82
- Fischer, D.; Bertram, B.; Kellner, U.; Agostini, H.; Lorenz, B.; Herrmann, P. (2019): Stellungnahme von DOG, RG und BVA zur therapeutischen Anwendung von voretigene neparvovec (Luxturna™) in der Augenheilkunde : Stand Januar 2019. In: *Der Ophthalmologe*, 116 (6), S. 524–533.
- Fliegau, M.; Benzing, T.; Omran, H. (2007): When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 8 (11), S. 880–893.
- Ford, M.; Bragadóttir, R.; Rakoczy, P.E.; Narfström, K. (2003): Gene transfer in the RPE65 null mutation dog: relationship between construct volume, visual behavior and electroretinographic (ERG) results. In: *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology* 107 (1), S. 79–86.
- Gange, W.S. et al. (2022): Perifoveal Chorioretinal Atrophy after Subretinal Voretigene Neparvovec-rzyl for RPE65-Mediated Leber Congenital Amaurosis. In: *Ophthalmology. Retina* 6 (1), S. 58–64.
- Gardiner, K.L. et al. (2020): Long-Term Structural Outcomes of Late-Stage RPE65 Gene Therapy. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 28 (1), S. 266–278.
- Giani, A. et al. (2010): Reproducibility of retinal thickness measurements on normal and pathologic eyes by different optical coherence tomography instruments. In: *American journal of ophthalmology* 150 (6), S. 815–824.
- Goldman, D. (2014): Müller glial cell reprogramming and retina regeneration. In: *Nature reviews. Neuroscience* 15 (7), S. 431–442.
- Hamel, C.P.; Jenkins, N.A.; Gilbert, D.J.; Copeland, N.G.; Redmond, T.M. (1994): The gene for the retinal pigment epithelium-specific protein RPE65 is localized to human 1p31 and mouse 3. In: *Genomics* 20 (3), S. 509–512.
- Hamel, C.P.; Tsilou, E.; Pfeffer, B.A.; Hooks, J.J.; Detrick, B.; Redmond, T.M. (1993): Molecular cloning and expression of RPE65, a novel retinal pigment epithelium-specific microsomal protein that is post-transcriptionally regulated in vitro. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (21), S. 15751–15757.
- Hauswirth, W.W. et al. (2008): Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. In: *Human gene therapy* 19 (10), S. 979–990.
- Heermann, S. (2017): Neuroanatomie der Sehbahn. In: *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 234 (11), S. 1327–1333.
- Hernández, M.; Pearce-Kelling, S.E.; Rodriguez, F.D.; Aguirre, G.D.; Vecino, E. (2010): Altered expression of retinal molecular markers in the canine RPE65 model of Leber congenital amaurosis. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 51 (12), S. 6793–6802.

Hörle, S. (2008): Bildgebende Verfahren. In: W. Straub, P. Kroll, C. Grunz und P. H. Artes (Hg.): *Augenärztliche Untersuchungsmethoden*. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: THIEME, S. 436.

Huang, D. et al. (1991): Optical coherence tomography. In: *Science* 254 (5035), S. 1178–1181.

Huber, G. et al. (2009): Spectral domain optical coherence tomography in mouse models of retinal degeneration. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 50 (12), S. 5888–5895.

Huggenberger, S.; Moser, N.; Schröder, H.; Cozzi, B.; Granato, A.; Merighi, A. (2019): *Neuroanatomie des Menschen*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 126–129

Hüttmann, G.; Lankenau, E.; Schulz-Wackerbarth, C.; Müller, M.; Steven, P.; Birngruber, R. (2009): Übersicht der apparativen Entwicklungen in der optischen Kohärenztomografie: von der Darstellung der Retina zur Unterstützung therapeutischer Eingriffe. In: *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 226 (12), S. 958–964.

Jacobs, G.H.; Deegan, J.F.; Crognale, M.A.; Fenwick, J.A. (1993): Photopigments of dogs and foxes and their implications for canid vision. In: *Visual neuroscience* 10 (1), S. 173–180.

Jacobson, S.G. et al. (2009): Defining the residual vision in leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 50 (5), S. 2368–2375.

Jacobson, S.G.; Cideciyan, A.V. (2010): Treatment possibilities for retinitis pigmentosa. In: *The New England journal of medicine* 363 (17), S. 1669–1671.

Jacobson, S.G. et al. (2008): Photoreceptor layer topography in children with leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 49 (10), S. 4573–4577.

Jin, M.; Li, S.; Moghrabi, W.N.; Sun, H.; Travis, G.H. (2005): Rpe65 is the retinoid isomerase in bovine retinal pigment epithelium. In: *Cell* 122 (3), S. 449–459.

Kang, C.; Scott, L.J. (2020): Voretigene Neparvovec: A Review in RPE65 Mutation-Associated Inherited Retinal Dystrophy. In: *Molecular diagnosis & therapy*, 24(4), S. 487–495

Kaschke, M.; Donnerhacke, K.-H.; Rill, M.S.; Benjamin, S. (2014): *Optical devices in ophthalmology and optometry. Technology, design principles and clinical applications*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, S. 277–288

Kaylor, J.J.; Cook, J.D.; Makshanoff, J.; Bischoff, N.; Yong, J.; Travis, G.H. (2014): Identification of the 11-cis-specific retinyl-ester synthase in retinal Müller cells as multifunctional O-acyltransferase (MFAT). In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (20), S. 7302–7307.

Kharitonov, A.E.; Surdina, A.V.; Lebedeva, O.S.; Bogomazova, A.N.; Lagarkova, M.A. (2018): Possibilities for Using Pluripotent Stem Cells for Restoring Damaged Eye Retinal Pigment Epithelium. In: *Acta Naturae* 10 (3), S. 30–39.

Kiser, P.D.; Palczewski, K. (2016): Retinoids and Retinal Diseases. In: *Annual review of vision science* 2, S. 197–234.

- Klein, D.; Mendes-Madeira, A.; Schlegel, P.; Rolling, F.; Lorenz, B.; Haverkamp, S.; Stieger, K. (2014): Immuno-histochemical analysis of rod and cone reaction to RPE65 deficiency in the inferior and superior canine retina. In: *PloS one* 9 (1), e86304.
- Koinzer, S. (2014): Optische Kohärenztomografie-hoch aufgelöste Gewebedarstellung, aber keine Histologie! In: *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 231 (7), S. 709–717.
- Kolb, H. (2003): How the Retina Works. In: *American Scientist*, 91 (1), S. 28.
- Kolb, H. (2007a): Webvision: The Organization of the Retina and Visual System. Gross Anatomy of the Eye. Hg. v. H. Kolb, E. Fernandez und R. Nelson. Salt Lake City (UT). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11534/>
- Kolb, H. (2007b): Webvision: The Organization of the Retina and Visual System. Inner Plexiform Layer. Hg. v. H. Kolb, E. Fernandez und R. Nelson. Salt Lake City (UT). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11536/>
- Kolb, H. (2007c): Webvision: The Organization of the Retina and Visual System. Outer Plexiform Layer. Hg. v. H. Kolb, E. Fernandez und R. Nelson. Salt Lake City (UT). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11518/>
- Kolb, H. (2007d): Webvision: The Organization of the Retina and Visual System. Roles of Amacrine Cells. Hg. v. H. Kolb, E. Fernandez und R. Nelson. Salt Lake City (UT). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11539/>
- Kolesnikov, A.V.; Tang, P.H.; Kefalov, V.J. (2018): Examining the Role of Cone-expressed RPE65 in Mouse Cone Function. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 14201.
- Kroeger, H.; Chiang, W.-C.; Felden, J.; Nguyen, A.; Lin, J. H. (2019): ER stress and unfolded protein response in ocular health and disease. In: *The FEBS journal* 286 (2), S. 399–412.
- Kumaran, N.; Ali, R.R.; Tyler, N.A.; Bainbridge, J.W.B.; Michaelides, M.; Rubin, G.S. (2020a): Validation of a Vision-Guided Mobility Assessment for RPE65-Associated Retinal Dystrophy. In: *Translational vision science & technology* 9 (10), S. 5.
- Kumaran, N. et al. (2020b): Retinal Structure in RPE65-Associated Retinal Dystrophy. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 61 (4), S. 47.
- Kumaran, N.; Michaelides, M.; Smith, A.J.; Ali, R.R.; Bainbridge, J.W.B. (2018a): Retinal gene therapy. In: *British medical bulletin* 126 (1), S. 13–25.
- Kumaran, N.; Moore, A.T.; Weleber, R.G.; Michaelides, M. (2017): Leber congenital amaurosis/early-onset severe retinal dystrophy: clinical features, molecular genetics and therapeutic interventions. In: *The British journal of ophthalmology* 101 (9), S. 1147–1154.
- Kumaran, N. et al. (2018b): GeneReviews®. Leber Congenital Amaurosis / Early-Onset Severe Retinal Dystrophy Overview. Hg. Adam M.P.; Ardinger H.H.; Pagon R.A.; Wallace S.E.; Bean L.J.H.; Stephens K.; Amemiya A.; Seattle (WA). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531510/>
- Lamb, T.D.; Pugh, E.N. (2006): Phototransduction, dark adaptation, and rhodopsin regeneration the proctor lecture. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 47 (12), S. 5137–5152.
- 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. In: *Gene therapy* 14 (4), S. 292–303.

- Le Meur, G. et al. (2018): Safety and Long-Term Efficacy of AAV4 Gene Therapy in Patients with RPE65 Leber Congenital Amaurosis. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 26 (1), S. 256–268.
- Lee, B.B.; Martin, P.R.; Grünert, U. (2010): Retinal connectivity and primate vision. In: *Progress in retinal and eye research* 29 (6), S. 622–639.
- Lee, S.C.S.; Martin, P.R.; Grünert, U. (2019): Topography of Neurons in the Rod Pathway of Human Retina. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 60 (8), S. 2848–2859.
- Lorenz, B. et al. (2000): Early-onset severe rod-cone dystrophy in young children with RPE65 mutations. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 41 (9), S. 2735–2742.
- Lorenz, B.; Wabbels, B.; Wegscheider, E.; Hamel, C.P.; Drexler, W.; Preising, M.N. (2004): Lack of fundus autofluorescence to 488 nanometers from childhood on in patients with early-onset severe retinal dystrophy associated with mutations in RPE65. In: *Ophthalmology* 111 (8), S. 1585–1594.
- Maguire, A.M. et al. (2008): Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. In: *The New England journal of medicine* 358 (21), S. 2240–2248.
- Masland, R.H. (2001): The fundamental plan of the retina. In: *Nature Neuroscience* 4 (9), S. 877–886.
- Mavlyutov, T.A.; Cai, Y.; Ferreira, P.A. (2002): Identification of RanBP2- and kinesin-mediated transport pathways with restricted neuronal and subcellular localization. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 3 (9), S. 630–640.
- Moiseyev, G.; Chen, Y.; Takahashi, Y.; Wu, B.X.; Ma, J.-X. (2005): RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (35), S. 12413–12418.
- Mowat, F.M. et al. (2013): RPE65 gene therapy slows cone loss in Rpe65-deficient dogs. In: *Gene therapy* 20 (5), S. 545–555.
- Mowat, F.M.; Petersen-Jones, S.M.; Williamson, H.; Williams, D.L.; Luthert, P.J.; Ali, R.R.; Bainbridge, J.W. (2008): Topographical characterization of cone photoreceptors and the area centralis of the canine retina. In: *Molecular Vision* 14, S. 2518–2527.
- Mustafi, D.; Engel, A.H.; Palczewski, K. (2009): Structure of cone photoreceptors. In: *Progress in retinal and eye research* 28 (4), S. 289–302.
- Narfström, K. (1999): Retinal dystrophy or ‚congenital stationary night blindness‘ in the Briard dog. In: *Veterinary Ophthalmology* 2 (1), S. 75–76.
- Narfström, K.; Katz, M.L.; Ford, M.; Redmond, T.M.; Rakoczy, E.; Bragadóttir, R. (2003a): In vivo gene therapy in young and adult RPE65^{-/-} dogs produces long-term visual improvement. In: *The Journal of heredity* 94 (1), S. 31–37.
- Narfström, K.; Wrigstad, A.; Nilsson, S.E. (1989): The Briard dog: a new animal model of congenital stationary night blindness. In: *The British journal of ophthalmology* 73 (9), S. 750–756.
- Narfström, K. et al. (2003b): Functional and structural recovery of the retina after gene therapy in the RPE65 null mutation dog. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 44 (4), S. 1663–1672.

- Ollivier, F.J.; Samuelson, D.A.; Brooks, D.E.; Lewis, P.A.; Kallberg, M.E.; Komáromy, A.M. (2004): Comparative morphology of the tapetum lucidum (among selected species). In: *Veterinary Ophthalmology* 7 (1), S. 11–22.
- Palczewski, K. (2012): Chemistry and biology of vision. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (3), S. 1612–1619.
- Parker, R.O.; Crouch, R.K. (2010): Retinol dehydrogenases (RDHs) in the visual cycle. In: *Experimental eye research* 91 (6), S. 788–792.
- Peichl, L. (1992): Topography of ganglion cells in the dog and wolf retina. In: *The Journal of comparative neurology* 324 (4), S. 603–620.
- Peters, S.; Schraermeyer, U. (2001): Charakteristika und Funktionen des Melanins im retinalen Pigmentepithel. In: *Der Ophthalmologe*, 98 (12), S. 1181–1185.
- Provis, J.M.; Dubis, A.M.; Maddess, T.; Carroll, J. (2013): Adaptation of the central retina for high acuity vision: cones, the fovea and the avascular zone. In: *Progress in retinal and eye research* 35, S. 63–81.
- Puller, C.; Haverkamp, S. (2011): Bipolar cell pathways for color vision in non-primate dichromats. In: *Visual neuroscience* 28 (1), S. 51–60.
- Rabinowitz, J.E.; Rolling, F.; Li, C.; Conrath, H.; Xiao, W.; Xiao, X.; Samulski, R.J. (2002): Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. In: *Journal of virology* 76 (2), S. 791–801.
- Redmond, T.M.; Yu, S.; Lee, E.; Bok, D.; Hamasaki, D.; Chen, N. et al. (1998): Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. In: *Nature genetics* 20 (4), S. 344–351.
- Redmond, T.M.; Poliakov, E.; Yu, S.; Tsai, J.-Y.; Lu, Z.; Gentleman, S. (2005): Mutation of key residues of RPE65 abolishes its enzymatic role as isomerohydrolase in the visual cycle. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (38), S. 13658–13663.
- Reichel, F.F. et al. (2022): Development of retinal atrophy after subretinal gene therapy with voretigene neparvovec. In: *The British journal of ophthalmology*. Epub ahead of print.
- Reichenbach, A.; Bringmann, A. (2020): Glia of the human retina. In: *Glia* 68 (4), S. 768–796.
- Riedelsheimer, B.; Büchl-Zimmermann, S.; Welsch, U. (2015): Schnittpräparation für die Lichtmikroskopie. In: M. Mulisch und U. Welsch (Hg.): *Romeis Mikroskopische Technik*. 19. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum, S. 100–107.
- Rolling, F. (2004): Recombinant AAV-mediated gene transfer to the retina: gene therapy perspectives. In: *Gene therapy* 11 Suppl 1, S26-32.
- Rosenthal, Robert (1991): *Meta-Analytic Procedures for Social Research*. 2455 Teller Road, Thousand Oaks California 91320 United States of America: SAGE Publications, Inc., S. 19
- Russell, S. et al. (2017): Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. In: *The Lancet* 390 (10097), S. 849–860.

Salmon, J.; Kanski, J. J. (2020): Kanski's clinical ophthalmology. A systematic approach. Ninth edition. [Edinburgh]: Elsevier, S. 624.

Slijkerman, R.W.N.; Song, F.; Astuti, G.D.N.; Huynen, M.A.; van Wijk, E.; Stieger, K.; Collin, R.W.J. (2015): The pros and cons of vertebrate animal models for functional and therapeutic research on inherited retinal dystrophies. In: *Progress in retinal and eye research* 48, S. 137–159.

Spaide, R.F.; Curcio, C.A. (2011): Anatomical correlates to the bands seen in the outer retina by optical coherence tomography: literature review and model. In: *Retina* 31 (8), S. 1609–1619.

Sparrow, J.R.; Hicks, D.; Hamel, C.P. (2010): The retinal pigment epithelium in health and disease. In: *Current Molecular Medicine* 10 (9), S. 802–823.

Stieger, K.; Cronin, T.; Bennett, J.; Rolling, F. (2011): Adeno-Associated Virus Mediated Gene Therapy for Retinal Degenerative Disease. In: Richard O. Snyder und Philippe Moullier (Hg.): Adeno-Associated Virus. Totowa, NJ: Humana Press (807), S. 179–218.

Stieger, K.; Lorenz, B. (2008): Die Behandlung hereditärer Dystrophien und neovaskulärer Erkrankungen der Retina durch AAV-vermittelten Gentransfer. In: *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 225 (12), S. 1009–1023.

Stieger, K.; Lorenz, B. (2020): RPE and Gene Therapy. In: Alexa Karina Klettner und Stefan Dithmar (Hg.): Retinal Pigment Epithelium in Health and Disease. Cham: Springer International Publishing, S. 266-267.

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

Swaroop, A.; Kim, D.; Forrest, D. (2010): Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. In: *Nature reviews. Neuroscience* 11 (8), S. 563–576.

Szmajda, B.A.; Grünert, U.; Martin, P.R. (2008): Retinal ganglion cell inputs to the koniocellular pathway. In: *The Journal of comparative neurology* 510 (3), S. 251–268.

Tang, P.H.; Kono, M.; Koutalos, Y.; Ablonczy, Z.; Crouch, R.K. (2013): New insights into retinoid metabolism and cycling within the retina. In: *Progress in retinal and eye research* 32, S. 48–63.

Tiziani, H. (2005): Optische Interferometrie. In: W. Schlegel und J. Bille (Hg.): Medizinische Physik 3. Medizinische Laserphysik. 1. Aufl. s.l.: Springer-Verlag, S. 257–278.

Travis, G.H.; Golczak, M.; Moise, A.R.; Palczewski, K. (2007): Diseases caused by defects in the visual cycle: retinoids as potential therapeutic agents. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 47, S. 469–512.

Tsin, A.; Betts-Obregon, B.; Grigsby, J. (2018): Visual cycle proteins: Structure, function, and roles in human retinal disease. In: *The Journal of biological chemistry* 293 (34), S. 13016–13021.

Ungewiss, J.; Breuninger, T.; Milenkovic, I.; Ebenhoch, R.; Schiefer, U. (2020): Aufbau und Funktion der Sehbahn. In: *Der Ophthalmologe*, 117(11), S. 1062-1067.

Vecino, E.; Rodriguez, F.D.; Ruzafa, N.; Pereiro, X.; Sharma, S.C. (2016): Glia-neuron interactions in the mammalian retina. In: *Progress in retinal and eye research* 51, S. 1–40.

- Veske, A.; Nilsson, S.E.; Narfström, K.; Gal, A. (1999): Retinal dystrophy of Swedish briard/briard-beagle dogs is due to a 4-bp deletion in RPE65. In: *Genomics* 57 (1), S. 57–61.
- Wang, J.-S.; Kefalov, V.J. (2011): The cone-specific visual cycle. In: *Progress in retinal and eye research* 30 (2), S. 115–128.
- Wässle, H.; Boycott, B.B. (1991): Functional architecture of the mammalian retina. In: *Physiological reviews* 71 (2), S. 447–480.
- Wässle, H. (2004): Parallel processing in the mammalian retina. In: *Nature reviews. Neuroscience* 5 (10), S. 747–757.
- Weber, M. et al. (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. In: *Molecular Therapy* 7 (6), S. 774–781.
- Wegerhoff, R. (2015): Mikroskopische Verfahren. In: M. Mulisch und U. Welsch (Hg.): *Romeis Mikroskopische Technik*. 19. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum, S. 22-23.
- Welsch, U.; Deller, T. (2011): *Sobotta Lehrbuch Histologie*. Unter Mitarbeit von T. Deller. 3. Aufl.: Urban Fischer Verlag – Lehrbücher, S. 506-507.
- 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. In: *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology* 87 (4), S. 337–354.
- Wrigstad, A.; Nilsson, S.E.G.; 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. In: *Experimental eye research* 55 (6), S. 805–818.
- Yamaue, Y.; Hosaka, Y.Z.; Uehara, M. (2015): Spatial relationships among the cellular tapetum, visual streak and rod density in dogs. In: *The Journal of veterinary medical science* 77 (2), S. 175–179.
- Yanik, M. et al. (2017): In vivo genome editing as a potential treatment strategy for inherited retinal dystrophies. In: *Progress in retinal and eye research* 56, S. 1–18.
- Young, R.W.; Bok, D. (1969): Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. In: *The Journal of Cell Biology* 42 (2), S. 392–403.
- Zhu, J.; Zhang, E.; Del Rio-Tsonis, K. (2012): *Eye Anatomy*. In eLS, John Wiley & Sons, Ltd (Ed.). <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000108.pub2>

11 Anhang

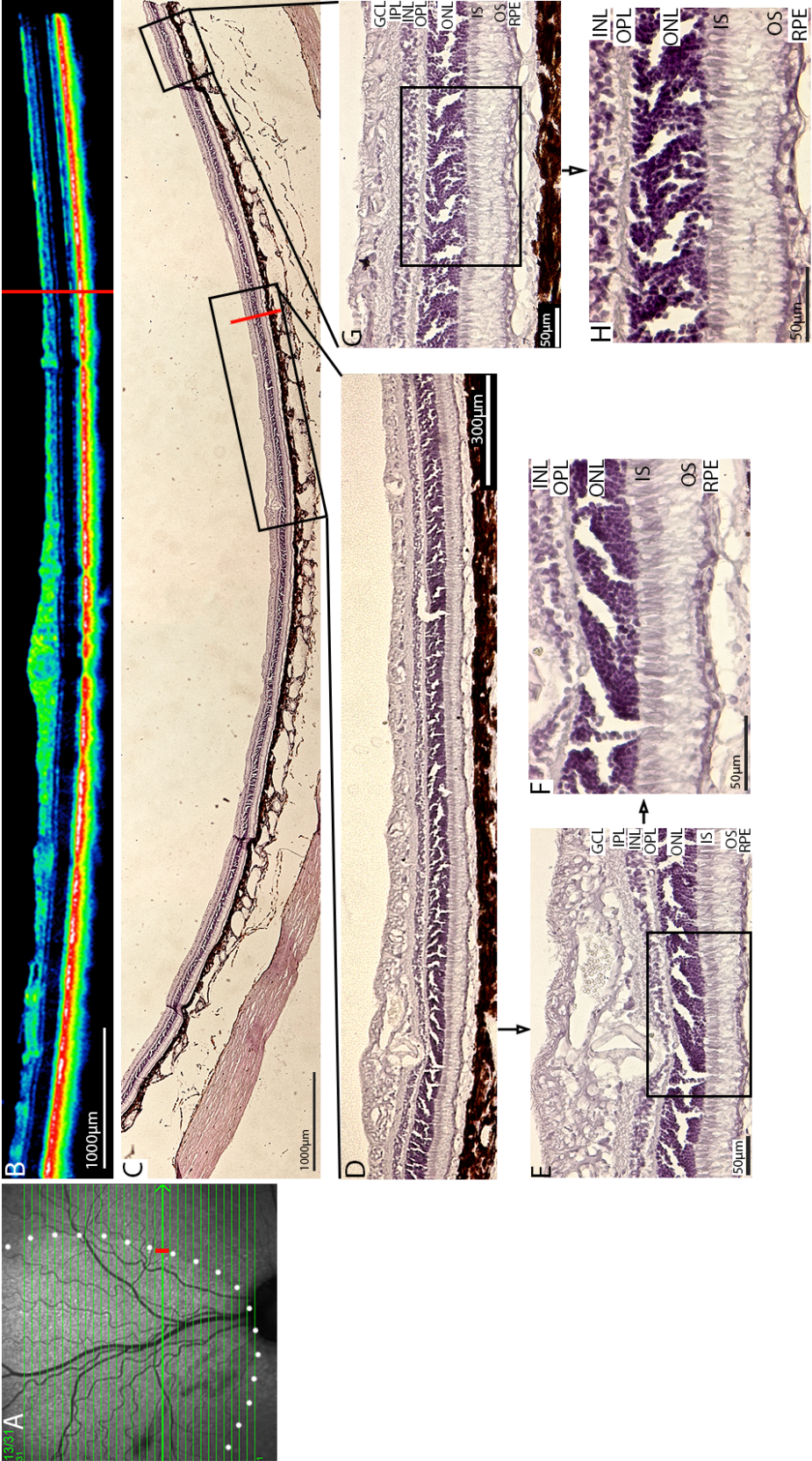


Abbildung 22: Vergleich der Retinastruktur innerhalb und außerhalb des transduzierten Bereiches (RA von A3)

Abbildung 22: Vergleich der Retinastruktur innerhalb und außerhalb des transduzierten Bereiches (RA von A3)

A OCT-Aufnahme des Augenhintergrundes des rechten Auges von A3, Scan 13 von 31 wurde ausgewählt. Die weiß gepunktete Linie markiert den Bereich der sogenannten Injektionsblase und der rote Balken, der sich auch in den Abbildungen **B** und **C** befindet, die Grenze zwischen behandeltem und unbehandeltem Bereich. **B** OCT-Aufnahme (DiOCTA) des Scans 13 in Falschfarben. Die Grenze der Injektionsblase ist deutlich zu sehen. In **C** ist der HE-gefärbte Kryostatschnitt gezeigt, der dem OCT-Scan 13 entspricht, wobei zum einen ein Ausschnitt aus dem behandelten Bereich vergrößert wurde (**D**, **E**, **F**), zum anderen ein Ausschnitt, der definitiv außerhalb dessen liegt (**G**, **H**). Vor allem in **G** und **H** sehen die Innensegmente der Photorezeptoren verkürzt aus, wobei die Außensegmente in allen Aufnahmen deformiert aussehen. In der ONL sehen die Kerne der Photorezeptoren präparationsbedingt so aus, als würden sie aneinanderkleben. RPE: Retinales Pigmentepithel; OS: Außensegment der Photorezeptoren; IS: Innensegment der Photorezeptoren; ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht; IPL: Innere plexiforme Schicht; GCL: Ganglienzellschicht; RA: rechtes Auge.

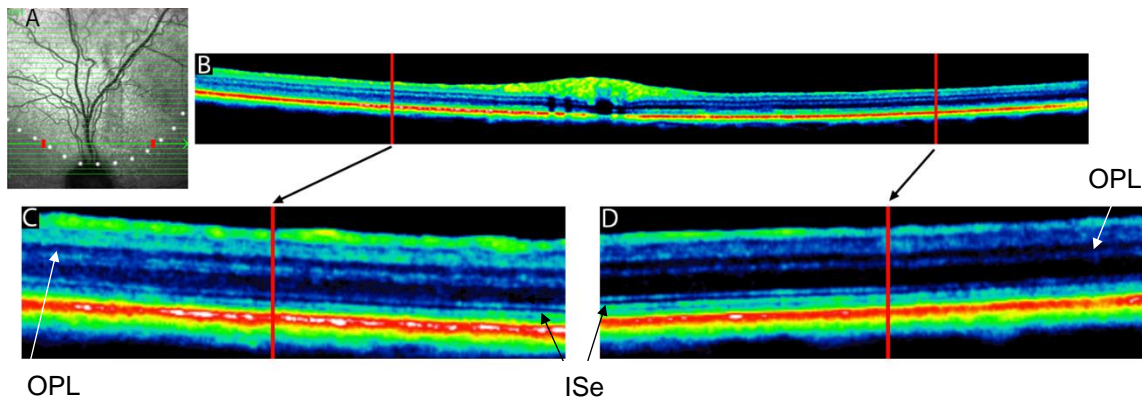


Abbildung 23: OCT-Aufnahme mit Markierung des Übergangs von behandeltem zu unbehandeltem Bereich (RA von A1)

Das rechte Auge von A1 wurde therapiert. Somit konnte auf der Fundusaufnahme **A** die Begrenzung der Injektionsblase definiert werden (weiß gepunktete Linie). Die roten Balken markieren diese für einen einzelnen Scan (Scan 7 von 31) und finden sich in **B**, **C** und **D** wieder. Die Begrenzung der ISe ist innerhalb des therapierten Bereiches gut zu unterscheiden, während sie außerhalb verschwommen wirkt. Die ISe spiegelt die Funktionsfähigkeit der Photorezeptoren wider.

Zu beachten ist, dass die Reflektion einiger Schichten innerhalb eines Scans je nach Winkel, in dem das Licht reflektiert wird, manchmal dicker erscheinen können, als sie sind (siehe Abschnitt 1.6), wie hier in **C** die OPL (weißer Pfeil). Zum Vergleich die eigentliche Dicke der OPL in **D**. Da jedoch die ISe in allen untersuchten Scans dieses Volumenscans betrachtet wurde, konnte die Annahme gemacht werden, dass sie innerhalb des transduzierten Bereiches besser zu unterscheiden ist. Dies ist eine repräsentative Aufnahme. ISe: Ellipsoid der Innensegmente; OPL: Äußere plexiforme Schicht; RA: rechtes Auge.

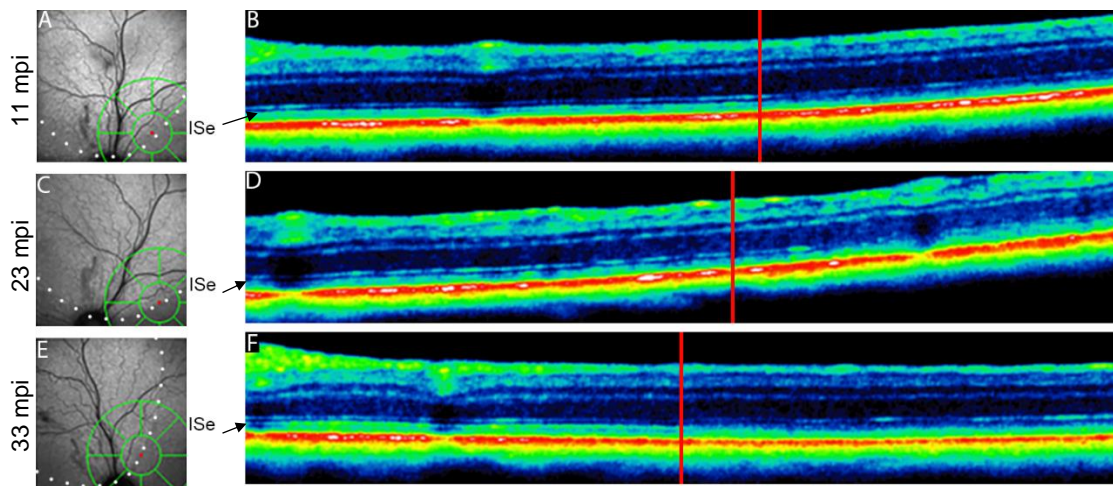


Abbildung 24: OCT-Aufnahme mit Markierung des Übergangs von behandeltem zu unbehandeltem Bereich (RA von A3)

Das rechte Auge von A3 zeigt mehrere Monate nach Therapie eine deutlich definierte ISe innerhalb des behandelten Bereiches. Wie man in den Fundusaufnahmen (**A**, **C**, **E**) erkennen kann, ist der Scan zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten leicht verschoben, was zu nicht vollständig übereinstimmenden OCT-Aufnahmen (**B**, **D**, **F**) führt. Jedoch konnte hier in jeder Aufnahme die Grenze zwischen behandeltem und unbehandeltem Bereich ausgemacht werden (rote Linie). Dies sind repräsentative Aufnahmen, da hier wie in Abbildung 26 das gleiche gilt bezüglich der Reflektion des Lichtes aus unterschiedlichen Winkeln.

ISe: Ellipsoid der Innensegmente; mpi: months post injection (Monate nach Injektion); RA: rechtes Auge.

$r < 0,1$	$r \geq 0,1$	$r \geq 0,3$	$r \geq 0,5$
A3 OS t ONL+ 23M/35M F= 0,032317	A2 OD t ONL+ 34M/46M F= 0,109933	A1 OD t ONL+ 34M/46M F= 0,413708	A1 OD n ONL+ 34M/46M F= 0,640645
A3 OS n ONL+ 23M/35M F= 0,022003	A2 OD t ONL+ 46M/57M F= 0,225661	A1 OD t ONL+ 46M/56M F= 0,38938	A1 OD n ONL+ 46M/56M F= 0,520346
NA OD t ONL+ 8M/24M F= 0,038028	A2 OD n ONL+ 34M/46M F= 0,146192	A1 OS t ONL+ 34M/46M F= 0,455546	A1 OS n ONL+ 34M/46M F= 0,557679
NA OD n ONL+ 8M/24M F= 0,014969	A2 OD n ONL+ 46M/57M F= 0,20469	A1 OS t ONL+ 46M/56M F= 0,449567	A1 OS n ONL+ 46M/56M F= 0,569329
NA OS t ONL+ 8M/24M F= 0,032288	A2 OS n ONL+ 46M/57M F= 0,204342	A3 OD t ONL+ 23M/35M F= 0,425963	A2 OS t ONL+ 34M/46M F= 0,579653
NA OS n ONL+ 8M/24M F= 0,03352	A1 OS n Retina 46M/56M F= 0,153895	A3 OD t ONL+ 35M/45M F= 0,363811	A2 OS t ONL+ 46M/57M F= 0,507759
A1 OD t Retina 34M/46M F= 0,031128	A2 OD t Retina 34M/46M F= 0,176225	A3 OD n ONL+ 23M/35M F= 0,325735	A2 OS n ONL+ 34M/46M F= 0,579171
A1 OD n Retina 34M/46M F= 0,092656	A2 OD n Retina 46M/57M F= 0,109362	A3 OD n ONL+ 35M/45M F= 0,490753	A1 OD t Retina 46M/56M F= 0,552135
A1 OS t Retina 34M/46M F= 0,072186	A2 OS t Retina 34M/46M F= 0,166047	A1 OS t Retina 46M/56M F= 0,421507	A1 OD n Retina 46M/56M F= 0,620303
A1 OS n Retina 34M/46M F= 0,016115	A3 OD t Retina 23M/35M F= 0,103891	A2 OD t Retina 46M/57M F= 0,37603	A2 OS t Retina 46M/57M F= 0,667141
A2 OD n Retina 34M/46M F= 0,087293	A3 OD n Retina 23M/35M F= 0,226655	A2 OS n Retina 34M/46M F= 0,469606	A3 OD t Retina 35M/45M F= 0,599251
A2 OS n Retina 46M/57M F= 0,069688	NA OD t Retina 8M/24M F= 0,107867	A3 OD n Retina 35M/45M F= 0,389664	A3 OS t Retina 23M/35M F= 0,834633
A3 OS n Retina 23M/35M F= 0,059489		NA OS n Retina 8M/24M F= 0,305013	NA OD n Retina 8M/24M F= 0,509992
			NA OS t Retina 8M/24M F= 0,64891

Tabelle 15: Zusammenfassung der Berechnung des standardisierten Effektstärkemaßes r

Das Effektstärkemaß r , auch Pearsons Korrelationskoeffizient genannt, ist ein Maß für den statistischen Zusammenhang zweier Datensätze. In diesem Fall wurde es für die berechneten t-Tests angewendet. Richtlinien von Cohen: $r \geq 0,10$ entspricht einem schwachen Effekt, $r \geq 0,30$ einem mittleren Effekt, $r \geq 0,50$ einem großen Effekt.

OD: rechtes Auge; OS: linkes Auge; n: nasal; t: temporal; ONL+: ONL+OLM+IS; ISe+: ISe+OS+RPE+TL; Retina: gesamte Retina; M: Alter in Monaten.

12 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit 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

13 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Knut Stieger für die Bereitstellung des Themas der Dissertation, die freundliche und ausgezeichnete Betreuung bei der Durchführung der gesamten Arbeit und dem entgegengebrachten Vertrauen. Seine Unterstützung und Begeisterungsfähigkeit haben mich stets motiviert. Die Möglichkeit auf dem Gebiet der experimentellen Ophthalmologie zu arbeiten hat meine Entscheidung zur Weiterbildung in Augenheilkunde bestärkt.

Ich möchte mich bei Frau Dr. Brigitte Müller für die hervorragende Einarbeitung in die Immunhistochemie, die gute Zusammenarbeit und die anregenden Gespräche bedanken.

Auch bedanke ich mich bei Frau Bettina Gill für das Anfertigen der Paraffinschnitte, was mich in meiner Arbeit ungemein unterstützte.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Robert Knobloch bedanken, der mir bei der Berechnung der Messanzahl einzelner Scans der OCT-Aufnahmen mit DiOCTA unterstützt hat.

Herrn Prof. Matus Rehak und Herrn PD Dr. Lyubomyr Lytvynchuk danke ich für die freundliche Bereitstellung des Arbeitsplatzes und freue mich auf die Zusammenarbeit während meiner Weiterbildung.

Bei Frau Prof. Dr. Birgit Lorenz möchte ich mich für die wissenschaftliche Unterstützung und das kritische Hinterfragen der Ergebnisse bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt zusätzlich Herrn PD Dr. Markus Preising für die lehrreichen Seminare und allen Mitarbeitern der Labore für Experimentelle und Molekulare Ophthalmologie der Augenklinik für die angenehme Arbeitsatmosphäre und freundliche Zusammenarbeit.

Für die Einführung in SPSS danke ich Dr. rer. soc. Johannes Herrmann.

Schließlich dient ein ganz besonderer Dank meiner Familie für ihre bedingungslose Unterstützung während meiner Studienzeit und der gesamten Zeit der Doktorarbeit.