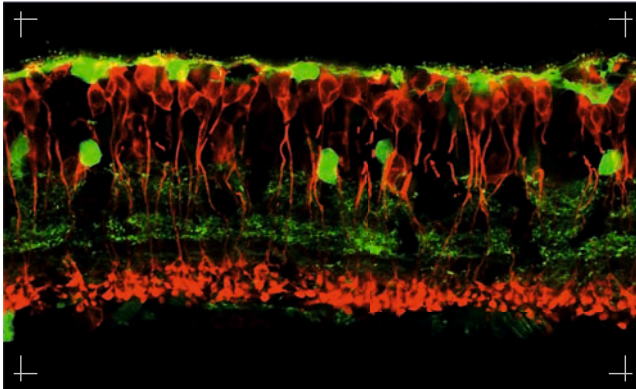


BERT CONSTANTIN GIERS

Morphologische Untersuchung AAV-transduzierter
Retinae nach subretinaler Injektion in Ratten



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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

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

1. Auflage 2016

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

1st Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Morphologische Untersuchung
AAV-transduzierter Retinae
nach subretinaler Injektion in Ratten**

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

**vorgelegt von Bert Constantin Giers
aus Lemgo**

Gießen 2015

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

Gutachter: Prof. Dr. Dr. K. Stieger

Gutachter: Prof. Dr. A. Bräuninger

Tag der Disputation: 28.04.2016

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Anatomie der Retina.....	2
1.1.1 Zellkontakte in der äußeren plexiformen Schicht (OPL).....	5
1.1.2 Ribbon- oder Bandsynapsen der Photorezeptor-Terminalien	6
1.1.3 Horizontalzellen	8
1.1.4 Bipolarzellen	9
1.1.5 Besonderheiten der retinalen Morphologie bei Ratten.....	9
1.2 Hereditäre Netzhautdystrophien.....	10
1.2.1 Retinopathia pigmentosa	10
1.2.2 LCA und EOSRD	11
1.3 RPE65 und seine Rolle für den Sehvorgang.....	11
1.3.1 Phototransduktion und Retinolzyklus.....	12
1.3.2 RPE65-Mutation: Pathophysiologie und Klinik	14
1.3.3 RPE65-Mutation im Tiermodell.....	14
1.4 Gentherapie retinaler Erkrankungen	15
1.4.1 Therapie-Strategien.....	15
1.4.2 Adeno-assoziierte Viren (AAV)	15
1.4.3 Proof-of-Principle-Studien am Tiermodell.....	17
1.4.4 Klinische Studien.....	18
1.5 Ursachen für unterschiedliche Effizienz bei Tiermodell und Mensch.....	20
1.5.1 Heterogener genetischer Hintergrund beim Menschen	20
1.5.2 Interferenzen durch Expression funktionsloser Proteine	21
1.5.3 Persistenz von Viruspartikeln in der Netzhaut.....	21
1.5.4 Plastizität neuronaler Strukturen in der Retina.....	21
1.5.5 Zeitlicher Ablauf struktureller Veränderung nach Netzhautablösung.....	22
1.5.5.1 Dekonstruktion von Photorezeptoren.....	22
1.5.5.2 Apoptotischer Zelluntergang von Photorezeptoren.....	24
1.5.5.3 Retraktion von Stäbchen-Axonon und Neuriten-Wachstum in der äußeren plexiformen Schicht.....	24
1.6 Ziel der Arbeit.....	25
2 Material und Methoden.....	26
2.1 Versuchstiere	26
2.2 Reportergen	27
2.3 Vorarbeiten (nicht Teil der eigenen Arbeit)	27
2.3.1 Subretinale Injektion.....	27
2.3.2 In-vivo-Funduskopie	28
2.3.3 Präparation der Augenbecher und Fixierung.....	28
2.4 Eigene Arbeiten.....	29
2.4.1 Lichtmikroskopie	29
2.4.1.1 Gefrierschutz und Präparation der Retina.....	29
2.4.1.2 Herstellung von Gefrierschnitten.....	29
2.4.1.3 Immunhistochemie	30
2.4.1.4 Verwendete Antikörper	31
2.4.1.5 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	32
2.4.2 Elektronenmikroskopie	32
2.4.2.1 Fixierung und Präparation.....	32

2.4.2.2	Osmierung und Dehydrierung.....	33
2.4.2.3	Einbettung.....	33
2.4.2.4	Ultradünnschnitte.....	33
2.4.2.5	Positiv-Kontrastierung.....	33
2.4.2.6	Transmissionselektronenmikroskopie	34
2.4.3	TUNEL-Assay	34
2.4.4	Bildbearbeitung.....	34
2.5	Quantitative Analyse und statistische Auswertung.....	35
2.6	Verwendete Materialien	37
2.6.1	Biologische Materialien.....	37
2.6.1.1	Primärantikörper.....	37
2.6.1.2	Sekundärantikörper.....	37
2.6.2	Verwendete Chemikalien und Reagenzien	38
2.6.3	Verbrauchsmaterialien.....	39
2.6.4	Verwendete Geräte.....	40
2.6.5	Verwendete Software.....	40
3	Ergebnisse	42
3.1	Identifikation des transduzierten Netzhautbereichs mittels GFP-Färbung.....	42
3.2	Morphologie der Ribbonsynapse 1 Monat p. i.	43
3.3	Morphologie der synaptischen Invaginationen 1 Monat p. i.	44
3.4	Morphologie der Photorezeptor-Terminalien 1 Monat p. i.	46
3.5	Ultramorphologie der Ribbonsynapsen 1 Monat p. i.	47
3.6	Morphologie der Ribbonsynapse 12 Monate p. i.	49
3.7	Quantifizierung der Synapsen.....	50
3.8	Müllerzellreaktion	52
3.9	Apoptosestatus.....	54
4	Diskussion	56
4.1	Morphologie der äußeren plexiformen Schicht.....	56
4.2	Persistenz der Viruspartikel	58
4.3	Verstärkte GFAP-Expression als Folge der subretinalen Injektion.....	58
4.4	Apoptose-Status.....	60
4.5	Schlussfolgerungen.....	61
4.6	Limitationen.....	62
5	Zusammenfassung	64
6	Summary	65
Abbildungsverzeichnis.....		V
Tabellenverzeichnis.....		VI
Literaturverzeichnis		VII
Publikationen.....		XXI
Erklärung zur Dissertation		XXII
Danksagung.....		XXIII

Abkürzungsverzeichnis

α -	Anti-
a. a. O.	am angegebenen Ort
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
AIF	<i>apoptosis inducing factor</i> (apoptoseinduzierender Faktor)
AK	Antikörper
ARVO	<i>Association for Research in Vision and Ophthalmology</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
CaBP	Calbindin (<i>calcium binding protein</i>)
CMV	Zytomegalievirus
CtBP2	<i>C-terminal binding protein 2</i>
Cy3	Indocarbocyanin
DHP	Dihydropyridin
dk	<i>donkey</i> (Esel)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dUTP	Desoxyribo-Uridintriphosphat
EM	Elektronenmikroskop(ie)
engl.	englisch
ERG	Elektroretinogramm
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GCL	<i>ganglion cell layer</i> (Ganglienzellschicht)
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> (saures Gliafaserprotein)
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grünfluoreszierendes Protein)
gt	<i>goat</i> (Ziege)
ILM	<i>inner limiting membrane</i> (innere Grenzschrift)
INL	<i>inner nuclear layer</i> (innere Körnerschicht)
IPL	<i>inner plexiform layer</i> (innere plexiforme Schicht)
IS	<i>inner segments</i> (innere Segmente der Photorezeptoren)
LCA	Leber'sche kongenitale Amaurose

Abkürzungsverzeichnis

LM	Lichtmikroskop(ie)
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
ms	<i>mouse</i> (Maus)
m. w. H.	mit weiteren Hinweisen
MZ	Müller-Zellen
NDS	<i>normal donkey serum</i>
NFL	<i>nerve fibre layer</i> (Nervenfaserschicht)
NGS	<i>normal goat serum</i>
n. u.	nicht untersucht
OCT	<i>optical coherence tomography</i> (optische Kohärenztomografie)
OLM	<i>outer limiting membrane</i> (äußere Grenzschrift)
ONL	<i>outer nuclear layer</i> (äußere Körnerschicht)
OPL	<i>outer plexiform layer</i> (äußere plexiforme Schicht)
OS	<i>outer segments</i> (äußere Segmente der Photorezeptoren)
PB	<i>phosphate buffer</i> (Phosphatpuffer)
PFA	Paraformaldehyd
p. i.	post injectionem
PKC α	Proteinkinase C Isoform α
PR	Photorezeptor(en)
PSD95	<i>postsynaptic density protein 95kDa</i>
rAAV	rekombinantes Adeno-assoziiertes Virus
rb	<i>rabbit</i> (Kaninchen)
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Retinitis pigmentosa/Retinopathia pigmentosa
RPE	retinales Pigmentepithel
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
sog.	sogenannt
Tbl.	Tabelle
TdT	terminale Deoxynukleotidyltransferase
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Das Sehen ist die wahrscheinlich wichtigste Sinnesfunktion des Menschen. In den meisten unserer täglichen Anforderungen sind wir auf die intakte visuelle Wahrnehmung unserer Umwelt angewiesen. Erkrankungen, die zum Verlust des Sehvermögens führen, stellen daher eine schwerwiegende Behinderung dar und schließen die Betroffenen von der Teilhabe an vielen Aspekten des täglichen Lebens aus. Dies gilt umso mehr für Erkrankungen, die die Sehkraft bereits in jungen Jahren erheblich einschränken oder sogar dazu führen, dass die Betroffenen blind oder hochgradig sehbehindert zur Welt kommen. Ein Beispiel für eine solche Erkrankung ist die Leber'sche kongenitale Amaurose bzw. die frühkindliche schwere Netzhautdystrophie, verursacht durch Mutationen im RPE65-Gen. Aktuelle Forschungsergebnisse mehren jedoch die Hoffnung, dass vielen an erblichen Augenerkrankungen leidenden Patienten in Zukunft mittels gentherapeutischer Verfahren geholfen werden kann.

Präklinische Studien zur Therapie der RPE65-Mutation am Tiermodell verliefen sehr erfolgreich. Durch AAV-vermittelte Gentherapie konnte bei zuvor blinden Tieren ein signifikantes Sehvermögen wiederhergestellt werden. Verglichen mit den Erfolgen in den Tierstudien, verliefen die ersten klinischen Anwendungen an menschlichen Patienten weniger vielversprechend. Zwar waren die Studien hinsichtlich ihrer primären Endpunkte, der Sicherheit des Verfahrens und der Abwesenheit schwerer Nebenwirkungen, zufriedenstellend, jedoch profitierten die meisten der behandelten Patienten nur geringfügig von der Therapie. Insbesondere konnten bei den Patienten auch nach der Therapie keine Reizantworten im Elektroretinogramm abgeleitet werden.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage, ob und inwiefern durch die subretinale Injektion, mit der der therapeutische Vektor in das Auge eingebracht wird, oder durch die Expression eines Transgens in den Photorezeptoren Veränderungen in der Architektur der synaptischen Verschaltungen in der Retina verursacht werden. Einleitend soll zunächst ein kurzer Einblick in Aufbau und Funktionsweise der Netzhaut und ein Überblick über die Erkrankungsgruppe der hereditären Netzhautdystrophien gegeben werden, bevor näher auf das Protein RPE65, seine Rolle für den Sehvorgang und den aktuellen Stand der Forschung zu gentherapeutischen Behandlungsmöglichkeiten für Patienten, die an RPE65-Mutationen leiden, eingegangen wird. Auf dieser Grundlage wird schließlich die der Arbeit zugrundeliegende Fragestellung ausgearbeitet.

1.1 Anatomie der Retina

Die für das Sehen verantwortlichen Sinneszellen liegen in der Retina, der Netzhaut des Auges. Die Retina ist ein komplexes neuronales Gewebe, das bei Vertebraten entwicklungsgeschichtlich dem Neuralrohr entstammt und somit Teil des zentralen Nervensystems (ZNS) ist [1-3]. Die Retina kleidet das Auge von innen aus und liegt der gefäßführenden Choroidea auf. Sie besteht aus zwei Gewebeblättern, einem äußeren Blatt (retinales Pigmentepithel) und einem inneren Blatt (Neuroretina).

Das äußere Blatt entspricht dem **retinalen Pigmentepithel (RPE)**, einem kubischen Epithel, welches basal der Bruch-Membran und der Choroidea aufliegt und dessen apikale Ausläufer sich den äußeren Segmenten der Photorezeptoren anlegen [3, 4]. Die Zellen des RPE sind reich an den namensgebenden Pigmentgranula, durch die ihnen einerseits eine Schutzfunktion für die dahinter liegenden Zellschichten gegen einfallendes Licht zukommt und zudem die Verzerrung des wahrgenommenen Bildes durch Streuungsartefakte reduziert wird [5]. Das RPE ist Teil der Blut-Netzhaut-Schranke und spielt durch seine Position zwischen Choroidea und Neuroretina eine zentrale Rolle in der Versorgung der Photorezeptoren mit Sauerstoff und Energieträgern sowie bei der Entsorgung anfallender Metabolite [4]. Zu den wichtigsten Aufgaben des RPE gehört die Reaktivierung des gebleichten Chromophors all-trans-Retinaldehyd zur aktiven Isoform 11-cis-Retinol im Rahmen des sogenannten Retinolzyklus [6].

Das innere Blatt, die **Neuroretina**, besteht aus im Wesentlichen fünf Typen von neuronalen Zellen sowie assoziierten Stütz- und Gliazellen. Bereits lichtmikroskopisch lässt die Neuroretina sich in mindestens sieben klar voneinander abgrenzbare Schichten sowie etliche Subschichten gliedern [7]. Auf der lichtabgewandten Außenseite liegen die Sinneszellen der Retina, die Photorezeptoren. Einfallendes Licht löst als Schlüsselreiz in den Photorezeptoren eine Kaskade chemischer Prozesse aus, die zur Entstehung elektrischer Potentialschwankungen an der Zellmembran führen [8-10]. Diese elektrischen Signale werden von den Photorezeptoren als Neurone erster Ordnung über Bipolarzellen, Horizontalzellen und Amakrinzellen als Neurone zweiter Ordnung an die Ganglienzellen als Neurone dritter Ordnung der Sehbahn weitergeleitet [3, 5].

Zwischen den beiden Retinablättern liegt ein schmaler kapillärer Spalt, die **Interphotorezeptormatrix (IPM)** [3, 4]. An dieser Stelle können sich die beiden Blätter leicht voneinander ablösen, so dass ein pathologischer subretinaler Raum entsteht, der zu einer sogenannten Netzhautablösung führt. Dieser Umstand wird aber auch zum Einbringen therapeutischer Gene in unmittelbare Nähe zu den Zielzellen im Rahmen einer subretinalen Injektion genutzt (s. dazu Abschnitt 2.3.1).

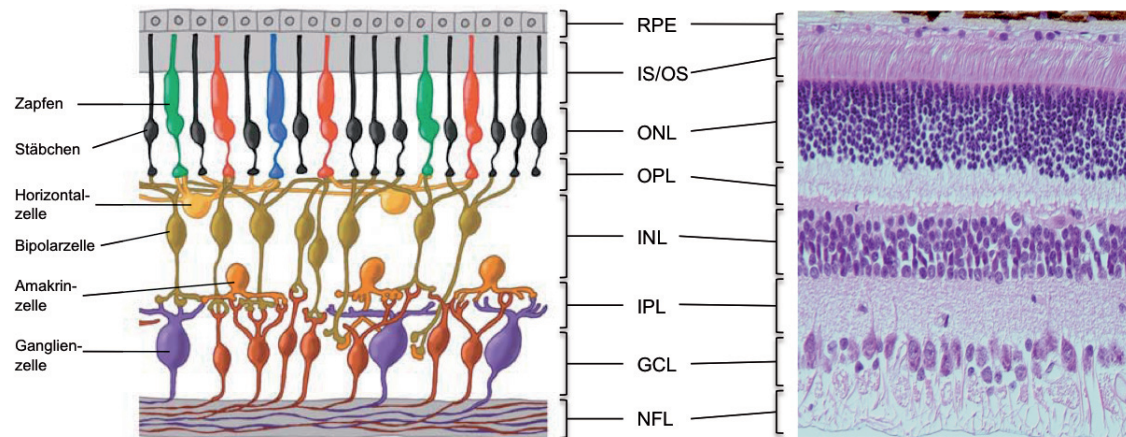


Abbildung 1: Aufbau der Retina.

Linke Seite: vereinfachende Schemazeichnung der fünf Typen retinaler Neurone und ihrer Vernetzung. Rechte Seite: histologisches Präparat eines Vertikalschnitts durch die menschliche Retina, HE-Färbung. Erläuterungen siehe Text. RPE: retinales Pigmentepithel, IS: Photorezeptor-Innensegmente, OS: Photorezeptor-Außensegmente, ONL: äußere Körnerschicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, INL: innere Körnerschicht, IPL: innere plexiforme Schicht, GCL: Ganglienzellschicht, NFL: Nervenfaserschicht. Linke Abb. modifiziert nach [5], rechte Abb. aus Webvision: The Organisation of the Retina and Visual System, <http://webvision.med.utah.edu>.

An der lichtabgewandten Seite der Retina liegen die äußeren Segmente (*outer segments*, OS) der Photorezeptoren (PR), in denen die Sehpigmente als chemisches Substrat des Sehvermögens lokalisiert sind [10, 11]. Die Somata der Photorezeptoren liegen in der äußeren Körnerschicht (*outer nuclear layer*, ONL). Ihrer Form nach unterscheidet man die länglichen, filigranen Stäbchen (Durchmesser 1-2 μm) von den plumperen Zapfen (Durchmesser 3-5 μm). Die **Stäbchen** vermitteln das farbneutrale Nacht- und Dämmerungssehen [11]. Durch ihre hohe Empfindlichkeit und die konvergente Verschaltung auf nachgeordnete Zellen sind sie darauf spezialisiert, niedrige Lichtintensitäten zu detektieren und zu verstärken. Diese hohe Empfindlichkeit geht jedoch mit Einbußen an räumlicher (konvergente Verschaltung) und zeitlicher (geringere Transduktionsgeschwindigkeit) Auflösung einher. Die **Zapfen** vermitteln das Farbsehen bei höheren Lichtintensitäten sowie das hochauflösende Sehen [11, 12]. Voraussetzung für die Wahrnehmung von Farben ist das Vorhandensein von mindestens zwei Zapfentypen mit unterschiedlicher spektraler Empfindlichkeit. Während die meisten Säugetiere über zwei Zapfentypen verfügen und somit Dichromaten sind, haben Menschen und die meisten Primaten drei Zapfentypen mit Absorptionsmaxima für kurz- ($\lambda_{\text{max}} \approx 420 \text{ nm}$), mittel- ($\lambda_{\text{max}} \approx 535 \text{ nm}$) und langwelliges ($\lambda_{\text{max}} \approx 565 \text{ nm}$) Licht, was sie zu Trichromaten macht [12]. Entsprechend des hervorgerufenen Farbeindrucks werden die Zapfentypen auch als Blau-, Grün- und Rotzapfen bzw. in Anlehnung an die englischen Bezeichnungen der Wellenlängen als S- (*short*), M- (*middle*) und L- (*long*) Zapfen bezeichnet.

In der äußeren plexiformen Schicht (*outer plexiform layer*, OPL) erfolgt die Verschaltung von den Photorezeptoren auf die nachfolgenden Horizontal- und Bipolarzellen [13]. Die **Horizontalzellen** erhalten lichtinduzierte Signale von den Photorezeptoren und sind

untereinander durch Zellkontakte elektrisch gekoppelt. Sie führen zu einer Querverschaltung innerhalb der Netzhaut und werden aufgrund ihrer negativen Rückkopplung auf die Photorezeptoren mit Kontrastregulierung in Verbindung gebracht [13-15]. Die vertikale Reizweiterleitung erfolgt über **Bipolarzellen**, deren Perikarya – zusammen mit denjenigen der Horizontal- und Amakrinzellen – in der inneren Körnerschicht (*inner nuclear layer*, INL) liegen [3]. Bei Säugern existieren bis zu 13 verschiedene Subtypen (bei Ratten 10, beim Menschen 11, bei Mäusen 13), die grob in ON- und OFF-Bipolarzellen untergliedert werden können, wobei die OFF-Bipolarzellen in den äußeren Schichten und die ON-Bipolarzellen in den inneren Schichten der inneren plexiformen Schicht (*inner plexiform layer*, IPL) stratifizieren [15-20]. Über ihre Synapsen führen sie zu einer Erregung von Amakrinzellen und Ganglienzellen.

Die **Amakrinzellen** sind mit ihren Somata im Wesentlichen in der inneren Körnerschicht, zum Teil aber auch in der Ganglienzellschicht (*ganglion cell layer*, GCL) lokalisiert. Sie führen zu einer lateralen Signalverarbeitung innerhalb der inneren plexiformen Schicht. Schließlich erfolgt über die **Ganglienzellen** die Weiterleitung der so modulierten Signale in höhere Zentren der visuellen Bahn. Sie sind dabei, mit Ausnahme einiger Amakrinzellen, die einzigen Zellen der Netzhaut, die Aktionspotentiale bilden. In den übrigen Zelltypen der Retina erfolgt die Signalbildung und -übertragung mittels graduierter Potentiale [21].

Neben den fünf retinalen Neuronen gibt es in der Netzhaut drei Typen von Gliazellen (vgl. [22]). Die wichtigsten und zahlreichsten sind die **Müller-Zellen**. Dabei handelt es sich um eine spezialisierte Art von Gliazellen, die die gesamte Netzhaut mit ihren Fortsätzen radial durchziehen. Sie liegen mit ihren Somata im äußeren Anteil der inneren Körnerschicht und bilden mit ihren Fortsätzen die innere und äußere Begrenzung der Retina: die innere Grenzmembran (*inner limiting membrane*, ILM) und die äußere Grenzmembran (*outer limiting membrane*, OLM). Sie bilden den Stütz- und Halteapparat der Retina, isolieren die retinalen Neurone elektrisch und halten das interzelluläre Milieu aufrecht durch die Aufnahme von Glutamat und die Regulierung der K^+ -Konzentration. Astrozyten kommen in der Retina vor allem im Bereich der Nervenfaserschicht, und dort in enger Assoziation zu retinalen Gefäßen, vor. Den in geringer Anzahl ubiquitär in der Netzhaut vorkommenden Mikrogliazellen wird eine Rolle bei der Phagozytose degenerierter Neurone zugeschrieben.

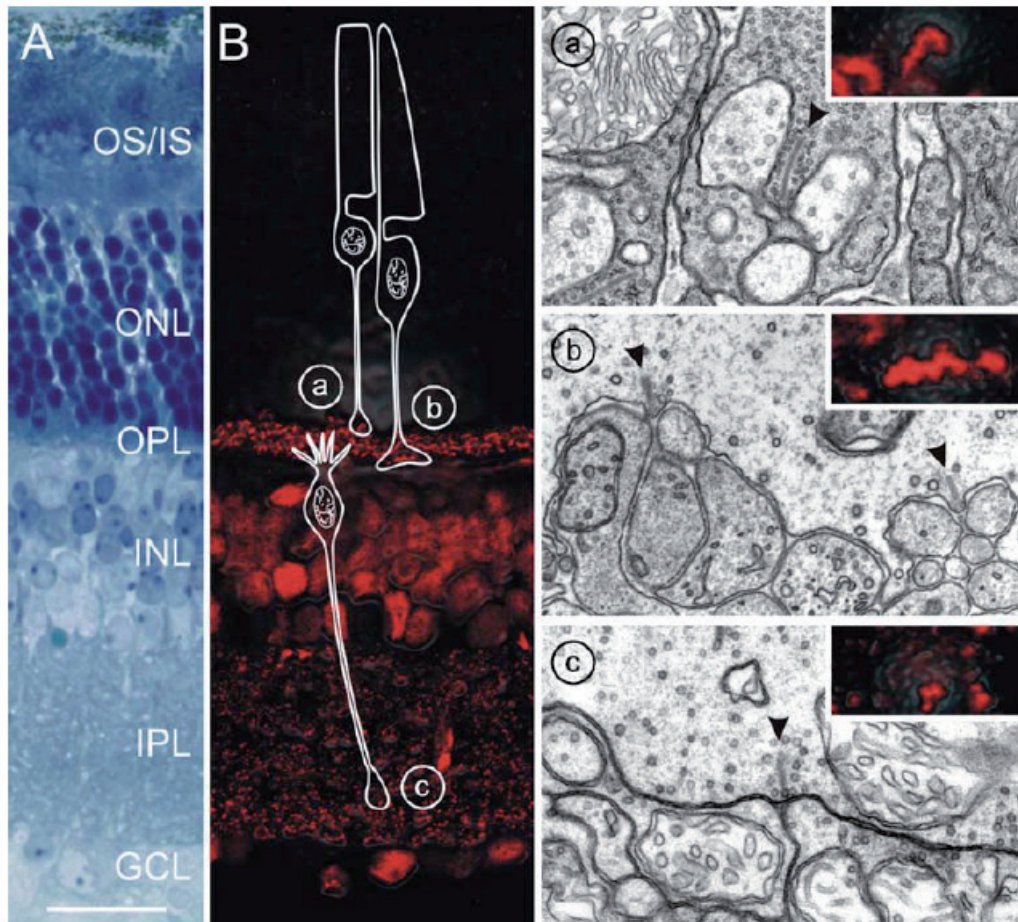


Abbildung 2: Ribbonsynapsen der Retina.

Links (**A**): Durchlichtaufnahme eines Vertikalschnitts durch die Retina in Toluidin-Blau-Färbung mit Kennzeichnung der retinalen Schichten. OS/IS: Photorezeptor-Außen-/Innensegmente, ONL: äußere Körnerschicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, INL: innere Körnerschicht, IPL: innere plexiforme Schicht, GCL: Ganglienzellschicht. Skalenbalken 20µm (für A und B). Mitte (**B**): Konfokalmikroskopische Aufnahme eines Vertikalschnitts durch die Mäuse-Retina mit Immunfärbung für CtBP2/RIBEYE (rot), welche die synaptischen Ribbons in OPL und IPL sowie Zellkerne in INL und GCL markiert. Die in der OPL miteinander verschalteten Stäbchen (a) bzw. Zapfen (b) und Bipolarzellen (c) sind schematisch dargestellt. Rechts: Hochauflösende Vergrößerungen der in (B) hervorgehobenen Ribbon-Synapsen (Inlays) und korrespondierende EM-Aufnahmen. (a) Stäbchen-Endknöpfchen, (b) Zapfenendfüßchen, (c) Bipolarzellaxon. Pfeilköpfe: synaptische Ribbons. Erläuterungen siehe Text. Abb. aus [23].

1.1.1 Zellkontakte in der äußeren plexiformen Schicht (OPL)

Ein erheblicher Teil der Verarbeitung visueller Signale findet bereits in der Retina selbst statt. In den beiden plexiformen Schichten werden die eingehenden Signale nicht bloß weitergeleitet, sondern hinsichtlich ihres Informationsgehalts zum Beispiel nach Helligkeit, Dunkelheit, Kontrast, Farbe oder Bewegung aufgeteilt und in parallelen Bahnen weiterverarbeitet [15, 24]. Dabei weist bereits die erste synaptische Verschaltungsschicht, die äußere plexiforme Schicht, in der die Photorezeptoren untereinander und mit den nachgeschalteten Horizontal- und Bipolarzellen verbunden sind, eine Komplexität auf, die im übrigen Nervensystem ihresgleichen sucht (z. B. [25]).

1.1.2 Ribbon- oder Bandsynapsen der Photorezeptor-Terminalien

Die aktiven Zonen der Photorezeptor-Terminalien sind durch eine spezielle präsynaptische Struktur, das sog. *Ribbon* (Proteinband), gekennzeichnet (Reviews in [23, 26, 27]). Dabei handelt es sich um eine bandförmige, elektronendichte Organelle, die sich von der aktiven Zone aus in das Zytoplasma erstreckt und an der eine Vielzahl synaptischer Vesikel gebunden sind [28, 29]. Die kleinen Stäbchen-Endknöpfchen (ca. 3 µm Durchmesser) enthalten in der Regel nur ein einzelnes Proteinband, welches hufeisenförmig gebogen um eine ca. 1-2 µm tiefe Invagination der basalen Zellmembran mit den darin liegenden postsynaptischen Elementen angeordnet ist [23]. Das Proteinband ragt etwa 200 nm tief in das Zytoplasma hinein und erreicht eine Länge von 1-2 µm [26]. Die wesentlich größeren Zapfen-Füßchen (Durchmesser zwischen 4-5 µm foveal bis ca. 8 µm peripher) enthalten zwischen 20 und 50 Proteinbänder mit kürzeren aktiven Zonen, die lichtmikroskopisch wie an einer Kette aufgereihe Punkte imponieren [15, 23, 25].

Dem Proteinband wird eine Rolle bei der kontinuierlichen Bereitstellung großer Mengen synaptischer Vesikel zugeschrieben. Die am Aufbau der Bandsynapse beteiligten Proteine scheiden sich in zwei Kompartimente, das Ribbon-assoziierte Kompartiment und das Aktive-Zone-Kompartiment [30]. Hauptbestandteil des Ribbons ist das Protein RIBEYE, dessen Vorkommen im Organismus auf die Proteinbänder in Bandsynapsen beschränkt ist [26, 31]. Es handelt sich dabei um ein alternatives Transkript des CtBP2-Gens und enthält im Bereich seines Carboxy-Endes fast die gesamte Proteinsequenz des in Zellkernen exprimierten transkriptionellen Corepressors CtBP2 [23, 31]. Andere, eng mit dem Ribbon assoziierte Proteine sind das Strukturprotein Piccolo, CtBP1, RIM1 und das Kinesin-Motorprotein KIF3A [26, 30]. Zum Aktive-Zone-Kompartiment gehören die Proteine RIM2, Munc13-1, CAST1 und eine Kalzium-Kanal $\alpha 1$ -Untereinheit (CACNA1F) [30]. Das Strukturprotein Bassoon scheint für die Verankerung des Proteinbandes an der aktiven Zone verantwortlich zu sein [30, 32].

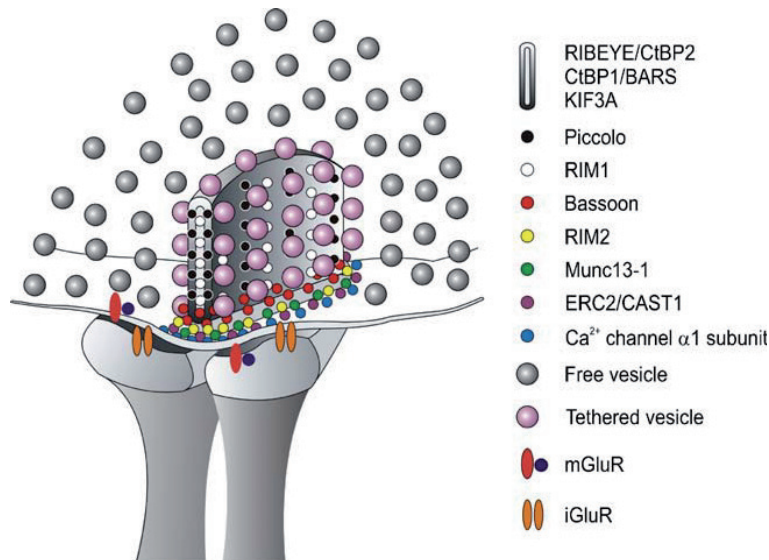


Abbildung 3: Synaptisches Ribbon und assoziierte Proteine.

Schematische Darstellung des synaptischen Ribbons eines Photorezeptor-Terminals mit assoziierten Proteinen. Mittig im Bild ist querverlaufend die präsynaptische Zellmembran des Photorezeptors dargestellt. Darunter befinden sich als postsynaptische Elemente zwei Bipolarzellendendriten. Erläuterungen siehe Text. Abb. aus [23].

Photorezeptoren reagieren auf Lichtstimulation mit einer graduellen Hyperpolarisation und setzen an ihren synaptischen Endigungen, den Zapfen-Füßchen und Stäbchen-Endknöpfen, den Neurotransmitter Glutamat frei [33-35]. Die Glutamat-Freisetzung ist in Dunkelheit am höchsten und wird mit zunehmender Beleuchtung graduell reduziert. Um eine kontinuierliche (im Gegensatz zur phasischen Transmitterfreisetzung an konventionellen Synapsen) und dynamische Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat über eine große Bandbreite an möglichen Intensitäten gewährleisten zu können, müssen an Bandsynapsen mehrere Hundert bis Tausend synaptische Vesikel pro Sekunde freigesetzt werden [23, 36, 37]. Das übersteigt die Exozytose-Rate an konventionellen Synapsen deutlich [38]. Bei den Ribbon- bzw. Bandsynapsen handelt es sich daher offenbar um eine spezialisierte Synapsenart in Sinnesneuronen mit einer fortwährenden Glutamat-Exozytose, wie Photorezeptoren und Bipolarzellen des Auges sowie Haarzellen des Innenohrs ([15] m. w. H.). Die vorherrschende Hypothese betrachtet die Proteinbänder als Reservoir zur Bereitstellung synaptischer Vesikel für die kalziumabhängige Exozytose am synaptischen Spalt [15, 23, 37, 39]. Die Entdeckung von Proteinband-assoziierten Motorproteinen führte zum Modell eines Förderbands, welches kontinuierlich synaptische Vesikel in Richtung der aktiven Zone transportiert [40, 41]. Angesichts der Kapazitätsgrenzen eines Kinesin-getriebenen Transports scheint diese Sichtweise jedoch zu stark vereinfacht [15, 30, 38]. Die genaue Funktion des Ribbon-Bandes bleibt ungeklärt. Möglicherweise spielt auch eine Verbund-Exozytose (*compound exocytosis*), bei der die am Proteinband gebundenen synaptischen Vesikel miteinander fusionieren, eine Rolle [23, 36].

Auf postsynaptischer Seite stehen dem Proteinband je zwei invaginierende Fortsätze von Horizontalzellen und ein bis zwei mittig dazwischen liegende Bipolarzell-Dendriten gegenüber. Diese Anordnung prä- und postsynaptischer Elemente wird als Triade bezeichnet [15, 42]. Eine andere Klasse von Bipolarzellen bildet flache Kontakte aus, die die gesamte basale Membran der Zapfen-Endfüßchen bedecken. Ein Zapfen der peripheren Primatenretina erhält Kontakte von ca. 80 invaginierenden Horizontalzell- und ebenso vielen invaginierenden Bipolarzelldendriten. Zusätzlich bestehen etwa 200-300 basale Kontakte, so dass ein einzelnes Zapfen-Endfüßchen ca. 400-500 synaptische Kontakte unterhält [15].

L- und M-Zapfen sowie teilweise auch Stäbchen sind im Bereich ihrer Terminalien in der OPL auch untereinander durch elektrische Synapsen (*gap junctions*) verbunden [43, 44]. Diese elektrische Kopplung führt zur Unterdrückung von Hintergrundrauschen durch Ausmittelung des fehlerhaften Signals einzelner Photorezeptoren [15, 44].

1.1.3 Horizontalzellen

Horizontalzellen sind ausschließlich lateral innerhalb der OPL mit den Photorezeptoren verschaltet und unterhalten keine Zellkontakte in der IPL [13, 44]. In den meisten Säugetier-Retinae finden sich zwei (tlw. drei, vgl. [13]) Typen von Horizontalzellen (Typ A und Typ B, bzw. H1 und H2 bei Primaten). Die Dendriten der axonlosen Typ A Horizontalzelle sind mit Zapfen-Endfüßchen verschaltet. Die axontragende Typ B Horizontalzelle kontaktiert mit ihren Dendriten ebenfalls Zapfen und erhält über ihr Axon zusätzlich Eingang von Stäbchen [13, 44, 45]. In der Primaten-Retina zeigen die Horizontalzellen eine chromatische Selektivität. Die axontragende H1-Zelle (entsprechend der Typ B Horizontalzelle in Nicht-Primaten) kontaktiert überwiegend L- und M-Zapfen, die H2-Horizontalzelle kontaktiert überwiegend blausensitive S-Zapfen [15, 44]. Die Horizontalzellfortsätze inserieren jeweils als laterale Elemente der postsynaptischen Triade in die Invaginationen an den Proteinbändern, wobei jeweils zwei Horizontalzellfortsätze von zwei unterschiedlichen Horizontalzellen stammen und an ihren Spitzen unterhalb des präsynaptischen Proteinbands über *gap junctions* miteinander in Verbindung stehen [15, 45, 46]. Traditionell wurden Horizontalzellen überwiegend mit einer lateralen, GABA-vermittelten Feedback-Hemmung der Photorezeptoren in Verbindung gebracht. Zwei neuere Hypothesen gehen einerseits von einer Beeinflussung des extrazellulären elektrischen Potentials und damit einer Veränderung der Leitfähigkeit spannungsabhängiger Kalziumkanäle an der Photorezeptormembran, andererseits von einer Änderung des pH-Werts im synaptischen Spalt über Ionenpumpen aus ([15] m. w. H.). Unabhängig vom genauen Mechanismus wird dadurch eine Kontrastverstärkung an Grenzen unterschiedlicher Lichtintensität erreicht, indem die Signale benachbarter Photorezeptoren summiert werden und durch laterale Inhibition die

Lichtantwort eines einzelnen Photorezeptors durch die gleichzeitige Beleuchtung benachbarter Photorezeptoren gehemmt wird [13-15].

1.1.4 Bipolarzellen

In der Retina der meisten Säuger existieren 10-13 verschiedene Typen von Bipolarzellen [15, 18-20, 24, 47-49]. Sie werden morphologisch einerseits nach Form und Stratifizierung ihrer Axone in der IPL, andererseits nach ihren synaptischen Kontakten zu verschiedenen Photorezeptoren in der OPL unterschieden. Bereits Cajal erkannte die Stäbchen-Bipolarzelle, die ausschließlich Input von Stäbchen erhält, als eigenen Subtyp [7]. Die übrigen Bipolarzellen kontaktieren Zapfen-Endfüßchen. Funktionell werden sie in ON- und OFF-Bipolarzellen unterschieden, wobei die ON-Bipolarzellen invaginierende Synapsen am Zapfen-Endfüßchen bilden und somit Teil der oben beschriebenen Triaden-Struktur sind. OFF-Bipolarzellen bilden basale (bzw. flache) Zellkontakte an der Basis der Zapfen-Füßchen aus. Ein eingehender Lichtreiz führt an ON-Bipolarzellen zu einer Depolarisation und an OFF-Bipolarzellen zu einer Hyperpolarisation der Membran [15, 50]. Die gegenläufige Reaktion auf den gleichen Transmitter (Glutamat) wird durch unterschiedliche, an beiden Zapfenpopulationen exprimierte Glutamatrezeptoren vermittelt [5, 44].

In der Primatenretina gibt es darüber hinaus noch einen weiteren Typ Bipolarzellen, die Midget-Bipolarzellen (engl. *midget* = Zwerg) [45, 51]. Diese unterscheiden sich von den übrigen Bipolarzellen dadurch, dass sie nur Input von einem einzigen Zapfen bekommen. Sie sorgen für eine 1:1 Übertragung optischer Signale aus der zentralen Retina, insbesondere der Fovea, dem Ort des schärfsten Sehens, und sind somit morphologisches Substrat für das hohe räumliche Auflösungsvermögen der Primaten-Retina [15].

1.1.5 Besonderheiten der retinalen Morphologie bei Ratten

Die Retina von Ratten (wie auch von Mäusen und anderen, überwiegend nachtaktiven Nagern) ist Stäbchen-dominiert. Nur ca. 1% der Photorezeptoren sind Zapfen [5, 15, 52]. Bei Ratten sind 10 verschiedene Typen von Bipolarzellen bekannt. Neben der Stäbchen-Bipolarzelle gibt es noch neun weitere Bipolarzelltypen, die mit ihren dendritischen Verästelungen jeweils ca. 5-10 benachbarte Zapfen-Endfüßchen kontaktieren [15, 18]. Der Bipolarzelltyp 9 hat einen weit verzweigten dendritischen Baum und ist S-Zapfen-selektiv [49, 53]. Wie oben bereits erwähnt, kommen in der Retina von Ratten keine Midget-Bipolarzellen vor. Von Horizontalzellen gibt es in der Ratten-Retina – im Gegensatz zu den Retinae der meisten Säuger – nur einen Subtyp, der morphologisch dem axontragenden B-Typ entspricht [54].

1.2 Hereditäre Netzhautdystrophien

Als erbliche Netzhautdystrophien bezeichnet man eine heterogene Gruppe verschiedener Krankheiten, deren gemeinsames Merkmal die meist fortschreitende Degeneration von Photorezeptoren in der Netzhaut ist [55-57]. Die genotypische und phänotypische Heterogenität innerhalb dieser Erkrankungsgruppe ist erdrückend und entsprechend uneinheitlich sind Terminologie und Klassifikationen. In der Regel werden die Netzhautdystrophien danach eingeteilt, ob die Erkrankung primär die Stäbchen oder die Zapfen betrifft [57]. Es werden also Stäbchen-Zapfen-Dystrophien, Zapfen-Stäbchen-Dystrophien und reine Zapfendystrophien unterschieden. Zapfen-Dystrophien betreffen vornehmlich das zentrale, Stäbchen-Dystrophien das periphere Gesichtsfeld. Klinisch werden meist zusätzliche Einteilungskriterien herangezogen, etwa Erkrankungsbeginn, Krankheitsprogression, die vorherrschende Symptomatik und diagnostische Befunde (z. B. [56]). Weiter kann eine Einteilung nach dem zugrunde liegenden Gendefekt erfolgen (vgl. <http://www.retina-international.org/sci-news/databases/disease-database/>) oder nach dem Zelltyp, in dem das die Krankheit verursachende Gen exprimiert wird (z. B. Photorezeptoren oder retinales Pigmentepithel, vgl. [58]). In allen genannten Fällen ist zu beachten, dass dem gleichen Phänotyp Defekte in vielen verschiedenen Genen zugrunde liegen können und gleichzeitig ein und derselbe Gendefekt – aus oft noch ungeklärten Gründen – zu verschiedenen klinischen Phänotypen (und damit Diagnosen) führen kann (vgl. [59]).

1.2.1 Retinopathia pigmentosa

Die häufigste und bekannteste Netzhautdystrophie ist die Retinopathia pigmentosa (auch: Retinitis pigmentosa, RP; der Begriff wird oft synonym für alle Arten von Stäbchen-Zapfen-Dystrophien verwendet). Die Retinopathia pigmentosa macht sich regelmäßig zunächst durch Verschlechterung des Dämmerungs- und Nachtsehens bemerkbar und führt im Verlauf zu einer progredienten konzentrischen Einengung des Gesichtsfelds [56, 60, 61]. Das zentrale Gesichtsfeld kann davon relativ lange unbeeinflusst bleiben, selbst dann ist den betroffenen Patienten jedoch eine visuelle Orientierung im Raum in der Regel nicht mehr möglich, so dass die Mehrheit der Patienten vor Erreichen des 40. Lebensjahrs mindestens im sozialversicherungsrechtlichen Sinne blind ist. Die weltweite Prävalenz dieser Erkrankung beträgt 25/100.000 [61]. Studien aus mehreren Ländern belegen, dass es sich damit um die häufigste Ursache für hochgradige Sehbehinderung bei unter 60-jährigen handelt ([61] m. w. H.). Die Erkrankung ist zumeist monogen und wird überwiegend autosomal-rezessiv (50-60% der Fälle), seltener autosomal-dominant (30-40%) oder X-chromosomal (ca. 10%)

vererbt [60, 61]. Sporadische Fälle sind häufig. Bei ca. 20-30% der Patienten ist die Retinopathia pigmentosa mit anderen, nicht-ophthalmologischen Erkrankungen, assoziiert, z. B. im Rahmen des Usher- oder Bardet-Biedl-Syndroms [61]. Mutationen des RPE65-Gens sind für ca. 2% der Fälle von autosomal-rezessiver Retinopathia pigmentosa verantwortlich [60, 61].

1.2.2 LCA und EOSRD

Die Leber'sche kongenitale Amaurose (LCA) ist ein seltenerer Subtyp retinaler Dystrophien mit einer weltweiten Prävalenz von ca. 3/100.000 Neugeborenen und führt typischerweise zu einem Verlust des Sehvermögens von Geburt an oder innerhalb der ersten Lebensmonate [56, 60, 61]. Bleibt ein signifikantes Sehvermögen während der ersten Lebensjahre erhalten, spricht man von frühkindlicher schwerer Netzhautdystrophie (EOSRD von englisch: *early onset severe retinal dystrophy*) [58, 62, 63]. Diese terminologische Unterscheidung wird jedoch wenig einheitlich gehandhabt: in großen Teilen des angelsächsischen Schrifttums werden auch solche Fälle, in denen eine Erblindung erst im jungen Erwachsenenalter eintritt unter den Begriff LCA subsumiert.

Wegweisendes diagnostisches Merkmal einer LCA ist die fehlende Reizantwort im Elektroretinogramm (ERG) bereits im ersten Lebensjahr [56, 57, 62]. Weitere diagnostische Kriterien sind ein Spontannystagmus, amaurotische Pupillenstarre und eine im späteren Krankheitsverlauf auftretende fleckige Netzhautdystrophie mit Pigmentflecken und Depigmentierungen (der Fundus kann jedoch lange Zeit relativ unauffällig sein).

Im Verlauf der letzten Jahre ist eine Vielzahl von Gendefekten entdeckt worden, welche zum klinischen Bild der LCA führen. Es handelt sich dabei im Wesentlichen um Gene, die für Enzyme der Phototransduktionskaskade in den Photorezeptoren kodieren, sowie für Proteine, die am Vitamin-A-Metabolismus in den Zellen des retinalen Pigmentepithels beteiligt sind. Zu den häufigsten, die LCA verursachenden Defekten gehören Mutationen in den Genloci GUCY2D, CRB1, RPE65, RPGRIP1, AIPL1, TULP1 und CRX [63-69]. Dabei machen Mutationen des RPE65-Gens ca. 6 - 16% der Fälle aus [60].

1.3 RPE65 und seine Rolle für den Sehvorgang

RPE65 ist ein 65 kDa schweres Protein, welches in der mikrosomalen Membran von Zellen des retinalen Pigmentepithels exprimiert wird [70]. Es ist ein zentrales Enzym im visuellen Zyklus und maßgeblich an der Wiederherstellung des aktiven Sehpigments Rhodopsin beteiligt. Es handelt sich dabei um eine Isomerase, welche die Umwandlung von all-trans-Retinylolester zu 11-cis-Retinol katalysiert [71-73].

1.3.1 Phototransduktion und Retinolzyklus

In den Außensegmenten der Photorezeptoren befinden sich – bei den Zapfen an Einstülpungen der Zellmembran, bei den Stäbchen an den intrazellulär gelegenen Scheibchenmembranen – die Sehpigmente. Diese bestehen bei Stäbchen und den drei unterschiedlichen Zapfentypen aus je einem unterschiedlichen Apoprotein Opsin, sowie aus einer chromophoren Gruppe, dem 11-cis-Retinal, einem Aldehyd des Vitamins A. Die strukturellen Unterschiede der vier Opsine haben unterschiedliche Absorptionsmaxima für Licht verschiedener Wellenlänge zur Folge, worin die molekulare Grundlage für das Farbsehen liegt (vgl. oben: Abschnitt 1.1). Einfallende Lichtquanten werden von 11-cis-Retinal absorbiert und bewirken eine Stereoisomeration zu all-trans-Retinol. Dadurch wird über mehrere Zwischenschritte eine Konformationsänderung des Opsins bewirkt, die schließlich zu einer verminderten intrazellulären cGMP-Konzentration und zu einem verminderten Einstrom von Na^+ - und Ca^+ -Ionen in die Zelle und damit zur Hyperpolarisation der Zellmembran führt. Als Folge kommt es zu einer verminderten Ausschüttung des Transmitters Glutamat an den Synapsen der Photorezeptoren. Dieser Prozess der Umsetzung der Energie einfallender Lichtquanten in gradierte zelluläre Potentiale wird als Phototransduktion bezeichnet.

Das „gebleichte“ Chromophor all-trans-Retinol wird zu seiner Wiederaufbereitung in das RPE aufgenommen. Dort wird es durch die Lecithin-Retinol-Acyl-Transferase in seine Speicherform all-trans-Retinylester umgewandelt und in spezialisierten Mikrosomen, den Retinosomen, abgelegt. Die all-trans-Retinylester bilden das Substrat für die Isomerisierung zum aktiven Chromophor 11-cis-Retinol. Diese wird durch das Enzym RPE65 vorgenommen, welches dazu die energiereiche Esterbindung spaltet. Das 11-cis-Retinol wird durch die Retinol-Dehydrogenase 5 zu 11-cis-Retinal oxidiert und durch zelluläre Retinaldehyd-bindende Proteine abtransportiert, um den Photorezeptoren neuerlich als Chromophor zur Verfügung gestellt zu werden (zum Ganzen vgl. [4, 6, 11, 58]).

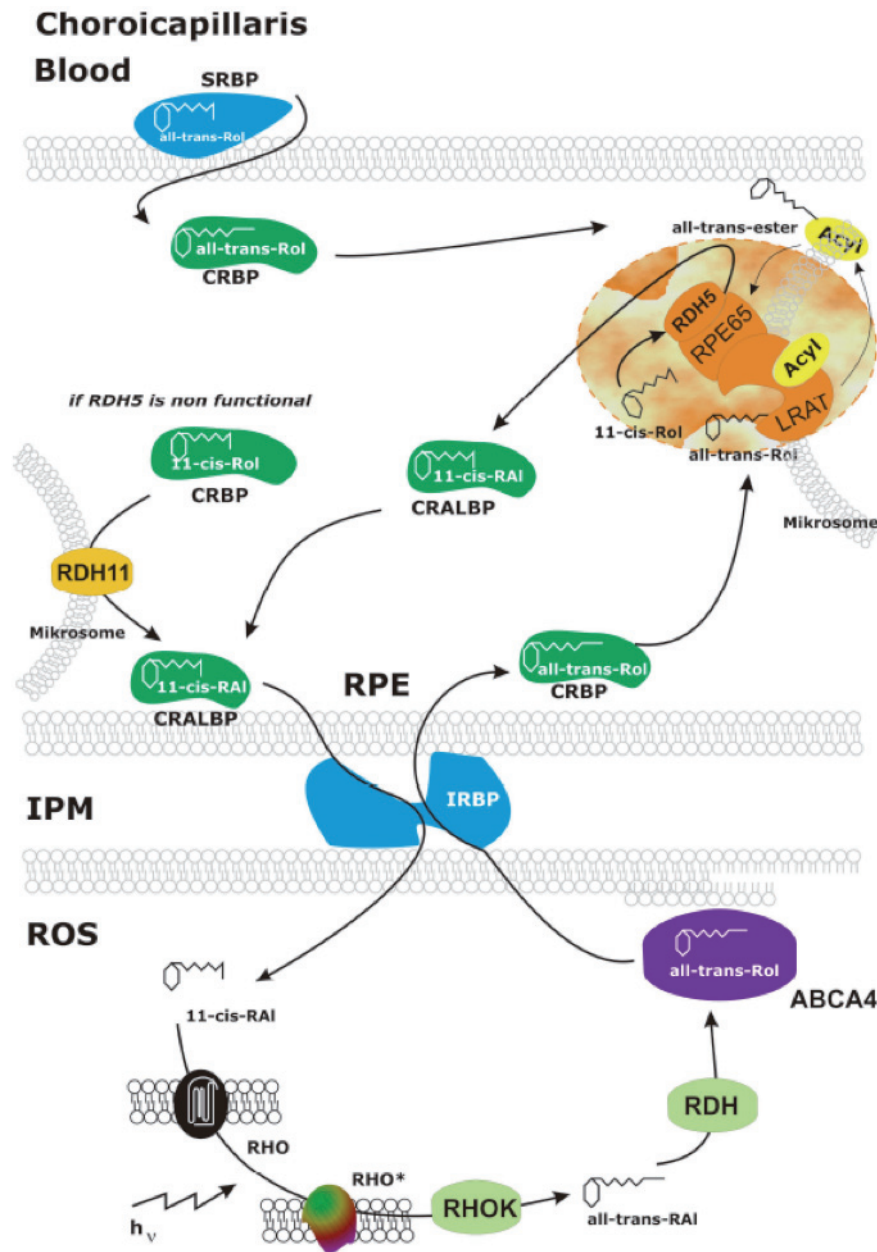


Abbildung 4: Retinolzyklus.

Schemazeichnung des Retinolzyklus. In den Stäbchen-Außensegmenten (ROS: rod outer segments) wird das im aktiven Chromophor Rhodopsin (RHO) gebundene 11-cis-Retinal (11-cis-RAI) durch einfallendes Licht zu all-trans-Retinal (all-trans-RAI) isomerisiert. Dieses wird durch eine Rhodopsinkinase (RHOK) aus dem „gebleichten“ Chromophor (RHO*) abgeschieden und durch eine Retinoldehydrogenase (RDH) zu all-trans-Retinol (all-trans-Rol) reduziert. Anschließend wird es durch Transportproteine (ABCA4: ATP-binding cassette transporter, IRBP: interstitial Retinol binding protein) über den Interzellulärspalt (IPM: Interphotorezeptormatrix) in das retinale Pigmentepithel (RPE) befördert und dort an zelluläre Retinol-bindende Enzyme (CRBP: cellular Retinol binding protein) gebunden. Nach Veresterung durch die Lecithin-Retinol-Acyl-Transferase (LRAT) erfolgt die Speicherung in der mikrosomalen Membran. Von hier aus erfolgt durch Aufspaltung der energiereichen Esterbindung durch das Enzym RPE65 die Isomerisierung zu 11-cis-Retinol (11-cis-Rol), welches schließlich durch eine Retinol-Dehydrogenase (RDH5) zu 11-cis-Retinal umgewandelt und über zelluläre Retinaldehyd-bindende Proteine (CRALBP) den Photorezeptoren wieder zugeführt wird. Wenn die RDH5-Aktivität gestört ist, erfolgt die Umwandlung durch eine alternative mikrosomale Dehydrogenase (RDH11). Das RPE wird zudem über die Zirkulation mit frischem All-trans-Retinol versorgt (SRBP: serum retinol binding protein). Abb. aus [58].

1.3.2 RPE65-Mutation: Pathophysiologie und Klinik

Mutationen innerhalb des RPE65-Gens führen zu einem teilweisen oder vollständigen Funktionsverlust der RPE-Isomerase. Im Falle einer Nullmutation kann das gebleichte Chromophor nicht reaktiviert und somit das Sehpigment Rhodopsin nicht mehr hergestellt werden, so dass die Photorezeptoren unempfindlich für Lichtreize werden. Das sich vor dem Reaktionsschritt aufstauende all-trans-Retinyl lagert sich in Form von Retinylestern im RPE ab [74, 75]. Obwohl es sich um einen Defekt in Zellen des retinalen Pigmentepithels handelt, macht die Erkrankung sich phänotypisch auf Ebene der Photorezeptoren durch deren Degeneration bemerkbar [76]: Aus bislang nicht vollständig verstandenen Gründen kommt es mit der Zeit zur Auslösung von Apoptosesignalen in den Photorezeptoren und somit zur retinalen Degeneration. Offenbar spielt dabei die durch das ungebundene Apoprotein Opsin ausgelöste, unkontrollierte Aktivität der Phototransduktionskaskade eine Rolle [77-79].

Die Folge ist ein frühzeitiger Verlust des Sehvermögens. Je nach Beginn und Ausprägung der Symptome spricht man von LCA oder frühkindlicher schwerer Netzhautdegeneration (EOSRD). Mutationen im RPE65-Gen machen etwa 6-16% der Fälle von LCA und ca. 2% der autosomal-rezessiven Retinitis pigmentosa aus. Typisches klinisches Zeichen einer RPE65-Mutation ist – neben den oben genannten – die verminderte oder fehlende Fundusautofluoreszenz bei den betroffenen Patienten [80]. Diese kommt bei gesunden Individuen durch fluoreszierende Endprodukte des Chromophorabbaus aus vom RPE phagozytierten Anteilen der Photorezeptor-Außensegmente zustande [6].

1.3.3 RPE65-Mutation im Tiermodell

Es sind eine Reihe von Tiermodellen zum Studium der Pathomechanismen bei RPE65-Mutationen beschrieben worden, bei denen ähnliche pathologische Erscheinungen wie beim Menschen beobachtet werden konnten. Dazu gehören eine Knock-out Maus [71] sowie die spontan auftretende Mauslinie rd12 [74]. Bei beiden Mauslinien kommt es durch die Unterbrechung des visuellen Zyklus zu einer langsam voranschreitenden Netzhautdegeneration und zur Überakkumulation von Retinylestern im RPE. RPE65, 11cis-Retinal und Rhodopsin sind nicht nachweisbar. Die betroffenen Tiere sind von Geburt an blind und zeigen stark abgeschwächte ERG-Ableitungen. Des Weiteren ist eine Knock-in Maus mit Missense-Mutation entwickelt worden, die eine Restaktivität des Proteins zulässt und so zu einem minder stark ausgeprägten Phänotyp der Erkrankung führt [81]. Die meisten Informationen bezüglich Pathophysiologie und Verlauf der Erkrankung konnten jedoch am spontan auftretenden Hundemodell gewonnen werden [82]. Bei diesen Hunden der Rasse Briard tritt eine Deletionsmutation von vier Basenpaaren an Position 487-490 im RPE65-Gen auf, wodurch ein verfrühtes Stoppcodon abgelesen und die resultierende mRNA dem

nonsense mediated decay (NMD) zugeführt wird [83, 84]. Da kein Protein hergestellt wird, handelt es sich um eine Nullmutation. Morphologische Befunde bei den betroffenen Tieren umfassen große Lipideinschlüsse im RPE, verkürzte und desorganisierte äußere Photorezeptorsegmente und einen mit dem Alter zunehmenden Verlust von Photorezeptoren [75, 85]. Es kommt zu einer veränderten Expression molekularer Marker in fast allen retinalen Zellen. Insbesondere kommt es zu einer Verschiebung von Rhodopsin aus den Außensegmenten der Stäbchen in Richtung perinukleärer und axonaler Zellmembran, zu Aussprossungen dendritischer Fortsätze von Bipolarzellen in die äußere Körnerschicht und zu Verkürzung der Axonterminalien der Stäbchen und ON-Bipolarzellen in der IPL [86]. Klinisch fallen die Tiere durch Nachtblindheit, einen stark verminderten Visus und schwache ERG-Ableitungen, die bereits nach zwei bis drei Lebensmonaten unter die Nachweisgrenze schwinden, auf [82].

1.4 Gentherapie retinaler Erkrankungen

1.4.1 Therapie-Strategien

Bei der gentherapeutischen Behandlung retinaler Erkrankungen werden zwei verschiedene Strategien verfolgt: die spezifische und die unspezifische Gentherapie. Welche Strategie zum Einsatz kommt, hängt davon ab, um was für eine Mutation es sich handelt. Rezessiv vererbte Erkrankungen gehen typischerweise mit einem totalen Funktionsverlust des betroffenen Proteins einher (*loss-of-function mutations*) [61]. Ist das mutierte Gen bekannt, kann im Sinne einer „*gene addition therapy*“ eine funktionelle Kopie des mutierten Gens in die Zellen eingebracht werden [61, 87]. Bei dominant vererbten Mutationen, bei denen der fortgesetzten Translation eines fehlerhaften Proteins in den Zellen eine maßgebliche Rolle in der Pathophysiologie zukommt, kann die Expression des betroffenen Gens gegebenenfalls mittels „*gene silencing*“ unterdrückt werden [61, 87]. Die unspezifische Gentherapie zielt dagegen darauf ab, bei Erkrankungen, deren genaue genetische Ursache noch nicht geklärt ist, durch die Expression neuroprotektiver Faktoren das Fortschreiten der Krankheit aufzuhalten oder einzudämmen. Es handelt sich hierbei mithin um einen symptomatischen Therapieansatz [87].

1.4.2 Adeno-assoziierte Viren (AAV)

Adeno-assoziierte Viren (AAV) scheinen am besten geeignet, die zelltypspezifische und lang anhaltende Expression von Proteinen in der Retina zu gewährleisten [88-90]. Insbesondere hinsichtlich der Anwendungssicherheit bieten AAV einige entscheidende Vorteile: sie sind nicht humanpathogen und kaum immunogen. Nach Transfektion der Zielzelle wird das

Vektorgenom in der Regel nicht in das Genom der Wirtszelle integriert, sondern liegt episomal vor, so dass keine Insertionsmutagenität besteht [91]. Schließlich enthalten rekombinante AAV-Vektoren keinerlei genetische Informationen für die Produktion viraler Proteine, die zu einer immunologischen Reaktion auf die transfizierte Zelle führen könnten. Bei lokaler Anwendung im ohnehin immunologisch privilegierten Auge (Blut-Netzhaut-Schranke, s. o. Abschnitt 1.1 und vgl. [92]) handelt es sich bei AAV also um ausgesprochen sichere Transportvehikel für therapeutische Gene.

AAV sind kleine, unbehüllte Parvoviren von 21 nm Durchmesser, die ursprünglich als Verunreinigung von Adenovirus-Kulturen entdeckt wurden, von denen sie für ihre Replikation abhängig sind [93]. Sie besitzen ein einzelsträngiges DNA-Genom von ca. 4700 Basen Länge [94]. Der kodierende Teil dieses DNA-Strangs befindet sich zwischen zwei *inverted terminal repeats* (ITR) von je 145 Basen Länge [95]. Für die Herstellung rekombinanter Viren können die zwischen den beiden ITR lokalisierten offenen Leseraster (*open reading frames*, ORF) REP und CAP entfernt und durch eine Replikationskassette, die in der Regel aus dem therapeutischen Gen inklusive Promotorregion und Polyadenylierungssequenz besteht, ersetzt werden [87]. Bei den heute verwendeten rekombinanten AAV-Vektoren ist die Replikationskassette üblicherweise zwischen den ITR des Serotyps AAV2 integriert, die wiederum in Kapside anderer Serotypen eingeführt werden. Die so entstandenen chimären Vektoren werden als AAV2/1 usw. (=AAV2-basierte Kassette in AAV1 Kapsid) bezeichnet [87, 96]. Als therapeutisches Gen wird in der Regel menschliche RPE65-cDNA unter der Kontrolle eines CMV-, CBA- oder hRPE65-Promoters eingesetzt [87].

Rekombinante Adeno-assoziierte Viren (rAAV) gehören zu den bevorzugten Transportvehikeln für das gezielte Einbringen von Transgenen in die Zellen der Retina [97]. Sie führen zu effizienter, stabiler und langanhaltender Expression transduzierter Gene in den Zielzellen, wobei die verschiedenen Subtypen sich in ihrem Tropismus unterscheiden, so dass die gezielte Transduktion bestimmter Zellpopulationen, z. B. von Photorezeptoren oder Zellen des RPE, möglich wird (vgl. Tbl. 1 und [98-108]). Eine weitere Möglichkeit, die Zellspezifität zu erhöhen, ist die Verwendung von zellspezifischen Promotoren, etwa des RPE65-Promoters, an Stelle von unspezifischen viralen Promotoren [87].

Trotz ihrer Persistenz in Form von nachweisbaren, definierten Partikeln innerhalb der Retina [109] rufen sie offenbar kaum Immunreaktionen oder anderweitige Nebenwirkungen hervor [92, 110, 111]. Eine vormalige Behandlung mit AAV an einem Auge stellt nach derzeitiger Erkenntnis keine Kontraindikation für eine neuerliche Behandlung am kontralateralen Auge dar [112-115]. Es existieren jedoch auch Hinweise darauf, dass die subretinale Behandlung mit AAV-Vektoren zu Gentransfer in übergeordnete Neurone entlang der Sehbahn im Gehirn führen kann [116, 117].

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

Tabelle 1: Zellulärer Tropismus verschiedener AAV-Serotypen.

Zellulärer Tropismus verschiedener AAV-Serotypen in der Retina nach subretinaler Injektion. RPE: retinales Pigmentepithel, PR: Photorezeptoren, INL: innere Körnerschicht, GZ: Ganglienzellen, MZ: Müller-Zellen, n. u.: nicht untersucht. Modifiziert nach [87].

1.4.3 Proof-of-Principle-Studien am Tiermodell

Sämtliche der oben genannte Tiermodelle (s. o.: Abschnitt 1.3.3) wurden bereits zur Etablierung experimenteller Therapiemethoden herangezogen. Bei der RPE65-Knock-out Maus konnte sowohl mit frühzeitiger fötaler Gentherapie als auch mit AAV2-vermittelter Therapie bei adulten Tieren eine partielle Wiederherstellung des ERG und ein Erhalt retinaler Strukturen erreicht werden [118, 119]. Die intravenöse Zufuhr von 11-cis Retinal führte zwar zu einer vorübergehenden Verbesserung des ERG, beschleunigte aber die Retinylester-Ablagerung und zeigte somit nur einen palliativen Effekt [120]. Bei der rd12-Maus konnte nach subretinaler Verabreichung eines rAAV5-CBA-hRPE65-Vektors eine fast vollständige Normalisierung der in Photorezeptoren exprimierten Rhodopsin-Menge und ein deutlicher Rückgang der Ester-Ablagerungen im RPE nachgewiesen werden [121]. Sowohl im Stäbchen- als auch im Zapfen-ERG zeigte sich eine Wiederherstellung von ca. 66% der normalen Netzhaut-Funktion. Dass die elektrophysiologisch nachweisbare Verbesserung auch mit einer tatsächlichen Wiederherstellung des Sehvermögens einhergeht, bestätigten Orientierungsversuche im Wasser-Labyrinth, in denen behandelte Tiere eine näherungsweise normales Sehverhalten zeigten[121].

Der Weg in die klinische Anwendung wurde durch die erfolgreichen Versuche am Briard-Hundemodell stark beschleunigt. Mehrere Forschungsgruppen konnten unabhängig voneinander zeigen, dass bei diesen kongenital blinden Tieren durch AAV-vermittelte Gentherapie eine weitgehende Wiederherstellung des Sehvermögens möglich ist [55, 122, 123]. ERG-Reizantworten waren innerhalb von 2-4 Wochen nach Behandlung wieder ableitbar und die Tiere konnten einen Hindernisparcours kollisionsfrei bewältigen. Mittels Immunfluoreszenzfärbung und PCR konnte der erfolgreiche Gentransfer nachgewiesen werden. Morphologisch zeigten behandelte Hunde einen deutlichen Rückgang von Lipideinschlüssen im RPE. Follow-up Studien zeigten, dass die Expression des Transgens

auch langfristig auf den Bereich der ursprünglich erzeugten Injektionsblase begrenzt blieb und dass die ERG-Ableitungen nach Therapie über Jahre hinweg konstant blieben [124, 125].

Eine wichtige Erkenntnis aus diesen Studien war, dass sich bei älteren Tieren trotz erfolgreichem Gentransfer in der Regel keine Funktionsverbesserung mehr erreichen ließ [55]. Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass sich auch bei älteren Tieren noch eine gewisse funktionelle Verbesserung erreichen lässt [126]. Allerdings ließ sich das Voranschreiten der retinalen Degeneration dadurch nicht aufhalten, ein Effekt der bei älteren Tieren mit bereits fortgeschrittener Degeneration umso ausgeprägter zu sein scheint [127]. Es konnte somit ein therapeutisches Zeitfenster identifiziert werden, das sich bei Hunden im Verlauf des zweiten Lebensjahres zu schließen scheint. Übertragen auf den Menschen wird man wahrscheinlich davon ausgehen müssen, dass eine Behandlung jenseits der zweiten Lebensdekade nicht erfolgversprechend ist.

Tiermodell	Vektor	Beobachtungsdauer (Monate)	Morphologische Verbesserung	Funktionelle Verbesserung	Quelle
rpe65-/- Maus	AAV2/2.CMV.rpe65	11 - 18	-	- (transitorisch)	Lai 2004
	AAV2/1.CMV.RPE65	2 - 4	+	+	Dejneka 2004
	AAV2/1.CMV.RPE65 in utero	1 – 2,5	n. u.	+	Dejneka 2004
	AAV2/2.modCBA.RPE65	1	+	+ OA	Benicelli 2008
rd12 Maus	AAV2/5.CBA.RPE65	14	+	+ MWMT	Pang 2006
Rpe65-/- Briard Hund	AAV2/2.CBA.cRPE65	4 (96)	+	+ PLR, OP	Acland 2001
	AAV2/2.CMV.cRPE65	4 - 9	+	+ OP	Narfström 2003
		36	+	-	Narfström 2005
	AAV2/5.CBA.RPE65 AAV2/2.CBA.RPE65 AAV2/1.CBA.RPE65 AAV2/1.pRPE65.RPE65	36	+	+ OP, RA	Acland 2005
	AAV2/2.modCBA.RPE65	3	+	+ OMT	Benicelli 2008
	AAV2/4.pRPE65.RPE65 AAV2/2.pRPE65.RPE65	11 (48)	+	+ OP mfERG	Le Meur 2007
	AAV2/2.modCBA.RPE65	3	+	+	Jacobson 2006

Tabelle 2: Tiermodelle RPE65-Gendefekt.

Modifiziert nach [128]. mfERG: multifokales-ERG, MWMT: Morris water maze test (Wasserlabyrinth), OA: optokinetische Analyse, OMT: ocular motility test, OP: obstacle parcours (Hindernisparcours), PLR: pupillary light reflex (Lichtreaktion), RA: Retinoid-Analyse.

1.4.4 Klinische Studien

Nach den erfolgreich verlaufenen Vorstudien am Tiermodell konnten bereits 2007 die ersten klinischen Studien an menschlichen Patienten aufgenommen werden. Anfänglich wurden insgesamt neun Patienten im Alter zwischen 17 und 26 Jahren in drei verschiedenen Studien behandelt: am Moorfields Eye Hospital/University College of London (NCT00643747; [129]), am Children's Hospital of Philadelphia/Universität Neapel, Italien (NCT00516477; [130]) und

an der University of Pennsylvania/University of Florida/National Eye Institute (NCT00749957; [131, 132]). Primärer Endpunkt war der Nachweis der Sicherheit der Behandlung, der deswegen auch im Mittelpunkt der initialen Auswertung stand. Dabei wurden keine schwerwiegenden Nebenwirkungen beobachtet, wenngleich es bei einem Patienten zur Ausbildung eines makulären Lochs in der Netzhaut [130] und bei einem weiteren Patienten zu einer Verdünnung der makulären Netzhaut [132] kam. Als sekundärer Endpunkt wurde die Frage untersucht, ob sich eine klinische Verbesserung von Visus und Gesichtsfeld, insbesondere beim Dämmerungs- und Nachtsehen erreichen lässt. Hier zeigte sich keine objektiv feststellbare Verbesserung, insbesondere blieben die ERG-Ableitungen unter der Nachweisgrenze, obgleich einige der Patienten über eine subjektive Verbesserung von Sehfähigkeit und Helligkeitsempfinden berichteten. Im Rahmen der Kontrolluntersuchungen, die über mehrere Jahre nach Behandlung erhoben wurden, wurde die Sicherheit des Verfahrens bestätigt und es wurden keine schweren Nebenwirkungen beobachtet [133, 134]. Junge Patienten reagierten auf die Behandlung insgesamt mit dem höchsten Anstieg an retinaler Lichtempfindlichkeit [134, 135]. Der Visus blieb davon jedoch unbeeinflusst, was auf eine Verbesserung der Stäbchen-, nicht aber der Zapfenfunktion hinweist. Eine 26-jährige Patientin entwickelte unter schwachen Lichtbedingungen einen neuen, extrafovealen Fixationspunkt [136]. Dieser Effekt konnte im weiteren Verlauf auch bei drei weiteren Patienten der ursprünglichen Studienpopulation nachgewiesen werden [137], was auf dynamische Veränderungen der retinalen Verschaltungen innerhalb der behandelten Region hinweisen kann.

Aktuell sind acht aktive klinische Studien zur Gentherapie von RPE65-Mutationen auf der *clinicaltrials.gov* Website der *National Institutes of Health* gelistet, darunter die drei oben beschriebenen Original-Studien, sowie darauf basierende Follow-up Studien (NCT01208389) inklusive einer Phase-III-Studie (NCT00999609) am Children's Hospital of Philadelphia. Zusätzlich sind weitere Gentherapie-Studien an der Universität Nantes, Frankreich, in Kooperation mit der Augenklinik der Universität Gießen (NCT00422721), an der Hadassah Medical University in Jerusalem, Israel (NCT00821340) und an der University of Oregon/University of Massachusetts (NCT00749957) begonnen worden.

NCT No.	Jahr	Klinische Phase	Principal Investigator	Status	Anzahl Patienten	Vektor	Referenzen
00643747	2007	I/II	Ali, London, UK	Ongoing, not recruiting	12	rAAV2/2-hRPE65p-hRPE65	Bainbridge 2008
00821340	2010	I	Banin, Jerusalem, Israel	Recruiting	(10)	rAAV2-hRPE65	Banin 2010
01496040	2011	I/II	Weber, Nantes, F Lorenz, Gießen, D	Completed	9	rAAV2/4-hPRE65	NP
00999609	2012	III	Maguire, Philadelphia, USA Russell, Iowa, USA	Ongoing, not recruiting	24	AAV2-hRPE65v2	NP
00749957	2008	I/II	Stout, Portland, USA	Ongoing, not recruiting	12	rAAV2-CB-hRPE65	NP
00481546	2007	I	Jacobson, Philadelphia, USA	Ongoing, not recruiting	15	rAAV2-CBSB-hRPE65	Hauswirth 2008, Cideciyan 2009, Jacobson 2012, Cideciyan 2014
00516477	2007	I	Maguire, Philadelphia, USA	Ongoing, not recruiting	12	AAV2-hRPE65v2	Maguire 2008 + 2009, Simonelli 2009, Asthary 2009, Testa 2013
01208389	2010	I/II	Maguire, Philadelphia, USA	Ongoing, not recruiting	12	AAV2-hRPE65v2	Bennett 2012

Tabelle 3: Klinische Studien RPE65-Gendefekt.

Klinische Studien zur Gentherapie bei RPE65-Defekt. Stand 07/2015 gemäß Listung auf www.clinicaltrials.gov (<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=rpe65&pg=1>). Recruiting: Es werden noch Patienten in die Studie eingeschlossen. Ongoing, not recruiting: Rekrutierungsvorgang abgeschlossen, die veranschlagte follow-up Zeit ist noch nicht abgelaufen. Completed: Studie abgeschlossen, alle relevanten Nachuntersuchungen sind komplettiert. NP: not published, es sind noch keine Ergebnisse/Zwischenergebnisse zu den genannten Studien publiziert.

1.5 Ursachen für unterschiedliche Effizienz bei Tiermodell und Mensch

Warum die Ergebnisse der humanen Studien den hohen in sie gesetzten Erwartungen nicht standhielten und nicht vollkommen mit den Ergebnissen aus den caninen Studien übereinstimmen, bleibt unklar. Um die Beobachtungen zu erklären, wurden verschiedene Theorien entwickelt.

1.5.1 Heterogener genetischer Hintergrund beim Menschen

Zum einen ist die genetische Situation beim Menschen wesentlich komplizierter und heterogener, als bei den genetisch homogenen Mauslinien und den eingezüchteten Hunderassen. Verschiedene Einflüsse, die bis heute nur unzureichend verstanden sind, können dazu führen, dass bei Patienten mit identischen Mutationen im RPE65-Gen die Ausprägung der Symptomatik mitunter erhebliche Unterschiede aufweist. Im Gegensatz zum Tiermodell, wo gleichaltrige Tiere sich mit einiger Sicherheit im gleichen Krankheitsstadium befinden, ist der Grad der retinalen Degeneration daher bei menschlichen Patienten uneinheitlich und muss individuell bestimmt werden.

1.5.2 Interferenzen durch Expression funktionsloser Proteine

Bei vielen Patienten mit Missense-Mutationen könnte die Anwesenheit funktionsloser Proteinprodukte die Expression und Funktion des transduzierten therapeutischen Gens beeinflussen (vgl. z. B. [138]). Bei den gängigen Maus- und Hundemodellen handelt es sich dagegen um Nullmutationen, bei denen keine fehlerhaften Proteine entstehen [74, 83, 84].

1.5.3 Persistenz von Viruspartikeln in der Netzhaut

Ein weiterer ernstzunehmender Aspekt ist die Beobachtung, dass virale AAV-Vektoren nach erfolgreichem Gentransfer und Expression des Transgens in den Zielzellen als Partikel in der OPL in definierten Strukturen persistieren können [109]. Die dahinter stehenden Mechanismen und mögliche Auswirkungen auf die retinale Funktion sind bislang nicht weiter untersucht worden.

1.5.4 Plastizität neuronaler Strukturen in der Retina

Schließlich ist bisher noch unzureichend untersucht, ob die subretinale Injektion, der Gentransfer und die nachweisliche Persistenz der Viruspartikel in der Netzhaut Auswirkungen auf retinale Strukturen zeitigt. So könnten Veränderungen in der synaptischen Verschaltung, zelluläre Funktionsstörungen, Zelluntergang und Gliose ebenfalls eine Störung der Signalbildung und –weiterleitung innerhalb der Netzhaut verursachen.

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass die synaptischen Verschaltungen in der Netzhaut eine hohe Plastizität aufweisen und dynamischen Veränderungen unterworfen sein können. So zeigen sich etwa in Netzhäuten von Fischen Veränderungen der synaptischen Zellmembranen von Photorezeptoren und Horizontalzellen im Rahmen der Hell-/Dunkel-Adaptation [139, 140]. Auch werden strukturelle Veränderungen retinaler Neurone als Reaktion auf durch Kainsäure verursachte Netzhautdegeneration beschrieben [141]. Bei Versuchen an nicht-menschlichen Primaten ließ sich zeigen, dass ein Übergang von dichromatem zu trichromatem Sehvermögen möglich ist, wenn das fehlende Sehpigment gentherapeutisch eingebracht wird [142, 143].

Eine häufig zu beobachtende Reaktion auf unterschiedliche Reize ist die Ausbildung ektopter Synapsen zwischen Stäbchen und Bipolarzellen bzw. Horizontalzellen in der äußeren Körnerschicht. Die Bildung solcher ektopter Zellkontakte konnte an Tiermodellen verschiedener degenerativer Erkrankungen der Netzhaut nachgewiesen werden [32, 144, 145]. An gezüchteten Mauslinien, bei denen die Photorezeptoren funktionell blockiert sind ($Rho^{-/-}$ -Maus, $CNGA^{-/-}Rho^{-/-}$ -Maus), konnte gezeigt werden, dass der Signaleingang von den Photorezeptoren auf die nachgeschalteten Bipolarzellen ein wesentlicher Faktor für die

Bildung ektooper synaptischer Kontakte ist: so bildeten die Stäbchen-Bipolarzellen in der Abwesenheit eines funktionierenden Stäbchen-Inputs ($\text{Rho}^{-/-}$) Zellkontakte mit Zapfen, wohingegen Zapfen-Bipolarzellen bei fehlendem Zapfen-Input ($\text{CNGA}^{-/-}$) synaptische Kontakte mit Stäbchen etablierten [146, 147].

Die Aussprossung von Horizontal- und Bipolarzelldendriten zeigt sich typischerweise bei Mutationen, die sich präsynaptisch auswirken, also auf Ebene der Photorezeptoren. Mutationen, die postsynaptische Strukturen betreffen, zeigen in der Regel keine strukturellen Abnormalitäten in der äußeren Retina [144]. Die Hauptursache für das abnorme Neuriten-Wachstum ist möglicherweise im Rückzug und der Verkürzung der Photorezeptor-Endigungen, vor allem der Stäbchen-Endknöpfchen, zu sehen, denen die Fortsätze der nachgeschalteten Neurone folgen [144].

Weiterhin können auch Netzhautablösungen zu Veränderungen der synaptischen Architektur der äußeren plexiformen Schicht sowie zu veränderter Expression verschiedener photorezeptorspezifischer Proteine und zu strukturellen Veränderungen der inneren und äußeren Segmente führen [148-150]. Dieser Umstand ist von herausragender Bedeutung, da die zum Einbringen therapeutischer Transgene in die Netzhaut vorgenommenen subretinalen Injektionen ebenfalls zu einer vorübergehenden Ablösung der Neuroretina vom RPE führen, die sich jedoch in der Regel innerhalb von 24 Stunden zurückbildet. Während dieser Zeit wird die den viralen Vektor enthaltende Flüssigkeit resorbiert und die umliegenden Zellen werden vom Vektor transduziert. Mögliche Veränderungen auf morphologischer und funktioneller Ebene, die durch solche therapeutischen Netzhautabhebungen entstehen, sind noch nicht eingehend untersucht – ein Umstand, der nicht zuletzt der Abwesenheit von schwerwiegenden Nebenwirkungen bei Versuchstieren der Gentherapiestudien geschuldet ist. Die Ergebnisse der aktuellen humanen Studien, die eine Diskrepanz zwischen subjektiv verbessertem Sehvermögen und objektiv nicht feststellbarer Aktivität im ERG erkennen ließen, könnten jedoch auf Veränderungen innerhalb der synaptischen Verschaltungen nach erfolgtem Gentransfer hinweisen.

1.5.5 Zeitlicher Ablauf struktureller Veränderung nach Netzhautablösung

1.5.5.1 Dekonstruktion von Photorezeptoren

In den Photorezeptoren führt eine Netzhautablösung zu sehr spezifischen und reproduzierbaren Veränderungen, welche in der Literatur bisweilen unter dem Terminus „Dekonstruktion“ zusammengefasst werden, in Abgrenzung zur Degeneration im Rahmen degenerativer Erkrankungen oder Verletzungen der Netzhaut [149, 151]. Im Gegensatz zu letztgenannter scheint die Dekonstruktion nicht notwendigerweise in den Zelltod zu münden,

sondern ist möglicherweise ein Prozess, der das Überleben der Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg sichert, indem er die Stoffwechselleistung reduziert [149].

Selbst eine sehr kurze Netzhautablösung führt zu einer Verkürzung und Verplumpung der äußeren Photorezeptor-Segmente sowie zum Verlust der filigranen apikalen Fortsätze der Zellen des retinalen Pigmentepithels, die stattdessen durch einen homogenen Mikrovilli-Saum ersetzt werden [148, 152, 153]. Letztgenannter Effekt lässt sich ansatzweise bereits nach Netzhautablösungen von nur einer Stunde Dauer beobachten [148, 154]. Eine Verkürzung der äußeren Segmente sowohl von Stäbchen als auch von Zapfen lässt sich frühestens nach Netzhautablösungen von 24 Stunden Dauer nachweisen (in kürzer andauernden Netzhautablösungen erscheinen die Photorezeptoren weitgehend unverändert) und ist umso schwerwiegender, je länger die Netzhautablösung andauert [152]. Auch nach langanhaltenden Netzhautablösungen (mehrere Tage und Wochen) bleibt ein verkürztes Außensegment mit wenigen Membranscheibchen und intaktem Zilium erhalten. Die Regenerierung der Grenzfläche zwischen Photorezeptoren und retinalem Pigmentepithel schreitet auch nach Wiederanlegung der Netzhaut langsam voran und die äußeren Photorezeptor-Segmente erreichen teilweise erst nach 150 Tagen ihre ursprüngliche Länge [148, 155].

Die inneren Segmente reduzieren die ultrastrukturelle Kompartimentierung ihrer Zellorganellen und die Anzahl ihrer Mitochondrien. Dieser Effekt ist allerdings erst nach Netzhautablösungen, die über mehr als 24 Stunden (i.e. 48 Stunden, 72 Stunden) persistieren, eindrucklich nachzuweisen und scheint auch von der Höhe der Ablösung und somit von der Länge des Diffusionswegs zwischen Choroidea und Neuroretina abzuhängen [152, 156]. Bereits nach 24-stündigen Netzhautablösungen lässt sich immunhistochemisch eine Umverteilung des Rhodopsins aus den äußeren Segmenten in die Plasmamembran vereinzelter Stäbchen nachweisen [153]. Bei länger als drei Tage andauernden Netzhautablösungen ist die gesamte Plasmamembran bis hin zu den synaptischen Endigungen in der äußeren plexiformen Schicht durch Antikörper gegen Rhodopsin anfärbbar [149, 153]. Es gibt Hinweise darauf, dass die Anwesenheit von Opsin in den Zellmembranen die Zellen anfälliger für apoptotischen Zelluntergang macht [157, 158]. In Zapfen kommt es initial ebenfalls zu einer Umverteilung des Opsins in die Zellmembran, allerdings scheinen Zapfen ihre Proteinexpression nach Netzhautablösung insgesamt stark zu reduzieren, so dass oft bereits nach 24 Stunden, jedenfalls aber nach 72 Stunden, eine Anfärbbarkeit mit den üblichen immunhistochemischen Markern kaum mehr gegeben ist [149, 159, 160].

1.5.5.2 Apoptotischer Zelluntergang von Photorezeptoren

Obwohl einige der oben beschriebenen Reaktionen der Photorezeptoren auf eine Netzhautablösung möglicherweise dazu beitragen, die Stoffwechselleistung der Zelle zu reduzieren und damit deren Überleben zu sichern, führen fortbestehende Netzhautablösungen zu einem erheblichen Untergang von Photorezeptoren durch Apoptose [161]. Die Apoptose-Aktivität erreicht ihr Maximum zwischen 24 und 72 Stunden nach Ablösung der Netzhaut vom Pigmentepithel [153, 161]. Innerhalb dieses Zeitraums gehen etwa 20% der Photorezeptoren zugrunde. Auch nach langandauernden Netzhautablösungen (bis zu 450 Tage) kann jedoch noch ungefähr die Hälfte der Photorezeptoren erhalten sein [156]. Wird die Retina innerhalb von 24 Stunden wieder angelegt, unterscheiden sich weder die Anzahl apoptotischer Zellen noch die Gesamtanzahl Photorezeptorkerne signifikant von gesunden Kontrollen [153].

1.5.5.3 Retraktion von Stäbchen-Axonen und Neuriten-Wachstum in der äußeren plexiformen Schicht

Ähnlich wie bei den oben beschriebenen Tiermodellen retinaler Degenerationen konnte auch im Rahmen experimenteller Netzhautablösungen eine Ausbildung ektopter Zellkontakte zwischen Photorezeptoren und Zweitorder-Neuronen nachgewiesen werden. Die Stäbchen reagieren auf Netzhautablösungen mit einer Verkürzung ihrer Axone und dem Rückzug der Stäbchen-Endknöpfchen in Richtung äußere Körnerschicht [156]. Solche delokalisierten Stäbchen-Terminalien können allerdings überwiegend erst nach Netzhautablösungen von mehr 24 Stunden Dauer nachgewiesen werden [148, 153]. Nach Netzhautablösungen von drei Tagen und länger sind retrahierte Stäbchen-Endknöpfchen sehr zahlreich auf allen Ebenen der äußeren Körnerschicht anzutreffen und die Schichtgrenze zwischen äußerer Körnerschicht und äußerer plexiformer Schicht ist deutlich aufgelockert [149, 150]. Wurde die Netzhaut nach Ablauf von 24 Stunden chirurgisch wieder angelegt, blieb eine Retraktion der Stäbchen-Terminalien aus [153]. Die retrahierten Stäbchen-Endknöpfchen weisen in der Regel flachere Invaginationen auf und die typische präsynaptische Struktur des Ribbon-Bandes geht verloren, so dass teilweise mehrere kleine und verkürzte Proteinbänder zur Darstellung kommen [149, 150, 156]. Die Zapfen-Endfüßchen bleiben zwar an ihrem angestammten Platz in der innersten Reihe der äußeren plexiformen Schicht, verändern jedoch ihre Form und verplumpen zunehmend. Die Proteinbänder kommen weniger zahlreich und verklumpt zur Darstellung, die Anzahl synaptischer Vesikel ist reduziert und die präsynaptischen Invaginationen der Zellmembran verflachen oder verschwinden vollständig [149, 150].

Stäbchen-Bipolarzellen reagieren auf Netzhautablösungen mit einer Aussprossung von dendritischen Fortsätzen in Richtung äußere Körnerschicht. Sie scheinen dabei überwiegend

den retrahierten Stäbchen-Endknöpfchen zu folgen. Horizontalzellen senden ebenfalls neuritische Aussprossungen in die äußere Körnerschicht aus. Diese konnten überwiegend den Axon-tragenden Typ B-Horizontalzellen zugeordnet werden und entsprechen auch morphologisch am ehesten Axonen [149]. Bemerkenswert ist, dass Horizontalzell-Neuriten teilweise gerichtet den Stäbchen-Endknöpfchen folgen, teilweise aber auch ein ungerichtetes Wachstum durch die komplette äußere Körnerschicht hindurch bis in den subretinalen Raum zeigen [149]. Dabei treten sie in enger Assoziation zu Müller-Zellen auf und sind an der Bildung subretinaler Narben beteiligt. Ob mechanischer Zug durch die retrahierenden Stäbchen-Endknöpfchen beziehungsweise durch die proliferierenden Müller-Zellen ursächlich für das Neuriten-Wachstum der Zweitorder-Neurone ist, ist ungeklärt. In den bisherigen Studien mit experimentellen Netzhautablösungen konnten solche dendritischen bzw. axonalen Aussprossungen von Bipolarzellen und Horizontalzellen regelmäßig frühestens nach einer Ablösedauer von drei Tagen und länger beobachtet werden [148-150]. Die oben genannten Prozesse scheinen (teil-)reversibel zu sein: selbst bei Retinae, die drei Tage lang abgelöst waren, kommt es nach erfolgreicher Wiederanlegung im Verlauf von einigen Wochen zu einer „Restrukturierung“ der äußeren plexiformen Schicht, einem Verschwinden der meisten ektopen Synapsen und einer Zunahme der Schichtdicke der äußeren Körnerschicht im Vergleich zu Kontrolltieren [149, 153].

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu eruieren, ob die subretinale Injektion und die Expression eines Transgens in der Netzhaut Auswirkungen auf die Morphologie der synaptischen Verschaltungen und die Apoptose-Aktivität in der Retina, insbesondere in der äußeren plexiformen Schicht (OPL), hat und ob sich daraus Hinweise ergeben, warum es in den bisherigen klinischen Gentherapiestudien zu keiner messbaren Verbesserung des Sehvermögens oder seiner funktionellen Parameter kam.

Dazu wurden fluoreszenzmikroskopische und histologische Untersuchungen an Netzhäuten gesunder Sprague-Dawley Ratten durchgeführt, welchen ein Fluoreszenzfarbstoff oder ein GFP-exprimierender AAV-Vektor subretinal injiziert wurde.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die in dieser Arbeit verwendeten Rattenaugen wurden von Versuchstieren aus dem französischen Forschungslabor INSERM U649, Laboratoire de Thérapie Génique der Universität Nantes, Frankreich, bezogen. Die Herstellung des Vektors, die subretinale Injektion sowie die Tötung der Tiere und die Präparation der Augenbecher erfolgte in Nantes, den an anderer Stelle beschriebenen Vorgehensweisen und Protokollen entsprechend (s. u.). Die Ratten wurden in einem 12 Stunden hell/dunkel-Zyklus gehalten und entsprechend der Europäischen Richtlinie zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere (RL 2010/63/EU) und dem *ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Visual Research* behandelt.

Insgesamt wurden die Augen von 10 Sprague-Dawley Ratten untersucht (Tbl. 4):

- 2 Sprague-Dawley Ratten mit bilateraler Injektion des AAV2/5.CMV.d2GFP-Vektors, 12 Monate p. i.
- 3 Sprague-Dawley Ratten mit jeweils unilateraler Injektion des AAV2/5.CMV.d2GFP-Vektors in das rechte Auge, 1 Monat p. i.
- 3 Sprague-Dawley Ratten mit unilateraler mock-Injektion von Fluorescein in das rechte Auge, 1 Monat p. i.
- 2 Sprague-Dawley Ratten als Kontrolltiere

Der Vollständigkeit halber seien im Folgenden die Technik der subretinalen Injektion, die in-vivo-Funduskopie und die Präparation der Augenbecher kurz dargestellt. Diese Untersuchungen sind jedoch nicht Teil der eigenen Arbeiten.

Versuchstier	Auge	Injektion	Volumen	Titer/Verdünnung	Fixierzeit (Min.)	Alter bei Inj. (Monate)	Alter bei Untersuchung (Monate)
rt1K	li	-	-	-	10	-	12
	re	-	-	-	30		
rt2K	li	-	-	-	10	-	12
	re	-	-	-	30		
rt1aav	li	AAV2/5.CMV.d2GFP	1,5 µL	3x10 ¹¹ p/mL	10	6	18
	re	AAV2/5.CMV.d2GFP	1,5 µL	3x10 ¹¹ p/mL	30		
rt2aav	li	AAV2/5.CMV.d2GFP	1,5 µL	3x10 ¹¹ p/mL	10	6	18
	re	AAV2/5.CMV.d2GFP	1,5 µL	3x10 ¹¹ p/mL	20		
AAV5DGFP28	li	-	-	-	15	6	7
	re	AAV2/5.CMV.d2GFP	1,5 µL	3x10 ¹¹ p/mL	15		
AAV5DGFP29	li	-	-	-	30	6	7
	re	AAV2/5.CMV.d2GFP	1,5 µL	3x10 ¹¹ p/mL	30		
AAV5DGFP30	li	-	-	-	15	6	7
	re	AAV2/5.CMV.d2GFP	1,5 µL	3x10 ¹¹ p/mL	15		
FLUO1	li	-	-	-	15	6	7
	re	Fluorescein	1,5 µL	1:1000	15		
FLUO2	li	-	-	-	15	6	7
	re	Fluorescein	1,5 µL	1:1000	15		
FLUO3	li	-	-	-	15	6	7
	re	Fluorescein	1,5 µL	1:1000	15		

Tabelle 4: Liste der Versuchstiere, injizierte Volumina und Vektor-Titer.

2.2 Reportergen

GFP ist ein aus 283 Aminosäuren zusammengesetztes Protein mit einer Molekülmasse von 26,9 kDa, das erstmals 1962 von Shimomura et al. aus der Quallenart *Aequorea victoria* isoliert und beschrieben wurde [162]. Die Struktur von GFP wurde 1979 aufgeklärt [163], die DNA-Sequenz 1992 [164]. Nachdem es gelungen war, GFP in Mikroorganismen zu exprimieren [165], hat es eine enorme Bedeutung in der Zellbiologie erlangt, insbesondere bei der Sichtbarmachung und Lokalisierung von Zielstrukturen auf zellulärer und subzellulärer Ebene und zur Kontrolle von Gen-Expression in-vivo [166]. Bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 475 nm, zeigt GFP eine starke Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum bei 509 nm [166].

2.3 Vorarbeiten (nicht Teil der eigenen Arbeit)

2.3.1 Subretinale Injektion

Die subretinale Injektion des Vektors bzw. der Kontroll-Lösung erfolgte nach dem in der Literatur beschriebenen, üblichen Verfahren [109, 167, 168]. Vor der subretinalen Injektion der Vektor- bzw. Fluoreszenzlösung erfolgte die Anästhesie der Tiere durch intramuskuläre Ketamin/Xylazin-Injektion gemäß den Anweisungen des Herstellers. Zusätzlich erfolgte eine lokale Betäubung durch Amethocain-Augentropfen. Zur Pupillendilatation wurden Tropicamid- und Phenylephrin-Augentropfen gegeben. Für die subretinale Injektion wird unter sterilen Bedingungen die Konjunktiva eröffnet und die Sklera in der Nähe des Limbus freigelegt. Anschließend wird die Sklera unter dem Operationsmikroskop mit einer 30-Gauge Injektionskanüle punktiert und durch diese Öffnung eine 32-Gauge Injektionskanüle mit der Injektionslösung tangential in den Bulbus vorgeschoben. Durch die Injektion der Vektor-Lösung in den subretinalen Raum zwischen Neuroretina und RPE hebt sich die Netzhaut im Bereich der Injektionsstelle als kreisrunde Blase („blep“) vom RPE ab (Abb. 5). Der erfolgreiche Verlauf der Injektion wird durch indirekte Ophthalmoskopie bestätigt. Die Kanüle wird für ca. eine Minute im Auge belassen und dann langsam zurückgezogen. Auf diese Weise wird ein Reflux durch den Stichkanal weitgehend vermieden. Der Titer für alle mit dem AAV-Vektor behandelten Augen betrug 1×10^8 p/mL, das injizierte Volumen betrug ca. 1,5 µl (vgl. [109]). Den Kontrolltieren mit mock-Injektion wurde jeweils 1,5 µl Fluoreszein injiziert.

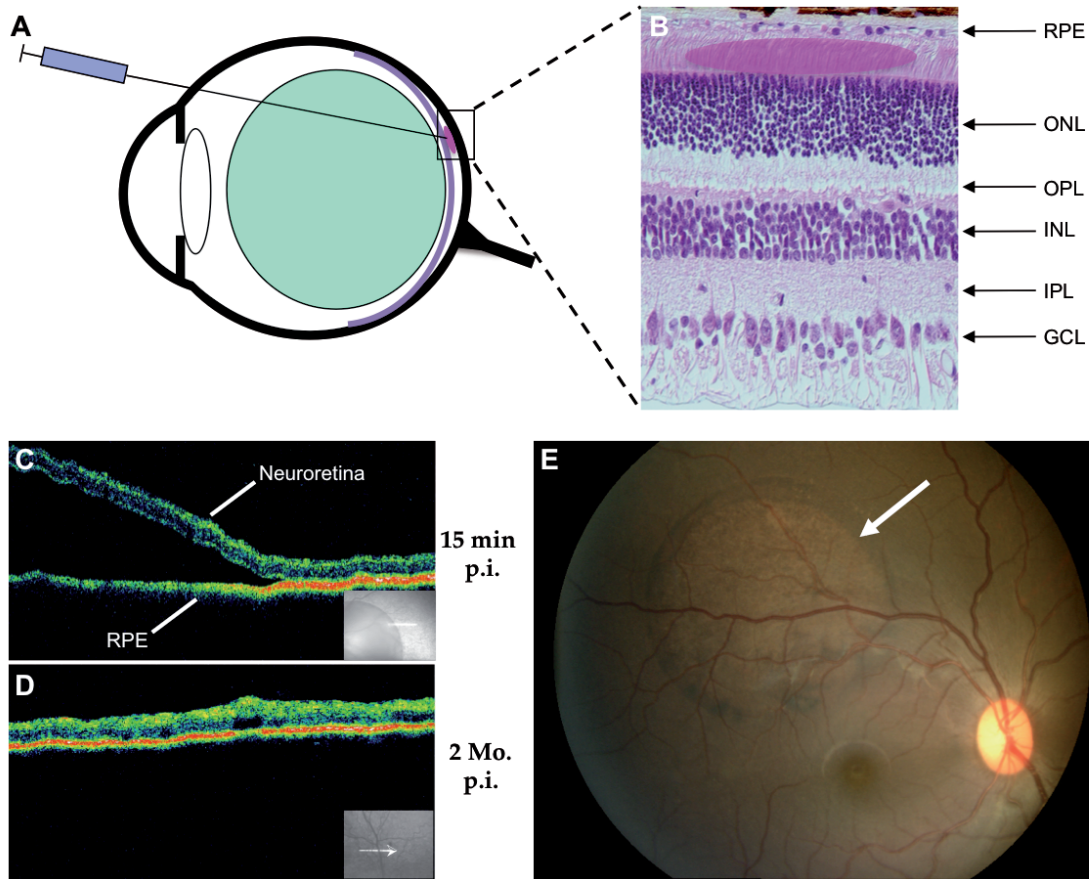


Abbildung 5: Technik der subretinalen Injektion.

(A) Schematische Darstellung des Bulbus im Querschnitt. Die Spitze der Kanüle penetriert die Neuroretina von ventral. Die Lösung mit dem Vektor wird zwischen die Außensegmente der PR und das RPE eingebracht. Die Neuroretina hebt sich dadurch vom RPE ab und es entsteht eine Injektionsblase („blep“). (B) Verdeutlichung der Injektionsstelle im Vertikalschnitt der Netzhaut. Die Vektor-Lösung wird im subretinalen Raum zwischen RPE und PR eingebracht. (C, D) OCT-Aufnahmen vom Rand der Injektionsblase 15 Minuten und 2 Monate p. i. Die Abhebung der Neuroretina vom RPE unmittelbar nach der Injektion ist gut zu erkennen. (E) Fundusaufnahme eines mit subretinaler Injektion behandelten nichthumanen Primaten. Der Rand der ehemaligen Injektionsblase zeichnet sich durch eine leichte Hyperpigmentierung ab (Pfeil). RPE: retinales Pigmentepithel, ONL: äußere Körnerschicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, INL: innere Körnerschicht, IPL: innere plexiforme Schicht, GCL: Ganglienzellschicht. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Dr. Stieger, Augenklinik Gießen.

2.3.2 In-vivo-Funduskopie

In-vivo-funduskopische Aufnahmen zur Kontrolle des postoperativen Verlaufs und der erfolgreichen GFP-Expression in den Netzhautzellen erfolgten mit einer Canon UVI Retina-Kamera (Lheritier, Saint-Ouen-l’Aumôn, Frankreich) ausgerüstet mit einem *Digital Imaging System* (Lhedioph Win Software, Lheritier, Frankreich).

2.3.3 Präparation der Augenbecher und Fixierung

Nachdem die Ratten mit 4% Halothan tief narkotisiert wurden, erfolgte die Tötung mittels Genickschnitt. Die Augen wurden vorsichtig entnommen und in einer Petrischale mit PB (0,1M, pH 7,4) unter mikroskopischer Sicht präpariert. Die Eröffnung erfolgte durch Einstich mit einer spitzen Skalpellklinge rostral der Ora serrata und anschließender ringförmiger

Schnittführung, so dass ein – in etwa um die optische Achse zentrierter – Augenbecher entstand. Der vorsichtigen Entfernung von Linse und Glaskörper folgte die Fixierung mit 4% PFA in PB (0,1M, pH 7,4) bei Raumtemperatur auf dem Schüttler für 10, 20 bzw. 30 Minuten (die genaue Fixierzeit für die jeweiligen Präparate ist Tab. 4 zu entnehmen). Die Fixierung wurde durch einen Waschgang (3 x 10 min in 0,1M PB, pH 7,4) abgebrochen und die so vorbereiteten Augenbecher in 0,1M PB gekühlt aufbewahrt und versendet.

2.4 Eigene Arbeiten

2.4.1 Lichtmikroskopie

Die Aufbereitung der Netzhaut-Präparate für die Lichtmikroskopie erfolgte nach einem standardisierten Schema, etablierten Methoden aus der Literatur folgend (z. B. [52, 146, 169-171]).

2.4.1.1 Gefrierschutz und Präparation der Retina

Die wie oben beschrieben vorbereiteten Augenbecher wurden durch Inkubation in Saccharoselösungen mit aufsteigender Konzentration (2 h in 10%, 2 h in 20% und über Nacht in 30% Saccharose in PB (0,1M, pH 7,4) bei +4°C) gefriereschützt. Schließlich wurde die Netzhaut als Ganzes entnommen und unter Beibehaltung der ursprünglichen Orientierung flach auf einen Objektträger aufgebracht. Im Falle der GFP-transduzierten Augen war die Injektionsstelle durch die GFP-Fluoreszenz bei 488nm unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan II, Zeiss) leicht auffindbar und es wurde ein Netzhautbereich präpariert, der sowohl die GFP-markierte Injektionsstelle als auch die nicht-injizierten benachbarten Bereiche inklusive der Sehnervenpapille umfasste (Abb. 7A). Bei den Kontrollaugen wurde ein jeweils korrespondierender Ausschnitt präpariert.

2.4.1.2 Herstellung von Gefrierschnitten

Die so gewonnenen Retina-Präparate wurden für 15 Minuten in einem Einbettmedium für Gefrierschnitte (Jung Tissue Freezing Medium, Leica Microsystems) vorinkubiert, flach auf einem Objektträger aufgebracht und von diesem anschließend auf einen vorgefertigten Block aus Einbettmedium aufgefroren. In der Folge wurden von den angefertigten Netzhautpräparaten vertikale Schnitte mit einer Schichtdicke von 16µm angefertigt und auf ionisierte Objektträger (Menzel Superfrost ultra plus) aufgebracht. Die Kammertemperatur des Kryostaten betrug während der gesamten Bearbeitungszeit -21°C, die Objekttemperatur beim Auffrieren -45°C und beim Schneiden -18°C. Die Objektträger mit den angefertigten Vertikalschnitten wurden bis zur weiteren Verwendung bei -21°C aufbewahrt.

2.4.1.3 Immunhistochemie

Zur immunhistochemischen Markierung gewünschter Zielstrukturen wurde die indirekte Fluoreszenzmethode angewandt. Diese beruht auf der spezifischen Bindung eines Primärantikörpers an die Zielstruktur in dem zu untersuchenden Präparat. Die so entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe können sichtbar gemacht werden durch Zugabe eines Sekundärantikörpers, an den ein Fluorochrom gekoppelt ist und der an die speziesspezifische Fc-Domäne des Primärantikörpers bindet. Durch Anregung mit Licht bestimmter Wellenlänge werden die Farbstoffe zum Fluoreszieren gebracht und das dabei von ihnen emittierte Licht kann mit Hilfe entsprechender Filter an Fluoreszenzmikroskopen sichtbar gemacht werden.

Die Antikörper wurden in einem Inkubationsmedium mit Tierseren (normal donkey serum, NDS bzw. normal goat serum, NGS) und einem Detergenz verdünnt (3% NDS/NGS, 1% BSA, 0,5% Triton-X-100). Die in den Tierseren enthaltenen Proteine sollen unspezifische Antikörperbindungen abfangen und so störende Hintergrundfärbungen auf dem Präparat verhindern. Sie werden entsprechend dem zu verwendenden Sekundärantikörper ausgewählt (donkey oder goat). Das nicht-ionische Detergenz Triton-X-100 löst Proteine aus den Zellmembranen und erhöht so deren Permeabilität für die Antikörper. Für Doppelfärbungen wurden die Schnitte mit einer Mischung aus zwei Primärantikörpern gefolgt von einer entsprechenden Sekundärantikörpermischung inkubiert.

Dazu wurden die Schnitte auf den Objektträgern zunächst mit einem Wachsstift (Liquid Blocker Super PAP-Pen, Sci Science Service) umrandet, um ein Auslaufen der Inkubationslösung und ein Austrocknen der Präparate zu vermeiden. Danach wurden die Präparate drei Mal für je zehn Minuten auf dem Schüttler in PB (0,1M, pH 7,4) bei Raumtemperatur gewaschen, um das Einbettmedium zu entfernen. Anschließend wurden sie über Nacht mit den Primärantikörpern in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Am Folgetag wurde durch weitere drei Waschschrte wie oben beschrieben die Primärantikörper-Lösung ausgewaschen und eine Stunde lang mit der Sekundärantikörper-Lösung inkubiert und anschließend nochmals ausgewaschen. Um ein vorzeitiges Ausbleichen der Fluorochrome zu verhindern, wurden sowohl die Inkubation mit dem Sekundärantikörper als auch die letzten Waschschrte lichtgeschützt durchgeführt. Schließlich wurden die Präparate auf den Objektträgern mit Einbettmedium (Aqua PolyMount, Polysciences) eingedeckelt. Dabei handelt es sich um einen Kunststoff, der eine artefaktfreie Fixierung des Präparats zwischen Objektträger und Deckgläschen gewährleisten und die Fotosensibilität der Fluorochrome erhöhen soll.

2.4.1.4 Verwendete Antikörper

Mit immunhistochemischen Methoden wurde die synaptische Verschaltung in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) der subretinal injizierten und transduzierten Retinae untersucht. Dazu wurden verschiedene Antikörper verwendet, mit denen die prä- und postsynaptischen Strukturen hinsichtlich ihrer lichtmikroskopischen Struktur und ihrer Anordnung dargestellt werden konnten. Die Spezifikationen der Primär- und Sekundärantikörper sind den Tabellen 5 und 6 zu entnehmen.

Zur Markierung präsynaptischer Strukturen in den Photorezeptor-Terminalien wurden Antikörper gegen CtBP2 und PSD95 verwendet. Anti-CtBP2 richtet sich gegen die B-Domäne des synaptischen Gerüstproteins Ribeye und markiert das präsynaptische Proteinband, das sog. *Ribbon*, welches sowohl in Stäbchen als auch in Zapfen an Synapsen mit invaginierenden Horizontal- und Bipolarzellneuriten lokalisiert ist [30, 31]. Anti-PSD-95 ist mit der präsynaptischen Membran von Stäbchen- und Zapfen-Axonon assoziiert. Es ist jedoch nicht auf den Bereich der unmittelbaren aktiven Zone begrenzt, sondern führt zu einem Signal, das die gesamte Membran der Photorezeptor-Terminalien markiert und teilweise entlang der Axone in Richtung ONL ausläuft [172].

Postsynaptische Strukturen wurden mit Antikörpern gegen CaBP, DHP und PKC α markiert. Anti-CaBP führt in Ratten zu einer homogenen Markierung der Horizontalzellen [173-176]. Von diesen gibt es in der Ratten-Retina – im Gegensatz zu den Retinae der meisten Säuger – nur einen Typ, der morphologisch dem Axon-tragenden B-Typ entspricht [54]. Amakrinzellen werden ebenfalls, wenn auch deutlich schwächer, markiert [174, 176]. Anti-DHP markiert die invaginierenden dendritischen Spitzen von Stäbchen- und ON-Zapfen-Bipolarzellen. Der Antikörper richtet sich gegen Cacna1s in der α_1 -Untereinheit von spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen, welche eng mit dem metabotropen Glutamatrezeptor mGluR6 assoziiert sind [177]. Möglicherweise spielt der durch diese spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanäle getriggerte Ca²⁺-Influx eine Rolle bei der Hell-Dunkel-Adaptation [177]. Anti-PKC α markiert Stäbchen-Bipolarzellen, in welchen die α -Isoform der Proteinkinase C bei nahezu allen Säugern reichhaltig exprimiert wird [47, 49, 178-180]. Die Funktion von PKC α ist bis heute ungeklärt. Möglicherweise kommt ihr eine Rolle im Rahmen der mGluR6-vermittelten Signalübertragung zu [181].

Zur Detektion einer möglichen Proliferation der Müller-Zellen wurde ein Antikörper gegen GFAP verwendet. Das saure Gliafaserprotein (*glial fibrillary acidic protein*, GFAP) ist ein überwiegend in den Astrozyten des zentralen Nervensystems vorkommender Bestandteil der Intermediärfilamente [182]. Müller-Zellen sind die spezialisierten Stützzellen der Retina. Lediglich im Bereich ihrer Endfüßchen, die die Membrana limitans interna der Netzhaut bilden, exprimieren Müller-Zellen GFAP [22, 183]. In einigen Spezies, wie Ratten und Mäusen, werden Müller-Zellen mit GFAP-Antikörpern normalerweise nicht oder kaum

markiert [184-186]. Ihre teilweise Anfärbbarkeit mit GFAP-Antiseren legt die Vermutung nahe, dass sie einen dem zentralnervösen GFAP sehr ähnlichen, aber möglicherweise nicht identischen GFAP-Subtyp exprimieren [187]. Müller-Zellen werden jedoch durch diverse pathologische Ereignisse zur GFAP-Expression angeregt, so etwa durch hereditäre Photorezeptordegeneration, lichtinduzierten Photorezeptoruntergang, Verletzungen der Retina und Quetschung des optischen Nerven [186-191]. Auch Netzhautablösungen führen zu einer starken Zunahme der GFAP-Expression in den Müller-Zellen [192, 193]. In diesen Fällen demaskieren sich radial angeordnete Fasern, die von der inneren Grenzmembran in die außen gelegenen Zellschichten teilweise bis zur äußeren Grenzmembran reichen und die morphologisch den Müller-Zellen entsprechen [149, 192, 193]

2.4.1.5 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Zur Auswertung der Fluoreszenz-Präparate wurde ein konfokales *Laser-Scanning* Mikroskop verwendet. Scans sowohl von Einzel- als auch von Doppelfärbungen, bei welchen mit Alexa Fluor® 488 und Cy3 gekoppelte Sekundäntikörper verwendet wurden, wurden an einem *Axioskop II MOT* mit *LSM5 Pascal* Modul (Zeiss) aufgenommen. Für die Aufnahmen wurden die Öl-Immersionsobjektive Plan Neofluar 40x/1.30 Oil (Zeiss) und Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil (Zeiss) verwendet, sowie das Luft-Objektiv Plan-Apochromat 20x/0.8 (Zeiss). Als Lichtquelle für die Aufnahmen diente ein Helium-Neon Laser, welcher Licht der Wellenlänge 543 nm erzeugt und ein Argon-Laser, welcher Licht der Wellenlängen 415 - 514 nm erzeugt. Scans wurden für die unterschiedlichen Wellenlängen jeweils sequentiell angefertigt, um Interferenzen zwischen den verschiedenen Kanälen auszuschließen. Die Bedienung des Mikroskops sowie der Export der angefertigten Scans erfolgte über die Software *LSM5 Pascal V3.2 SP2* (Zeiss).

2.4.2 Elektronenmikroskopie

Zur Untersuchung der Ultrastruktur der Synapsen in der OPL wurde die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) verwendet. Diese erlaubt aufgrund der geringeren Wellenlänge der Elektronenstrahlen im Vergleich zum sichtbaren Licht eine höhere Auflösung als die herkömmliche und die konfokale Lichtmikroskopie.

2.4.2.1 Fixierung und Präparation

Nach Eukleation und Eröffnung der Augenbecher wie zuvor beschrieben, wurden diese für zwei Stunden in 2,5% Glutaraldehyd und 4% PFA in PB (0,1M, pH 7,4) bei Raumtemperatur fixiert. Die Fixierung wurde durch einen Waschgang (3 x 10 min in 0,1M PB, pH 7,4)

abgebrochen. Anschließend wurde die Retina herauspräpariert und für 3 x 10 Minuten in 0,1M Cacodylatpuffer gewaschen.

2.4.2.2 Osmierung und Dehydrierung

Darauf folgend wurde eine Osmierung zur Verstärkung der Elektronendichte des Gewebes durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte 60 Minuten lang bei 4°C mit 2% Osmiumtetroxid in 0,1M Cacodylatpuffer inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in Cacodylatpuffer (je 10 min, Raumtemperatur) wurden die Schnitte in einer Ethanol-Reihe dehydriert. Diese bestand aus zunächst zwei je 15-minütigen Inkubationsschritten in 30% und 50% Ethanol. Anschließend erfolgte zur Blockkontrastierung eine Inkubation mit 2% Uranylacetat in 70% Ethanol für eine Stunde bei Raumtemperatur. Schließlich wurde die Ethanolreihe mit einer 15-minütigen Inkubation in 90% und 2 x 15 min in 100% Ethanol sowie anschließender Inkubation (2 x 15 min) in Propylenoxid bei Raumtemperatur fortgesetzt.

2.4.2.3 Einbettung

Es folgte eine Prä-Inkubation für 30 Minuten in einer Lösung aus Propylenoxid und dem Kunstharz Epon (1:1) in einem geschlossenen Schnappdeckelgläschen. Danach wurde das Präparat über Nacht in reinem Epon inkubiert. Am folgenden Tag konnten die Schnitte in frischem Epon flach unter Luftabschluss zwischen zwei Silikonblättchen eingebettet werden. Die so behandelten Schnitte wurden zwei Tage lang bei 60°C inkubiert, um das Kunstharz auszuhärten.

2.4.2.4 Ultradünnschnitte

Nach dem Aushärten des Epon wurden einzelne Schnitte ausgewählt, ausgestanzt, mit flüssigem Epon auf Eponblöcken befestigt und über Nacht ausgehärtet. Die Blöcke mit dem Gewebe wurden in ein Mikrotom (*Ultracut S*, Reichert-Jung) eingespannt, passend orientiert und mit einem Glasmesser getrimmt. Daraufhin wurden mit einem Diamantmesser Ultradünnschnitte von 60-80 nm Dicke angefertigt und in einer mit *Aqua bidest.* gefüllten Schneidewanne aufgefangen. Die Ultradünnschnitte wurden mit Hilfe eines Wimpernpinsels auf mit *Formvar* beschichteten Kupfer-Lochträgernetzchen orientiert und aufgefangen.

2.4.2.5 Positiv-Kontrastierung

Um die Ultrastruktur des Gewebes unter dem EM sichtbar zu machen, wurden die Ultradünnschnittpräparate einer maschinellen Positiv-Kontrastierung mit Hilfe eines *EM-Stain* Gerätes (Leica) unterzogen. Nach dem Standard-Programm wurden die Präparate für eine

Stunde bei 25°C in Uranylacetat und 20 min in Bleicitrat kontrastiert. Während Uranylacetat mit Nukleinsäuren und Proteinen reagiert, bewirkt Bleicitrat eine Kontrastierung von Nukleinsäuren und Proteinen, sowie von Zellmembranen und Glykogen.

2.4.2.6 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Auswertung der EM-Präparate erfolgte an einem *LEO 912 AB Omega* Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss). Für die Bildaufnahmen des EM-Materials wurde eine CCD Kamera 2K (TRS) mit Wasserkühlung verwendet. Die Kamera wurde über die Software *ImageSP* gesteuert, mit deren Hilfe auch erste Schritte der Bildbearbeitung vorgenommen wurden. Die Auflösung der Aufnahmen betrug 2048 x 2048 Pixel, die Aufnahmen wurden bei 1000facher bis 20.000facher Vergrößerung angefertigt.

2.4.3 TUNEL-Assay

Das *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (TUNEL) wurde 1992 von Garvrieli et al. beschrieben [194]. Dabei handelt es sich um eine Methode zur Markierung von DNA-Strangbrüchen in apoptotischen Zellen. Sie basiert auf der spezifischen Erkennung freier 3'-OH-Enden fragmentierter DNA mittels terminaler Deoxynukleotidyl-Transferasen (TdT), durch deren enzymatische Aktivität markierte dUTP an die Bruchstellen gebunden werden [195-199]. Es wurde ein *fluorometric DNA fragmentation detection kit* verwendet, welches Br-dUTP (bromierte Deoxyuridintriphosphat-Nukleotide) an DNA-Bruchstücke bindet und mittels fluoreszenzfarbstoffmarkierten Anti-Br-dUTP-Antikörpern sichtbar macht.

Die Schnitte wurden dazu mit Proteinase K (20µg/ml) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mit 4% PFA fixiert. Nach der Inkubation mit der Marker-Lösung, welche Br-dUTP-Nukleotide und TdT enthält, wurden die Schnitte gewaschen und mit der Antikörperlösung, sowie im Anschluss daran mit 7-AAD/RNase A inkubiert. Die Schnitte wurden sodann auf den Objektträgern mit Deckgläsern und *antifading kit* fixiert. Fluoreszenz-Aufnahmen wurden mit einem digitalen Fluoreszenzmikroskop (BZ8000, Keyence) angefertigt.

2.4.4 Bildbearbeitung

Die Bearbeitung der Aufnahmen sowohl der lichtmikroskopischen als auch der elektronenmikroskopischen Präparate hinsichtlich Helligkeit und Kontrast wurde mit der Open Source Software ImageJ (Version 1.46i) und dem Bildbearbeitungsprogramm Photoshop (Versionen 8.0.1 sowie CS5.1) vorgenommen.

2.5 Quantitative Analyse und statistische Auswertung

Bei insgesamt drei Tieren, die jeweils im Alter von sechs Monaten eine einseitige subretinale Injektion des AAV2/5.CMV.GFP-Vektors erhielten und einen Monat p. i. euthanasiert wurden, wurde die Anzahl der synaptischen Kontakte in der OPL innerhalb des injizierten Bereichs quantitativ untersucht. Als Kontrolle diente ein jeweils zum injizierten Bereich korrespondierender Abschnitt aus der Retina des unbehandelten, kontralateralen Auges. Um zwischen den Effekten der Anwesenheit des viralen Vektors und der Expression des Transgens in den Photorezeptoren einerseits und den Effekten der durch die Injektion hervorgerufenen vorübergehenden Netzhautablösung andererseits unterscheiden zu können, wurden zudem die Augen dreier Tiere untersucht, denen jeweils einseitig eine Fluorescein-Lösung subretinal injiziert wurde. Insgesamt wurde also eine Anzahl von $n=12$ Augen untersucht, davon 3 mit dem Vektor-Konstrukt transduzierte, 3 mit einer Fluorescein-Lösung injizierte und 6 unbehandelte Kontrollen. Aus jedem Auge wurden drei Vertikalschnitte untersucht und in die statistische Auswertung mit einbezogen. Da die bisher in der Literatur veröffentlichten Ergebnisse entweder deutliche oder keine relevanten Unterschiede gezeigt haben und die hier zuvor durchgeführte morphologische Analyse keine relevanten Unterschiede erwarten ließ, haben wir uns auf eine geringe Anzahl von Tieren beschränkt.

Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde versucht, möglichst exakt miteinander korrespondierende Abschnitte beider Augen eines jeden Tieres zu erhalten, bei ähnlicher retinaler Schichtdicke und vergleichbarer Anzahl von Photorezeptor-Lagen. Für die quantitative Auswertung wählten wir eine Doppelfärbung mit CtBP2 und DHP. Die Wahl fiel auf CtBP2, weil dieses sowohl in unseren Vorarbeiten als auch in der Literatur zu einer extrem zuverlässigen Markierung der präsynaptischen Ribbons in den Photorezeptor-Terminalien geführt hat. Da die Ribbons aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur je nach ihrer Orientierung nicht komplett in einer Focusebene liegen und gelegentlich nicht eindeutig voneinander abgrenzbar sind, entschieden wir uns, zusätzlich mit DHP die dendritischen Spitzen der Bipolarzellen zu färben. Das DHP-Signal ergibt im konfokalmikroskopischen Scan der OPL relativ kleine, annähernd runde „Punkte“, die *Clustern* von Kalziumkanälen in den invaginierenden dendritischen Spitzen der Bipolarzellen entsprechen. In den üblicherweise triadisch angeordneten Synapsen an den Stäbchen-Terminalien befinden sich jeweils zwei Bipolarzellendendriten in Kontakt zu einem synaptischen *Ribbon*. Es ergibt sich mithin das Bild zweier eng beieinander liegender „Punkte“ innerhalb der hufeisenförmigen Struktur des *Ribbon*-Bandes (Abb. 14). Diese „Punkte“ sind unter Idealbedingungen besser abgrenzbar und leichter zu zählen als die hufeisenförmigen *Ribbons*. Da die DHP-Färbung deutlich weniger zuverlässig ist und das Signal oftmals schwach, wurde DHP mit Cy3-

Sekundärantikörpern gekoppelt, die erfahrungsgemäß zu einem stärkeren und stabileren Signal führen als Alexa Fluor® 488.

Die Auszählung erfolgte jeweils über die gesamte Breite eines angefertigten Scans (146,40 µm). Dieser wurde mit ImageJ in seine zwei Kanäle aufgetrennt und anschließend wurden die Zielstrukturen manuell mit Hilfe des *Cell Counter Plugins* (Kurt de Vos, University of Sheffield, Academic Neurology) markiert (Abb. 13A,B).

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) mithilfe der Statistik-Software SPSS.

2.6 Verwendete Materialien

2.6.1 Biologische Materialien

2.6.1.1 Primärantikörper

Antikörper	Wirt	Art	Antigen	Verdünnung	Spezifität in der Ratten-Retina	Hersteller	Katalog-Nr.
AIF	rb	polyklonal	Peptid entsprechend dem Carboxyl-Terminus von Apoptose-induzierendem Faktor	1:100	N/A	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA	4642
Calbindin (CaBP)	ms	monoklonal IgG	Maus Calbindin D-28k	1:1000	Horizontalzellen sowie einige Amakrinzellen	Swant, Bellinzona, Schweiz	300
Calbindin (CaBP)	rb	polyklonal	Ratten Calbindin D-28k	1:2000	Horizontalzellen sowie einige Amakrinzellen	Swant, Bellinzona, Schweiz	CB-38a
CtBP2	rb	polyklonal	AS 431-445 von Ratten-C-terminal-binding-protein 2 über einen N-terminalen Cystein-Rest an Napfschnecken Hämocyanin gebunden	1:5000	RIBEYE in den synaptischen Ribbons in Axon-Terminalien von Photorezeptoren und Bipolarzellen, Transkriptions-Corepressor CtBP2 in Zellkernen	Synaptic-Systems, Göttingen, Deutschland	193-003
DHP	ms	monoklonal IgG	Cacna1s in der $\alpha 1$ -Untereinheit des Dihydropyridin-empfindlichen L-Typ Ca^{2+} -Kanals	1:1000 - 1:2000	Postsynaptische Kalzium-Kanäle in invaginierenden Dendriten von Stäbchen- und ON-Zapfen-Bipolarzellen	Chemicon (Millipore), Billerica, MA, USA	MAB427
GFAP	rb	polyklonal	Bovines saures Gliafaserprotein (<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>)	1:1000	Astrozyten, Endfüßchen der Müller-Gliazellen im Bereich der inneren Grenzmembran	Chemicon (Millipore), Billerica, MA, USA	AB5804
GFP	rb	polyklonal IgG	Grün fluoreszierendes Protein	1:2000	N/A	Invitrogen, San Diego, CA, USA	A-11122
PKC α	rb	polyklonal	Peptid entsprechend der AS 659-672 des N-Terminus von Ratten-Proteinkinase-C α	1:10.000	Stäbchen-Bipolarzellen sowie ein Subtyp von Amakrinzellen	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO	P4334
PSD95	ms	monoklonal IgG	Rekombinantes Ratten-PSD95 (postsynaptisches Dichteprotein 95 kDa)	1:500	Präsynaptische Membran von Photorezeptor-Endfüßchen in der OPL, postsynaptisch an glutamergen Synapsen in der IPL (postsynaptisches Dichteprotein an AMPA-Rezeptoren)	Affinity Bioreagents, Golden, CO, USA	MA1-046

Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper.

2.6.1.2 Sekundärantikörper

Fluorophor	Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Produktnr.
Alexa Fluor® 488 [λ_{abs} = 496 nm] [λ_{em} = 519 nm]	dk α gt	1:500	MoBiTec/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	A-11055
	dk α ms	1:500		A-21202
	dk α rb	1:500		A-21206
Cy3 [λ_{abs} = 550 nm] [λ_{em} = 570 nm]	dk α ms	1:500	Jackson IR/Dianova, Hamburg, Deutschland	711-165-152
	dk α rb	1:500		711-165-152

Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper.

2.6.2 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller	Verwendung
Agar	Merck, Darmstadt, Deutschland	Vibratomschnitte
Aqua PolyMount	Polysciences Europe, Eppelheim, Deutschland	LM
Bleicitrat	Leica, Nussloch, Deutschland	EM
BSA (Fraction V)	Merck, Darmstadt, Deutschland	Inkubationsmedien (LM/EM)
Cacodylat	Merck, Darmstadt, Deutschland	EM
Di-Natriumhydrogenphosphat- Heptahydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Roth, Karlsruhe, Deutschland	LM/EM
Fluorescence anti-fading Kit	Daco, Carpinteria, CA, USA	TUNEL
Fluorometric DNA Fragmentation Detection Kit II (BrdU)	PromoCell, Heidelberg, Deutschland	TUNEL
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	EM
Jung Tissue Freezing Medium	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland	LM
Natriumdihydrogenphosphat- Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt, Deutschland	LM/EM
Natronlauge (NaOH) 1 mol/L	KMF OptiChem, Lohmar, Deutschland	LM
NDS	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	Inkubationsmedien (LM/EM)
NGS	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	Inkubationsmedien (LM/EM)
Osmiumtetroxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland	EM
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland	LM/EM

Material und Methoden

Saccharose D+	Roth, Karlsruhe, Deutschland	Gefrierschutz LM/EM
Salzsäure (HCl) 0,1 mol/L	Merck, Darmstadt, Deutschland	LM
Silbernitrat	Merck, Karlsruhe, Deutschland	EM
Tris-Base	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	LM
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	LM
Tris-Puffer	Roth, Karlsruhe, Deutschland	LM
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	LM
Uranylacetat	Plano, Wetzlar, Deutschland	EM
Wasserstoffperoxid H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland	LM

2.6.3 Verbrauchsmaterialien

Cryogenic Vials 5,0 mL Kryo-Phiolen	Corning, NY, USA
Deckgläschen für Objektträger	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EM-Stain	Leica, Nussloch, Deutschland
Eppendorf Tubes div. Ausführungen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Filterpapier Chromatography Paper 3mm	GE Healthcare, München, Deutschland
Kimtech Präzisionswischtücher Weiß 11x21cm	Kimberley-Clark, Surrey, UK
Liquid-Blocker PAP-Pen Mini	SCI Sciences Services, München, Deutschland
Parafilm M Laboratory Film	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
PP Test Tubes 50 mL Cellstar	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Skalpellklingen, unsteril, div. Ausführungen	Bayha, Tuttlingen, Deutschland
SuperFrost Ultra Plus Objektträger	Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland

2.6.4 Verwendete Geräte

Binokular Stemi SR 6 mit	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Halogenlampe KL 1500	Schott, Mainz, Deutschland
Digitales Fluoreszenzmikroskop BZ8000	Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland
Färbekammer, gläsern	Glaswerke Wertheim, Wertheim, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Galaxy Mini Zentrifuge C12XX	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Glasgefäße div. Ausführungen	Schott/Duran, Mainz, Deutschland
Glaspipetten, div. Größen	Brand, Wertheim, Deutschland
Heraeus Biofuge pico	Kendro Laboratory Products, Hamburg, Deutschland
Konfokales LaserScan Mikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Axioskop 2 MOT mit LSM 5 Pascal Modul und Ar-Laser 488, 514 nm, 25 mW sowie HeNe-Laser 543 nm, 1 mW	
Kryostat CM3050 S	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Kühlzentrifuge 541 7R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Luft-Objektiv Plan-Apochromat 20x/0.8	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Öl-Immersionsojektive Plan-Neofluar 40x/1.3 und Plan-Apochromat 63x/1.4	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
pH-Meter 320	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Pipetten „Pipetman“ verschiedene Größen	Gilson International B.V. Deutschland, Limburg-Offheim, Deutschland
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Schüttler Duomax 1030 und Rotamax 120	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Thermoschüttler	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transmissionselektronenmikroskop LEO 912 omega	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Ultracut S Mikrotom	Reichert-Jung, Bensheim, Deutschland
Vibratom VT1000 S	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Vortex Genie 2 G-560E	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Waage 1204 MP, beheizbar	Sartorius, Göttingen, Deutschland

2.6.5 Verwendete Software

Excel:mac 2008	Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
ImageJ Version 1.46i	Wayne Rasband, National Institutes of Health,

	Berthesda, Kalifornien, USA; http://imagej.nih.gov/ij
LSM 5 Pascal Version 3.2 SP2	Carl Zeiss Microimaging, Jena, Deutschland
Photoshop Version 8.0.1	Adobe Systems, San Jose, Kalifornien, USA
Photoshop CS5.1	Adobe Systems, München, Deutschland
Powerpoint:mac 2008	Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland

3 Ergebnisse

3.1 Identifikation des transduzierten Netzhautbereichs mittels GFP-Färbung

Zur Visualisierung des transduzierten Bereichs wurde das GFP-Transgen mit einem AAV2/5-Vektor appliziert, der bei Ratten, wie auch bei den meisten anderen üblicherweise in der retinalen Forschung eingesetzten Spezies, zu einer Transduktion von Photorezeptoren und RPE führt [87]. Die in-vivo Funduskopie zeigte bereits 14 Tage p. i. eine deutliche Fluoreszenz (Abb. 6).

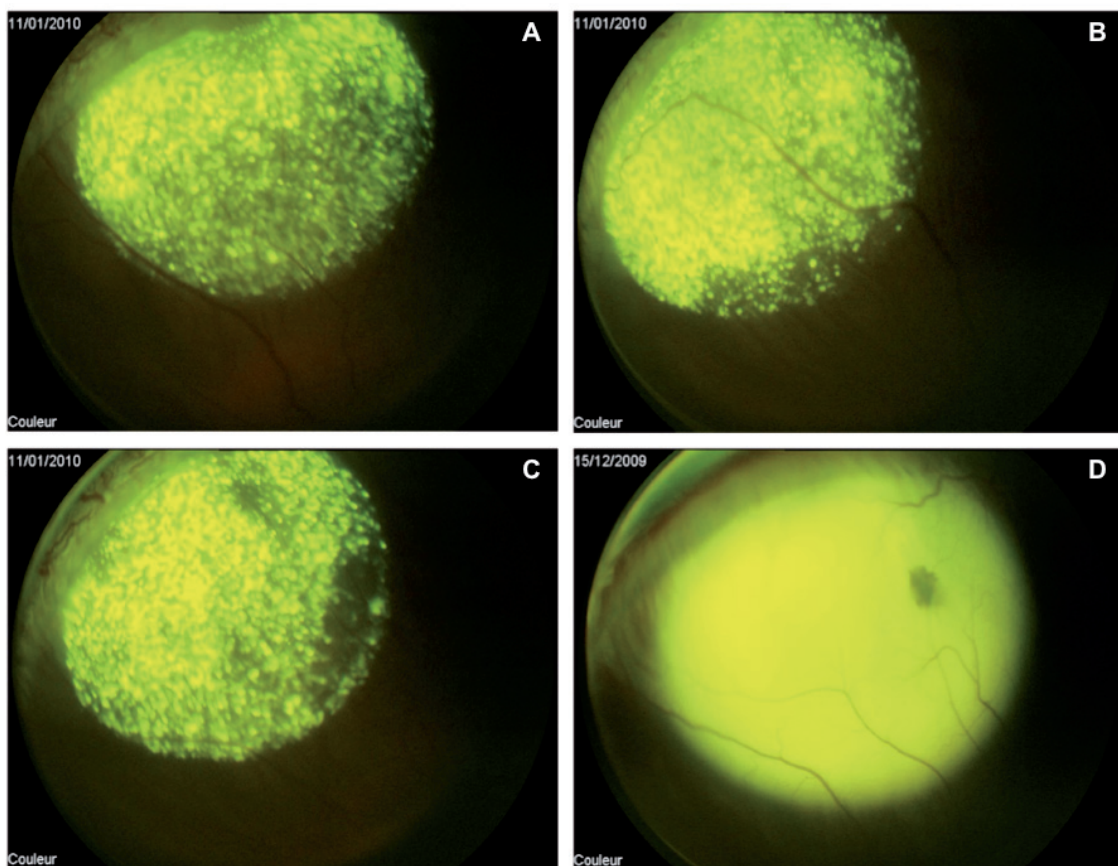


Abbildung 6: In-vivo Fundusaufnahmen transduzierter Rattenaugen.

(A-C) Rechtes Auge dreier transduzierter Ratten 4 Wochen p.i. Die Tiere erhielten die Injektion in einen peripheren Netzhaut-Bereich. Der GFP-transduzierte Bereich ist in der Fluoreszenz-Funduskopie leicht zu lokalisieren. Die hellen, stark GFP-positiven Punkte entsprechen Zellen des RPE. Das schwächere, homogene Signal entspricht der GFP-Expression in den Photorezeptoren. (D) Rechtes Auge eines Kontrolltiers, dem lediglich Fluoreszein ohne Vektor in den subretinalen Raum injiziert wurde.

In den angefertigten histologischen Schnitten der Neuroretina konnte der Bereich der Injektion in immunhistochemischen Färbungen mit α -GFP-Antikörpern sichtbar gemacht werden. Die GFP-Expression war dabei auf die Photorezeptoren begrenzt und zeigte einen relativ abrupten Abbruch am Rand des ursprünglich durch die Injektion abgehobenen

Netzhautbereichs (‚blep‘). Photorezeptoren außerhalb dieses ‚bleps‘ sowie andere retinale Zelltypen zeigten keine GFP-Expression (Abb. 7). Das RPE, welches durch den Vektor ebenfalls transduziert wird, war auf den Flatmounts präparationsbedingt nicht mehr vorhanden. Die GFP-Expression war über den gesamten Zeitraum der Untersuchung stabil und zeigte auch bei den ältesten untersuchten Tieren (18 Monate) keine Abschwächung.

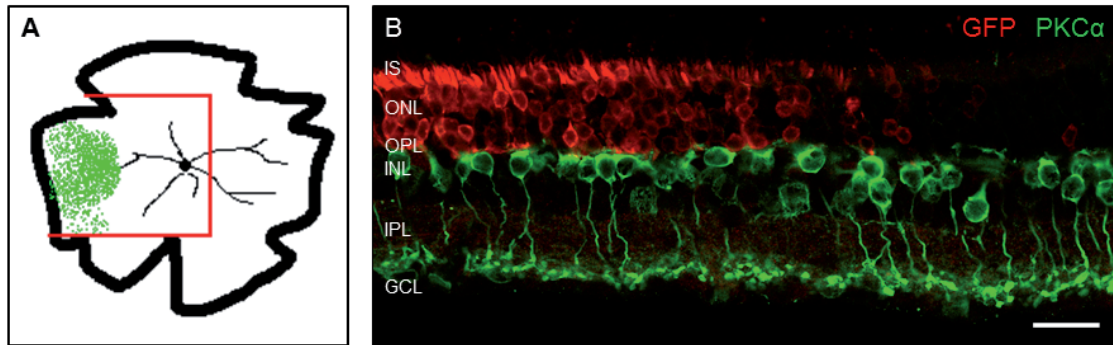


Abbildung 7: Netzhaut-Skizze und Vertikalschnitt mit Übergangszone zum GFP-transduzierten Bereich. (A) Skizze einer Netzhaut als Flatmount nach Herauslösen aus dem Augenbecher. Der Bereich der GFP-Expression ist grün dargestellt. In rot ist die gewählte Schnittführung für die Präparation und anschließende Aufbereitung für vertikale Kryostatschnitte eingezeichnet. (B) Vertikaler Schnitt durch das in A eingezeichnete Netzhaut-Präparat in der anti-GFP-Immunfärbung (rot). Gezeigt ist die Übergangszone vom GFP-transduzierten zum zentralwärts davon gelegenen, nicht-transduzierten Bereich. PKCα (grün) markiert Stäbchen-Bipolarzellen. IS: innere Segmente der Photorezeptoren, ONL: äußere Körnerschicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, INL: innere Körnerschicht, IPL: innere plexiforme Schicht, GCL: Ganglienzellschicht. Skalenbalken 20µm.

3.2 Morphologie der Ribbonsynapse 1 Monat p. i.

Die Darstellung des Proteinbands als wichtigstes präsynaptisches Element der OPL erfolgte durch Markierung mit Anti-CtBP2. In der Übersichtsaufnahme sieht man ein stark leuchtendes, horizontal im äußeren Drittel der OPL verlaufendes Fluoreszenzsignal von in 2-3 Schichten übereinander angeordneten Stäbchen-Terminalien. Ein zusätzliches, deutliches Signal relativ homogen verstreuter kleiner Punkte in der IPL entspricht den Endigungen von Bipolarzell-Axonon, in welchen ebenfalls Ribbonsynapsen vorkommen (Abb. 8A,B). Auch Zellkerne im Bereich der INL und GCL sind teilweise deutlich angefärbt (das in den synaptischen Ribbons vorkommende Strukturprotein RIBEYE ist ein alternatives Transkript des in Zellkernen vorkommenden Transkriptionsfaktors CtBP2). In höherer Vergrößerung zeigt sich deutlich die hufeisenförmige Struktur der synaptischen Proteinbänder (*Ribbons*; Abb. 8E,F, vgl. auch Abb. 14B). In transduzierten Netzhautbereichen lässt die regelmäßige Anordnung der Stäbchen-Terminalien keine Abweichungen erkennen. Die Hufeisenform der Proteinbänder ist unverändert erhalten und zeigt keine Verkürzungen oder Verklumpungen (Abb. 8A,C,E). Typische Zeichen eines Remodellings bzw. der Dekonstruktion, z. B. der Verlust der klassischen Hufeisenform zugunsten einer eher groben und klobigen Konfiguration der Proteinbänder, eine Auflockerung der homogenen und dichten Anordnung

der Stäbchen-Endknöpfchen oder das Auftauchen versprengter Fluoreszenzsignale in der ONL durch verkürzte und retrahierte Photorezeptor-Axone, finden sich nicht.

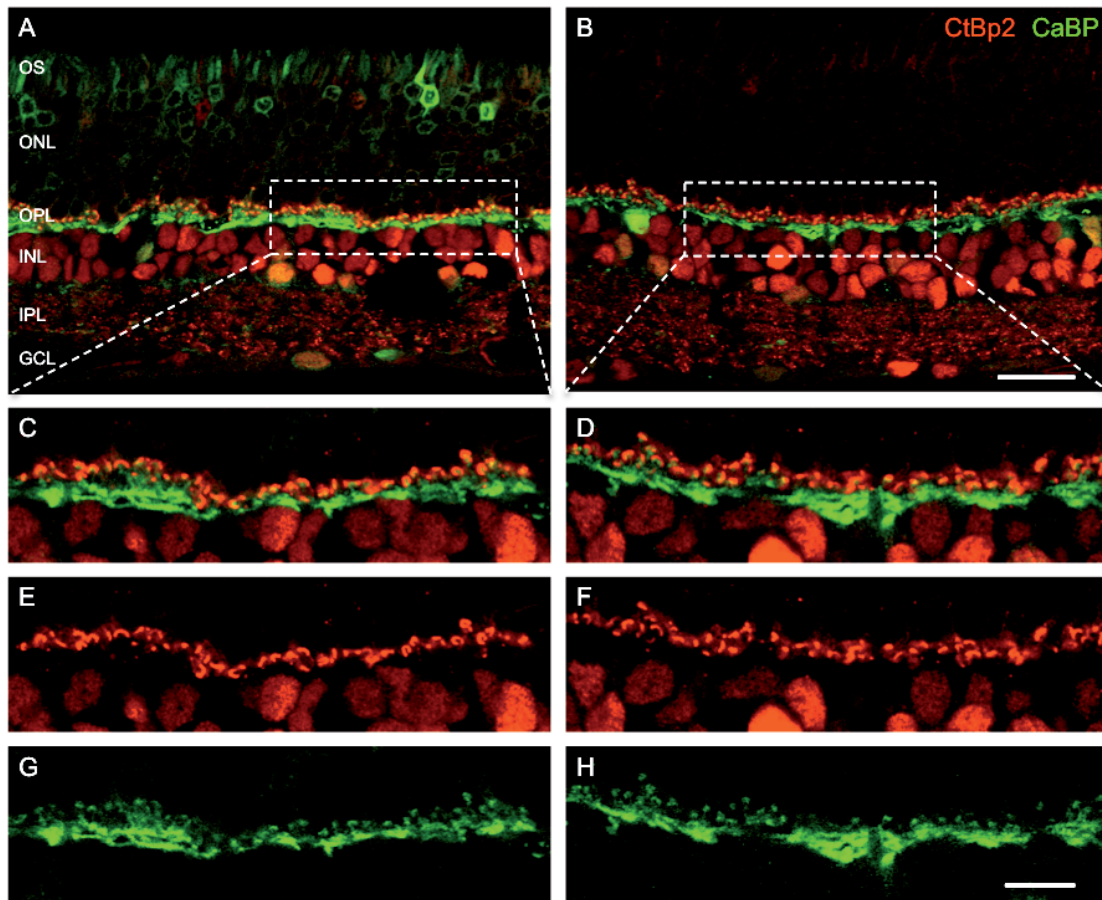


Abbildung 8: Äußere plexiforme Schicht (OPL) der Ratten-Retina mit Färbung für CtBP2 (synaptische Ribbons in den Photorezeptor-Terminalien) und CaBP (Horizontalzellen) 1 Monat p.i.

(A) GFP-transduzierter Bereich. Die GFP-Fluoreszenz in den Photorezeptoren ist deutlich zu erkennen. (C, E, G) Vergrößerung des in A markierten Bereichs. (B) Nicht-transduzierter Bereich. (D, F, H) Vergrößerung des in B markierten Bereichs. Weder in Struktur und Anordnung noch in der Anzahl synaptischer Kontakte zwischen Photorezeptoren und Horizontalzellen zeigen sich nennenswerte Abweichungen. OS: äußere Photorezeptorsegmente, ONL: äußere Körnerschicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, INL: innere Körnerschicht, IPL: innere plexiforme Schicht, GCL: Ganglienzellschicht. Skalensbalken in B (für A und B): 20 μ m ; Skalensbalken in H (für C-H): 10 μ m.

3.3 Morphologie der synaptischen Invaginationen 1 Monat p. i.

Die fein verästelten dendritischen Fortsätze der Stäbchenbipolarzellen, die jeweils ca. 15-50 Stäbchen-Terminalien kontaktieren [13], lassen sich in der Färbung mit Anti-PKC α als senkrechte, die OPL bis knapp unterhalb der innersten Stäbchen-Zellkernreihe durchziehende Fasern gut verfolgen (Abb. 9C,D). Als Anhaltspunkt für eine funktionierende Signalübertragung von den Stäbchen auf die nachgeschalteten Bipolarzellen haben wir zudem Antikörper gegen Dihydropyridin (DHP) verwendet. Das DHP-Signal ergibt in der konfokalmikroskopischen Aufnahme der OPL relativ kleine, annähernd runde „Punkte“, die

Clustern von Kalziumkanälen an den invaginierenden dendritischen Spitzen der Bipolarzellen entsprechen (Abb. 9 und 13). In den üblicherweise triadisch angeordneten Synapsen an den Stäbchen-Terminalien befinden sich jeweils zwei Bipolarzelldendriten in Kontakt zu einem synaptischen *Ribbon*. Es ergibt sich mithin das Bild zweier eng beieinander liegender „Punkte“ innerhalb der hufeisenförmigen Struktur des *Ribbon*-Bandes (Abb. 14).

Sowohl in den Netzhäuten von Kontrolltieren als auch in transduzierten Netzhautbereichen ergibt die Anti-DHP-Färbung eine Lage gleichmäßig verteilter Fluoreszenzpunkte, die sowohl den mit Anti-PKC α markierten dendritischen Spitzen der Bipolarzellen unmittelbar aufsitzen (Abb. 9E,F) als auch in engem Kontakt mit den präsynaptischen Proteinbändern stehen (Abb. 14C). Ein Verlust endständiger dendritischer Verästelungen („*pruning*“), eine Aussprossung dendritischer Fortsätze in die ONL oder eine verminderte Expression postsynaptischer Rezeptormoleküle, wie sie als typische Reaktionen von Bipolarzellen sowohl in Tiermodellen retinaler Degeneration [200], als auch bei experimentellen Netzhautablösungen beobachtet wurden [149, 150], lässt sich mit den von uns gewählten Antikörpern nicht nachweisen.

Sowohl in gesunden Kontrollaugen als auch in behandelten Augen brachte die Anti-Calbindin-Markierung die Horizontalzellen mit ihren aus den Zellkörpern hervorgehenden Dendriten und dünnen, tangential in der OPL verlaufenden Axonen zum Vorschein (Abb. 8G,H und 10C,D). Die weit gefächerten und verästelten axonalen Auftreibungen kontaktieren mit ihren feinen, wie kleine Antennen in die OPL vorstoßenden Verzweigungen die Stäbchen-Terminalien. Die den Axonterminalien endständig aufsitzenden, punktförmigen Auftreibungen stehen in unmittelbarem Kontakt zu dem synaptischen Ribbon, von dem sie förmlich umklammert werden (Abb. 8C,D). Sie invaginieren tief in die Photorezeptor-Terminalien, was in der Doppelmarkierung mit Anti-PSD-95 gut deutlich wird (Abb. 10E,F). Eine Verplumpung oder Hypertrophie der Horizontalzellaxone und ein Verlust endständiger Auftreibungen war in behandelten Netzhäuten ebensowenig festzustellen wie ein Aussprossen axonaler Fortsätze in die ONL.

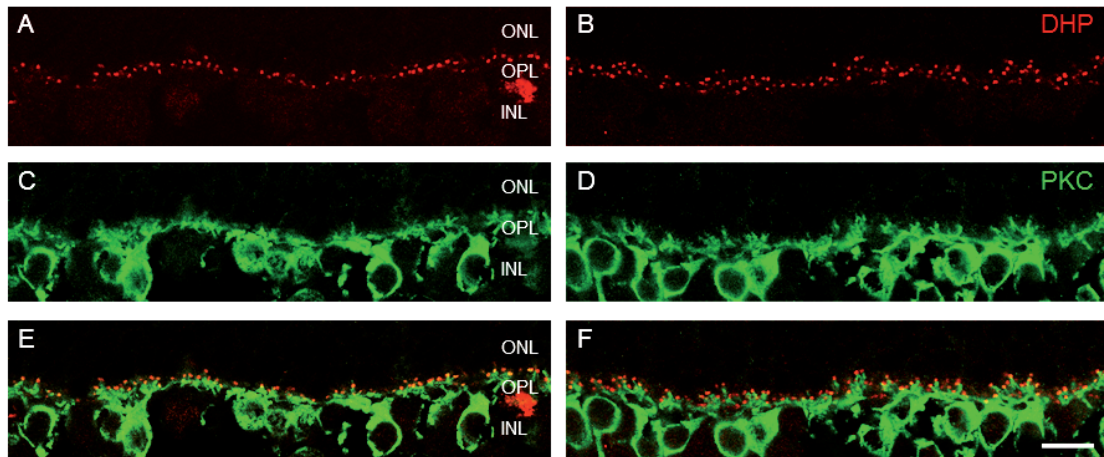


Abbildung 9: Äußere plexiforme Schicht (OPL) der Ratten-Retina mit Färbung für DHP und PKC.
 Linke Spalte (**A, C, E**): GFP-transduzierter Bereich, rechte Spalte (**B, D, F**): nicht-injizierter Bereich. DHP markiert Ca^{2+} -Kanäle an den Spitzen invaginierender Bipolarzell-Dendriten, PKC α färbt Stäbchen-Bipolarzellen. ONL: äußere Körnerschicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, INL: innere Körnerschicht. Skalenbalken in F: 10µm.

3.4 Morphologie der Photorezeptor-Terminalien 1 Monat p. i.

In der normalen Retina liegen die Stäbchen-Endknöpfchen dicht gepackt in ca. 2-5 Reihen unmittelbar unterhalb der letzten Zellreihe der ONL und oberhalb des OPL-Neuropils. In der Färbung mit Anti-PSD-95 ergibt sich durch die Markierung der präsynaptischen Membranen ein charakteristisches Fluoreszenzmuster homogen angeordneter „züngelnder Flammen“ (Abb. 10A,B). Auch diesbezüglich zeigen sich in behandelten Netzhäuten keine auffälligen Unterschiede. In der Doppelfärbung mit Anti-Calbindin stellen sich zudem die Invaginationen der basalen Zellmembran hinsichtlich ihrer Anordnung und Tiefe unauffällig dar (Abb. 10E, F).

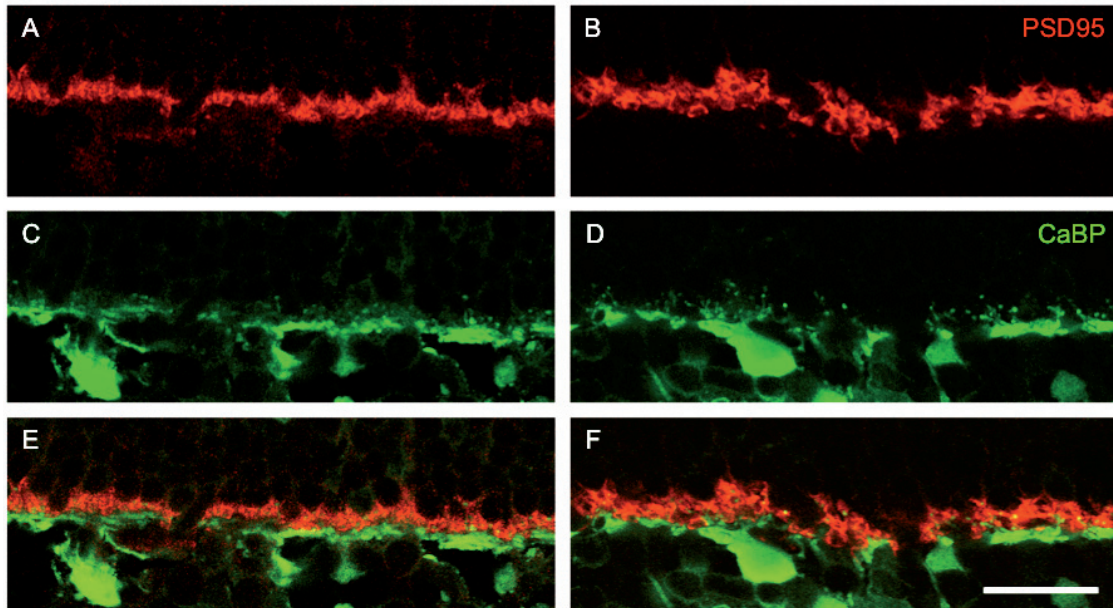


Abbildung 10: OPL der Ratten-Retina mit Immunfärbung für PSD95 und CaBP.

Linke Spalte (A, C, E) transduzierter Bereich, rechte Spalte (B, D, F) korrespondierender Netzhautbereich aus dem nicht-transduzierten, kontralateralen Auge. Die GFP-Fluoreszenz in den PR ist in C und E teilweise zu erkennen. ONL: äußere Körnerschicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, INL: innere Körnerschicht. Skalenbalken in F: 20 μ m.

3.5 Ultramorphologie der Ribbonsynapsen 1 Monat p. i.

Zur genaueren Untersuchung der synaptischen Architektur wurden transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der OPL von behandelten und unbehandelten Kontrolltieren angefertigt. Dabei stellte sich die Struktur der OPL insgesamt regelhaft dar.

Die Stäbchen-Terminalien im transduzierten Netzhautbereich zeigen eine im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren unveränderte Form und eine kompakte Anordnung distal des Neuropils der OPL. Ihr Zytoplasma ist dicht mit synaptischen Vesikeln gefüllt. Die Synapsen mit den nachgeschalteten Horizontal- und Bipolarzellen zeigen die typische Triaden-Struktur mit je einem gut abgrenzbaren präsynaptischen Proteinband (Pfeilspitzen in Abb. 11A,B) und den in enger Assoziation dazu stehenden invaginierenden Fortsätzen von je zwei lateral angeordneten Horizontalzellaxonen und ein bis zwei zentral dazwischen liegenden Bipolarzellendriten (s. Abb. 11B mit Kennzeichnung der einzelnen Strukturen). Die Invaginationen haben eine Tiefe von ca. 1 μ m. In Abb. 11B ist der enge Hilus, durch den die invaginierenden postsynaptischen Fortsätze passieren müssen, gut erkennbar. Strukturelle Veränderungen, wie sie etwa nach Netzhautablösungen zu beobachten sind, z. B. verkürzte oder verklumpte Proteinbänder, flachere oder vollständig fehlende Invaginationen der Zellmembran und eine insgesamt lockerere Organisation der postsynaptischen Zellfortsätze [149, 150], konnten nicht nachgewiesen werden.

Die Zapfen-Füßchen behandelter Netzhäute stellen sich in ihrer typischen Form als flache, im Querschnitt diskoide, im Längsschnitt (Vertikalschnitt) stempelförmige Auftreibungen von ca. 5-10 μm Durchmesser, apikal abgerundet und mit flacher Basis dar (Abb. 11C,D). Auch hier präsentiert sich das Zytoplasma dicht mit synaptischen Vesikeln bepackt. Die Basis des Zapfen-Füßchens ist unterbrochen von mehreren tiefen Invaginationen und das sich nach innen hin anschließende Neuropil der OPL ist dicht von den postsynaptischen Fortsätzen der Horizontal- und Bipolarzellen durchzogen. Die feinen postsynaptischen Fortsätze, insbesondere die Horizontalzellaxone, zeigen gegenüber unbehandelten Kontrolltieren keine Anzeichen für Schwellung und Hypertrophie. Innerhalb eines Zapfen-Füßchens lassen sich erwartungsgemäß mehrere präsynaptische Proteinbänder nachweisen (Pfeilköpfe in Abb. 11C,D), die mit den nachgeschalteten Zellen zu typischen Triaden organisiert sind. Auch die basalen Zellkontakte lassen bei transduzierten Tieren keine Abweichungen erkennen.

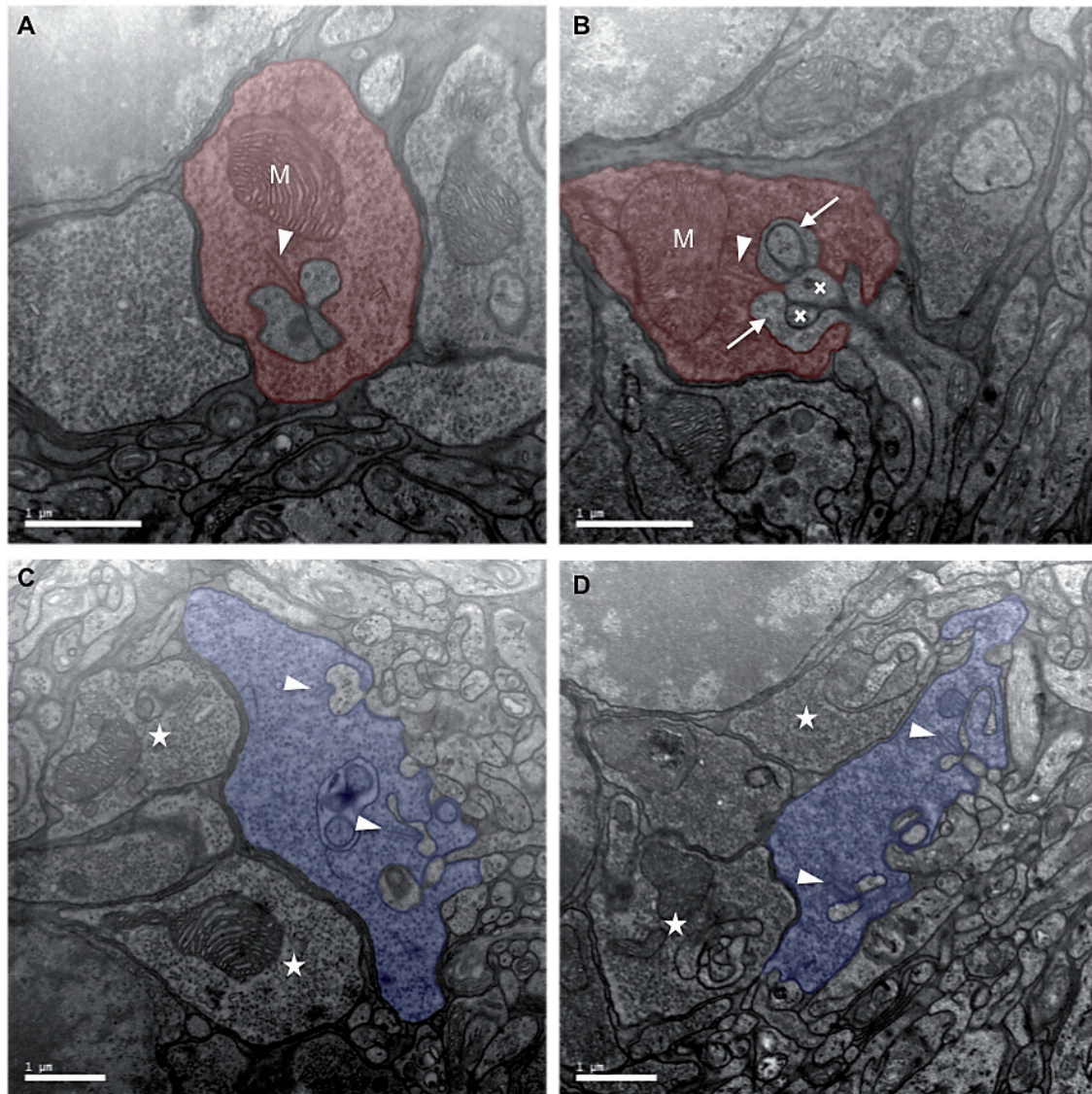


Abbildung 11: Elektronenmikroskopische Aufnahmen aus der OPL GFP-transduzierter (linke Spalte: A, C) und nicht-transduzierter (rechte Spalte: B, D) Ratten.

(A, B) Stäbchen-Terminalien (rot hinterlegt) mit je einem synaptischen Ribbon (Pfeilspitzen) und den tief invaginierenden Dendriten von Bipolarzellen (x) sowie den randständig angeordneten axonalen Endigungen von Horizontalzellen (Pfeile). Ribbon und Horizontal- sowie Bipolarzellfortsätze ergeben zusammen eine sog. Triade. M: Mitochondrien. (C, D) Zapfen-Füßchen (blau hinterlegt) mit invaginierenden und basalen synaptischen Zellkontakten. Pfeilköpfe: Ribbon-Synapsen; Sternchen: benachbarte Stäbchen-Terminalien. Skalenbalken in A-D: 1µm.

3.6 Morphologie der Ribbonsynapse 12 Monate p. i.

Auch langfristig zeigte sich in AAV-transduzierten Retinae eine stabile GFP-Expression in den Photorezeptoren. Mit den hier verwendeten Markern ließen sich keine Abweichungen im Aufbau der synaptischen Verschaltungen innerhalb der äußeren plexiformen Schicht feststellen. Die Hufeisenform der Ribbons kommt unverändert zur Darstellung, ebenso die postsynaptischen Elemente. Auch 12 Monate nach subretinaler Injektion zeigen sich keine ektopen Zellfortsätze oder Synapsen außerhalb der OPL (Abb. 12). Insgesamt zeigt sich bei den älteren Tieren eine verminderte retinale Schichtdicke. Dies ist jedoch am ehesten auf

altersbedingte Degeneration und gegebenenfalls lichtinduzierte Schädigung zurückzuführen und lässt sich auch bei unbehandelten Tieren gleichen Alters feststellen.

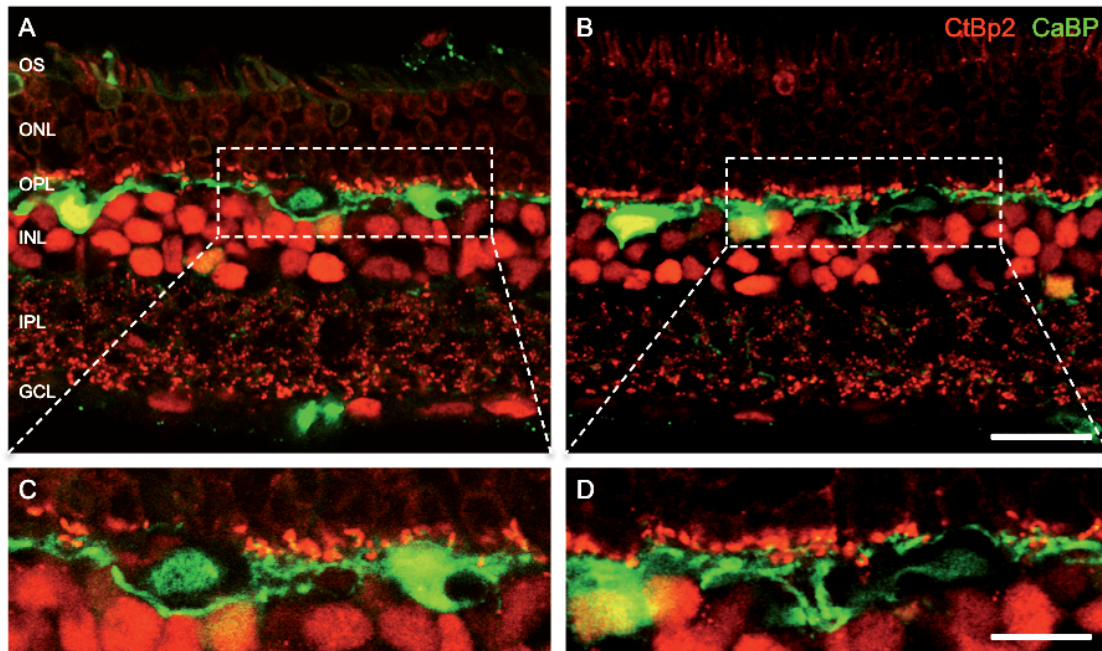


Abbildung 12: Vertikalschnitte durch die Ratten-Retina mit Immunfärbung für CtBP2 und CaBP 12 Monate p.i.

(A) GFP-transduzierter Bereich. Die grüne GFP-Fluoreszenz in den Photorezeptoren ist teilweise zu erkennen. (B) Nicht-transduzierter Bereich. (C) Vergrößerung des in (A) hervorgehobenen Ausschnitts. (D) Vergrößerung des in (B) hervorgehobenen Ausschnitts. Die etwas größere Anzahl an Ribbon-Synapsen in der OPL ist auf die zentralere Lage des nicht-transduzierten Abschnitts im Vergleich zum transduzierten Bereich zurückzuführen (beide Aufnahmen entstammen dem gleichen vertikalen Schnittpräparat). Die zentralere Lage des nicht-transduzierten Bereichs in (B) zeigt sich auch in der größeren Schichtdicke der ONL mit größerer Anzahl an PR-Kernen. OS: äußere Photorezeptorsegmente, ONL: äußere Körnerschicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, INL: innere Körnerschicht, IPL: innere plexiforme Schicht, GCL: Ganglienzellschicht. Skalenbalken in B (für A und B): 20 μm , Skalenbalken in D (für C und D): 10 μm .

3.7 Quantifizierung der Synapsen

Zur Untersuchung der Frage, ob es durch die Expression des Transgens oder die subretinale Injektion zu einer Abnahme der Anzahl synaptischer Verschaltungen innerhalb der OPL kommt, wurden die Augen von sechs Tieren jeweils einen Monat nach Behandlung untersucht. In der quantitativen Auswertung zeigten sich in unserer Versuchsanordnung keine statistisch relevanten Abweichungen der Anzahl CtBP2- und DHP-positiver Signale in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) von Netzhäuten GFP-transduzierter, Fluoreszein-injizierter und unbehandelter Tiere (Abb. 13). Als Signifikanzniveau wurde $p \leq 0,05$ angenommen. Die signifikante Abweichung der CtBP2-positiven Ribbons in den mit Fluoreszein-injizierten Retinae ist wohl eher den im Methodenteil angesprochenen Schwierigkeiten sowie der geringen Anzahl an Versuchstieren geschuldet und spiegelt sich jedenfalls in der vergleichenden Auszählung der DHP-positiven postsynaptischen Kalziumkanal-Cluster nicht wider.

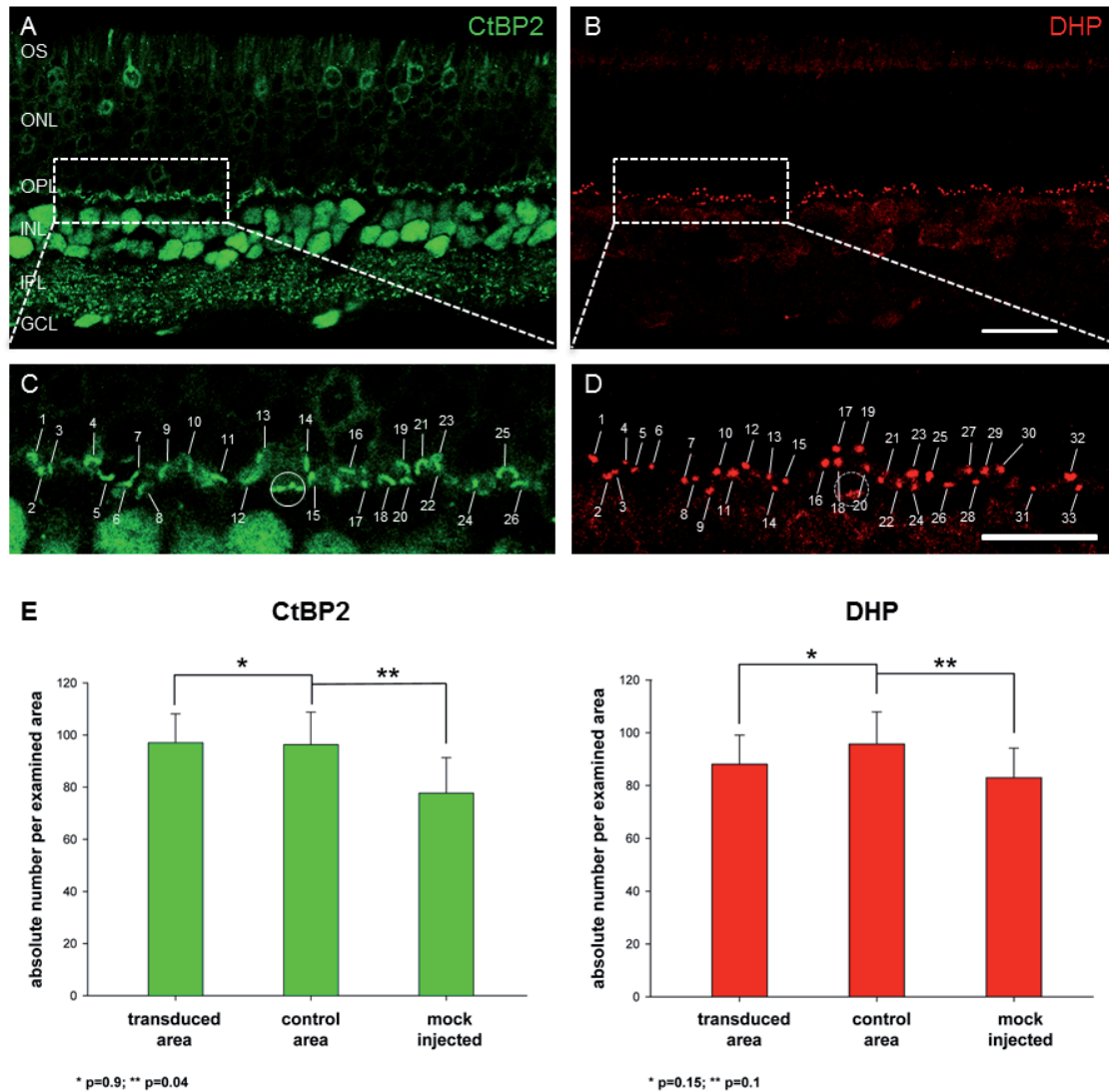


Abbildung 13: Quantifizierung der Ribbon-Synapsen in der OPL.

(A und B) Vertikalschnitt aus der Retina einer transduzierten Ratte im Bereich der GFP-Expression mit Immunfärbungen gegen CtBP2 (synaptische Ribbons, grüner Kanal) bzw. DHP (L-Typ-Kalziumkanäle in den dendritischen Spitzen von Bipolarzellen, roter Kanal). Die GFP-Fluoreszenz ist als schwaches Signal in den Photorezeptoren im grünen Kanal (A) erkennbar. (C und D) Vergrößerung der in (A) und (B) hervorgehobenen Bereiche zur Verdeutlichung der Auszählung der synaptischen Strukturen. Zentral im Bildausschnitt ist ein Zapfenfußchen zu sehen (Kreis). (E) Quantitative Darstellung für das CtBP2- und das DHP-Signal; Erläuterungen siehe Text. Skalenbalken in B: 20 μ m, Skalenbalken in D: 10 μ m.

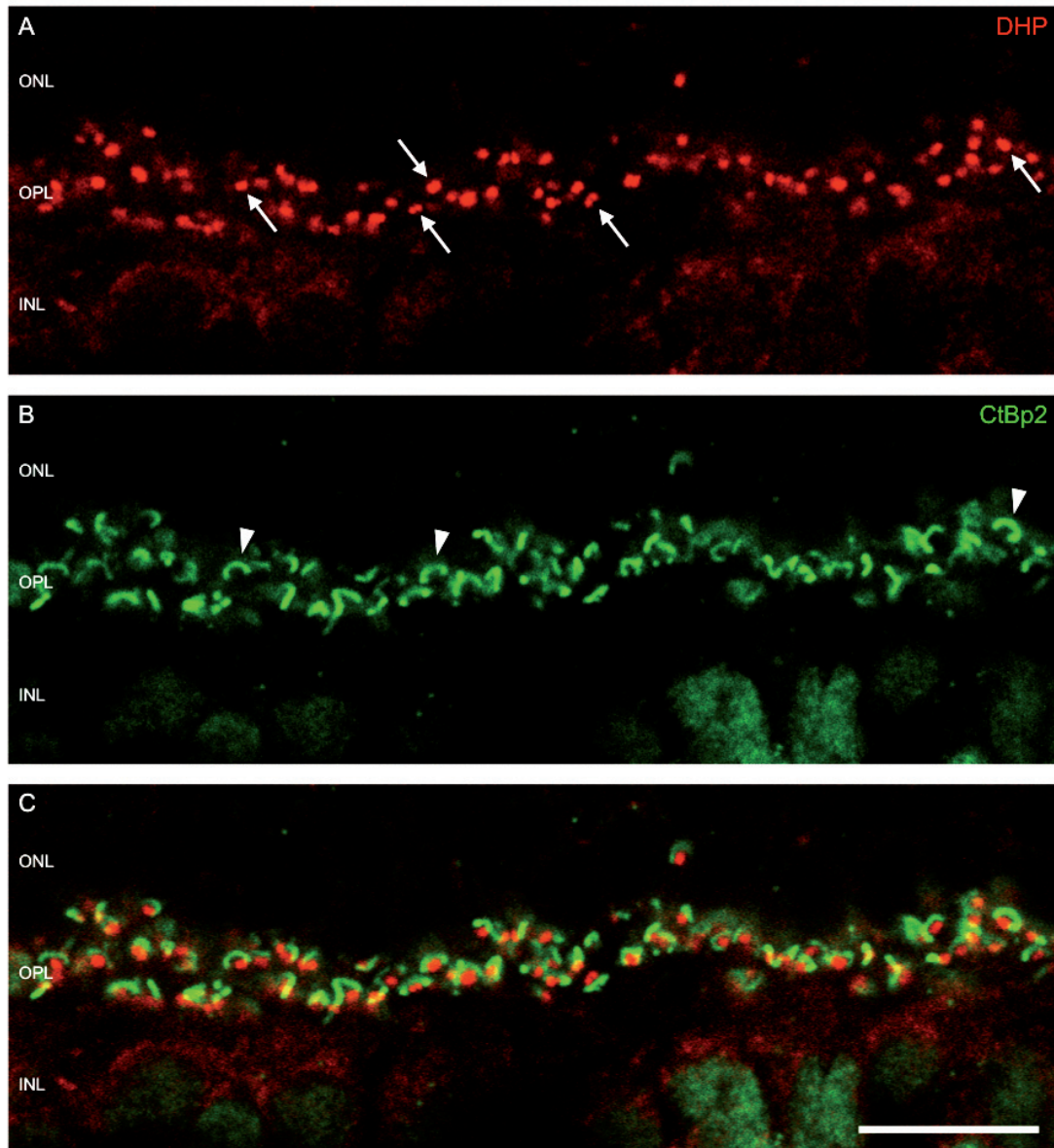


Abbildung 14: OPL einer nicht-transduzierten Ratten-Retina mit Immunfärbung für CtBP2 und DHP.

Die Synapsen zwischen Photorezeptoren und Bipolarzellen sind gut zu diskriminieren. Die CtBP2-positiven, hufeisenförmigen Strukturen im grünen Kanal entsprechen den synaptischen Proteinbändern (*Ribbons*) in den Stäbchen-Terminalien (Pfeilspitzen in **B**). Ein solches *Ribbon* umklammert in der Regel je zwei invaginierende Horizontalzell- und Bipolarzell-Dendriten. Die – im Idealfall einer parallel zur Schnittebene angetroffenen Synapse – zwei dicht beieinander liegenden, DHP-positiven Punkte im roten Kanal entsprechen spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen in den dendritischen Spitzen invaginierender Bipolarzellen (Pfeile in **A**). ONL: äußere Körnerschicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, INL: innere Körnerschicht. Skalenbalken 10µm.

3.8 Müllerzellreaktion

Weiterhin wurden Immunfärbungen an Vertikalschnitten der Netzhaut mit einem monoklonalen GFAP-Antikörper durchgeführt. Dabei zeigte sich bei unbehandelten Kontrollaugen ein auf die Nervenfaserschicht bzw. Ganglienzellschicht begrenztes Fluoreszenzmuster (Abb. 15C,E,F). Dieses entspricht dem Verteilungsmuster von retinalen Astrozyten, die regelmäßig GFAP-positiv sind [182, 201] und mit ihren Fortsätzen sowohl am Aufbau der Blut-Netzhautschanke, als auch der Membrana limitans interna beteiligt sind,

sowie den Endfüßchen von Müller-Zellen, in denen GFAP ebenfalls schwach exprimiert wird. Bei GFP-transduzierten Tieren zeigte sich im Bereich der GFP-Expression eine deutliche Fluoreszenz in radial angeordneten Fasern, die sich durch die gesamte Netzhaut von der inneren bis zur äußeren Grenzmembran erstreckten und in ihrer Form dem typischen Fluoreszenzmuster von Müller-Zellen entsprachen (Abb. 15A,B). Auch in den untersuchten Augen, in die lediglich eine Fluoreszeinlösung subretinal injiziert wurde, zeigten sich fibrilläre „Aussprossungen“, die bis weit in die INL reichten und gut mit dem Fluoreszenzmuster von Müller-Zellen nach traumatischer Manipulation in Einklang zu bringen sind (Abb. 15D). Eine Zunahme von Müllerzellfortsätzen im Bereich der Membrana limitans interna und externa und insbesondere ein Aussprossen von GFAP-positiven Fasern über die Grenzmembranen hinaus in den subretinalen Raum bzw. den Vitreus war nicht nachzuweisen.

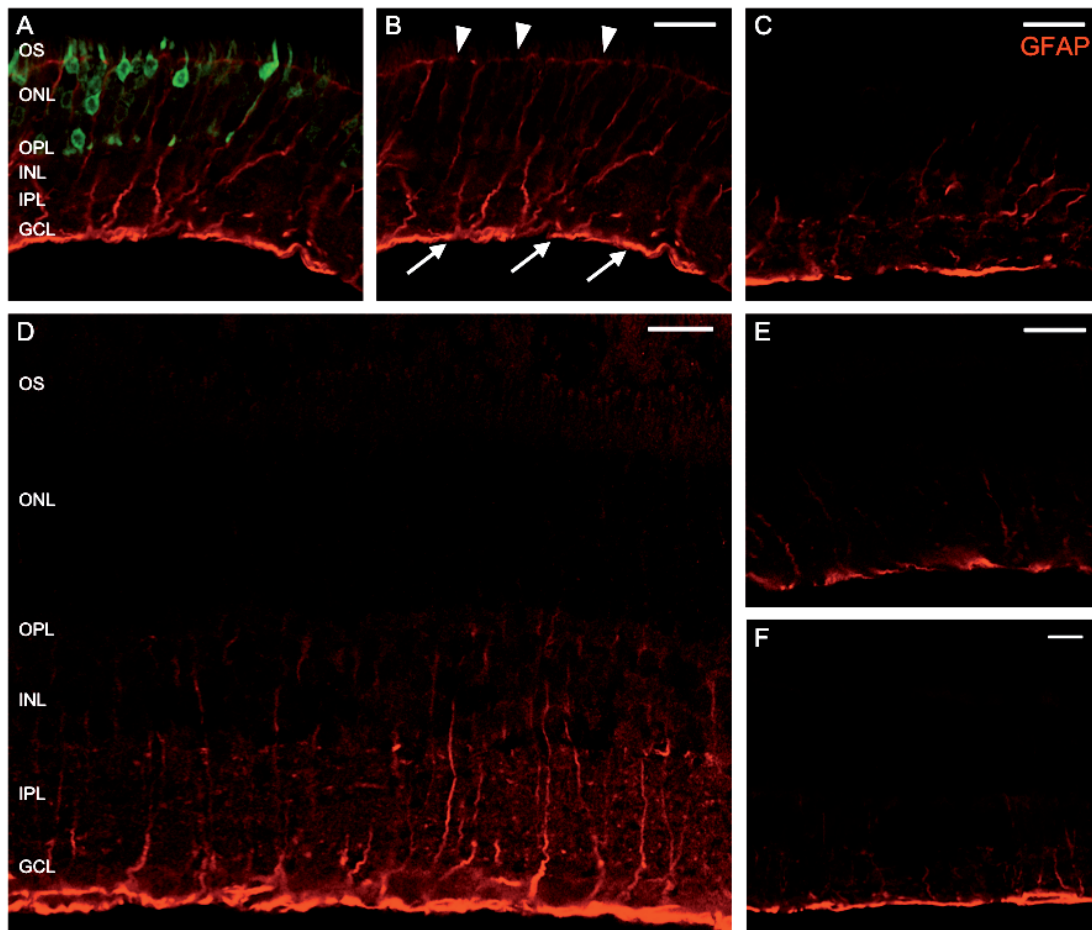


Abbildung 15: Ratten-Retinae mit Immunfärbung für GFAP (Müller-Zellen).

(A) GFP-transduzierter Bereich. Die GFP-Fluoreszenz in den Photorezeptoren ist deutlich zu erkennen. (B) Isolierter roter Kanal aus (A). Das GFAP-Signal in den Müller-Zellen durchzieht die gesamte Netzhaut von der inneren bis zur äußeren Grenzmembran. Die Pfeilspitzen markieren die Membrana limitans externa, die Pfeile weisen auf die Membrana limitans interna. (D) Kontrolltier, dem eine Fluoreszeinlösung subretinal injiziert wurde; zentralwärts gelegener Netzhautbereich. Auch hier findet sich eine deutlich gesteigerte GFAP-Expression, die in den radial angeordneten Fortsätzen der Müller-Zellen bis weit in die INL hinein verfolgt werden kann. (C und E) Gesunde Kontrolltiere, peripherer Netzhautbereich. (F) Gesundes Kontrolltier, zentraler Netzhautbereich. OS: äußere Photorezeptorsegmente, ONL: äußere Körnerschicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, INL: innere Körnerschicht, IPL: innere plexiforme Schicht, GCL: Ganglienzellschicht. Skalenbalken in allen Abb.: 20 µm.

3.9 Apoptosestatus

Apoptose oder der programmierte Zelltod ist ein aktiver, energieabhängiger Prozess, in dem Zellen – auf externe oder interne Stimuli hin – in einem komplexen und wohlgeordneten Vorgang ihren eigenen Tod herbeiführen [196, 202, 203]. Spezielle Proteasen, die Caspasen, spielen eine Schlüsselrolle im klassischen Ablauf der Apoptose [204], jedoch sind auch Caspase-unabhängige Apoptoseformen bekannt [205]. Typische Stationen des apoptotischen Zelluntergangs sind dabei die Chromatinkondensation und die intranukleosomale DNA-Fragmentation [202, 206, 207].

Mit zwei Methoden wurde der apoptotische Status der transduzierten Ratten-Retinae untersucht. Zum einen wurde mit immunhistochemischen Methoden die Verteilung des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) in der Retina untersucht, zum anderen wurde ein TUNEL-Assay durchgeführt, um im Laufe des programmierten Zelluntergangs auftretende DNA-Doppelstrangbrüche aufzudecken.

AIF ist ein ubiquitär in eukaryoten Zellen exprimiertes Flavoprotein, das eine Schlüsselrolle im Rahmen des Caspase-unabhängigen Apoptose-Wegs spielt [205, 208, 209]. Es ist normalerweise im intermembranösen Spalt der Mitochondrien lokalisiert und wird durch apoptotische Stimuli freigesetzt [209]. Die Dislokation von AIF in das Zytosol und den Zellkern führt zu Chromatin-Kondensation und DNA-Fragmentation [210]. Immunfärbungen der Ratten-Retinae mit Anti-AIF führten zu einem starken Signal in den inneren Segmenten der Photorezeptoren, in denen die Mitochondrien lokalisiert sind. Eine Dislokation des AIF-Signals in Richtung der Zellkerne konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 16).

Der TUNEL-Assay (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) ist ein Verfahren zur Markierung von DNA-Strangbrüchen [194]. Er basiert auf der spezifischen Erkennung freier 3'-OH-Enden fragmentierter DNA. Auf diese Weise können Zellkerne, die fragmentierte DNA enthalten, in der Fluoreszenzmikroskopie oder Immunhistochemie sichtbar gemacht werden. In unserer Untersuchung zeigten injizierte bzw. transduzierte Netzhautabschnitte keine erhöhte Anzahl TUNEL-positiver Zellen im Vergleich zu außerhalb der Injektionsblase gelegenen Netzhautabschnitten und Netzhäuten gesunder Kontrolltiere (Abb. 17).

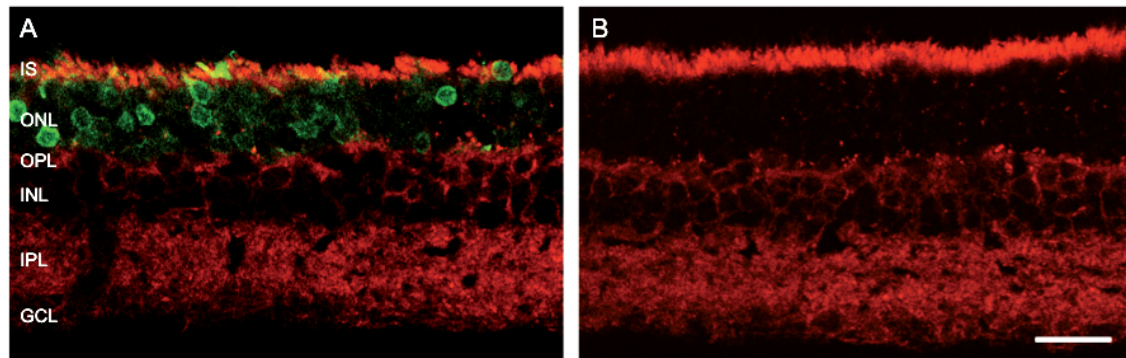


Abbildung 16: Immunfluoreszenzfärbung für AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) in Vertikalschnitten der Ratten-Retina.

(A) Transduzierter Bereich. Die GFP-Fluoreszenz in den Photorezeptoren ist deutlich zu erkennen. **(B)** Benachbarter, nicht-transduzierter Bereich. Der in den Mitochondrien der inneren Photorezeptor-Segmente lokalisierte AIF ist nicht in die Nuclei verlagert, was ein typisches Zeichen für apoptotischen Zelluntergang wäre. IS: innere Segmente der Photorezeptoren, ONL: äußere Körnerschicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, INL: innere Körnerschicht, IPL: innere plexiforme Schicht, GCL: Ganglienzellschicht. Skalenbalken 20µm.

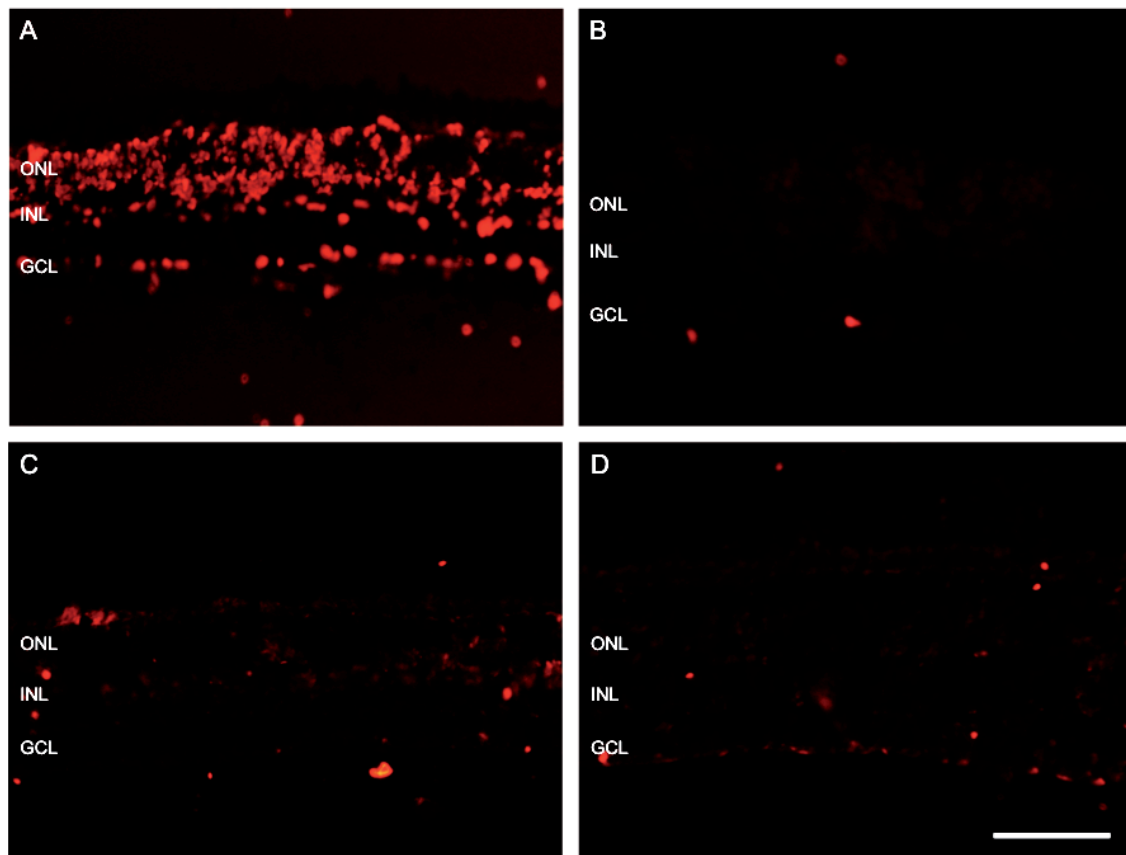


Abbildung 17: TUNEL-Assay.

(A) Positiv-Kontrolle. **(B)** Negativ-Kontrolle. **(C)** Transduzierter Netzhautbereich. **(D)** Netzhaut außerhalb des transduzierten Bereichs. ONL: äußere Körnerschicht, INL: innere Körnerschicht, GCL: Ganglienzellschicht. Skalenbalken in D: 50µm.

4 Diskussion

Die Morphologie der Netzhaut und die Organisation ihrer synaptischen Verschaltungen weisen einen hohen Grad an Plastizität auf und können dynamischen Veränderungen unterworfen sein. Dabei sind die Reaktionsmuster auf unterschiedliche Reize oftmals uniform. Typische dabei zu beobachtende Phänomene sind apoptotischer Zelluntergang von Photorezeptoren, der Verlust synaptischer Verbindungen, die Bildung ektopter Synapsen und reaktive Gliose. Abgesehen von letztgenannter manifestieren sich diese Veränderungen überwiegend in der äußeren Retina, insbesondere der äußeren plexiformen Schicht, also derjenigen Schicht der Netzhaut, in der die Signalübertragung von den Photorezeptoren auf die nachgeschalteten Horizontal- und Bipolarzellen stattfindet. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die subretinale Vektor-Eingabe und die Transgenexpression in den Zellen der Netzhaut zu keinen schwerwiegenden Veränderungen dieser Strukturen führen.

4.1 Morphologie der äußeren plexiformen Schicht

Von einer Netzhautablösung spricht man, wenn es infolge des Eindringens von Flüssigkeit in den Spalt zwischen Photorezeptoraußensegmenten und RPE zur Ablösung der Neuroretina vom RPE und zur Entstehung eines pathologischen subretinalen Raums kommt. Ursächlich sind in der Regel die Ausbildung eines Netzhauttrisses, Glaskörperzug oder die Ansammlung eines pathologischen Exsudats. Dadurch kommt es zu einer räumlichen Trennung der Photorezeptoren von ihrer Blutversorgung durch die Gefäße der Choroidea. Die Folge kann eine erhebliche und oft unwiederbringliche Einschränkung des Sehvermögens sein.

Exzessive Studien mit experimenteller Netzhautablösung bei Mäusen [211, 212] und Katzen (ausführlicher Review: [149]) haben gezeigt, dass es infolge der Abhebung der Neuroretina vom RPE zu einer Reihe von typischen Veränderungen und Umbauprozessen innerhalb der Netzhaut kommt.

Die in dieser Arbeit und im Rahmen der meisten präklinischen und klinischen Gentherapiestudien am Auge angewendete Technik der subretinalen Injektion führt zu einer vorübergehenden Ablösung der Neuroretina vom RPE, die sich jedoch in der Regel innerhalb von maximal 24 Stunden zurückbildet. Während dieser Zeit wird die den viralen Vektor enthaltende Flüssigkeit resorbiert und die umliegenden Zellen werden vom Vektor transduziert.

Da die meisten der oben genannten Veränderungen die Photorezeptoren und die OPL betreffen, haben wir uns in unserer Untersuchung auf diese Regionen beschränkt. Dabei fanden sich keine der zuvor genannten typischen Veränderungen. Die OPL erschien in ihrer

Struktur durchweg geordnet und die Strukturen der prä- und postsynaptischen Zellen stellten sich regelhaft dar: die synaptischen Ribbons zeigten in den Stäbchen die typische hufeisenförmige Konfiguration und waren in Zapfen als streifenförmig angeordnete dicht beieinander liegende Punkte auszumachen. Die Ribbons lagen innerhalb der Plasmamembran und ihnen gegenüber lagen auf postsynaptischer Seite die als feine Knöpfchen den Verästelungen der Bipolar- und Horizontalzellen aufsitzenden dendritischen Auftreibungen. Ultrastrukturell fanden sich normale, triadisch organisierte Invaginationen mit intakt konfiguriertem Proteinband. Insbesondere fanden sich keine Zellausläufer von Bipolar- bzw. Horizontalzellen in der ONL und keine ektopen Synapsen mit Stäbchen-Endknöpfchen. Auch in der Übersicht zeigten die untersuchten Netzhäute keine strukturellen Auffälligkeiten. Wie eingangs bereits ausführlich erläutert, treten die Veränderungen in der retinalen Architektur nach Netzhautablösung in einer typischen und reproduzierbaren zeitlichen Abfolge auf. In Studien, die die Auswirkungen von Netzhautablösungen von wenigen Stunden Dauer bis maximal 24 Stunden untersuchten, zeigten sich an relevanten Veränderungen vor allem eine Reduktion der apikalen Zellfortsätze des retinalen Pigmentepithels, eine Verkürzung der äußeren Photorezeptorsegmente sowie zum Teil eine Dysorganisation zellulärer Organellen im Bereich der inneren Segmente auf ultrastruktureller Ebene [152, 156]. Im Falle einer Wiederanlegung der Netzhaut innerhalb von 24 Stunden zeigen sich diese Veränderungen größtenteils reversibel. Hier zeigt sich insbesondere kein signifikanter Unterschied zwischen Netzhäuten, welche nur eine Stunde lang abgelöst waren bevor die chirurgische Wiederanlegung erfolgte, und solchen, die volle 24 Stunden lang abgelöst waren [153].

Gravierende morphologische Veränderungen wie eine Retraktion von Stäbchen-Endfüßchen verbunden mit dem Aussprossen von Horizontal- und Bipolarzellfortsätzen in die äußere Körnerschicht sind erst bei länger als 24 Stunden (in den gängigen Studien in der Regel 72 Stunden) anhaltenden Netzhautablösungen nachweisbar [148-150, 156]. Der kritische Zeitraum für die Entstehung solcher schwerwiegenden morphologischen Veränderungen scheint somit zwischen 24 und 72 Stunden zu liegen. Dies bestätigt sich in den hier vorgelegten Ergebnissen, da an den von uns untersuchten behandelten Augen mit einer Ablösedauer von weniger als 24 Stunden ebenfalls keine der geschilderten Veränderungen nachweisbar waren. Schließlich lassen auch die bisherigen, erfolgreich verlaufenen Therapiestudien am Mäuse- und Hundemodell, bei denen das Transgen ebenfalls mittels subretinaler Injektion eingebracht wurde, den Schluss zu, dass die kurzfristige durch die subretinale Injektion verursachte Netzhautablösung keine schwerwiegenden Konsequenzen für die retinale Morphologie hat.

4.2 Persistenz der Viruspartikel

Ein weiterer ernstzunehmender Aspekt ist die Beobachtung, dass virale AAV-Vektoren nach erfolgreichem Gentransfer und Expression des Transgens in den Zielzellen als Partikel in der OPL in definierten Strukturen persistieren können [109]. Inwiefern die Persistenz der AAV-Partikel Auswirkungen auf die retinale Morphologie und synaptische Verschaltung haben könnte, ist bislang nicht weiter untersucht worden. Mit den hier verwendeten Methoden konnten für die synaptische Architektur der OPL keine Veränderungen gezeigt werden. Da auch bei verhältnismäßig alten Ratten und ein Jahr post injectionem keine Veränderungen nachweisbar waren, scheinen sich daraus jedenfalls keine gravierenden Effekte zu ergeben. Auch beim mittlerweile über viele Jahre nachuntersuchten Hundemodell sowie im Rahmen der klinischen Studien traten keine schweren Nebenwirkungen entzündlicher oder immunologischer Natur auf [55, 121, 128, 130, 134, 213]. Die Befürchtung, dass die langjährige Persistenz der Viruspartikel zu einer Sensibilisierung des Immunsystems führen könnte, scheint sich ebenfalls nicht zu bestätigen, da eine Vorbehandlung mit AAV-Vektoren einer erneuten Behandlung offenbar nicht entgegensteht [112-114]. Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass die Persistenz viraler Strukturen in den transduzierten Zellen die Eignung und Sicherheit des Verfahrens nicht einschränkt.

4.3 Verstärkte GFAP-Expression als Folge der subretinalen Injektion

Die auffälligste Veränderung, die wir in dieser Studie feststellen konnten, war die deutlich erhöhte GFAP-Expression in den Netzhäuten subretinal injizierter Tiere. Es gibt in der Retina der meisten Spezies nur zwei Zelltypen, die GFAP exprimieren: Astrozyten und Müller-Zellen. Astrozyten exprimieren regelmäßig GFAP [182, 201]. Ihr Vorkommen ist in der Retina auf die Nervenfaserschicht beschränkt, wo sie insbesondere in der Nähe von retinalen Blutgefäßen zu finden sind [22]. Sie sind sowohl am Aufbau der Blut-Netzhaut-Schranke als auch der Membrana limitans interna beteiligt. Müller-Zellen sind die spezialisierten retinalen Gliazellen, die mit ihren radial angeordneten Fortsätzen die gesamte Retina durchziehen. Müller-Zellen exprimieren GFAP im Normalfall nur im Bereich ihrer Endfüßchen, welche den Hauptbestandteil der Membrana limitans interna ausmachen [22, 149, 192]. Bei Mäusen und Ratten werden die Müller-Zellen durch GFAP-Antikörper in der Regel nicht oder nur schwach markiert [184-186].

Wie oben erwähnt, fand sich bei unseren gesunden Kontrolltieren in der Anti-GFAP-Färbung ein gleichmäßiges schmales Fluoreszenzband am innersten Rand der Retina sowie um retinale Blutgefäße herum. Dies korreliert mit dem Verteilungsmuster retinaler Astrozyten sowie der Endfüßchen von Müller-Zellen im Bereich der Membrana limitans interna und

entspricht einem Normalbefund. Anders verhielt es sich bei den subretinal injizierten Netzhäuten. Hier zeigte sich innerhalb des von der Netzhautablösung betroffenen Bereichs ein deutlich gesteigertes Fluoreszenzmuster. Es wurden radial angeordnete, feine Fasern markiert, die sich von der Ganglienzellschicht ausgehend über die gesamte Netzhaut bis zur äußeren Grenzmembran erstreckten. Dies entspricht sehr genau der typischen Morphologie von Müller-Zellen, wie man sie etwa im Anti-S-100-Staining [214, 215] oder mit der Golgi-Imprägnationsmethode findet. Ähnliche Befunde konnten auch nach experimenteller Netzhautablösung [149, 192, 193] und als Reaktion auf Verletzungen der Retina beobachtet werden [186, 187]. Es ist also davon auszugehen, dass die markierten Fasern die Fortsätze von Müller-Zellen sind. Es handelt sich mithin nicht um neue zelluläre Aussprossungen, sondern lediglich um die immunhistochemische Demaskierung der Müller-Zellen, hervorgerufen durch deren vermehrte Expression von GFAP als Reaktion auf die Netzhautablösung. Da sich die gleiche Reaktion sowohl bei den mit GFP-transduzierten als auch bei den lediglich mit einer Fluoreszeinlösung injizierten Tieren zeigte, liegt der Schluss nahe, dass die erhöhte GFAP-Expression eine Folge der durch die subretinale Injektion hervorgerufenen vorübergehenden Netzhautablösung ist und in keinem Zusammenhang mit der AAV-transduzierten GFP-Expression in den Photorezeptoren steht. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von *Lewis et al.*, die am Katzenmodell zeigen konnten, dass es bereits einen Tag nach experimenteller Netzhautablösung zu einer deutlich gesteigerten Expression zytoskelettaler Proteine wie GFAP und Vimentin im Bereich der Müller-Endfüßchen kommt und sich von dort aus in Richtung äußere Retina ausbreitet [149, 192, 193, 216]. Im zeitlichen Verlauf kommt es – bei fortbestehender Netzhautablösung – zu einer Hypertrophie der Müller-Zellen, zu einer starken Verästelung der Müller-Endfüßchen entlang der vitrealen Netzhautoberfläche und bereits ab dem dritten Tag zu einem Eindringen von apikalen Müller-Zellfortsätzen in den subretinalen Raum mit ausgeprägter Narbenbildung [149]. Als Reaktion auf eine erfolgreiche Wiederanlegung der Neuroretina kommt es gewissermaßen zu einer Umkehr der Wachstumsrichtung und zu einer Proliferation der Müller-Endfüßchen in Form feiner Zellbänder und –membranen in den Glaskörperaum [149]. Unklar ist, ob solche Reaktionen auch bei sehr kurz anhaltenden Netzhautablösungen vorkommen. *Fisher et al.* zeigen entsprechende Reaktionen für drei Tage lang abgelöste Netzhäute und 28 Tage nach erfolgreicher chirurgischer Wiederanlegung [149].

Abgesehen von der gesteigerten GFAP-Expression, die bei den subretinal injizierten Tieren teilweise bis zur Membrana limitans externa zu verfolgen war, fanden sich bei den von uns untersuchten Tieren jedoch keine Anzeichen für Wucherungen der Müller-Zellen und die Ausbildung einer Gliose. Weder stellten sich die Müller-Endfüßchen auf der vitrealen Netzhautoberfläche verdickt, vergrößert oder verformt dar, noch konnten wir Aussprossungen der apikalen Müller-Zellfortsätze in den subretinalen Raum beobachten.

Die bereits frühzeitig nachweisbare, verstärkte Expression von Neurofilamenten scheint ein im weitesten Sinne physiologisches Reaktionsmuster zentralnervöser Gliazellen auf alle möglichen Manipulationen zu sein (vgl. [186] m. w. H.). Unsere Ergebnisse zeigen, dass diese Reaktion der Müller-Gliazellen bei sehr kurzfristigen Netzhautablösungen mit rascher Wiederanlegung der Neuroretina an das RPE keine schwerwiegenden Konsequenzen für die retinale Architektur hat. In der Zusammenschau mit den insgesamt sehr positiven Erfahrungen aus den okulären Gentherapiestudien der vergangenen Jahre zeigt dies, dass die rasche Wiederanlegung der Neuroretina nach subretinaler Injektion nicht zur Ausbildung einer reaktiven Gliose im behandelten Netzhautbereich führt.

4.4 Apoptose-Status

Es konnte wiederholt gezeigt werden, dass der Untergang von Photorezeptoren im Rahmen degenerativer Netzhauterkrankungen, lichtinduzierter Netzhautschädigung sowie Netzhautablösungen durch Apoptose bedingt ist [79, 161, 200, 217-219]. Bei Netzhautablösungen kommt es insbesondere in der Frühphase zu einem erhöhten Zelluntergang. Dieser ist bereits nach 24-stündigen Netzhautablösungen nachweisbar, gipfelt nach ca. 3 Tagen und betrifft fast ausschließlich die Photorezeptoren [161]. Obwohl sich die Apoptose-Rate danach drastisch reduziert, ist auch bei 28 Tage und länger währenden Netzhautablösungen ein erhöhter Zelluntergang in der ONL nachweisbar. Insgesamt gehen ca. 20% der Photorezeptoren durch Apoptose zugrunde [149, 153, 161].

Neben der vorübergehenden Netzhautablösung, welche durch die subretinale Injektion hervorgerufen wird, könnte auch die AAV-Transfektion der Photorezeptoren und die Expression des GFP-Transgens zu einem erhöhten Zelluntergang führen. Mehrere Studien haben sich in der Vergangenheit bereits mit der Frage beschäftigt, ob die intrazelluläre GFP-Expression in Photorezeptoren für diese toxisch sei. Dabei wurde in den meisten Studien auch bei hohen intrazellulären Konzentrationen keine Toxizität von GFP auf Photorezeptoren festgestellt [102, 220, 221]. Es gibt jedoch Hinweise, dass GFP bei Primaten toxisch wirken könnte [222].

Zur Beurteilung des Apoptose-Status der transduzierten Netzhäute haben wir einen TUNEL-Assay durchgeführt, um DNA-Doppelstrangbrüche in apoptotischen Zellen zu identifizieren. Zudem wurde die Lokalisation des mitochondrialen AIF mit immunhistochemischen Methoden untersucht.

Der TUNEL-Assay ist aufgrund seiner verhältnismäßig einfachen Durchführbarkeit eines der am weitesten verbreiteten Nachweisverfahren für apoptotischen Zelluntergang. Bei der Interpretation der Ergebnisse dieses Verfahrens ist jedoch Vorsicht geboten. Es existieren in der Literatur diverse Hinweise darauf, dass der TUNEL-Assay nicht mit Sicherheit zwischen

Apoptose, Nekrose und anderen, z. B. autolytischen Formen des Zelluntergangs, unterscheiden kann [223-225]. Auch im Rahmen der Aufbereitung für histologische Schnitte kann das Gewebe derart manipuliert werden, dass falsch positive Ergebnisse im TUNEL-Assay zustande kommen [226]. Goldstandard für die richtige Erkennung und Zuordnung einer apoptotischen Zelle ist daher nach wie vor die Elektronenmikroskopie [196, 202]. Diese ist jedoch zeit- und materialaufwändig und für ein Screening größerer Gewebeproben ungeeignet.

Für eine stichhaltige Aussage darüber, ob in einem Gewebe Apoptose stattfindet oder nicht, sollten mehrere etablierte Verfahren kombiniert werden. Insbesondere in Kombination mit der elektronen- und lichtmikroskopischen Beurteilung der Zellmorphologie erlaubt der TUNEL-Assay eine zuverlässige Beurteilung des Apoptose-Status des untersuchten Gewebes [196].

Unsere Daten weisen für die GFP-transduzierten Netzhautbereiche bei subretinal injizierten Ratten einen Monat p. i. im TUNEL-Labeling keine erhöhte Anzahl von TUNEL-positiven Zellen im Vergleich zu Netzhäuten von Kontrolltieren nach. Auch eine intrazelluläre Dislokation von AIF, einem Effektormolekül des Caspase-unabhängigen Apoptosewegs, konnte nicht festgestellt werden. In der Zusammenschau mit der licht- und elektronenmikroskopischen Beurteilung der Zellmorphologie und der Schichtdicke der ONL, die als ungefähres Maß für die Anzahl der Stäbchen angenommen werden kann, konnte daher ein vermehrter apoptotischer Zelluntergang sowohl bei den mit Fluoreszein subretinal injizierten als auch bei den GFP-transduzierten Tieren ausgeschlossen werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von *Lewis et al.*, die zeigen konnten, dass Retinae, die eine Stunde bzw. 24 Stunden abgelöst waren, bevor sie chirurgisch wieder angelegt wurden, sich weder hinsichtlich der Anzahl der Photorezeptorkerne noch hinsichtlich der Anzahl apoptotischer Nuclei signifikant von unbehandelten Retinae unterschieden [153].

4.5 Schlussfolgerungen

Mit den beschriebenen Methoden konnten wir weder in Ratten, denen eine Fluoreszein-Lösung subretinal injiziert wurde, noch in Ratten, denen der AAV2/5.CMV.d2GFP-Vektor subretinal eingegeben wurde, histologische Veränderungen in der Architektur der OPL feststellen. Die Anzahl der Synapsen in der OPL wich nicht von derjenigen aus unbehandelten Kontrolltieren ab. Eine gesteigerte Apoptoserate retinaler Zellen findet sich ebenfalls nicht. Obwohl die durch die subretinale Injektion verursachte vorübergehende Netzhautablösung zu einer verstärkten GFAP-Expression in den Müller-Zellen führt, fanden sich keine Anzeichen für eine schwerere Gliose.

Die subretinale Injektion, der AAV-vermittelte Gentransfer und die Expression des GFP-Transgens in den Photorezeptoren führen zu keinerlei schwerwiegenden morphologischen Veränderungen der Netzhaut. Es handelt sich somit um einen sicheren und effizienten Weg zur Einbringung eines Transgens in Zellen der äußeren Retina. Eine vergleichbare Untersuchung am Hundemodell wäre wünschenswert, um die Sicherheit des Verfahrens weiter zu untermauern. Bestätigten sich darin unsere Ergebnisse, wäre es als unwahrscheinlich anzusehen, dass die menschliche Retina wesentlich anders auf den Eingriff reagiert. Die Ursache für das Ausbleiben eines signifikanten Therapieerfolgs und insbesondere einer ERG-Wiederherstellung bei menschlichen Patienten bedarf somit weiterer Klärung. Dass ein komplexer Umbau oder eine Verringerung synaptischer Kontakte in der Retina dafür ursächlich sein könnte, erscheint nach den hier vorgelegten Ergebnissen eher unwahrscheinlich. Denkbar wäre eine veränderte Expression intrazellulärer Proteine. Zu einer solchen kam es aber im Tiermodell regelmäßig erst nach Netzhautablösungen von drei Tagen und länger. Zudem würde sich diese auch in einer verminderten Anfärbbarkeit mit immunologischen Markern und einem veränderten Verteilungsmuster selbiger niederschlagen, ein Effekt, der hier nicht beobachtet werden konnte. Ein nicht zu unterschätzender Aspekt ist sicherlich das Alter zum Zeitpunkt der Therapie. Es ist anzunehmen, dass ein relevanter Therapieerfolg nur in einem sehr frühen Krankheitsstadium zu erwarten ist, da es mit zunehmendem Voranschreiten degenerativer Erkrankungen zu sekundären Veränderungen der Retina (und nachgeschalteter visueller Zentren) kommt, die höchstwahrscheinlich durch Ersatz des defekten Gens nicht oder nur zum Teil reversibel sind.

4.6 Limitationen

Die statistische Aussagekraft der vorliegenden Studie ist durch die kleine Anzahl an Versuchstieren naturgemäß begrenzt. Im Vordergrund stand hier jedoch die morphologische Analyse möglicher Veränderungen in der retinalen Architektur. Die vielen bekannten Studien zu degenerativen retinalen Erkrankungen und Netzhautablösungen im Tiermodell haben gezeigt, dass diesbezüglich in der Regel entweder deutliche Veränderungen oder aber keine relevanten Veränderungen zu erwarten sind. Es wurden zudem repräsentative und vielfach getestete molekulare Marker verwendet, mit denen die in der Literatur vorbeschriebenen Veränderungen in der Regel zuverlässig erfasst werden können. Dass relevante morphologische Veränderungen aufgrund der kleinen Anzahl untersuchter Tiere nicht detektiert wurden, ist daher als unwahrscheinlich anzunehmen.

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse ist zudem dadurch eingeschränkt, dass hier am gesunden Modell gearbeitet wurde. Dadurch wurden zwar Interferenzen mit dem natürlichen

Krankheitsverlauf folgenden degenerativen Veränderungen der Netzhaut ausgeschlossen, es ist aber auch denkbar, dass erkrankte Netzhäute anders auf durch die subretinale Injektion verursachte Änderungen reagieren. Schließlich wurde hier an der Stäbchen-dominierten Retina von Ratten gearbeitet. Auf eine selektive Darstellung der Zapfen wurde verzichtet, unter anderem, weil diese in der Regel keine ebenso auffälligen Veränderungen auf Netzhautablösungen zeigen wie die Stäbchen. Selbstverständlich ist dadurch eine Übertragung der Ergebnisse insbesondere auf die im zentralen Bereich sehr stark Zapfen-dominierten Retinae von Primaten und Menschen nur eingeschränkt möglich.

5 Zusammenfassung

Ziel: Beurteilung der Effekte der subretinalen Injektion, des AAV-vermittelten Gentransfers und der GFP-Expression in Photorezeptoren auf die Morphologie der Retina und den Apoptose-Status retinaler Zellen in Ratten, denen entweder eine Fluoreszein-Lösung oder ein AAV2/5-Vektor mit dem GFP-Gen unter einem CMV-Promoter subretinal injiziert wurde.

Methoden: Untersuchung der Morphologie der äußeren Körnerschicht mittels immunocytochemischer Markierung zellulärer Zielstrukturen und konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie sowie Transmissionselektronenmikroskopie; Quantifikation der Synapsen in der OPL; Beurteilung des Gliose-Status; TUNEL-Assay.

Ergebnisse: Trotz der hohen Plastizität synaptischer Strukturen vor allem in der äußeren plexiformen Schicht, die auf verschiedentlich verursachte Degenerationen und Verletzungen mit typischen Reaktionsmustern, wie Verkürzung und Rückzug der Stäbchen-Endknöpfchen, Aussprossungen dendritischer Fortsätze von Horizontal- und Bipolarzellen sowie Bildung ektopter Synapsen reagieren, konnten in dieser Studie keine histologischen Veränderungen festgestellt werden. Sowohl bei Fluoreszein-injizierten als auch bei GFP-transduzierten Retinae zeigte sich die äußere plexiforme Schicht strukturell normal organisiert und es fanden sich keine Anzeichen für eine Verkürzung und einen Rückzug der Stäbchen-Terminalien. Horizontal- und Stäbchen-Bipolarzellen wiesen keinen Verlust dendritischer Endigungen auf und insbesondere zeigten sich keine Aussprossungen von Zellfortsätzen in die äußere Körnerschicht. Auch auf ultrastruktureller Ebene zeigten sich Zapfen-Füßchen und Stäbchen-Terminalien unverändert. Die Anzahl synaptischer Kontakte zwischen Stäbchen und Stäbchen-Bipolarzellen war nicht reduziert. Obwohl die durch die subretinale Injektion verursachte vorübergehende Netzhautablösung zu einer verstärkten GFAP-Expression in den Müller-Zellen führt, fanden sich keine Anzeichen für eine schwerere Gliose. In behandelten Netzhäuten tritt kein vermehrter Zelltod durch Apoptose auf.

Schlussfolgerungen: Der AAV-vermittelte Gentransfer und die Expression des GFP-Transgens in den Photorezeptoren führen weder zu morphologischen Veränderungen der Netzhaut noch zu einer erhöhten Apoptoserate. Es handelt sich somit um einen sicheren und effizienten Weg zur Einbringung eines Transgens in Zellen der äußeren Retina.

6 Summary

Purpose: To determine the effects of vector-delivery via subretinal injection, AAV-mediated gene-transfer to photoreceptors and GFP-expression within photoreceptors on retinal morphology and apoptotic status of retinal cells in rats that underwent subretinal injection of either fluorescein or an AAV2/5 vector containing the GFP-gene under control of a CMV promoter.

Methods: Assessment of outer-plexiform-layer morphology by means of immunocytochemical labeling and laser scanning confocal microscopy as well as electron microscopy; quantification of OPL synapses; assessment of retinal gliosis; TUNEL-Assay.

Results: In spite of the high plasticity of the retinal circuitry especially within the outer plexiform layer, where rod spherule retraction, dendritic sprouting and the formation of ectopic synapses between photoreceptors and second order neurons have been shown to be common responses to different types of retinal degeneration and retinal injury, no histologic abnormalities have been found in our study. The outer plexiform layers in both fluorescein-injected and GFP-transduced retinae showed a normal architecture and there were no signs of rod spherule retraction. No dendritic pruning was found in rod bipolar or horizontal cells and particularly no sprouting of second order neurite processes into the outer nuclear layer could be observed. Both rod spherules and cone pedicles and their respective invaginating and flat synaptic contacts seemed unaltered on an ultrastructural level. The overall number of synaptic contacts between rods and rod bipolar cells did not appear to be reduced. Although the temporary retinal detachment caused by the subretinal injection results in an upregulation of glial fibrillary acidic protein expression within retinal Müller cells, there were no signs of more severe forms of gliosis. There is no increase in apoptotic cell death within treated retinae.

Conclusions: AAV-mediated transgene delivery via subretinal injection and expression of GFP as a transgene in photoreceptors do not inflict significant changes on retinal morphology nor do they lead to increased rates of apoptotic cell death. It seems therefore to be a safe and efficacious way for transgene delivery to outer retinal cells.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Retina.....	3
Abbildung 2: Ribbonsynapsen der Retina.....	5
Abbildung 3: Synaptisches Ribbon und assoziierte Proteine.....	7
Abbildung 4: Retinolzyklus.....	13
Abbildung 5: Technik der subretinalen Injektion.....	28
Abbildung 6: In-vivo Fundusaufnahmen transduzierter Rattenaugen.....	42
Abbildung 7: Netzhaut-Skizze und Vertikalschnitt mit Übergangszone zum GFP- transduzierten Bereich.....	43
Abbildung 8: Äußere plexiforme Schicht (OPL) der Ratten-Retina mit Färbung für CtBP2 (synaptische Ribbons in den Photorezeptor- Terminalien) und CaBP (Horizontalzellen) 1 Monat p.i.....	44
Abbildung 9: Äußere plexiforme Schicht (OPL) der Ratten-Retina mit Färbung für DHP und PKC.....	46
Abbildung 10: OPL der Ratten-Retina mit Immunfärbung für PSD95 und CaBP.....	47
Abbildung 11: Elektronenmikroskopische Aufnahmen aus der OPL GFP- transduzierter (linke Spalte: A, C) und nicht-transduzierter (rechte Spalte: B, D) Ratten.....	49
Abbildung 12: Vertikalschnitte durch die Ratten-Retina mit Immunfärbung für CtBP2 und CaBP 12 Monate p.i.....	50
Abbildung 13: Quantifizierung der Ribbon-Synapsen in der OPL.....	51
Abbildung 14: OPL einer nicht-transduzierten Ratten-Retina mit Immunfärbung für CtBP2 und DHP.....	52
Abbildung 15: Ratten-Retinae mit Immunfärbung für GFAP (Müller-Zellen).....	53
Abbildung 16: Immunfluoreszenzfärbung für AIF (<i>Apoptosis Inducing Factor</i>) in Vertikalschnitten der Ratten-Retina.....	55
Abbildung 17: TUNEL-Assay.....	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zellulärer Tropismus verschiedener AAV-Serotypen.....	17
Tabelle 2: Tiermodelle RPE65-Gendefekt.....	18
Tabelle 3: Klinische Studien RPE65-Gendefekt.....	20
Tabelle 4: Liste der Versuchstiere, injizierte Volumina und Vektor-Titer.....	26
Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper.....	37
Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper.....	37

Literaturverzeichnis

1. Kolb, H., *Gross Anatomy of the Eye*, in *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet]*, F.E. Kolb H, Nelson R, Editor. 1995, University of Utah Health Science Center: Salt Lake City.
2. Kolb, H., *Simple Anatomy of the Retina*, in *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet]*, F.E. Kolb H, Nelson R, Editor. 1995, University of Utah Health Science Center: Salt Lake City.
3. Welsch, U., *Sobotta Lehrbuch Histologie*. 3. Aufl.. ed. 2010, München: Urban & Fischer in Elsevier.
4. Strauss, O., *The retinal pigment epithelium in visual function*. *Physiol Rev*, 2005. **85**(3): p. 845-81.
5. Kolb, H., *How the retina works - Much of the construction of an image takes place in the retina itself through the use of specialized neural circuits*. *American Scientist*, 2003. **91**(1): p. 28-35.
6. Preising, M.N. and B. Lorenz, *[Genetic diseases of the retinal pigment epithelium]*. *Ophthalmologie*, 2009. **106**(4): p. 311-9.
7. Cajal, S.R.Y., *La rétine des vertébrés*. *Cellule*, 1893(9): p. 119-257.
8. Stryer, L., *Visual excitation and recovery*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(17): p. 10711-4.
9. Yau, K.W., *Phototransduction mechanism in retinal rods and cones*. *The Friedenwald Lecture*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994. **35**(1): p. 9-32.
10. Fu, Y., *Phototransduction in Rods and Cones*, in *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet]*, F.E. Kolb H, Nelson R, Editor. 1995, University of Utah Health Science Center: Salt Lake City.
11. Kolb, H., *Photoreceptors*, in *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet]*, F.E. Kolb H, Nelson R, Editor. 1995, University of Utah Health Science Center: Salt Lake City.
12. Gouras, P., *Color Vision*, in *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet]*, F.E. Kolb H, Nelson R, Editor. 1995, University of Utah Health Science Center: Salt Lake City.
13. Kolb, H., *Outer Plexiform Layer*, in *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet]*, F.E. Kolb H, Nelson R, Editor. 1995, University of Utah Health Science Center: Salt Lake City.
14. Perlman, I., H. Kolb, and R. Nelson, *S-Potentials and Horizontal Cells*, in *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet]*, F.E. Kolb H, Nelson R, Editor. 1995, University of Utah Health Science Center: Salt Lake City.

15. Wässle, H., *Decomposing a Cone's Output (Parallel Processing)*, in *The Senses: A Comprehensive Reference*, I.B. Volume Editors: Allan, et al., Editors. 2008, Academic Press: New York. p. 313-339.
16. Kolb, H., *Inner Plexiform Layer*, in *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet]*, F.E. Kolb H, Nelson R, Editor. 1995, University of Utah Health Science Center: Salt Lake City.
17. Nelson, R. and V. Connaughton, *Bipolar Cell Pathways in the Vertebrate Retina*, in *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet]*, F.E. Kolb H, Nelson R, Editor. 1995, University of Utah Health Science Center: Salt Lake City.
18. Haverkamp, S., et al., *Immunocytochemical description of five bipolar cell types of the mouse retina*. J Comp Neurol, 2003. **455**(4): p. 463-76.
19. Ghosh, K.K., et al., *Types of bipolar cells in the mouse retina*. J Comp Neurol, 2004. **469**(1): p. 70-82.
20. Euler, T., et al., *Retinal bipolar cells: elementary building blocks of vision*. Nat Rev Neurosci, 2014. **15**(8): p. 507-19.
21. Dowling, J.E., *The retina: an approachable part of the brain*. 1987, Cambridge, Mass: Harvard University Press.
22. Kolb, H., *Glial Cells of the Retina*, in *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet]*, F.E. Kolb H, Nelson R, Editor. 1995, University of Utah Health Science Center: Salt Lake City.
23. tom Dieck, S. and J.H. Brandstatter, *Ribbon synapses of the retina*. Cell Tissue Res, 2006. **326**(2): p. 339-46.
24. Wässle, H., *Parallel processing in the mammalian retina*. Nat Rev Neurosci, 2004. **5**(10): p. 747-57.
25. Haverkamp, S., U. Grunert, and H. Wassle, *The cone pedicle, a complex synapse in the retina*. Neuron, 2000. **27**(1): p. 85-95.
26. Schmitz, F., *The making of synaptic ribbons: how they are built and what they do*. Neuroscientist, 2009. **15**(6): p. 611-24.
27. Zanazzi, G. and G. Matthews, *The molecular architecture of ribbon presynaptic terminals*. Mol Neurobiol, 2009. **39**(2): p. 130-48.
28. Rao-Mirotnik, R., et al., *Mammalian rod terminal: architecture of a binary synapse*. Neuron, 1995. **14**(3): p. 561-9.
29. Lenzi, D. and H. von Gersdorff, *Structure suggests function: the case for synaptic ribbons as exocytotic nanomachines*. Bioessays, 2001. **23**(9): p. 831-40.
30. tom Dieck, S., et al., *Molecular dissection of the photoreceptor ribbon synapse: physical interaction of Bassoon and RIBEYE is essential for the assembly of the ribbon complex*. J Cell Biol, 2005. **168**(5): p. 825-36.
31. Schmitz, F., A. Konigstorfer, and T.C. Sudhof, *RIBEYE, a component of synaptic ribbons: a protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function*. Neuron, 2000. **28**(3): p. 857-72.

32. Dick, O., et al., *The presynaptic active zone protein bassoon is essential for photoreceptor ribbon synapse formation in the retina*. Neuron, 2003. **37**(5): p. 775-86.
33. Schneeweis, D.M. and J.L. Schnapf, *Photovoltage of rods and cones in the macaque retina*. Science, 1995. **268**(5213): p. 1053-6.
34. Schmitz, Y. and P. Witkovsky, *Dependence of photoreceptor glutamate release on a dihydropyridine-sensitive calcium channel*. Neuroscience, 1997. **78**(4): p. 1209-16.
35. Schneeweis, D.M. and J.L. Schnapf, *The photovoltage of macaque cone photoreceptors: adaptation, noise, and kinetics*. J Neurosci, 1999. **19**(4): p. 1203-16.
36. Parsons, T.D. and P. Sterling, *Synaptic ribbon. Conveyor belt or safety belt?* Neuron, 2003. **37**(3): p. 379-82.
37. Sterling, P. and G. Matthews, *Structure and function of ribbon synapses*. Trends Neurosci, 2005. **28**(1): p. 20-9.
38. Heidelberger, R., W.B. Thoreson, and P. Witkovsky, *Synaptic transmission at retinal ribbon synapses*. Prog Retin Eye Res, 2005. **24**(6): p. 682-720.
39. Pelassa, I. and L. Lagnado, *Synaptic ribbons: machines for priming vesicle release?* Curr Biol, 2011. **21**(19): p. R819-21.
40. Gray, E.G. and H.L. Pease, *On understanding the organisation of the retinal receptor synapses*. Brain Res, 1971. **35**(1): p. 1-15.
41. Muresan, V., A. Lyass, and B.J. Schnapp, *The kinesin motor KIF3A is a component of the presynaptic ribbon in vertebrate photoreceptors*. J Neurosci, 1999. **19**(3): p. 1027-37.
42. Missotten, L., *The ultrastructure of the human retina*. 1965, Brussels: Editions Arscia S.A.
43. Söhl, G., S. Maxeiner, and K. Willecke, *Expression and functions of neuronal gap junctions*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(3): p. 191-200.
44. Puller, C. and S. Haverkamp, *Die synaptische Architektur des Zapfen-Endfüßchens*. Neuroforum, 2009(4).
45. Kolb, H., *Organization of Outer Plexiform Layer of Primate Retina - Electron Microscopy of Golgi-Impregnated Cells*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences, 1970. **258**(823): p. 261-&.
46. Raviola, E. and N.B. Gilula, *Intramembrane organization of specialized contacts in the outer plexiform layer of the retina. A freeze-fracture study in monkeys and rabbits*. J Cell Biol, 1975. **65**(1): p. 192-222.
47. Wässle, H., et al., *The rod bipolar cell of the mammalian retina*. Vis Neurosci, 1991. **7**(1-2): p. 99-112.
48. Boycott, B.B. and H. Wässle, *Morphological Classification of Bipolar Cells of the Primate Retina*. Eur J Neurosci, 1991. **3**(11): p. 1069-1088.
49. Euler, T. and H. Wässle, *Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina*. J Comp Neurol, 1995. **361**(3): p. 461-78.

50. Werblin, F.S. and J.E. Dowling, *Organization of the retina of the mudpuppy, Necturus maculosus. II. Intracellular recording*. J Neurophysiol, 1969. **32**(3): p. 339-55.
51. Polyak, S.L., *The Retina*. 1941, Chicago: University of Chicago Press.
52. Haverkamp, S. and H. Wassle, *Immunocytochemical analysis of the mouse retina*. J Comp Neurol, 2000. **424**(1): p. 1-23.
53. Haverkamp, S., et al., *The primordial, blue-cone color system of the mouse retina*. J Neurosci, 2005. **25**(22): p. 5438-45.
54. Peichl, L. and J. Gonzalez-Soriano, *Morphological types of horizontal cell in rodent retinae: a comparison of rat, mouse, gerbil, and guinea pig*. Vis Neurosci, 1994. **11**(3): p. 501-17.
55. Le Meur, G., et al., *Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium*. Gene Ther, 2007. **14**(4): p. 292-303.
56. Kanski, J.J. and A. Burk. *Klinische Ophthalmologie Lehrbuch und Atlas*. 2008; 6., aktualisierte und erw. Aufl.[VII, 974 S.].
57. den Hollander, A.I., et al., *Lighting a candle in the dark: advances in genetics and gene therapy of recessive retinal dystrophies*. J Clin Invest, 2010. **120**(9): p. 3042-53.
58. Lorenz, B., M. Preising, and K. Stieger, *Retinal blinding disorders and gene therapy--molecular and clinical aspects*. Curr Gene Ther, 2010. **10**(5): p. 350-70.
59. Preising, M.N., K. Stieger, and B. Lorenz, *[Inherited ophthalmological disorders. Part 1: Genetic fundamentals and phenotypes]*. Klin Monbl Augenheilkd, 2014. **231**(2): p. 177-89; quiz 190-1.
60. Ferrari, S., et al., *Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms*. Curr Genomics, 2011. **12**(4): p. 238-49.
61. Hartong, D.T., E.L. Berson, and T.P. Dryja, *Retinitis pigmentosa*. Lancet, 2006. **368**(9549): p. 1795-809.
62. Lorenz, B., et al., *Early-onset severe rod-cone dystrophy in young children with RPE65 mutations*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(9): p. 2735-42.
63. Gu, S.M., et al., *Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy*. Nat Genet, 1997. **17**(2): p. 194-7.
64. Hanein, S., et al., *Leber congenital amaurosis: survey of the genetic heterogeneity, refinement of the clinical definition and phenotype-genotype correlations as a strategy for molecular diagnosis. Clinical and molecular survey in LCA*. Adv Exp Med Biol, 2006. **572**: p. 15-20.
65. Marlhens, F., et al., *Mutations in RPE65 cause Leber's congenital amaurosis*. Nat Genet, 1997. **17**(2): p. 139-41.
66. Morimura, H., et al., *Mutations in the RPE65 gene in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa or leber congenital amaurosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 3088-93.

67. Perrault, I., et al., *Evidence of autosomal dominant Leber congenital amaurosis (LCA) underlain by a CRX heterozygous null allele*. J Med Genet, 2003. **40**(7): p. e90.
68. Perrault, I., et al., *A novel mutation in the GUCY2D gene responsible for an early onset severe RP different from the usual GUCY2D-LCA phenotype*. Hum Mutat, 2005. **25**(2): p. 222.
69. Preising, M.N., et al., *[Genetic and clinical heterogeneity in LCA patients. The end of uniformity]*. Ophthalmologe, 2007. **104**(6): p. 490-8.
70. Hamel, C.P., et al., *Molecular cloning and expression of RPE65, a novel retinal pigment epithelium-specific microsomal protein that is post-transcriptionally regulated in vitro*. J Biol Chem, 1993. **268**(21): p. 15751-7.
71. Redmond, T.M., et al., *Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle*. Nat Genet, 1998. **20**(4): p. 344-51.
72. Jin, M., et al., *Rpe65 is the retinoid isomerase in bovine retinal pigment epithelium*. Cell, 2005. **122**(3): p. 449-59.
73. Moiseyev, G., et al., *RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(35): p. 12413-8.
74. Pang, J.J., et al., *Retinal degeneration 12 (rd12): a new, spontaneously arising mouse model for human Leber congenital amaurosis (LCA)*. Mol Vis, 2005. **11**: p. 152-62.
75. Wrigstad, A., S.E. Nilsson, and K. Narfstrom, *Ultrastructural changes of the retina and the retinal pigment epithelium in Briard dogs with hereditary congenital night blindness and partial day blindness*. Exp Eye Res, 1992. **55**(6): p. 805-18.
76. Cideciyan, A.V., *Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations and its treatment with gene therapy*. Prog Retin Eye Res, 2010. **29**(5): p. 398-427.
77. Woodruff, M.L., et al., *Spontaneous activity of opsin apoprotein is a cause of Leber congenital amaurosis*. Nat Genet, 2003. **35**(2): p. 158-64.
78. Zhang, T., et al., *Cone opsin determines the time course of cone photoreceptor degeneration in Leber congenital amaurosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(21): p. 8879-84.
79. Hamann, S., D.F. Schorderet, and S. Cottet, *Bax-induced apoptosis in Leber's congenital amaurosis: a dual role in rod and cone degeneration*. PLoS One, 2009. **4**(8): p. e6616.
80. Lorenz, B., et al., *Lack of fundus autofluorescence to 488 nanometers from childhood on in patients with early-onset severe retinal dystrophy associated with mutations in RPE65*. Ophthalmology, 2004. **111**(8): p. 1585-94.
81. Samardzija, M., et al., *R91W mutation in Rpe65 leads to milder early-onset retinal dystrophy due to the generation of low levels of 11-cis-retinal*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(2): p. 281-92.
82. Narfstrom, K., A. Wrigstad, and S.E. Nilsson, *The Briard dog: a new animal model of congenital stationary night blindness*. Br J Ophthalmol, 1989. **73**(9): p. 750-6.

83. Veske, A., et al., *Retinal dystrophy of Swedish briard/briard-beagle dogs is due to a 4-bp deletion in RPE65*. Genomics, 1999. **57**(1): p. 57-61.
84. Aguirre, G.D., et al., *Congenital stationary night blindness in the dog: common mutation in the RPE65 gene indicates founder effect*. Mol Vis, 1998. **4**: p. 23.
85. Wrigstad, A., K. Narfstrom, and S.E. Nilsson, *Slowly progressive changes of the retina and retinal pigment epithelium in Briard dogs with hereditary retinal dystrophy. A morphological study*. Doc Ophthalmol, 1994. **87**(4): p. 337-54.
86. Hernandez, M., et al., *Altered expression of retinal molecular markers in the canine RPE65 model of Leber congenital amaurosis*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010. **51**(12): p. 6793-802.
87. Stieger, K. and B. Lorenz, *[The treatment of inherited dystrophies and neovascular disorders of the retina by rAAV-mediated gene therapy]*. Klin Monbl Augenheilkd, 2008. **225**(12): p. 1009-23.
88. Auricchio, A. and F. Rolling, *Adeno-associated viral vectors for retinal gene transfer and treatment of retinal diseases*. Curr Gene Ther, 2005. **5**(3): p. 339-48.
89. Rolling, F., *Recombinant AAV-mediated gene transfer to the retina: gene therapy perspectives*. Gene Ther, 2004. **11 Suppl 1**: p. S26-32.
90. Warrington, K.H., Jr. and R.W. Herzog, *Treatment of human disease by adeno-associated viral gene transfer*. Hum Genet, 2006. **119**(6): p. 571-603.
91. Schnepf, B.C., et al., *Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle*. J Virol, 2003. **77**(6): p. 3495-504.
92. Willett, K. and J. Bennett, *Immunology of AAV-Mediated Gene Transfer in the Eye*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 261.
93. Atchison, R.W., B.C. Casto, and W.M. Hammon, *Adenovirus-Associated Defective Virus Particles*. Science, 1965. **149**(3685): p. 754-6.
94. Srivastava, A., E.W. Lusby, and K.I. Berns, *Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome*. J Virol, 1983. **45**(2): p. 555-64.
95. Lusby, E., K.H. Fife, and K.I. Berns, *Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA*. J Virol, 1980. **34**(2): p. 402-9.
96. Rabinowitz, J.E., et al., *Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity*. J Virol, 2002. **76**(2): p. 791-801.
97. Stieger, K., et al., *Adeno-associated virus mediated gene therapy for retinal degenerative diseases*. Methods Mol Biol, 2011. **807**: p. 179-218.
98. Ali, R.R., et al., *Gene transfer into the mouse retina mediated by an adeno-associated viral vector*. Hum Mol Genet, 1996. **5**(5): p. 591-4.
99. Allocca, M., et al., *Novel adeno-associated virus serotypes efficiently transduce murine photoreceptors*. J Virol, 2007. **81**(20): p. 11372-80.

100. Auricchio, A., et al., *Exchange of surface proteins impacts on viral vector cellular specificity and transduction characteristics: the retina as a model*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(26): p. 3075-81.
101. Bennett, J., et al., *Real-time, noninvasive in vivo assessment of adeno-associated virus-mediated retinal transduction*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997. **38**(13): p. 2857-63.
102. Bennett, J., et al., *Stable transgene expression in rod photoreceptors after recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer to monkey retina*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(17): p. 9920-5.
103. Lotery, A.J., et al., *Adeno-associated virus type 5: transduction efficiency and cell-type specificity in the primate retina*. Hum Gene Ther, 2003. **14**(17): p. 1663-71.
104. Natkunarajah, M., et al., *Assessment of ocular transduction using single-stranded and self-complementary recombinant adeno-associated virus serotype 2/8*. Gene Ther, 2008. **15**(6): p. 463-7.
105. Petrs-Silva, H., et al., *Novel properties of tyrosine-mutant AAV2 vectors in the mouse retina*. Mol Ther, 2011. **19**(2): p. 293-301.
106. Surace, E.M., et al., *Delivery of adeno-associated virus vectors to the fetal retina: impact of viral capsid proteins on retinal neuronal progenitor transduction*. J Virol, 2003. **77**(14): p. 7957-63.
107. Weber, M., et al., *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*. Mol Ther, 2003. **7**(6): p. 774-81.
108. Yang, G.S., et al., *Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size*. J Virol, 2002. **76**(15): p. 7651-60.
109. Stieger, K., et al., *Detection of intact rAAV particles up to 6 years after successful gene transfer in the retina of dogs and primates*. Mol Ther, 2009. **17**(3): p. 516-23.
110. Jacobson, S.G., et al., *Safety of recombinant adeno-associated virus type 2-RPE65 vector delivered by ocular subretinal injection*. Mol Ther, 2006. **13**(6): p. 1074-84.
111. Le Meur, G., et al., *Postsurgical assessment and long-term safety of recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer into the retinas of dogs and primates*. Arch Ophthalmol, 2005. **123**(4): p. 500-6.
112. Amado, D., et al., *Safety and efficacy of subretinal readministration of a viral vector in large animals to treat congenital blindness*. Sci Transl Med, 2010. **2**(21): p. 21ra16.
113. Annear, M.J., et al., *Gene therapy in the second eye of RPE65-deficient dogs improves retinal function*. Gene Ther, 2011. **18**(1): p. 53-61.
114. Bennett, J., et al., *AAV2 Gene Therapy Readministration in Three Adults with Congenital Blindness*. Sci Transl Med, 2012. **4**(120): p. 120ra15.
115. Li, W., et al., *Gene therapy following subretinal AAV5 vector delivery is not affected by a previous intravitreal AAV5 vector administration in the partner eye*. Mol Vis, 2009. **15**: p. 267-75.

116. Provost, N., et al., *Biodistribution of rAAV vectors following intraocular administration: evidence for the presence and persistence of vector DNA in the optic nerve and in the brain*. Mol Ther, 2005. **11**(2): p. 275-83.
117. Stieger, K., et al., *Subretinal delivery of recombinant AAV serotype 8 vector in dogs results in gene transfer to neurons in the brain*. Mol Ther, 2008. **16**(5): p. 916-23.
118. Dejneka, N.S., et al., *In utero gene therapy rescues vision in a murine model of congenital blindness*. Mol Ther, 2004. **9**(2): p. 182-8.
119. Lai, C.M., et al., *Recombinant adeno-associated virus type 2-mediated gene delivery into the Rpe65-/- knockout mouse eye results in limited rescue*. Genet Vaccines Ther, 2004. **2**(1): p. 3.
120. Van Hooser, J.P., et al., *Recovery of visual functions in a mouse model of Leber congenital amaurosis*. J Biol Chem, 2002. **277**(21): p. 19173-82.
121. Pang, J.J., et al., *Gene therapy restores vision-dependent behavior as well as retinal structure and function in a mouse model of RPE65 Leber congenital amaurosis*. Mol Ther, 2006. **13**(3): p. 565-72.
122. Acland, G.M., et al., *Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness*. Nat Genet, 2001. **28**(1): p. 92-5.
123. Narfstrom, K., et al., *Functional and structural recovery of the retina after gene therapy in the RPE65 null mutation dog*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003. **44**(4): p. 1663-72.
124. Acland, G.M., et al., *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*. Mol Ther, 2005. **12**(6): p. 1072-82.
125. Narfstrom, K., et al., *Assessment of structure and function over a 3-year period after gene transfer in RPE65-/- dogs*. Doc Ophthalmol, 2005. **111**(1): p. 39-48.
126. Annear, M.J., et al., *Successful gene therapy in older Rpe65-deficient dogs following subretinal injection of an adeno-associated vector expressing RPE65*. Hum Gene Ther, 2013. **24**(10): p. 883-93.
127. Rakoczy, E.P. and K. Narfstrom, *Gene therapy for eye as regenerative medicine? Lessons from RPE65 gene therapy for Leber's Congenital Amaurosis*. Int J Biochem Cell Biol, 2014. **56**: p. 153-7.
128. Stieger, K., C. Chauveau, and F. Rolling, *Preclinical studies on specific gene therapy for recessive retinal degenerative diseases*. Curr Gene Ther, 2010. **10**(5): p. 389-403.
129. Bainbridge, J.W., et al., *Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis*. N Engl J Med, 2008. **358**(21): p. 2231-9.
130. Maguire, A.M., et al., *Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis*. N Engl J Med, 2008. **358**(21): p. 2240-8.
131. Cideciyan, A.V., et al., *Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(39): p. 15112-7.

132. Hauswirth, W.W., et al., *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*. Hum Gene Ther, 2008. **19**(10): p. 979-90.
133. Cideciyan, A.V., et al., *Human RPE65 gene therapy for Leber congenital amaurosis: persistence of early visual improvements and safety at 1 year*. Hum Gene Ther, 2009. **20**(9): p. 999-1004.
134. Simonelli, F., et al., *Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration*. Mol Ther, 2010. **18**(3): p. 643-50.
135. Maguire, A.M., et al., *Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial*. Lancet, 2009. **374**(9701): p. 1597-605.
136. Cideciyan, A.V., et al., *Vision 1 year after gene therapy for Leber's congenital amaurosis*. N Engl J Med, 2009. **361**(7): p. 725-7.
137. Cideciyan, A.V., et al., *Pseudo-fovea formation after gene therapy for RPE65-LCA*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015. **56**(1): p. 526-37.
138. Li, S., et al., *Rescue of enzymatic function for disease-associated RPE65 proteins containing various missense mutations in non-active sites*. J Biol Chem, 2014. **289**(27): p. 18943-56.
139. Wagner, H.J., *Light-dependent plasticity of the morphology of horizontal cell terminals in cone pedicles of fish retinas*. J Neurocytol, 1980. **9**(5): p. 573-90.
140. Yazulla, S. and K.M. Studholme, *Light-dependent plasticity of the synaptic terminals of Mb bipolar cells in goldfish retina*. J Comp Neurol, 1992. **320**(4): p. 521-30.
141. Peichl, L. and J. Bolz, *Kainic acid induces sprouting of retinal neurons*. Science, 1984. **223**(4635): p. 503-4.
142. Bennett, J., *Gene therapy for color blindness*. N Engl J Med, 2009. **361**(25): p. 2483-4.
143. Mancuso, K., et al., *Gene therapy for red-green colour blindness in adult primates*. Nature, 2009. **461**(7265): p. 784-7.
144. Bayley, P.R. and C.W. Morgans, *Rod bipolar cells and horizontal cells form displaced synaptic contacts with rods in the outer nuclear layer of the nob2 retina*. J Comp Neurol, 2007. **500**(2): p. 286-98.
145. Cuenca, N., et al., *Early changes in synaptic connectivity following progressive photoreceptor degeneration in RCS rats*. Eur J Neurosci, 2005. **22**(5): p. 1057-72.
146. Haverkamp, S., et al., *Synaptic plasticity in CNGA3(-/-) mice: cone bipolar cells react on the missing cone input and form ectopic synapses with rods*. J Neurosci, 2006. **26**(19): p. 5248-55.
147. Claes, E., et al., *Morphological characterization of the retina of the CNGA3(-/-)Rho(-/-) mutant mouse lacking functional cones and rods*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. **45**(6): p. 2039-48.

148. Lewis, G.P., et al., *Animal models of retinal detachment and reattachment: identifying cellular events that may affect visual recovery*. Eye (Lond), 2002. **16**(4): p. 375-87.
149. Fisher, S.K., et al., *Cellular remodeling in mammalian retina: results from studies of experimental retinal detachment*. Prog Retin Eye Res, 2005. **24**(3): p. 395-431.
150. Linberg, K.A., G.P. Lewis, and S.K. Fisher, *Retraction and remodeling of rod spherules are early events following experimental retinal detachment: an ultrastructural study using serial sections*. Mol Vis, 2009. **15**: p. 10-25.
151. Mervin, K., et al., *Limiting photoreceptor death and deconstruction during experimental retinal detachment: the value of oxygen supplementation*. Am J Ophthalmol, 1999. **128**(2): p. 155-64.
152. Anderson, D.H., et al., *Retinal detachment in the cat: the pigment epithelial-photoreceptor interface*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1983. **24**(7): p. 906-26.
153. Lewis, G.P., et al., *The ability of rapid retinal reattachment to stop or reverse the cellular and molecular events initiated by detachment*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. **43**(7): p. 2412-20.
154. Immel, J., A. Negi, and M.F. Marmor, *Acute changes in RPE apical morphology after retinal detachment in rabbit. A SEM study*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1986. **27**(12): p. 1770-6.
155. Guerin, C.J., et al., *Recovery of photoreceptor outer segment length and analysis of membrane assembly rates in regenerating primate photoreceptor outer segments*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1993. **34**(1): p. 175-83.
156. Erickson, P.A., et al., *Retinal detachment in the cat: the outer nuclear and outer plexiform layers*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1983. **24**(7): p. 927-42.
157. Zhang, N. and E. Townes-Anderson, *Regulation of structural plasticity by different channel types in rod and cone photoreceptors*. J Neurosci, 2002. **22**(16): p. 7065-79.
158. Zhang, T., et al., *Genetic deletion of S-opsin prevents rapid cone degeneration in a mouse model of Leber congenital amaurosis*. Hum Mol Genet, 2015. **24**(6): p. 1755-63.
159. Linberg, K.A., et al., *Distribution of S- and M-cones in normal and experimentally detached cat retina*. J Comp Neurol, 2001. **430**(3): p. 343-56.
160. Rex, T.S., et al., *A survey of molecular expression by photoreceptors after experimental retinal detachment*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. **43**(4): p. 1234-47.
161. Cook, B., et al., *Apoptotic Photoreceptor Degeneration in Experimental Retinal-Detachment*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1995. **36**(6): p. 990-996.
162. Shimomura, O., F.H. Johnson, and Y. Saiga, *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea*. J Cell Comp Physiol, 1962. **59**: p. 223-39.
163. Shimomura, O., *Structure of the Chromophore of Aequorea Green Fluorescent Protein*. Febs Letters, 1979. **104**(2): p. 220-222.

164. Prasher, D.C., et al., *Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein*. Gene, 1992. **111**(2): p. 229-33.
165. Chalfie, M., et al., *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science, 1994. **263**(5148): p. 802-5.
166. Zimmer, M., *GFP: from jellyfish to the Nobel prize and beyond*. Chem Soc Rev, 2009. **38**(10): p. 2823-32.
167. Rolling, F., et al., *Evaluation of adeno-associated virus-mediated gene transfer into the rat retina by clinical fluorescence photography*. Hum Gene Ther, 1999. **10**(4): p. 641-8.
168. Stieger, K., et al., *Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors*. Mol Ther, 2006. **13**(5): p. 967-75.
169. Wässle, H., H. Regus-Leidig, and S. Haverkamp, *Expression of the vesicular glutamate transporter vGluT2 in a subset of cones of the mouse retina*. J Comp Neurol, 2006. **496**(4): p. 544-55.
170. Haverkamp, S., et al., *Diversity of glycine receptors in the mouse retina: localization of the alpha2 subunit*. J Comp Neurol, 2004. **477**(4): p. 399-411.
171. Haverkamp, S. and H. Wässle, *Characterization of an amacrine cell type of the mammalian retina immunoreactive for vesicular glutamate transporter 3*. J Comp Neurol, 2004. **468**(2): p. 251-63.
172. Koulen, P., et al., *Immunocytochemical localization of the postsynaptic density protein PSD-95 in the mammalian retina*. J Neurosci, 1998. **18**(23): p. 10136-49.
173. Chu, Y., M.F. Humphrey, and I.J. Constable, *Horizontal cells of the normal and dystrophic rat retina: a wholemount study using immunolabelling for the 28-kDa calcium-binding protein*. Exp Eye Res, 1993. **57**(2): p. 141-8.
174. Uesugi, R., et al., *Calbindin D-28k and parvalbumin immunohistochemistry in developing rat retina*. Exp Eye Res, 1992. **54**(4): p. 491-9.
175. Rabie, A., et al., *Immunocytochemical detection of 28 000-MW calcium-binding protein in horizontal cells of the rat retina*. Cell Tissue Res, 1985. **240**(2): p. 493-6.
176. Hamano, K., et al., *Localization of two calcium binding proteins, calbindin (28 kD) and parvalbumin (12 kD), in the vertebrate retina*. J Comp Neurol, 1990. **302**(2): p. 417-24.
177. Specht, D., et al., *Effects of presynaptic mutations on a postsynaptic Cacna1s calcium channel colocalized with mGluR6 at mouse photoreceptor ribbon synapses*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(2): p. 505-15.
178. Zhang, D.R. and H.H. Yeh, *Protein kinase C-like immunoreactivity in rod bipolar cells of the rat retina: a developmental study*. Vis Neurosci, 1991. **6**(5): p. 429-37.
179. Greferath, U., U. Grunert, and H. Wässle, *Rod bipolar cells in the mammalian retina show protein kinase C-like immunoreactivity*. J Comp Neurol, 1990. **301**(3): p. 433-42.

180. Negishi, K., S. Kato, and T. Teranishi, *Dopamine cells and rod bipolar cells contain protein kinase C-like immunoreactivity in some vertebrate retinas*. Neurosci Lett, 1988. **94**(3): p. 247-52.
181. Ruether, K., et al., *PKC α is essential for the proper activation and termination of rod bipolar cell response*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010. **51**(11): p. 6051-8.
182. Eng, L.F., R.S. Ghirnikar, and Y.L. Lee, *Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000)*. Neurochem Res, 2000. **25**(9-10): p. 1439-51.
183. Fisher, S.K., et al., *Cellular Remodeling in Mammalian Retina Induced by Retinal Detachment*, in *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet]*, F.E. Kolb H, Nelson R, Editor. 2005, University of Utah Health Science Center, 1995-. Salt Lake City.
184. Shaw, G. and K. Weber, *The structure and development of the rat retina: an immunofluorescence microscopical study using antibodies specific for intermediate filament proteins*. Eur J Cell Biol, 1983. **30**(2): p. 219-32.
185. Dixon, R.G. and L.F. Eng, *Glial fibrillary acidic protein in the retina of the developing albino rat: an immunoperoxidase study of paraffin-embedded tissue*. J Comp Neurol, 1980. **195**(2): p. 305-21.
186. Bignami, A. and D. Dahl, *The radial glia of Muller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein*. Exp Eye Res, 1979. **28**(1): p. 63-9.
187. Bjorklund, H., A. Bignami, and D. Dahl, *Immunohistochemical demonstration of glial fibrillary acidic protein in normal rat Muller glia and retinal astrocytes*. Neurosci Lett, 1985. **54**(2-3): p. 363-8.
188. Cao, W., et al., *Development of normal and injury-induced gene expression of aFGF, bFGF, CNTF, BDNF, GFAP and IGF-I in the rat retina*. Exp Eye Res, 2001. **72**(5): p. 591-604.
189. de Raad, S., et al., *Light damage in the rat retina: glial fibrillary acidic protein accumulates in Muller cells in correlation with photoreceptor damage*. Ophthalmic Res, 1996. **28**(2): p. 99-107.
190. Osborne, N.N., F. Block, and K.H. Sontag, *Reduction of ocular blood flow results in glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression in rat retinal Muller cells*. Vis Neurosci, 1991. **7**(6): p. 637-9.
191. Eisenfeld, A.J., A.H. Bunt-Milam, and P.V. Sarthy, *Muller cell expression of glial fibrillary acidic protein after genetic and experimental photoreceptor degeneration in the rat retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1984. **25**(11): p. 1321-8.
192. Lewis, G.P., B. Matsumoto, and S.K. Fisher, *Changes in the organization and expression of cytoskeletal proteins during retinal degeneration induced by retinal detachment*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995. **36**(12): p. 2404-16.
193. Lewis, G.P., et al., *Changes in the expression of specific Muller cell proteins during long-term retinal detachment*. Exp Eye Res, 1989. **49**(1): p. 93-111.

194. Gavrieli, Y., Y. Sherman, and S.A. Ben-Sasson, *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation*. J Cell Biol, 1992. **119**(3): p. 493-501.
195. Loo, D.T., *In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques*. Methods Mol Biol, 2011. **682**: p. 3-13.
196. Huerta, S., et al., *Screening and detection of apoptosis*. J Surg Res, 2007. **139**(1): p. 143-56.
197. Walker, P.R., et al., *Labeling DNA damage with terminal transferase. Applicability, specificity, and limitations*. Methods Mol Biol, 2002. **203**: p. 3-19.
198. Li, X. and Z. Darzynkiewicz, *Labelling DNA strand breaks with BrdUTP. Detection of apoptosis and cell proliferation*. Cell Prolif, 1995. **28**(11): p. 571-9.
199. Gorczyca, W., et al., *DNA strand breaks occurring during apoptosis - their early insitu detection by the terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays and prevention by serine protease inhibitors*. Int J Oncol, 1992. **1**(6): p. 639-48.
200. Barhoum, R., et al., *Functional and structural modifications during retinal degeneration in the rd10 mouse*. Neuroscience, 2008. **155**(3): p. 698-713.
201. Raff, M.C., et al., *Cell-type-specific markers for distinguishing and studying neurons and the major classes of glial cells in culture*. Brain Res, 1979. **174**(2): p. 283-308.
202. Cummings, M.C., C.M. Winterford, and N.I. Walker, *Apoptosis*. Am J Surg Pathol, 1997. **21**(1): p. 88-101.
203. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
204. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 770-6.
205. Broker, L.E., F.A. Kruyt, and G. Giaccone, *Cell death independent of caspases: a review*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(9): p. 3155-62.
206. Oberhammer, F., et al., *Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation*. EMBO J, 1993. **12**(9): p. 3679-84.
207. Arends, M.J., R.G. Morris, and A.H. Wyllie, *Apoptosis. The role of the endonuclease*. Am J Pathol, 1990. **136**(3): p. 593-608.
208. Lipton, S.A. and E. Bossy-Wetzel, *Dueling activities of AIF in cell death versus survival: DNA binding and redox activity*. Cell, 2002. **111**(2): p. 147-50.
209. Daugas, E., et al., *Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis*. FEBS Lett, 2000. **476**(3): p. 118-23.
210. Susin, S.A., et al., *Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor*. Nature, 1999. **397**(6718): p. 441-6.
211. Yang, L., et al., *Preventing retinal detachment-associated photoreceptor cell loss in Bax-deficient mice*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. **45**(2): p. 648-54.

212. Nour, M., et al., *P2Y(2) receptor agonist INS37217 enhances functional recovery after detachment caused by subretinal injection in normal and rds mice*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003. **44**(10): p. 4505-14.
213. Palczewski, K., *Blind dogs that can see: pharmacological treatment of Leber congenital amaurosis caused by a defective visual cycle*. Arch Ophthalmol, 2010. **128**(11): p. 1483-5.
214. Terenghi, G., et al., *Localization of S-100 protein in Muller cells of the retina--1. Light microscopical immunocytochemistry*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1983. **24**(7): p. 976-80.
215. Kondo, H., T. Iwanaga, and T. Nakajima, *An immunocytochemical study on the localization of S-100 protein in the retina of rats*. Cell Tissue Res, 1983. **231**(3): p. 527-32.
216. Lewis, G.P. and S.K. Fisher, *Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression*. Int Rev Cytol, 2003. **230**: p. 263-90.
217. Doonan, F., M. Donovan, and T.G. Cotter, *Caspase-independent photoreceptor apoptosis in mouse models of retinal degeneration*. J Neurosci, 2003. **23**(13): p. 5723-31.
218. Marigo, V., *Programmed cell death in retinal degeneration: targeting apoptosis in photoreceptors as potential therapy for retinal degeneration*. Cell Cycle, 2007. **6**(6): p. 652-5.
219. Wenzel, A., et al., *Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration*. Prog Retin Eye Res, 2005. **24**(2): p. 275-306.
220. Rex, T.S., et al., *The distribution, concentration, and toxicity of enhanced green fluorescent protein in retinal cells after genomic or somatic (virus-mediated) gene transfer*. Mol Vis, 2005. **11**: p. 1236-45.
221. Daniels, D.M., et al., *Quantitative model demonstrating that recombinant adeno-associated virus and green fluorescent protein are non-toxic to the rat retina*. Clin Experiment Ophthalmol, 2003. **31**(5): p. 439-44.
222. Rex, T.S., et al., *EGFP levels and toxicity in transgenic and virus injected animals*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2004. **45**: p. U197-U197.
223. Wolvekamp, M.C., I.A. Darby, and P.J. Fuller, *Cautionary note on the use of end-labelling DNA fragments for detection of apoptosis*. Pathology, 1998. **30**(3): p. 267-71.
224. Charriaut-Marlangue, C. and Y. Ben-Ari, *A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis*. Neuroreport, 1995. **7**(1): p. 61-4.
225. Grasl-Kraupp, B., et al., *In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note*. Hepatology, 1995. **21**(5): p. 1465-8.
226. Sloop, G.D., et al., *Histologic sectioning produces TUNEL reactivity. A potential cause of false-positive staining*. Arch Pathol Lab Med, 1999. **123**(6): p. 529-32.

Publikationen

Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

ARVO Annual Meeting, Ft. Lauderdale, FL, USA 2010:

Stieger K., B. Giers, A. Mendes-Madeira, B. Lorenz, F. Rolling, S. Haverkamp, *Immunohistochemical Characterization of AAV Transduced Retinas Following Subretinal Injection in Rats*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2010; 51(13):3100.

36th Annual Meeting of the European Paediatric Ophthalmological Society, Bad Nauheim, Germany 2010:

Giers B., A. Mendes-Madeira, B. Lorenz, F. Rolling, S. Haverkamp, K. Stieger, *Immunohistochemical Characterization of AAV Transduced Retinae Following Subretinal Injection in Rats*. Proceedings of the 36th Annual Meeting of the European Paediatric Ophthalmological Society 2010, B. Lorenz, M. Preising, Editors. 2010, Lollar, Germany: Rosenbaum.

Erklärung zur Dissertation

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

Heidelberg, im Juli 2015

Danksagung

Mein Dank gilt zuvorderst Herrn Prof. Dr. Dr. Knut Stieger für die Überlassung des Themas und die umfangreiche Betreuung des gesamten Arbeitsprozesses, für stetigen Zuspruch, unermüdliches Erklären und ausreichend Hartnäckigkeit, um auch in Zeiten verminderter Motivation das Ziel nicht aus den Augen zu verlieren, ebenso aber auch für angenehme und geselligen Stunden sowohl in als auch außerhalb von Labor und Klinik.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Birgit Lorenz, Direktorin der Augenklinik der Universität Gießen, für die Ermöglichung des Projekts, zu dessen Gelingen sie mit Weitblick und vielfachen Anregungen beigetragen hat.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank Frau PD Dr. Silke Haverkamp vom Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt am Main für Anleitung, Unterstützung und Supervision bei allen wichtigen Schritten der Untersuchungen, für das Zurverfügungstellen der wissenschaftlichen Infrastruktur und ihre geduldige und herzliche Hilfe sowohl bei der Durchführung der eigentlichen Experimente als auch bei der Auswertung.

Weiterhin bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Labors für experimentelle Ophthalmologie der Augenklinik Gießen sowie der Abteilung Neuroanatomie am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt am Main.

Schließlich möchte ich meinen Eltern danken, die mir stets ein Vorbild waren und mich zeitlebens unterstützt und gefördert haben. Ihnen sei diese Arbeit gewidmet.



VVB



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-6345-0



9 783835 196345 0