

Aus der Augenklinik und Poliklinik,
Klinik der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Siegfried Priglinger

**Entwicklung von Biomarkern zur Charakterisierung
okulärer Manifestationen der Cystinose mittels
optischer Kohärenztomographie**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Leonie Keidel
aus Düsseldorf

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

PD Dr. Claudia Priglinger

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. Thomas Berninger

Prof. Dr. Christos Haritoglou

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:

Dr. med. Benedikt Schworm

Dekan:

Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.07.2022

Inhaltsverzeichnis

1. Abstract (English)	5
2. Abbildungsverzeichnis	7
3. Tabellenverzeichnis.....	8
4. Abkürzungsverzeichnis	9
5. Einleitung	11
5.1. Pathophysiologie	12
5.1.1. Lysosomale Akkumulation von Cystin	12
5.1.2. Pathologisch gesteigerte Autophagie.....	14
5.2. Phänotypen und extraokuläre Manifestationen der Cystinose	16
5.2.1. Infantile nephropathische Cystinose.....	16
5.2.2. Juvenile Cystinose	20
5.2.3. Okuläre Cystinose.....	21
5.3. Die Rolle des Augenarztes in der Diagnosefindung.....	21
5.4. Stand der Wissenschaft und Therapieoptionen	22
5.4.1. Orale Therapie	22
5.4.2. Topische Therapie	24
5.4.3. Ausblick auf zukünftige Therapiestrategien.....	26
6. Zielsetzung	28
7. Material und Methoden	29
7.1. Patientenkollektiv	29
7.2. Klinisch-ophthalmologische Untersuchung	31
7.2.1. Bestimmung Sehschärfe und Augeninnendruck.....	31
7.2.2. Spaltlampenbiomikroskopie, Entwicklung stromaler Cystinkristallscore..	31
7.3. Apparativ diagnostische Untersuchung.....	31
7.3.1. Spaltlampenfotografie, CCCS nach Gahl.....	31
7.3.2. Optische Kohärenztomografie, physikalische Grundlagen	32
7.3.3. Optische Kohärenztomografie, Klinische Anwendung	33
7.3.4. Optische Kohärenztomografie des vorderen Augenabschnitts, Entwicklung einer Klassifikation der okulären Cystinosemanifestation anhand der kornealen Cystinkristalltopistik.....	34
7.3.5. Optische Kohärenztomografie des hinteren Augenabschnitts, Skalierung des Manifestationsgrades chorioretinaler Cystinkristalle.....	37
7.4. Standardisierte Fragebögen zur Evaluierung der Sehqualität.....	39
7.5. Statistik	40

8.	Ergebnisse	41
8.1.	Spezifische Charakteristika des Gesamtkollektivs	41
8.2.	Klinisch-ophthalmologische Untersuchung	43
8.2.1.	Bestimmung Sehschärfe und Augeninnendruck.....	43
8.2.2.	Spaltlampenbiomikroskopie	43
8.3.	Apparativ diagnostische Untersuchung.....	46
8.3.1.	Spaltlampenfotografie	46
8.3.2.	Optische Kohärenztomografie des vorderen Augenabschnitts.....	47
8.3.3.	Optische Kohärenztomografie des hinteren Augenabschnitts.....	54
8.4.	Einflussfaktoren auf die chorioretinale Cystinkristallablagerung	57
8.4.1.	Einfluss des Genotyps	57
8.4.2.	Einfluss systemischer Parameter und oraler Therapie.....	57
8.5.	Evaluierung der Sehqualität anhand standardisierter Fragebögen	59
8.6.	Einflussfaktoren auf Sehqualität und Sehschärfe	63
8.6.1.	Korneale Cystinkristallablagerung	63
8.6.2.	Chorioretinale Cystinkristallablagerung.....	64
9.	Diskussion	64
9.1.	Lokalisation der Cystinkristallablagerungen.....	65
9.2.	Innovative Wertigkeit der entwickelten Messmethoden für die korneale und retinale Manifestation	68
9.2.1.	Die optische Kohärenztomografie als optimale Bildgebungsmethode für die Cystinose	69
9.3.	Anwendung der Messmethoden im Kollektiv	71
9.3.1.	Korneale Cystinkristallablagerung	71
9.3.2.	Retinale Cystinkristallablagerung.....	73
9.3.3.	Subjektive Qualität des Sehvermögens	74
9.4.	Ausblick.....	77
10.	Anhang	80
10.1.	Synopsis der demografischen und klinisch- ophthalmologischen Patientendaten	80
10.2.	Zusammenfassung der systemischen/apparativ diagnostischen Patientendaten	82
11.	Literaturverzeichnis.....	84
12.	Zusammenfassung.....	92
13.	Danksagung.....	94

1. Abstract (English)

Cystinosis is a rare lysosomal storage disease caused by a mutation of the CTNS gene that codes for the lysosomal cystine transporter cystinosin. Functional impairment of cystinosin leads to an accumulation of cystine crystals in several organs and in different ophthalmic structures. Current gold standard treatment of ocular cystinosis is the oral administration of cysteamine. The purpose of the present work is to describe clinical, demographic and functional findings in Germany's largest cystinosis collective and to evaluate data gained by multimodal imaging. The present work describes for the first time an anterior segment optical coherence tomography (AS-OCT) based objective biomarker for corneal cystine crystal deposition will be described and crystal deposition in chorioretinal structures as imaged by spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT) will be characterized. In the following their potential value as a marker for systemic disease control is elucidated.

The study is carried out at the University eye hospital of the Ludwig-Maximilian University in Munich in collaboration with the interdisciplinary cystinosis clinic at the RoMed Clinic Rosenheim.

Patients were recruited from the German national Cystinosis registry study. A complete ophthalmological examination was performed, including ETDRS best corrected visual acuity, slitlamp biomicroscopy, dilated funduscopy, AS-OCT (Cirrus HD-OCT 5000, Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Germany) and SD-OCT (Spectralis; Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Germany). Corneal crystals were graded using slitlamp biomicroscopy and AS-OCT. The first objective semi-automated B-scan image segmentation algorithm was developed using a grey scale value-based threshold method to automatically quantify corneal crystals. Deposition of retinal and choroidal crystals was graded employing a novel semi-quantitative grading system using SD-OCT, named chorioretinal cystine crystal score (RCCCS). It is the first description of a quantitative evaluation of retinal crystals on a large scale. To quantify patient-reported quality of vision, patients completed a standardized and clinically validated 30-item questionnaire addressing different visual symptoms (e.g. glare, blurred vision). Moreover, genetic testing to differentiate mutations of the cystinosin gene was performed.

A total of 112 eyes of 56 patients (mean age 23 years \pm 13 SD, median age 18,5 years; male:female ratio = 32:24; aged between 1-75 years) from the German Cystinosis Registry were included. 88 corneas of 45 patients were imaged. Another 68 AS-OCT Scans from 35 healthy subjects were used as controls. A total of 74 retina scans from 38 patients were evaluated. Cystine crystals present as hyperreflective, gold yellow deposits in ocular structures like the conjunctiva, cornea, iris, retina and choroid. On AS-OCT B-scans, corneal crystals appeared as hyperreflective deposits within the corneal stroma. The novel automatic B-scan image segmentation algorithm was most efficient in delineating corneal crystals at higher greyscale thresholds. Significant differences in suprathreshold greyscale pixels were observable between cystinosis patients and healthy controls ($p < 0.001$). In addition, the algorithm was able to detect an age-dependent depth distribution profile of crystal deposition. Using SD-OCT of the retina cystine crystals were detectable in all neuroretinal layers and the choroid. Crystals in the choriocapillaris were the most common manifestation. The new defined parameter, RCCCS, based on the number of hyperreflective spots in the distinct retinal layers, was negatively correlated with the dose of cysteamine intake ($R = 0.533$, $p = 0.001$) and positively with Cystatin C, a stable parameter of renal function ($R = 0.496$, $p = 0.016$). Moreover, the value of the RCCCS affected subjective quality of vision. Genetic analysis indicated pronounced crystal deposition in patients with heterozygous mutations containing the 57-kb-deletion allele of the CTNS gene. The survey of the RCCCS allowed the establishment of a first clinical grading system.

The newly established measuring methods for corneal and retinochoroidal crystal deposition can help to evaluate clinical data and to better understand the pathophysiology of cystinosis. Objective quantification of corneal cystine crystal deposition is feasible with AS-OCT and can present an age-related depth distribution. Via AS-OCT it was possible to develop a classification of cystinosis with respect to the different depth distribution patterns of the corneal cystine crystals. In future studies it may serve as a longterm parameter for ocular disease control and topical treatment surveillance. The presented SD-OCT based grading system might serve as a biomarker for systemic disease control. The established clinical grading system enables the quantification of the degree and the course of the illness.

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Eine Mutation im CTNS-Gen führt zu einer Malfunktion des Cystin-Transporters Cystinosin und somit zu einer Akkumulation des Cystins im Lysosom. Durch die intralysosomale Bindung an therapeutisch gegebenes Cysteamin, kann das Cystin über einen protonengesteuerten Transporter wieder in das Cytoplasma hinaus transportiert werden.	13
Abbildung 2: Spaltlampenphotografien eines Cystinosepatienten. Konjunktivale Cystinkristalle lassen die Bindehaut matter erscheinen. Inferior ist eine beginnende Vaskularisation der Kornea sichtbar (A). Cystinkristalle zeigen sich als goldgelbe, kristalline Einlagerungen im Hornhaustroma (B, C). Im Bild C sind zusätzlich einzelne Iriskristalle erkennbar.	18
Abbildung 3: Messung der zentralen Hornhautdicke (schwarze Linie), der zentralen Stromadicke (weiße Linie) und der Eindringtiefe der Cystinkristalle in der Hornhaut (weiße Linie für den stromalen Teil) mittels eines digitalen Kalipers.	35
Abbildung 4: Festlegen einer ROI im zentralen Stromabereich	36
Abbildung 5: Teilen der ROI in drei flächengleiche Segmente zur Evaluation des Tiefenverteilungsmusters.....	36
Abbildung 6: Bestimmung des RCCCS durch Addition der Einzelgraduierung der Kristallablagerung in den verschiedenen chorioretinalen Schichten.....	39
Abbildung 7: Spaltlampenphotografien verschiedener Cystinosepatienten. Im Spätstadium der kornealen Manifestation der Cystinose kann es zu einer Pannusbildung (A und B), sowie scholliger kalziumphosphathaltiger Einlagerungen kommen (C und D), die teils mit einer perforierenden Keratoplastik therapiert werden müssen.....	45
Abbildung 8.: OCT-Aufnahmen der Papille mit sichtbaren Cystinkristallablagerungen in der retinalen Nervenfaserschicht (Pfeile).	46
Abbildung 9: Exemplarische Tiefenverteilungsmuster der Cystinkristalle in der Hornhaut: (A) Die Kristalle waren entweder auf alle Stromaschichten verteilt, (B) lediglich im anterioren oder (C) im posterioren Stroma lokalisiert.....	48
Abbildung 10: Altersabhängigkeit des Tiefenverteilungsmusters der Hornhautkristalle. Die Eindringtiefe der Kristalle, nahm mit steigendem Alter zu (104).	50
Abbildung 11: (A) Streudiagramm, das die x-fache Differenz der Anzahl der Suprathreshold-Pixel zwischen Cystinose-Patienten und gesunden Kontrollen (Ordinate) unter Verwendung von 16 verschiedenen Graustufen-Schwellenwerten (Abszisse) wiedergibt. (B) Die im Rahmen der Algorithmus Entwicklung getesteten drei höchsten Schwellenwerte der Graustufen im OCT ergaben die im Boxplot dargestellten, statistisch signifikanten Unterschiede detektierter Suprathreshold-Pixel zwischen Cystinose-Patienten und den gesunden Kontrollen (104).	50
Abbildung 12: Automatisierte Markierung von Hornhautkristallen, die in den AS-OCT-Bildern als hyperreflektive Foci visualisiert werden können. Wie im Vergleich zu (A) keine Markierung zu sehen ist, konnten die höheren als Schwellenwerte gesetzten Grauwerte von (B) 241, (C) 226 und (D) 211 die Kristalle effizient vom restlichen Stromagewebe abgrenzen (Kristalle sind hier rot markiert). (E-H) Korneae gesunder Kontrollen mit identisch angewandten Schwellenwerten (104).....	51

Abbildung 13: Tiefenverteilungsmuster der mit dem Analyse-Algorithmus im AS-OCT detektierten Korneakristalle in verschiedenen Altersgruppen (104).....	53
Abbildung 14: Altersverteilung der Cystinkristallablagerung bezogen auf die verschiedenen Typen der Tiefenverteilungsmuster.....	53
Abbildung 15: Verteilung der Cystinkristalle in Retina und Choroidea (105).....	55
Abbildung 16: SD-OCT B-Scans von Cystinose-Patienten. (A) Netzhautkristalle, die sich als hyperreflektive Foci präsentieren, mit einer ausgeprägten Akkumulation in den Choriokapillaris (Pfeilspitze); RCCCS von 0,5 mit nur wenigen choroidalen Kristallen. (B) RCCCS von 2,5 mit mehr Kristallen in der Aderhaut (Pfeilspitze) und IPL (Pfeil). (C) RCCCS von 5 mit Kristallen in der Aderhaut (Choroidea), GCL, IPL und INL. Am häufigsten wurden Kristalle an den Übergangszonen zwischen den Schichten gefunden. (D) Ausgeprägte Kristallablagerungen in mehreren chorioretinalen Schichten (105)...	56
Abbildung 17: Verteilung der chorioretinalen Cystinkristalle in verschiedenen Allelkombinationen (105).....	57
Abbildung 18: Korrelation des RCCCS mit systemischen Parametern und der täglichen Cysteamindosis. A) Patienten mit einer hohen Dosis des oralen Cysteamins zeigen bei negativer Korrelation einen geringeren RCCCS. B) Positive Korrelation mit dem Cystatin C Spiegel im Blut in Patienten vor stattgefundenener Nierentransplantation. C) Positive Korrelation des RCCCS mit dem leukozytären Cystinspiegel (105).....	59
Abbildung 19: Prozentuale Häufigkeit (A), Stärke der Symptomausprägung (B) und subjektive Beeinträchtigung (C) verschiedener Parameter des subjektiven Sehvermögens. Die prozentualen Angaben werden entsprechend des Ausprägungsgrades farbcodiert dargestellt (105).....	61
Abbildung 20: Korrelation des RCCCS mit der bestkorrigierten Sehschäfe in logMAR (105).....	64

3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.: Ein- und Ausschlusskriterien des Cystinosekollektivs.....	30
Tabelle 2: Klassifikation der kornealen Cystinkristallablagerungen anhand der Topistik des Tiefenverteilungsmusters.....	37
Tabelle 3 : Graduierung der chorioretinalen Cystinkristallablagerungen anhand des SD-OCT.....	39
Tabelle 4: Demografische und klinische Daten des gesamten Cystinosekollektivs.....	42
Tabelle 5: Topische Therapie der okulären Manifestationen der Cystinose des gesamten Cystinosekollektivs.....	43
Tabelle 6: Demografische Daten der Patienten, die Cystadrops® applizierten.....	43
Tabelle 7: Klinisch ophthalmologische Befunde des gesamten Cystinosekollektivs.....	44
Tabelle 8: Demografische Daten des Hornhautkollektivs und des Kontrollkollektivs. .	47
Tabelle 9: Korrelation der Ergebnisse der manuellen Kalipermessungen der zwei verblindeten Untersucher (U1, U2) und Darstellung der signifikanten Unterschiede im Vergleich des Cystinose-Kollektivs mit dem Normalkollektiv.....	49
Tabelle 10: Typisierung der Tiefenverteilungsmuster der kornealen Cystinkristallablagerungen im AS-OCT.....	52

Tabelle 11: Systemische Parameter des Netzhautkollektivs	54
Tabelle 12: Charakteristika des Netzhautkollektivs aufgegliedert in Ausprägungsstadien der chorioretinalen Cystinkristallablagerung.....	58
Tabelle 13...: Korrelation visueller Phänomene mit dem Alter nach Spearman (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$).	62
Tabelle 14: Korrelation visueller Phänomene mit der BCVA in logMAR nach Spearman (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$)......	63
Tabelle 16: Klinisch ophthalmologische Parameter des gesamten Cystinosekollektivs für die 56 untersuchten Patienten	81
Tabelle 17: OCT-basierte und internistische Parameter des gesamten Cystinosekollektivs. (2. Spalte: Ergebnisse der manuellen Kalipermessungen im AS-OCT: Prozentualer Anteil der Eindringtiefe der Cystinkristallablagerungen im kornealen Stroma an der jeweiligen Stromadicke, Spalten 3-6: Ergebnisse des schwellenwertbasierten AS-OCT-Algorithmus: Prozentualer Anteil aller über der Grauwertschwelle 211 liegenden Pixel der gesamten ROIs (Spalte3), bzw. des 1., 2. bzw. 3. Stromasegments (Spalten 4-6) an allen Pixeln in der ROI).....	83

4. Abkürzungsverzeichnis

AmnionTx	Amnionmembrantransplantation
ANOVA	„analysis of variance“
ART	“automatic real-time averaging algorithm” (automatischer Echtzeit-Mittelungsalgorithmus des SD-OCTs)
AS-OCT	„Anterior segment optical coherence tomography“ (Optische Kohärenztomografie des vorderen Augenabschnitts)
AT	Augentropfen
ATP	Adenosintriphosphat
ATG 13	„autophagy-related protein 13“
BCVA	„best corrected visual acuity“ (bestkorrigierte Sehschärfe)
CCCS	“Corneal Cystine Crystal Score” (Kornealer Cystinkristallscore: Auf Fotografien beruhender Parameter zur Quantifizierung korneale Cystinkristalle)
DMEK	„Descemet membrane endothelial keratoplasty“ (Transplantation der Descemetmembran der Kornea)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERG	Elektroretinogramm
ETDRS-Visus	Visus, erhoben nach dem Protokoll der <i>Early Treatment Diabetic Retinopathy Study</i>
FD-OCT	„Fourier domain OCT“
FIX	Fixation (als Parameter der Sehschärfenbestimmung bei Kindern)
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
GCL	“ganglion cell layer” (Ganglienzellschicht)
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HSC(s)	„Hematopoietic stem cell(s)“ (Hämatopoetische Stammzelle(n))
INL	„inner nuclear layer“ (innere Körnerschicht)
IPL	“inner plexiform layer” (Innere plexiforme Schicht)
IVCM	In vivo konfokale Mikroskopie

LC3-II	„light chain 3“
LH	Luteinisierendes Hormon
logMAR	Logarithm of the Minimum Angle of Resolution: System zur Bestimmung der Sehschärfe
LUX	Lichtscheinwahrnehmung
MAPK	Mitogen-activated protein kinase (Proteinkinase, die u.a. die Autophagie fördert)
MAX	Maximal
MIN	Minimal
mTOR	Mammalian target of rapamycin (Proteinkinase, die u.a. die Autophagie hemmt)
NL	„Nulla Lux“ (Vollständige Erblindung)
ONL	„outer nuclear layer“ (Äußere Körnerschicht)
OPL	„outer plexiform layer“ (Äußere plexiforme Schicht)
pKP	Perforierende Keratoplastik (Hornhauttransplantation aller Schichten der Kornea)
RCCCS	“Retinochoirodal cystine crystal score” (Messmethode zur Quantifizierung retinochoroidaler Cystinkristalle)
RNFL	“retinal nerve fiber layer” (Retinale Nervenfaserschicht)
ROI	“Region of interest” (Bereich von Interesse, <i>hier</i> : Rechteckiger Bereich im zentralen Hornhautstroma in der AS-OCT)
RPE	Retinales Pigmentepithel
SD	Standardabweichung
SD-OCT	“Spectral Domain Optical Coherence Tomography” (Spectral Domain Optische Kohärenztomographie)
TD-OCT	„Time domain OCT“
TFEB	Transkriptionsfaktor EB
Thr	„Threshold“ (Schwellenwert)
TNT(s)	„Tunneling Nanotube(s)“ (kleine dünne Membrankanäle, welche den interzellulären Transfer verschiedener Moleküle ermöglichen)

5. Einleitung

Die Cystinose ist eine seltene, autosomal rezessiv vererbte lysosomale Speicherkrankheit der Aminosäure Cystin mit einer geschätzten Prävalenz von 1:100.000 bis 1:200.000. Ursächlich sind Mutationen im CTNS Gen, welches für den lysosomalen Aminosäure-Transporter Cystinosin kodiert.

Die Cystinose manifestiert sich in drei verschiedenen Phänotypen, wobei den häufigsten Typ die infantile nephropathische Cystinose darstellt, die 90 % aller Cystinose-Patienten betrifft. Sie stellt die Hauptursache eines renalen Fanconi-Syndroms, einer Funktionsstörung des Energiehaushalts der proximalen Nierentubuluszellen, in der Kindheit dar (1). Ferner entwickeln sich eine kristalline Keratopathie und zahlreiche weitere extrarenale Manifestationen.

Etwa 130 Personen in Deutschland leiden an dieser Erkrankung. Die Betroffenen sind in Deutschland mithilfe der Cystinose Stiftung e.V. in ein unvergleichbares strukturiertes Selbsthilfeprogramm eingebunden, das es ermöglicht eine große Patientenkohorte interdisziplinär im Rahmen einer deutschlandweiten Cystinose-Sprechstunde zu betreuen (2).

Seit Januar 2018 existiert aufgrund der möglichen Therapieoptionen ein Pilotprojekt in Bayern, das erstmalig ein rein molekulargenetisches Neugeborenen-Screening auf Cystinose anbietet. Je früher die Diagnose gestellt wird und eine Therapie initiiert werden kann, desto besser ist die Prognose der Patienten. Hier kommt dem Augenarzt eine entscheidende Rolle zu. Er kann schon in der Frühphase durch die Visualisierung der kornealen Cystinkristalle in der Spaltlampenbiomikroskopie die Diagnose stellen.

Cystinose scheint auf den ersten Blick klinisch wenig relevant zu sein, da nur eine geringe Zahl an Menschen betroffen ist, zugleich stellt sie aber eine der wenigen genetischen Stoffwechselerkrankungen dar, die effektiv topisch und systemisch behandelt werden kann.

Die aktuelle Therapie der Cystinose erfolgt mittels des Aminothiols Cysteamin, das einerseits in einer oralen Form (Cystagon™/Procysbee™) für die systemische Therapie zugelassen ist, andererseits in einer löslichen Form als Lokalthherapie (Cystaran™/Cystadrops® Augentropfen) appliziert werden kann (3). Cysteamin kann Zellen von circa 90% ihres Cystin-Gehalts befreien. Die Cysteamin-Therapie verzögert sowohl das

Auftreten der kornealen Kristallbildung als auch aller weiteren extraokulären Manifestationen wie des renalen Fanconi-Syndroms (4).

Diagnostik und Therapie der Cystinose befinden sich im Umbruch und die Forschung im Bereich dieser lysosomalen Stoffwechselerkrankung ist innovativer denn je. Neue diagnostische Methoden und Therapiestrategien werden entwickelt. Für das Verständnis der Erkrankung ist es erforderlich, einen genaueren Blick auf die Pathogenese, diagnostischen Methoden und Therapiemöglichkeiten dieser Erbkrankheit zu werfen.

5.1. Pathophysiologie

Insgesamt sind über 100 pathogene CTNS Mutationen bekannt. Ihr Schweregrad bestimmt den klinischen Phänotyp mit. So werden drei Verlaufsformen unterschieden. Die häufigste, die infantile nephropathische Cystinose, zeigt meist ein vollständiges Fehlen der Transportfunktion des Cystinosins beziehungsweise eine veränderte Lokalisation des Transporters, wohingegen der Cystintransport bei der später beginnenden juvenilen und der nur auf die Augen beschränkten, sehr seltenen okulären Cystinose meist noch partiell erhalten ist (5).

Dennoch scheinen weitere Einflussfaktoren auf den klinischen Phänotyp zu existieren. Diskutiert wird eine gewebsspezifische Cystinosinexpression. So wurde gezeigt, dass die Expression des Cystinosins in den verschiedenen Geweben variiert: Trotz pathologisch erhöhter Cystinspiegel in den Leukozyten bestand bei einigen Patienten eine rein okuläre Beteiligung. Renale Zellen zeigen eventuell eine Restexpression des CTNS-Transkripts und somit eine suffiziente Cystinosin-Produktion, die okulären Zellen hingegen nicht und es kommt zur Akkumulation von Cystinkristallen ausschließlich in okulären Geweben, wie der Kornea und Retina (6).

5.1.1. Lysosomale Akkumulation von Cystin

CTNS codiert für den Cystin-Transporter Cystinosin. Die Fehlfunktion des Cystinosins führt zu einer Akkumulation von Cystin im Lysosom und dadurch zu einer Leckage der Lysosomenmembran und Stimulation der zytosolischen Proteinkinase delta (Abbildung 1).

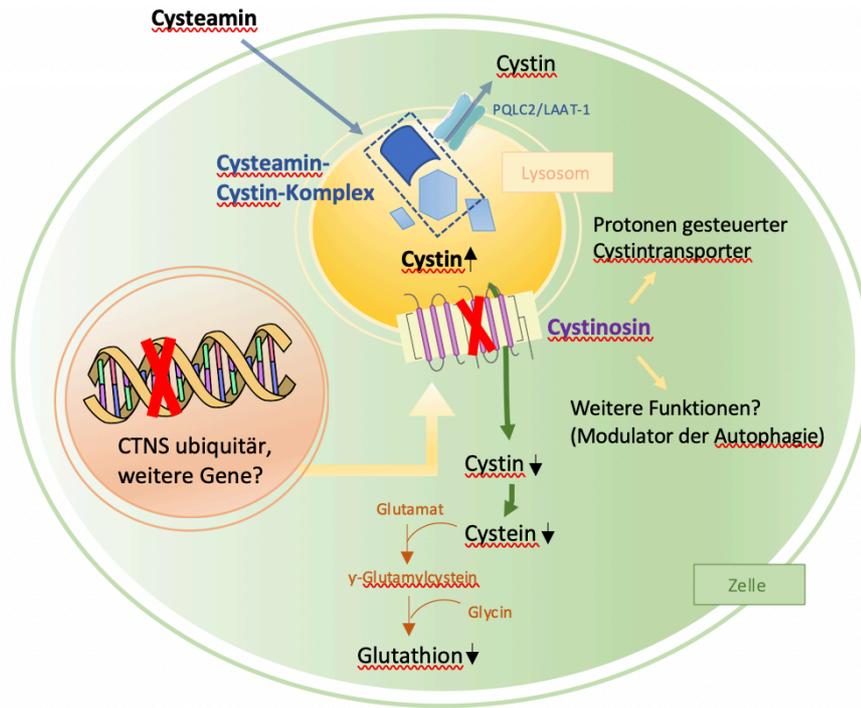


Abbildung 1: Eine Mutation im CTNS-Gen führt zu einer Malfunktion des Cystin-Transporters Cystinosin und somit zu einer Akkumulation des Cystins im Lysosom. Durch die intralysosomale Bindung an therapeutisch gegebenes Cysteamin, kann das Cystin über einen protonengesteuerten Transporter wieder in das Cytoplasma hinaus transportiert werden.

Dieser Mechanismus kann letztlich die Apoptose der Zelle verursachen (7). Das intrazelluläre Cystinosin ist ubiquitär im Körper vorhanden, sodass sich Cystin-Kristalle in jedem Gewebe ablagern und zu einer Dysfunktion verschiedener Organe führen (8, 9). Renale und okuläre Strukturen sind als erste betroffen.

Die Pathogenese der Cystinose kann durch den insuffizienten Transport des Cystins aus den Lysosomen allerdings nicht ausreichend erklärt werden. Kalatzis et al. berichteten über Fälle einer mit mildereren Symptomen einhergehenden juvenilen Cystinose, in denen ein vollständiges Fehlen der Transportfunktion des Cystinosins vorlag. Ebenso wurde die Entwicklung eines renalen Fanconi-Syndroms beobachtet, ohne dass zu diesem Zeitpunkt Cystinkristalle in proximalen Nierentubuluszellen nachweisbar waren (10).

Es gibt somit Anhalt dafür, dass das Cystinosin neben der reinen Cystin-Transportfunktion, weitere Funktionen besitzt.

5.1.2. Pathologisch gesteigerte Autophagie

Autophagie beschreibt den intrazellulären katabolischen Prozess, in dem zelleigene Bestandteile über Autophagosomen zu den Lysosomen transportiert werden, um dort hydrolytisch gespalten und gegebenenfalls wiederverwendet werden zu können. Das Autophagosom fusioniert in diesem Vorgang mit dem Lysosom zum Autolysosom. Autophagie geschieht in vielen eukaryotischen Organismen und in verschiedenen Zelltypen als Antwort auf Fasten oder während zellulärer Umbauprozesse beziehungsweise dem Zelltod. Sie ist die zelluläre Antwort auf sowohl extrazellulär (11), als auch intrazellulär (u.a. bei Akkumulation geschädigter Organellen und zytoplasmatischer Komponenten) vorliegendem Stress und erlaubt hier ein Überleben der Zelle durch ‚Recycling‘ ihrer Komponenten (12).

Dysregulation des Ragulator-Komplexes

Reguliert wird die Autophagie unter anderem durch den lysosomalen Ragulator-Komplex, der die Aktivierung der multifunktionalen, anabolen Proteinkinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) und der katabolen MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) steuert (13). Der Ragulator-Komplex besteht aus fünf lysosomalen Adaptor- und MAPK- und mTOR-Regulator (LAMTOR)-Untereinheiten. Eine LAMTOR-Untereinheit bindet an die RagA/B und RagC/D-GTPasen (14). Wenn ausreichend Nährstoffe und Wachstumsfaktoren vorhanden sind, wird mTOR durch seine Interaktion mit aktivierten Rag-GTPasen an den Ragulator-Komplex gebunden, an die lysosomale Membran transloziert und aktiviert. Eine vakuoläre H⁺-Adenosintriphosphatase (v-ATPase) interagiert mit dem Ragulator-Komplex und reguliert die Aktivierung der GTPasen abhängig vom Vorhandensein von Aminosäuren im Lysosom. Wenn also Aminosäuren im Inneren des lysosomalen Lumens akkumulieren, erzeugen diese ein aktivierendes Signal, das über den v-ATPase-Ragulator an die R-GTPasen übertragen wird (15).

Eine Aktivierung der anabolen mTOR hemmt so die Autophagie und fördert das zelluläre Wachstum und Proteinsynthese. Zum einen geschieht dies direkt durch die Beeinflussung der Transkription und Translation von Genen, die für die Organisation des Aktin-Zytoskeletts, die Degradation der Proteine und die Biogenese von Ribosomen verantwortlich sind. Zum anderen durch Phosphorylierung und konsekutive Aktivierung nachgeschalteter Ziele, wie z.B. der S6-Kinase oder des 4E-BP1-Transkriptionsfaktors oder aber durch Hyperphosphorylierung z.B. des Autophagy-related protein 13 (ATG13), das in diesem Zustand eine hemmende Wirkung auf die Autophagie besitzt (16).

In cystinotischen Zellen aber berichteten Ivanova et al. über eine verzögerte Reaktivierung des mTORC1-Signalwegs und somit einer verzögerten Hemmung der Autophagie nach einer Hungerepisode. Diese zeitliche Verzögerung war mit einer abnormalen Lokalisierung von mTOR in Cystinose-Zellen verbunden: Während einer Hungerepisode dissoziierte mTOR, im Gegensatz zu den Kontrollzellen, nicht aus den Kompartimenten der späten Lysosomen und es konnte nach Wiederherstellung des Kulturmediums keine spezifische Translokation und Aktivierung des Komplexes stattfinden. Die Autoren gehen davon aus, dass die lysosomalen Kompartimente in der Cystinose verändert sind und den mTOR-Komplex in Hungerepisoden an ihrer Oberfläche halten. Ebenso vermuten die Autoren, dass das Cystinosin eine Rolle bei der schnellen Erkennung von Aminosäuren im lysosomalen Lumen spielt und einen fehlenden Aminosäuresensor darstellen könnte, der das Signal an die v-ATPase weiterleitet (17). Andrzejewska et al. griffen diesen Gedanken auf und berichteten über die direkte Bindung des Cystinosins an die vakuoläre H⁺-ATPase und an den Ragulator-Komplex mit den RagA und RagC GTPasen (18). Die Autoren gehen davon aus, dass das Fehlen von Cystinosin in der Cystinose zu einer Minderaktivierung des mTORC1-Pathways führt und somit zu einer gesteigerten Autophagie mit einer vermehrten Bildung von Autophagosomen, einer verminderten Proteinsynthese, einem verminderten Zellwachstums und einer verminderten Zellteilung. Die Annahme, dass bei der Cystinose eine pathologisch gesteigerte Autophagie vorliegt, wird zudem durch die Beobachtung gestützt, dass sich in proximalen Nierentubuluszellen von an Cystinose erkrankten Mäusen ein signifikant vermehrtes Vorkommen von LC3-II, im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe findet (19, 20). LC3-II (microtubule-associated protein 1 light chain 3) ist ein Marker für die Anzahl an Autophagosomen. Zusätzlich ließ sich eine höhere Anzahl eines weiteren Autophagie-Markers, des Beclin-1 in cystinotischen Zellen nachweisen, welches an der Bildung von Autophagosomen beteiligt ist (19).

Eine abnormal gesteigerte Autophagie wird als mitursächlich für eine verminderte Überlebensfähigkeit der cystinotischen Zellen angesehen (19).

Mitochondriale Dysfunktion

Cystin ist das Substrat für die Produktion der Aminosäure Cystein (Abbildung 1). Cystein wiederum wird unter anderem zur Synthese von Cysteinproteasen und des Antioxidans Glutathion benötigt. Das in der Cystinose lysosomal akkumulierte Cystin kann nicht zur Synthese von Cystein verwendet werden und macht somit eine suffiziente Synthese des

Glutathions unmöglich. Durch den Glutathionmangel kommt es zu einer unzureichenden Neutralisierung von Sauerstoffradikalen, zu einer erhöhten Apoptoserate betroffener Zellen und zu einer Schädigung von Mitochondrien (7, 21). Durch die verminderte Expression der Cysteinproteasen wird die lysosomale Dynamik langfristig verändert.

Die Mitochondrien zeigen sich in cystinotischen Zellen morphologisch und funktionell verändert: cystinotische Mitochondrien präsentieren sich in der konfokalen Mikroskopie als runde, nicht-filamentöse Strukturen und zeigen eine kondensierte Matrix mit veränderten Cristae in der Elektronenmikroskopie (22). Sansanwal et al. berichteten über eine verminderte Produktion des Adenosintriphosphats (ATP) in cystinotischen Mitochondrien aufgrund einer Malfunktion des Komplexes I der Atmungskette durch ein Fehlen einer seiner wesentlichen Untereinheiten (23). Während der physiologischen und vermehrt bei dysfunktionaler Zellatmung kommt es zu einer Akkumulation von Sauerstoffradikalen (24). Dies könnte den Grund für die Dysfunktion gerade der proximalen Nierentubuluszellen darstellen, die durch ihren hohen ATP-Bedarf besonders sensitiv auf eine Störung der ATP-Produktion reagieren. Darüber hinaus ist das Nichtfunktionieren der Atmungskette in den Mitochondrien maßgeblich an der Auslösung der Autophagie beteiligt. So konnte man in cystinotischen Zellen eine erhöhte Anzahl reaktiver Sauerstoffspezies nachweisen, die unter anderem zu Stress im endoplasmatischen Retikulum (ER) führen und auf diesem Weg die Aktivierung präautophagosomaler Strukturen triggern (25).

5.2. Phänotypen und extraokuläre Manifestationen der Cystinose

5.2.1. Infantile nephropathische Cystinose

Die infantile nephropathische Cystinose stellt die Hauptursache eines renalen Fanconi-Syndroms, einer Funktionsstörung des Energiehaushalts der proximalen Nierentubuluszellen, in der Kindheit dar (1). Die Cystinosin-Depletion der proximalen Tubuluszellen, führt zu einer Reabsorptionsstörung der Niere und folglich zu einem Verlust zahlreicher Elektrolyte, wie Calcium oder Phosphat und dem Verlust von Glucose und zahlreicher Proteine, wie Albumin oder beta-2-Mikroglobulin. Renale Veränderungen, genauso wie korneale Cystinkristalle, können schon im 6.-12. Lebensmonat nachgewiesen werden. Betroffene Kinder leiden somit früh an Polydipsie, Polyurie und einer Wachstumsretardierung. Eine terminale Niereninsuffizienz im Rahmen des Fanconi-Syndroms führt nicht selten zu einer Dialysepflichtigkeit und der

Notwendigkeit einer Nierentransplantation. Die Lebenserwartung ist in der nephropathischen Cystinose aufgrund des chronischen Nierenversagens und zahlreicher extrarenaler Manifestationen reduziert (4).

Die typische Wachstumsretardierung ist durch ein Zusammenspiel aus einer Azidose, Rachitis, Mangelernährung, gestörter Nierenfunktion und direkter Cystinkristallablagerung im Knochen bedingt (26). In der Knochendichtemessung via Dual-Röntgen-Absorptiometrie fand sich eine signifikant reduzierte mineralisierte Knochensubstanz im Verhältnis zum Knochenvolumen. Die Patienten zeigen somit zusätzlich eine erhöhte Frakturneigung (27).

Anschließend entwickeln sich die kristalline Keratopathie und zahlreiche weitere extrarenale Manifestationen. Die Ablagerung von Cystinkristallen vor allem im Hornhautstroma verursacht eine Streuung des hineinfallenden Lichts und somit eine schwere Photophobie verbunden mit einem (willkürlichem) Blepharospasmus (11).

Bindehautkristalle zeigen sich als goldgelbe, hyperreflektive Ablagerungen, die die Bindehaut matter erscheinen lassen. Korneakristalle sind vor allem früh in der Spaltlampenbiomikroskopie sichtbar, als goldgelbe, nadelförmige, hyperreflektive korneale Trübungen in der gesamten Hornhautdicke mit Betonung des Stromas (Abbildung 2).

Zu den extrarenalen Manifestationen zählen unter anderem der Hypothyreoidismus durch eine Atrophie des follikulären Gewebes der Schilddrüse und die Rachitis aufgrund des Calcium- und Phosphatmangels (28). So benötigen 75% aller Patienten ab dem 10. Lebensjahr eine medikamentöse Supplementation mit L-Thyroxin. (29) Eine früh begonnene Cysteamintherapie kann den Beginn der L-Thyroxin-Substitution verhindern oder deutlich verzögern (26).

Bei männlichen Patienten wird über einen primären hypergonadotropen Hypogonadismus mit verringertem Testosteron-Spiegel und erhöhtem luteinisierendem Hormon (LH)- und Follikel-stimulierendem Hormon (FSH)-Spiegel berichtet (30). Die Pubertät beginnt verzögert im Alter von 16-17 Jahren. Eine mikroskopische Untersuchung der Testes ergab eine Akkumulation von Cystinkristallen, einhergehend mit einer ausgeprägten Fibrose (31, 32).

Im Gegensatz hierzu ist der weibliche Zyklus nicht beeinträchtigt. Reiss et al. berichteten über eine erfolgreiche Schwangerschaft einer Cystinose-Patientin mit Geburt eines gesunden Kindes (33).

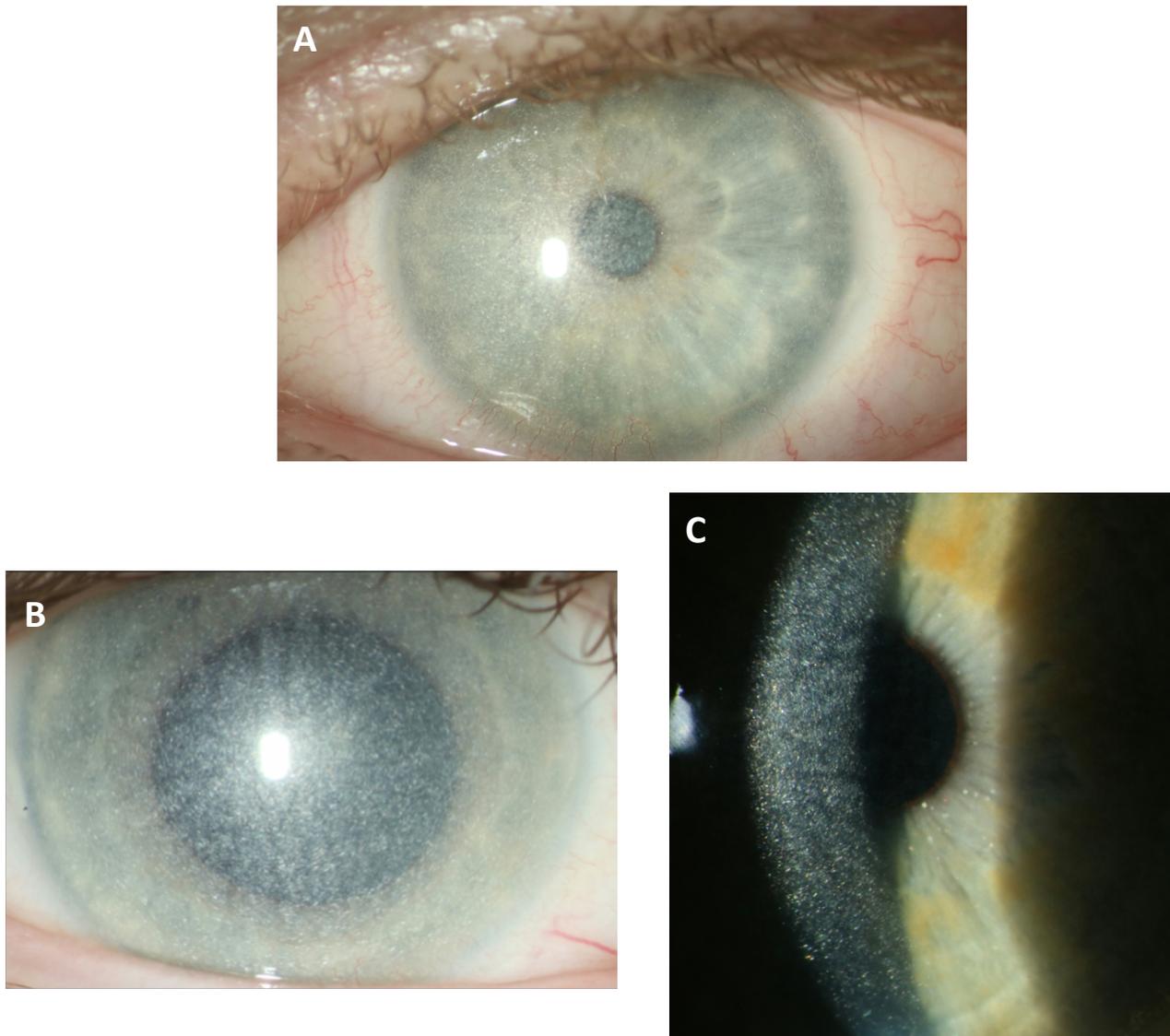


Abbildung 2: Spaltlampenfotografien eines Cystinosepatienten. Konjunktivale Cystinkristalle lassen die Bindehaut matter erscheinen. Inferior ist eine beginnende Vaskularisation der Kornea sichtbar (A). Cystinkristalle zeigen sich als goldgelbe, kristalline Einlagerungen im Hornhaustroma (B, C). Im Bild C sind zusätzlich einzelne Iriskristalle erkennbar.

Eine weitere häufige endokrinologische Komplikation stellt einen durch die Cystinablagerung verursachten Diabetes mellitus dar. Durch die Cystinakkumulation kommt es zu einer Hyperplasie der Beta-Zellen und folglich zu einer Beeinflussung des

18

Insulinmetabolismus: Die C-Peptid Produktion und Insulin Sekretion ist vermindert (34). Die Hälfte der Patienten entwickelt im Verlauf eine Glukoseintoleranz, die durch eine im Rahmen der Nierentransplantation durchgeführte Cortisontherapie im Rahmen der Nierentransplantation exazerbiert werden kann (35).

Hinzu kommen motorische Beeinträchtigungen in Form einer fortschreitenden distalen Muskelschwäche aufgrund eines zusätzlichen Carnitinmangels und Schluckbeschwerden, sowie eine heisere Stimme im Spätstadium (36-38). Die Schluckbeschwerden äußern sich in absteigender Häufigkeit in langsamem Essen, Obstruktion der Atemwege und Würgereiz, sowie Schmerzen beim Schlucken (39). Elektronenmikroskopisch können Cystinkristalle in den Kollagenfibrillen des Perimysiums dargestellt werden (40).

Gastroenterologisch bestehen häufig eine Hepato- oder Splenomegalie als Spätmanifestationen (4). Elektronenmikroskopisch können hypertrophierte Kupffer-Zellen nachgewiesen werden, die Cystinkristalle enthalten (41). Die Hypertrophie kann in einzelnen Fällen durch die Kompression von Sinusoiden und dem folglich reduzierten Blutfluss aus der Pfortader in die Leber zu einer nicht-zirrhotischen portalen Hypertension führen. In Biopsien einer autopsierten Leber fand man eine auffällige Ablagerung von Kollagen in dilatierten Sinusoiden umgeben von atrophierten Hepatozyten ohne Hinweis auf ein Entzündungsgeschehen (42).

Kardiovaskulär kann eine Renin-abhängige arterielle Hypertension vorliegen, die sich nach Nierentransplantation meist legt. Ueda et al. beschrieben eine Kalzifizierung verschiedener Gefäße, besonders der Koronararterien, im Spätstadium der Erkrankung (43). Diese verhält sich direkt proportional zur Therapiedauer mit Cysteamin (44). Man geht davon aus, dass die Cystinakkumulation, unabhängig von bestehender arterieller Hypertension, Hypercholesterinämie und einem durch die Vitamin D-Supplementierung gestörten Calcium- und Phosphatmetabolismus, einen Hauptrisikofaktor für die Entstehung der Atherosklerose darstellt. Die mögliche Entwicklung einer Atherosklerose macht eine sorgfältige Kontrolle des Gefäßstatus zur Prävention einer Myokardischämie vor allem bei älteren Cystinose-Patienten notwendig. In einzelnen Fällen führten Cystinkristallablagerung in den Histozyten des Interstitiums in direkter Nähe zu den Myozyten des Herzmuskels zu einer wahrscheinlich restriktiven Kardiomyopathie (40, 45). Zusätzlich besteht die Gefahr der Entwicklung von Aortenaneurysmata mit der teils letalen Komplikation einer spontanen Ruptur (46).

Selten wird eine Beteiligung des zentralen Nervensystems in Form einer cerebellären Atrophie oder eines funktionellen Defizits der Pyramidenbahn beobachtet. Eine Enzephalopathie kann sich als Bradykinese, Spastik und/oder voranschreitende Demenz manifestieren (47). Elektronenmikroskopisch, konnte eine Cystinkristallbildung im Zytoplasma der Perizyten und im Parenchym des Marklagers beobachtet werden. Die Perizyten besitzen eine die Blut-Hirn-Schranke stabilisierende Funktion. Somit kann eine perizytäre Cystinakkumulation zu einer indirekten Schädigung der Hirnsubstanz durch eine Destabilisierung der Blut-Hirn-Schranke mit sekundärer Durchlässigkeit von potenziellen Noxen führen (47, 48). Eine kortikale Atrophie kann in der Magnetresonanztomografie visualisiert werden (49). Zudem wurde eine idiopathische intrakranielle Hypertension aufgrund einer reduzierten Nervenwasserresorption durch die Cystinablagerung in den intraventrikulären Arachnoidealzotten beschrieben (50).

Eine geistige Retardierung aufgrund der Schädigung der Hirnsubstanz liegt im Regelfall nur bedingt vor. Die meisten Patienten zeigen einen Intelligenzquotienten im durchschnittlichen Bereich. Ebenso ist die Sprachverarbeitung und die Verarbeitung auditorischer Stimuli nicht beeinträchtigt. Nichols et al. berichteten allerdings über Fälle mit einer kortikalen Atrophie und signifikant zunehmender Beeinträchtigung des Kurzzeitgedächtnisses (49). Die betroffenen Patienten schneiden in Tests für das visuelle Gedächtnis schlechter ab als das gleichaltrige Normalkollektiv. Sie zeigen ein Defizit vorwiegend in den visuospatialen Funktionen, die es ermöglichen räumliche Proportionen zwischen verschiedenen Objekten abzuschätzen. Dies wurde bei allen CTNS-Trägern beobachtet, unabhängig vom Ausmaß der Cystinkristallakkumulation. Man geht ursächlich von einer asymmetrischen Entwicklung der linken und rechten Gehirnhälfte aus (51). Die Defizite sind somit auch schon in einer sehr jungen Patienten-Population im Alter von vier bis sieben Jahren nachweisbar (52).

5.2.2. Juvenile Cystinose

Den zweiten Phänotyp der Cystinose stellt die Juvenile Cystinose dar. Sie tritt lediglich in fünf Prozent der Fälle auf. Abweichend von der infantilen Form zeigt sich die Initialsymptomatik erst im jugendlichen Alter. Als Erstsymptom fällt mitunter nur eine isolierte Polyurie auf und renale und extrarenale Beteiligungen sind anfänglich nur mild ausgeprägt.

5.2.3. Okuläre Cystinose

Die okuläre Cystinose ist die dritte nosologische Entität, die sich phänotypisch ausschließlich mit einer kornealen Ablagerung der Cystinkristalle zeigt und sich mit einem ‚late onset‘ erst im Erwachsenenalter manifestiert.

5.3. Die Rolle des Augenarztes in der Diagnosefindung

Die vorliegende Arbeit befasst sich ausschließlich mit Patienten mit genetisch-bestätigter infantiler nephropathischer Cystinose. Der klinische Verdacht einer Cystinose ergibt sich aus dem Nachweis von Cystinkristallen in der Kornea in Kombination mit einem kindlichen Fanconi-Syndrom. Das Auge dient quasi als „Fenster zur Cystinose“, da sich die Korneakristalle bereits früh neben den Cystinkristallen in der Niere manifestieren und Nierenbiopsien in jungem Alter nicht durchgeführt werden können. Die Nierenfunktionsparameter sind aufgrund der großen funktionellen Reserve der Niere zu Beginn häufig normal (11). Der Augenarzt ist somit für die Diagnosefindung der Cystinose essenziell. Als Vertreter der ophthalmologischen Fachdisziplin kann er mittels Spaltlampenbiomikroskopie schon in der Frühphase der Erkrankung die Cystinkristalle direkt sehen und quantifizieren. Die Diagnosesicherung erfolgt molekulargenetisch sowie über die Bestimmung des Cystinspiegels in den Leukozyten.

Neben der Spaltlampenbiomikroskopie, können Cystinkristallablagerungen mithilfe multimodaler Bildgebung, wie der optischen Kohärenztomografie des vorderen Augenabschnitts (Anterior segment OCT/AS – OCT), der in vivo konfokalen Mikroskopie (IVCM) oder der optischen Kohärenztomografie des hinteren Augenabschnitts in Form von punktuellen Hyperreflektivitäten dargestellt werden (53). Bislang ist keine objektive Messmethode zur Quantifizierung der kornealen Cystinkristallablagerungen beschrieben. Ebenso ist es mittels der bestehenden Messmethoden nicht möglich ein Tiefenverteilungsmuster der kornealen Kristallablagerungen darzustellen.

In der klinischen Routine bislang am besten etabliert ist der „Corneal cystine crystal score“ (CCCS) nach Gahl. Dabei handelt es sich um ein subjektives 13-stufiges Bewertungssystem basierend auf einer Bibliothek von Spaltlampenphotografien von Hornhäuten mit zunehmender Kristalldichte (54). Die Beurteilung erfolgt durch einen subjektiven Bildvergleich mit einem online-verfügbaren Fotoatlas. Allerdings ist eine standardisierte, reproduzierbare Aufnahme der Fotografien häufig durch eine mangelnde

Compliance der Patienten erschwert. Bei deutlicher Blendeempfindlichkeit und teils Blepharospasmus der Patienten gelingt oft nur eine Aufnahme und die erforderliche Aufnahmequalität wird teils nicht erreicht. Objektive, nicht untersucherabhängige Untersuchungsmethoden wären wünschenswert, um die Schwere und die Tiefenverteilung der Cystinkristallakkumulation akkurat einordnen zu können und einen genauen Verlauf darstellen zu können. Es wird ein repräsentativerer, objektiver Biomarker benötigt, um den Erfolg und die langfristige Therapieadhärenz zur topischen Therapie effizient überwachen zu können. Ein solches Monitoring kann dazu beitragen, die Patientencompliance über einen direkten Feedbackmechanismus zu verbessern.

Im Hinterabschnitts-OCT wurden Kristallablagerungen im Rahmen von Fallberichten in allen Netzhautschichten beschrieben (53). Es existiert bislang keine standardisierte Auswertung von retinalen OCTs in Cystinosepatienten.

5.4. Stand der Wissenschaft und Therapieoptionen

Die aktuelle Therapie der Cystinose mit Cysteamin setzt genau am Ursprung der pathogenetischen Kaskade an: im Lysosom. Das Aminothiols Cysteamin konvertiert das in den Lysosomen akkumulierte Cystin in ein gemischtes Cysteamin-Cystin-Disulfid, welches analog zu Lysin die Lysosomen durch einen kationischen Aminosäuretransporter PQLC2/LAAT-1 verlassen kann (Abbildung 1). Cysteamin kann Zellen somit von circa 90% ihres Cystin-Gehalts befreien. Die Cysteamin-Therapie verzögert sowohl das Auftreten der kornealen Kristallbildung als auch aller weiteren extraokulären Manifestationen wie des renalen Fanconi-Syndroms und führt letztlich zu einer Verlängerung der Lebenserwartung.

Cysteamin ist in einer oralen Form (CystagonTM/ProcysbeeTM) für die systemische Therapie zugelassen. Da die Hornhaut als bradytrophes Gewebe der systemischen Therapie nicht zugänglich ist, muss Cysteamin zur Reduktion der kristallinen Keratopathie in einer löslichen Form als Lokalthherapie (CystaranTM/ Cystadrops[®] Augentropfen) appliziert werden (3).

5.4.1. Orale Therapie

Cysteaminhaltige Tabletten (Cystagon[®]) werden unmittelbar nach Diagnosestellung einer manifesten nephropathischen Cystinose eingesetzt. Sie haben sich als Goldstandard

in der Therapie der Cystinose etabliert. Das Ansprechen der Therapie variiert jedoch je nach Mutation und noch unbekanntem Umweltfaktoren (55).

Eine Dosisanpassung und Monitoring des Erfolgs der systemischen Therapie beziehungsweise der Einnahme-Compliance erfolgt durch die regelmäßige Messung der leukozytären Cystinspiegel (56). Das Ziel der oralen Therapie ist es den leukozytären Cystinspiegel $< 1 \text{ nmol Hemicystin/mg Protein}$ zu senken. Je nach Körperoberfläche und Alter werden individuell unterschiedliche Dosen von $1,3 \text{ g/m}^2 - 2 \text{ g/m}^2$ viermal täglich verabreicht.

Durch die Reduktion des intralysosomalen Cystin-Gehalts führt Cystagon® zu einer Prävention der Entwicklung renaler und extrarenaler Manifestationen (57-60). Ein Jahr der Cystindepletion erhält die renale Funktion um ein weiteres Jahr (61). Die Lebenserwartung kann durch die Therapie mit Cystagon® somit um circa sechs bis zehn Jahre verlängert werden. Den größten Therapieerfolg beobachtet man in Kindern, die vor Erreichen des fünften Lebensjahrs mit cysteaminhaltigen Tabletten therapiert wurden. Wird die Therapie später begonnen oder ist die Compliance der Medikamenteneinnahme reduziert, ist der Effekt auf den Erhalt der Nierenfunktion geringer und es kommt zu einem früheren Eintreten eines chronischen Nierenversagens (61-63).

Durch eine regelmäßige Medikamenteneinnahme kommt es auch zur Verzögerung des Auftretens einer Myopathie, eines Diabetes mellitus, eines Hypothyreoidismus, oder einer pulmonalen Insuffizienz (64). In weiteren parenchymalen Organen, wie der Leber, des Pankreas, der Lunge und der Milz kann sich der Cystingehalt unter Cysteamintherapie um den Faktor 5 - 90 reduzieren (65, 66). Es kann zudem zu einer Steigerung des Größenwachstums kommen (26).

Die aktuelle Therapie führt jedoch nur zu einer Verzögerung der Entwicklung der Symptom-Manifestationen, nicht zu einer Verhinderung. Es sind durchaus Fälle ohne oder mit nur geringem Ansprechen auf die Cysteaminbehandlung bekannt, trotz frühem Beginn der Medikamentengabe zwei bis drei Jahre nach der Geburt. So entwickelten einige Patienten trotz Therapie eine terminale Niereninsuffizienz (67, 68). Diese kann partiell durch eine Maldosierung oder unzureichende Therapiecompliance bedingt sein. Ein wichtiger Faktor ist jedoch, dass die Therapie mit Cysteamin lediglich die lysosomale Cystinakkumulation behandelt. Der Einfluss des fehlenden Cystinosins auf die Autophagie-Kaskade oder die Synthese des Glutathions und Mitochondriale Dysfunktion

wird durch diese Therapieform nicht angesprochen. Auch auf die korneale Kristallbildung hat die orale Cysteamintherapie keinen signifikanten Einfluss.

Da retinale und choroidale Blutversorgung mit dem systemischen Blutfluss verbunden sind, kann eine systemische Therapie retinale und choroidale Strukturen erreichen (69). Es wurde ein vermehrtes Auftreten einer cystinotischen Retinopathie bei Patienten, die eine orale Cysteamin-Therapie pausierten, beobachtet (70, 71).

Aufgrund der verschiedenen Nebenwirkungen der oralen Therapie ist es jedoch häufig schwierig -insbesondere bei Kindern und Jugendlichen- eine adäquate Therapieadhärenz zu erreichen (56). Die orale Therapie ist für die Patienten im Alltag sehr belastend. In 35% der Fälle kann es durch die Einnahme von Cystagon®-Tabletten zu zahlreichen unerwünschten Nebenwirkungen, wie Erbrechen, Übelkeit, Diarrhö und Appetitsverlust kommen. Orales Cysteamin führt durch den Zerfall des Cystin-Disulfids zu einem schwefeligen Mund und -Körpergeruch, der eine enorme psychosoziale Belastung der meist jungen Patienten mit sich bringt. Durch die Halitose sind die Patienten häufig sozial ausgegrenzt (72). Um einen effizienten Therapiespiegel zu halten, muss Cystagon® vier Mal täglich verabreicht werden, dazu eine Vielzahl von Medikamenten zur symptomatischen Behandlung der begleitenden Multiorganmanifestationen. Die Einnahme kann durch eine im Rahmen der Cystinose auftretende Myopathie mit Dysphagie bei Beteiligung der Kau- und -Schluckmuskulatur zusätzlich erschwert werden.

Bis heute ist der leukozytäre Cystinspiegel der einzige Biomarker, der zum Monitoring des Erfolgs einer oralen cystinabbauenden Therapie verwendet wird (11). Dieser Biomarker spiegelt jedoch nicht die langfristige Therapiecompliance wider. Seine Konzentration ist abhängig von der Zeit zur letzten oralen Einnahme des Cystinabbauenden Medikaments und kehrt erst sechs Stunden nach der oralen Verabreichung wieder auf seinen Ausgangswert zurück (4). Daher wird ein repräsentativerer und stabilerer Biomarker benötigt, um den Erfolg und die langfristige Therapieadhärenz zur systemischen Therapie effizient überwachen zu können. Ein solches Monitoring könnte dazu beitragen, die Patientencompliance zu verbessern.

5.4.2. Topische Therapie

Cysteamin-haltige Augentropfen existieren in drei Applikationsformen, einerseits den für die topische Therapie der Cystinose zugelassenen wässrigen Cystaran™-Augentropfen und den gelförmigen Cystadrops®, andererseits können wässrige Cysteaminhydrochlorid

0.5% Augentropfen nach NRF-Rezeptur verordnet und von ausgewählten Apotheken in Deutschland hergestellt werden.

Cystaran™ Augentropfen können in Europa nur außerhalb des durch die Arzneimittelbehörden zugelassenen Gebrauchs verschrieben werden. Wie auch die in Apotheken hergestellten Cysteamintropfen bedürfen diese einer Applikation von sechs bis zwölf Mal am Tag und erfordern eine Aufbewahrung in Kälte um die Oxidation des Cysteamins zu Cystamin zu verhindern. Aufgrund zahlreicher Nebenwirkungen wie Photophobie, Brennen, Schmerzen, Rötung und Gesichtsfelddefekten und der Notwendigkeit der häufigen Applikation, ist auch hier die Therapiecompliance deutlich reduziert (73).

Cystadrops® Augengel ist in Europa zugelassen, bedarf als Gel einer nur vier Mal täglichen Applikation und kann bei Raumtemperatur gelagert werden. Die Patienten berichten über ein Brennen direkt nach der Applikation. Die Therapiecompliance zeigt sich verglichen zu den wässrigen Augentropfen weniger reduziert.

Eine häufig assoziierte Sicca-Symptomatik kann durch die Gabe von Tränenersatzmitteln behandelt werden.

In einem multidisziplinären Ansatz sollte immer auch die Lebensqualität der Patienten mit evaluiert werden, da die häufige Instillation der Augentropfen den Alltag der Patienten erheblich beeinflusst (74).

In Entwicklung sind daher Cysteamin-haltige Kontaktlinsen, die durch das Versetzen mit Vitamin E zu einer verzögerten Freisetzung des Medikaments führen. Das zweistündige Tragen der Linsen pro Tag soll mit gleichem therapeutischem Effekt, ein Umgehen der hohen Tropffrequenz ermöglichen (75).

Hornhauttransplantationen zur Behandlung der kornealen Cystinkristallablagerungen in Spätstadien zeigten initial teils gute Ergebnisse, dennoch fand man im Verlauf eine sekundäre Ablagerung von Cystinkristallen in den Zellen des Hornhauttransplantats mit einem Rezidiv der Beschwerdesymptomatik (76, 77).

Interessanterweise stellt die augenärztliche Therapie aufgrund von lokalen Nebenwirkungen wie Brennen oder Verschwommensehen und aufgrund der teils aufwendigen Lagerung der Tropfen sowie der Notwendigkeit einer häufigen Applikation

für die meisten Patienten eine noch viel größere Herausforderung dar als die systemische Therapie, sodass die Compliance mitunter schwierig ist.

Für die Patienten essentiell und dringend gewünscht sind daher regelmäßige augenärztliche Kontrollen zum Feedback sowie eine interdisziplinäre Zusammenarbeit mit den behandelnden Nephrologen - insbesondere im frühen Erwachsenenalter.

5.4.3. Ausblick auf zukünftige Therapiestrategien

Die Therapie mit Cysteamin führt lediglich zu einer Verzögerung des Auftretens okulärer und extraokulärer Manifestationen, nicht zu deren Verhinderung. Da ein fehlendes Ansprechen der Behandlung mit Cysteamin gerade bei den schweren Formen der Cystinose beschrieben wird (78, 79), bedarf es der Entwicklung neuer Therapiestrategien, die die weiteren Funktionen des Cystinosins adäquat ansprechen.

So wird in Mausmodellen das Isoflavanoid Genistein zur Induktion der Expression und des nukleären Transfers des Transkriptionsfaktors EB mit Erfolg eingesetzt (80). Eine diätetische Genistein Supplementation könnte zu einer Abnahme des lysosomalen Cystingehalts führen.

In zahlreichen weiteren Studien wurde der positive Nutzen einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation auf die Entwicklung der Cystinose im Mausmodell beschrieben. Hämatopoetische Stammzellen (HSCs) wurden mithilfe eines Lentivirus genetisch derart verändert, dass sie ein funktionierendes Cystinosin-Transgen produzieren. Transduzierte Zellen waren fähig, den Cystingehalt in allen Geweben zu verringern, indem sie befallene Zellen ersetzen, oder mit diesen fusionieren. Dies funktioniert einerseits nach allogener Transplantation von Wildtyp-HSCs in CTNS $-/-$ Mäusen, andererseits nach autologer Transplantation genveränderter HSCs.

Nach Implantation von Wildtyp-HSCs aus dem Knochenmark mit funktionierender Produktion des Cystinosins in Mäuse mit mutiertem CTNS-Gen, kam es zu einem Wachstum von Cystinosin-produzierenden Zellen auch im Interstitium der Niere. Dies führte zu einer Verbesserung der Nierenfunktion, wenn eine hohe Anzahl transduzierter Zellen vorhanden war (81). Auch konnte der Cystingehalt in zahlreichen weiteren Geweben, wie Auge, Herz, Niere, Leber, Muskel und Milz reduziert werden. Das Transgen wurde bis zu einem Jahr nach Transplantation effizient produziert (10, 82). Im Hinblick auf die Augen zeigten Rocca et al. im Mausmodell, dass mithilfe der

systemischen Transplantation von Cystinosin-produzierenden hämatopoetischen Stammzellen die Cystinkristalldichte auch in der Hornhaut deutlich reduziert werden kann. So fanden die Autoren eine Reduzierung des CCCS nach Gahl und eine Wiederherstellung der kornealen Struktur (83). Hämatopoetische Stammzellen wurden zudem in der Sklera, Ziliarkörper, Retina, Chorioidea und der Linse nachgewiesen. Rocca et al. berichteten, dass es nach einer HSC-Transplantation neben einer reinen Population der Gewebe mit funktionierenden Cystinosin-produzierenden Zellen zu einer Entwicklung von Tunneling Nanotubes (TNTs) exprimierenden Makrophagen aus Abkömmlingen der HSCs kommt (83). TNTs bezeichnen kleine dünne Membrankanäle, welche den interzellulären Transfer verschiedener Moleküle ermöglichen. Durch diese Tunnel können cystinosintragende Lysosomen in die erkrankte Zelle transportiert werden. Die Stärke des Effekts variiert abhängig von der Menge der transplantierten HSCs. So kommt es bei einer großen Menge an transplantierten HSCs zu einer ausgeprägten Abnahme der Kristalldichte und vice versa.

Elmonem et al. berichteten kürzlich über die erste humane allogene Stammzelltransplantation bei einem 16-jährigen, an infantiler Cystinose erkranktem Patienten. Transplantiert wurden allogene HSCs aus dem peripheren Blut eines vollständig HLA-gematchten Donors. In der Posttransplantationsphase kam es zur Entwicklung einer „Graft-versus-host“-Disease, einer unerwünschten Reaktion der T-Lymphozyten der transplantierten Stammzellen mit den Wirtszellen. Der Patient verstarb an einer der zweiten HSC-Transplantation folgenden nun therapieresistenten Graft-versus-host-Reaktion 35 Monate nach der ersten HSC-Gabe. In Bezug auf einen möglichen therapeutischen Effekt der Transplantation, zeigte sich eine Inkorporation des Wildtyp-Allels in das Gewebe im Rahmen eines Gentransfers. Es kam zu einer fokalen Expression des Cystinosins in nicht-hämatologischen Epithelzellen in verschiedenen Organen, wie Ösophagus, Magen, Niere und Leber. Symptomatisch konnte eine Abnahme der Polyurie und Photophobie beobachtet werden (72).

Letztlich kann durch die hämatopoetische Stammzelltransplantation möglicherweise durchaus ein positiver therapeutischer Effekt auf die Cystinose festgestellt werden, den es in Bezug auf mögliche Komplikationen der Immunsuppression und Reaktion des Transplantats vorsichtig abzuwägen gilt.

6. Zielsetzung

In Anbetracht der gegenwärtigen und zukünftigen effektiven Therapieoptionen ist es von besonderer Bedeutung die Compliance der Medikamenteneinnahme der Cystinosepatienten zu verbessern und den damit in Zusammenhang stehenden Verlauf der Erkrankung günstig zu beeinflussen. Die Entwicklung von für den Arzt und den Patienten objektivierbaren Biomarkern stellt einen ganz wesentlichen Baustein für die Therapiekontrolle dar.

Die Arbeit geht folgenden Zielsetzungen nach:

- 1) An der Augenklinik der LMU war die Möglichkeit gegeben, im umfassendsten Patientenkollektiv Europas mit 56 Patienten klinische und apparativ-zusatzdiagnostische Daten strukturiert zu erheben und die okulären Manifestationen der infantilen nephropathischen Cystinose mittels multimodaler Bildgebung zu erfassen. Neben klinischen Befunden sollten Spaltlampen-Fotografien, Vorderabschnitts-OCTs, Hinterabschnitt-OCTs und ein Fragebogen zur subjektiven Sehqualität ausgewertet werden.
- 2) Im Rahmen der multimodalen Bildgebung sollte eine semiautomatisierte Messmethode entwickelt werden, die es erlaubt mit Hilfe eines spektralanalytischen Algorithmus das Ausmaß und die Verteilung der kornealen Cystinkristallablagerungen im OCT des vorderen Augenabschnitts zu quantifizieren.
Ebenso sollte eine erste Messmethode für die Quantifizierung retinochoroidaler Cystinkristalle mittels des OCT des hinteren Augenabschnitts entwickelt werden.
- 3) Es war ein Ziel der dargestellten Untersuchungen anhand der im OCT ermittelten Größen, unter Einbeziehung klinischer Parameter, einen Biomarker zu entwickeln, der es erlaubt das Krankheitsbild zu typisieren, die aktuelle Krankheitsaktivität im Querschnitt zu graduieren, im prospektiven Verlauf zu objektivieren und die Effizienz therapeutischer Maßnahmen zu supervidieren. Die Rückmeldung des individuellen Therapieerfolgs an den Patienten kann langfristig durch eine Verbesserung der Therapieadhärenz zu einer günstigen Beeinflussung des Verlaufs führen. Der Nachweis eines Biomarkers soll dazu beitragen, unser Verständnis der unterliegenden Pathomechanismen der Cystinose zu erweitern.

4) Es war eine weitere Zielsetzung der Arbeit, die neu etablierten Messmethoden in unserem Kollektiv anzuwenden. So war es möglich, die demografischen und klinischen Daten unseres Kollektivs standardisiert zu evaluieren. Die anhand der OCT-Analyse erhobenen morphologischen Parameter der Quantität und Topistik der Cystinkristallablagerungen wurden im Cystinose-Kollektiv mit klinischen Befunden inklusive Spaltlampenfotos, mit der visuellen Funktion, mit dem Score der mittels Fragebogen ermittelten subjektiven Sehqualität, mit der Medikation und mit demographischen Daten in Beziehung gesetzt und bezüglich korrelativer Zusammenhänge überprüft. Durch die Anbindung an den überregionalen, deutschlandweiten Netzwerkverbund der interdisziplinären Cystinose-Sprechstunde war es möglich die erhobenen okulären Befunde auch mit systemischen laborchemischen und humangenetischen Parametern, wie dem leukozytären Cystinspiegel im Blut, der Art der Gen-Mutation, der Dauer der oralen Therapie und Parametern der Nierenfunktion zu korrelieren. Der interdisziplinäre Expertise-Austausch der Spezialambulanzen zur Erhebung und Analyse patientenbezogener Daten war für die durchgeführte Untersuchungsreihe von besonderer Bedeutung.

7. Material und Methoden

7.1. Patientenkollektiv

Im Rahmen einer retrospektiven Querschnittsstudie wurden in Zusammenarbeit mit der Cystinose Stiftung e.V. und dem Klinikum Rosenheim, Daten von Patienten mit genetisch bestätigter infantiler nephropathischer Cystinose im Rahmen der deutschen interdisziplinären Cystinosesprechstunde zwischen 2018 und 2019 erhoben.

Alle Messungen folgten den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki von 1964 und ihren späteren Versionen. Die Ethikkommission der Bayerischen Landesärztekammer hat am 11. März 2015 auf die Genehmigung dieser Studie verzichtet, da das geplante Projekt einer interdisziplinären Cystinose-Datenbank nicht unter die Beratungspflicht nach § 15 der Berufsordnung für Ärzte in Bayern fällt. Von allen beteiligten Patienten wurde die Zustimmung zur Nutzung ihrer Daten für die Analyse und wissenschaftliche Veröffentlichung eingeholt. Alle augenärztlichen Untersuchungen wurden an der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Die Genehmigung der Ethikkommission für die Untersuchung der gesunden Kontrollpersonen wurde bereits im Rahmen einer früheren retrospektiven Studie unserer Forschungsgruppe eingeholt. Alle Verfahren wurden von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität genehmigt (508/14). Eine zusätzliche Genehmigung ist nach den Bestimmungen der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität nicht notwendig, da es sich um eine retrospektive Studie mit anonymisierten Daten handelt, bei der der Forscher Teil des Behandlungsteams ist. In dieser Situation ist die Einsicht in die Patientendaten nach dem bayerischen Krankenhausgesetz, durch den Behandlungsvertrag zum Zwecke der Forschung beziehungsweise des Erkenntnisgewinns gestattet.

Für die Analyse der Vorder- und Hinterabschnitt – OCTs, konnte nur eine Stichprobe verwendet werden. Aufgrund mangelnder Compliance (Blepharospasmus) oder reduzierter Bildqualität (Hornhauttrübung) während der ophthalmologischen Untersuchung und während der Aufnahme der Bilder, konnte ein Teil der Patienten nach Ermessen des Untersuchers als ‚drop outs‘ keinen Eingang in das Untersuchungskollektiv finden. Diese untersuchten Kollektive sind in der Arbeit als „Hornhautkollektiv“ und „Netzhautkollektiv“ benannt.

Allgemeine Ein- und Ausschlusskriterien sind in Tabelle 1 dargestellt.

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
Genetisch bestätigte infantile nephropathische Cystinose	Akute, klinisch signifikante okuläre Affektion
Alter \geq 1 Jahr	Hornhaut-Pathologie: Frühere Hornhautoperation, -dystrophie oder -verletzung
	Unfähigkeit des Patienten an einer ophthalmologischen Untersuchung teilzunehmen (schlechter körperlicher oder psychischer Zustand)

Tabelle 1.: Ein- und Ausschlusskriterien des Cystinosekollektivs

7.2. Klinisch-ophthalmologische Untersuchung

7.2.1. Bestimmung Sehschärfe und Augeninnendruck

Bei allen Patienten wurde eine vollständige ophthalmologische Untersuchung mit Erhebung der bestkorrigierten Sehschärfe, applanatorischer Augeninnendruckmessung nach Goldmann, Spaltlampenbiomikroskopie und Funduskopie durchgeführt.

Die bestkorrigierte Sehschärfe („best corrected visual acuity“, BCVA) wurde unter Verwendung der ETDRS (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study) - Standardtafel in vier Metern Entfernung geprüft. Für die statistische Auswertung wurde der ETDRS-Visus (dezimal) in logMAR (Logarithm of the Minimum Angle of Resolution) konvertiert. Im LogMAR-System wird die Sehschärfe in Bezug auf den Logarithmus des minimalen Auflösungswinkels bewertet und die dezimale Sehschärfe wurde nach der folgenden Formel in logMAR umgerechnet: $\text{logMAR} = -\log(\text{dezimale Sehschärfe})$ (84, 85).

Zur Bestimmung des Augeninnendrucks erfolgte eine applanatorische Augeninnendruckmessung nach Goldmann.

7.2.2. Spaltlampenbiomikroskopie, Entwicklung stromaler Cystinkristallscore

Im Rahmen der Spaltlampenbiomikroskopie, wurde die Kristallakkumulation für die drei Stromaanteile anterior / mittig / posterior einzeln evaluiert und subjektiv bewertet mit „1“ für Vorhandensein einer Kristallakkumulation im jeweiligen Abschnitt und „0“ für keine Kristallakkumulation. Die Summe dieser Bewertungen ergab den subjektiven stromalen Cystinkristall-Score von 0-3.

7.3. Apparativ diagnostische Untersuchung

7.3.1. Spaltlampenfotografie, CCCS nach Gahl

Zur Aufnahme der Spaltlampenfotografien wurde eine Zeiss Spaltlampe (SL-280, Zeiss AG, Jena, Germany) verwendet. Fotografien der Kornea wurden mittels direkt fokaler Beleuchtung mit einem Strahl von 5mm mit 25facher Vergrößerung aufgenommen, basierend auf den Leitlinien zur Durchführung des standardisierten Gradings nach Gahl (54). Der Schweregrad der Hornhautbeteiligung wurde anhand des standardisierten Gradingsystems nach Gahl, dem Corneal Cystin Crystal Score (CCCS) im

Spaltlampenfoto definiert und nachverfolgt. Das 13-stufige Bewertungssystem basiert auf einer Bibliothek von Spaltlampenfotografien von Hornhäuten mit zunehmender Kristalldichte (54). In 0,25-Schritten wird die Kristallablagerung von 0,00 bis 3,00 bewertet mit null als Platzhalter für keine, und drei für maximale Cystinkristallakkumulation. Der so generierte Score wird in der Auswertung basierend auf der Literatur CCCS genannt.

7.3.2. Optische Kohärenztomografie, physikalische Grundlagen

Die optische Kohärenztomografie diente in der vorliegenden Arbeit als Grundlage für die Entwicklung des ersten objektiven Algorithmus zur Bestimmung des Ausmaßes und der Verteilung kornealer Cystinkristallablagerungen. Ebenso konnte anhand von OCT-Scans erstmalig die retinochoroidale Kristallakkumulation quantifiziert und skaliert werden.

Die optische Kohärenztomographie ist eine der wichtigsten diagnostischen Methoden in der Augenheilkunde. Seit bald zwei Jahrzehnten ist sie im klinischen Alltag etabliert.

Als nicht-invasives Verfahren verwendet sie die Reflexion von Infrarotlicht aus einer externen Lichtquelle vom Augenhintergrund, um unter anderem die Netzhautdicke darzustellen (86).

Die OCT-Aufnahme ist zusammengesetzt aus zahlreichen eindimensionalen A-Scans, die jeweils die Reflexivität eines einzelnen Lichtstrahls am Gewebe im Vergleich zu einem Referenzlichtstrahl beschreiben. Im Genaueren wird die Zeitverzögerung, Eindringtiefe und Intensität des reflektierten Strahles bestimmt (87). Eindringende Breitbandlichtstrahlen des OCT-Geräts werden getrennt und einerseits vom Gewebe, andererseits von einem Referenzspiegel (Referenzlichtstrahl) reflektiert. Es existieren zwei Formen der OCT: Das Time Domain OCT (TD-OCT) und das heute häufiger verwendete Fourier Domain OCT (FD-OCT). Im TD-OCT ist der Referenzspiegel beweglich, sodass die Eindringtiefe des Gewebelichtstrahls durch Verschieben des Spiegels berücksichtigt wird. Die Überschneidung/Interferenz des Referenzlichtstrahls mit dem reflektierten Lichtstrahl aus dem Gewebe, wird im Detektor als Interferenzmuster detektiert und im Folgenden nach sequenzieller Analyse der einzelnen reflektierten Lichtstrahlen aus allen Lichtstrahlen eine Tiefenaufnahme erstellt. In der hier verwendeten Spectral domain OCT (SD-OCT), die einen Teil des FD-OCT darstellt, ist der Spiegel stationär, sodass durch den Wegfall der Motilität des Spiegels eine schnellere Aufnahmesequenz erzielt werden kann. Die Überschneidung/Interferenzen

zwischen den Reflexionen aus dem Gewebe und der Reflexion aus dem Spiegel, wird Spektrum genannt. Die Lichtstrahlen werden nicht sequenziell analysiert, sondern reflektierte Spektren aus allen Gewebetiefen treffen zeitgleich auf eine CCT Kamera, anstelle eines Punktdetektors in der TD-OCT (88). Mithilfe einer Fourier-Transformation, werden die Spektren separiert und im nachgeschalteten Fotodetektor eine Tiefenaufnahme erstellt (89). Das OCT-Signal, das nach vollständiger Reflexion im Punktdetektor beziehungsweise CCT Kamera ankommt, wird Tiefenscan oder A-Scan genannt. Alle A-Scans der Gewebeoberfläche bilden zuletzt ein vollständiges zweidimensionales B-Bild.

Das OCT kreiert somit eine „in vivo Biopsie“ der Retina in hoher Qualität (90). So ist die Bildauflösung im OCT mit einer axialen Auflösung von 1 bis 15 μm , weitaus höher als im konventionellen Ultraschall, vergleichbar mit einem histologischen Schnitt in der Lichtmikroskopie.

7.3.3. Optische Kohärenztomografie, Klinische Anwendung

Die optische Kohärenztomografie kann verwendet werden zur direkten Aufnahme okulärer Strukturen im Vorderabschnitt als Anterior segment OCT (AS-OCT) und im Hinterabschnitt.

OCT des vorderen Augenabschnitts (AS-OCT)

Am vorderen Augensegment können die Hornhaut, vordere Linsenkapsel, Iris, Kammerwinkel und Ziliarkörper visualisiert werden. Das AS-OCT erlaubt die Aquisition von Bildern in einer transversalen Auflösung von 15-60 μm und einer axialen Auflösung von 5-20 μm (91). Die einzelnen Schichten der Hornhaut können somit präzise dargestellt werden. So grenzt sich der Tränenfilm als dünne hyperreflektive Schicht von der Kornea ab. Darunter folgen das Epithel als hyporeflektives Gewebe (ca. 50-70 μm) und die Bowman-Membran. Das Stroma grenzt sich weiterhin mit seinem irregulären hyperreflektiven Muster von der Bowman-Membran ab. Unterhalb des Stromas stellt sich das Endothel als hyperreflektives Band dar mit der nach zentral anliegenden hyperreflektiven Descemet-Membran.

Das AS-OCT ist eine wichtige Ergänzung zur klinischen Untersuchung verschiedener kornealer Pathologien. Eine fokale Ausdünnung der Kornea in Zusammenhang mit einer kornealen Asymmetrie sind wegweisend für die Diagnosestellung eines Keratokonus.

(92-94). Auch Risse in der Descemet-Membran oder intrastromale Spaltbildungen lassen sich darstellen (95).

Zudem können durch das AS-OCT verschiedene Hornhautdystrophien beschrieben und differenziert werden. Sowohl die Tiefe der Ablagerungen als auch die Verteilung und Menge des Materials in den verschiedenen kornealen Schichten können bestimmt werden (96).

OCT des hinteren Augenabschnitts

Auch im Bereich der Netzhautpathologien ist das OCT des hinteren Augenabschnitts im klinischen Alltag nicht mehr wegzudenken. Die Methode hat sich aufgrund des Konzepts der Querschnittsbildgebung inzwischen zu einer der wichtigsten klinischen Bildgebungsmodalitäten etabliert (97).

Mithilfe der hohen Auflösung des OCTs ist es möglich zwölf retinale Schichten genau darzustellen und die Netzhautdicke zu quantifizieren. Die OCT hat die Sensitivität und Spezifität der Diagnosefindung, der Nachsorge und des Ansprechens auf die Behandlung von makulären Pathologien revolutioniert. So lassen sich primär okuläre Diagnosen, wie Makulaforamina, die Diagnose einer Chorioretinopathia centralis serosa oder der klinische Verdacht auf eine choroidale Neovaskularisation beispielsweise im Rahmen der altersbedingten Makuladegeneration genau verfolgen (98). Ebenso kommt die OCT durch das Monitoring sekundärer okulärer Manifestationen bei Systemerkrankungen wie Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie oder verschiedener neurologischer Erkrankungen auch anderen Fachgebieten zugute (99, 100).

7.3.4. Optische Kohärenztomografie des vorderen Augenabschnitts, Entwicklung einer Klassifikation der okulären Cystinosemanifestation anhand der kornealen Cystinkristalltopistik

Die AS-OCT-Bildgebung erfolgte mit der Zeiss Cirrus HD-OCT 5000 (Carl Zeiss Meditec AG; Oberkochen, Deutschland) mit einer axialen Auflösung von 4µm. Für jeden Patienten wurde auf standardisierte Weise ein 9,0 mm horizontaler und ein 9,0 mm vertikaler parazentraler B-Scan aufgenommen. Entsprechend der Bewertung zweier erfahrener AS-OCT-Grader wurde für jeden aufgezeichneten AS-OCT-Datensatz des Patienten das parazentrale B-Bild (ohne Hornhautreflexartefakte) mit der besten Bildqualität ausgewählt.

In einem ersten Schritt wurden pathologische Veränderungen der B-Bilder im Vergleich zum Normalkollektiv mittels visueller Analyse beschrieben. Darüber hinaus wurde die zentrale Dicke der gesamten Hornhaut und die zentrale Stromadicke von zwei unabhängigen Graden mit einem digitalen Kaliper in ImageJ bestimmt (ImageJ 1.52; National Institutes of Health, USA; Abbildung 3).

Im Folgenden wurde die Eindringtiefe der Hornhautkristalle mittels der gleichen Kaliperfunktion einerseits gemessen von der Bowman-Membran, andererseits vom anterioren Beginn des Stromas bis zur posteriorsten Darstellung eines Kristalls bestimmt.

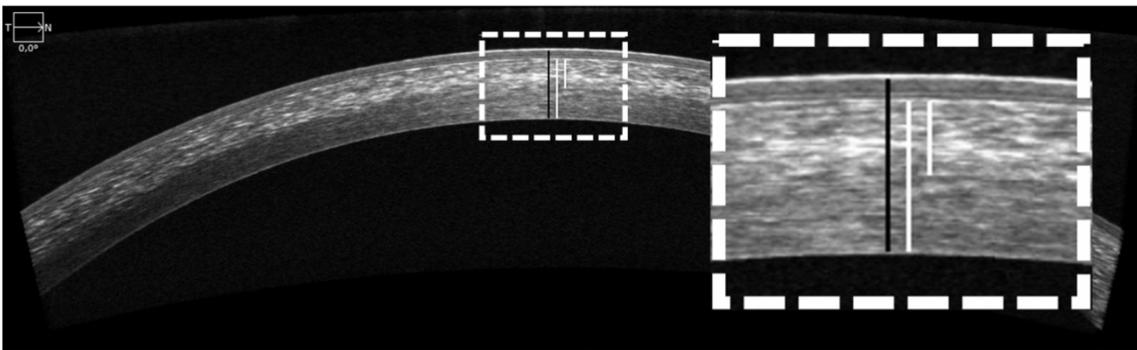


Abbildung 3: Messung der zentralen Hornhautdicke (schwarze Linie), der zentralen Stromadicke (weiße Linie) und der Eindringtiefe der Cystinkristalle in der Hornhaut (weiße Linie für den stromalen Teil) mittels eines digitalen Kalipers.

Die Ergebnisse wurden für vier verschiedene Altersgruppen analysiert (≤ 10 ; 11-20; 21-30; > 30 Jahre). Für alle visuellen, nicht computergestützten Kalipermessungen wurden die Mittelwerte beider Messungen der zwei Grader verwendet.

Zum objektiven Grading der Korneakristalle wurde semiautomatisierte Grey Scale System mittels des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ weiterentwickelt und für die Bestimmung der intrastromalen Cystinkristallverteilung optimiert (101). Hierfür wurde ein rechteckiger Bereich (102) von 100 Pixeln horizontal und vertikal entsprechend der Länge der individuell unterschiedlichen Stromadicke manuell im zentralen Stromabereich des AS-OCT B-Bilds platziert (Abbildung 4). Der obere (axial vordere) Rand des ROI wurde genau an den Anfang des Stromas platziert, so dass die Bowman-Membran nicht in die Analyse mit einbezogen wurde.

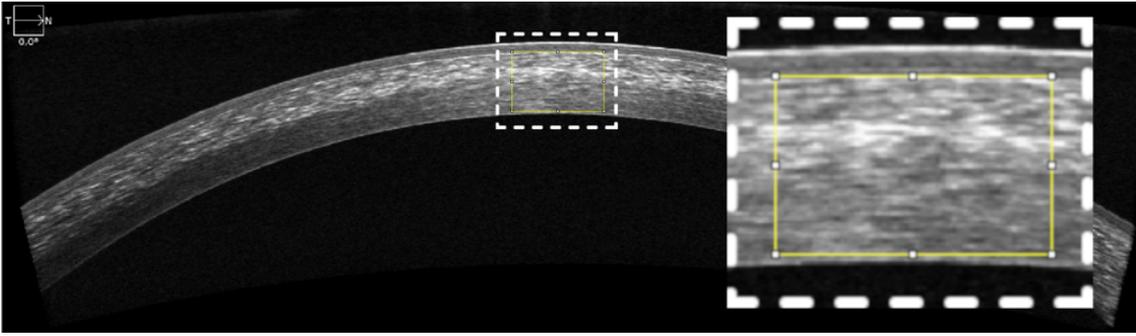


Abbildung 4: Festlegen einer ROI im zentralen Stromabereich .

Mittels ImageJ ist es möglich 256 Grautöne im AS-OCT zu differenzieren, die von 0 als dunkelster Pixel bis 255 als hellster Wert reichen. Zur Quantifizierung der hyperreflektiven Hornhautkristalle wurden alle Pixel im ROI bestimmt, die über eines als Schwellenwert gesetzten Grauwerts lagen. Es wurden im Rahmen der Entwicklung des Algorithmus insgesamt 16 verschiedene Grauwerte als Schwellenwert angewendet, um den optimalen Grauwert für die Differenzierung kornealer Cystinkristalle von physiologischen hyperreflexiven Stromastrukturen zu definieren.

Zur Darstellung des Verteilungsmusters der Hornhautkristalle, wurde die rechteckige ROI horizontal in drei flächengleiche Segmente geteilt (Abbildung 5).

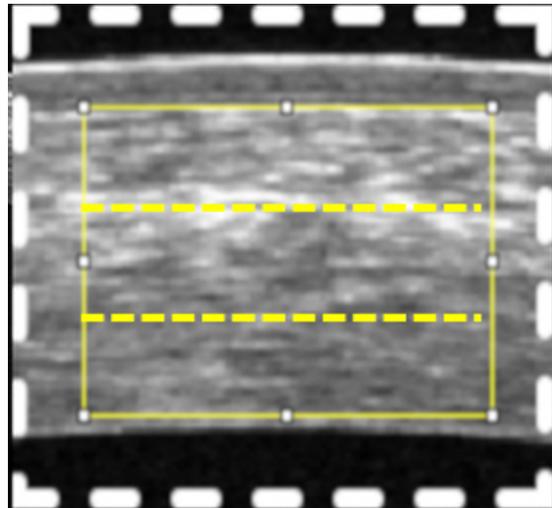


Abbildung 5: Teilen der ROI in drei flächengleiche Segmente zur Evaluation des Tiefenverteilungsmusters.

Damit die individuell unterschiedliche Größe der ROI berücksichtigt wird, wurde die Anzahl der Pixel oberhalb des gesetzten Schwellenwerts im anterioren, mittleren oder

posterioren Drittel als Prozent an der Gesamtzahl aller Pixel oberhalb des Schwellenwerts in der gesamten ROI angegeben.

Mittels des Algorithmus war es möglich, die korneale Cystinkristallablagerung bezüglich ihres Tiefenverteilungsmusters zu typisieren. Es konnten vier verschiedene Typen nachgewiesen werden (Tabelle 2).

Verteilung der Korneakristalle im AS-OCT
<u>Typ I (anteriorer Typ)</u> Typ I a) (>75% der Kristalle im anterioren Stromasegment) Typ I b) (>50-75% der Kristalle im anterioren Stromasegment)
<u>Typ II (zentraler Typ)</u> Typ II a) (>75% der Kristalle im mittleren Stromasegment) Typ II b) (>50-75% der Kristalle im mittleren Stromasegment)
<u>Typ III (posteriorer Typ)</u> Typ III a) (>75% der Kristalle im posterioren Stromasegment) Typ III b) (>50-75% der Kristalle im posterioren Stromasegment)
<u>Typ IV (homogener Typ)</u> Kristalle gleichmäßig auf alle Stromasegmente verteilt

Tabelle 2: Klassifikation der kornealen Cystinkristallablagerungen anhand der Topistik des Tiefenverteilungsmusters.

7.3.5. Optische Kohärenztomografie des hinteren Augenabschnitts, Skalierung des Manifestationsgrades chorioretinaler Cystinkristalle

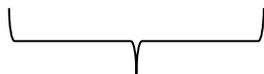
Für die Aquisition der SD-OCT B-Scans wurde das Spectralis OCT (Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Germany) verwendet. In allen Fällen wurden Volumenscans der Makula, bestehend aus 25 B-Scans (jeweils 512 A-Scans), in einem auf die Fovea zentrierten Bereich von 20°x20° durchgeführt. Die Bildoptimierung wurde mit dem automatischen Echtzeit-Mittelungsalgorithmus (automatic real-time averaging algorithm, ART: zwölf Bilder pro B-Scan) der Software des Herstellers durchgeführt. Der am präzisesten zentrierte horizontale B-Scan mit einem sichtbaren Foveolareflex wurde für die weitere Bildanalyse verwendet. In Fällen, in denen die adäquate Aufnahme eines Volumenscans aufgrund mangelnder Compliance nicht möglich war (fünf Augen von drei

Patienten), wurde ein einzelner, auf die Foveola zentrierter Line-Scan mit ART-Mittelung (zwei Bilder pro B-Scan) aufgenommen und stattdessen zur Analyse verwendet.

Cystinkristalle stellen sich in der OCT des hinteren Augenabschnitts als hyperreflektive Foci dar. Diese Foci wurden von zwei unabhängigen Netzhautexperten bewertet (L.K, C.P.), die sowohl für die Identität der Patienten als auch für die okulären und systemischen Krankheitsmanifestationen verblindet waren. Pro Auge wurde ein einzelnes zentrales horizontales B-Bild analysiert. Die Kristallakkumulation wurde semi-quantitativ für den gesamten Volumenscan und separat für jede der folgenden Netzhautschichten und der Choroidea analysiert: Retinale Nervenfaserschicht (RNFL), Ganglienzellschicht (GCL), innere plexiforme Schicht (IPL), innere Körnerschicht (INL), äußere plexiforme Schicht (OPL), äußere Körnerschicht (ONL) und Choroidea. Die Helligkeit des B-Scans wurde teils reduziert, um den Kontrast der Retinakristalle zur restlichen Netzhaut zu erhöhen. Das retinale Pigmentepithel und die Photorezeptorschicht wurden aufgrund der zu geringen Helligkeitsunterschiede zwischen den Cystinkristallen und des physiologischen Gewebes nicht ausgewertet.

Das daraus abgeleitete retinochoroidale Cystinkristall-Score (RCCCS) stellt die erste quantitative Analysemethode von Cystinkristallablagerungen in der Choroidea und Retina dar. Es besteht aus vier semi-quantitativen Stufen: In Stufe 0,5 waren 1-3 Kristalle in der jeweiligen Schicht vorhanden, Stufe 1 beschreibt 4-10 Kristalle, Stufe 2 11-20 Kristalle und in Stufe 3 wurden über 20 Kristalle gezählt. Durch Addition aller semi-quantitativen Werte für die sieben einzelnen retinochoroidalen Schichten wurde der RCCCS (die kumulative Kristallablagerung in allen retinochoroidalen Schichten) für jedes Auge berechnet. Der RCCCS kann von 0 (i.e. keine Kristallablagerung in einer der retinochoroidalen Schichten) bis 21 (i.e. maximal mögliche Kristallablagerung im Sinne von >20 Kristallablagerungen in allen retinochoroidalen Schichten anzeigt) reichen (Abbildung 6).

Stufe	Kristalle pro retinale Schicht bzw. Choroidea
0,5	1-3
1	4-10
2	11-20
3	>20



Addition der Stufen für die sieben einzelnen chorioretinalen Schichten ergibt den **RCCCS (0-21)**

Abbildung 6: Bestimmung des RCCCS durch Addition der Einzelgraduierung der Kristallablagerung in den verschiedenen chorioretinalen Schichten.

Für die Bestimmung des RCCCS wurde für alle Berechnungen der Mittelwert beider Augen verwendet. In Fällen, in denen sich die Messungen zwischen den Prüfern unterschieden (36 von 595 Scans; 6,1%), wurde ein Konsensus-Wert bestimmt.

Anhand des OCTs konnten die Cystinkristallablagerungen nicht nur lokalisiert und laminär quantifiziert, sondern auch skaliert werden. Es ergaben sich in Zusammenschau der Befunde je nach Ausprägung der Cystinkristallablagerung vier verschiedene klinische Schweregrade (Tabelle 3).

Stufe des RCCCS	Ausprägung der chorioretinalen Cystinkristallablagerungen
0	Keine chorioretinalen Kristalle
>0-1	Milde Ablagerung
>1-3	Moderate Ablagerung
>3	Schwere Ablagerung

Tabelle 3 : Graduierung der chorioretinalen Cystinkristallablagerungen anhand des SD-OCT.

7.4. Standardisierte Fragebögen zur Evaluierung der Sehqualität

Zur Quantifizierung der subjektiven Qualität des Sehvermögens wurden die Patienten gebeten, einen standardisierten, rasch-skalierten, klinisch validierten Fragebogen mit 30 Punkten auszufüllen, der verschiedene Sehphänomene behandelte (103). In 10 Fragen wurden die Blendung (1 A-C), die Wahrnehmung von Lichtkränzen (Halos) (2 A-C), die Wahrnehmung von Strahlenkränzen (3 A-C), das Vernebeltsehen (4 A-C), das Verschwommensehen (5 A-C), das Verzerrtsehen (6 A-C), das Doppeltsehen (7 A-C),

die Schwankungen des Sehvermögens (8 A-C), Fokussierungsprobleme (9 A-C) und die Einschätzung von Entfernung und Tiefe (10 A-C) erfragt. Alle bis auf die drei letztgenannten Symptome werden durch Farbbilder in standardisierter Größe (163x232mm, 300 x 300 DPI) veranschaulicht.

In Unterfrage A wurde jeweils die Häufigkeit des Symptoms evaluiert, in Unterfrage B die Stärke der Symptomausprägung und in Unterfrage C die Beeinträchtigung durch das Symptom. Pro Unterfrage konnte der Patient die Häufigkeit, Stärke beziehungsweise Beeinträchtigung beschreiben, indem er zwischen „nie“, „gelegentlich“, „ziemlich häufig“ oder „sehr häufig“ (Unterfrage A) beziehungsweise zwischen „nie“, „mäßig“, „mild“ und „schwer“ wählen musste. (Unterfragen B und C)

Der Fragebogen wurde von 46 Patienten bearbeitet.

7.5. Statistik

Alle statistischen Analysen wurden mit Excel 365 Version 16.45 (Microsoft Corporation; Redmond, WA, USA) und SPSS Statistics Version 25.0 (IBM; Armonk, New York, USA) durchgeführt. Die Diagramme wurden mit Graph Pad Prism Version 8 (GraphPad Software, San Diego, CA) und SPSS Statistics Version 25.0 erstellt. Alle metrischen Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) dargestellt, alle ordinalen Daten als Median und Spannweite. Box-Plots zeigen den Mittelwert und das 95%-Konfidenzintervall. Die Normalität der Daten wurde mithilfe eines Frequenzhistogramms und des Shapiro-Wilk-Tests bestätigt. Der statistische Vergleich zwischen den Versuchsgruppen wurde für zwei Gruppen mit einem unabhängigen t-Test und für mehr als zwei Gruppen mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (17) mit einem Bonferroni Post-Hoc-Test bzw. mit dem Kruskal Wallis Test berechnet. Die Korrelationen zwischen den Messungen der zwei Untersucher des Hornhautkollektivs wurden mithilfe des Pearson Korrelationskoeffizienten (R) berechnet. Der Pearson Korrelationskoeffizient wurde berechnet, um die bestkorrigierte Sehschärfe („best corrected visual acuity“, BCVA) oder die Anzahl an applizierten Cystadrops® pro Tag mit der Anzahl der Pixel oberhalb des gesetzten Schwellenwerts als Prozentsatz der Pixel in der gesamten ROI zu korrelieren. Darüber hinaus wurden Spearman-Korrelationsanalysen eingesetzt, um die Zusammenhänge zwischen kornealer Kristallakkumulation und okulären Cystinose-spezifischen subjektiven visuellen Symptomen (wie Blendung und Wahrnehmung von Strahlenkränzen) zu beurteilen. Auch der Zusammenhang zwischen bestkorrigierter

Sehschärfe und stromalem Cystinkristallscore oder dem CCCS wurde mit der Spearman-Korrelationsanalyse berechnet.

Korrelationsanalysen zwischen dem RCCCS und dem Alter sowie der bestkorrigierten Sehschärfe, dem leukozytären Cystinspiegel, dem Cystatin C Spiegel aller Patienten, die noch keine Nierentransplantation erhalten hatten, der Dosis der oralen Cysteamineinnahme, dem CCCS nach Gahl, den Ergebnissen der digitalen Kalipermessungen im Stroma und der bei Schwelle 211 mit dem semiautomatisierten Algorithmus erhobenen Werte, wurden durch Berechnung des Pearson Korrelationskoeffizienten (R) durchgeführt. Zudem wurden Spearman-Korrelationsanalysen eingesetzt, um die Zusammenhänge zwischen retinochoroidaler Kristallakkumulation, okulären Cystinose-spezifischen subjektiven visuellen Symptomen (wie Blendung und Wahrnehmung von Strahlenkränzen) oder dem stromalen Cystinkristallscore, zu beurteilen.

Für alle Analysen wurde ein p-Wert von $<0,05$ als Indikator für die statistische Signifikanz betrachtet.

8. Ergebnisse

8.1. Spezifische Charakteristika des Gesamtkollektivs

Teilergebnisse und Abbildungen der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in: Acta ophthalmologica/ 24.08.2020; Keidel et al. Establishing an objective biomarker for corneal cystinosis using a threshold-based optical coherence tomography imaging algorithm (104), sowie British journal of ophthalmology/16.09.2021; Keidel et al. Spectral domain optical coherence tomography-based retinochoroidal cystine crystal score: a window into infantile nephropathic cystinosis (105).

Es wurden 56 an infantiler nephropathischer Cystinose erkrankte Patienten (112 Augen) aus dem deutschen Cystinoseregister. Sie befanden sich im Alter von 1-75 Jahren (mittleres Alter: 21 ± 13 , Median:18,5) mit einem Verhältnis von Mann zu Frau von N=32:24. Die Diagnose der infantilen nephropathischen Cystinose war in allen Fällen molekulargenetisch gesichert. Das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose betrug drei Jahre. Nierentransplantiert waren zum Untersuchungszeitpunkt 17 Patienten.

Tabelle 4 zeigt die demografischen und klinischen Daten des gesamten Cystinosekollektivs.

Demografische Daten Gesamtkollektiv	2018-2019 n=112 Augen in 56 Patienten, Patienten (%)
Alter (Jahre) Mittleres Alter \pm SD ≤ 10 11-20 21-30 >30 Median	21 \pm 13,29 13 (23,21) 17 (30,36) 14 (25,00) 12 (21,43) 18,5
Geschlecht Männlich Weiblich	32 (56,36) 24 (43,63)
Zeitpunkt der Erstdiagnose/der Therapieinitiierung \pm SD (Monate)	32.23 \pm 10.74
Zeitpunkt des Auftretens einer terminalen Niereninsuffizienz \pm SD (Jahre)	19.39 \pm 10.45

Tabelle 4: Demografische und klinische Daten des gesamten Cystinosekollektivs.

Im Kollektiv tropften 44 Patienten regelmäßig cysteaminhaltige, von den Apotheken selbst hergestellte Augentropfen. Die Aufteilung in das Präparat und die Einnahmefrequenz sind in Tabelle 5 spezifiziert. Die demografischen Charakteristika der Patienten, die ausschließlich Cystadrops® AT applizieren sind in Tabelle 6 dargestellt.

Therapie	2018-2019 n=108 Augen in 54 Patienten, Patienten (%)
Topische Therapie Ja Nein	44 (81,48) 10 (18,52)
Präparat Cystadrops®AT Cysteamin 0,5% AT	41 (75,93) 3 (5,56)

Einnahmefrequenz Mittlere Frequenz \pm SD (MIN-MAX) Cystadrops®AT Cysteamin 0,5% AT	2,21 \pm 1,53 (0-4) 5,33 \pm 1,37 (4-7)
--	--

Tabelle 5: Topische Therapie der okulären Manifestationen der Cystinose des gesamten Cystinosekollektivs.

Therapie – Cystadrops® Einnahmefrequenz	Einnahmefrequenz Mittlere Frequenz \pm SD (MIN-MAX)
Alter (Jahre) Mittleres Alter	
\leq 10	3,00 (1-4)
11-20	2,47 (1-4)
21-30	2,56 (0-4)
$>$ 30	3,14 (2-4)
Geschlecht	
Männlich	3,10 (0-4)
Weiblich	2,36 (1-4)

Tabelle 6: Demografische Daten der Patienten, die Cystadrops® applizierten.

8.2. Klinisch-ophthalmologische Untersuchung

8.2.1. Bestimmung Sehschärfe und Augeninnendruck

Bestkorrigiert reichte der Visus in unserem Kollektiv von NULLA LUX bis 1,6 (Tabelle 7). Im Mittel lag die BCVA bei 0,9 dezimal. Mit zunehmendem Alter zeigte sich eine Abnahme der Sehschärfe, gemessen in logMAR ($R=0,590$, $p<0,01$).

Kein Patient wies einen Nystagmus auf. In der applanatorischen Augeninnendruckmessung nach Goldmann zeigte kein Patient einen erhöhten Augeninnendruck. Der Augeninnendruck reichte von 8mmHg bis 20mmHg. Im Mittel betrug er 13mmHg ($\pm 2,95$ SD).

8.2.2. Spaltlampenbiomikroskopie

Die Häufigkeit der Cystinkristallakkumulation in den jeweiligen okulären Strukturen ist in Tabelle 7 dargestellt.

Klinisch ophthalmologische Daten	2018-2019 n=112 Augen in 56 Patienten bzw. n=108 in 54 Patienten für Hornhautbeteiligung; Augen (%)
Bestkorrigierte Sehschärfe (LogMAR)	
-0,5-<0	24 (21,43)
0	32 (28,57)
0,1	18 (16,07)
>0,1-0,5	27 (24,11)
>0,5-1	5 (4,46)
>1	0 (0)
FIX	3 (2,68)
LUX	2 (1,79)
NL	1 (0,89)
Bindehautkristalle	74 (66,07)
Limbuskristalle	64 (57,14)
Hornhautpannus	17 (15,18)
Hornhautbeteiligung (zentrales Stroma)	96 (88,89)
Anteriorer Stromaanteil	89 (86,41)
Mitte	65 (63,11)
Posterior	49 (47,57)
Perforierende Keratoplastik	1 (0,89)
DMEK	2 (1,79)
AmnionTx bei Hornhautulkus	2 (1,79)
Katarakt	4 (3,57)
Papillenödem	3 (2,7)

Tabelle 7: Klinisch ophthalmologische Befunde des gesamten Cystinosekollektivs

98 Augen von 51 Patienten, das heißt 88% aller Patienten zeigten eine korneale Cystinkristallakkumulation. Eine Einteilung nach Hornhauttiefe ist in Tabelle 7 dargestellt. In 17 Augen von zehn Patienten, das heißt 15% aller Patienten, fand sich eine Spätform der Keratopathie mit Ausbildung eines Hornhautpannus (Abbildung 7). Fünf Augen von drei Patienten wurden mit einer Keratoplastik behandelt. Ein Auge eines Patienten mit einer perforierenden Keratoplastik, zwei Augen eines Patienten mit einer Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK), einer Transplantation nur der

Descemetmembran und zwei Augen eines Patienten mit einer Amnionmembrantransplantation bei Hornhautulcus.

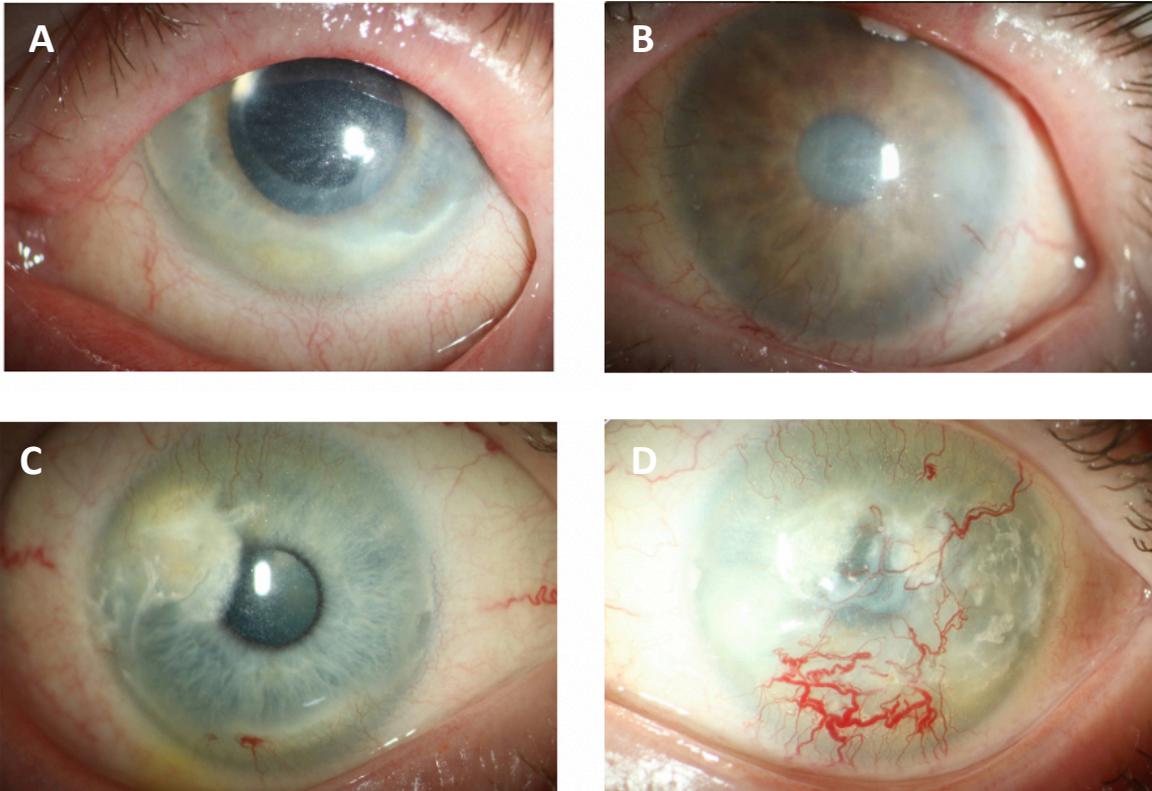


Abbildung 7: Spaltlampenfotografien verschiedener Cystinosepatienten. Im Spätstadium der kornealen Manifestation der Cystinose kann es zu einer Pannusbildung (A und B), sowie scholliger kalziumphosphathaltiger Einlagerungen kommen (C und D), die teils mit einer perforierenden Keratoplastik therapiert werden müssen.

Je älter die Patienten waren, desto höher war der stromale Cystinkristall-Score (Rho=0,544, p=0,000). Die Häufigkeit der Anwendung der Cystadrops® Augentropfen zeigte keine signifikante Auswirkung auf den stromalen Cystinkristall-Score (Rho=-0,212, p=0,156).

Kristallablagerungen konnten auch in der Iris (Abbildung 2C) und der Papille (Abbildung 8) gefunden werden. In der Linse zeigten sich keine sichtbaren Kristalle.

28 Augen von 16 Patienten zeigten Fundusveränderungen im Sinne einer in der Infrarotaufnahme des OCT sichtbaren Auflockerung der Netzhautschichten. Nur drei Augen von zwei Patienten präsentierten sich mit einem klinisch signifikanten Papillenödem.

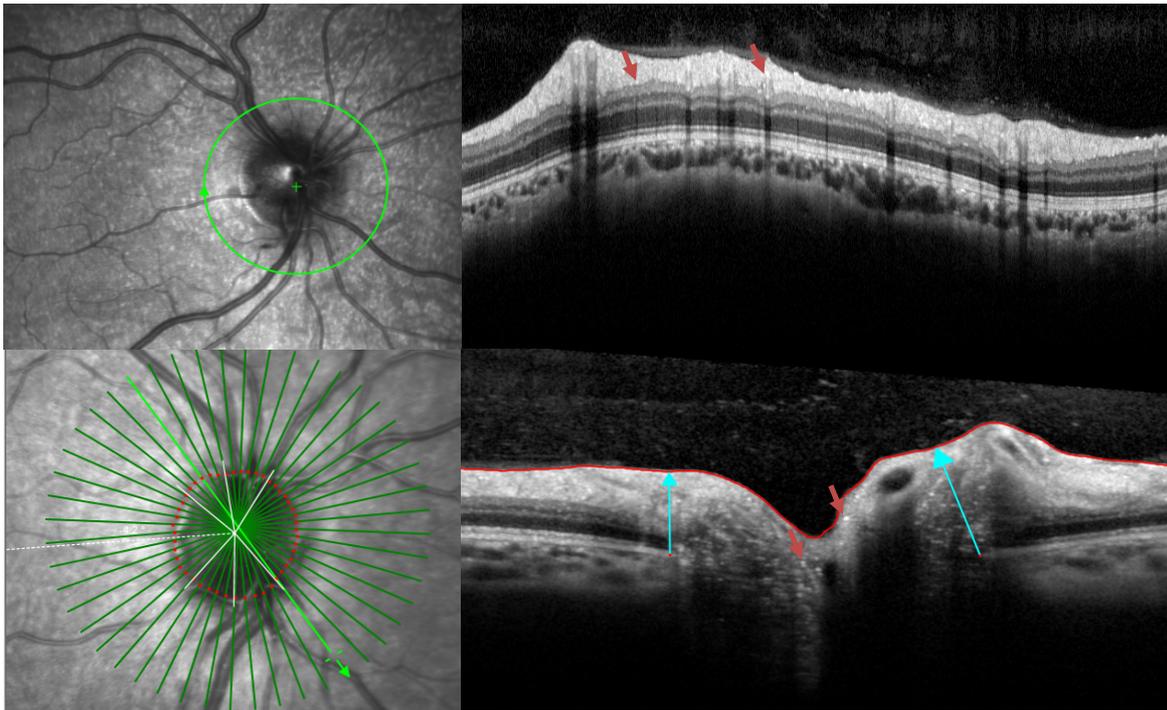


Abbildung 8.: OCT-Aufnahmen der Papille mit sichtbaren Cystinkristallablagerungen in der retinalen Nervenfaserschicht (Pfeile).

Eine tabellarische Synopsis aller demografischen und klinisch-ophthalmologischen Daten, die als Grundlage einer statistischen Auswertung dienen ist im Anhang (10.1) dargestellt

8.3. Apparativ diagnostische Untersuchung

8.3.1. Spaltlampenfotografie

Die korneale Cystinkristallablagerung lässt sich gut mittels Spaltlampenfotografien darstellen. Dennoch ist eine standardisierte, reproduzierbare Aufnahme der Fotografien häufig durch eine mangelnde Compliance der Patienten erschwert. Die erforderliche Aufnahmequalität wurde in 4 von 56 Patienten (7,1%) nicht erreicht, hier war keine Auswertung möglich. In weiteren 4 von 56 (7,1%) Patienten zeigte sich die Aufnahmequalität deutlich reduziert.

Der anhand eines Vergleichs mit einer Bibliothek von Spaltlampenfotografien erhobene CCCS nach Gahl reichte von 0-3 mit einem mittleren Score von $1,91 \pm 0,87$ und zeigte sich höher in Patienten mit höherem Alter ($Rho=0,288$, $p=0,038$). Der CCCS korrelierte positiv mit dem stromalen Cystinkristall-Score ($Rho=0,513$, $p<0,01$). Die Häufigkeit der

Anwendung von Cystadrops Augentropfen zeigte keinen signifikanten Einfluss auf den CCCS.

8.3.2. Optische Kohärenztomografie des vorderen Augenabschnitts

Vorderabschnitts-OCTs wurden von 88 Augen von 45 Cystinosepatienten aufgenommen mit einem Verhältnis von Mann zu Frau von N=46:42 und einem Durchschnittsalter von $21,1 \pm 12,2$ Jahren. Diese wurden mit den Vorderabschnitts-OCTs der Kontrollgruppe mit 68 Augen von 35 Patienten mit einem Verhältnis von Mann zu Frau von N=35:33 und einem Durchschnittsalter von $27,8 \pm 10,1$ verglichen. Tabelle 8 zeigt die demografischen Daten des Hornhautkollektivs und dessen Kontrollkollektivs.

Demografische Daten	Hornhautkollektiv n=88 Augen in 45 Patienten, Patienten (%)	Kontrollkollektiv n=68 Augen in 35 Patienten, Patienten (%)
Alter (Jahre) Mittleres Alter \pm SD	$21,1 \pm 12,2$	$27,8 \pm 10,1$
≤ 10	8 (17,78)	0
11-20	17 (37,78)	8 (22,86)
21-30	13 (28,89)	19 (54,29)
>30	7 (15,56)	8 (22,86)
Geschlecht		
Männlich	23 (51,11)	18 (51,42)
Weiblich	22 (48,89)	17 (48,57)

Tabelle 8: Demografische Daten des Hornhautkollektivs und des Kontrollkollektivs.

Korneale Cystinkristalle erscheinen im Vorderabschnitts-OCTs als hyperreflektive punktuelle, aber meist flächige Ablagerungen innerhalb des Hornhautstromas (Abbildung 9). Im Hornhautkollektiv für die AS-OCT Messungen zeigten insgesamt 43 (49%) Augen Kristalle, die homogen in allen Stromaschichten verteilt waren (Abbildung 9 A), 23 (26%) Augen überwiegend im vorderen Stroma (Abbildung 9 B) und 22 (25%) Augen überwiegend im hinteren Stroma mit einzelnen Kristallen im vorderen und mittleren Stroma (Abbildung 9 C).

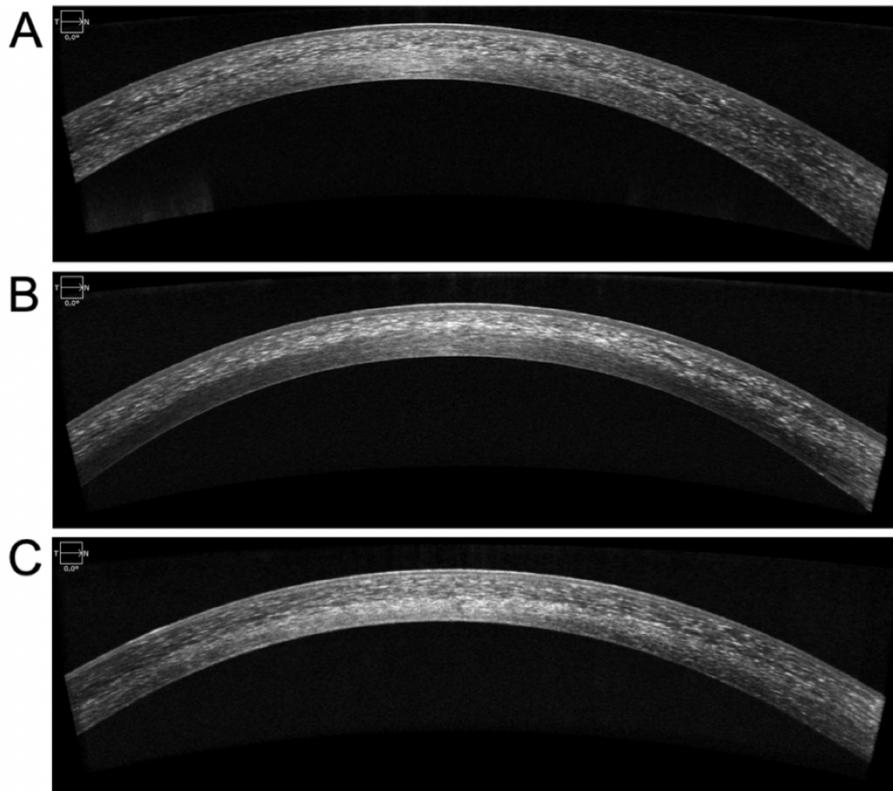


Abbildung 9: Exemplarische Tiefenverteilungsmuster der Cystinkristalle in der Hornhaut: (A) Die Kristalle waren entweder auf alle Stromaschichten verteilt, (B) lediglich im anterioren oder (C) im posterioren Stroma lokalisiert.

In Bezug auf die manuellen, nicht semi-quantitativen Kalipermessungen zeigten alle Berechnungen einen Pearson-Korrelationskoeffizienten (R^2) von 0,81 oder höher (Tabelle 9).

Die zentrale Hornhautdicke ($p < 0,001$) und die zentrale Stromadicke ($p < 0,001$) zeigten sich bei Cystinosepatienten signifikant höher als bei gesunden Kontrollen. Die Eindringtiefe der Kristallablagerungen im Stroma erreichte einen Mittelwert von $369 \pm 133 \mu\text{m}$ unterhalb der Bowman-Membran, was im Mittel $78 \pm 27\%$ der jeweiligen Stromadicke entspricht.

		U1	U2	Mittelwert	Pearson's Korrelation (R ²)
Zentrale Hornhautdicke (µm) ± SD	Cystinose	537±34	534±36	536±35	0,95
	Gesundes Kontrollkollektiv	517±35	514±33	516±33	0,84
Zentrale Stromadicke (µm) ± SD	Cystinose	474±35	470±35	472±34	0,94
	Gesundes Kontrollkollektiv	450±33	456±30	453±31	0,81
Eindringtiefe der Hornhautkristalle ± SD	Posterior der Bowman-Membran (µm)	378±138	360±134	369 ±133	0,86
	% zentrale Stromadicke	79±28	76±27	78±27	0,84

Tabelle 9: Korrelation der Ergebnisse der manuellen Kalipermessungen der zwei verblindeten Untersucher (U1, U2) und Darstellung der signifikanten Unterschiede im Vergleich des Cystinose-Kollektivs mit dem Normalkollektiv.

Die Tiefe der stromalen Kristallablagerungen nahm mit steigendem Alter im Vergleich zur jüngsten Altersgruppe deutlich zu ($p < 0,001$ in allen Vergleichen) (Abbildung 10). Bei allen Patienten der ältesten Untergruppe ($>30a$) fanden sich Kristalle in allen stromalen Schichten. Die Werte der digitalen Kalipermessungen im Stroma (Anteil der Ablagerungstiefe an der individuell unterschiedlichen Stromadicke in %) korrelierten positiv mit dem manuell im Rahmen der Spaltlampenbiomikroskopie erhobenen stromalen Cystinkristallscore ($Rho=0,509$, $p=0,01$).

Im objektiven Grading mittels des Grey Scale Schwellenwertsystems waren zwischen Cystinosepatienten und dem Normalkollektiv signifikante Unterschiede in der Anzahl der Pixel, die oberhalb der am höchsten getesteten Graustufenschwellen (211, 226, 241) lagen (Suprathreshold-Pixel), zu beobachten (mit $p=0,038$, $p=0,001$ bzw. $p < 0,001$; Abbildung 11).

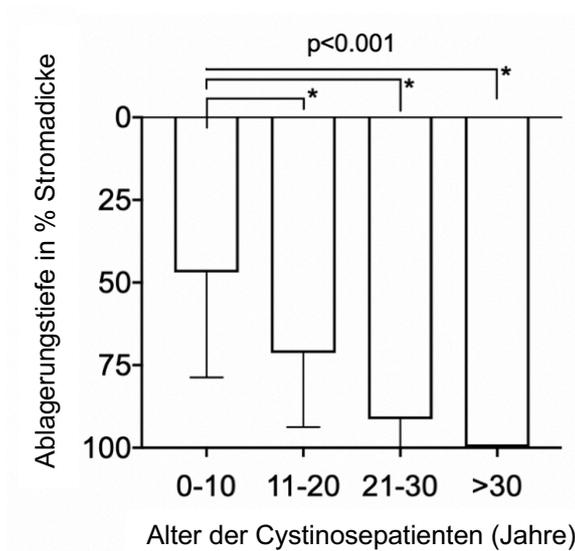


Abbildung 10: Altersabhängigkeit des Tiefenverteilungsmusters der Hornhautkristalle. Die Eindringtiefe der Kristalle, nahm mit steigendem Alter zu (104).

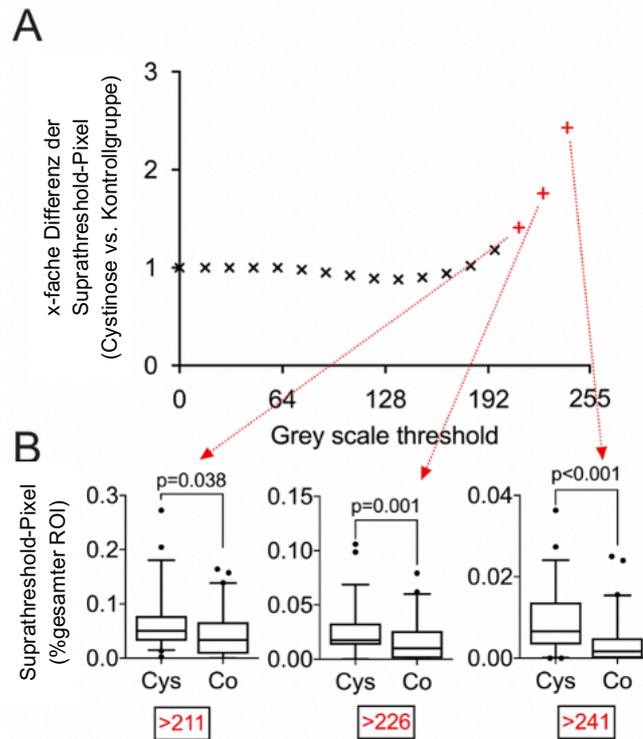


Abbildung 11: (A) Streudiagramm, das die x-fache Differenz der Anzahl der Suprathreshold-Pixel zwischen Cystinose-Patienten und gesunden Kontrollen (Ordinate) unter Verwendung von 16 verschiedenen Graustufen-Schwellenwerten (Abszisse) wiedergibt. (B) Die im Rahmen der Algorithmus Entwicklung getesteten drei höchsten Schwellenwerte der Graustufen im OCT ergaben die im Boxplot dargestellten, statistisch signifikanten Unterschiede detektierter Suprathreshold-Pixel zwischen Cystinose-Patienten und den gesunden Kontrollen (104).

Beispiele der semiautomatisierten Markierung der Cystinkristallakkumulation für die drei Schwellenwerte, verglichen mit dem Kontrollkollektiv sind in Abbildung 12 dargestellt.

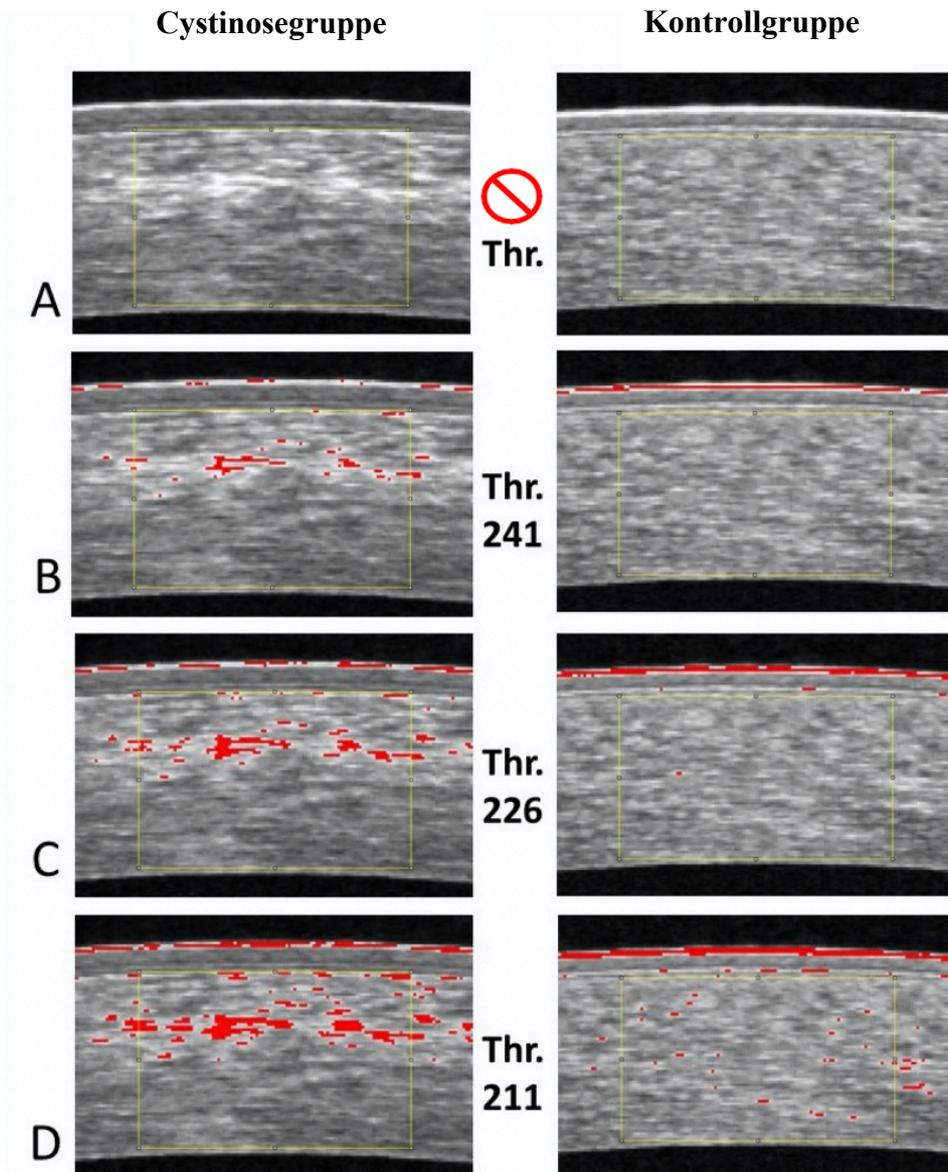


Abbildung 12: Automatisierte Markierung von Hornhautkristallen, die in den AS-OCT-B-Bildern als hyperreflektive Foci visualisiert werden können. Wie im Vergleich zu (A) keine Markierung zu sehen ist, konnten die höheren als Schwellenwerte gesetzten Grauwerte von (B) 241, (C) 226 und (D) 211 die Kristalle effizient vom restlichen Stromagewebe abgrenzen (Kristalle sind hier rot markiert). (E-H) Korneae gesunder Kontrollen mit identisch angewandten Schwellenwerten (104).

Mit Hilfe des Algorithmus war es möglich, die korneale Cystinkristallablagerung bezüglich ihres Tiefenverteilungsmusters zu typisieren. Die Charakteristika der Patientengruppen in den vier verschiedenen Typen sind in Tabelle 10 dargestellt.

Verteilung der Korneakristalle im AS-OCT	Häufigkeit, Personen (%)	Alter, Mittleres Alter (Jahre), \pm SD	Subgruppe Patienten mit Cystadrops: Anzahl der applizierten AT / Tag \pm SD	Geschlecht, Männlich (%)
<u>Typ I (anterior betonter Typ)</u>				
Typ I a) (>75% der Kristalle im anterioren Stromasegment)	18 (52,94)	19,1 \pm 16,53	3 \pm 1,01	10 (29,41)
Typ I b) (>50-75% der Kristalle im anterioren Stromasegment)	3 (8,82)	20,67 \pm 14,22	2 \pm 1,73	1 (2,94)
<u>Typ II (mittig betonter Typ)</u>				
Typ II a) (>75% der Kristalle im mittleren Stromasegment)	1 (2,94)	26	0	1 (2,94)
Typ II b) (>50-75% der Kristalle im mittleren Stromasegment)	1 (2,94)	26		0
<u>Typ III (posterior betonter Typ)</u>				
Typ III a) (>75% der Kristalle im posterioren Stromasegment)	3 (8,82)	27 \pm 1,73	3,5 \pm 0,71	1 (2,94)
Typ III b) (>50-75% der Kristalle im posterioren Stromasegment)	1 (2,94)	24	2	1 (2,94)
<u>Typ IV (homogener Typ)</u>				
Kristalle gleichmäßig auf alle Stromasegmente verteilt	7 (20,59)	24 \pm 8,25	2,75 \pm 0,96	3 (8,82)

Tabelle 10: Typisierung der Tiefenverteilungsmuster der kornealen Cystinkristallablagerungen im AS-OCT

Wie bereits in den manuellen Kalipermessungen beobachtet, nahm die Ansammlung von Kristallen im mittleren und hinteren ROI-Segment mit zunehmendem Alter zu (Abbildung 13).

Bei Patienten unter zehn Jahren manifestierten sich 93% der nachgewiesenen Kristalle im vorderen und die restlichen 7% im mittleren Stromasegment. In der ältesten Subgruppe (>30 Jahre) waren 50% der nachgewiesenen Kristalle in dem mittleren oder hinteren Bereich abgelagert.

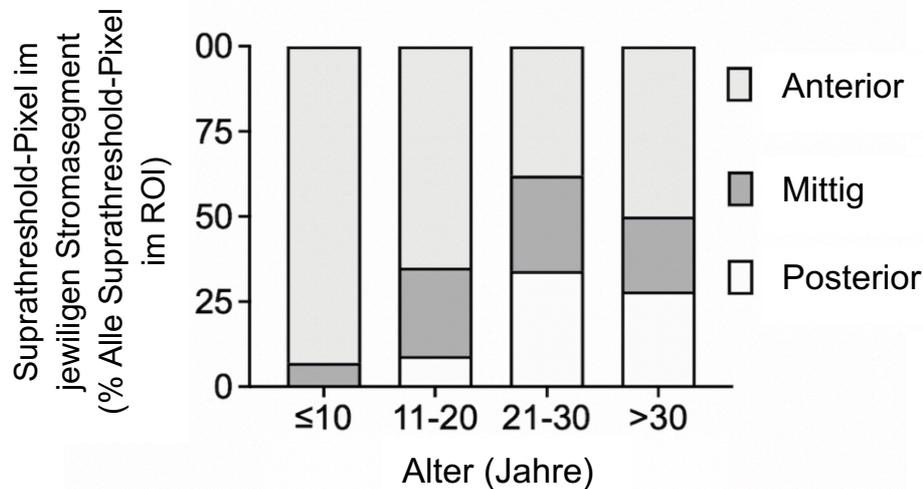


Abbildung 13: Tiefenverteilungsmuster der mit dem Analyse-Algorithmus im AS-OCT detektierten Korneakristalle in verschiedenen Altersgruppen (104).

Hiermit übereinstimmend, zeigte sich im Typ I der kornealen Cystinkristallablagerungen, der eine betonte Ablagerung im anterioren Stromasegment beschreibt, eine jüngere Altersverteilung als kumulativ im Typ II und III, die eine betonte Ablagerungen im mittigen und posterioren Stromasegment beschreiben (Abbildung 14). Aufgrund der insgesamt geringen Fallzahl in den einzelnen Gruppen, ergab sich kein signifikanter

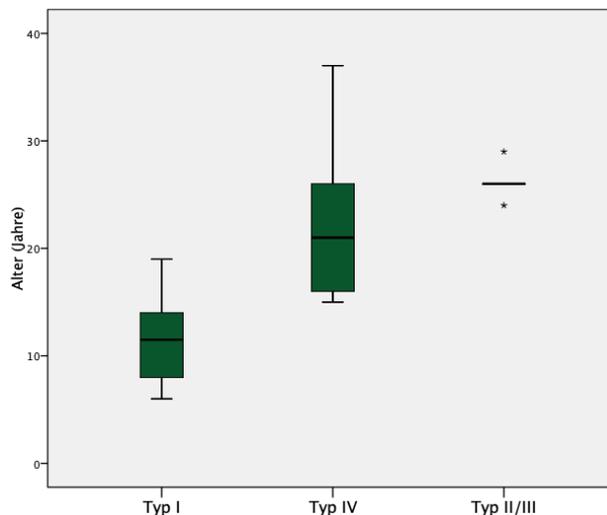


Abbildung 14: Altersverteilung der Cystinkristallablagerung bezogen auf die verschiedenen Typen der Tiefenverteilungsmuster.

Unterschied zwischen den Gruppen ($H=5,026$, $p<0,081$). Das Geschlecht und die Tropffrequenz zeigten sich zwischen den verschiedenen Typen homogen verteilt.

Insgesamt zeigte sich eine Tendenz zu weniger Cystinkristalleinlagerungen im vorderen Stromabereich in Patienten mit adäquater Tropftherapie im Vergleich zu Patienten mit insuffizienter Tropftherapie. In der Gruppe der Patienten mit einer ein bis zwei Mal täglichen Applikation der Cystadrops® fanden sich im vorderen Stromabereich im Mittel 15,8% markierte Pixel von allen Pixeln, in der Gruppe der Patienten mit einer drei bis vier Mal täglichen Applikation nur 7,7%. Die Anzahl an applizierten Cystadrops® pro Tag zeigte dennoch keine signifikante Korrelation mit der Anzahl an allen Suprathreshold-Pixel im ROI in % am Gesamt-ROI für Thr. 211 ($R=0,246$, $p=0,217$), 226 ($R=0,215$, $p=0,217$) und 241 ($R=0,158$, $p=0,421$). Sie zeigte eine Tendenz zu einer Abnahme der Kristalldichte im mittleren Stromabereich, dennoch ist auch dieser Zusammenhang nicht signifikant in Thr. 211 ($R=-0,326$, $p=0,091$).

8.3.3. Optische Kohärenztomografie des hinteren Augenabschnitts

Für die Auswertung der Hinterabschnitts-OCTs wurden 85 Augen von 43 Cystinose-Patienten im Alter von 5-37 Jahren mit einem Verhältnis von $N=23:20$ zwischen Männern und Frauen in die Analyse einbezogen. Das mittlere Alter betrug $20,6\pm 8,8$ Jahre. Die ausgewählten internistischen Parameter (tägliche Cysteamindosis, Cystatin C-Spiegel, leukozytärer Cystinspiegel im Blut) entstammen der Datenbank der interdisziplinären Sprechstunde des Klinikums Rosenheim (Tabelle 11).

Systemische Daten Netzhautteil	Mittelwert \pm SD	Minimum/Maximum
Cysteamindosis (mg/kg KG / Tag)	$37,61 \pm 16,31$	0,00 – 66,70
Cystatin C (mg/l) (Normal: 0,6-1 mg/l)	$1,94 \pm 1,31$	0,69 – 7,08
Leukozytärer Cystinspiegel im Blut (nmol/mg) (Normal: <1nmol/mg)	$1,02 \pm 1,11$	0,07 – 5,70

Tabelle 11: Systemische Parameter des Netzhautkollektivs

Cystinkristalle sind als hyperreflektive Foci im SD-OCT erkennbar, die panretinal in allen Schichten der Netzhaut und der Choroidea visualisiert werden konnten. Sie fanden sich in 58 der 85 ausgewerteten Augen (68,2%). Kristalle in der Choroidea waren die häufigste SD-OCT-Manifestation. Sie konnten in 53 Augen (62,4%) in der gefäßreichen Choriokapillaris nachgewiesen werden. Hierauf folgten in absteigender Reihenfolge Kristalle in der inneren Körnerschicht (INL, 18 Augen, 21,2%), der Ganglienzellschicht (GCL, 14 Augen, 16,5%), der inneren plexiformen Schicht (IPL, neun Augen, 10,6%), der retinalen Nervenfaserschicht (RNFL, fünf Augen, 5,9%) der äußeren plexiformen Schicht (OPL, drei Augen, 3,5%) und der äußeren Körnerschicht (ein Auge, 1,2%). Kristalle der INL wurden überwiegend in der Nähe der Übergangszonen zur angrenzenden OPL bzw. IPL gefunden (Abbildung 15 und 16).

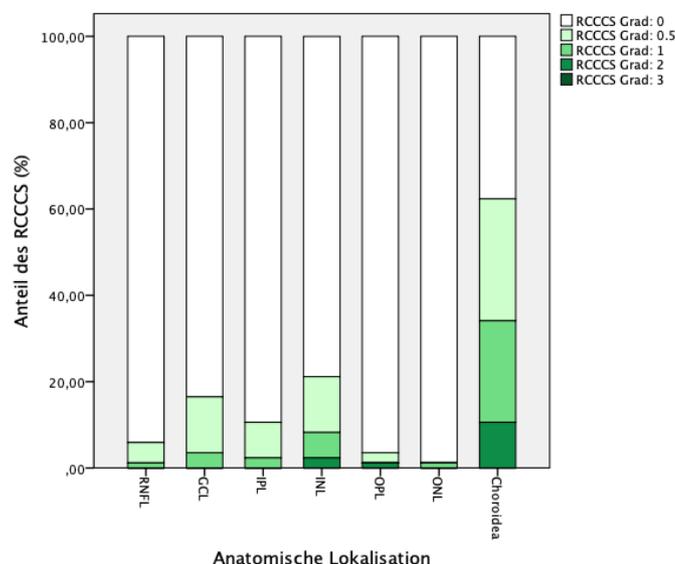


Abbildung 15: Verteilung der Cystinkristalle in Retina und Choroidea (105).

Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten chorioretinaler Kristalle und dem Vorhandensein kornealer Cystinkristalle. So korrelierten weder der stromale Cystinkristallscore, noch der CCCS nach Gahl, die Werte der digitalen Kalipermessungen im Stroma und die bei Schwelle 211 mit dem semiautomatisiertem Algorithmus erhobenen Werte positiv mit dem RCCCS (Rho=0,158, p=0,311; R= 0,199 p=0,206; R=0,270, p=0,106; R=-0,175, p=0,372).

Eine tabellarische Synopsis aller systemischen und apparativ diagnostischen Daten, die als Grundlage einer statistischen Auswertung dienen ist im Anhang (10.2) dargestellt.

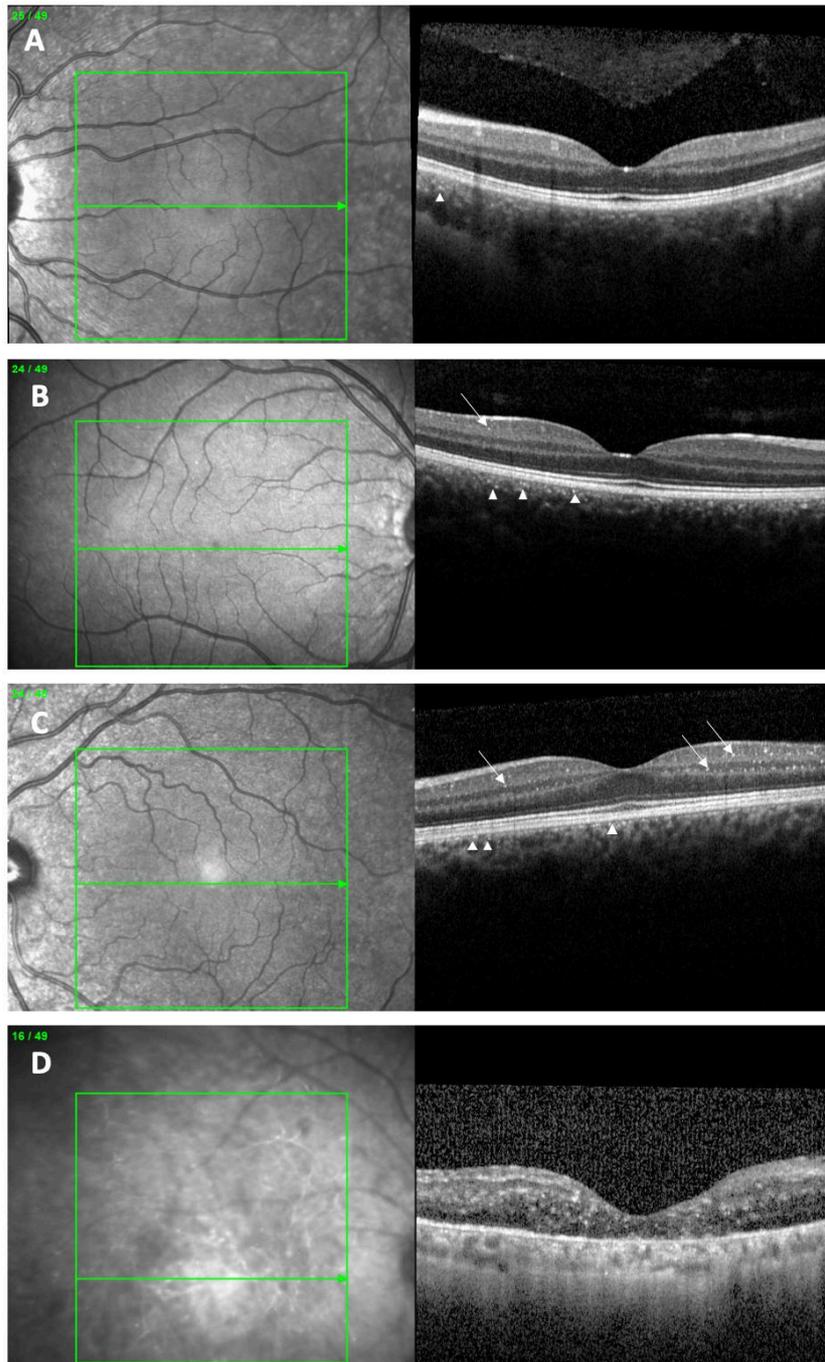


Abbildung 16: SD-OCT B-Scans von Cystinose-Patienten. (A) Netzhautkristalle, die sich als hyperreflektive Foci präsentieren, mit einer ausgeprägten Akkumulation in der Choriokapillaris (Pfeilspitze); RCCCS von 0,5 mit nur wenigen choroidalen Kristallen. (B) RCCCS von 2,5 mit mehr Kristallen in der Aderhaut (Pfeilspitze) und IPL (Pfeil). (C) RCCCS von 5 mit Kristallen in der Aderhaut (Chorioidea), GCL, IPL und INL. Am häufigsten wurden Kristalle an den Übergangszonen zwischen den Schichten gefunden. (D) Ausgeprägte Kristallablagerungen in mehreren chorioretinalen Schichten (105).

8.4. Einflussfaktoren auf die chorioretinale Cystinkristallablagerung

8.4.1. Einfluss des Genotyps

Die Ergebnisse der genetischen Sequenzierung sind in Abbildung 17 dargestellt.

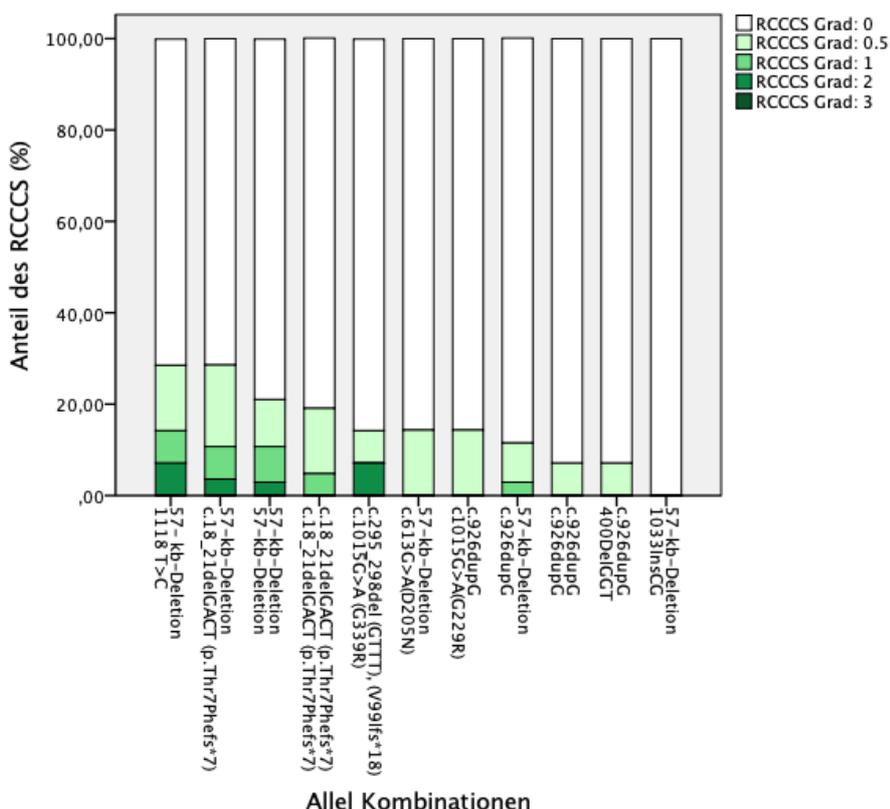


Abbildung 17: Verteilung der chorioretinalen Cystinkristalle in verschiedenen Allelkombinationen (105).

Ein niedriger Grad an chorioretinalen Cystinkristallablagerungen war weitgehend gleichmäßig über die meisten Mutationen und deren heterozygoten Kombinationen verteilt. Insgesamt zeigte sich die Kristallablagerung am stärksten ausgeprägt in Patienten mit heterozygoten Mutationen, die das 57-kb-Deletions-Allel des CTNS-Gens in Kombination mit c.18_21delGACT bzw. c.1118T>C enthielten.

8.4.2. Einfluss systemischer Parameter und oraler Therapie

Mit zunehmendem Patientenalter zeigte sich eine Neigung zu höheren RCCCS-Werten ($R=0,292$, $p=0,056$). Zudem korrelierte der RCCCS negativ mit der täglichen Cysteamindosis bezogen auf das Körpergewicht ($R=0,533$, $p=0,01$; Abbildung 18A) und positiv mit dem Cystatin C Spiegel im Blut bei Patienten, die noch keine

Nierentransplantation erhalten haben ($R=0,496$, $p=0,016$; Abbildung 18B). Darüber hinaus zeigten sich höhere RCCCS-Werte bei Patienten mit hohem leukozytären Cystinspiegel ($R=0,327$, $p=0,055$; Abbildung 18C). Bezogen auf die Einteilung der klinischen Schweregrade ist auch hier obenstehender Zusammenhang zwischen chorioretinaler Cystinkristallablagerung und systemischen Parametern gut sichtbar. Patienten zeigten mit zunehmender Cystinkristallablagerung (mild bis schwer) im Mittel ein höheres Alter, eine niedrigere Dosis des oralen Cysteamins, ein höheres Cystatin C und einen höheren leukozytären Cystinspiegel (Tabelle 12). Die Cysteamindosis zeigte sich signifikant höher bei Patienten mit moderater im Vergleich zu schwerer Cystinkristallablagerung ($p=0,013$), der leukozytäre Cystinspiegel zeigte sich signifikant höher bei Patienten mit moderater Cystinkristallablagerung im Vergleich zu milder Cystinkristallablagerung ($H=2,944$, $p=0,089$). In den weiteren Gruppenvergleichen bezogen auf das Graduierungssystem zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge mit $p=0,713$ Alter keine/mild; $p=0,684$ Alter mild/moderat; $p=0,189$ Alter moderat/schwer; $p=0,192$ Cysteamindosis keine/moderat; $p=0,999$ Cysteamindosis mild/moderat; $p=0,211$ Cystatin C keine/mild; $p=0,371$ mild/moderat; $p=0,375$ Cystinspiegel keine/mild.

Ausprägung der chorioretinalen Cystinkristallablagerungen	Alter, Mittleres Alter (Jahre) \pm SD	Dosis des oralen Cysteamins (mg/kg KG/Tag) \pm SD	Cystatin C (mg/l) \pm SD	Leukozytärer Cystinspiegel (nmol/mg) \pm SD
Keine chorioretinalen Kristalle	21,1 \pm 8,8	45,3 \pm 11,4	1,1 \pm 0,4	0,6 \pm 0,7
Milde Ablagerung	22,4 \pm 8,2	38,6 \pm 11,9	1,5 \pm 0,6	0,7 \pm 0,6
Moderate Ablagerung	23,7 \pm 9,7	38,6 \pm 19	1,8 \pm 0,9	1,7 \pm 1,8
Schwere Ablagerung	31,2 \pm 7,9	2,2 \pm 3,8	/	1,8 \pm 1,6

Tabelle 12: Charakteristika des Netzhautkollektivs aufgegliedert in Ausprägungsstadien der chorioretinalen Cystinkristallablagerung.

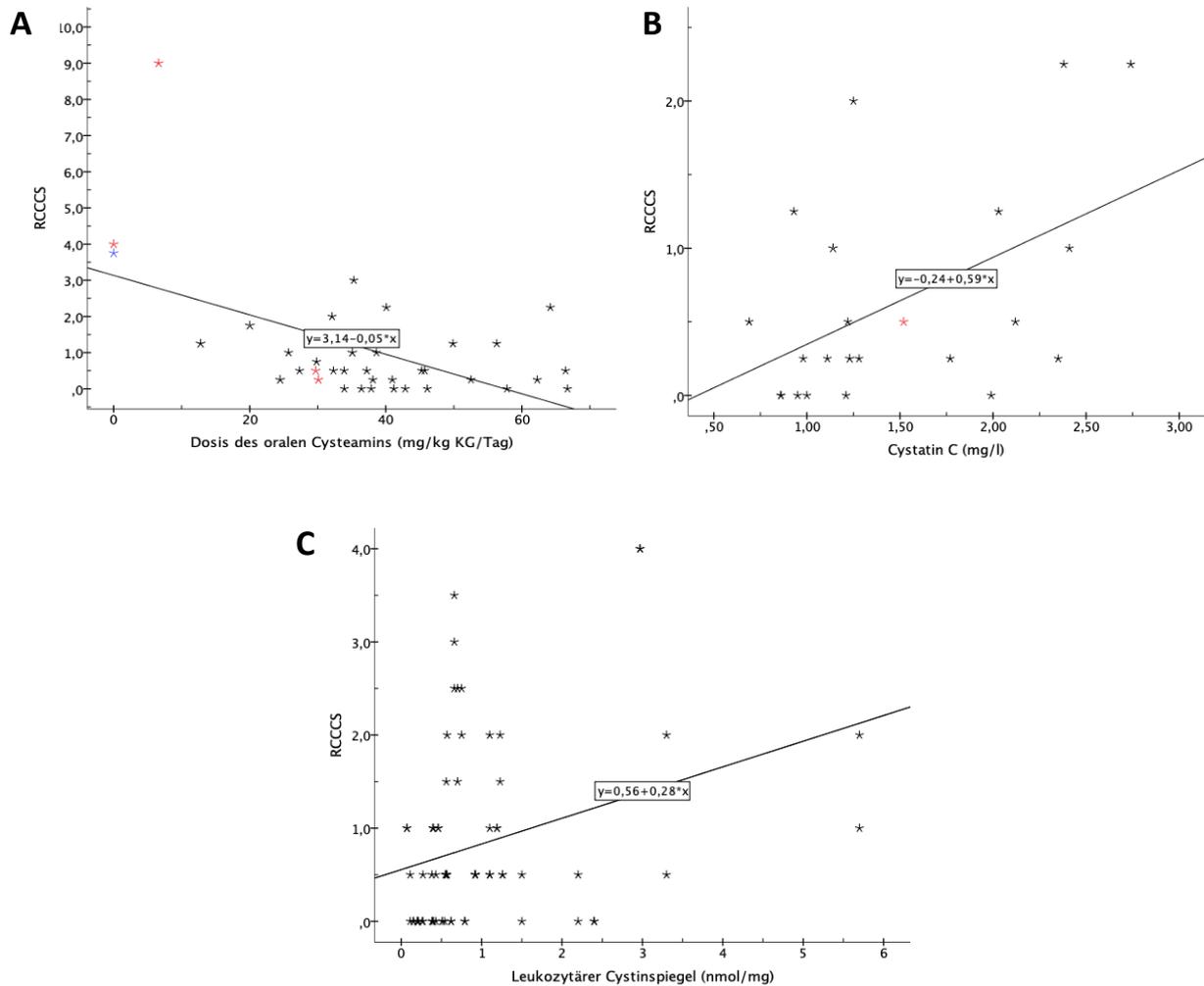


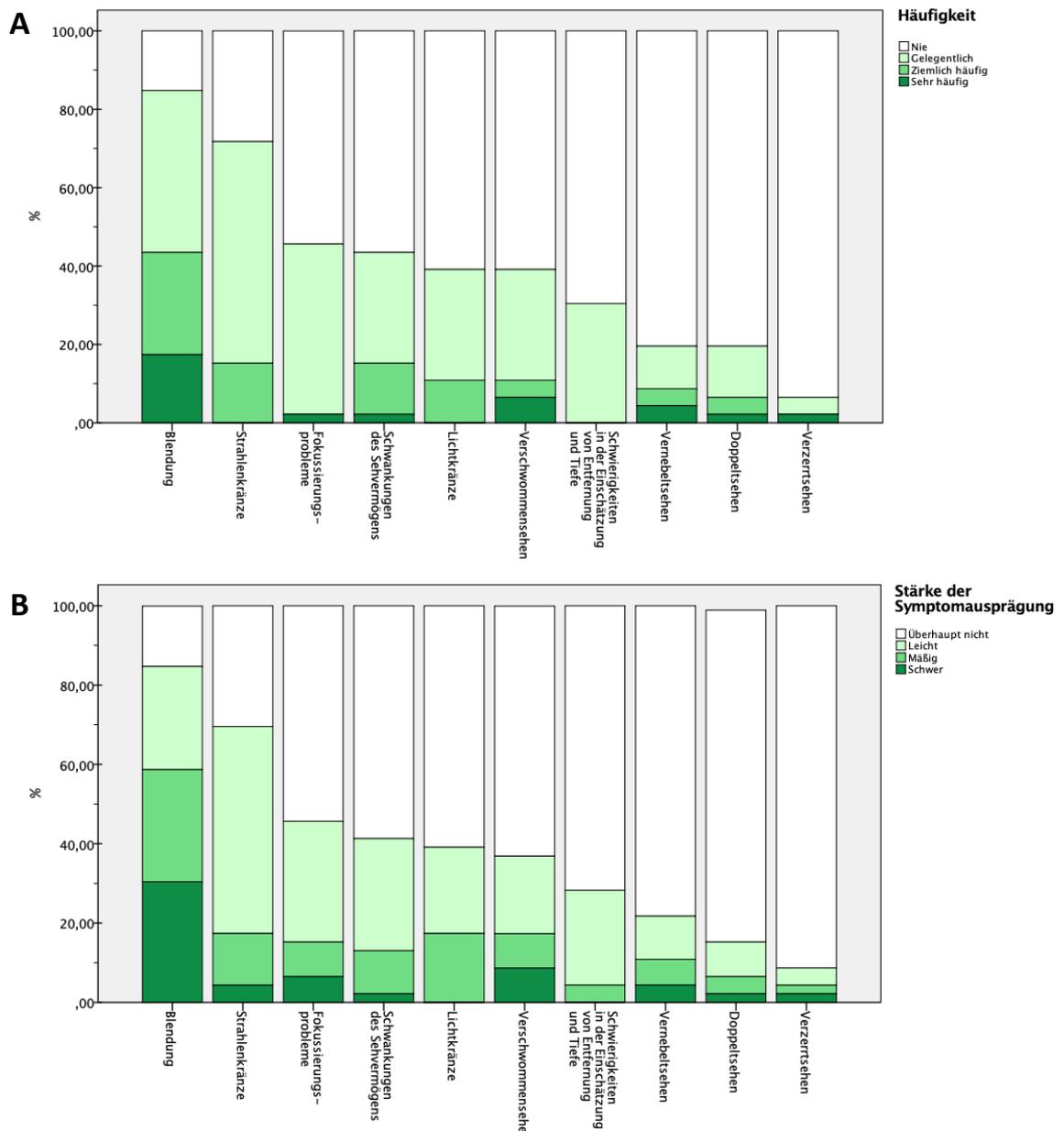
Abbildung 18: Korrelation des RCCCS mit systemischen Parametern und der täglichen Cysteamindosis. A) Patienten mit einer hohen Dosis des oralen Cysteamins zeigen bei negativer Korrelation einen geringeren RCCCS. B) Positive Korrelation mit dem Cystatin C-Spiegel im Blut in Patienten vor stattgefundenener Nierentransplantation. C) Positive Korrelation des RCCCS mit dem leukozytären Cystinspiegel (105).

8.5. Evaluierung der Sehqualität anhand standardisierter Fragebögen

Blendung war das am häufigsten wahrgenommene visuelle Symptom. In unserem Kollektiv gaben kumulativ 84,8 % der Patienten an, Blendung "gelegentlich" (41,3 %), "ziemlich oft" (26,1 %) oder "sehr oft" (17,4 %) wahrzunehmen (Abbildung 19A). Blendung war gleichzeitig das am stärksten wahrgenommene (Abbildung 19B) und am meisten störende (Abbildung 19C) aller getesteten visuellen Symptome. Das zweithäufigste (71,7%), am stärksten wahrgenommene und die Lebensqualität beeinträchtigende visuelle Symptom war die Wahrnehmung von Strahlenkränzen (Abbildung 19). Die übrigen acht visuellen Symptome wurden seltener angegeben, wobei

die prozentuale Angabehäufigkeit zwischen 45,6% für Fokussierungsprobleme und 6,5% für Verzerrtsehen lag.

Je älter die Patienten waren, desto häufiger zeigte sich die Wahrnehmung von Lichtkränzen und desto ausgeprägter war die Intensität und die subjektive Beeinträchtigung durch die Lichtkränze. Ebenso korrelierten Häufigkeit, Intensität und störender Effekt des Vernebeltsehens, des Verschwommensehens, des Verzerrtsehens, der Schwankungen des Sehvermögens sowie Häufigkeit und Intensität der Fokussierungsprobleme positiv mit dem Alter (Tabelle 13).



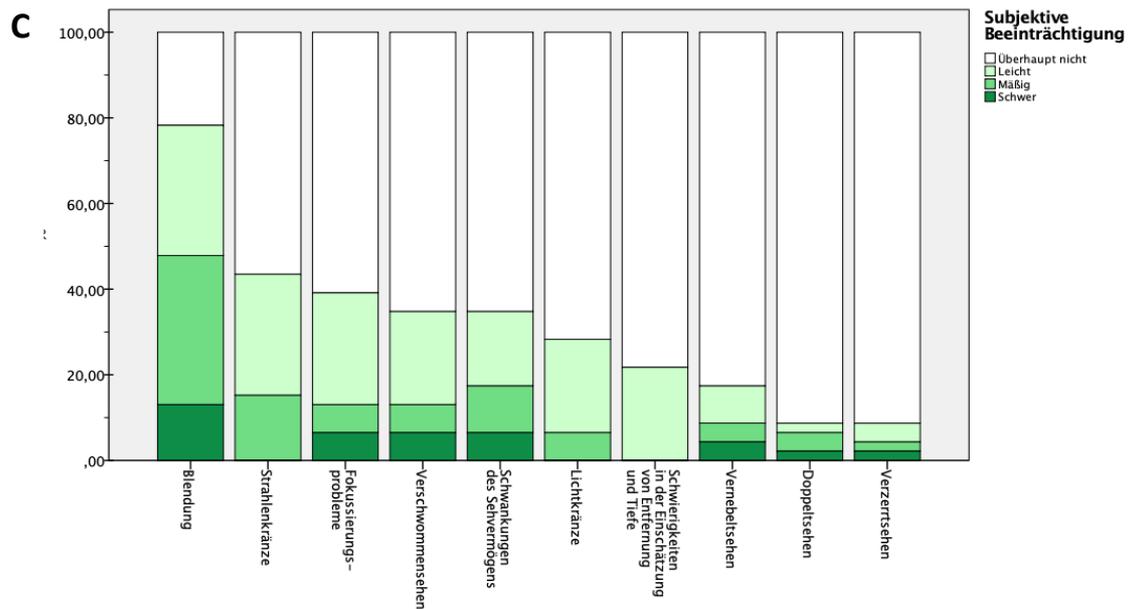


Abbildung 19: Prozentuale Häufigkeit (A), Stärke der Symptomausprägung (B) und subjektive Beeinträchtigung (C) verschiedener Parameter des subjektiven Sehvermögens. Die prozentualen Angaben werden entsprechend des Ausprägungsgrades farbcodiert dargestellt (105).

	Alter
Lichtkränze	
- Häufigkeit	0,317*
- Intensität	0,330*
- Subjektive Beeinträchtigung	0,252*
Vernebeltsehen	
- Häufigkeit	0,351**
- Intensität	0,336**
- Subjektive Beeinträchtigung	0,410**
Verschwommensehen	
- Häufigkeit	0,323**
- Intensität	0,326**
- Subjektive Beeinträchtigung	0,307**
Verzerrtsehen	
- Häufigkeit	0,236*
- Intensität	0,300**
- Subjektive Beeinträchtigung	0,300**

Schwankungen des Sehvermögens	
- Häufigkeit	0,451**
- Intensität	0,482**
- Subjektive Beeinträchtigung	0,433**
Fokussierungsprobleme	
- Häufigkeit	0,237*
- Intensität	0,285**
- Subjektive Beeinträchtigung	0,210*

Tabelle 13.: Korrelation visueller Phänomene mit dem Alter nach Spearman (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$).

Je schwächer der Visus gemessen in logMAR, desto häufiger nahmen die Patienten Blendung und Verzerrtsehen war und desto häufiger, stärker und störender zeigte sich die Wahrnehmung von Vernebeltsehen und Verschwommensehen. Ebenso korrelierte der störende Effekt des Doppeltsehens, der Schwankungen des Sehvermögens, der Fokussierungsprobleme und der Einschätzung von Entfernung und Tiefe positiv mit dem LogMAR-Visus (Tabelle 14).

	Visus in logMAR
Blendung	
- Häufigkeit	0,464**
Verzerrtsehen	
- Häufigkeit	0,558*
Vernebeltsehen	
- Häufigkeit	0,622**
- Intensität	0,606**
- Subjektive Beeinträchtigung	0,668**
Verschwommensehen	
- Häufigkeit	0,643**
- Intensität	0,643**
- Subjektive Beeinträchtigung	0,643**
Schwankungen des Sehvermögens	
- Subjektive Beeinträchtigung	0,356*

Doppeltsehen - Subjektive Beeinträchtigung	0,558*
Fokussierungsprobleme - Subjektive Beeinträchtigung	0,357*
Einschätzung von Entfernung und Tiefe - Subjektive Beeinträchtigung	0,525*

Tabelle 14: Korrelation visueller Phänomene mit der BCVA in logMAR nach Spearman (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$).

8.6. Einflussfaktoren auf Sehqualität und Sehschärfe

8.6.1. Korneale Cystinkristallablagerung

Der bestkorrigierte Fernvisus zeigte keine Korrelation mit den Werten der kornealen Cystinkristallakkumulation, die mit den vier unterschiedlichen Methoden der Quantifizierung erhoben wurden (Korrelationen mit dem stromalen Cystinkristallscore: $Rho=0,171$, $p=0,342$; CCCS: $Rho=0,226$, $p=0,311$; digitale Kalipermessung im Stroma: $R=0,161$, $p=0,404$; Analyse-Algorithmus SD-OCT: Anzahl der Suprathreshold-Pixel in % an der Gesamt-ROI für den Graustufenschwellenwert 211 ($R=-0,046$; $p=0,74$), 226 ($R=0,012$, $p=0,93$) und 241 ($R=-0,047$, $p=0,73$))

Der manuell im Rahmen der Spaltlampenbiomikroskopie gemessene stromale Cystinkristallscore zeigte eine positive Korrelation mit dem störenden Effekt durch das Vernebeltsehen ($Rho = 0,315$, $p=0,037$) und der Intensität und dem störenden Effekt des Verzerrtsehens ($Rho = 0,332$, $p=0,027$). Zudem fand sich bei Cystinose-Patienten mit einer höheren Dichte an kornealen Cystinkristallen ein vermehrtes Auftreten von Verschwommensehen und Schwankungen des Sehvermögens ($Rho=0,322$, $p=0,033$; $Rho=0,395$, $p=0,08$) mit einer höheren Intensität ($Rho=0,340$, $p=0,024$; $Rho=0,432$, $p=0,03$) und einem größeren störenden Effekt ($Rho=0,311$, $p=0,040$; $Rho=0,376$, $p=0,012$).

Die Ergebnisse der digitalen Kalipermessungen im Stroma (Anteil der Ablagerungstiefe am gesamten Stroma in %) und der CCCS nach Gahl zeigten keinen statistisch signifikanten Zusammenhang mit den subjektiven Parametern des Sehvermögens.

Das objektive Grading mittels des Grey Scale Schwellenwertsystems mit Thr 211 korrelierte positiv mit der Stärke von Schwierigkeiten in der Einschätzung von Entfernung und Tiefe ($Rho=0,386$ und $0,480$, $p=0,029$).

8.6.2. Chorioretinale Cystinkristallablagerung

Höhere RCCCS-Werte waren statistisch signifikant mit einer verminderten bestkorrigierten Sehschärfe assoziiert ($Rho=0,465$, $p<0,01$; Abbildung 20).

Während die Häufigkeit der Blendung nicht mit dem RCCCS korrelierte ($Rho=0,182$, $p=0,262$), zeigten Schweregrad und störender Effekt der Blendung eine statistisch signifikante positive Assoziation mit dem RCCCS ($Rho = 0,432$, $p=0,05$ und $Rho = 0,313$, $p=0,049$). Weder die Häufigkeit ($Rho=0,131$, $p=0,420$, noch der Schweregrad ($Rho=0,157$, $p=0,334$) oder der störende Effekt ($Rho=0,140$, $p=0,388$) der Wahrnehmung von Strahlenkränzen korrelierten mit dem RCCCS.

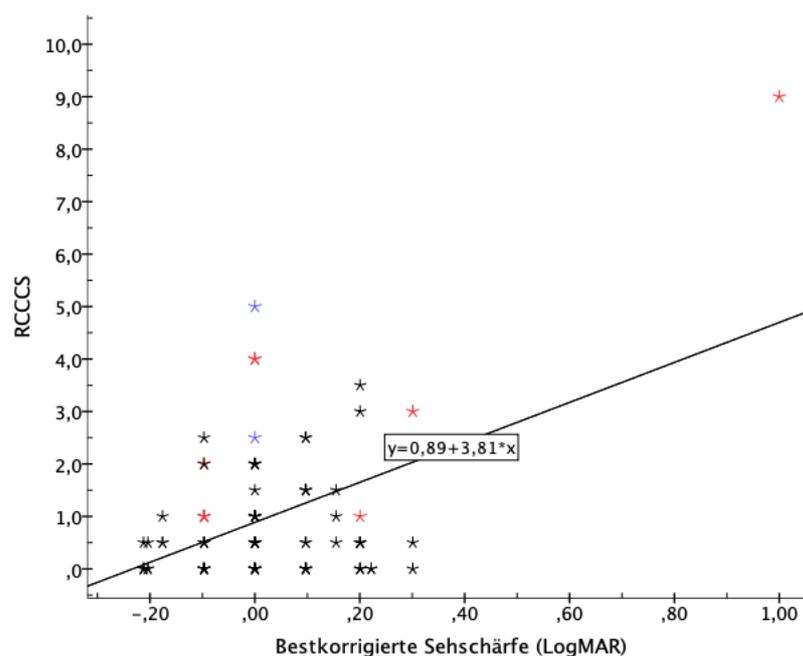


Abbildung 20: Korrelation des RCCCS mit der bestkorrigierten Sehschärfe in logMAR (105).

9. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Patientendaten ausgewertet, die im Rahmen der deutschen interdisziplinären Cystinosesprechstunde erhoben wurden. Angesichts der geschätzten Krankheitshäufigkeit von 1 zu 100.000 bis 1 zu 200.000 Lebendgeburt und der Tatsache, dass in Europa nur 10-15 neue Fälle von Cystinose pro Jahr diagnostiziert

werden (106) kann diese umfassend untersuchte Kohorte von 56 Cystinosepatienten als sehr wertvoll angesehen werden, um unser Verständnis für diese seltene lysosomale Stoffwechselerkrankung zu erweitern.

9.1. Lokalisation der Cystinkristallablagerungen

Pathognomonisch für die Cystinose ist die korneale und konjunktivale Beteiligung, die vom Augenarzt schon früh detektiert werden sollte. Ablagerungen von Cystinkristallen konnten in den der vorliegenden Studie in verschiedenen Strukturen des Auges, wie der Kornea, Konjunktiva, Iris, Choroidea, Retina und der Papille gefunden werden.

89 % aller Patienten zeigten in unserem Kollektiv eine korneale und 66% eine konjunktivale Cystinkristallablagerung, wobei die konjunktivalen Kristalle teils schwierig zu erkennen waren. Aufgrund der weißlichen Färbung und der geringeren Reflexivität ließen sich die Bindehautkristalle im Spaltlampenfoto schwierig visualisieren. Wie von Tsilou et al. vorbeschrieben, lassen sie die Bindehaut matter erscheinen (70).

Korneale Kristalle wurden, wie bereits beschrieben, in der gesamten Hornhautbreite gefunden und die Hornhautschicht mit der höchsten Kristalldichte stellte das Stroma dar (107). Aus diesem Grund wurde in der Auswertung auf den Stromabereich der zentralen Hornhaut fokussiert. In der in dieser Arbeit verwendeten AS-OCT beziehungsweise der Spaltlampenfotografie stellten sich die kornealen Cystinkristalle als flächige oder punktuelle hyperreflektive beziehungsweise goldgelbe Ablagerungen dar. Die flächigen Ablagerungen im AS-OCT lassen eine beschriebene vor allem extrazelluläre Lokalisation der Kristalle erahnen, da die Größe der hyperreflektiven Ablagerungen deutlich die Größe der Keratozyten von nur wenigen μm übersteigt (108). Die Cystinkristallablagerungen ließen sich im AS-OCT meist parallel zu den Stromalamellen nachweisen. Diese Konfiguration ist lediglich in der Kornea zu finden. Aktuelle Studien gehen davon aus, dass diese Anordnung durch die Interaktion des kationischen Cystins mit dem anionisch geladenen Kollagen im Stroma nach Apoptose der Keratozyten und Freisetzen des Cystins in dieser Form entsteht. Cystin lagert sich nach Apoptose an der Oberfläche des Kollagens ab und bildet nadelförmige intra- und extrazelluläre Strukturen in direkter Nähe zu den Stromalamellen (109).

Für eine morphologische Unterteilung in spindelförmige und nadelförmige Kristalltypen, wie sie mit der IVCN möglich ist, sind die Spaltlampenfotografie und die AS-OCT zu gering auflösend. Unabhängig von der Morphologie der Zellen lässt sich jedoch mittels dieser Bildgebungsmodalitäten ein standardisiertes Tiefenverteilungsmuster der Kristallablagerung darstellen.

Iriskristalle konnten, wie im Mausmodell vorbeschrieben, im Irisstroma und im Pigmentblatt der Iris gefunden werden. Auf eine Gonioskopie, die einen Kontakt zur Hornhaut erfordert hätte, haben wir bei den blendeempfindlichen Patienten verzichtet. Die in der Literatur beschriebenen Kristalle im Ziliarkörper konnten somit nicht nachgewiesen werden (110).

Im OCT des hinteren Augenabschnitts, sind Cystinkristalle als hyperreflektive Foci erkennbar, die in allen Schichten der Netzhaut und der Choroidea visualisiert werden konnten. Wie von Kalatzis et al. bereits für das Mausmodell beschrieben, fanden sich auch ich in der Retina weitaus weniger Kristalle als in der Choroidea. Die bildgebungsbasierten in vivo-Befunde im SD-OCT bestätigen frühere Studien im Mausmodell, in denen mittels Transmissionselektronenmikroskopie eine ausgeprägte Anhäufung von Cystin-Kristallen in der Aderhaut und der INL nachgewiesen wurde (110). Unsere Studienergebnisse gehen einher mit den SD-OCT Ergebnissen eines Fallberichts von Kozak et al., die Kristalle in allen Netzhautschichten beobachten konnten. Die Netzhautschichten mit der ausgeprägtesten Anhäufung von Cystinkristallen waren in unserem Kollektiv die innere Körner- und Ganglienzellschicht.

Die INL und GCL enthalten Zellkerne und Perikarya von Ganglienzellen, deren Axone die Nervenfaserschicht bilden, amakrine Zellen, Bipolarzellen und horizontale Zellen (111, 112). Da davon ausgegangen wird, dass sich Cystinkristalle intra- und extrazellulär ablagern (108), lässt sich die gehäufte Cystinkristallakkumulation in GCL und INL durch das zusätzliche Vorkommen von Zellkernen in diesen Schichten erklären. Bei genauerem Hinsehen finden sich Kristalle in der inneren Körnerschicht speziell in der Übergangszone zwischen den Schichten, an den Rändern der inneren Körnerschicht. Hier befinden sich die Netzhautkapillaren mit den sie ummantelnden Perizyten. Das Kapillarsystem der Netzhaut ist in drei Plexus - oberflächlich, intermediär und tief - unterteilt, die sowohl innerhalb der RNFL als auch in den Übergangszonen IPL/INL und INL/OPL lokalisiert sind (113).

Die Elektronenmikroskopie des Gehirns eines 28-jährigen Patienten, zeigte eine ausgeprägte Cystinkristallakkumulation innerhalb der Perizyten und innerhalb der parenchymalen Zellen der weißen Substanz (48). Perizyten sind ein wichtiger Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke, da sie die Endothelzellen von Mikrogefäßen im Gehirn wie Arteriolen, Venolen und Kapillaren umgeben. Sie dienen hier unter anderem als Hirnmakrophagen (114) und enthalten eine beträchtliche Anzahl von Lysosomen, einem makrophagentypischem strukturellen Merkmal (115). Die Phagozytose der dysfunktionalen cystinotischen Zellen durch die Perizyten in ihrer Funktion als Hirnmakrophagen und die hohe Anzahl an Lysosomen, könnte zu der ausgeprägten Lokalisation der Kristalle perivaskulär am Rand der inneren Körner- und Ganglienzellschicht führen. Perizyten in den entsprechenden Gefäßplexus könnten somit auch in der Retina die primären Zellen darstellen, in denen sich Cystinkristalle ablagern.

Einen weiteren prominenten retinalen Zelltyp mit phagozytischer Aktivität stellen die Mikroglia dar (116). In der Netzhaut befinden sich Mikroglia nur in den inneren Schichten. Auch dieser Zelltyp könnte als Ursprungszelltyp vermutet werden, da eine besonders ausgeprägte Cystinkristallakkumulation in den innere Netzhautschichten festgestellt werden konnte (117, 118).

Von Bedeutung ist auch, dass im Vergleich zur GCL und INL eine noch deutlichere Kristallablagerung in der gut vaskularisierten Choriokapillaris nachgewiesen werden konnte. Wie in der Netzhaut scheinen die Kristalle hier perivaskulär und in direkter Nähe zu den Zellen des retinalen Pigmentepithels lokalisiert zu sein. Dies geht einher mit früheren histologischen Arbeiten, in denen die Cystinkristallablagerungen in choroidalen Endothelzellen nachgewiesen werden konnten (70).

Mit der SD-OCT kann eine perivaskuläre Lokalisation der Kristalle bestätigt werden; der Ursprungszelltyp kann nur vermutet werden. Weitere histologische Untersuchungen sind erforderlich, um die verschiedenen Zelltypen genau zu differenzieren, seien es choroidale Endothelzellen, Perizyten, perivaskuläre angeborene Immunzellen in Form von residenten choroidalen Makrophagen oder Mikroglia (119).

Eine Degeneration des retinalen Pigmentepithels war lediglich in sehr späten Stadien zu finden. Eine Vakuolisierung des retinalen Pigmentepithels, wie sie von Tsilou et al. beschrieben wurden, konnte sich in den SD-OCT basierten Untersuchungen nicht bestätigen (70, 110). Ebenso wurden in unserem Kollektiv keine Knochenbälkchen

ähnlichen Veränderungen, wie sie in vorherigen Fallberichten beschrieben wurden, aufgezeigt (120-123).

9.2. Innovative Wertigkeit der entwickelten Messmethoden für die korneale und retinale Manifestation

Die Einhaltung der topischen und systemischen Cysteamintherapie hat einen erheblichen Einfluss auf das Fortschreiten der Erkrankung und kann okuläre und systemische Manifestationen deutlich verzögern. Es war daher ein besonderes Anliegen unserer Studie neue Biomarker der Erkrankung unter anderem auch zur Kontrolle der topischen und systemischen Therapie zu identifizieren, die eine langfristige Verbesserung der Therapiecompliance und des therapeutischen Outcomes ermöglichen können.

In unserem Kollektiv konnte die Diagnose einer nephropathischen Cystinose im Mittel im Alter von drei Jahren gestellt werden. Eine entsprechende cysteaminhaltige Therapie konnte somit schon ab einem frühen Alter initiiert werden. Ohne eine regelmäßige Einnahme der oralen Therapie entwickeln fast alle Patienten im Alter von zehn bis zwölf Jahren eine terminale Niereninsuffizienz (63). Der Zeitpunkt des Einsetzens einer terminalen Niereninsuffizienz wurde in unserem Kollektiv durch die frühe Therapieinitiierung und Therapiecompliance somit um circa sieben Jahre verzögert.

Das Auge als „Fenster zur Cystinose“ ist ein geeignetes Organ, um die cystinotische Kristallbildung früh darzustellen, da Biopsien der Niere im jungen Alter nicht durchgeführt werden und Nierenparameter aufgrund der großen funktionellen Reserve der Niere zu Beginn normal sein können (11, 124).

In Hinblick auf die korneale Cystinose kann der Visus nicht als Biomarker verwendet werden, da er nachweislich nicht mit der Akkumulation von Hornhautkristallen korreliert (58, 125). Auch in unserem Kollektiv zeigte keine der vier verwendeten Messmethoden für die korneale Cystinkristallablagerung (subjektiver stromaler Cystinkristallscore, CCCS nach Gahl, Kalipermessung im Stroma und Anzahl der Suprathreshold-Pixel in % am Gesamt-ROI für die getesteten Graustufenschwellenwerte 211) einen signifikanten Zusammenhang mit dem Visus. Wie im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert, sollten sich Augenärzte daher andere klinische Biomarker für die korneale Cystinkristallakkumulation zur Hilfe nehmen.

Bis heute stehen drei Klassifizierungssysteme für die korneale Kristallablagerung zur Verfügung, die unterschiedliche bildgebende Verfahren nutzen: das klinische Gahl-Spaltlampen-Klassifizierungssystem basierend auf der Spaltlampenfotografie (11), das AS-OCT basierte Gradingsystem mit einem digitalen manuellen Kaliper zur Bestimmung der Eindringtiefe der Cystinkristalle, sowie der Labbé IVCN-Score zur semiquantitativen Bewertung der Kristallablagerungen durch Vergleich von Cystinkristallen in IVCN-Aufnahmen von Cystinosepatienten mit einer standardisierten Bibliothek von IVCN-Bildern (107). Für die retinochoroidale Cystinkristallakkumulation existiert bisher keine standardisierte Auswertung.

In dieser Arbeit wurden der CCCS nach Gahl und das AS-OCT basierte Gradingsystem mittels digitaler manueller Kalipermessungen erhoben und verglichen. Zusätzlich wurde für die korneale Manifestation der stromale Cystinkristallscore basierend auf unseren Untersuchungsergebnissen der Spaltlampenbiomikroskopie und ein semiautomatisierter, grauwert-basierter AS-OCT-Bildgebungsalgorithmus entwickelt. Dieser Algorithmus stellt die erste objektive Messmethode für die Bewertung der kornealen Cystinkristalle dar. Für die retinochoroidale Manifestation der Cystinose konnte ein SD-OCT basierter retinochoroidaler Cystinkristallscore (RCCCS) ausgearbeitet werden. Der RCCCS ist das erste beschriebene System zur Quantifizierung und Graduierung der chorioretinalen Cystinkristalle.

9.2.1. Die optische Kohärenztomografie als optimale Bildgebungsmethode für die Cystinose

Sowohl die Spaltlampenmikroskopie als auch die IVCN arbeiten mit Licht im sichtbaren Bereich und sind daher für die meisten Cystinosepatienten, die an schwerer Photophobie leiden, nicht optimal geeignet. Auch in unserem Kollektiv entsprachen die aufgenommenen Spaltlampenfotografien aufgrund einer mangelnden Compliance der Patienten während der Untersuchung oft nicht der erforderlichen Aufnahmequalität. Eine standardisierte Aufnahme von Spaltlampenfotografien für Verlaufsuntersuchungen war teils nicht möglich.

Die IVCN erfordert aufgrund einer komplexen, zeitaufwendigen Aufnahmetechnik, die einen Kontakt des Geräts mit der Hornhautoberfläche des Patienten beinhaltet, einen erfahrenen Aufnahmetechniker, ist bei pädiatrischen Patienten nur bedingt durchführbar, steht nur in größeren Zentren zur Verfügung und wird in der klinischen Routine im

Allgemeinen nicht angewandt. Sie wurde daher auch im Rahmen der Datenerhebung nicht verwendet.

Die OCT ist Grundlage des neu entwickelten grauwert-basierten Bildgebungsalgorithmus für die Hornhautbeteiligung und des RCCCS. Diese Bildgebungsmodalität bietet mehrere Vorteile: Sie arbeitet in dem für das menschliche Auge unsichtbarem Infrarotbereich und kann somit gut als diagnostische Bildgebungsmodalität für blendeempfindliche Cystinosepatienten verwendet werden. Zudem verwendet sie im Vergleich zur IVCN eine „no-touch“-Technik und sollte daher vor allem bei jungen und lichtsensitiven Patienten verwendet werden (126, 127). Die OCT stellt eine standardisierte, hochauflösende und leicht reproduzierbare Aufnahmetechnik dar, die es ermöglichte einen semiautomatisierten, grauwert-basierten Bildgebungsalgorithmus zu entwickeln. Nachdem weder der Gahl-Score noch der Labbé-Score oder die Anwendung von manuellen Kalipern im AS-OCT objektive Messmethoden der Hornhautkristallablagerungen darstellen, ist der im Rahmen der Doktorarbeit entwickelte semi-automatisierte, grauwert-basierte Bildgebungsalgorithmus als erster objektiver Biomarker für die korneale Cystinkristallablagerung zu sehen.

Mithilfe des grauwert-basierten Bildgebungsalgorithmus war es erstmals möglich, nicht nur die stromale Kristalldichte objektiv zu quantifizieren, sondern auch verschiedene Tiefenverteilungsmuster bei kornealer Cystinose zu charakterisieren und zu typisieren (Tabelle 2). Das Verteilungsmuster der Hornhautkristalle im AS-OCT stellt sich zu heterogen für eine alleinige Beurteilung mittels Kalipermessungen von der anterioren Hornhautoberfläche in die Tiefe dar (107). So zeigten beispielsweise ein Viertel der Patienten Kristallablagerungen nur im vorderen Stroma, während ein weiteres Viertel Kristalle überwiegend im hinteren Stroma mit marginaler Beteiligung der vorderen Schichten zeigte (Abbildung 9).

Für die Auswertung wurde die Anzahl der Pixel über dem jeweiligen Schwellenwert als prozentualen Anteil der Pixelzahl an der Gesamt-ROI als Biomarker herangezogen. Da der Schwellenwert 211 den niedrigsten der drei Schwellenwerte darstellt, der bei Cystinose-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine statistisch signifikant höhere Anzahl an Suprathreshold Pixel ergab, empfiehlt sich eine Verwendung dieses Schwellenwertes auch in zukünftigen Studien. Er zeigt die höchste Wahrscheinlichkeit, hyperreflektive Foci (repräsentativ für Cystinkristalle) zu erfassen und grenzt

physiologisches Gewebe immer noch ausreichend von Cystinkristallen ab (Abbildungen 11 und 12).

Für die Quantifizierung der retinochoroidalen Cystinkristallablagerung, ist der neu entwickelte RCCCS als Marker des Schweregrades der cystinotischen Retinopathie erstmals beschrieben worden (105). Anhand dessen konnte ein Graduierungssystem mit vier verschiedenen Ausprägungsgraden festgesetzt werden (Abbildung 5, Tabelle 3).

Da die retinale und choroidale Vaskularisation mit dem systemischen Blutfluss verbunden sind, kann die Netzhaut als Fenster zu den systemischen Manifestationen der Cystinose genutzt werden. Die Kornea als bradytrophes Gewebe kann hierfür nicht verwendet werden. Tsilou et al. berichteten erstmals über einen direkten Zusammenhang zwischen der Inzidenz der cystinotischen Retinopathie, wie sie durch Fundoskopie, Perimetrie oder Elektroretinographie bestimmt wird und der Zeitspanne, in der die Patienten keine orale Cysteamintherapie erhielten (123). In ihrer Studie wurde jedoch die traditionelle Fundoskopie zum Screening auf Netzhautkristalle verwendet. Eine retinale Beteiligung fand sich lediglich in 50% der Patienten (128). In unserer Studie mit dem hochauflösenden SD-OCT konnten in 68,2% aller untersuchten Augen retinochoroidale Kristalle sichtbar gemacht werden. Darunter befanden sich auch asymptotische pädiatrische Patienten. Im Hinblick auf die häufig subretinale choroidale Lokalisation der Kristalle ist zu erwarten, dass die Kristalle im Rahmen der konventionellen Fundoskopie nicht erkannt werden. Einzelne choroidale Kristalle führen nicht unbedingt zu Funktionsstörungen und können daher im Frühstadium mittels Elektroretinogramm (ERG) oder Perimetrie nicht erfasst werden. Darüber hinaus sind Perimetrie und das ERG bei pädiatrischen photophoben Cystinosepatienten aufgrund der langen Aufnahmezeit bzw. der hellen Lichtblitze nur schwer durchführbar und bedingt verwertbar (129, 130).

Das SD-OCT-basierte RCCCS-System hingegen kann das Ausmaß der retinochoroidalen Cystinoseerkrankung auch in einem frühen Stadium genau detektieren, erfordert nur eine kurze Aufnahmezeit und steht einer großen Gruppe an Augenärzten zur Verfügung.

9.3. Anwendung der Messmethoden im Kollektiv

9.3.1. Korneale Cystinkristallablagerung

Durch die Anwendung dieser verschiedenen in der Literatur beschriebenen und im Rahmen der Studie neu entwickelten Messmethoden zur Typisierung und Graduierung

der okulären Cystinose-Manifestation ist es gelungen, die demografischen und klinischen Daten dieses Kollektivs standardisiert zu evaluieren. Die alten und neuen Biomarker können dazu beitragen, unser Verständnis der Pathophysiologie der kornealen und retinalen Manifestation der Cystinose zu erweitern.

Mithilfe des stromalen Cystinkristallscore und des CCCS nach Gahl konnte eine Zunahme der Cystinkristallablagerungen mit zunehmendem Alter nachgewiesen werden. In Bezug auf die Verteilung der kornealen Cystinkristalle bestätigten sowohl der in der vorliegenden Arbeit verwendete stromale Cystinkristallscore, der CCCS, die digitalen Kalipermessungen als auch der neu etablierte AS-OCT-Bildgebungsalgorithmus eine Entwicklung der Cystin-Kristallablagerung mit zunehmendem Alter, im anterioren Stroma beginnend, und im Verlauf den mittleren und posterioren Stromaanteil zunehmend einbeziehend. Diese Ergebnisse gehen einher mit früheren Beobachtungen in der Spaltlampenbiomikroskopie und IVCM (77, 107, 124, 128, 131, 132). In dem im Rahmen dieser Arbeit entwickeltem Typisierungssystem des Tiefenverteilungsmusters der kornealen Cystinkristallablagerungen, fand sich ein jüngeres Alter bei Patienten mit Cystinkristallablagerungen vorwiegend im anterioren Stromasegment (Typ I), im Vergleich zu Patienten mit Cystinkristallablagerungen vorwiegend im mittleren und posterioren Segment (Typ II und III). Ebenso zeigten sich die Patienten mit Typ I jünger, als mit Typ IV, bei dem die Cystinkristallablagerungen fast homogen auf alle Stromasegmente verteilt waren. Die Daten weisen darauf hin, dass die Ablagerungen der Cystinkristalle anfangs vorrangig im vorderen Segment lokalisiert sind und sich dann im weiteren Krankheitsverlauf mit zunehmendem Alter, diffus im gesamten kornealen Stroma auf alle Segmente ausweiten.

Zahlreiche Studien konnten eine Abnahme der Kristalldichte in cystinotischen Zellen und somit (133) eine Besserung der Symptomatik durch die Applikation cysteaminhaltiger Medikamente beschreiben (134-138). So wurde der CCCS nach Gahl durch die Applikation cysteaminhaltiger Augentropfen über einen 8-41monatigen Zeitraum auf 0-0,25 reduziert, unabhängig vom Alter und initialem CCCS. Auch in der quantitativen IVCM zeigte sich im Mausmodell nach Therapie mit cysteaminhaltigen Augentropfen eine Reduktion des Anstiegs der Kristallakkumulation um 158% im Vergleich zu unbehandelten Augen (124).

Unser Kollektiv beschreibt Therapieadhärenz und damit einhergehende Ablagerung kornealer Cystinkristalle außerhalb von Studienbedingungen im wahren Alltag der

Patienten. Der Großteil der Patienten verwendete cysteaminhaltige Augentropfen (81%), hiervon die Mehrzahl Cystadrops® (76%). Die Augentropfen wurden allerdings nicht suffizient appliziert, um einen ausreichenden Wirkspiegel herzustellen (bei Cystadrops® im Mittel zwei von vier notwendigen Malen; Cystaran™ AT im Mittel fünf von mindestens sechs Mal pro Tag). Die Dichte der Cystinkristallablagerungen zeigte sich in der vorliegenden Arbeit nicht signifikant abhängig von der angegebenen Anzahl an Cystadrops® Augentropfen, die zum Zeitpunkt der Erhebung appliziert wurden. Dies kann einerseits daran liegen, dass es im Krankheitsverlauf der Patienten teils zur fehlerhaften Durchführung beziehungsweise zu einem vollständigen Aussetzen des Therapieprotokolls aufgrund mangelnder Compliance oder schwieriger Verfügbarkeit des Wirkstoffs gekommen war. Andererseits wechselten viele Patienten im Krankheitsverlauf häufig zwischen wässrigen und gelförmigen Tropfen. Kaum ein Patient, tropfte die angegebene Anzahl an Cystadrops® stringent ein gesamtes Leben lang.

In Folgestudien empfiehlt es sich eine Auswertung von Langzeitergebnissen zusätzlich zu den erhobenen Querschnittsdaten der Patienten durchzuführen, um den Erfolg einer angesetzten Therapie valide evaluieren zu können. In einzelnen Patienten des beschriebenen Kollektivs, die bereits augenärztlich kontrolliert werden konnten, wurde eine deutliche Abnahme der kornealen Cystinkristallablagerungen unter regelmäßig applizierter Therapie beobachtet. Den Patienten war es möglich ihren individuellen Therapieerfolg visuell mittels der AS-OCT Scans zu evaluieren. Es kann davon ausgegangen werden, dass ein visueller Feedbackmechanismus in Zusammenhang mit regelmäßigen Kontrolluntersuchungen und Gesprächen die Patientencompliance und folglich das therapeutische Outcome im Verlauf deutlich verbessert.

9.3.2. Retinale Cystinkristallablagerung

Eine Vielzahl von Ergebnissen der vorliegenden Studie weisen darauf hin, dass das RCCCS-System als wertvoller Biomarker für die systemischen Krankheitsmanifestationen und das Monitoring der Krankheit dienen kann: Erstens zeigte der RCCCS eine positive Korrelation mit Cystatin C (Abbildung 18B), einem stabilen körpereigenen Protein zur Bestimmung der Nierenfunktion, welches im Vergleich zum üblicherweise verwendeten Parameter Kreatinin weniger von Alter und Muskelmasse des Patienten abhängt.

Zweitens zeigten Patienten mit einer niedrigen täglichen Cysteamindosis (Subgruppe keine oder milde Cystinkristallablagerung im Vergleich zur Subgruppe mit moderater Cystinkristallablagerung, Tabelle 12) einen hohen RCCCS (Abbildung 18A). Die Augen von Patienten mit bekannter geringer Therapiecompliance (rot markiert) oder von Patienten mit Cysteamintoleranz (blau markiert) zeigten besonders hohe RCCCS-Werte (Abbildung 18A-C).

Drittens konnten höhere RCCCS-Werte bei Patienten mit höheren leukozytären Cystin-Spiegeln, dem derzeit einzigen Biomarker zur Überwachung der oralen Cystinose-therapie, nachgewiesen werden (Tabelle 12, Abbildung 18C).

Viertens zeigten ältere Patienten signifikant höhere RCCCS-Werte, da die durch die Cystinose bedingten Endorganschäden mit zunehmendem Alter fortschreiten.

Fünftens wurde eine ausgeprägte Cystinkristall-Akkumulation in Patienten mit biallelischen Mutationen gefunden, die als "schwere nephropathische" Mutationen bezeichnet wurden (das heißt, 57 kb-Deletion, Abbildung 17). Dies stellt die häufigste Mutation in Patienten europäischer Abstammung dar. Sie verursacht eine schwere Form der cystinotischen Nephropathie (139). Der Zusammenhang weist darauf hin, dass der RCCCS einen frühen Marker für eine fortschreitende (renale) Endorganschädigung darstellt.

Anhand der OCT-Auswertungen konnte somit erstmals eine klinische Graduierung des Schweregrades der okularen Manifestation der infantilen nephropathischen Cystinose anhand des Ausmaßes der chorioretinalen Cystinkristallablagerungen entwickelt werden. Patienten zeigten mit zunehmender Cystinkristallablagerung (mild bis schwer) im Mittel ein höheres Alter, nahmen eine niedrigere Dosis des oralen Cysteamins ein und hatten ein höheres Cystatin C- sowie einen höheren leukozytären Cystinspiegel (Tabelle 12, Abbildung 18).

9.3.3. Subjektive Qualität des Sehvermögens

Okuläre Cystinkristalle verursachen unterschiedliche visuelle Probleme. Die Blendung stellt auch in unserem Kollektiv das häufigste Sehphänomen dar, gefolgt von der Wahrnehmung von Strahlenkränzen. Die Ablagerung von Cystinkristallen vor allem im Hornhautstroma verursacht eine Streuung des hineinfallenden Lichts und somit eine schwere Photophobie verbunden mit einem willkürlichen Blepharospasmus (11). Hinzu

kommen die mit zunehmender Krankheitsdauer entstehenden Folgen einer kristallbedingten Alteration der kornealen Oberfläche. Aufgrund der Irregularität der Hornhautoberfläche leiden Cystinose-Patienten häufig an einer Sicca-Symptomatik, wie Brennen, Fremdkörpergefühl und Epiphora.

Im Spätstadium der Erkrankung treten teils kleinere rezidivierende Erosiones bis hin zur filamentösen Keratopathie oder einer Bandkeratopathie auf (140). Zudem kann es zu einer durch die Kristalle bedingten Hypoxie der Kornea kommen, die die Bildung kornealer Neovaskularisationen mit weiterem Fortschreiten der Sehinderung induziert (141). Eine Abnahme des Visus in Patienten mit zunehmendem Alter kann demnach zum Teil auch an einer Zunahme der kristallbedingten Oberflächenproblematik und deren Folgen liegen. Hierfür spricht auch eine Zunahme von Verschwommen- und Vernebeltsehen, sowie Schwankungen des Sehvermögens bei Patienten mit vermehrter Cystinkristallakkumulation. Eine schwankende Sehschärfe, in Form intermittierender Phasen von Verschwommen- beziehungsweise Vernebeltsehen, ist bei Patienten mit einer ausgeprägten Oberflächenproblematik bekannt (133, 142).

Die vermehrte Wahrnehmung von *Strahlenkränzen* mit zunehmendem Alter kann auf einer Zunahme kornealer Cystinkristalle beruhen, die eine vermehrte Streuung einzelner Lichtstrahlen hervorrufen. Die Cystinkristalldichte im Stroma korrelierte in unserem Kollektiv interessanterweise jedoch nicht signifikant mit der *Blendeempfindlichkeit* und der Wahrnehmung von *Strahlenkränzen*. Es ist somit neben der kornealen Cystinkristallablagerung von ergänzenden Faktoren auszugehen, die das subjektive Blendeempfinden beeinflussen. Histologische Untersuchungen zeigten, dass sich gerade im posterioren Teil des Hornhaut-Stromas eine Assoziation der Cystinkristalle mit inflammatorischen dendritischen Zellen findet. Mit zunehmendem Alter wird sowohl eine Zunahme der Cystinkristalldichte, als auch eine Zunahme der Migration inflammatorischer dendritischer Zellen in die Kornea (143) beschrieben. Eine Entzündung des vorderen Augenabschnitts stellt bei allen ophthalmologischen Erkrankungen die häufigste Ursache der Photophobie dar. Es wird davon ausgegangen, dass dies an einer direkten Irritation der afferenten trigeminalen Nervenfasern durch ausgeschüttete Entzündungsmediatoren liegt (144, 145). Liang et al. berichten auch in der Cystinose über eine positive Korrelation der inflammatorischen dendritischen Zellen in der Bowman-Membran mit dem subjektiven Photophobie-Score der Patienten. Ebenso zeigten sich morphologische Veränderungen der Nervenfasern, die durch eine gesteigerte Aktivierung nozizeptiver Fasern, hervorgerufen werden könnten (126). Diese

Untersuchungen weisen darauf hin, dass neben der Cystinkristallablagerung, eine gesteigerte korneale Inflammation im Rahmen der Cystinose den Blendungseffekt maßgeblich beeinflussen kann.

In diesem Zusammenhang wäre es in Folgestudien und in der Betreuung von Cystinosepatienten sinnvoll, den Effekt der Verwendung entzündungshemmender Augentropfen in Verbindung mit Cysteamin-Augentropfen und deren Einfluss auf die Photophobie herauszuarbeiten. Gegenwärtig werden entzündungshemmende Augentropfen bei Cystinosepatienten insbesondere zur Behandlung des mit fortschreitendem Krankheitsstadium zunehmend belastenden trockenen Auges angewandt.

Die retinochoroidale Cystinkristallablagerung zeigte in unseren Untersuchungen eine positive Korrelation mit der *Schwere der Blendeempfindlichkeit* der Patienten. Es lässt sich ableiten, dass die cystinotische Retinopathie, zusätzlich zu der durch die Hornhautkristalle verursachten Streuung des Lichts und der gesteigerten kornealen Inflammation, als Confounder die Blendeempfindlichkeit i.R. der Photophobie aggraviert (11).

Im Gegensatz zur Blendeempfindlichkeit korrelierte die subjektive Verschlechterung der *Sehqualität* (*Vernebeltsehen, Verschwommensehen, Verzerrtsehen*) positiv mit der kornealen Cystinkristallakkumulation, die mit dem subjektiven stromalen Cystinkristallscore bestimmt wurde.

Es ergab sich, wie bereits mehrfach vorbeschrieben, dennoch ein fehlender Zusammenhang zwischen der *Sehschärfe* in logMAR und der kornealen Cystinkristallakkumulation, die mit den vier Messmethoden erfasst wurde (54, 116). Dies weist darauf hin, dass eine ausgeprägte korneale Cystinkristallakkumulation zunächst zu einer Abnahme der Sehqualität führt, nicht aber der Sehschärfe. Über die Hälfte der Patienten in unserem Kollektiv (66,07%) gaben einen Visus von 0,8 oder höher an. Wie von Gahl et al. beschrieben, kann die Sehschärfe dennoch in späteren Krankheitsstadien abnehmen. Diese Beobachtung konnte mit unseren Untersuchungen durch die Abnahme der BCVA mit zunehmendem Alter bestätigt werden (58).

Einen Grund für eine messbare Visusabnahme in späteren Krankheitsstadien könnte die Zunahme der retinochoroidalen Manifestation im Rahmen der Cystinose darstellen. Im Unterschied zur kornealen Cystinkristallakkumulation kann die cystinotische

Retinopathie zu einer progressiven Abnahme der Sehschärfe sowie des Nacht- und Farbsehens führen (58, 125). Darüber hinaus können ein signifikanter Gesichtsfeldverlust und reduzierte Antworten im Elektroretinogramm (ERG) auftreten (123, 146-148). Auch in der vorliegenden Arbeit war der SD-OCT-Parameter RCCCS als Maß für die retinochoroidale Kristallakkumulation negativ mit der Sehschärfe assoziiert (Abbildung 20). Hinzu kommen die mit zunehmender Krankheitsdauer entstehenden Folgen im Rahmen der kristallinen Keratopathie mit Oberflächenproblematik.

In geringem Maße zur Visusminderung beitragend sind eine Kataraktbildung und ein Papillenödem zu nennen. Eine visuslimitierende Kataraktbildung fand sich jedoch lediglich in vier Augen (3,6%). Ein klinisch signifikantes Papillenödem konnte nur in drei Augen nachgewiesen werden (2,7%) (Tabelle 7).

9.4. Ausblick

Für die vorliegende Dissertationsschrift wurde ein Kollektiv von 56 an Cystinose erkrankten Patienten bezüglich demografischer, klinischer, apparativ-zusatzdiagnostischer, bildgebend-morphologischer, laborchemischer, genetischer, funktioneller und therapeutischer Parameter untersucht. Es wurden Biomarker entwickelt, die es erlauben die okuläre Manifestation der Cystinose zu typisieren, bezüglich des Schweregrades zu graduieren sowie die therapeutische Effizienz und den Krankheitsverlauf zu monitoren. Die Biomarker erlauben es dem Patienten ein direktes Feedback für seinen individuellen Therapieerfolg zu geben. Dies ist von besonderer Bedeutung bei Cystinose-Patienten im Teenager- und jungen Erwachsenenalter zur Verbesserung einer in diesen Altersgruppen nicht selten verminderten Therapiecompliance.

Unter der Projektleitung von Frau PD Dr. Priglinger wurde die Entwicklung eines semiautomatisierten AS-OCT B-Bildsegmentierungsalgorithmus angeregt, um die Akkumulation und Verteilung von kornealen Cystinkristallen zu quantifizieren. Die objektive Quantifizierung und Visualisierung des Therapieerfolgs in Form einer Regression der Kristallablagerungen (grafisch dargestellt mit farbcodierten AS-OCT-B-Scan-Bildern) kann für den Patienten zukünftig eine hohe Motivation darstellen, sich an sein Therapiekonzept zu halten und damit den prospektiven Krankheitsverlauf günstig zu beeinflussen. Dies ist besonders für die Altersgruppe mit der geringsten Compliance

interessant, den 21-30jährigen (149). Die Patienten befinden sich an einer Schnittstelle, einerseits in ihrem eigenen Leben, andererseits im Gesundheitssystem. Sie ziehen von zu Hause aus und müssen aufgrund ihrer Volljährigkeit vom Kinderneurologen zum Internisten wechseln, der teils die Vorgeschichte des Patienten nicht kennt und mit der „Kinderkrankheit“ Cystinose häufig nicht sehr vertraut ist. Hier ist eine standardisierte Dokumentation des Krankheitsverlaufs von besonderer Wichtigkeit, da so eine Versorgungskontinuität trotz interdisziplinärer Versorgungsschnittstelle gewährleistet werden kann. Ergebnisse der AS-OCT Scans und Ausdrücke können direkt mit neuen Untersuchungen verglichen werden und der Patient kann an sein Therapieprotokoll anknüpfen.

Ebenso konnte erstmals ein Parameter zur Frühdiagnostik und zur Quantifizierung retinochoroidaler Cystinkristalle vorgestellt werden. Bisher existiert kein standardisierter, stabiler, nicht-invasiver Parameter, der als Biomarker für den Therapieerfolg der systemischen Therapie dienen kann. Der häufig zum Monitoring eingesetzte leukozytäre Cystinspiegel zeigt sich stark abhängig von der Einnahmezeit der oralen Therapie und kann somit nicht als Langzeitparameter verwendet werden. Der RCCCS stellt den ersten, stabilen Biomarker zur Überwachung der Therapieadhärenz der oralen Therapie dar. Die Anwendung dieses Biomarkers kann die Compliance der Patienten erheblich verbessern, da die Reduktion der Retinakristalle auf den SD-OCT-Scans von den Patienten selbst beobachtet und quantifiziert werden kann. Mit Hilfe einer „deep learning“ basierten OCT-Segmentierung und einer begleitenden laminären Auflösung der Choroidea und Retina könnte in naher Zukunft eine objektive und vollautomatische Auswertung der retinochoroidalen Cystinkristalldichte möglich sein.

Dem genauen Monitoring der systemischen Therapie kommt ein besonderer Stellenwert zu, da eine adäquate Therapieadhärenz die Entwicklung einer Niereninsuffizienz verzögern und die Lebenserwartung verlängern kann (63). Klinische longitudinale Studien mit dem neuartigen RCCCS-System sind erforderlich, um die zeitliche Dynamik zwischen der Ablagerung retinochoroidaler Kristalle und der systemischen Krankheitsmanifestation zu untersuchen.

Die Forschung im Bereich der Cystinose, als eine der wenigen therapierbaren Stoffwechselerkrankungen bleibt weiter innovativ und zukunftssträftig. Im Rahmen des Pilotprojekts für das erste molekulargenetische Neugeborenenenscreening auf Cystinose wurde nun 2019 der erste Säugling noch vor einer renalen Manifestation erfolgreich auf

Cystinose gescreent (150). Eine Therapie konnte bereits am 18. Lebensstag erfolgen und der Patient zeigte auch nach dem ersten Lebensjahr keinen Hinweis auf eine Verminderung des Größenwachstums oder eine tubuläre Dysfunktion. Die Therapieoptionen sind aktuell bei weitem nicht ausgeschöpft. Die Durchführung einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation könnte einen erfolgsversprechenden neuen Therapieansatz darstellen.

Im Rahmen der umfassenden, interdisziplinären Untersuchung einer großen Kohorte von Cystinosepatienten konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit ein Beitrag zur Diagnostik, Klassifikation, Schweregradskalierung und pathogenetischen Abklärung der Cystinose geleistet werden. Die nationale Etablierung eines flächendeckenden kooperierenden Netzwerks mit Einbeziehung der Augenklinik zur Verbesserung der Forschung und Versorgung der Cystinose-Patienten ist paradigmatisch. Unsere neuen Biomarker und Ansätze werden nun in die klinische Praxis integriert. Ich freue mich, auch über meine Doktorarbeit hinaus, an der Cystinoseforschung mitzuwirken und die Pathophysiologie dieser Erbkrankheit anhand unserer Langzeitergebnisse weiter beleuchten zu dürfen.

10. Anhang

10.1. Synopsis der demografischen und klinisch- ophthalmologischen Patientendaten

Die demografischen und klinisch-ophthalmologischen Patientendaten, die als Grundlage einer statistischen Auswertung dienen sind in Tabelle 16 zusammenfassend dargestellt.

Pat. ID	Alter	Geschlecht	Applizierte Cystadrops /Tag	Visus in log-MAR RA	Visus in log-MAR LA	Bindehaut-kristalle (+: ja, -: nein)	Limbus-kristalle (+: ja, -: nein)	CCCS nach Gahl	Stromaler Cystin-kristall-score	Hornhaut-pannus (+: ja, -: nein)	Katarakt (+: ja, -: nein)	Papillen-ödem (+: ja, -: nein)
1	12	w	3	-0,2	-0,2	+	-	1,63	2	-	+	-
2	15	w	3	-0,2	-0,2	+	+	2,38	2,5	-	-	-
3	16	m	4	-0,1	-0,1	-	-	1,75	2,5	-	-	-
4	15	w	2	0,0	0,0	+	+	2,75	3	-	-	-
5	15	w	2	0,0	0,0	+	+	5,25	3	-	-	-
6	5	m	3	0,0	0,1	-	-	0,5	1	-	-	-
7	11	w	1	0,0	0,0	-	-	2,75	3	-	-	+
8	14	w	1	0,0	0,0	+	+	2,38	1	-	-	-
9	19	w	2	-0,1	0,0	+	+	1,89	2	-	-	-
10	8	m	4	0,1	0,2	-	-	0	0	-	-	-
11	33	m	2	0,0	0,0	+	+	3	3	+	-	-
12	33	m	0	1,0	lux	+	+	/(pKP)	/(pKP)	+	-	-
13	19	w	2	0,1	0,2	+	+	2,25	1	-	-	-
14	37	w	2	0,0	0,0	+	+	1,75	3	-	-	-
15	23	m	/	0,0	-0,1	-	-	0,5	1	-	-	-
16	6	w	4	0,2	0,2	-	-	1,13	1	-	-	-
17	18	w	2	0,0	0,0	+	+	2,25	2	-	-	-
18	33	m	2	0,0	-0,1	+	+	2,89	2	-	-	-
19	28	m	4	0,3	0,2	+	+	1,38	3	+	-	-
20	26	m	/	-0,1	-0,2	+	+	2,25	2	-	-	-
21	17	m	4	-0,2	-0,2	-	-	1,89	2	-	-	-
22	17	m	4	0,2	0,2	-	-	2,63	1	-	-	-
23	14	m	4	0,0	0,0	-	-	2,63	2	-	-	-
24	14	m	1	-0,1	-0,1	+	-	2,5	2	-	-	-
25	26	w	0	0,0	0,0	+	+	2,75	3	-	-	-
26	29	w	2	lilo	0,3	+	+	3	3	-	-	-

27	16	m	4	-0,2	-0,2	+	+	0,25	1	-	-	-
28	8	w	/	-0,1	0,0	+	+	1	1	-	-	-
29	24	m	2	-0,1	-0,2	+	+	0,63	1	-	-	-
30	27	m	2	0,0	0,0	+	+	2	3	-	-	+
31	32	w	0	0,0	0,0	+	-	2,75	2,5	-	-	-
32	75	w	4	1,0	0,6	+	+	2,25	3	+	-	-
33	35	m	4	NL	0,2	+	+	0,63	3	+	-	-
34	1	m	0	fix	fix	-	-	/	/	-	-	-
35	6	m	0	0,1	0,1	-	-	/	1	-	-	-
36	29	m	4	0,1	0,2	+	+	2,13	1	-	-	-
37	6	m	0	0,1	0,0	-	-	0,38	1	-	-	-
38	26	w	0	0,1	0,2	+	+	2,38	3	-	-	-
39	37	m	4	0,3	0,3	+	+	2,75	/	+	-	-
40	37	w	4	1,0	0,7	+	+	0,63	/	+	-	-
41	18	m	2	0,2	0,1	+	+	2	1	-	+	-
42	17	w	1	0,1	0,2	-	-	2,5	2,5	-	-	-
43	39	m	4	0,3	0,1	+	+	1,63	2	+	-	-
44	26	m	0	-0,1	-0,1	+	+	2,89	3	-	-	-
45	32	m	/	0,2	0,1	+	+	2,5	3	+	-	-
46	26	m	0	0,1	-0,1	+	+	2,5	3	-	-	-
47	29	w	4	0,0	0,1	+	+	2,38	2	-	-	-
48	28	w	2	-0,1	0,1	+	+	2,89	2,5	-	-	-
49	4	m	0	0,1	0,2	-	-	0,75	/	-	-	-
50	5	w	1	0,2	0,1	-	-	1,25	1	-	-	-
51	26	w	3	0,0	0,1	+	-	1,89	1	-	-	-
52	2	m	/	0,2	fix	-	-	0,5	1	-	-	-
53	7	m	4	0,0	0,0	-	-	/	1	-	-	-
54	3	w	0	0,4	0,2	-	-	1,5	1	-	-	-
55	8	m	2	0,2	0,2	-	-	2	3	-	-	-
56	44	m	4	0,2	0,2	+	+	1,75	2	-	-	-

Tabelle 15: Klinisch ophthalmologische Parameter des gesamten Cystinosekollektivs für die 56 untersuchten Patienten

10.2. Zusammenfassung der systemischen/apparativ diagnostischen Patientendaten

Die systemischen und apparativ diagnostischen Untersuchungsdaten, die als Grundlage einer statistischen Auswertung dienen sind in Tabelle 17 zusammenfassend dargestellt.

Pat. ID	Eindringtiefe /%Stromadicke	Thr. 211/% gesamt	Thr. 211/% S1	Thr. 211/% S2	Thr. 211/% S3	RCCCS	Leukozytäres Cystin (nmol/mg)	Cysteamin-dosis (mg/kgKG/Tag)	Cyst. C	Allel1	Allel2
1	0,45	0,0321	0,0262	0,0042	0,0018	0	0,15	57,81	0,86	c.18_21delGACT	c.18_21delGACT
2	0,96	0,0363	0,0128	0,0148	0,0087	0,25	0,27	52,52	1,28	c.18_21delGACT	c.18_21delGACT
3	0,88	/	/	/	/	2,25	0,75	40,08	2,38	57-kb-Deletion	57-kb-Deletion
4	0,71	/	/	/	/	0,5	0,55	27,32	1,84	57-kb-Deletion	c.926dupG
5	0,81	/	/	/	/	0,75	1,1	29,82	1,69	57-kb-Deletion	c.926dupG
6	/	/	/	/	/	/	/	52,6	/	c.18_21delGACT	c.18_21delGACT
7	0,84	0,0316	0,0181	0,0135	0,0000	1,25	0,57	49,86	2,03	57-kb-Deletion	c.18_21delGACT
8	0,50	0,0321	0,0306	0,0106	0,0084	1	1,19	38,63	2,41	57-kb-Deletion	57-kb-Deletion
9	0,93	0,0249	0,0208	0,0040	0,0002	0	0,26	42,86	1,21	57-kb-Deletion	1033InsCG
10	0,43	0,0321	0,0162	0,0010	0,0000	2,25	0,56	64,17	2,74	c.18_21delGACT	c.18_21delGACT
11	1,00	/	/	/	/	1,25	3,3	12,78	1,65	57-kb-Deletion	57-kb-Deletion
12	/	/	/	/	/	9	/	6,6	/	57-kb-Deletion	57-kb-Deletion
13	0,99	0,0672	0,0089	0,0298	0,0284	3	0,66	35,29	7,08	/	/
14	1,00	0,0267	0,0103	0,0118	0,0046	3,75	/	0	4,03	/	/
15	0,87	0,0403	0,0193	0,0185	0,0025	0,5	0,92	29,7	1,52	57-kb-Deletion	57-kb-Deletion
16	0,24	0,0385	0,0365	0,0020	0,0000	0,5	0,92	66,41	1,22	57-kb-Deletion	c.613G>A(D205N)
17	0,49	0,0705	0,0357	0,0162	0,0000	0	0,21	36,41	0,86	57-kb-Deletion	c.926dupG
18	0,99	/	/	/	/	0,5	0,39	45,28	1,18	57-kb-Deletion	57-kb-Deletion
19	1,00	0,0289	0,0219	0,0000	0,0070	2	/	/	/	57-kb Deletion	c.18_21delGACT
20	0,99	0,1406	0,0268	0,0433	0,0650	1	0,46	25,71	1,33	57-kb-Deletion	57-kb-Deletion
21	0,49	0,3900	0,1302	0,0743	0,0000	0,25	0,38	40,96	1,11	c.926dupG	400DelGGT
22	0,30	0,1002	0,0958	0,0022	0,0022	0,25	0,11	24,47	1,23	57-kb-Deletion	57-kb-Deletion
23	0,61	0,1089	0,0873	0,0215	0,0002	1	0,07	35,07	1,14	57-kb-Deletion	57-kb-Deletion
24	0,56	/	/	/	/	0,5	0,4	45,71	0,69	c.926dupG	c1015G>A(G229R)
25	0,99	/	/	/	/	4	2,97	0	5,87	57-kb-Deletion	57-kb-Deletion
26	/	/	/	/	/	/	1,85	48,2	/	57-kb Deletion	57-kb Deletion

27	1,00	0,0913	0,0504	0,0309	0,0101	0,5	/	33,87	2,12	/	/
28	0,28	0,0574	0,0515	0,0056	0,0004	0,25	0,43	62,25	0,98	57-kb-Deletion	57-kb-Deletion
29	0,83	0,0971	0,0052	0,0358	0,0562	0	0,2	41,18	1,99	c.18_21delGACT	/
30	0,84	0,0484	0,0349	0,0136	0,0000	0	0,79	33,9	1,5	c.18_21delGACT	/
31	0,99	0,0586	0,0127	0,0295	0,0164	1,75	1,23	20	2,9	57-kb-Deletion	57-kb-Deletion
32	1,00	0,0762	0,0762	0,0000	0,0000	/	/	/	/	/	/
33	/	/	/	/	/	/	1,34	39,3	/	/	/
34	/	/	/	/	/	/	0,36	50	/	57-kb-Deletion	57-kb-Deletion
35	/	/	/	/	/	/	0,63	79	/	c.696_697dupCG	Deletion von Exon
36	0,48	0,0587	0,0565	0,0023	0,0000	0	2,4	37,86	/	1118 T>C	/
37	/	/	/	/	/	/	0,69	48,6	/	57-kb- Deletion	c.852G>T (Q284H)
38	1,00	0,0516	0,0113	0,0316	0,0088	1,25	/	/	1,39	/	/
39	1,00	0,1951	0,0965	0,0056	0,0929	0,25	2,2	38,1	3,54	c.926dupG	/
40	/	/	/	/	/	/	/	/	/	IVSI-4IC>T	c.-520T>C
41	0,38	0,0618	0,0532	0,0086	0,0000	0,25	/	/	1,77	57-kb-Deletion	57-kb-Deletion
42	0,95	0,0364	0,0300	0,0064	0,0000	2	0,7	32,09	1,25	57- kb-Deletion	1118 T>C
43	/	/	/	/	/	/	0,72	41,4	/	c.18_21delGACT	c.18_21delGACT
44	0,93	0,1763	0,0255	0,1448	0,0060	1,5	5,7	/	/	/	/
45	1,00	0,0248	0,0189	0,0017	0,0042	0,5	0,56	32,3	1,79	57-kb-Deletion	57-kb Deletion
46	0,99	0,0568	0,0033	0,0060	0,0475	0,25	1,5	30,1	2,35	c.926dupG	c.926dupG
47	1,00	0,0743	0,0005	0,0090	0,0648	1,25	/	/	/	57-kb Deletion	c.926dupG
48	1,00	/	/	/	/	0,5	1,26	/	2,29	/	/
49	0,39	0,0316	0,0316	0,0000	0,0000	/	0,53	/	/	c.516dupc	c.516dupc
50	0,10	/	/	/	/	0	0,62	66,7	0,95	/	/
51	1,00	0,0513	0,0000	0,0026	0,0488	0	0,51	46,1	1,47	57-kb Deletion	c.926dupG
52	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
53	0,92	/	/	/	/	1,25	1,1	56,3	0,93	c.295_298del (GTTT)	c.1015G>A (G339R)
54	0,19	0,0279	0,0279	0,0000	0,0000	/	0,52	51,2	/	c.295_298del (GTTT)	c.1015G>A (G339R)
55	0,93	0,0914	0,0663	0,0251	0,0000	0	/	/	1,0	57-kb-Deletion	57-kb-Deletion
56	0,45	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

Tabelle 16: OCT-basierte und internistische Parameter des gesamten Cystinosekollektivs. (2. Spalte: Ergebnisse der manuellen Kalipermessungen im AS-OCT: Prozentualer Anteil der Eindringtiefe der Cystinkristallablagerungen im kornealen Stroma an der jeweiligen Stromadicke, Spalten 3-6: Ergebnisse des schwellenwertbasierten AS-OCT-Algorithmus: Prozentualer Anteil aller über der Grauwertschwelle 211 liegenden Pixel der gesamten ROIs (Spalte3), bzw. des 1., 2. bzw. 3. Stromasegments (Spalten 4-6) an allen Pixeln in der ROI.

1. Literaturverzeichnis

1. Foreman JW. Fanconi Syndrome. *Pediatr Clin North Am.* 2019;66(1):159-67.
2. Hohenfellner K, Deerberg-Wittram J. Coordinated, Cost-effective Care for Rare Disease: The Cystinosis Outpatient Consultation Program at RoMed. *NEJM Catalystr.* 2020;1(4).
3. Thoene JG, Oshima RG, Crawhall JC, Olson DL, Schneider JA. Cystinosis. Intracellular cystine depletion by aminothiols in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 1976;58(1):180-9.
4. Elmonem MA, Veys KR, Soliman NA, van Dyck M, van den Heuvel LP, Levtchenko E. Cystinosis: a review. *Orphanet J Rare Dis.* 2016;11:47.
5. Kalatzis V, Nevo N, Cherqui S, Gasnier B, Antignac C. Molecular pathogenesis of cystinosis: effect of CTNS mutations on the transport activity and subcellular localization of cystinosin. *Hum Mol Genet.* 2004;13(13):1361-71.
6. Anikster Y, Lucero C, Guo J, Huizing M, Shotelersuk V, Bernardini I, et al. Ocular nonnephropathic cystinosis: clinical, biochemical, and molecular correlations. *Pediatr Res.* 2000;47(1):17-23.
7. Wilmer MJ, Emma F, Levtchenko EN. The pathogenesis of cystinosis: mechanisms beyond cystine accumulation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;299(5):F905-16.
8. David D, Princiero Berlingerio S, Elmonem MA, Oliveira Arcolino F, Soliman N, van den Heuvel B, et al. Molecular Basis of Cystinosis: Geographic Distribution, Functional Consequences of Mutations in the CTNS Gene, and Potential for Repair. *Nephron.* 2019;141(2):133-46.
9. Kalatzis V, Antignac C. New aspects of the pathogenesis of cystinosis. *Pediatr Nephrol.* 2003;18(3):207-15.
10. Cherqui S, Courtoy PJ. The renal Fanconi syndrome in cystinosis: pathogenic insights and therapeutic perspectives. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13(2):115-31.
11. Gahl WA, Kuehl EM, Iwata F, Lindblad A, Kaiser-Kupfer MI. Corneal crystals in nephropathic cystinosis: natural history and treatment with cysteamine eyedrops. *Mol Genet Metab.* 2000;71(1-2):100-20.
12. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell.* 2004;6(4):463-77.
13. Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell.* 2000;103(2):253-62.
14. Colaco A, Jaattela M. Ragulator-a multifaceted regulator of lysosomal signaling and trafficking. *J Cell Biol.* 2017;216(12):3895-8.
15. Zoncu R, Bar-Peled L, Efeyan A, Wang S, Sancak Y, Sabatini DM. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science.* 2011;334(6056):678-83.
16. Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol.* 2000;150(6):1507-13.
17. Ivanova EA, van den Heuvel LP, Elmonem MA, De Smedt H, Missiaen L, Pastore A, et al. Altered mTOR signalling in nephropathic cystinosis. *J Inherit Metab Dis.* 2016;39(3):457-64.
18. Andrzejewska Z, Nevo N, Thomas L, Chhuon C, Bailleux A, Chauvet V, et al. Cystinosin is a Component of the Vacuolar H⁺-ATPase-Ragulator-Rag Complex Controlling Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 Signaling. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(6):1678-88.

19. Sansanwal P, Yen B, Gahl WA, Ma Y, Ying L, Wong LJ, et al. Mitochondrial autophagy promotes cellular injury in nephropathic cystinosis. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(2):272-83.
20. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 2000;19(21):5720-8.
21. Sansanwal P, Sarwal MM. Abnormal mitochondrial autophagy in nephropathic cystinosis. *Autophagy.* 2010;6(7):971-3.
22. Bar-Peled L, Schweitzer LD, Zoncu R, Sabatini DM. Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Cell.* 2012;150(6):1196-208.
23. Bellomo F, Signorile A, Tamma G, Ranieri M, Emma F, De Rasmio D. Impact of atypical mitochondrial cyclic-AMP level in nephropathic cystinosis. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(18):3411-22.
24. Dawson TL, Gores GJ, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ. Mitochondria as a source of reactive oxygen species during reductive stress in rat hepatocytes. *Am J Physiol.* 1993;264(4 Pt 1):C961-7.
25. Yorimitsu T, Nair U, Yang Z, Klionsky DJ. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J Biol Chem.* 2006;281(40):30299-304.
26. Kimonis VE, Troendle J, Rose SR, Yang ML, Markello TC, Gahl WA. Effects of early cysteamine therapy on thyroid function and growth in nephropathic cystinosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80(11):3257-61.
27. Zimakas PJ, Sharma AK, Rodd CJ. Osteopenia and fractures in cystinotic children post renal transplantation. *Pediatr Nephrol.* 2003;18(4):384-90.
28. Chan AM, Lynch MJ, Bailey JD, Ezrin C, Fraser D. Hypothyroidism in cystinosis. A clinical, endocrinologic and histologic study involving sixteen patients with cystinosis. *Am J Med.* 1970;48(6):678-92.
29. Gahl WA, Schneider JA, Thoene JG, Chesney R. Course of nephropathic cystinosis after age 10 years. *J Pediatr.* 1986;109(4):605-8.
30. Winkler L, Offner G, Krull F, Brodehl J. Growth and pubertal development in nephropathic cystinosis. *Eur J Pediatr.* 1993;152(3):244-9.
31. Chik CL, Friedman A, Merriam GR, Gahl WA. Pituitary-testicular function in nephropathic cystinosis. *Ann Intern Med.* 1993;119(7 Pt 1):568-75.
32. Hillenbrand M, Stropahl G, Seiter H. Massive tumour-like testicular cystine accumulation in a patient with infantile nephropathic cystinosis. *Br J Urol.* 1998;81(2):331-2.
33. Reiss RE, Kuwabara T, Smith ML, Gahl WA. Successful pregnancy despite placental cystine crystals in a woman with nephropathic cystinosis. *N Engl J Med.* 1988;319(4):223-6.
34. Robert JJ, Tete MJ, Guest G, Gagnadoux MF, Niaudet P, Broyer M. Diabetes mellitus in patients with infantile cystinosis after renal transplantation. *Pediatr Nephrol.* 1999;13(6):524-9.
35. Filler G, Amendt P, von Bredow MA, Rohde W, Ehrich JH. Slowly deteriorating insulin secretion and C-peptide production characterizes diabetes mellitus in infantile cystinosis. *Eur J Pediatr.* 1998;157(9):738-42.
36. Bernardini I, Rizzo WB, Dalakas M, Bernar J, Gahl WA. Plasma and muscle free carnitine deficiency due to renal Fanconi syndrome. *J Clin Invest.* 1985;75(4):1124-30.
37. Trauner DA, Fahmy RF, Mishler DA. Oral motor dysfunction and feeding difficulties in nephropathic cystinosis. *Pediatr Neurol.* 2001;24(5):365-8.
38. Kastrup O, Koeppen S, Schwechheimer K, Keidel M, Diener HC. Myopathy in two siblings with nephropathic cystinosis. *Eur J Neurol.* 1998;5(6):609-12.

39. Sonies BC, Almajid P, Kleta R, Bernardini I, Gahl WA. Swallowing dysfunction in 101 patients with nephropathic cystinosis: benefit of long-term cysteamine therapy. *Medicine (Baltimore)*. 2005;84(3):137-46.
40. Charnas LR, Luciano CA, Dalakas M, Gilliatt RW, Bernardini I, Ishak K, et al. Distal vacuolar myopathy in nephropathic cystinosis. *Ann Neurol*. 1994;35(2):181-8.
41. Rossi S, Herrine SK, Navarro VJ. Cystinosis as a cause of noncirrhotic portal hypertension. *Dig Dis Sci*. 2005;50(7):1372-5.
42. Klenn PJ, Rubin R. Hepatic fibrosis associated with hereditary cystinosis: a novel form of noncirrhotic portal hypertension. *Mod Pathol*. 1994;7(8):879-82.
43. Broyer M, Tete MJ, Gubler MC. Late symptoms in infantile cystinosis. *Pediatr Nephrol*. 1987;1(3):519-24.
44. Ueda M, O'Brien K, Rosing DR, Ling A, Kleta R, McAreavey D, et al. Coronary artery and other vascular calcifications in patients with cystinosis after kidney transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006;1(3):555-62.
45. Dixit MP, Greifer I. Nephropathic cystinosis associated with cardiomyopathy: a 27-year clinical follow-up. *BMC Nephrol*. 2002;3:8.
46. Strayer DS. Cystinosis and dissecting aortic aneurysm in a 7-year-old boy. *Am J Dis Child*. 1979;133(4):436-8.
47. Fink JK, Brouwers P, Barton N, Malekzadeh MH, Sato S, Hill S, et al. Neurologic complications in long-standing nephropathic cystinosis. *Arch Neurol*. 1989;46(5):543-8.
48. Vogel DG, Malekzadeh MH, Cornford ME, Schneider JA, Shields WD, Vinters HV. Central nervous system involvement in nephropathic cystinosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1990;49(6):591-9.
49. Nichols SL, Press GA, Schneider JA, Trauner DA. Cortical atrophy and cognitive performance in infantile nephropathic cystinosis. *Pediatr Neurol*. 1990;6(6):379-81.
50. Dogulu CF, Tsilou E, Rubin B, Fitzgibbon EJ, Kaiser-Kupper MI, Rennert OM, et al. Idiopathic intracranial hypertension in cystinosis. *J Pediatr*. 2004;145(5):673-8.
51. Sathappan A, Trauner D. Hierarchical processing of visual stimuli in nephropathic cystinosis. *J Inher Metab Dis*. 2019;42(3):545-52.
52. Spilkin AM, Ballantyne AO, Babchuck LR, Trauner DA. Non-verbal deficits in young children with a genetic metabolic disorder: WPPSI-III performance in cystinosis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2007;144B(4):444-7.
53. Kozak I, Arevalo JF, Shoughy SS. Intraretinal Crystals in Nephropathic Cystinosis and Fanconi Syndrome. *JAMA Ophthalmol*. 2017;135(3):e165169.
54. Bonini Filho MA, de Carlo TE, Ferrara D, Adhi M, Baumal CR, Witkin AJ, et al. Association of Choroidal Neovascularization and Central Serous Chorioretinopathy With Optical Coherence Tomography Angiography. *JAMA Ophthalmol*. 2015;133(8):899-906.
55. Nesterova G, Gahl W. Nephropathic cystinosis: late complications of a multisystemic disease. *Pediatr Nephrol*. 2008;23(6):863-78.
56. Kleta R, Gahl WA. Pharmacological treatment of nephropathic cystinosis with cysteamine. *Expert Opin Pharmacother*. 2004;5(11):2255-62.
57. Gahl WA, Reed GF, Thoene JG, Schulman JD, Rizzo WB, Jonas AJ, et al. Cysteamine therapy for children with nephropathic cystinosis. *N Engl J Med*. 1987;316(16):971-7.
58. Gahl WA, Thoene JG, Schneider JA, O'Regan S, Kaiser-Kupfer MI, Kuwabara T. NIH conference. Cystinosis: progress in a prototypic disease. *Ann Intern Med*. 1988;109(7):557-69.
59. da Silva VA, Zurbrugg RP, Lavanchy P, Blumberg A, Suter H, Wyss SR, et al. Long-term treatment of infantile nephropathic cystinosis with cysteamine. *N Engl J Med*. 1985;313(23):1460-3.

60. Kleta R, Bernardini I, Ueda M, Varade WS, Phornphutkul C, Krasnewich D, et al. Long-term follow-up of well-treated nephropathic cystinosis patients. *J Pediatr*. 2004;145(4):555-60.
61. Nesterova G, Williams C, Bernardini I, Gahl WA. Cystinosis: renal glomerular and renal tubular function in relation to compliance with cystine-depleting therapy. *Pediatr Nephrol*. 2015;30(6):945-51.
62. Brodin-Sartorius A, Tete MJ, Niaudet P, Antignac C, Guest G, Ottolenghi C, et al. Cysteamine therapy delays the progression of nephropathic cystinosis in late adolescents and adults. *Kidney Int*. 2012;81(2):179-89.
63. Ariceta G, Giordano V, Santos F. Effects of long-term cysteamine treatment in patients with cystinosis. *Pediatr Nephrol*. 2019;34(4):571-8.
64. Gahl WA, Balog JZ, Kleta R. Nephropathic cystinosis in adults: natural history and effects of oral cysteamine therapy. *Ann Intern Med*. 2007;147(4):242-50.
65. Gahl WA, Charnas L, Markello TC, Bernardini I, Ishak KG, Dalakas MC. Parenchymal organ cystine depletion with long-term cysteamine therapy. *Biochem Med Metab Biol*. 1992;48(3):275-85.
66. Broyer M. [Cystinosis from childhood to adulthood]. *Nephrologie*. 2000;21(1):13-8.
67. Proesmans W, Baten E, Hoogmartens J, Bruyneel P. Nephropathic cystinosis: effect of long-term cysteamine therapy. *Clin Nephrol*. 1987;27(6):309-12.
68. van't Hoff WG, Gretz N. The treatment of cystinosis with cysteamine and phosphocysteamine in the United Kingdom and Eire. *Pediatr Nephrol*. 1995;9(6):685-9.
69. Biswas S, Sornalingam K. The Ocular Status of Cystinosis Patients Receiving a Hospital Pharmacy-Made Preparation of Cysteamine Eye Drops: A Case Series. *Ophthalmol Ther*. 2019;8(1):125-36.
70. Tsilou E, Zhou M, Gahl W, Sieving PC, Chan CC. Ophthalmic manifestations and histopathology of infantile nephropathic cystinosis: report of a case and review of the literature. *Surv Ophthalmol*. 2007;52(1):97-105.
71. Cantani A, Giardini O, Ciarella Cantani A. Nephropathic cystinosis: ineffectiveness of cysteamine therapy for ocular changes. *Am J Ophthalmol*. 1983;95(5):713-4.
72. Elmonem MA, Veys K, Oliveira Arcolino F, Van Dyck M, Benedetti MC, Diomedi-Camassei F, et al. Allogeneic HSCT transfers wild-type cystinosis to nonhematological epithelial cells in cystinosis: First human report. *Am J Transplant*. 2018;18(11):2823-8.
73. Shams F, Livingstone I, Oladiwura D, Ramaesh K. Treatment of corneal cystine crystal accumulation in patients with cystinosis. *Clin Ophthalmol*. 2014;8:2077-84.
74. Sousa-Neves F, Ribeiro AC, Saraiva E, Ribeiro L, Sequeira J, Varandas R. Ocular manifestations of intermediate cystinosis: To treat or not to treat? *Eur J Ophthalmol*. 2019;1120672119848899.
75. Hsu KH, Fentzke RC, Chauhan A. Feasibility of corneal drug delivery of cysteamine using vitamin E modified silicone hydrogel contact lenses. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013;85(3 Pt A):531-40.
76. Kaiser-Kupfer MI, Datiles MB, Gahl WA. Corneal transplant in boy with nephropathic cystinosis. *Lancet*. 1987;1(8528):331.
77. Katz B, Melles RB, Schneider JA. Recurrent crystal deposition after keratoplasty in nephropathic cystinosis. *Am J Ophthalmol*. 1987;104(2):190-1.
78. Al-Hemidan A, Shoughy SS, Kozak I, Tabbara KF. Efficacy of topical cysteamine in nephropathic cystinosis. *Br J Ophthalmol*. 2017;101(9):1234-7.
79. MacDonald IM, Noel LP, Mintsoulis G, Clarke WN. The effect of topical cysteamine drops on reducing crystal formation within the cornea of patients affected by nephropathic cystinosis. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 1990;27(5):272-4.

80. Rega LR, Polishchuk E, Montefusco S, Napolitano G, Tozzi G, Zhang J, et al. Activation of the transcription factor EB rescues lysosomal abnormalities in cystinotic kidney cells. *Kidney Int.* 2016;89(4):862-73.
81. Syres K, Harrison F, Tadlock M, Jester JV, Simpson J, Roy S, et al. Successful treatment of the murine model of cystinosis using bone marrow cell transplantation. *Blood.* 2009;114(12):2542-52.
82. Harrison F, Yeagy BA, Rocca CJ, Kohn DB, Salomon DR, Cherqui S. Hematopoietic stem cell gene therapy for the multisystemic lysosomal storage disorder cystinosis. *Mol Ther.* 2013;21(2):433-44.
83. Rocca CJ, Kreymerman A, Ur SN, Frizzi KE, Naphade S, Lau A, et al. Treatment of Inherited Eye Defects by Systemic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56(12):7214-23.
84. Holladay JT. Visual acuity measurements. *J Cataract Refract Surg.* 2004;30(2):287-90.
85. Mataftsi A, Koutsimpogeorgos D, Brazitikos P, Ziakas N, Haidich AB. Is conversion of decimal visual acuity measurements to logMAR values reliable? *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2019;257(7):1513-7.
86. Han SB, Liu YC, Noriega KM, Mehta JS. Applications of Anterior Segment Optical Coherence Tomography in Cornea and Ocular Surface Diseases. *J Ophthalmol.* 2016;2016:4971572.
87. Wang J, Abou Shousha M, Perez VL, Karp CL, Yoo SH, Shen M, et al. Ultra-high resolution optical coherence tomography for imaging the anterior segment of the eye. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging.* 2011;42 Suppl:S15-27.
88. Popescu DP, Choo-Smith LP, Flueraru C, Mao Y, Chang S, Disano J, et al. Optical coherence tomography: fundamental principles, instrumental designs and biomedical applications. *Biophys Rev.* 2011;3(3):155.
89. Marschall S, Sander B, Mogensen M, Jorgensen TM, Andersen PE. Optical coherence tomography-current technology and applications in clinical and biomedical research. *Anal Bioanal Chem.* 2011;400(9):2699-720.
90. Fujimoto JG, Pitris C, Boppart SA, Brezinski ME. Optical coherence tomography: an emerging technology for biomedical imaging and optical biopsy. *Neoplasia.* 2000;2(1-2):9-25.
91. Ang M, Baskaran M, Werkmeister RM, Chua J, Schmidl D, Aranha Dos Santos V, et al. Anterior segment optical coherence tomography. *Prog Retin Eye Res.* 2018;66:132-56.
92. Kanellopoulos AJ, Asimellis G. OCT-derived comparison of corneal thickness distribution and asymmetry differences between normal and keratoconic eyes. *Cornea.* 2014;33(12):1274-81.
93. Kymionis GD, Tsoulnaras KI, Grentzelos MA, Plaka AD, Mikropoulos DG, Liakopoulos DA, et al. Corneal stroma demarcation line after standard and high-intensity collagen crosslinking determined with anterior segment optical coherence tomography. *J Cataract Refract Surg.* 2014;40(5):736-40.
94. Tzamalidis A, Vinciguerra R, Romano V, Arbabi E, Batterbury M, Kaye SB. Intraobserver reproducibility and interobserver agreement of demarcation line depth measurements following corneal cross linking. *Eur J Ophthalmol.* 2019;1120672119835116.
95. Ueno H, Matuzawa A, Kumagai Y, Takagi H, Ueno S. Imaging of a severe case of acute hydrops in a patient with keratoconus using anterior segment optical coherence tomography. *Case Rep Ophthalmol.* 2012;3(3):304-10.
96. Siebelmann S, Scholz P, Sonnenschein S, Bachmann B, Matthaei M, Cursiefen C, et al. Anterior segment optical coherence tomography for the diagnosis of corneal dystrophies according to the IC3D classification. *Surv Ophthalmol.* 2018;63(3):365-80.

97. Yaqoob Z, Wu J, Yang C. Spectral domain optical coherence tomography: a better OCT imaging strategy. *Biotechniques*. 2005;39(6 Suppl):S6-13.
98. Puliafito CA, Hee MR, Lin CP, Reichel E, Schuman JS, Duker JS, et al. Imaging of macular diseases with optical coherence tomography. *Ophthalmology*. 1995;102(2):217-29.
99. Al-Mujaini A, Wali UK, Azeem S. Optical coherence tomography: clinical applications in medical practice. *Oman Med J*. 2013;28(2):86-91.
100. Britze J, Frederiksen JL. Optical coherence tomography in multiple sclerosis. *Eye (Lond)*. 2018;32(5):884-8.
101. Wertheimer CM, Elhardt C, Wartak A, Luft N, Kassumeh S, Dirisamer M, et al. Corneal optical density in Fuchs endothelial dystrophy determined by anterior segment optical coherence tomography. *Eur J Ophthalmol*. 2021;31(4):1771-8.
102. Sonoda S, Sakamoto T, Kuroiwa N, Arimura N, Kawano H, Yoshihara N, et al. Structural Changes of Inner and Outer Choroid in Central Serous Chorioretinopathy Determined by Optical Coherence Tomography. *PLoS One*. 2016;11(6):e0157190.
103. McAlinden C, Pesudovs K, Moore JE. The development of an instrument to measure quality of vision: the Quality of Vision (QoV) questionnaire. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(11):5537-45.
104. Keidel L, Elhardt C, Hohenfellner K, Priglinger S, Schworm B, Wertheimer C, et al. Establishing an objective biomarker for corneal cystinosis using a threshold-based Spectral domain optical coherence tomography imaging algorithm. *Acta Ophthalmol*. 2020.
105. Keidel L, Hohenfellner K, Schworm B, Priglinger S, Luft N, Priglinger C. Spectral domain optical coherence tomography-based retinochoroidal cystine crystal score: a window into infantile nephropathic cystinosis. *Br J Ophthalmol*. 2021.
106. Gahl WA, Thoene JG, Schneider JA. Cystinosis. *N Engl J Med*. 2002;347(2):111-21.
107. Labbe A, Niaudet P, Loirat C, Charbit M, Guest G, Baudouin C. In vivo confocal microscopy and anterior segment optical coherence tomography analysis of the cornea in nephropathic cystinosis. *Ophthalmology*. 2009;116(5):870-6.
108. Iwata F, Kuehl EM, Reed GF, McCain LM, Gahl WA, Kaiser-Kupfer MI. A randomized clinical trial of topical cysteamine disulfide (cystamine) versus free thiol (cysteamine) in the treatment of corneal cystine crystals in cystinosis. *Mol Genet Metab*. 1998;64(4):237-42.
109. Dixon P, Christopher K, Chauhan A. Potential role of stromal collagen in cystine crystallization in cystinosis patients. *Int J Pharm*. 2018;551(1-2):232-40.
110. Kalatzis V, Serratrice N, Hippert C, Payet O, Arndt C, Cazevielle C, et al. The ocular anomalies in a cystinosis animal model mimic disease pathogenesis. *Pediatr Res*. 2007;62(2):156-62.
111. Nguyen-Ba-Charvet KT, Chedotal A. Development of retinal layers. *C R Biol*. 2014;337(3):153-9.
112. Gupta MP, Herzlich AA, Sauer T, Chan CC. Retinal Anatomy and Pathology. *Dev Ophthalmol*. 2016;55:7-17.
113. Campbell JP, Zhang M, Hwang TS, Bailey ST, Wilson DJ, Jia Y, et al. Detailed Vascular Anatomy of the Human Retina by Projection-Resolved Optical Coherence Tomography Angiography. *Sci Rep*. 2017;7:42201.
114. Thomas WE. Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells. *Brain Res Brain Res Rev*. 1999;31(1):42-57.
115. Farrell CR, Stewart PA, Farrell CL, Del Maestro RF. Pericytes in human cerebral microvasculature. *Anat Rec*. 1987;218(4):466-9.
116. Thomas WE. Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Res Brain Res Rev*. 1992;17(1):61-74.

117. Rathnasamy G, Foulds WS, Ling EA, Kaur C. Retinal microglia - A key player in healthy and diseased retina. *Prog Neurobiol.* 2019;173:18-40.
118. Silverman SM, Wong WT. Microglia in the Retina: Roles in Development, Maturity, and Disease. *Annu Rev Vis Sci.* 2018;4:45-77.
119. Forrester JV, Xu H, Kuffova L, Dick AD, McMenamin PG. Dendritic cell physiology and function in the eye. *Immunol Rev.* 2010;234(1):282-304.
120. Richard G, Kroll P. [Retinal changes in cystinosis]. *Ophthalmologica.* 1983;186(4):211-8.
121. Francois J, Hanssens M, Coppieters R, Evens L. Cystinosis. A clinical and histopathologic study. *Am J Ophthalmol.* 1972;73(5):643-50.
122. Wong VG, Lietman PS, Seegmiller JE. Alterations of pigment epithelium in cystinosis. *Arch Ophthalmol.* 1967;77(3):361-9.
123. Tsilou ET, Rubin BI, Reed G, Caruso RC, Iwata F, Balog J, et al. Nephropathic cystinosis: posterior segment manifestations and effects of cysteamine therapy. *Ophthalmology.* 2006;113(6):1002-9.
124. Simpson JL, Nien CJ, Flynn KJ, Jester JV. Evaluation of topical cysteamine therapy in the CTNS(-/-) knockout mouse using in vivo confocal microscopy. *Mol Vis.* 2011;17:2649-54.
125. Biswas S, Gaviria M, Malheiro L, Marques JP, Giordano V, Liang H. Latest Clinical Approaches in the Ocular Management of Cystinosis: A Review of Current Practice and Opinion from the Ophthalmology Cystinosis Forum. *Ophthalmol Ther.* 2018;7(2):307-22.
126. Liang H, Baudouin C, Tahiri Joutei Hassani R, Brignole-Baudouin F, Labbe A. Photophobia and corneal crystal density in nephropathic cystinosis: an in vivo confocal microscopy and anterior-segment optical coherence tomography study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56(5):3218-25.
127. Pinxten AM, Hua MT, Simpson J, Hohenfellner K, Levtchenko E, Casteels I. Clinical Practice: A Proposed Standardized Ophthalmological Assessment for Patients with Cystinosis. *Ophthalmol Ther.* 2017;6(1):93-104.
128. Dureau P, Broyer M, Dufier JL. Evolution of ocular manifestations in nephropathic cystinosis: a long-term study of a population treated with cysteamine. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus.* 2003;40(3):142-6.
129. Young B, Eggenberger E, Kaufman D. Current electrophysiology in ophthalmology: a review. *Curr Opin Ophthalmol.* 2012;23(6):497-505.
130. Vincent A, Robson AG, Holder GE. Pathognomonic (diagnostic) ERGs. A review and update. *Retina.* 2013;33(1):5-12.
131. Simpson J, Nien CJ, Flynn K, Jester B, Cherqui S, Jester J. Quantitative in vivo and ex vivo confocal microscopy analysis of corneal cystine crystals in the Ctns knockout mouse. *Mol Vis.* 2011;17:2212-20.
132. Melles RB, Schneider JA, Rao NA, Katz B. Spatial and temporal sequence of corneal crystal deposition in nephropathic cystinosis. *Am J Ophthalmol.* 1987;104(6):598-604.
133. Uchino M, Schaumberg DA. Dry Eye Disease: Impact on Quality of Life and Vision. *Curr Ophthalmol Rep.* 2013;1(2):51-7.
134. Blanksma LJ, Jansonius NM, Reitsma-Bierens WC. Cysteamine eyedrops in three patients with nephropathic cystinosis. *Doc Ophthalmol.* 1996;92(1):51-3.
135. Bradbury JA, Danjoux JP, Voller J, Spencer M, Brocklebank T. A randomised placebo-controlled trial of topical cysteamine therapy in patients with nephropathic cystinosis. *Eye (Lond).* 1991;5 (Pt 6):755-60.
136. Graf M, Grote A, Wagner F. [Cysteamine eyedrops for treatment of corneal cysteine deposits in infantile cystinosis]. *Klin Monbl Augenheilkd.* 1992;201(1):48-50.

137. Kaiser-Kupfer MI, Fujikawa L, Kuwabara T, Jain S, Gahl WA. Removal of corneal crystals by topical cysteamine in nephropathic cystinosis. *N Engl J Med.* 1987;316(13):775-9.
138. Jones NP, Postlethwaite RJ, Noble JL. Clearance of corneal crystals in nephropathic cystinosis by topical cysteamine 0.5%. *Br J Ophthalmol.* 1991;75(5):311-2
139. Anikster Y, Shotelersuk V, Gahl WA. CTNS mutations in patients with cystinosis. *Hum Mutat.* 1999;14(6):454-8.
140. Elder MJ, Astin CL. Recurrent corneal erosion in cystinosis. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus.* 1994;31(4):270-1.
141. Kaiser-Kupfer MI, Caruso RC, Minkler DS, Gahl WA. Long-term ocular manifestations in nephropathic cystinosis. *Arch Ophthalmol.* 1986;104(5):706-11.
142. Latkany R. Dry eyes: etiology and management. *Curr Opin Ophthalmol.* 2008;19(4):287-91.
143. Alsuhaibani AH, Khan AO, Wagoner MD. Confocal microscopy of the cornea in nephropathic cystinosis. *Br J Ophthalmol.* 2005;89(11):1530-1.
144. Okamoto K, Tashiro A, Chang Z, Bereiter DA. Bright light activates a trigeminal nociceptive pathway. *Pain.* 2010;149(2):235-42.
145. Jan JE, Groenveld M, Anderson DP. Photophobia and cortical visual impairment. *Dev Med Child Neurol.* 1993;35(6):473-7.
146. Dufier JL, Dhermy P, Gubler MC, Gagnadoux MF, Broyer M. Ocular changes in long-term evolution of infantile cystinosis. *Ophthalmic Paediatr Genet.* 1987;8(2):131-7.
147. Bishop R. Ocular Complications of Infantile Nephropathic Cystinosis. *J Pediatr.* 2017;183S:S19-S21.
148. Nesterova G, Gahl WA. Cystinosis: the evolution of a treatable disease. *Pediatr Nephrol.* 2013;28(1):51-9.
149. Campbell F, Biggs K, Aldiss SK, O'Neill PM, Clowes M, McDonagh J, et al. Transition of care for adolescents from paediatric services to adult health services. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;4:CD009794.
150. Hohenfellner K, Bergmann C, Fleige T, Janzen N, Burggraf S, Olgemoller B, et al. Molecular based newborn screening in Germany: Follow-up for cystinosis. *Mol Genet Metab Rep.* 2019;21:100514.

2. Zusammenfassung

Im Rahmen meiner Doktorarbeit habe ich die Pathophysiologie, diagnostischen Methoden und Therapiestrategien der Cystinose beschrieben und ein Cystinosekollektiv (n=56) bezüglich demografischer, klinischer, morphologischer und funktioneller Parameter beleuchtet. In diesem Zusammenhang konnten Biomarker entwickelt werden, die die Therapiecompliance der vor allem pädiatrischen Cystinosepatienten verbessern sollen und eine Graduierung und Typisierung kornealer und chorioretinaler Cystinkristallablagerungen ermöglichen.

Die Cystinose ist eine seltene lysosomale Speicherkrankheit, die sich mit Cystinkristallablagerungen im gesamten Körper und somit auch in vielen okulären Strukturen, wie der Konjunktiva, Kornea, der Retina und Choroidea manifestiert. Die Cystinkristallablagerungen können einerseits mittels Spaltlampenbiomikroskopie, andererseits mittels optischer Kohärenztomografie des vorderen und hinteren Augenabschnitts sehr gut visualisiert werden.

Aufgrund der verschiedenen Tiefenverteilungsmuster der kornealen Cystinkristallablagerungen reicht eine alleinige Beurteilung mittels Kalipermessungen von der Hornhautoberfläche zum letzten sichtbaren Cystinkristall im AS-OCT oder in der Spaltlampenbiomikroskopie nicht aus, um die Kristallablagerungen adäquat zu beurteilen.

Daher habe ich im Rahmen der Untersuchungsreihe einen grauwetbasierten semiautomatisierten Algorithmus entwickelt, mittels dem eine Beurteilung einzelner Stromasegmente und somit die Erstellung eines Tiefenverteilungsmusters möglich wurde. Durch die Bestimmung der verschiedenen Verteilungsmuster der Cystinkristallablagerungen im kornealen Stroma gelang es ein Klassifikationsschema der kornealen Manifestation der infantilen nephropathischen Cystinose vom Typ I-IV zu entwickeln.

Nach Auswertung der OCT-Scans des hinteren Augenabschnitts, konnten erste Schlüsse auf die Lokalisation der Cystinkristallablagerungen gezogen werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich die Cystinkristalle in den der choroidalen und retinalen Vaskularisation anliegenden Perizyten befinden. Ebenso konnte in der Arbeit der retinochoroidale Cystinkristallscore (RCCCS) für die Quantifizierung des Ausmaßes der

retinochoroidalen Cystinkristallablagerungen entwickelt werden, anhand dessen auch der Schweregrad der okulär manifestierten Cystinose skaliert werden kann. Je höher der RCCCS, desto schlechter zeigte sich die Nierenfunktion, gemessen am Cystatin-C und desto niedriger zeigte sich die täglich eingenommene Dosis des Cysteamins. Der RCCCS ermöglicht somit als erster, stabiler Biomarker die Überwachung der Adhärenz der oralen Therapie und der systemischen Manifestationen.

Abschließend habe ich die morphologischen und funktionellen Ergebnisse unseres Kollektivs den bereits bestehenden Erkenntnissen der Cystinoseforschung gegenübergestellt und die Daten unseres Cystinosekollektivs diskutiert. Die neu etablierten Biomarker für die kornealen und retinalen Cystinkristallablagerungen waren Grundlage der Auswertungen und halfen die Pathophysiologie der Erkrankung besser zu verstehen.

Die Ermöglichung einer Typisierung der kornealen Manifestation (Typ I-IV) der Cystinose mittels des entwickelten OCT-Analysealgorithmus, sowie die OCT-basierte Schweregradskalierung der chorioretinalen Manifestation (keine/milde/moderate/schwere Ablagerung) der Cystinose erlauben in künftigen prospektiven Studien die zeitliche Dynamik zwischen der Ablagerung retinochoroidaler Kristalle und der systemischen Krankheitsmanifestation, sowie die Dynamik kornealer Cystinkristallablagerungen unter topischer Therapie zu untersuchen.

3. Danksagung

Meiner Doktormutter Frau Priv.-Doz. Dr. med. Claudia Priglinger gilt mein besonderer Dank für das Vertrauen mich als Doktorandin anzunehmen. Sie hat mich auf meinem Weg sehr unterstützt und stand mir immer bereitwillig für Fragen zur Verfügung.

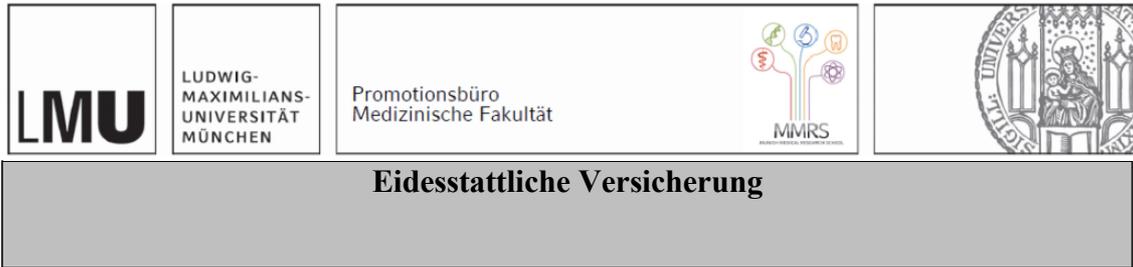
Auch möchte ich meinem Betreuer Herrn Dr. med. Benedikt Schworm danken. Er stand mir vor allem in meiner ersten Zeit an der Klinik immer zur Seite und brachte mir viel klinisches Arbeiten und wissenschaftliches Schreiben bei.

Eine große Hilfe beim Verfassen wissenschaftlicher Artikel war für mich auch Herr PD Dr. Dr. Nikolaus Luft, der für mich immer erreichbar war, um mir bei dem ein oder anderem statistischen Problem weiterzuhelfen.

Für die kollegiale Zusammenarbeit möchte ich Frau PD Dr. med. Katharina Hohenfellner danken, die mich bei inhaltlichen, internistischen Fragestellungen unterstützte.

Besonders möchte ich meinen Eltern Frau Barbara Keidel und Herrn Prof. Dr. med. Dipl.-Psych. Matthias Keidel danken, die mir all die Studienjahre ermöglicht haben. Ihnen habe ich zu verdanken, dass ich die Studienzeit so fokussiert durchlaufen konnte. Auch möchte ich meinen Geschwistern Franziska und Linus Keidel danken, die mich während meines gesamten Studiums, dem Arbeitsbeginn in der Augenklinik und der Doktorarbeit immer unterstützt haben.

4. Affidavit



Keidel, Leonie Franziska Lucia Maria

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Entwicklung von Biomarkern zur Charakterisierung okulärer Manifestationen der Cystinose mittels optischer Kohärenztomographie“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 20.07.2022

Leonie Keidel

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin