

Aus dem
Lehrstuhl für Physiologische Genomik, Biomedizinisches Centrum (BMC)
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München



**Effekte einer komplementmodulierenden Genadditionstherapie im
retinalen Ischämie-/ Reperfuisionsmodell und
Charakterisierung des ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Knockoutmodells in der Maus**

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

vorgelegt von
Sarah Glänzer

aus
Dresden

Jahr
2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstes Gutachten: Prof. Dr. Antje Grosche

Zweites Gutachten: Prof. Dr. Stylianos Michalakis

Drittes Gutachten: Prof. Dr. Martin Biel

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 25. November 2025

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	5
Abbildungsverzeichnis	9
Tabellenverzeichnis	10
Abkürzungsverzeichnis	11
1 Einleitung	13
1.1 Anatomie der Retina	13
1.1.1 Stratum pigmentosum	13
1.1.2 Stratum nervosum	14
1.1.2.1 Aufbau und neuronale Verschaltung	14
1.1.2.2 Gliazellen	16
1.2 Komplementsystem	18
1.2.1 Aktivierungswege	18
1.2.2 Regulation der Komplementaktivität	21
1.3 Auswahl Komplement-assoziiierter degenerativer Retinaerkrankungen	22
1.3.1 Altersbedingte Makuladegeneration (AMD)	22
1.3.2 Morbus Stargardt	25
1.4 Mausmodelle für Komplement-assoziierte degenerative Erkrankungen der Retina	26
1.4.1 Hintergrund des experimentellen Aufbaus des Ischämiemodells	26
1.4.2 Die ABCA4 ^{-/-} RDH8 ^{-/-} -Knockoutmaus als Modell einer langsamen Retinadegeneration	27
1.5 Gentherapie	30
1.5.1 Grundsätze der Gentherapie	30
1.5.2 Die erste Gentherapie in der Augenheilkunde	31
1.6 Fragestellung und Zielsetzung	32
2 Materialien und Methoden	34
2.1 Materialien	34
2.1.1 Versuchstiere	34

2.1.2	Stocklösungen.....	34
2.1.3	Chemikalien.....	34
2.1.4	Gebrauchsfertige Kits	35
2.1.5	Enzyme und Proteine	36
2.1.6	Antikörper	36
2.1.7	Verbrauchsmaterialien	37
2.1.8	Geräte	38
2.1.9	Software	39
2.2	Methoden.....	39
2.2.1	Induktion von Ischämie	39
2.2.2	Vireninjektion	40
2.2.3	DNA-Extraktion und Genotypisierung	40
2.2.3.1	DNA-Extraktion	40
2.2.3.2	Genotypisierung der ABCA4 ^{-/-} RDH8 ^{-/-} -Mäuse.....	41
2.2.4	Immunhistochemie	44
2.2.4.1	Gewinnung der Mauseugen	44
2.2.4.2	Immunhistochemische Färbung von Retinaschnitten	44
2.2.4.3	Immunhistochemische Färbung von retinalen und RPE-Wholemounds	45
2.2.4.4	TUNEL-Färbung.....	45
2.2.5	Methodisches Vorgehen bei morphologischen Auswertungen	46
2.2.5.1	Messung der C3b/iC3b/C3d-Signalintensität.....	47
2.2.5.2	Messung des GFAP-Signals	48
2.2.5.3	Messung der RPE-Autofluoreszenz	48
2.2.5.4	Mikrogliaanalysen	48
2.2.6	Statistische Analyse.....	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Ischämieprojekt.....	50
3.1.1	miniFH-Konstrukte und Plasmide	50
3.1.2	Validierung der Transduktionseffizienz der AAV-Konstrukte <i>in vivo</i>	53
3.1.3	Einfluss der miniFH-Überexpression auf die Müllerzellgliose.....	54

3.1.4	Reduzierte Mikroglia-Aktivierung in ischämischen Augen unter miniFH-Behandlung.....	56
3.1.5	Effekte auf die Akkumulation von C3-Spaltprodukten	58
3.1.6	Auswirkung der miniFH-Genadditionstherapie auf die Neurodegeneration im akuten Ischämie-/ Reperfusionsschädigungsmodell	60
3.1.6.1	Leicht verminderte Apoptose in miniFH-behandelten Retinae	60
3.1.6.2	Verbessertes neuronales Überleben durch miniFH-Genadditionstherapie.....	62
3.1.6.3	Einfluss der miniFH-Genadditionstherapie auf das Überleben von Amakrin- und Ganglienzellen	63
3.1.7	Co-Lokalisation von FH mit Mikroglia nach Ischämie-/ Reperfusionsschaden.....	66
3.2.	Die ABCA4 ^{-/-} RDH8 ^{-/-} -Maus – Charakterisierung eines langsamen, genetischen Modells für Retinadegeneration	68
3.2.1	Verstärkte, altersabhängige RPE-Autofluoreszenz bei ABCA4 ^{-/-} RDH8 ^{-/-} -Mäusen	68
3.2.2	Erhöhte altersabhängige Mikroglia-Aktivierung in ABCA4 ^{-/-} RDH8 ^{-/-} -Mäusen	69
3.2.3	Anzeichen neuronaler Degeneration in 9 Monate alten ABCA4 ^{-/-} RDH8 ^{-/-} -Mäusen.....	72
3.2.4	Retinale Veränderungen nach Exposition gegenüber verschiedenen Lichtbedingungen bei 9 Monate alten Tieren	73
3.2.5	Morphometrische Auswertung der 9 Monate alten Tiere differenziert nach Netzhautarealen: Nachweis lokaler Unterschiede der Netzhautdegeneration	78
4	Diskussion.....	79
4.1	Wirksamkeit der miniFH-Genadditionstherapie im akuten retinalen Ischämie-/ Reperusionsmodell	79
4.1.1	Protektive Wirkung von miniFH auf den sekundären Zelltod nach Ischämie/ Reperfusion.....	79
4.1.1.1	Validierung einer stabilen Transduktion und miniFH-Expression in Müllerzellen	79
4.1.1.2	miniFH-Überexpression führt zu reduzierter Inflammation nach retinaler Ischämie/ Reperfusion	80
4.1.1.3	Verzögerter Therapieeffekt der miniFH-Überexpression auf zelluläres Überleben.....	82

4.1.2 Vergleich des Wirkprofils der zwei miniFH-Varianten im akuten Ischämie-/ Reperusionsmodell.....	84
4.1.3 Limitation des Experiments der miniFH-Effekte im akuten Ischämie-/ Reperusionsmodell der Retinadegeneration	85
4.2 Charakterisierung des ABCA4 ^{-/-} RDH8 ^{-/-} -Mausphänotyps.....	86
4.2.1 Nachweis eines milden Phänotyps erst nach 9 Monaten	86
4.2.2 Eignung als Modell zur Applikation der Gentherapie	89
4.3 Andere Retinadegenerationsmodelle mit Angriffspunkt Komplementsystem	90
4.4 AAV-Gentherapie	92
4.5 Limitationen des Mausmodells	93
Literaturverzeichnis	95
Anhang.....	117
Anhang A: Vergrößerte Darstellung von Abbildung 16 A	117
Anhang B: Vergrößerte Darstellung von Abbildung 17 B	119
Anhang C: Vergrößerte Darstellung von Abbildung 22	121
Anhang D: Vergrößerte Darstellung von Abbildung 24 A	123
Anhang E: Vergrößerte Darstellung von Abbildung 27 A	124
Danksagung	125
Affidavit	126
Publikationsliste.....	127
Publikationen	127
Vorträge	127
Posterpräsentationen.....	127

Zusammenfassung

Ziel im ersten Teil meiner Doktorarbeit war es, den Erfolg einer adeno-assoziierten (AAV)-gestützten Genadditionstherapie im Rahmen einer retinalen Ischämiesituation im Mausmodell hinsichtlich histomorphologischer Veränderungen der Retina zu untersuchen. Eine gekürzte und funktionell optimierte Version des Komplementmodulators Komplementfaktor H sollte durch intravitreale Injektion lokal in der Retina über ein AAV-Vektorsystem überexprimiert werden und eine Rebalancierung der überschießenden Komplementantwort infolge der Läsion bewirken. Die Limitierung der exogenen Proteinproduktion auf Müllerzellen hatte eine einfachere Applikation, eine effektive Sekretion des Zielproteins miniFH und eine Schonung der sensiblen Neuronen zum Ziel.

Zu diesem Zweck wurden Mäuse 3 und 14 Tage nach Läsion/ Injektion untersucht. Es kamen morphometrische Analysen der Kernzahlen und Schichtdicken der Retina in Kombination mit Zelltodanalysen via TUNEL-Assay zum Einsatz. Immunhistochemische Färbungen gestatteten Einblicke in die Verteilung von Komplementfaktoren innerhalb der Retina und in das Ausmaß der Müllerzellgliose. Durch immunhistochemische Anfärbbarkeit des Aktivierungsmarkers CD68 waren Rückschlüsse auf den Aktivierungszustand von Mikroglia möglich.

Über die Färbung gegen den EGFP-Reporter konnte zunächst eine sichere Transduktion von Müllerzellen bestätigt werden, welche über ihre einzigartige Morphologie identifiziert werden konnten.

Hinsichtlich der Stress-/Inflammationsmarker GFAP und CD68 zeichnete sich eine ausgeprägte Stresssituation mit starker Gliose bzw. Immunreaktion infolge der Läsion ab. Während der Mikroglia-Aktivierungsmarker CD68 nach 14 Tagen einen deutlichen Rückgang der Immunantwort anzeigte und einen signifikanten Vorteil für die miniFH-Behandlung offenbarte, blieben die GFAP-Level auch nach 14 Tagen hoch und geben Raum für Diskussionen über mögliche Kontaminationen oder immunologische Reaktionen auf den viralen Vektor oder aber eine Müllerzellgliose unabhängig von der Komplementhomöostase.

Durch immunhistochemische Färbungen gegen die Komplementfaktoren C3/C3d und CFH konnte ich Veränderungen der qualitativen und quantitativen Verteilung dieser Komplementfaktoren nach der Läsion und Therapie beschreiben. Die C3-Spaltprodukte, welche sich in meiner C3d-Färbung anfärben ließen, zeigten Überlappungen mit den Signalen für den Müllerzellmarker GFAP und schienen in deren Endfüßen zu akkumulieren. Ihr Immunfluoreszenzsignal stieg postischämisch an und ebte nach 14 Tagen wieder ab, wobei sich Hinweise auf geringere Ablagerungen in den miniFH-Behandlungsgruppen abzeichneten. Ich beobachtete die Co-Lokalisation von Komplementfaktor H und Mikroglia, wobei zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Aussagen zu den molekularen Vorgängen der Interaktion gemacht

werden können oder sicher ausgeschlossen werden kann, dass es sich nicht auch um mauseigenen Komplementfaktor H handeln könnte.

Ein TUNEL-Assay kam zum Einsatz, um das Ausmaß von Apoptose bzw. Zelltod 3 und 14 Tage nach Läsion/ Injektion zu untersuchen. Hier zeigten sich nach 3 Tagen noch sehr aktive Entzündungsvorgänge mit hohen Apoptoseraten, die erst nach 14 Tagen abklangen und leichte Vorteile der Therapie mit miniFH anzeigten.

In der Konsequenz der noch lange aktiven Apoptosevorgänge zeigten sich die Vorteile einer Behandlung mit miniFH hinsichtlich retinaler Integrität insbesondere nach 14 Tagen. Morphometrische Analysen offenbarten einen starken Zellverlust infolge der Ischämieperiode für DAPI-positive Zellkerne im Allgemeinen sowie speziell für Ganglienzellen und Amakrinzellen. Für alle untersuchten Zellarten zeigte sich zum 14-Tages-Zeitpunkt eine Tendenz zur Überlegenheit der Behandlung mit miniFH – teils in verbessertem relativem Zellüberleben nach 14 Tagen, aber insbesondere in weniger ausgeprägtem Zellverlust zwischen den beiden Analysezeitpunkten im Vergleich zur untersuchten Kontrollgruppe. Ähnliche Beobachtungen konnte ich auch in der Vermessung der Schichtdicken der plexiformen Schichten der Retina machen.

Es lässt sich festhalten, dass die Therapie mit miniFH in den meisten Analysen keinen signifikanten Therapieerfolg erzielen konnte, jedoch vielversprechende und untereinander konsistente Tendenzen zu beobachten waren.

In dieser Arbeit konnte daher die erfolgreiche Etablierung eines AAV-vermittelten Überexpressionssystems für einen Komplementmodulator auf histologischer Ebene beschrieben werden, welches die effektive und spezifische Transduktion von Müllerzellen erlaubt und die Akkumulation von C3-Spaltprodukten reduziert. Die miniFH-Genadditionstherapie resultierte in verbessertem Zellüberleben und geringerer Mikroglia-Aktivierung im akuten und relativ schweren Degenerationsmodell retinaler Ischämie/ Reperfusion.

Der Einsatz im Ischämie-/ Reperfusionsmodell spiegelt nur eingeschränkt den angedachten Einsatzbereich der Therapie wider. In Zukunft wäre eine weitere Evaluation des Effekts in Modellen sinnvoll, die eine langsame Progression eines Krankheitsverlaufs simulieren, wobei die AAV-Applikation idealerweise frühzeitig vor der Manifestation ausgeprägter retinaler Degeneration erfolgen sollte. Weitere Ansatzpunkte zur Optimierung wären beispielsweise die weitere Anpassung des AAV-Vektors hinsichtlich Effektivität der Müllerzelltransduktion oder die Adaptation der miniFH-Zusammensetzung. Insbesondere eventuelle Manipulationen durch das myc-Tag und seine Detektierbarkeit sollten optimiert werden. Das Degenerationsausmaß könnte ERG-gestützt quantifiziert und Therapieeffekte feiner differenziert werden, da bekannt ist, dass Funktionseinschränkungen lange vor dem eigentlichen Verlust der entspre-

chenden Zelltypen darstellbar sind. Die limitierte Übertragbarkeit der Ergebnisse vom Mausmodell auf den Menschen sollte zudem ins Auge gefasst werden.

Die Daten dieses Projektteils meiner Dissertation sind als zentrales Kernstück zur Validierung *des in vivo* Therapieeffekts der miniFH-Überexpression in folgendem Manuskript publiziert:

Biber J, Jabri Y, Glänzer S, Dort A, Hoffelner P, Schmidt CQ, Bludau O, Pauly D, Grosche A. Gliosis-dependent expression of complement factor H truncated variants attenuates retinal neurodegeneration following ischemic injury. J Neuroinflammation. 2024;21(1):56. doi: 10.1186/s12974-024-03045-3. PMID: 38388518

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Phänotyp eines ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout-Mausmodells charakterisiert, welcher die retinale Manifestation eines Morbus Stargardt simulieren sollte. Da für den RDH8^{-/-}-Single-Knockout keine strukturelle Degeneration bekannt war, wurden Tiere dieses Genotyps als Vergleich zugrunde gelegt. Die Charakterisierung erfolgte anhand der Merkmale der Autofluoreszenz des retinalen Pigmentepithels, der Mikroglia-Aktivierung und struktureller retinaler Integrität im Alter von 4 und 9 Monaten.

Im Alter von 4 Monaten war in keinem der untersuchten Parameter ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen zu verzeichnen. In der Messung der RPE-Autofluoreszenz zeigten sich mit der Zeit zunehmende Ablagerungen autofluoreszenten Lipofusins, was auch ein typisches Charakteristikum des Morbus Stargardt ist. Die Autofluoreszenzwerte korrelierten positiv mit der Stärke der Lichtexposition und waren bei ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout-Mäusen jeweils signifikant höher als bei den Referenztieren.

Hinsichtlich des Zustandes der Mikroglia wiesen beide Genotypen im zeitlichen Verlauf Zeichen verstärkter Aktivierung auf, welche sich insgesamt weniger in höheren Zellzahlen, sondern eher in morphologischen Veränderungen der Mikroglia manifestierte. Mikroglia gingen dabei in eine aktivere Form mit größerem Soma und kürzeren Fortsätzen über. Vermehrte Lichtexposition war nur bei RDH8^{-/-}-Mäusen mit signifikant steigender Zellzahl und einer signifikanten Veränderung der Mikroglia-Morphologie in die beschriebene Richtung vergesellschaftet. Nach Differenzierung hinsichtlich verschiedener haltungsbedingter Lichtbedingungen wurde offenkundig, dass bei ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Mäusen Mikroglia mit signifikant aktiverer Morphologie als bei RDH8^{-/-}-Mäusen nur unter niedrigerer Lichtexposition vorkommen.

Hinsichtlich struktureller Integrität zeigten die ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Mäuse im direkten Vergleich zwar meistens dezent geringere Zellzahlen und Schichtdicken der plexiformen Schichten als RDH8^{-/-}-Mäuse, die Unterschiede waren jedoch bis auf wenige Ausnahmen nicht signifikant. Insgesamt hielt sich die Anzahl an DAPI+ Zellkernen sehr stabil im zeitlichen Verlauf, bei beiden Genotypen waren hier keine starken Degenerationen zu beobachten. Auch nach Dif-

ferenzierung hinsichtlich der Lichtbedingungen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen. Ein Zusammenhang zwischen Lichtexposition und Degenerationsausmaß konnte auf Ebene struktureller retinaler Integrität ebenfalls nicht beobachtet werden. Nach lokaler Differenzierung zwischen superior und inferior des Nervus opticus gelegenen Retinaabschnitten zeigten sich grundsätzlich sehr vergleichbare Kernzahlen und Schichtdicken innerhalb eines Genotyps. In den inferioren Abschnitten waren jedoch gering niedrigere Zellzahlen in der äußeren Körnerschicht und eine etwas dünnere innere plexiforme Schicht für ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Mäuse als für RDH8^{-/-}-Mäuse zu verzeichnen.

Die bei Maeda et al. (2008) beschriebenen Veränderungen an der zentralen Retina der Knockoutmäuse konnten in den meisten Gesichtspunkten nicht bestätigt werden. Das Degenerationsausmaß stellte sich in den vorliegenden Auswertungen deutlich geringer dar. Während sich im Alter von 4 Monaten kaum Unterschiede zwischen den ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout-Mäusen und den zum Vergleich untersuchten RDH8^{-/-}-Single-Knockout-Mäusen nachweisen ließen, stellte sich ein gewisses, wenn auch eher mildes Degenerationsausmaß im erweiterten Beobachtungszeitraum nach 9 Monaten dar. Einige Unterschiede manifestierten sich erst nach Differenzierung zwischen verschiedenen Lichtbedingungen oder genauerer Eingrenzung des untersuchten Retinaabschnittes. Bei beiden Genotypen kam es zum erwarteten deutlichen Anstieg der Autofluoreszenz im RPE sowie zur morphologischen Veränderung der Mikroglia. Hinsichtlich retinaler Integrität konnten jedoch kaum Unterschiede zum Vergleichsgenotyp gesichert werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das vorbeschriebene Degenerationsausmaß auf eine Inzucht-Crb^{rd8}-Mutation im C57BL/6N-Mausstamm zurückzuführen ist, der in den Arbeiten von Maeda et al. untersucht wurde. Aufgrund des nur geringen Degenerationsausmaßes bei den Mäusen mit C57BL/6J-Hintergrund, welche in meiner Arbeit zum Einsatz kamen, kann dieses Mausmodell nicht für die Untersuchung des oben beschriebenen Genadditionstherapieansatzes eingesetzt werden.

Zukünftige Projekte sollten daher den vorgestellten Therapieansatz weiterentwickeln und sein Potential in anderen Modellen weiter evaluieren, die Progression verschiedenster erblich bedingter oder multifaktorieller retinaler Erkrankungen zu verlangsamen, die mit Komplementaktivierung vergesellschaftet sind.

Abstract

The aim of the first part of my doctoral thesis was to investigate the success of an adeno-associated virus (AAV)-based gene addition therapy in a mouse model of retinal ischemia with focus on histomorphological changes in the retina. A shortened and functionally optimized version of the complement modulator complement factor H was intended to be locally overexpressed in the retina via an AAV vector system through intravitreal injection, with the aim of rebalancing the excessive complement response triggered by the lesion. Limiting the exogenous protein production to Müller cells was intended to simplify the application, ensure effective secretion of the target protein miniFH, and protect the sensitive neurons.

For this purpose, mouse eyes were examined 3 and 14 days after lesion/ injection. Morphometric analyses of retinal cell nuclei counts and layer thicknesses were combined with cell death analyses via TUNEL assay. Immunohistochemical staining provided insights into the distribution of complement factors within the retina and the extent of Müller cell gliosis. Through immunohistochemical staining of the activation marker CD68, it was possible to assess the activation status of microglia.

The staining for the EGFP reporter confirmed a successful transduction of Müller cells, which could be identified by their unique morphology.

Regarding the stress/ inflammation markers GFAP and CD68, a pronounced stress situation with strong gliosis and immune response following the lesion was observed. While the microglia activation marker CD68 showed a marked decrease in the immune response after 14 days, revealing a significant benefit for the miniFH treatment, GFAP levels remained high even after 14 days, raising questions about possible contamination, immunological reactions to the viral vector, or Müller cell gliosis independent of complement homeostasis.

Immunohistochemical staining for complement factors C3/C3d and CFH allowed me to describe changes in the qualitative and quantitative distribution of these complement factors following the lesion and therapy. The C3 cleavage products, which were stained by my C3d staining, overlapped with signals for the Müller cell marker GFAP and appeared to accumulate in their end feet. Their immunofluorescence signal increased following ischemia and subsided again after 14 days, with indications of lower deposits in the miniFH treated groups. I observed the co-localization of complement factor H and microglia, but at this stage, no definitive statements can be made about the molecular processes of this interaction, nor can it be definitively excluded that it might be endogenous mouse complement factor H.

A TUNEL assay was employed to examine the extent of apoptosis or cell death 3 and 14 days after lesion/ injection. After 3 days, highly active inflammatory processes with high

apoptosis rates were observed, which only subsided after 14 days and indicated slight advantages of miniFH therapy.

Consequently, the advantages of miniFH treatment in terms of retinal integrity were particularly evident after 14 days due to the still active apoptosis processes. Morphometric analyses revealed a significant cell loss following the ischemic period, both in terms of overall DAPI-positive cell nuclei and specifically for ganglion cells and amacrine cells. For all cell types examined, a trend toward the superiority of miniFH treatment was evident at the 14-day time point—partly in improved relative cell survival after 14 days, but particularly in less pronounced cell loss between the two analysis time points compared to the control group. Similar observations were made in the measurement of the thicknesses of the retinal plexiform layers.

In summary, while the miniFH therapy did not achieve significant therapeutic success in most analyses, promising and consistent trends were observed.

Thus, this work describes the successful establishment of an AAV-mediated overexpression system for a complement modulator at the histological level, which allows for effective and specific transduction of Müller cells and reduces the accumulation of C3 cleavage products. The miniFH gene addition therapy resulted in improved cell survival and reduced microglial activation in the acute and relatively severe degeneration model of retinal ischemia/ reperfusion.

The use of this ischemia/ reperfusion model only partially reflects the intended application of the therapy. In the future, further evaluation of the effect in models that simulate a slow progression of disease would be beneficial, ideally with early AAV application before the manifestation of pronounced retinal degeneration. Further optimization approaches could include the enhancement of the AAV vector's effectiveness for Müller cell transduction or the adaptation of the miniFH composition. Specifically, potential manipulations of the myc-tag and its detectability should be optimized. The extent of degeneration could be quantified with ERG support, allowing for finer differentiation of therapeutic effects, as it is known that functional impairments can be detected long before the actual loss of the corresponding cell types. The limited transferability of the results from the mouse model to humans should also be taken into consideration.

The data from this part of my dissertation serve as a central core piece for the validation of the in vivo therapeutic effect of miniFH overexpression and are published in the following manuscript:

Biber J, Jabri Y, **Glänzer S**, Dort A, Hoffelner P, Schmidt CQ, Bludau O, Pauly D, Grosche A. *Gliososis-dependent expression of complement factor H truncated variants attenuates retinal neurodegeneration following ischemic injury. J Neuroinflammation. 2024;21(1):56. doi: 10.1186/s12974-024-03045-3. PMID: 38388518*

In the second part of the thesis, the phenotype of an ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-} double knockout mouse model was characterized, which was intended to simulate the retinal manifestation of Stargardt disease. Since no structural degeneration was known for the RDH8^{-/-} single knockout, animals of this genotype were used as a comparison. The characterization was based on the autofluorescence of the retinal pigment epithelium, microglia activation, and structural retinal integrity at 4 and 9 months of age.

At 4 months of age, no significant differences between the two genotypes were observed in any of the examined parameters. The measurement of RPE autofluorescence revealed increasing deposits of autofluorescent lipofuscin over time, which is also a typical characteristic of Stargardt disease. The autofluorescence values correlated positively with the intensity of light exposure and were significantly higher in ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-} double knockout mice than in the reference animals.

In terms of the microglia state, both genotypes showed signs of increased activation over time, manifesting more in morphological changes of the microglia than in higher cell numbers. Microglia transitioned into a more active form with larger somas and shorter processes. Increased light exposure was associated with significantly increasing cell numbers and a significant change in microglia morphology exclusively in RDH8^{-/-} mice. After differentiating based on different housing light conditions, it became apparent that in ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-} mice, microglia with significantly more active morphology compared to RDH8^{-/-} mice were found only under lower light exposure.

Regarding structural integrity, ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-} mice generally showed slightly lower cell counts and plexiform layer thicknesses compared to RDH8^{-/-} mice, but these differences were not significant, with a few exceptions. Overall, the number of DAPI+ nuclei remained stable over time, with no significant degeneration observed in either genotype. No significant differences between the genotypes were found after differentiating based on light exposure. A connection between light exposure and the extent of degeneration could not be observed at the level of structural retinal integrity either. After local differentiation between the superior and inferior sections of the retina relative to the optic nerve, very comparable cell counts and layer thicknesses were observed within each genotype, although in the inferior sections, ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-} mice displayed slightly lower cell numbers in the outer nuclear layer and a slightly thinner inner plexiform layer compared to RDH8^{-/-} mice.

The changes in the central retina of these knockout mice described by Maeda et al. (2008) could not be confirmed in most aspects; the extent of degeneration was significantly lower in my analyses. At the 4-month time point, merely few differences could be detected between ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-} double knockout mice and RDH8^{-/-} single knockout mice; however, a mild degree of degeneration became apparent during the extended observation period of 9 months. Some differences only manifested after differentiating between the light conditions or after more precise localization of the examined retinal section. In both genotypes, the expected significant increase in RPE autofluorescence and the morphological changes in microglia occurred. But few differences could be confirmed regarding retinal integrity compared to the reference genotype. The results suggest that the previously described degree of degeneration is due to an inbred Crb^{rd8} mutation in the C57BL/6N mouse strain used in the studies by Maeda et al. Due to the only mild degree of degeneration in the mice with a C57BL/6J background used in my work, this mouse model cannot be used for the investigation of the aforementioned gene addition therapy approach.

Future projects should continue to develop the presented therapy approach and evaluate its potential in other models to slow the progression of various inherited or multifactorial retinal diseases associated with complement activation.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Netzhaut.....	15
Abbildung 2: Fundusfotografie.....	16
Abbildung 3: Aktivierungsschritte des Komplementsystems gemäß Merle et al. (2015a und b).....	21
Abbildung 4: Schematische Darstellung struktureller Veränderungen in der Retina bei altersbedingter Makuladegeneration (AMD)	23
Abbildung 5: Übersicht über das experimentelle Design des Experiments.....	27
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Pathomechanismus im ABCA4 ^{-/-} RDH8 ^{-/-} -Doppel-Knockout im Vergleich zum normalen visuellen Zyklus in Photorezeptoraußensegmenten	28
Abbildung 7: Genotypisierung ABCA4 und RDH8.....	43
Abbildung 8: Genotypisierung zum RP65-Polymorphismus Leu450Met	44
Abbildung 9: Beispielbild zur Illustration der morphometrischen Auswertung über eine Retinabreite von 100 µm	47
Abbildung 10: Beispielbild zur Illustration der Intensitätsmessung des C3b/iC3b/C3d-Immunfluoreszenzsignals	47
Abbildung 11: Beispielbilder zur Illustration der Analyse von Mikroglia.....	48
Abbildung 12: Struktur und Funktionsweise von miniFH	52
Abbildung 13: Rolle von Komplementfaktor H (FH) in der Komplementkaskade.....	53
Abbildung 14: Immunhistochemische EGFP-Färbung auf retinalen Gewebeschnitten mit DAPI-Gegenfärbung.	54
Abbildung 15: Müllerzellgliose nach Ischämie	55
Abbildung 16: Mikroglia-Aktivierung basierend auf Immunfluoreszenz- Signalintensität des Aktivierungsmarkers CD68.....	57
Abbildung 17: Akkumulation von C3-Spaltprodukten in der Retina	59
Abbildung 18: Zelltodanalyse via TUNEL-Assay.....	61
Abbildung 19: Auswertung über neuronales Überleben nach Ischämie	62
Abbildung 20: Quantitative Auswertung der Schichtdicken der plexiformen Schichten als Ausdruck synaptischer Integrität	63
Abbildung 21: Überleben Calretinin-positiver Zellen nach Ischämie.....	65
Abbildung 22: Immunhistochemische IBA-1-/FH-Kofärbung mit DAPI- Gegenfärbung auf retinalen Gewebeschnitten	67
Abbildung 23: Messung der Autofluoreszenz im Wholemound-Präparat des retinalen Pigmentepithels von 4 und 9 Monate alten ABCA4 ^{-/-} RDH8 ^{-/-} -Doppel-Knockout-Mäusen im Vergleich zum RDH8 ^{-/-} -Single-Knockout.....	68

Abbildung 24: Analyse der Mikroglia-Aktivierung in 4 und 9 Monate alten ABCA4 ^{-/-} RDH8 ^{-/-} -Doppel-Knockout-Mäusen im Vergleich zum RDH8 ^{-/-} -Single-Knockout im retinalen Wholemout-Präparat.....	71
Abbildung 25: Morphometrische Analyse der Retinae von ABCA4 ^{-/-} RDH8 ^{-/-} -Doppel-Knockout-Mäusen im Vergleich zu RDH8 ^{-/-} -Single-Knockout-Mäusen im Alter von 4 und 9 Monaten.....	73
Abbildung 26: Messung der Autofluoreszenz in Wholemout-Präparaten des retinalen Pigmentepithels von ABCA4 ^{-/-} RDH8 ^{-/-} -Doppel-Knockout-Tieren im Vergleich zum RDH8 ^{-/-} -Single-Knockout nach Haltung bei hoher und niedriger Lichtexposition.....	74
Abbildung 27: Mikroglia-Aktivierung unter verschiedenen Lichtbedingungen im 9 Monate alten ABCA4 ^{-/-} RDH8 ^{-/-} -Doppel-Knockout- im Vergleich zum RDH8 ^{-/-} -Single-Knockout-Mausmodell	76
Abbildung 28: Morphometrische Analyse von 9 Monate alten ABCA4 ^{-/-} RDH8 ^{-/-} -Doppel-Knockout-Mäusen im Vergleich zu RDH8 ^{-/-} -Single-Knockout-Mäusen unter verschiedenen Lichtbedingungen.....	77
Abbildung 29: Vergleich von superior und inferior des Nervus opticus gelegenen Retinaabschnitten im Abstand von etwa 200 µm zum Sehnerv in 9 Monate alten ABCA4 ^{-/-} RDH8 ^{-/-} -Doppel-Knockout- und RDH8 ^{-/-} -Single-Knockout-Mäusen	78
Abbildung 30: Vergleich der Photorezeptordichte in der menschlichen und Mausretina.....	94

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Stocklösungen.....	34
Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Chemikalien.....	34
Tabelle 3: Eingesetztes gebrauchsfertiges Kit	35
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Enzyme und Proteine	36
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten primären Antikörper	36
Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten sekundären Antikörper.....	37
Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien	37
Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Geräte	38
Tabelle 9: Übersicht über die verwendete Software	39
Tabelle 10: Zusammensetzung des Lysepuffers zur DNA-Extraktion	40
Tabelle 11: PCR-Mix-Komponenten.....	41

Tabelle 12: PCR-Schritte zur Genotypisierung für das ABCA4-Gen.....	41
Tabelle 13: PCR-Schritte zur Genotypisierung für das RDH8-Gen	41
Tabelle 14: Übersicht über die verwendeten Primer für die PCR zur ABCA4-Genotypisierung	42
Tabelle 15: Übersicht über die verwendeten Primer für die PCR zur RDH8-Genotypisierung	42

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
AIF1	<i>Allograft inflammatory factor 1</i>
ÄKS	Äußere Körnerschicht
ÄPS	Äußere plexiforme Schicht
bp	Basenpaare
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELM	Äußere Gliagrenzmembran (<i>external limiting membrane</i>)
ERG	Elektroretinogramm
g	Gramm
GFAP	Saures Gliafaserprotein (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GZS	Ganglienzellschicht
IBA-1	<i>Ionized calcium-binding adaptor molecule 1</i>
IKS	Innere Körnerschicht
ILM	Innere Gliagrenzmembran (<i>internal limiting membrane</i>)
IPS	Innere plexiforme Schicht
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
(q)PCR	(quantitative) Polymerase-Kettenreaktion

RPE	Retinales Pigmentepithel
s	Sekunden
°C	Grad Celsius

1 Einleitung

1.1 Anatomie der Retina

Die Retina (Netzhaut) stellt den zentralen lichtwahrnehmenden Teil des Auges dar, mit dem der Mensch seine Umwelt wie mit keinem anderen Organ wahrnehmen kann. Sie kleidet den Augapfel von innen aus und lässt sich in zwei Bereiche unterteilen, die an der Ora serrata ineinander übergehen: Die Pars caeca, die nur das Pigmentepithel enthält und sich dem Ziliarkörper und der Irisrückseite anlegt, und die Pars optica, die den eigentlichen lichtsensitiven Teil der Retina darstellt und neben dem Pigmentepithel die neuronalen Strukturen enthält, über die optische Signale in elektrische Impulse umgewandelt werden können (Trepel, 2017). In der Pars optica können wiederum zwei Schichten voneinander abgegrenzt werden. Diese sind das Stratum pigmentosum und das Stratum nervosum (Trepel, 2017).

1.1.1 Stratum pigmentosum

Das **Pigmentepithel (Stratum pigmentosum)** ist eine einzellige Epithelschicht, die die Retina von der Aderhaut (Choroidea) trennt (Trepel, 2017) (Abbildung 1). Es enthält eine Reihe verschiedener Pigmente wie Melanin, die die durch die Linse auf die zentrale Netzhaut konzentrierte Lichtenergie absorbieren und die Photorezeptoren vor Photooxidation und folgender oxidativer Schädigung schützen (Strauss, 2005). Im Laufe des Lebens kommt es zur Akkumulation von Lipofuszin im retinalen Pigmentepithel, was zunächst im Rahmen von weiterer Lichtabsorption von Nutzen sein könnte, im Verlauf aber toxische Konzentrationen erreicht (Strauss, 2005). Das Lipofuszin in RPE-Zellen unterscheidet sich von jenem in anderen Körperzellen, da es zum Großteil aus chemisch modifizierten Rückständen von inkomplett verdauten Photorezeptoraußensegmenten besteht (Kennedy et al., 1995). Das Pigmentepithel versorgt die Sinneszellschichten durch seinen Kontakt mit den choroidalen Blutgefäßen mit Metaboliten, phagozytiert abgestoßene Außensegmente von Photorezeptoren, damit diese ihre Funktion erhalten können, und nimmt eine wichtige Rolle in der Wiederherstellung von 11-cis-Retinal ein (Strauss, 2005). Photorezeptoren sind nicht in der Lage, das nach Lichteinfall entstehende all-trans-Retinal zurück in 11-cis-Retinal zu reisolieren, sodass die Isomere des Retinals unter ständigem Austausch zwischen Photorezeptoren und Pigmentepithel stehen, wo im Rahmen des visuellen Zyklus 11-cis-Retinal regeneriert und den Photorezeptoren für die folgenden Sehvorgänge wieder zur Verfügung gestellt werden kann (Strauss, 2005). Obwohl bekannt ist, dass Zapfenzellen aufgrund ihres hohen Stoffwechsels bei Tageslicht-Sehen für die Regeneration ihrer Chromophore zusätzlich auf einen alternativen, Müllerzell-assoziierten Weg zurückgreifen können (Wang & Kefalov, 2011), legt eine aktuelle Arbeit nahe, dass eine einwandfreie Zapfenfunktion trotz dessen maßgeblich von einer ordnungsmäßigen Funktion des visuellen Zyklus im Pigmentepithel abhängig ist (Bassetto et al., 2024). Mit seiner basolateralen Membran liegt es an der Bruchmembran an,

wo es den inneren Teil der Blut-Retina-Schranke formt, die wesentlich zum Erhalt des Immunprivilegs der Retina beiträgt (Trepel, 2017). Eine Dysfunktion des RPE trägt zu verschiedenen retinalen Erkrankungen wie diabetischer Retinopathie oder altersbedingter Makuladegeneration (AMD) bei (Ljubimov et al., 1996), (Booij et al., 2010).

1.1.2 Stratum nervosum

1.1.2.1 Aufbau und neuronale Verschaltung

Das Stratum nervosum liegt der apikalen Seite des Pigmentepithels innen an und enthält die Neuronen der Retina sowie Gliazellen (Trepel, 2017). Diese etwa 200 µm dicke Schicht kann in neun weitere Schichten unterteilt werden (Abbildung 1), von denen drei die Zellkörper der retinalen Zellen enthalten und die restlichen sechs die Fortsätze dieser Zellen beherbergen (Trepel, 2017). Von außen nach innen folgen zunächst die **Photorezeptorschicht (Stratum segmentorum externorum et internorum)**, das die Innen- und Außensegmente der Photorezeptoren beinhaltet, in welchen die Lichtrezeption stattfindet, die **äußere Gliagrenzmembran (Stratum limitans externum)** aus den Fortsätzen der Gliazellen und die **äußere Körnerschicht (Stratum nucleare externum)**, die die Perikaryen der Sinneszellen enthält, aufeinander (Trepel, 2017). Als lichtwahrnehmende Sinneszellen (Photorezeptoren) werden die hell-dunkel-wahrnehmenden Stäbchenzellen und die farbwahrnehmenden Zapfenzellen subsumiert. Nach innen folgt die **äußere plexiforme Schicht (Stratum plexiforme externum)**, in der die Synapsen zwischen den Axonen der Photorezeptoren und den Dendriten der bipolaren Zellen verortet sind. Hier erfolgt die synaptische Übertragung des visuellen Impulses vom ersten auf das zweite Neuron der Sehbahn (Trepel, 2017). Es schließen sich die **innere Körnerschicht (Stratum nucleare internum)** mit den Perikaryen der bipolaren Zellen, der Müllerzellen, Horizontalzellen und der Amakrinzellen an, gefolgt von der **inneren plexiformen Schicht (Stratum plexiforme internum)**, in der die synaptische Verschaltung vom zweiten Neuron der Sehbahn, den bipolaren Zellen, auf das dritte, die Ganglienzellen, stattfindet (Trepel, 2017). Ihre Zellkörper finden sich in der nach innen angrenzenden **Ganglienzellschicht (Stratum ganglionicum)**, ihre noch marklosen Axone formen die **Nervenfaserschicht (Stratum neurofibrarum)**, die außerdem die großen Blutgefäße der Netzhaut enthält (Trepel, 2017). Den Abschluss zum Glaskörper bildet die **innere Gliagrenzmembran (Stratum limitans internum)**, die aus den Fortsätzen der Müllerzellen besteht (Trepel, 2017). Die Perikaryen der retinalen Zellen sind lichtmikroskopisch als drei Banden zu erkennen (Trepel, 2017).

In der Retina befinden sich damit die ersten drei Neurone der Sehbahn. Die Stäbchen und Zapfen sind lichtwahrnehmende Sinneszellen und stellen das erste Neuron dar. Die menschliche Retina enthält etwa 20-mal mehr Stäbchen als Zapfen, wobei sich die Stäbchen hauptsächlich in der Peripherie der Netzhaut befinden, während sich die Zapfen in der Fovea centralis konzentrieren (Trepel, 2017). Aufgrund des inversen Aufbaus der Retina müssen

eintreffende Lichtreize alle Schichten durchdringen, ehe sie in den Außensegmenten der Photorezeptorzellen registriert werden können (Trepel, 2017). Beide Photorezeptortypen wandeln die wahrgenommenen optischen Signale mit Hilfe von Opsinen in chemische um und leiten diese Information über Synapsen mit Bipolarzellen weiter, welche wiederum auf die Ganglienzellen verschalten (Trepel, 2017). Ganglienzellen sind die Output-Neurone der Retina (Trepel, 2017). Ihre Axone ziehen schließlich zur Sehnervenpapille, wo sie sich zum Sehnerven (Nervus opticus) bündeln (Trepel, 2017). Zur Kontrastverstärkung tragen verschiedene Typen von Interneuronen wie Amakrinzellen und Horizontalzellen durch komplexe Verschaltung bereits innerhalb der Netzhaut bei (Trepel, 2017).

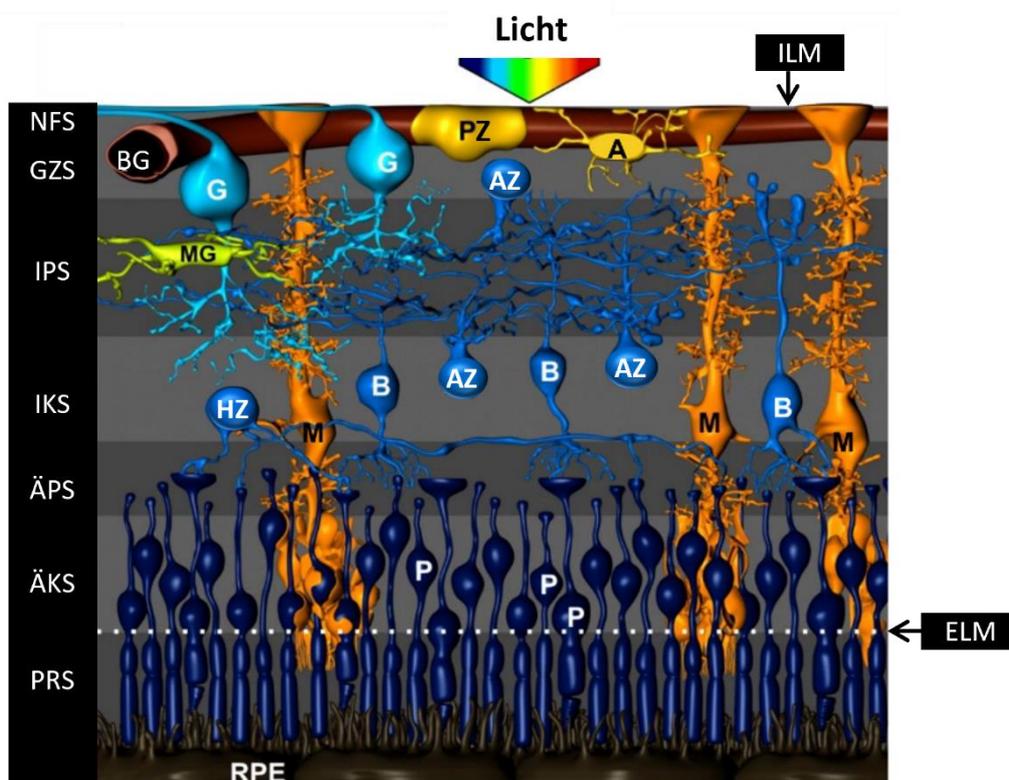


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Netzhaut. ILM: Innere Gliagrenzmembran. NFS: Nervenfaserschicht. GZS: Ganglienzellschicht. IPS: innere plexiforme Schicht. IKS: innere Körnerschicht. ÄPS: äußere plexiforme Schicht. ÄKS: äußere Körnerschicht. ELM: äußere Gliagrenzmembran. PRS: Photorezeptorschicht. BG: Blutgefäß. G: Ganglienzelle. PZ: Perizyt. A: Astrozyt. AZ: Amakrinzelle. MG: Mikroglia. HZ: Horizontalzelle. M: Müllerzelle. B: Bipolarzelle. P: Photorezeptorzelle. RPE: retinales Pigmentepithel. Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. rer. nat. Antje Grosche.

Als rezeptives Feld bezeichnet man einen Bereich der Netzhaut, der Einfluss auf den Erregungszustand einer bestimmten Ganglienzelle hat (Kipp, 2017). Die Größe rezeptiver Felder in der Netzhaut variiert stark. Im Großteil der Retina konvergiert das Signal mehrerer Photorezeptorzellen letzten Endes auf nur eine Ganglienzelle, die rezeptiven Felder sind also vergleichsweise groß und zur Peripherie hin in ihrer Größe zunehmend (Kipp, 2017). An der Fovea centralis, der Stelle des schärfsten Sehens, hingegen ist die Retina zur Perfektion der Lichtwahrnehmung ausgedünnt, indem alle Strukturen, die nicht unmittelbar der Reizrezeption dienen, was also die inneren Retinaschichten betrifft, zur Seite verlegt sind (Trepel, 2017)

(Abbildung 2). Es finden sich an Photorezeptoren nur Zapfenzellen, keine Stäbchen. Hier gibt es im Sinne maximaler Reizauflösung keine Signalkonvergenz, sondern eine 1:1-Verschaltung zwischen Zapfenzellen, bipolaren Zellen und Ganglienzellen (Trepel, 2017).

Die etwa 1,7 mm durchmessende und medial der Fovea centralis gelegene Sehnervenpapille (Papilla nervi optici oder auch Discus nervi optici) markiert den Beginn des Nervus opticus, weshalb an dieser Stelle von den Retinaschichten nur die Nervenfaserschicht zu sehen ist (Trepel, 2017).

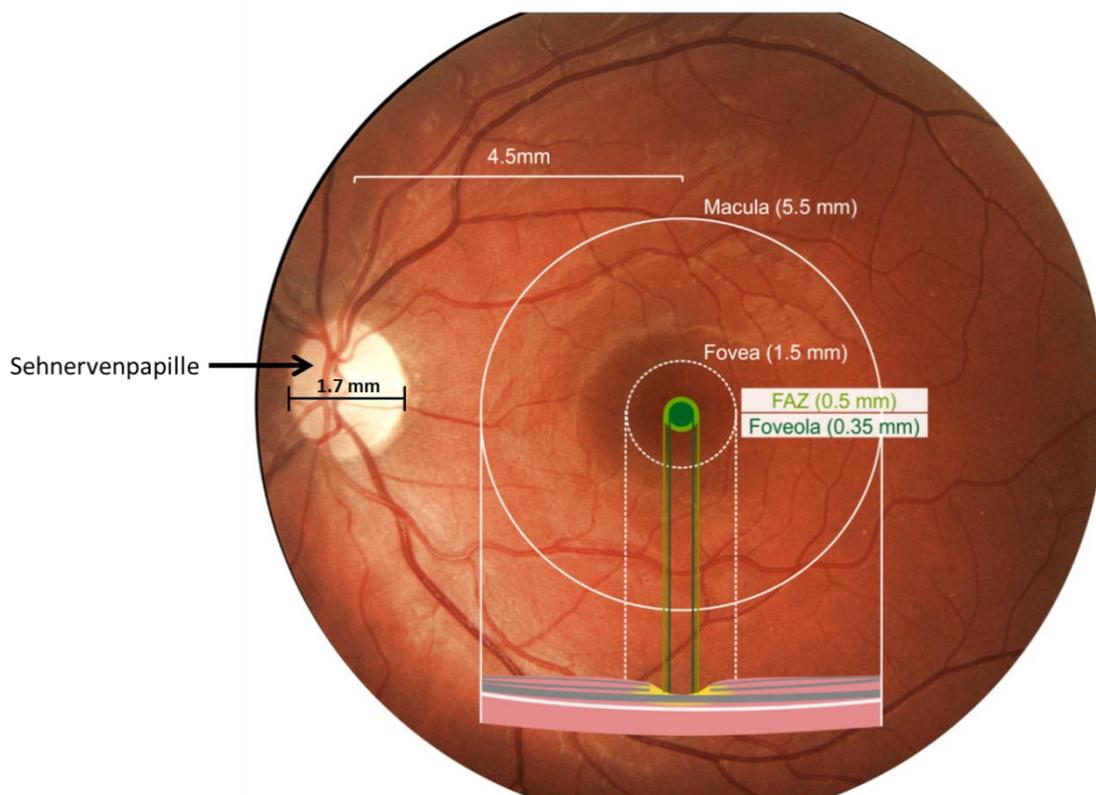


Abbildung 2: Fundusfotografie. Die Fovea centralis bildet eine trichterförmige Grube in der Macula lutea (gelber Fleck), ihre tiefste Stelle bezeichnet man als Foveola (Trepel, 2017). Im Bereich der Macula lutea sind Blutgefäße und Kapillaren zur Optimierung des Sehens nach außen gedrängt (Kipp & Radlanski, 2017). FAZ: foveale avaskuläre Zone. Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. rer. nat. Antje Grosche.

1.1.2.2 Gliazellen

In der menschlichen Retina können drei Arten von Gliazellen unterschieden werden: Astrozyten, Müllerzellen und Mikroglia (Bringmann et al., 2006).

Mikroglia sind die lokalen Immunzellen der Retina, die maßgeblich in die Abwehr eindringender Mikroorganismen, die Initiierung von Entzündungsprozessen und die Gewebeerneuerung involviert sind (Bringmann et al., 2006). Sie sind hauptsächlich in den inneren und hier vor allem in den plexiformen Schichten lokalisiert (Bringmann et al., 2006).

Astrozyten, benannt nach ihrer sternförmigen Morphologie, sind Gliazellen, die aus dem Nervus opticus zusammen mit Blutgefäßen in die Retina migrieren (Stone & Dreher, 1987),

(Vecino et al., 2016) Ihr Vorkommen ist auf die Nervenfaserschicht und Ganglienzellschicht sowie auf vaskularisierte Retinae beschränkt (Stone & Dreher, 1987). Ihnen wird eine entscheidende Rolle in der Vaskularisierung der Retina zugesprochen, da sie den größten Anteil an VEGF (vascular endothelial growth factor) sowohl während normaler als auch pathologischer Bildung von Blutgefäßen sezernieren (Vecino et al., 2016). Des Weiteren sind sie Teil der Blut-Retina-Schranke, deren Integrität sie als Reaktion auf Läsion oder Krankheit beeinträchtigen (Vecino et al., 2016). Außerdem erfüllen sie neurotrophe Funktionen und steuern mechanische Unterstützung für degenerierende Axone von Ganglienzellen bei (Vecino et al., 2016).

Müllerzellen sind die Hauptgliazellen der Retina und reichen mit ihrer besonderen Morphologie über die gesamte Dicke der Retina (Bringmann et al., 2006). Sie übernehmen nicht nur eine Vielzahl an metabolischen und homöostatischen Funktionen, sondern sind auch an der Regulierung synaptischer Aktivität und des retinalen Blutflusses (Paulson & Newman, 1987) sowie der Durchlässigkeit der Blut-Retina-Schranke beteiligt (Tout et al., 1993).

Eine ihrer Hauptaufgaben besteht in der Kontrolle der Ionen- und Wasserhomöostase der Retina, zu welchem Zweck sie zum Transport von Wasser über Aquaporin-4-Kanäle befähigt sind (Nagelhus et al., 1998) und Schwankungen in der extrazellulären Kaliumkonzentration durch passive Ionenströme über Kir-Kanäle entgegenwirken (Kofuji et al., 2002), (Reichenbach & Bringmann, 2013). Sie versorgen Photorezeptoren mit Metaboliten und entsorgen Stoffwechselprodukte ins Blut und den Glaskörper, worüber auch der extrazelluläre pH-Wert reguliert wird (Reichenbach & Bringmann, 2013).

Müllerzellen exprimieren Transportsysteme für verschiedene Neurotransmitter, darunter insbesondere Glutamat (Bringmann et al., 2009). Über diese Transporter wird extrazelluläres Glutamat aufgenommen, wodurch sowohl seine Diffusion aus dem synaptischen Spalt verhindert und die räumliche Signalauflösung sichergestellt wird (Bringmann et al., 2009), als auch die synaptische Transmission zwischen Neuronen frühzeitig terminiert wird (Brew & Attwell, 1987), (Matsui et al., 1999). Durch die schnelle Entfernung von extrazellulärem Glutamat wird auch effektiv der Neurotoxizität dieses Transmitters vorgebeugt, die bereits in niedrigen Konzentrationen relevant ist (Kashii et al., 1996). Glutamat wird nach Aufnahme in Müllerzellen mithilfe des Glia-spezifischen Enzyms Glutaminsynthetase in Glutamin umgewandelt, welches den Neuronen schließlich wieder zur Verfügung gestellt wird, um daraus erneut Glutamat und γ -Aminobuttersäure (GABA) zu bilden (Bringmann et al., 2009), (Pow & Crook, 1996). Wie essenziell diese Müllerzell-vermittelte Regeneration beziehungsweise Inaktivierung von Neurotransmittern für die Aufrechterhaltung der visuellen Funktion ist, wurde in Experimenten deutlich, in denen Glutaminsynthetase in Müllerzellen pharmakologisch blockiert wurde, was zu schlagartigem Mangel an Glutamat und resultierender funktioneller

Blindheit führte (Barnett & Pow, 2000), (Pow & Robinson, 1994). Ebenso sind Müllerzellen an der Phagozytose der abgestoßenen Außensegmente von Zapfenzellen und an der Regeneration von 11-cis-Retinal für diese beteiligt, um die schnelle Verfügbarkeit von Zapfen zur Lichtdetektion sicherzustellen (Long et al., 1986), (Das et al., 1992), (Muniz et al., 2007). Eine weitere Aufgabe der Müllerzellen besteht in der Unterstützung von Photorezeptoren und Neuronen gegen oxidativen Stress durch die Sekretion von Antioxidantien wie Glutathion (Pow & Crook, 1995), schließlich ist die Belastung insbesondere der äußeren Retina durch den circadianen Wechsel von schweren Hypoxieperioden im Dunklen und Hyperoxieperioden bei Lichteinfall (Linsenmeier, 1986) und hohen Sauerstoffverbrauch beträchtlich (Reichenbach & Bringmann, 2013). Müllerzellen spielen zudem eine entscheidende Rolle in der strukturellen Organisation der sich entwickelnden Retina. Sie dienen als Orientierungsstrukturen für die Migration von Neuronen (Bringmann et al., 2006), (Willbold et al., 1997). Auch in der vollentwickelten Retina scheinen Müllerzellen essenziell für den Erhalt der retinalen Struktur zu sein, wie Müllerzell-Deletions- und -Ablationsversuche nahelegen: Selektiver Verlust von Müllerzellen resultiert in struktureller Desorganisation sowie Vaskulopathie inklusive Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke und Ausbildung intraretinaler Neovaskularisationen (Shen et al., 2012), (Byrne et al., 2013).

Neben diesen altbekannten Aufgaben legen Arbeiten aus den 2000er-Jahren zusätzlich auch Funktionen in der Minimierung von Lichtstreuung über die gezielte Leitung von Licht durch die Retina bis zu den Photorezeptoren, ähnlich wie Glasfasern (Franze et al., 2007), und mechanische Schutzfunktionen nahe. Im Rahmen neuronaler Aktivität wurde beispielsweise ein Anschwellen der Neurone und eine Abnahme des Extrazellulärtraumes beschrieben, worauf Müllerzellen mit einer Anpassung ihrer Morphologie reagieren (Uckermann et al., 2004), (Reichenbach & Bringmann, 2013). Daneben werden diesem Zelltyp weitere Regulationsmöglichkeiten der synaptischen Transmission über sogenannte Gliotransmitter wie Glutamat, ATP, Adenosin und D-Serin zugeschrieben (Newman, 2004a), (Newman, 2004b).

1.2 Komplementsystem

1.2.1 Aktivierungswege

Das Komplementsystem ist Teil des angeborenen Immunsystems. Es besteht aus über 40 Proteinen, die unter physiologischen Bedingungen sowohl an der entzündungsfreien Beseitigung von apoptotischen Zellen beteiligt sind als auch Pathogene opsonieren oder über die Formation eines Membranangriffskomplexes (membrane attack complex, MAC) eliminieren, Entzündungsprozesse über Anaphylatoxine modulieren und zur Eliminierung von Immunkomplexen beitragen (Merle et al., 2015b). Im visuellen System wird dem Komplementsystem des Weiteren eine Rolle bei der Optimierung synaptischer Verbindungen zugeschrieben. Während der Ausreifung des Nervensystems nach der Geburt binden Komplementfaktoren

an überschüssige Synapsen zwischen Ganglienzellen und den Neuronen des Corpus geniculatum laterale und markieren diese zur Phagozytose durch Mikroglia (Borucki et al., 2020). In Frühstadien des Glaukoms kommt es zu einer pathologischen Synapsenreduktion, welche mit übermäßiger Opsonierung durch Komplementfaktoren assoziiert ist (Stevens et al., 2007), (Schafer et al., 2012). Es konnte gezeigt werden, dass die genetische Deletion verschiedener Komplementfaktoren im Mausmodell zu retinaler Degeneration mit zunehmendem Alter führt (Mukai et al., 2018). Diese Beobachtungen zeigen: Wird die empfindliche Homöostase des Komplementsystems gestört, ist dies mit einer Reihe inflammatorischer und autoimmuner Krankheiten assoziiert. Hierzu gehören beispielsweise der systemischen Lupus Erythematoses (SLE), das atypische hämolytisch-urämischen Syndrom (aHUS) oder die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) (Merle et al., 2015b).

Die Aktivierung des Komplementsystems kann über drei verschiedene Aktivierungswege erfolgen: den klassischen, den Lektin- und den alternativen Aktivierungsweg (Abbildung 3).

Der klassische Aktivierungsweg und der Lektinweg werden durch die Bindung ihrer jeweiligen Erkennungsmoleküle an Zielstrukturen eingeleitet (Merle et al., 2015a). Das Erkennungsmolekül des klassischen Aktivierungsweges ist C1q, welches zusammen mit den Serinproteasen C1r und C1s in Form des inaktiven C1-Komplexes an Oberflächen-gebundenes IgM oder mehrere IgG-Moleküle bindet, was zur autokatalytischen Spaltung und Aktivierung von C1r führt, welches C1s spaltet. C1s spaltet nun wiederum die Komplementfaktoren C4 und C2, deren Fragmente C4b und C2a die C3-Konvertase des klassischen Aktivierungsweges (C4b2a) bilden (Merle et al., 2015a).

Im Lektinweg erkennen Mannose-bindendes Lektin (MBL), Collektin 11 und die Ficoline H, L und M Kohlenhydrate und Acetylgruppen auf Bakterien, Viren und apoptotischen Zellen (Merle et al., 2015a). Sie sind ebenfalls mit Proteasen (MASP-1 und -2) assoziiert, welche nach der Bindung von MBL bzw. Ficolinen an ihre Zielstrukturen C4 und C2 spalten, deren Spaltprodukte hier die C3-Konvertase des Lektinweges (C4b2a) bilden (Merle et al., 2015a). Die C3-Konvertasen aller Aktivierungswege können schließlich den Komplementfaktor C3 spalten, dessen Fragment C3b benötigt wird, um die C5-Konvertase ((C4b2a)3b) zu formen (Merle et al., 2015a). Die neue C5-Konvertase spaltet dann C5 in C5a und C5b, von denen letzteres die Komplementfaktoren C6, C7, C8 und C9 rekrutiert (Merle et al., 2015a). Diese formen zusammen den Membranangriffskomplex (MAC) (Merle et al., 2015a). Dieser Komplex bildet eine Pore im Pathogen, über welche es zum Einstrom von Calcium und zur Lyse desselben kommt (Merle et al., 2015a). Die Faktoren C3a und C5a fungieren als Anaphylatoxine (Merle et al., 2015a).

Während der klassische und der Lektinweg klare Erkennungsmoleküle besitzen, die Komplementaktivierung nur dann initiieren, wenn und wo sie notwendig ist, entsteht C3b im alterna-

tiven Aktivierungsweg in kleinen Mengen permanent durch einen Vorgang, der als tick-over bezeichnet wird (Merle et al., 2015a): C3 kann durch spontane Hydrolyse in seine bioaktive Form übergehen (Nicol & Lachmann, 1973), (Lachmann & Halbwachs, 1975). Diese bindet Komplementfaktor B, welcher durch Faktor D, eine Serinprotease, gespalten wird (Merle et al., 2015a). Hierdurch entsteht die C3-Konvertase des alternativen Aktivierungsweges (C3bBb) (Merle et al., 2015a). Diese kann wiederum neues C3 in C3a und C3b spalten. Das entstehende C3b kann über seine TED-Domäne (Thioester-Domäne) an Oberflächen-gebundene Hydroxylgruppen binden (Merle et al., 2015a). Da der Thioester aber nur eine Halbwertszeit von deutlich unter einer Sekunde und eine Bindungseffizienz von 10% aufweist (Law & Dodds, 1997), kann C3b hier nur an Oberflächen in direkter Umgebung binden. Auf körpereigenen Oberflächen wird es durch eine Reihe von Komplementregulatoren zügig deaktiviert (Merle et al., 2015a). Die Funktion des alternativen Aktivierungsweges besteht also darin, die Umgebung in permanenter Aktion nach Komplement-aktivierenden Oberflächen abzusuchen und die durch den klassischen und Lektinweg initiierten Komplementaktionen zu verstärken (Merle et al., 2015a). Während die beiden letztgenannten Aktivierungswege die entscheidendere Rolle in der Auslösung der Komplementaktivierung einnehmen, vermittelt der alternative Weg schlussendlich über 80% der Komplementaktivität (Harboe et al., 2004), da sich dieser Aktivierungsweg über die Nutzung von C3b durch die C3-Konvertasen aller drei Aktivierungswege als Bestandteil seiner eigenen C3-Konvertase selbst verstärkt (Lachmann & Hughes-Jones, 1984). Man spricht hier auch von der Funktion als „amplification loop“ (Lachmann & Hughes-Jones, 1984).

Komplementfaktoren werden hauptsächlich durch Hepatozyten und Immunzellen produziert und dann systemisch über die Blutbahn verteilt. Aktuelle Studien legen nahe, dass retinale Zellen selbst in der Lage sind, Komplementkomponenten zu produzieren und somit bei intakter Blut-Retina-Schranke unabhängig vom systemischen Komplementsystem schnell auf Pathogeninvasion und anfallende Zelltrümmer zu reagieren (Schafer et al., 2017), (Pauly et al., 2019). Sie scheinen dabei insbesondere Komplementfaktoren des klassischen und alternativen Aktivierungsweges zu exprimieren (Pauly et al., 2019).

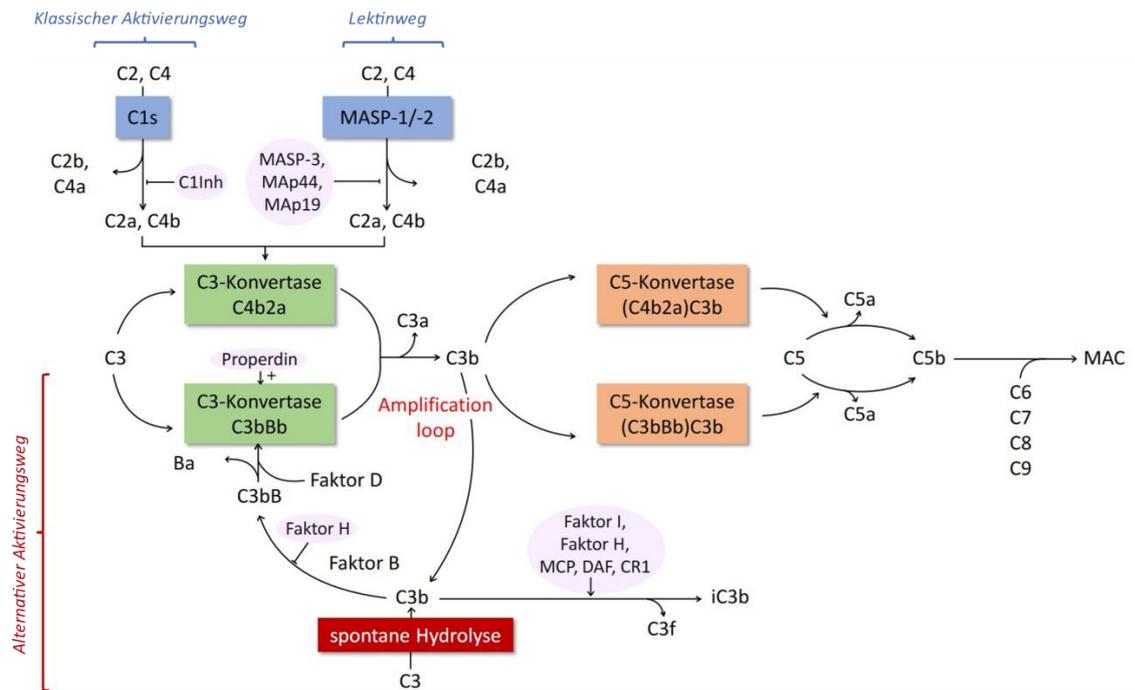


Abbildung 3: Aktivierungsschritte des Komplementsystems gemäß Merle et al. (2015a und b). Während die Komplementkaskade insbesondere durch den klassischen und den Lektinweg initiiert wird, dient der alternative Aktivierungsweg vor allem der Amplifikation der Komplementantwort, indem sich die C3-Konvertase des alternativen Weges auch durch ihr eigenes Produkt, C3b, speist. Strenge Regulation der Komplementaktivität hier beispielhaft an der Funktion der Komplementfaktoren H, I, und Properdin demonstriert.

1.2.2 Regulation der Komplementaktivität

„Die Hauptregel des Komplementsystems besagt, dass alles, was nicht explizit geschützt ist, attackiert werden muss.“ (Merle et al., 2015b). Aus diesem Grund exprimieren körpereigene Zellen Komplementkomponenten auf ihrer Membran oder rekrutieren sie aus dem Plasma, um C3b, das an ihre Oberfläche bindet, rasch zu inaktivieren (Merle et al., 2015a). Die Aktivität des Komplementsystems unterliegt also strenger Regulierung durch verschiedene Regulatorproteine, die die Homöostase des Systems sicherstellen beziehungsweise stabilisieren.

So wird beispielsweise die Initiation durch den klassischen und den Lektinweg über C1 Inhibitor (C1Inh) und die Proteine MASP-3, MASP-4 und MASP-19 kontrolliert (Merle et al., 2015a). C1Inh inaktiviert die Proteasen C1r, C1s, MASP-1 und -2 (Beinrohr et al., 2008), während MASP-3, MASP-4 und MASP-19 mit ähnlicher Affinität wie MASP-1 und -2 an die Erkennungsmoleküle des Lektinweges binden können und somit um die Bindungsstellen konkurrieren (Gaboriaud et al., 2013). Sie können hingegen keine Komplementkomponenten spalten und verhindern somit das Voranschreiten der Komplementkaskade (Merle et al., 2015a).

Da die C3-Konvertase des alternativen Aktivierungsweges alleine nur eine kurze Halbwertszeit von etwa 90 Sekunden hat (Pangburn & Muller-Eberhard, 1986), muss der C3bBb-Komplex stabilisiert werden. Dies geschieht durch den Komplementfaktor Properdin (Fearon & Austen, 1975), (Merle et al., 2015a). Auf der anderen Seite wird die Bindung von Faktor B an C3b auf körpereigenen Oberflächen durch Komplementfaktor H verhindert, indem er mit

Faktor B um die Bindung an C3b konkurriert und eine Dissoziation des C3bBb-Komplexes induziert (Whaley & Ruddy, 1976). Des Weiteren wird die Bildung der C3-Konvertase des alternativen Aktivierungsweges auch durch Faktor I inhibiert, indem er C3b in der Anwesenheit von Kofaktoren, insbesondere Faktor H, unter Abspaltung des Fragments C3f in seine inaktive Form iC3b spaltet (Whaley & Ruddy, 1976), (Merle et al., 2015a). Diese kann Faktor B nicht mehr binden. iC3b wird in der Folge weiter in die Spaltprodukte C3c und C3dg geteilt. Es folgt die Spaltung von C3dg in C3d und C3g (Biber et al., 2024). Neben Faktor H als löslichem Komplementregulator existieren eine Reihe weiterer Kofaktoren für Faktor I, die membrangebunden Komplementaktivität reduzieren. Hierzu gehören Membrane Cofaktor Protein (MCP), Decay Acceleration Factor (DAF) und Complementrezeptor 1 (CR1) (Merle et al., 2015a). Die Kontrolle des Komplementsystems unterliegt der Steuerung durch viele weitere Mechanismen und Komplementkomponenten, deren Erläuterung jedoch den Rahmen dieser Doktorarbeit sprengen würde. Ich habe mich deshalb auf die für das Verständnis des Therapiekonzepts relevantesten Aspekte fokussiert.

1.3 Auswahl Komplement-assoziiierter degenerativer Retinaerkrankungen

1.3.1 Altersbedingte Makuladegeneration (AMD)

Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ist eine chronische Erkrankung der zentralen Retina und stellt die aktuell führende Ursache irreversiblen Visusverlusts in Industriestaaten dar (Lim et al., 2012). In frühen Krankheitsstadien verläuft die Erkrankung in der Regel asymptomatisch, in der klinischen Untersuchung sind Drusen (abnormale Akkumulation von extrazellulärem Material zwischen RPE und Bruchmembran) (Johnson et al., 2001) und Hyper- sowie Hypopigmentierungen des retinalen Pigmentepithels am Augenhintergrund erkennbar (Lim et al., 2012) (Abbildung 4). Mit dem Voranschreiten der Erkrankung kommt es zu zunehmender Einschränkung des zentralen Sehens mit Zentralskotom und Metamorphopsien (Sehstörungen mit verzerrter Wahrnehmung), während eine grobe räumliche Orientierungsfähigkeit durch das periphere Gesichtsfeld in der Regel erhalten bleibt (Sachsenweger, 2003). In späten Stadien kann zwischen der nicht-exsudativen (trockenen) Form, die durch geografische Atrophie mit langsam progredienter Symptomatik gekennzeichnet ist, und der exsudativen (feuchten) Form unterschieden werden. Bei letzterer Verlaufsform kommt es zur Entstehung choroidaler Neovaskularisationen, deren Folge sub- und intraretinale Blutungen sein können, welche plötzlichen Visusverlust bis hin zum kompletten Verlust des zentralen Sehens und damit Blindheit im Sinne des Gesetzes verursachen können (Sachsenweger, 2003).

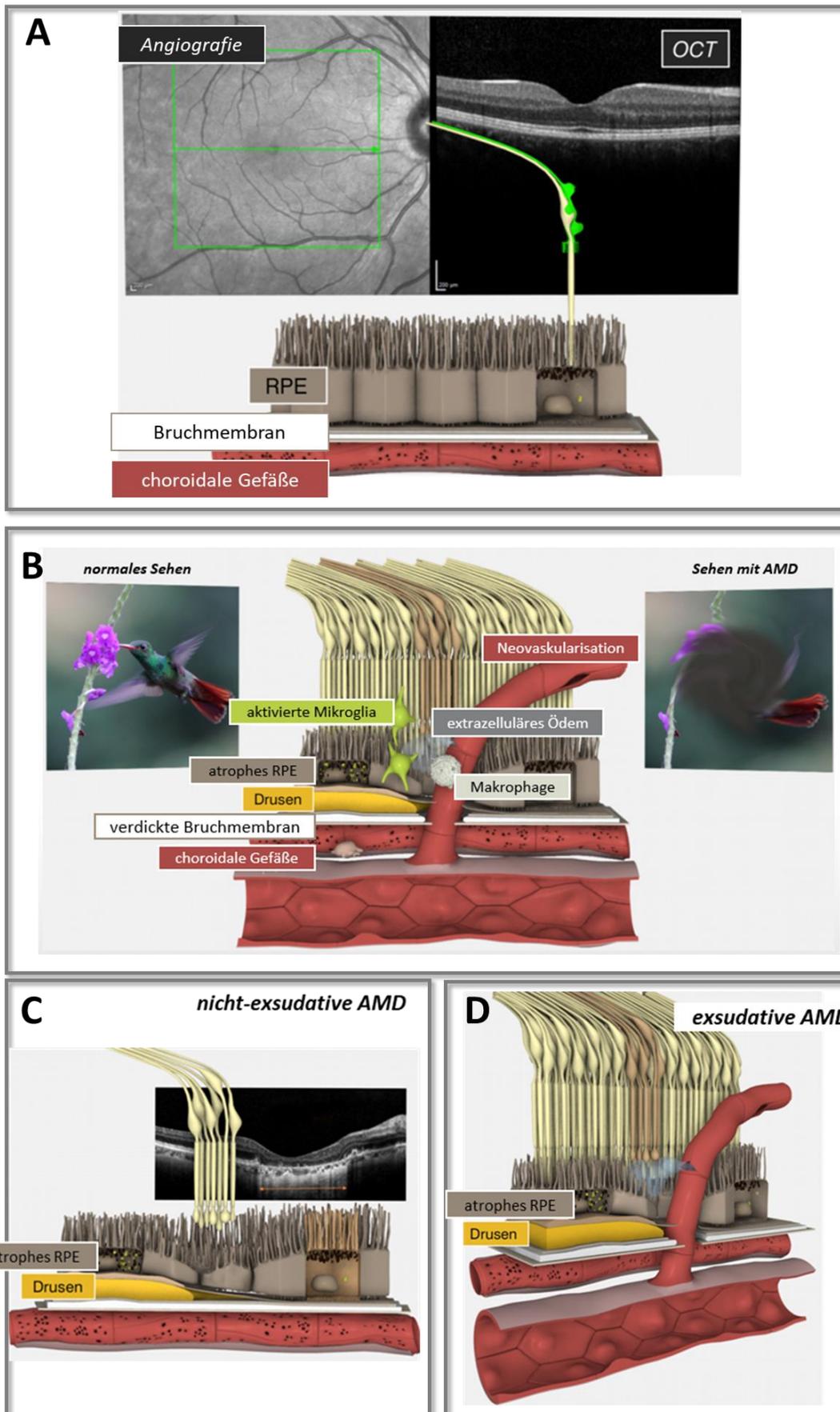


Abbildung 4: Schematische Darstellung struktureller Veränderungen in der Retina bei altersbedingter Makuladegeneration (AMD). A: Angiografie, Optische Kohärenztomografie (OCT) und schematische Darstellung einer

gesunden Retina. **B:** Illustration des Seheindrucks bei Patienten mit AMD mit Zentralskotom und Metamorphopsien. Strukturelle Veränderungen bei AMD mit RPE-Atrophie, Verdickung der Bruchmembran, Drusen, leckenden Neovaskularisationen sowie Rekrutierung von Immunzellen. **C, D:** Schematische Darstellung der retinalen Veränderungen bei nicht-exsudativer (trockener) AMD (**C**) und exsudativer (feuchter) AMD (**D**). Es kommt bei beiden Verlaufsformen zur Ablagerung subretinalen Materials in Form von Drusen und zur Atrophie des retinalen Pigmentepithels. Das Einsprossen pathologischer Gefäße aus der Choroidea in die Netzhaut (choroidale Neovaskularisation, CNV), aus welchen sich sub- und intraretinale Flüssigkeitsdepots speisen, kennzeichnet die exsudative Form der AMD. Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. rer. nat. Antje Grosche.

Ätiologisch geht man von einem Zusammenspiel von genetischen und Umweltfaktoren aus. Risikofaktoren umfassen beispielsweise das Alter (Smith et al., 2001), Zigarettenrauchen (Seddon et al., 1996), (Smith et al., 2001), Übergewicht (Seddon et al., 2003), vorangegangene Katarakt-Operation (Cugati et al., 2006) und kardiovaskuläre Erkrankungen (Chakravarthy et al., 2010), aber auch für eine Vielzahl von Genen ist eine Assoziation mit der Entwicklung einer AMD beschrieben (Lim et al., 2012). Ein erhöhtes Risiko ist auch mit Polymorphismen in den Genen verschiedener Proteine des alternativen Aktivierungsweges des Komplementsystems vergesellschaftet, darunter Faktor I, C3 und C9 (Seddon et al., 2013), aber insbesondere auch Faktor H. Die Y402H-Variante des Faktor H ist etwa bei der Hälfte aller AMD-Patienten zu finden (Haines et al., 2005). Der Austausch von Tyrosin zu Histidin in Aminosäure 402 in der Domäne 7 von FH führt bei diesem Polymorphismus zu reduzierter Erkennung von oxidierten Lipiden wie Malondialdehyd auf der Oberfläche nekrotischer und apoptotischer Zellen, welche ein proinflammatorisches Milieu erzeugen, dem FH nicht mehr entgegenwirken kann (Weismann et al., 2011). Deletionen in den Genen von CFHR1 und CFHR3, die für die Antagonisten Complementfaktor H-related-Proteine 1 und 3 kodieren, scheinen sich hingegen protektiv gegenüber der Entstehung einer AMD auszuwirken (Hughes et al., 2006). Diese Komplementkomponenten konkurrieren mit FH um die Bindung von C3b (Goicoechea de Jorge et al., 2013). Pauly et al. (2019) beschrieben bereits in der gesunden alternden Retina eine Verschiebung der Komplementexpression hin zur vermehrten Komplementaktivatorenproduktion, insbesondere von C1s, C3, Faktor B und Properdin. Auch Mutationen im ABCA4-Gen, das im zweiten Teil dieser Dissertation untersucht wurde, sind in Zusammenhang mit AMD beschrieben (Lim et al., 2012). In der Pathogenese der Erkrankung geht man von Alterungsprozessen im retinalen Pigmentepithel, der Bruchmembran und der Choroidea aus, die sich in der Akkumulation von Lipofuszin im Pigmentepithel und der Bruchmembran, oxidativer Schädigung der Epithelzellen mit Zellverlust und reaktiver Proliferation sowie konsekutiver Degeneration der Retina widerspiegeln (Ding et al., 2009). Choroidale Perfusionsstörungen ziehen VEGF-induzierte Neovaskularisation nach sich (Lim et al., 2012). Für die Entwicklung einer AMD scheint auch das Komplementsystem eine zentrale kausale Rolle zu spielen (Weber et al., 2014). Komplementkomponenten wie C3-Fragmente, CR1 und MCP wurden in Drusen und RPE-Zellen von Patienten mit AMD nachgewiesen (Johnson et al., 2001).

Gängige Therapieoptionen umfassen aktuell insbesondere die intravitreale Applikation von VEGF-Inhibitoren bei Auftreten von Neovaskularisationen mit intra- oder subretinaler Flüssigkeit (Lim et al., 2012). Der Effekt diätetischer Therapien mit Supplementierung von Antioxidantien wird kontrovers diskutiert (Evans & Lawrenson, 2017). Zur Behandlung von geografischer Atrophie gibt es aktuell keine in Europa zugelassene Therapie (Weber et al., 2014). Obwohl die Erkenntnisse über die Pathogenese und Risikofaktoren der Erkrankung weiter zunehmen, sind die therapeutischen Optionen insgesamt sehr begrenzt. Der Zusammenhang zwischen AMD und dem Komplementsystem wurde oben erläutert. Ein Therapieansatz, der überschießende Komplementaktivität moduliert und das Komplementsystem wieder ausbalanciert, erscheint daher sehr vielversprechend. Aus diesem Grund sind im Jahr 2023 der C3-Inhibitor Pegcetacoplan (Syfovre) und der C5-Inhibitor Avacincaptad Pegol (Izervay) als erste Medikamente zur Behandlung der geographischen Atrophie bei AMD von der FDA zugelassen worden (Apellis Pharmaceuticals, 02/2023), (Shakeel et al., 2024). Damit stehen aktuell in den USA zwei intravitreal zu applizierende Therapeutika zur Verfügung, in Europa hingegen aktuell keines (siehe auch 4.3 Andere Retinadegenerationsmodelle mit Angriffspunkt Komplementsystem).

1.3.2 Morbus Stargardt

Morbus Stargardt Typ 1 ist eine meist autosomal-rezessiv vererbte Netzhauterkrankung aus der Gruppe der Makuladystrophien, die häufig bereits im Jugendalter mit unterschiedlich schwer ausgeprägten Visuseinschränkungen und Zentralskotomen einhergeht (Genead et al., 2009). Dabei kommt es typischerweise zu einem Verlust der zentralen Sehschärfe, während das periphere Sehen in der Regel erhalten bleibt (Genead et al., 2009). Funduskopisch finden sich zu Beginn der Erkrankung zentrale Unregelmäßigkeiten in der Pigmentierung, später fortschreitende Atrophien mit gelblich-grauen Flecken, die allmählich in der Makulagegend konfluieren (Stargardt, 1909), (Stargardt, 1913), (Stargardt, 1916). Die letztgenannte Veränderung bezeichnet man als Fundus flavimaculatus (Rudolph et al., 2002). Klassischerweise manifestiert sich die Erkrankung vor dem 20. Lebensjahr. Ursächlich liegt meist eine Mutation im ABCA4-Gen zugrunde (Allikmets et al., 1997). Zur Simulation eines Morbus Stargardt kam daher ein ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout-Mausmodell zum Einsatz (Genauerer zum Mausmodell siehe unter 1.4.2 Die ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Knockoutmaus als Modell einer langsamen Retinadegeneration).

1.4 Mausmodelle für Komplement-assoziierte degenerative Erkrankungen der Retina

1.4.1 Hintergrund des experimentellen Aufbaus des Ischämie-Modells

Um den Effekt dieses neuartigen Therapieansatzes zu untersuchen, kam ein Ischämie-/ Reperfusion-Mausmodell gemäß der High-intraocular-pressure (HIOP)-Methode (Pannicke et al., 2014), (Wagner et al., 2016) als Beispiel für eine akute Form der retinalen Schädigung zum Einsatz. Durch die 60-minütige Unterbrechung der okulären Blutversorgung über eine Steigerung des intraokulären Drucks (Abbildung 5) mit anschließender Reperfusion kommt es zu einer Schädigung der Retina, die in primärer ischämiebedingter Degeneration sowie sekundärer Inflammation mit assoziiertem Zelltod resultiert (Minhas et al., 2016). Durch den reduzierten Blutfluss kommt es in der ischämischen Retina zu einem Zustand der Hypersensitivität gegenüber Sauerstoff und anderen Nährstoffen, was bei Reperfusion schweren oxidativen und inflammatorischen Schaden mit Neurodegeneration auslöst (Hartsock et al., 2016). Während der Ischämie, aber auch während der Reperfusion, entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die die Aufnahme von Glutamat in Gliazellen hemmen, welches extrazellulär neurotoxisch wirkt, sowie Nekrose und Apoptose induzieren können (Bonne et al., 1998). Ebenso ist beschrieben, dass sie durch Freisetzung von VEGF (vascular endothelial growth factor) und VPF (vascular permeability factor) zumindest teilweise zur Neovaskularisation nach Ischämie beitragen (Bonne et al., 1998). Zusätzlich kommt es durch die Ischämie zur Aktivierung von Mikroglia (Renner et al., 2017). Daneben lösen Ischämie und Reperfusion eine ganze Reihe veränderter Proteinexpressionsmuster aus. Im Rahmen dessen findet auch eine abweichende Sekretion von Komplementfaktoren statt, welche bereits für die wichtigsten retinalen Zelltypen genau charakterisiert wurde (Pauly et al., 2019). In dieser Arbeit wurde berichtet, dass es 24 Stunden nach transientscher Ischämie in allen untersuchten Zelltypen zu einer Verschiebung der Komplementexpression hin zu stärkerer Expression von Komplementaktivatoren kam, am deutlichsten in Müllerzellen. Aus diesem Grund erscheint ein Therapieansatz, der in die fehlregulierte Funktion des Komplementsystems eingreift, überaus vielversprechend. Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit altersabhängige Veränderungen der Komplementexpression in der gesunden Retina demonstriert. In der alternden Retina fand sich ebenfalls eine vermehrte Expression von Komplementaktivatoren, insbesondere von C1s, C3, Faktor B und Properdin.

Wie bei Biber et al. (2024) beschrieben, erfolgte direkt im Anschluss an die Ischämieperiode die Applikation einer der drei Varianten eines Transgen-tragenden Adeno-assoziierten Vektors (AAV) über eine intravitreale Injektion in beide Augen jedes Tieres (Abbildung 5), wobei jeweils nur einem Auge die ischämische Schädigung zugefügt wurde, während das andere Auge als gesunde interne Kontrolle diente. Die histologische Analyse der Augen erfolgte 3 und 14 Tage nach der Ischämie/ Injektion (Abbildung 5).

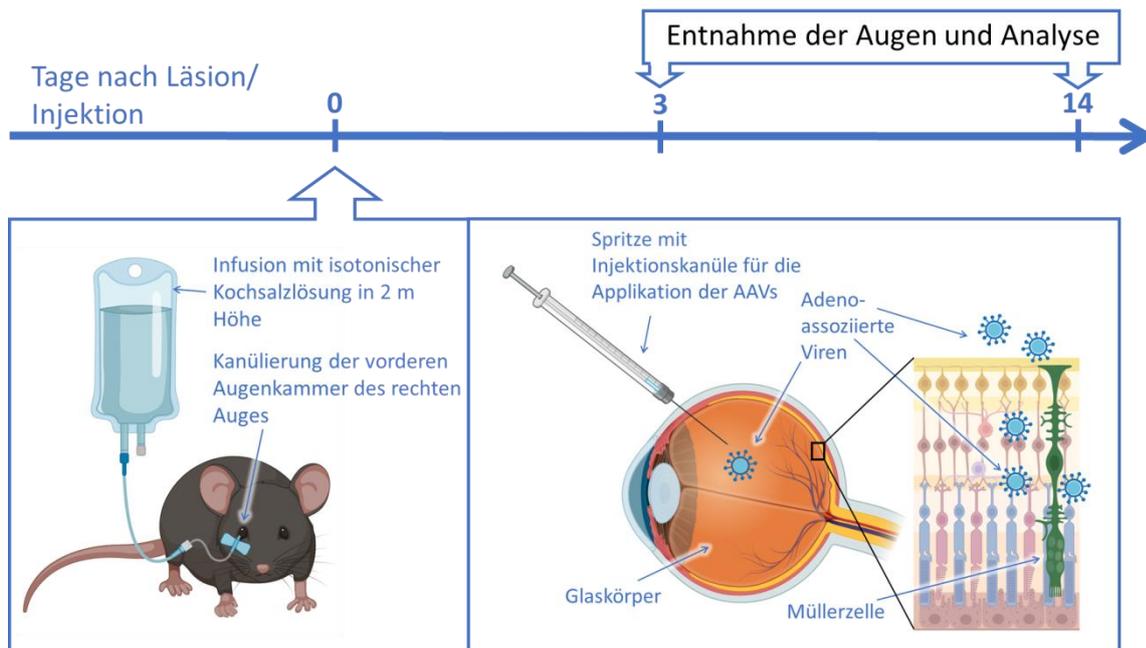


Abbildung 5: Übersicht über das experimentelle Design des Experiments. Abbildungen erstellt mit <https://BioRender.com>.

1.4.2 Die ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Knockoutmaus als Modell einer langsamen Retinadegeneration

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der retinale Phänotyp eines ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Knockouts in der Maus charakterisiert und seine Eignung als mögliches langsam progredientes Krankheitsmodell für die Erprobung der oben beschriebenen Genadditionstherapie untersucht.

Um einen möglichen Phänotyp des Morbus Stargardt zu modellieren, wurden Mäuse mit einem ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout der Linie C57BL/6J analysiert (Abbildung 6) (siehe auch 1.3.2 Morbus Stargardt). ABCA4 (ATP-binding cassette subfamily A member 4) ist ein Retina-spezifisches Transportprotein, das das durch Photoisomerisierung aus 11-cis-Retinal entstehende all-trans-Retinal ATP-abhängig über die Membran von Außensegmenten der Photorezeptoren vom Disk-Lumen in das Zytoplasma transportiert (Abbildung 6). Hier wird all-trans-Retinal mithilfe der Retinol-Dehydrogenase 8 (RDH8) zu all-trans-Retinol reduziert (Kiser et al., 2014). RDH8 katalysiert damit den ersten Schritt in der Regeneration von 11-cis-Retinal im visuellen Zyklus. Somit tragen beide Proteine des verwendeten Knockoutmodells dazu bei, eine Akkumulation von all-trans-Retinal und toxischem Lipofuszin aus Bisretinoiden zu verhindern (Kiser et al., 2014). Aus diesem Grund kam in der vorliegenden Arbeit ein ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout-Mausmodell zum Einsatz, um einen Morbus Stargardt zu simulieren (siehe auch 1.4.2 Die ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Knockoutmaus als Modell einer langsamen Retinadegeneration). Ein Charakteristikum des Morbus Stargardt ist die Akkumulation von Bisretinoiden in Form von autofluoreszentem Lipofuszin im retinalen Pigmentepithel (RPE), was zu einem messbaren Anstieg der Autofluoreszenz bei Stargardt-Patienten führt (Burke et al., 2014). Im ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Mausmodell ist aufgrund der eingeschränkten Regeneration von all-trans-Retinal, welches selbst zytotoxisch ist, und der daraus resultieren-

den Bildung von fluoreszierenden Retinalprodukten wie Pyridinium-Bisretinoid (A2E) und Retinaldehyd-Dimer (RALdi) (Kiser et al., 2014) eine ähnliche Lipofuszin-Akkumulation mit konsekutiver Zunahme der RPE-Autofluoreszenz zu erwarten (Abbildung 6). Frühere Arbeiten konnten Akkumulationen von Bisretinoid-Fluorophoren im RPE von pigmentierten und Albino-ABCA4^{-/-}-Mäusen zeigen (Charbel Issa et al., 2013), (Jabri et al., 2020). Maeda et al. (2008) berichteten bereits über messbar erhöhte A2E- und RALdi-Werten in den auch hier verwendeten Doppel-Knockout-Mäusen (Maeda et al., 2008). Auch die Aktivierung des Komplementsystems ist im Mausmodell für diese Erkrankung beschrieben (Radu et al., 2011), (Jabri et al., 2020).

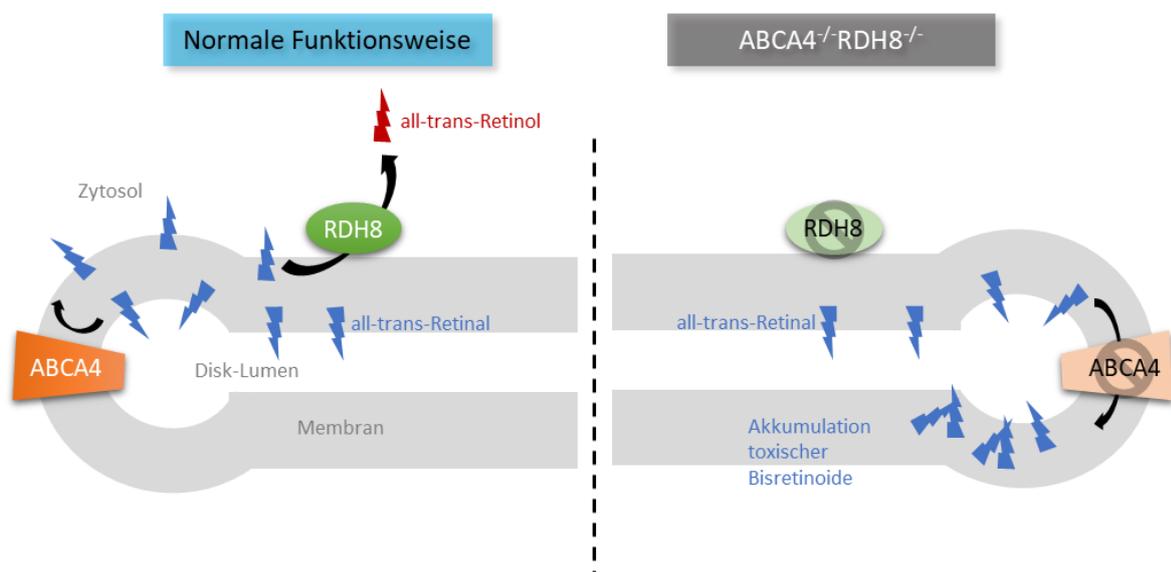


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Pathomechanismus im ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout (rechts) im Vergleich zum normalen visuellen Zyklus in Photorezeptoraußensegmenten (links). Die physiologische Funktion (links) von ABCA4 besteht im Transport von all-trans-Retinal-Addukten über die Disk-Membran auf die zytosolische Seite, wo all-trans-Retinal (blaue Symbole) dann von Retinol-Dehydrogenasen wie RDH8 zu all-trans-Retinol (rote Symbole) reduziert wird. Von hier aus wird es zum RPE weitertransportiert. Im ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Knockout-Modell (rechts) fallen diese Funktionen aus, sodass es zur Bildung und Akkumulation toxischer direkter Produkte wie A2E und RALdi kommt. Adaptiert nach Kiser et al. (2014).

Innerhalb der verwendeten Mauslinie ist ein Polymorphismus im RPE65-Gen beschrieben, bei dem es zu einem Einzelbasenaustausch in Codon 450 kommt. Dieser bedingt den Einbau der Aminosäure Methionin anstelle von Leucin an dieser Stelle im Protein, weshalb diese Variante als Leu450Met bezeichnet wird (Danciger et al., 2000), (Kim et al., 2004). RPE65 ist ein weiteres Protein des visuellen Zyklus, welches in der Regeneration von Rhodopsin eine entscheidende Rolle einnimmt und im retinalen Pigmentepithel verortet ist (Kim et al., 2004). Die Entstehung von Bisretinoiden und Lipofuszin ist insbesondere von einem funktionierenden visuellen Zyklus und einer ordnungsgemäßen Regeneration des Chromophors

abhängig (Kim et al., 2004). So zeigen RPE65^{-/-} Mäuse kaum Lipofuszinablagerungen im RPE im Rahmen des Alterungsprozesses (Katz & Redmond, 2001). Die Leu450Met-Variante scheint eine verlangsamte Kinetik des Enzyms zu bedingen und somit mit geringerer Ablagerung der Bisretinoide im RPE (Kim et al., 2004) und einer höheren Toleranzschwelle gegenüber Lichtschaden (Wenzel et al., 2001) einherzugehen, indem sie die Photorezeptoren vor übermäßiger Strapazierung durch ständige Phototransduktion schützt (Danciger et al., 2000). Als Versuchstiere wurden daher lediglich Mäuse mit der (originalen) Leucin-Variante verwendet, um einen möglichst großen Effekt des Degenerationsmodells hervorzurufen.

Da für Mäuse mit einem alleinigen RDH8^{-/-}-Single-Knockout keine strukturellen Unterschiede zum Wildtypen beschrieben werden konnten (Maeda et al., 2007), wurden Mäuse dieses Genotyps als Referenz zugrunde gelegt.

Die Retinae von Tieren mit RDH8^{-/-}-Single-Knockout - oder ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout wurden jeweils nach 4 oder nach 9 Monaten untersucht, wobei die 9-Monats-Tiere zusätzlich unterschiedlich starken Lichtbedingungen ausgesetzt waren.

Da der ABCA4^{-/-}-Knockout ein verbreitetes Modell für insbesondere frühe Phasen des Morbus Stargardt ist, wurde der Phänotyp für pigmentierte und Albinomäuse bereits in diversen Publikationen charakterisiert. Besonderen Einfluss auf die vorliegende Arbeit hatten drei Arbeiten der Arbeitsgruppe um Dr. Maeda, die als einzige degenerative Veränderungen im Rahmen retinaler Integrität ohne Applikation von akutem Lichtschaden im ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout beschrieben (Maeda et al., 2008), (A. Maeda et al., 2009), (T. Maeda et al., 2009). Die Autoren berichteten von schwerwiegender regionaler Degeneration bereits nach 4-6 Wochen, die sich nach 3 Monaten in Form von reduzierter Photorezeptor-Schichtdicke und -anzahl manifestierte (Maeda et al., 2008). Nach 5 Monaten seien lediglich 4-6 Reihen unorganisierter Photorezeptoren mehr nachweisbar gewesen, nach 12 Monaten konnten gar keine Zellen mehr in dieser Retinaschicht gesehen werden (A. Maeda et al., 2009). Aufgrund des beschriebenen Degenerationsumfangs erschien uns dieses Modell vielversprechend, um auf Grundlage eines ausgeprägten Phänotyps später einen Therapieeffekt untersuchen zu können. ABCA4-Mutationen verursachen zudem nicht nur Morbus Stargardt, sondern sind auch in Zusammenhang mit AMD, Zapfen-Stäbchen-Dystrophie (Cone-rod-dystrophy, CRD) und autosomal rezessiver Retinopathia pigmentosa dokumentiert (Cremers et al., 1998). Aus diesen Gründen soll das untersuchte Mausmodell die Möglichkeit bieten, zu einem späteren Zeitpunkt die miniFH-Genadditionstherapie in einem Umfeld retinaler Degeneration zu untersuchen, wie sie im Rahmen verschiedener Retinadystrophien vorkommt.

1.5 Gentherapie

1.5.1 Grundsätze der Gentherapie

Als Gentherapie bezeichnet man das Hinzufügen, Entfernen oder Verändern von genetischer Information (Kirschner & Cathomen, 2020). Während die Korrektur von Gendefekten in Keimbahnzellen (Keimbahntherapie) in Deutschland verboten ist, hat die Zahl erfolgreicher und zugelassener Therapeutika der somatischen Gentherapie kontinuierlich zugenommen (Kirschner & Cathomen, 2020). Die erste durch die EMA zugelassene Gentherapie richtete sich 2012 an Patienten mit familiärer Lipoproteinlipasedefizienz (Alipogen tiparvovec, Glybera; Zulassung 2017 ausgelaufen) (Paul Ehrlich Institut, 2025), (European Medicines Agency, 2017). Es folgten die Zulassungen von Therapien zur Behandlung von Melanomen 2015 (Talinogen laherparepvec, Imlygic) (European Medicines Agency, 11/2022a) und schweren Immundefekten durch Adenosindesaminasemangel (ADA-SCID) (Strimvelis) 2016 (European Medicines Agency, 07/2022), (Paul Ehrlich Institut, 2025). Eines der neuesten Gentherapeutika, Etranacogene dezaparvovec (Hemgenix, zugelassen 2023), wird zur Behandlung der Hämophilie B eingesetzt (Paul Ehrlich Institut, 2025), (European Medicines Agency, 02/2023). Um Nukleinsäuren in die Zielzellen einzubringen (Genaddition), kann zwischen Ex-vivo- und In-vivo-Therapie unterschieden werden. Bei der Ex-vivo-Gentherapie werden die Zielzellen aus dem Körper isoliert, um dann mit einem meist lentiviralen Vektor genetisch verändert zu werden, welcher sich in das Wirtsgenom integriert. Somit wird das therapeutische Gen nach Verabreichung an den Patienten an die Tochterzellen weitergegeben (Kirschner & Cathomen, 2020). Bei der In-vivo-Gentherapie hingegen werden Virusvektoren, die für das therapeutische Gen kodieren – hier meist abgeleitet von Adeno-assoziierten Viren (AAV) -, direkt in den Körper des Patienten appliziert, wo sie sich nicht ins Wirtsgenom integrieren oder replizieren, sondern vor Ort eine funktionsfähige Kopie der fehlenden oder defekten Erbinformation in die Zielzellen einschleusen (Kirschner & Cathomen, 2020). Der Einsatz dieser Therapieform eignet sich daher insbesondere in postmitotischem Gewebe wie beispielsweise der Retina (Kirschner & Cathomen, 2020). Eine solche In-vivo-Genadditionstherapie wurde auch in dieser Arbeit untersucht. Neben der Genaddition sind auch Techniken möglich, die nicht Nukleinsäuren in den Patienten einbringen, sondern darauf abzielen, eine Mutation direkt im Erbgut zu korrigieren. Man bezeichnet sie als Genom-Editierung (Kirschner & Cathomen, 2020). Diese Ansätze basieren auf der Entdeckung des CRISPR/Cas9-Systems. Neuere Systeme nutzen auch Zink-Finger-Nukleasen (ZFNs) und Transkriptionsaktivator-ähnliche Effektor-Nukleasen (TALENs) (Kirschner & Cathomen, 2020). Therapeutika der Genom-Editierung werden aktuell klinisch erprobt (Kirschner & Cathomen, 2020). Im Februar 2024 erteilte die EMA die bedingte Zulassung für das Arzneimittel Exagamglogene autotemcel (Casgevy) für Patienten mit Beta-Thalassämie und Sichelzellerkrankheit (European Medicines Agency, 02/2024). Es handelt sich um das erste Arzneimittel, bei dessen Herstellung die Technologie

der Geneditierung mithilfe der Genschere CRISPR/Cas verwendet wird (Paul-Ehrlich-Institut, 2023).

1.5.2 Die erste Gentherapie in der Augenheilkunde

2017 erteilte die US-amerikanische Behörde für Lebensmittel- und Arzneimittelsicherheit (Food and Drug Administration, FDA) die Zulassung für die retinale Gentherapie mit dem Wirkstoff Voretigen Neparvovec (Luxturna®) von Novartis, durch welche erstmals hereditäre Netzhauterkrankungen mit biallelischer Mutation im RPE65-Gen kausal behandelt werden konnten (Stingl et al., 2022). Die Zulassung durch die Europäische Arzneimittelagentur (European Medicines Agency, EMA) folgte 2018 (Stingl et al., 2022). Die Therapie richtet sich an pädiatrische und erwachsene Patienten mit Sehverlust aufgrund einer RPE65-Mutation, die über ausreichend lebensfähige Netzhautzellen verfügen (Gerhardt et al., 2022). Das RPE65-Gen codiert für eine Isomerhydrolase, die eine zentrale Rolle in der Regeneration von all-trans-Retinal zu 11-cis-Retinal durch das retinale Pigmentepithel einnimmt (Kiser et al., 2014), (Redmond et al., 1998). Aus einer erblich bedingten Fehlfunktion des Enzyms können verschiedene Krankheitsverläufe resultieren, insbesondere die Lebersche kongenitale Amaurose, die Early-Onset Severe Retinal Dystrophy (EOSRD) und Retinopathia pigmentosa, die alle mit ausgeprägter Nachtblindheit und progredienter irreversibler Netzhautdegeneration einhergehen (Gerhardt et al., 2022). Das Symptom der Nachtblindheit erklärt sich durch die Abhängigkeit der Stäbchen von der Regeneration des Chromophors im RPE, während Zapfenzellen auch auf 11-cis-Retinal aus anderen Quellen wie Müllerzellen zurückgreifen können (Long et al., 1986), (Das et al., 1992), (Muniz et al., 2007), was sich in ihrer besser erhaltenen Funktion in frühen Krankheitsstadien zeigt (Gerhardt et al., 2022). 16% der Patienten mit Leberscher kongenitaler Amaurose und 2% der Patienten mit autosomal rezessiver Retinopathia pigmentosa weisen eine biallelische RPE65-Mutation auf (Morimura et al., 1998). Der Wirkstoff besteht aus dem Kapsid eines adeno-assoziierten viralen Vektors vom Serotyp 2 (AAV2), der die kodierende Sequenz des humanen RPE65-Gens enthält (Gerhardt et al., 2022), (European Medicines Agency, 01/2019). Er wird im Rahmen einer Pars-plana-Vitrektomie per subretinaler Injektion einmalig appliziert, wodurch RPE-Zellen dauerhaft in der Lage sind, 11-cis-Retinal zu regenerieren (Gerhardt et al., 2022), (Herrmann, 2020). Die Effektivität dieser Therapie hinsichtlich Verbesserung beziehungsweise Erhalt retinaler Funktion sowie Sicherheitsaspekte konnten in unterschiedlichen Studien demonstriert werden (Maguire et al., 2008), (Russell et al., 2017), (Maguire et al., 2019), (Stingl et al., 2022), (Sengillo et al., 2022), (Bainbridge et al., 2015). Aktuelle Studien weisen allerdings auf das Auftreten großengroßprogreredienter chorioretinaler Atrophien nach Injektion von Voretigen Neparvovec hin (Gange et al., 2022), (Reichel et al., 2023).

Im August 2023 kündigte das deutsche Startup ViGeneron an, dass der Antrag auf klinische Prüfung für ihr Arzneimittel VG901 von der EMA genehmigt worden sei (ViGeneron GmbH,

2023). Es handelt sich um eine intravitreal zu verabreichende Gentherapie auf Basis des firmeneigenen adeno-assoziierten Vektors vgAAV für Patienten mit biallelischer CNGA1-Mutation bei Retinopathia pigmentosa (ViGeneron GmbH, 2023). Im Januar 2025 hat die FDA für VG901 den Status einer seltenen pädiatrischen Erkrankung (Rare Pediatric Disease Designation) erteilt, wodurch eine beschleunigte FDA-Prüfung im Rahmen eines Priority Review Vouchers nach der Marktzulassung möglich wäre. Ebenso wurde die Dosissteigerung in der aktuell laufenden klinischen Phase-1b-Studie genehmigt (ViGeneron GmbH, 2025).

1.6 Fragestellung und Zielsetzung

Sekundäre Inflammation ist ein Charakteristikum vieler verschiedener degenerativer Erkrankungen der Retina wie beispielsweise altersbedingter Makuladegeneration (AMD), diabetischer Retinopathie (Joussen et al., 2004), (Ghaseminejad et al., 2020) oder Retinopathia pigmentosa (Yoshida et al., 2013), auch wenn sie durch eine Vielzahl unterschiedlicher Ursachen ausgelöst werden. Diese Inflammationsreaktion umfasst unter anderem die Aktivierung des Komplementsystems als Teil des angeborenen, unspezifischen Immunsystems, was weitere Schädigung von retinalem Gewebe verursachen kann. Komplementaktivierung wurde nicht nur im Rahmen von AMD und Morbus Stargardt (Radu et al., 2011), (Jabri et al., 2020) nahegelegt, sondern auch in Zusammenhang mit Retinopathia pigmentosa (Sudharsan et al., 2017) und diabetischer Retinopathie (Zhang et al., 2002) demonstriert.

Ziel dieses Projektes war es daher

- (i) zu untersuchen, ob die Überexpression der gekürzten, funktionell optimierten Version des Komplementfaktors H (miniFH) als Komplementinhibitor in der akuten, Ischämie-bedingten Retinadegeneration im *in-vivo*-Mausmodell überschießende Komplementaktivierung eindämmen und damit Neurodegeneration reduzieren kann. Das therapeutische Target sollte mithilfe eines Adeno-assoziierten viralen (AAV) Vektors über eine intravitreale Injektion in das Auge eingebracht werden, direkt nachdem dem Auge eine ischämische Läsion über eine vorübergehende intraokuläre Druckerhöhung und anschließende Reperfusion erfahren hatte. Über ein müllerzellspezifisches Kapsid und einen GFAP-Promotor sollten ausschließlich Müllerzellen zur exogenen Proteinproduktion angeregt werden.
- (ii) das Wirkprofil zweier verschiedener Versionen des gekürzten Komplementfaktors H, welche sich in der Zusammensetzung ihrer Domänen unterschieden, im genannten Versuchsansatz zu vergleichen.
- (iii) ein Mausmodell für genetisch bedingte retinale Degeneration hinsichtlich seiner Eignung als Modell für den Morbus Stargardt zu untersuchen und zu evaluieren, inwiefern es sich als chronisches Degenerationsmodell zur Testung der beschrie-

benen Genadditionstherapie eignet. Hierfür wurden Mäuse mit ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout im Alter von 4 und 9 Monaten mit RDH8^{-/-}-Single-Knockout-Mäusen, bei denen keine strukturelle Degeneration zu erwarten war, hinsichtlich Autofluoreszenz des retinalen Pigmentepithels und Morphometrie verglichen. Über die Auszählung und Ausmessung von Mikroglia in retinalen Wholemount-Präparaten konnten Aussagen über den Aktivierungszustand der retinalen Mikroglia getroffen werden.

Die histologischen Untersuchungen zum *in vivo* Therapieeffekt der miniFH-Varianten sind zentraler Bestandteil der folgenden Publikation:

Biber, J., Jabri, Y., **Glänzer, S.** *et al.* Gliosis-dependent expression of complement factor H truncated variants attenuates retinal neurodegeneration following ischemic injury. *J Neuroinflammation* **21**, 56 (2024). <https://doi.org/10.1186/s12974-024-03045-3>

Ein weiteres Manuskript mit mir als Erstautorin, das die Ergebnisse der Untersuchung der ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout-Mauslinie zusammenfasst, ist in Vorbereitung.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Versuchstiere

Alle Tiere wurden unter regulärem 12-Stunden-Tag/Nacht-Rhythmus mit freiem Zugang zu Wasser und Futter in klimatisierten, pathogen-freien Räumlichkeiten gehalten. Alle Versuche wurden unter Einhaltung des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Für das Ischämieprojekt wurden erwachsene (3-8 Monate alte) C57BL6/J Mäuse verwendet.

Experimente an den Knockout-Mäusen mit den Genotypen RDH8^{-/-} und ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-} (Jackson Laboratories, Stammmnummer #030503) wurden im Alter von 16 Wochen und 9 Monaten durchgeführt. Ein Teil der Tiere wurde zwischen dem fünften und dem neunten Lebensmonat höherer Lichtexposition ausgesetzt, indem ihre Käfige die oberste Position im Mausstall erhielten, während ein anderer Teil der Mäuse tiefer und damit unter geringerer Lichtexposition gehalten wurde. Bis einschließlich dem vierten Lebensmonat befanden sich alle Mäuse unter Einwirkung der niedrigeren Lichtexposition.

2.1.2 Stocklösungen

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Stocklösungen

10x PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung), pH 7,4 2,5 l	36,83 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 5 g KH ₂ PO ₄ , 200 g NaCl, 5 g KCl gelöst in Aqua dest.
30% Sucroselösung in 0,1 M Phosphatpuffer 500 ml	5,96 g Na ₂ HPO ₄ 0,803 g NaH ₂ PO ₄ 150 g Sucrose gelöst in Aqua dest.
50x TAE (TRIS-Acetat-EDTA)-Puffer 1 l	242 g Tris, 57,1 ml Essigsäure, 37,2 g Na ₂ EDTA x 2H ₂ O gelöst in Aqua dest.
10 mM TRIS-HCL, pH 8,5 1 l	1,211 g TRISbase gelöst in Aqua dest. mit 1 M HCl auf pH 8,5 eingestellt

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Produkt	Hersteller	Bestellnummer
Agarose	VWR	443666A
Aqua-Poly/Mount	Polysciences Europe	18606-20
Bovines Serumalbumin	Carl Roth	8076.4
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck	1064461000

EMPROVE®		
DAPI	Sigma-Aldrich	D9564
D(+)-Glucose - Monohydrat	AppliChem	AP-1431401211
D(+)-Saccharose, ≥99,5 %, RNAse/DNAse-frei	Carl Roth	9097.1
Eselserum (normal donkey serum)	Sigma-Aldrich	S30-100ML
Essigsäure	Sigma-Aldrich	A6283-1L
Ethanol > 99,8%	Carl Roth	0911.4
Isopropanol	Carl Roth	6752.5
KCl	AppliChem GmbH	A2939
KH ₂ PO ₄	Roth	3904.2
NaCl	Roth	0601.1
Na ₂ EDTA	Sigma-Aldrich	E1644-250G
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Roth	4984.1
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Merck	1063460500
Neg-50-Gefrierschnittmedium	Epredia™	6502
SYBR™ Safe DNA Gel Stain	Invitrogen™	S33102
Tris	Roth	3170.1
Triton™ X-100	Roth	3051.3
Tween® 80	Sigma-Aldrich	P4780-100ML
Ziegenserum (normal goat serum)	Sigma-Aldrich	S26-100ML

2.1.4 Gebrauchsfertige Kits

Tabelle 3: Eingesetztes gebrauchsfertiges Kit

Produkt	Hersteller	Bestellnummer
In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany	12156792910

2.1.5 Enzyme und Proteine

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Enzyme und Proteine

Produkt	Hersteller	Bestellnummer
100 bp DNA-Leiter	Invitrogen	15628050
dNTP-Gemisch 10 mM	Thermo Scientific	R0192
DreamTaq DNA Polymerase	Thermo Scientific	EP0702
DreamTaq Green PCR Master Mix	Thermo Scientific	K1081
Gel Loading Dye, Purple (6X), no SDS	New England Biolabs	B7025SVIAL

2.1.6 Antikörper

Primäre Antikörper:

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten primären Antikörper

Antikörper	Wirt (englisch)	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
α -C3d	goat	2 μ g/ml	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)	AF2655
α -Calretinin	goat	1:500	Swant (Burgdorf, Switzerland)	CG1
α -CD68	rat	1:500	AbDSerotec	MCA1957GA
α -CFH	mouse	1:1200	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)	sc-166613
α -GFAP	mouse	1:500	Sigma Aldrich/Merck (Darmstadt, Germany)	G3893
α -GFP	goat	1:200	Rockland Immunochemicals (Limerick, PA, USA)	600 101 215
α -Glutaminsynthetase	mouse	1:500	Millipore	MAB302
α -IBA-1	rabbit	1:500	Wako Chemicals (Neuss, Germany)	019-19741

Sekundäre Antikörper:

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten sekundären Antikörper

Antikörper	Wirt (englisch)	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
Alexa Fluor 647 anti-mouse	donkey	1:500	Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	A31571
Alexa Fluor 647 anti-mouse-IgG1	goat	1:500	Invitrogen (Massachusetts, USA)	A21240
Alexa Fluor 647 anti-goat	donkey	1:500	Dianova (Hamburg, Germany)	705-605-003
Alexa Fluor 488 anti-rat	donkey	1:500	Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	A21208
Cy2 anti-goat	donkey	1:500	Dianova (Hamburg, Germany)	705-225-147
Cy3 anti-rabbit	goat	1:500	Dianova (Hamburg, Germany)	111-165-144
Cy3 anti-goat	donkey	1:500	Dianova (Hamburg, Germany)	705-165-147
Cy5 anti-rabbit	donkey	1:500	Dianova (Hamburg, Germany)	711-175-152

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller	Artikelnummer
Deckgläser	Carl Roth	1871
Hypotex Nitril Comfort puderfrei Handschuhe	PPS-Med	20361
PARAFILM® M	Merck	P7793
Pasteurpipetten aus Glas	neoLab	4-4035
Pasteurpipetten graduiert 3 ml, Unsteril	ROTH SELECTION	1CAY.1
PCR 8er-Streifen 0,2 ml	neoLab	7-5209
Pipettenspitzen TipOne®	starlab	S1111-3210, S1111-0810,

		S1111-6810, S1110-3710
Research® plus Pipetten	Eppendorf	3123000012, 3123000020, 3123000098, 3123000047, 3123000055, 3123000063
Schraubröhre 15 ml	Sarstedt	62.554.502
Schraubröhre 50 ml	Sarstedt	62.547.004
Serologische Pipetten 10 ml, 25 ml	Sarstedt	86.1688.010, 86.1685.020
Standard Reagiergefäß 0,5 ml	Sarstedt	72.704
Standard Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt	72.706.200
Standard Reagiergefäß 2 ml	Sarstedt	72.695.500
Standard Reagiergefäß 5 ml	Sarstedt	72.701.500
SuperFrost Plus™ Adhäsionsobjektträger	Epredia™	10149870
Tissue-Tek ® Cryomold®- Einbettschälchen (15x15x5 mm)	Sakura Finetek	4566
Zellkulturplatte, 24 Well	Sarstedt	83.3922
Zellkulturplatte, 48 Well	Sarstedt	83.3923.300

2.1.8 Geräte

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Geräte

Produkt	Hersteller	Bestellnummer
Accu-jet® pro Pipettierhilfe	Brand	BR26320
Agarose- Gelelektrophoresekammer	Biozym	615258
ChemiDoc XRS+ System	Bio-Rad	1708265
CryoStar™ NX50 Kryostat	Epredia™	
Heiz- und Magnetrührer MR Hei-Standard	Heidolph	
EV1450 Stromversorgungs- gerät	Consort	
PCR Thermocycler Master- cycler® nexus X2	Eppendorf	6337000019

WTW™ inoLab™ 7110 Labor-pH-Messgerät	WTW™ 1AA110	11721435
Präzisionswaage 440-21N	Kern	440-21N
Rollmixer	Premiere	
Sigma 1-14K Tischzentrifuge	Sigma	
Stereomikroskop SZ51	Olympus	
ThermoMixer® C	Eppendorf	5382000015
Tischzentrifuge Centrifuge 5810 R	Eppendorf	5811000010
Titramax 100 Schüttler	Heidolph	544-11200-00
VisiScope CSU-X1 Konfokalmikroskop mit hochauflösender sCMOS-Kamera	Mikroskop: VisiScope; Kamera: Visitron Systems	
Vortex-Genie® 2 Reagenzglasschüttler	Scientific Industries	P505.1

2.1.9 Software

Tabelle 9: Übersicht über die verwendete Software

Name	Hersteller
CorelDRAW®	Corel Corporation
GelAnalyzer	von Istvan Lazar
GraphPad PRISM 8	GraphPad Software
Fiji (Schindelin, et al., 2012)	Open-Source-Software
Image Lab™	Bio-Rad Laboratories
Microsoft Office	Microsoft

2.2 Methoden

2.2.1 Induktion von Ischämie

Für dieses Ischämie-/ Reperusionsmodell fand die High intraocular pressure (HIOP) Methode gemäß Pannicke et al (2014) Anwendung. Hierbei wurde eine 30-Gauge-Infusionsnadel in die vordere Augenkammer eines Auges von 3-8 Monate alten Mäusen der Linie C57BL/6 eingeführt. Über eine an die Nadel angeschlossene Infusion mit isotonischer Salzlösung konnte der Augeninnendruck durch Anheben der Salzlösung auf eine Höhe von 2 Meter über das Tier für 60 Minuten auf etwa 160 mmHg gesteigert werden, sodass er den systolischen Blutdruck (maximal 130 mmHg) der okulären Gefäße überstieg und die Blutversorgung des

Auges vorübergehend sistierte. Das andere Auge jedes Tieres blieb unangetastet, um als interne Kontrolle zu fungieren. Der genaue Vorgang ist bei Biber et al. (2024) beschrieben, da die Durchführung dieser Methode nicht Teil der Dissertation war. Die Analyse der Tiere erfolgte 3 und 14 Tage nach der Läsion.

2.2.2 Vireninjektion

Der genaue Vorgang der Virusproduktion und -injektion ist bei Biber et al. (2024) nachzulesen, da diese Methoden nicht Teil der Dissertation waren. Zum Verständnis sei das Wichtigste in Kürze zusammengefasst: Zunächst wurden HEK 293T-Zellen mit einem Replikationsstrukturen enthaltenden Helferplasmid, dem ShH10 RepCap-Plasmid und dem Transferplasmid, das das Transgen, die gfABC1D-Version des GFAP-Promotors und den über eine IRES-Sequenz verbundenen GFP-Reporter enthielt, transfiziert. Aus dem Überstand wurden die AAVs gewonnen und über mehrere Schritte aufgereinigt und verdünnt. Die Injektionslösung enthielt 10^{10} - AAV-Genkopien pro μl und wurde in einer Menge von 1 μl in den Glaskörper beider Augen injiziert.

2.2.3 DNA-Extraktion und Genotypisierung

2.2.3.1 DNA-Extraktion

Ohrstanzen der zu typisierenden Mäuse, bereitgestellt durch die Animal Facility, wurden in je 500 μl eines Lysepuffers der Zusammensetzung gemäß der untenstehenden Tabelle bei 55°C eine Stunde bei 700 Umdrehungen/min im Thermoschüttler lysiert. Nach 10-minütigem Zentrifugieren bei 15000 Umdrehungen/min wurde die DNA durch Zugabe von 500 μl Isopropanol aus dem Überstand ausgefällt und durch erneutes 10-minütiges Zentrifugieren und anschließendes Trocknen bei Raumluft isoliert. Anschließend wurde die DNA in 30 μl 10 mM Tris-HCL (pH 8,5) 30 min lang bei 55°C im Thermoschüttler resuspendiert und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert.

Zusammensetzung des Lysepuffers je Biopsie:

Tabelle 10: Zusammensetzung des Lysepuffers zur DNA-Extraktion

1 M Tris HCL Puffer pH 8,5	50 μl
0,5 M EDTA	5 μl
10% SDS	10 μl
1 M NaCl	100 μl
H2O bidest.	330 μl
10 mg/ml Proteinase K	5 μl

2.2.3.2 Genotypisierung der ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Mäuse

Zur Amplifikation der gesuchten Gene wurden die DNA-Extrakte nach Zugabe der untenstehenden PCR-Mix-Komponenten einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit folgenden Schritten unterzogen:

PCR-Mix-Komponenten:

Tabelle 11: PCR-Mix-Komponenten

H ₂ O	16,7 µl
Dreamtaq-Puffer	2,5 µl
Primer 1 WT for	1,0 µl
Primer 2 WT rev	1,0 µl
Primer 3 mut. Rev	1,0 µl
dNTPs 10 mM	0,5 µl
Taq-Polymerase: Dreamtaq	0,3 µl
DNA-Extrakt	2,0 µl

PCR-Schritte:

Tabelle 12: PCR-Schritte zur Genotypisierung für das ABCA4-Gen

ABCA4:

Erhitzungsphase	95°C	3 min	} 35 Zyklen
Denaturierung	95°C	30 s	
Primerhybridisierung	60°C	30 s	
Elongation	72°C	30 s	
	72°C	5 min	

Tabelle 13: PCR-Schritte zur Genotypisierung für das RDH8-Gen

RDH8:

Erhitzungsphase	94°C	2 min	} 10 Zyklen
Denaturierung	95°C	20 s	
Primerhybridisierung	65°C	15 s	
Elongation	68°C	10 s	
Denaturierung	95°C	15 s	} 28 Zyklen
Primerhybridisierung	60°C	15 s	
Elongation	72°C	15 s	
	72°C	2 min	

Es wurden die untenstehenden Primer zur Amplifikation der Gene ABCA4 und RDH8 verwendet:

ABCA4 (The Jackson Laboratory, 2023b):

Tabelle 14: Übersicht über die verwendeten Primer für die PCR zur ABCA4-Genotypisierung

Primer-Sequenz Common	5' AAG AGA AGC AAT CAA ATC AGG A 3'
Primer-Sequenz Wild type Reverse	5' GAA GAT GCT CTG GAT ATC TCT GC 3'
Primer-Sequenz Mutant Reverse	5' TGA GTA GGT GTC ATT CTA TTC TGG 3'
Zugangsnummer	NM_007378.1

RDH8 (The Jackson Laboratory, 2023a):

Tabelle 15: Übersicht über die verwendeten Primer für die PCR zur RDH8-Genotypisierung

Primer-Sequenz Wild type Forward	5' CAC AAC ATC CCA GCA CTC TG 3'
Primer-Sequenz Common	5' ACT CCG CCT TGG AAA CCT G 3'
Primer-Sequenz Mutant Forward	5' AGA CTG CCT TGG GAA AAG CG 3'
Zugangsnummer	NM_001030290.2

Anschließend wurden die DNA-Fragmente durch Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Hierfür wurde ein zweiprozentiges (w/v) Agarosegel hergestellt, indem Agarose in 1x TAE Puffer aufgekocht wurde und das Gemisch daraufhin nach Zusatz von SYBR™ Safe DNA Gel-Färbemittel bei Raumtemperatur zu einem Gel aushärtete. In dieses wurden durch Einsatz eines Kammes feine Taschen eingepreßt, in welche die PCR-Produkte eingefüllt werden konnten.

Die PCR-Produkte waren zuvor mit einem interkalierenden Farbstoff versetzt worden und wurden unter einer Spannung von 130 V entsprechend ihrer Länge in der Agarosematrix aufgetrennt. Durch Zugabe einer 100 bp DNA-Leiter ist eine Abschätzung der Fragmentgröße möglich.

Die folgenden Genotypen waren möglich:

ABCA4 (The Jackson Laboratory, 2023b):

Wildtyp Tiere zeigten eine einzige Bande bei 123 bp, heterozygote Tiere zwei Banden bei 123 bp und 160 bp und homozygote Tiere für den ABCA4-Knockout eine einzige Bande bei 160 bp (Abbildung 7).

RDH8 (The Jackson Laboratory, 2023a):

Wildtyp Tiere zeigten eine einzige Bande bei 300 bp, heterozygote Tiere zwei Banden bei 300 bp und 400 bp und homozygote Tiere für den RDH8-Knockout eine einzige Bande bei 400 bp (Abbildung 7).

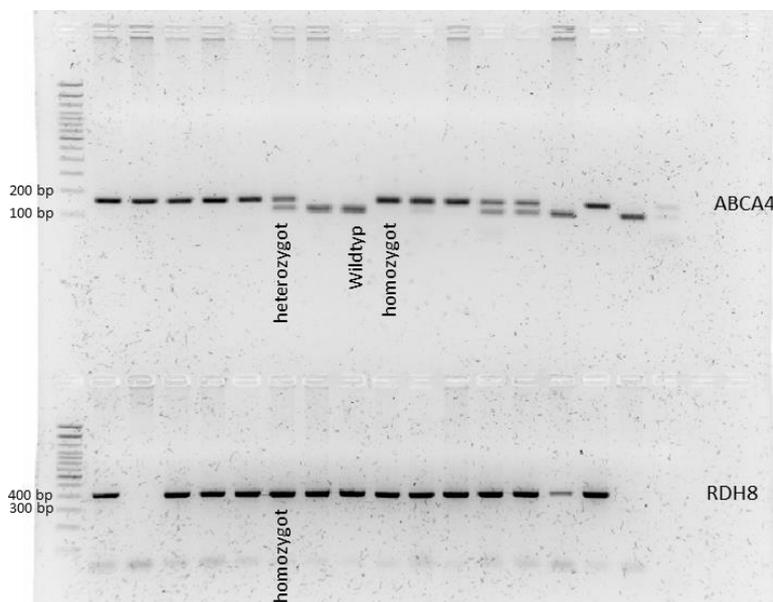


Abbildung 7: Genotypisierung. Die obere Reihe zeigt die Genotypisierung für das ABCA4-Gen, die untere für das RDH8-Gen. **ABCA4**: Wildtyp eine Bande bei 123 bp, Mutant eine Bande bei 160 bp, heterozygot zwei Banden bei 123 und 160 bp. **RDH8**: Mutant eine Bande bei 400 bp. bp: Basenpaare

Die Genotypisierung zum RPE65-Polymorphismus Leu450Met erfolgte analog zur Methode bei Kim et al. (2004): Die gewonnene Maus-DNA wurde mit den Primern 5'-ACCAGAAATTTGGAGGGAAAC-3' (forward) und 5'-CCCTTCCATTCAGAGCTTCA-3' (reverse) PCR-amplifiziert. Das entstehende 545 bp lange Produkt wurde anschließend einem vollständigen Verdau mit der Restriktionsendonuklease *MwoI* (New England Biolabs, 50-facher Überschuss) unterzogen und daraufhin auf zwei Prozentigem Agarosegel analysiert. *MwoI* erkennt 5'-GCNNNNNNGC-3'-Sequenzen (N steht für ein beliebiges Nukleotid) und hydrolysiert die Phosphodiesterbindung innerhalb der DNA zwischen der siebten und achten Base (Skowronek et al., 2012). Da die Met-450-Variante eine *MwoI*-Schnittstelle aufweist, zeigt die entsprechende Sequenzvariante zwei Fragmente der Größe 180 und 365 bp. Das Leu-450-Codon eliminiert die *MwoI*-Schnittstelle, daher wurde unverdautes oder teilweise

verdautes Material als homozygot respektive heterozygot für Leu-450 interpretiert (Kim et al., 2004).

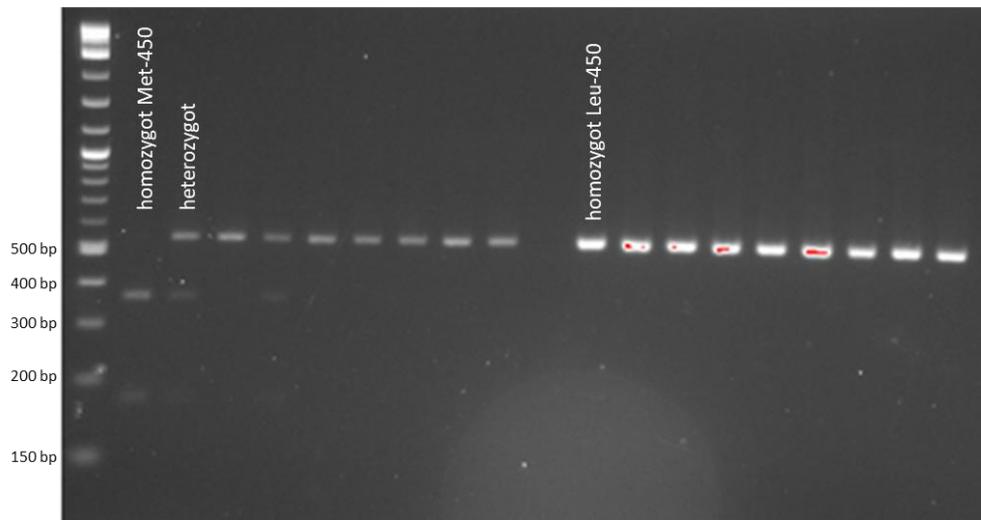


Abbildung 8: Genotypisierung zum RP65-Polymorphismus Leu450Met. Homozygote Tiere für die Met-450-Variante zeigen zwei Banden bei 365 und 180 bp, homozygote Tiere für die Leu-450-Variante zeigen eine Bande bei 545 bp. Heterozygote Tiere zeigen drei Banden bei 545, 365 und 180 bp. bp: Basenpaare

2.2.4 Immunhistochemie

Zur histologischen Evaluierung wurden immunhistochemische Färbungen von Retinaschnitten und retinalen Wholemount-Präparaten nach dem Prinzip einer indirekten Methode eingesetzt. Hierfür wird ein spezifischer Primärantikörper verwendet, der das Zielantigen bindet. In einem zweiten Schritt wird ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper zugegeben, dessen Signal nach Anregung mit einem Laser der entsprechenden Wellenlänge mit einem Konfokalmikroskop detektiert werden kann.

2.2.4.1 Gewinnung der Mauseugen

Die Gewinnung und Fixierung der Mauseugen in PFA erfolgte wie bei Biber et al. (2024) beschrieben.

Anschließend wurden die Augen in 30-prozentiger (w/v) Sucroslösung bei 4°C über Nacht inkubiert. Es folgten die Einbettung in Tissue Tek® O.C.T. Compound Einbettmedium, das Schneiden des Gewebes in 20 µm dicke Schnitte mit einem Kryostaten und das Aufziehen auf Objektträger. Bis zum Färben der Schnitte wurden diese bei -20°C gelagert.

2.2.4.2 Immunhistochemische Färbung von Retinaschnitten

Nach dem Auftauen und Trocknen der Schnitte folgte ein Rehydrierungsschritt über 20 min mit 1x PBS. Zur Permeabilisierung des Gewebes wurde 0,2% Triton X in PBS für 10 min appliziert. Es folgten drei Waschschrte zu je 10 min mit PBS. Der primäre Antikörper wurde in einer Pufferlösung aus 1x PBS und 0,1% Tween sowie jeweils 3% Eselserum oder 5% Ziegen serum, je nach eingesetztem sekundärem Antikörper, zur Blockierung gelöst und die

Schnitte mit der Primärantikörperlösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Zum Blocken wurde jeweils Serum aus dem Wirt des Sekundärantikörpers eingesetzt, um unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers im Gewebe zu mindern und somit Färbeartefakte zu reduzieren. Es schlossen sich am nächsten Tag drei Waschschrte mit 1x PBS zu je 10 min an. Anschließend wurde eine Antikörperlösung mit fluoreszenzmarkiertem sekundärem Antikörper und 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich, 1:1000), ebenfalls gelöst in PBS und 0,1% Tween sowie jeweils 3% Eselserum oder 5% Ziegenserum, für 45 Minuten bei Raumtemperatur aufgebracht. Nach drei weiteren 10-minütigen Waschschrten mit 1x PBS wurden die Objektträger mithilfe des Eindeckmediums Aqua-Poly/Mount mit einem Deckglas versehen und bis zur Beurteilung an einem Konfokalmikroskop im Dunklen aufbewahrt. Als Negativkontrollen dienten Schnitte, auf denen kein primärer Antikörper appliziert wurde.

2.2.4.3 Immunhistochemische Färbung von retinalen und RPE-Wholemounds

Der Färbeporgang versteht sich analog zum Protokoll für Retinaschnitte, mit den folgenden Ausnahmen:

Nach der Freipräparation und Fixierung der Retinae bzw. der RPEs wurden diese mit sechs radiären Einschnitten geebnet und zum Färben in 24-Well-Platten transferiert.

Die sekundären Antikörperlösungen wurden zu je 500 µl/Well über zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler appliziert. Die restlichen Färbeschritte entsprachen dem obigen Protokoll. Nach Abschluss der Färbeprozedur wurden die Wholemound-Präparate auf Objektträger übertragen und mithilfe von Aqua-Poly/Mount Eindeckmedium mit einem Deckglas versehen.

2.2.4.4 TUNEL-Färbung

Zur Identifikation von apoptotischen und nekrotischen Zellen der Retina wurde ein terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL) Assay (In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red by Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) eingesetzt. An der Anweisung des Herstellers orientiert, erfolgte nach einem Permeabilisierungsschritt mit 0,1% Triton X-100 und 0,1% Natriumcitrat in Milli q Reinstwasser die Applikation des TUNEL-Reaktions-Mixes, in dem die Retinaschnitte bei 37°C für 60 min inkubiert wurden. Anschließend folgte die Gegenfärbung der Zellkerne mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, Sigma-Aldrich, 1:1000 Verdünnung in 1x PBS) für fünf Minuten, bevor die Objektträger mithilfe von Aqua-Poly/Mount mit einem Deckglas versehen und getrocknet wurden.

Mithilfe des TUNEL-Assays (terminal desoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling) wurde das Ausmaß von detektierbarem Zelltod in den ischämischen Augen untersucht. Dieses Verfahren nutzt die durch Caspasen vermittelte DNA-Fragmentierung im Zuge der Apoptose aus und markiert DNA-Fragmente an ihrer freien 3'-OH-Gruppe mit einem Fluoro-

phor-konjugierten Desoxyuridintriphosphat (dUTP) (Darzynkiewicz et al., 2008). Diese Polymerisation wird durch das Enzym terminale Desoxynukleotidyltransferase katalysiert. Der in diesem Produkt verwendete Fluorophor TMR red (Tetramethyl-Rhodamin) kann mithilfe eines Konfokalmikroskops mit einem Laser der Wellenlänge 520-560 nm angeregt werden, sein Emissionsspektrum liegt zwischen 570 und 620 nm (Roche, 2016). Im Anschluss an die Mikroskopie der Retinaschnitte (Abbildung 18 A) erfolgte die Quantifizierung der apoptotischen Zellen als Anteil TUNEL-positiver Zellkerne an der Gesamtzahl DAPI-positiver Zellkerne in der äußeren und inneren Körnerschicht sowie in der Ganglienzellschicht für den 3- und den 14-Tages-Zeitpunkt (Abbildung 18 B).

2.2.5 Methodisches Vorgehen bei morphologischen Auswertungen

Für die Bildgebung wurde ein Konfokalmikroskop (VisiScope) mit hochauflösender Kamera verwendet (Visitron Systems). Die Aufnahmen wurden anschließend mithilfe der Software Fiji (Schindelin et al., 2012) qualitativ und quantitativ ausgewertet. Für die Retinaschnitte wurden jeweils Fotografien in einer Entfernung von ca. 200 μm vom Nervus opticus miteinander verglichen.

Für die Auswertung von Wholemounts wurden Stacks mit Bildabstand von 0,5-1 μm aufgenommen, die anschließend mit Fiji zu Z-Projektionen zusammengefügt werden konnten.

Die Auszählung von DAPI-positiven Zellkernen erfolgte über eine Retinabreite von 100 bzw. 50 μm (Abbildung 9). TUNEL-positive Zellen wurden ebenfalls im entsprechenden Ausschnitt gezählt. Die Anzahl an Calretinin-positiven Zellen wurde über eine Breite von 217 μm quantifiziert, was der größtmöglichen auswertbaren Breite bei einer 25-fachen Vergrößerung entspricht, um auch geringe Zellzahlen noch sinnvoll beurteilen zu können.

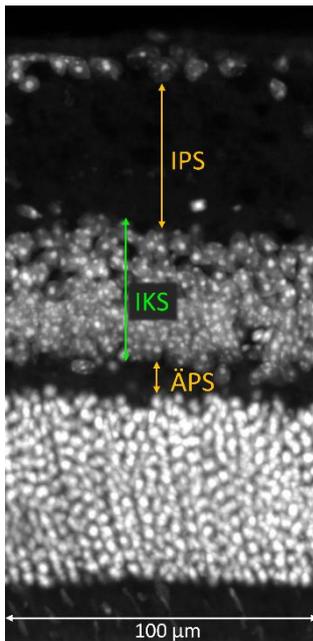


Abbildung 9: Beispielfoto zur Illustration der morphometrischen Auswertung über eine Retinabreite von 100 µm. IPS: Innere plexiforme Schicht; IKS: Innere Körnerschicht; ÄPS: Äußere plexiforme Schicht. DAPI-Färbung.

2.2.5.1 Messung der C3b/iC3b/C3d-Signalintensität

Das C3b/iC3b/C3d-Signal wurde quantitativ ausgewertet, indem die mittlere Helligkeit der Pixel im Bereich der Ganglienzellschicht und der inneren plexiformen Schicht ermittelt wurde (siehe Abbildung 17 B, C). Um die schwache Färbung besser gegen den Hintergrund abgrenzen zu können, wurde für jedes Bild ein individueller Threshold appliziert, der Hintergründe um die feinen C3-Spaltprodukt-positiven Zellfortsätze ausspartete (siehe Abbildung 10). Da die nichtischämischen Kontrollaugen untereinander vergleichbare Werte ergaben, wurde der Durchschnitt ihrer Werte berechnet und jeweils für den 3-Tages bzw. für den 14-Tages-Zeitpunkt als Referenz zugrunde gelegt. Die Angabe der Werte für die Ischämie-/ Reperfusionsaugen erfolgte daher als Verhältnis zum jeweiligen Referenzwert (Abbildung 17 C).

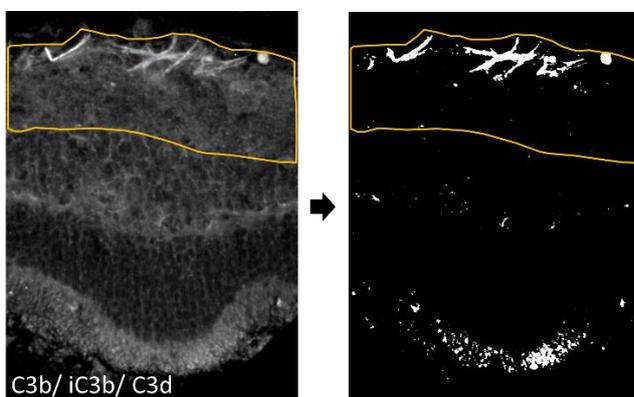


Abbildung 10: Beispielfoto zur Illustration der Intensitätsmessung des C3b/iC3b/C3d-Immunfluoreszenzsignals nach Applikation eines Thresholds. Die umrandete Fläche entspricht der ausgemessenen Fläche über die Ganglienzellschicht und die innere plexiforme Schicht.

2.2.5.2 Messung des GFAP-Signals

Das Immunfluoreszenzsignal der GFAP-Färbung wurde ermittelt, indem nach Applikation eines gemeinsamen Thresholds, der sämtliche Hintergründe um Müllerzellen aussparte, die mittlere Helligkeit der Pixel im Bereich der inneren Körnerschicht im Sinne einer Immunfluoreszenz gemessen wurde, um nicht fälschlicherweise Astrozytensignale in den innersten Retinaschichten mitzuerfassen. Da die nichtischämischen Kontrollaugen bei dieser Auswertung sehr unterschiedliche Werte zeigten, erfolgte die Angabe der Werte für ischämische Augen in Abbildung 15 B als Verhältnis zum Wert des jeweiligen Kontrollauges jedes Tieres.

2.2.5.3 Messung der RPE-Autofluoreszenz

Für RPE-Autofluoreszenzmessungen (siehe Abbildung 23 B und Abbildung 26 B) wurden RPE-Wholemounds bei RDH8^{-/-}-Single-Knockout- und ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout-Mäusen zum 4- und zum 9-Monats-Zeitpunkt analysiert, indem das RPE mithilfe eines Konfokalmikroskops mit einem Laser der Wellenlänge 488 nm angeregt wurde. Anschließend wurde eine Z-Projection des entstandenen Stacks erstellt und an repräsentativen Stellen die durchschnittliche Helligkeit der Pixel mithilfe der Software ImageJ ermittelt.

2.2.5.4 Mikrogliaanalysen

Für die Auswertung der Mikrogliamorphologie wurden das Soma und die Endpunkte der Fortsätze in den Aufnahmen umkreist und die dadurch beschriebene Fläche in Fiji berechnet (Abbildung 11 A). Für die Analyse des Aktivierungszustandes der Mikroglia wurde die in der IBA-1-Färbung umschriebene Somafläche auf die Fotografie der zugehörigen CD68-Färbung übertragen und die Pixelhelligkeit in diesem Bereich gemessen (Abbildung 11 B).

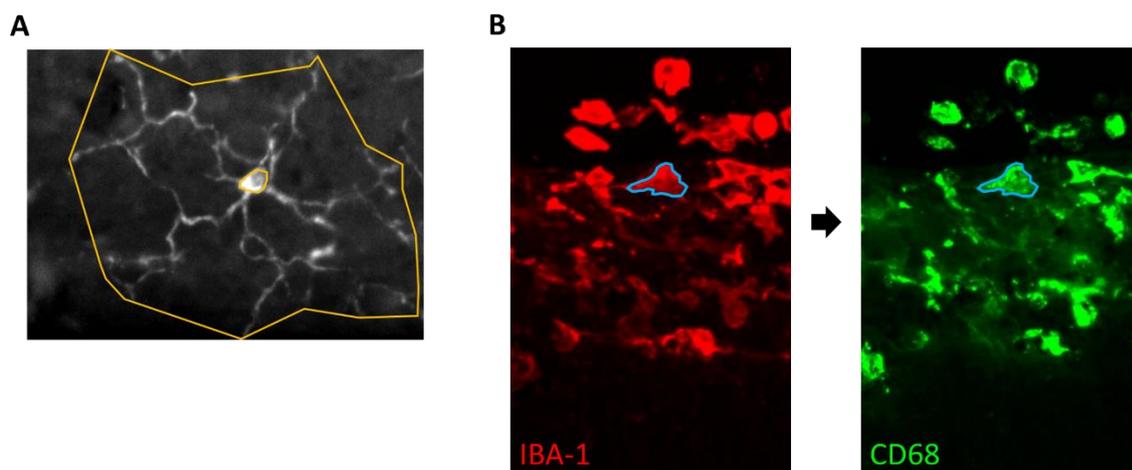


Abbildung 11: Beispielbilder zur Illustration der Analyse von Mikroglia. **A:** Ausmessung der Somafläche (innere Umrandung) und der Mikrogliaesamtfläche (äußere Umrandung) im retinalen Wholemount-Präparat. **B:** Messung der CD68-Immunfluoreszenz auf Mikroglia somata in retinalen Gewebeschnitten. Somata von Mikroglia wurden in der IBA-1-Färbung identifiziert und auf die Fotografie der CD68-Färbung übertragen, anschließend wurde dort im umschriebenen Bereich die durchschnittliche Pixelhelligkeit ausgemessen.

2.2.6 Statistische Analyse

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software Graphpad PRISM 8 unter Darstellung der Mittelwerte \pm Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit dem Mann-Whitney U-Test ermittelt.

3 Ergebnisse

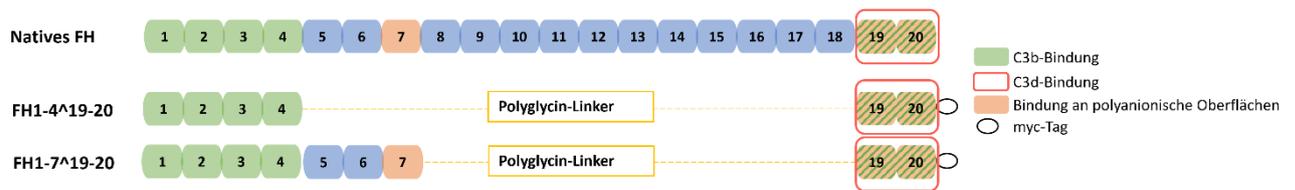
3.1 Ischämieprojekt

3.1.1 miniFH-Konstrukte und Plasmide

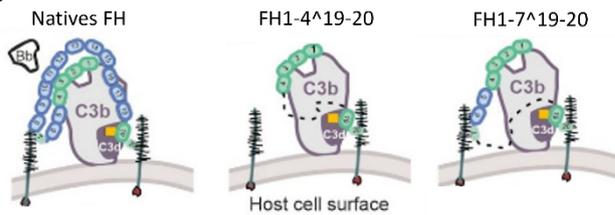
Komplementfaktor H (FH) ist ein Protein, das aus 20 Domänen besteht (Perkins et al., 2012), (Abbildung 12 A). Von diesen vermitteln die N-terminalen Domänen 1 bis 4 vor allem die Bindung an Komplementfaktor C3b (Schmidt et al., 2013), (Abbildung 12 A, B). Die C-terminalen Domänen 19 und 20 sind für die Erkennung von körpereigenen Strukturen über polyanionische Oberflächen verantwortlich und vermitteln ebenfalls eine Bindung an C3b sowie dessen opsonierende Spaltprodukte iC3b und C3dg über eine sogenannte TED (Thioester-containing domain, gemeinsame Bindungsstelle) (Wu et al., 2009), während die mittleren Regionen (Domänen 5-18) die C-terminale Erkennung der Spaltprodukte zu behindern scheinen (Oppermann et al., 2006). Für dieses Projekt wurden daher zwei verkürzte Versionen dieses Komplementregulators verwendet, die sich in ihrer Größe für den Einsatz in einen Adeno-assoziierten Vektor mit limitierter Kapazität von maximal 4,7 kb eignen und dabei in der Zusammensetzung ihrer Domänen funktionell optimiert wurden. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Schmidt et al. (2013) bestand eine erste Version des Konstrukts, im Folgenden miniFH genannt, entsprechend der dort beschriebenen Zusammensetzung aus den Domänen 1 bis 4 sowie 19 und 20, welche über einen Poly-Glycin-Linker miteinander verbunden sind (Abbildung 12A). Diese Variante trägt im Folgenden den Namen **FH1-4[^]19-20**. Da die Domäne 7 ebenfalls eine wichtige Rolle in der Erkennung von Glykosaminoglykanen wie Heparin einzunehmen scheint (Blackmore et al., 1996), wurde in Erwartung der Überlegenheit dieser Variante hinsichtlich der Erkennung von körpereigenen Oberflächen noch eine zweite Variante des Konstrukts getestet, die zusätzlich die Domänen 5 bis 7 enthält. Sie wird im Folgenden als **FH1-7[^]19-20** bezeichnet (Abbildung 12 A). Die beiden Varianten von miniFH wurden durch den Transfer mittels AAV (*AAV_FH1-4[^]19-20* oder *AAV_FH1-7[^]19-20*) in der immunprivilegierten Retina exprimiert. Dabei soll die gfABC1D Version eines GFAP-Promotors die Transkription des Transgens auf den Zustand der Müllerzellgliose im Falle retinaler Schädigung beschränken, um die Homöostase des Komplementsystems in der gesunden Retina nicht zu beeinträchtigen (Abbildung 12 C). Um die sensiblen Neuronen der Retina nicht durch exogene Proteinproduktion zu stressen, sollen Müllerzellen als wichtigste Vertreter der retinalen Makroglia zur Produktion von miniFH transduziert werden. Dies wird einerseits durch den Einsatz des müllerzellspezifischen ShH10-Kapsid erreicht, dessen Überlegenheit hinsichtlich der Transduktion von Müllerzellen bei intravitrealer Injektion im Vergleich zu anderen AAV-Serotypen belegt ist (Klimczak et al., 2009), (Byrne et al., 2013). Durchschnittlich 22% der Müllerzellen konnten in einer vorangegangenen Studie erfolgreich transduziert werden; von allen transduzierten Zellen waren 94% Müllerzellen (Klimczak et al., 2009). Vor dem Hintergrund ihrer ohnehin hohen sekretorischen Aktivität und ihrer einzigarti-

gen Morphologie, mit der sie sich über die komplette Dicke der Retina erstrecken und in Kontakt mit jedem retinalen Zelltyp stehen, stellen Müllerzellen eine ideale Zellpopulation für exogene Proteinproduktion dar (Liang et al., 2001). Darüber hinaus bieten sie den Vorteil, dass der AAV über eine intravitreale Injektion ins Auge eingebracht werden kann, da Müllerzellendfüße die innere Gliagrenzmembran in Richtung Glaskörper formen (Abbildung 1), über welche sie über diesen Applikationsweg gut erreicht werden können. Somit können risikoreichere subretinale Injektionen vermieden werden. Zudem exprimieren Müllerzellen zusammen mit den RPE-Zellen den größten Anteil an den Komplementfaktoren C1s, C3 und B, welche alle wichtige Aktivatoren des Komplementsystems sind, während gleichzeitig ihre Expression von Komplementfaktor H postischämisch erniedrigt ist (Pauly et al., 2019). Um die erfolgreiche Transduktion im Tiermodell überprüfen zu können, wurde über eine IRES (internal ribosomal entry site)-Sequenz ein EGFP (enhanced green fluorescent protein)-Reporter eingefügt (Abbildung 12C). Zum Nachweis der Expression des miniFH-Konstrukts fand ein myc-Tag Anwendung, welches an das Transgen an die Domäne 20 gekoppelt wurde (Abbildung 12 A). Zur Kontrolle des Therapieeffekts in ischämischen Augen erhielten die Tiere der Kontrollgruppe ebenfalls eine Injektion mit einem AAV (*AAV_EGFP*), dessen Plasmid allerdings nur eine Sequenz für den EGFP-Reporter und kein Transgen enthielt, im Folgenden wird diese Gruppe als **EGFP** bezeichnet (Abbildung 12 C).

A



B



C

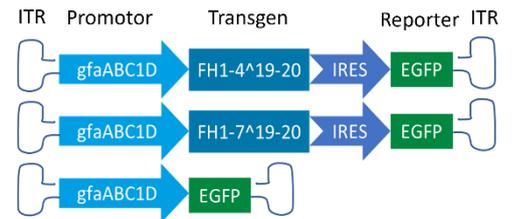


Abbildung 12: Struktur und Funktionsweise von miniFH. **A:** Schematischer Aufbau der beiden miniFH-Konstrukte (unten) im Vergleich zu nativem FH (oben), das normalerweise aus 20 Domänen besteht. Übersicht über die wichtigsten Eigenschaften der verwendeten Domänen in den miniFH-Konstrukten. Adaptiert nach Biber et al. (2024). **B:** Illustration der Funktionsweise der beiden miniFH-Konstrukte (rechts) im Vergleich zu nativem FH (links) bezüglich Bindungsverhalten an körpereigene Zelloberflächen, C3b und C3d. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Biber et al. (2024). **C:** Schematischer Aufbau des Plasmids für AAV_FH1-4¹⁹⁻²⁰ (oben), AAV_FH1-7¹⁹⁻²⁰ (Mitte) und AAV_EGFP (unten). ITR: Inverted terminal repeat sequences. IRES: internal ribosomal entry site. EGFP: enhanced green fluorescent protein. Adaptiert nach Biber et al. (2024).

Die Funktion von Komplementfaktor H (FH) ist im alternativen Aktivierungsweg des Komplementsystems zu finden, wo er als effektiver Komplementinhibitor fungiert. Hier inhibiert FH über die Hemmung des Komplementfaktors B die Bildung der C3-Konvertase auf körpereigenen Zellen und unterstützt den Komplementfaktor I – vermittelten Abbau von Komplementfaktor C3b zu iC3b (Merle et al., 2015b), (Abbildung 13). Über diese Mechanismen wird die Aktivierung des alternativen Wegs des Komplementsystems und die daraus resultierende Selbstverstärkungsschleife des Komplementsystems unterbunden (Merle et al., 2015b). Die Funktion dieses Komplementmodulators besteht also darin, die Aktivierung und Verstärkung des Komplementsystems gegen körpereigene Oberflächen zu blockieren. Ziel dieses Therapieansatzes besteht daher darin, überschießende Komplementaktivierung nur im Falle retinaler Schädigung zu mildern, um sekundäre Degeneration zu verhindern.

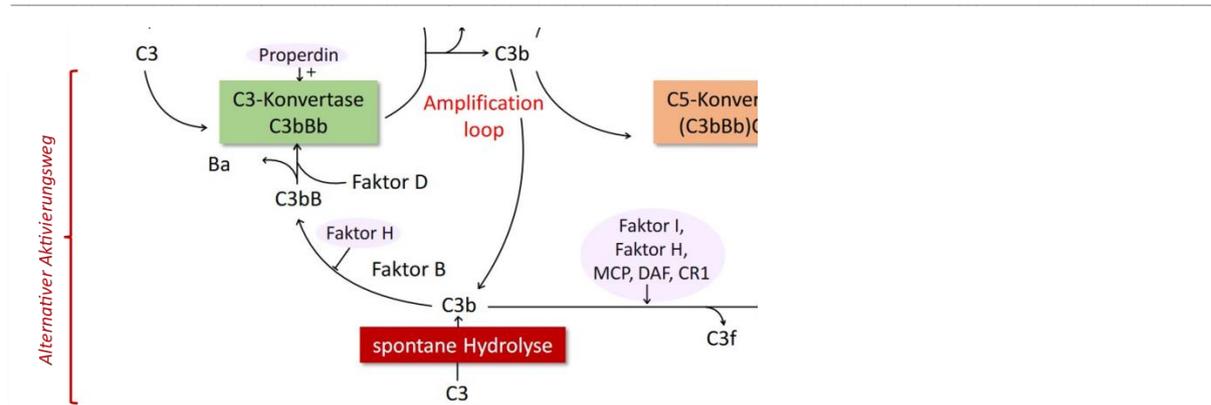


Abbildung 13: Rolle von Komplementfaktor H (FH) in der Komplementkaskade. Auf körpereigenen Oberflächen hemmt Komplementfaktor H die Bildung der C3-Konvertase des alternativen Aktivierungsweges und unterstützt den Komplementfaktor I-vermittelten Abbau von C3b zu iC3b.

3.1.2 Validierung der Transduktionseffizienz der AAV-Konstrukte *in vivo*

Die Überprüfung, ob die retinalen Müllerzellen erfolgreich transduziert worden waren, erfolgte anhand immunhistochemischer Färbung mit einem Antikörper gegen EGFP, welches alle drei Konstrukte als Reporter exprimieren sollten. Über die einzigartige Morphologie der Müllerzellen konnte die erfolgreiche Expression des Reporters sowohl 3 als auch 14 Tage nach Virusinjektion bestätigt werden und zeigte sich beschränkt auf diesen Zelltyp sowie auf ischämische Augen (Abbildung 14), auch wenn die Qualität der Aufnahmen durch Färbefaktoren etwas eingeschränkt ist. Tiere, die lediglich den AAV ohne miniFH erhalten hatten (**EGFP**-Gruppe), zeigten hierbei eine stärkere EGFP-Expression als die Tiere der beiden miniFH-Behandlungsgruppen. Dies war zu erwarten, da die Transkription der EGFP-Sequenz in diesem Fall nicht der Kontrolle der IRES-Sequenz unterlag.

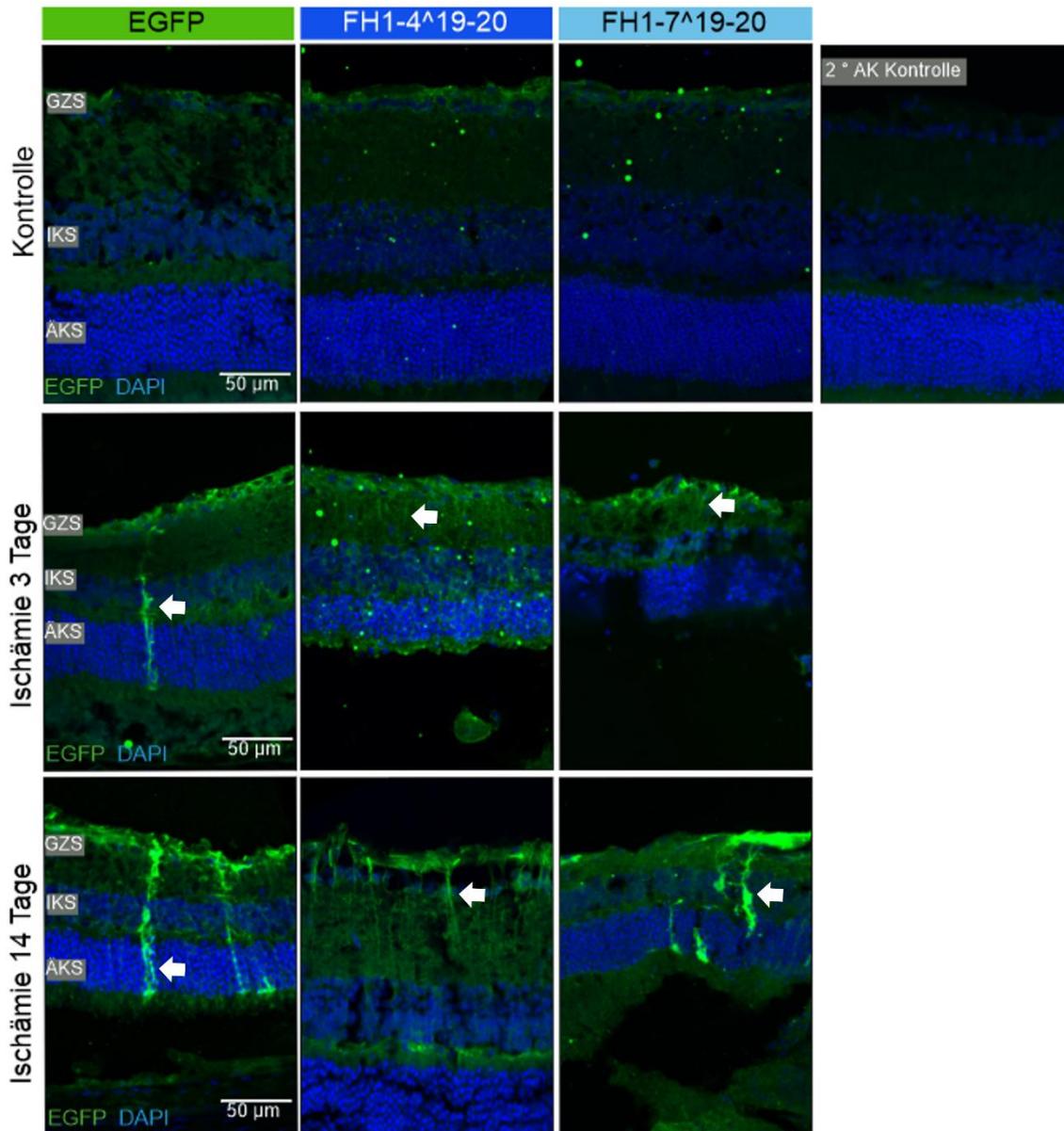


Abbildung 14: Immunhistochemische EGFP-Färbung auf retinalen Gewebeschnitten mit DAPI-Gegenfärbung. Pfeile markieren Müllerzellen. GZS: Ganglienzellschicht. IKS: Innere Körnerschicht. ÄKS: Äußere Körnerschicht.

3.1.3 Einfluss der miniFH-Überexpression auf die Müllerzellgliose

GFAP (saures Gliafaserprotein, *glial fibrillary acidic protein*) ist ein Intermediärfilament, dessen vermehrte Expression in der Retina als Marker für Müllerzellgliose verwendet werden kann. Die Gliose von Müllerzellen ist eine unspezifische frühe und sensible Reaktion, die infolge verschiedenster retinaler Schädigungen auftritt (Bringmann & Reichenbach, 2001). Eine immunhistochemische Färbung auf retinalen Gewebeschnitten mit einem Antikörper gegen GFAP (Abbildung 15 A) sollte daher Effekte der miniFH-Behandlung auf das Ausmaß von retinaler Müllerzellgliose in Abhängigkeit vom Vorliegen der ischämischen Schädigung, aber auch nach intravitrealer Injektion der verschiedenen Vektoren im Kontrollauge untersuchen (siehe auch 2.2.5.2 Messung des GFAP-Signals). Ich konnte zeigen, dass es durch die Ischämie und Reperfusion zu einem starken Anstieg der GFAP-Immunfluoreszenz auf etwa

das Zehn- bis Zwanzigfache kam (Abbildung 15 B), allerdings war zu beiden Analysezeitpunkten keine Reduktion unter Behandlung mit miniFH im Vergleich zur **EGFP**-Gruppe zu beobachten. Stattdessen waren sogar tendenziell höhere Intensitäten zu verzeichnen, wobei die Aussagekraft bei starker Streuung eingeschränkt ist. Bemerkenswert ist, dass die Intensitäten im Verlauf von 2 Wochen nicht wieder abnahmen, sondern weiter anstiegen.

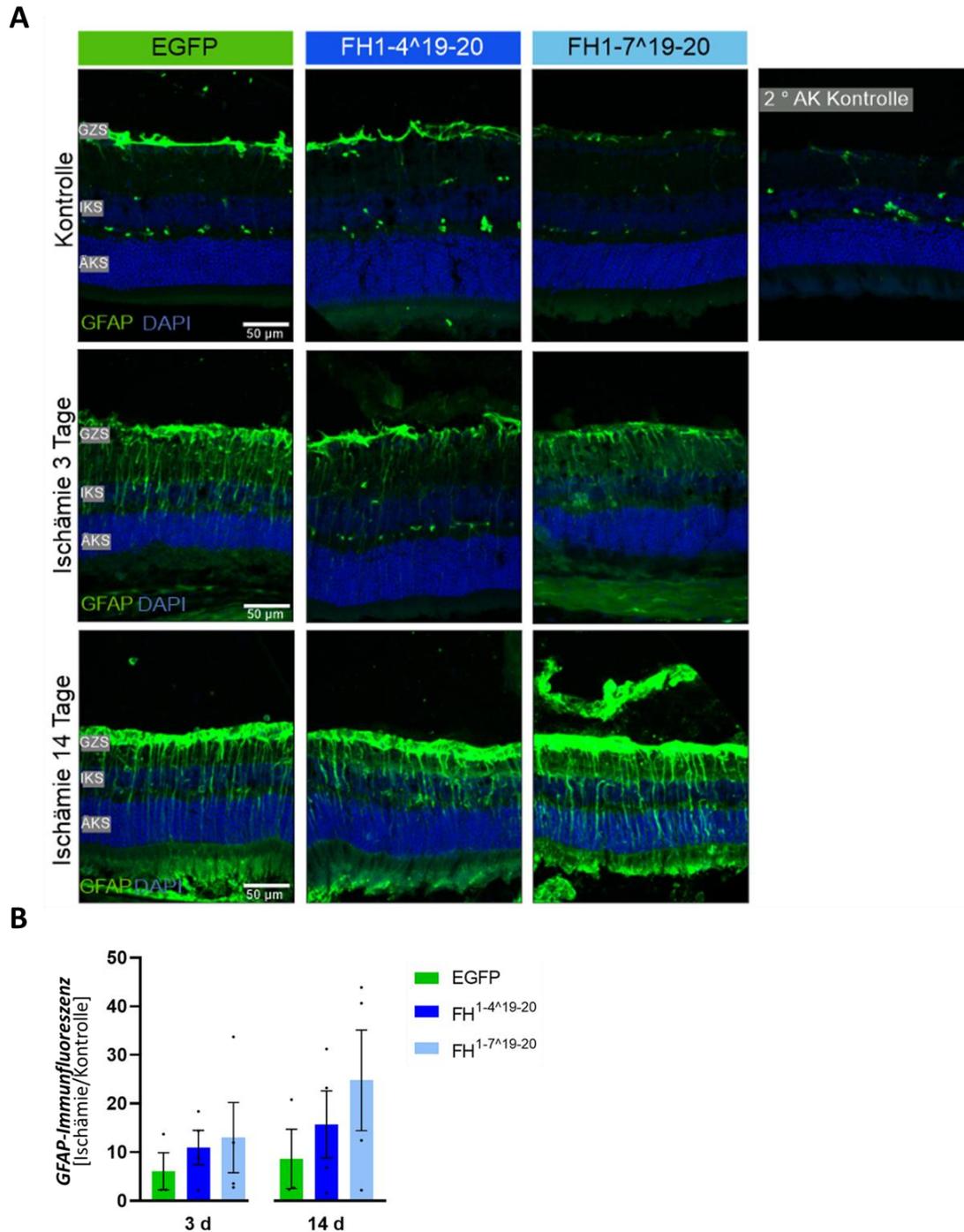


Abbildung 15: Müllerzellgliose nach Ischämie. **A:** Immunhistochemische GFAP-Färbung auf retinalen Gewebeschnitten mit Kern(-DAPI)-Gegenfärbung. **B:** Quantitative Analyse des GFAP-Immunfluoreszenzsignals in der IKS 3 und 14 Tage nach Ischämie/ Virusinjektion. Im Balkendiagramm ist der Mittelwert \pm SEM dargestellt. Pro Injektionsgruppe und Zeitpunkt wurden jeweils $n = 3-4$ Tiere (schwarze Punkte) analysiert. Analyse statistisch signifikanter Unterschiede gemäß Mann-Whitney U-Test. GZS: Ganglienzellschicht. IKS: Innere Körnerschicht. ÄKS: Äußere Körnerschicht. 3d: 3 Tage nach Ischämie/ Virusinjektion. 14d: 14 Tage nach Ischämie/ Virusinjektion.

3.1.4 Reduzierte Mikroglia-Aktivierung in ischämischen Augen unter miniFH-Behandlung

CD68 ist ein Glykoprotein in der lysosomalen Membran phagozytierender Zellen, das bei „Aktivierung“, also Involvierung in neuroinflammatorische Prozesse als Antwort auf Stresssituationen, vermehrt exprimiert wird (Walker et al., 2013). Über eine Intensitätsmessung der CD68-Expression in retinalen Mikroglia-Somata können daher Rückschlüsse auf deren Aktivierungszustand gezogen werden. Hierfür wurden auf retinalen Gewebeschnitten in einer CD68-/IBA-1-Kofärbung (Abbildung 16A) Mikroglia anhand ihrer Anfärbbarkeit mit IBA-1 (ionized calcium-binding adaptor molecule 1), einem etablierten Marker für diese Zellart (Santos et al., 2008), identifiziert, ihre Zellkörper umrandet und die durchschnittliche Helligkeit der Pixel in der Projektion dieses Bereichs in die CD68-Färbung im Sinne der Immunfluoreszenz gemessen (siehe auch Abbildung 11 B).

Infolge der Läsion war bei fast allen Tieren ein wesentlicher Anstieg in der CD68-Immunfluoreszenz auf etwa das Dreifache zu beobachten (Abbildung 16 B). Zum 3-Tages-Zeitpunkt waren die Immunfluoreszenzwerte in den beiden miniFH-Behandlungsgruppen mit durchschnittlich 15-20% Unterschied signifikant niedriger als jene in der **EGFP**-Gruppe. Von 3 auf 14 Tage kam es zu einer Abnahme der Helligkeitswerte um etwa 60% bzw. 40% in den Gruppen **FH1-4¹⁹⁻²⁰** und **EGFP**, wobei bei den Tieren der Gruppe **FH1-4¹⁹⁻²⁰** eine signifikante Reduktion gegenüber den Tieren, die mit *AAV-EGFP* behandelt worden waren, bis fast auf Werte vergleichbar mit denen der nichtischämischen Kontrollaugen zu verzeichnen war. Ein derartiger Rückgang des Immunfluoreszenz-Signals war in der Gruppe **FH1-7¹⁹⁻²⁰** nicht nachzuweisen, hier stagnierten die Werte auf dem 3-Tages-Niveau und überstiegen sogar jene der **EGFP**-Gruppe um etwa 20%.

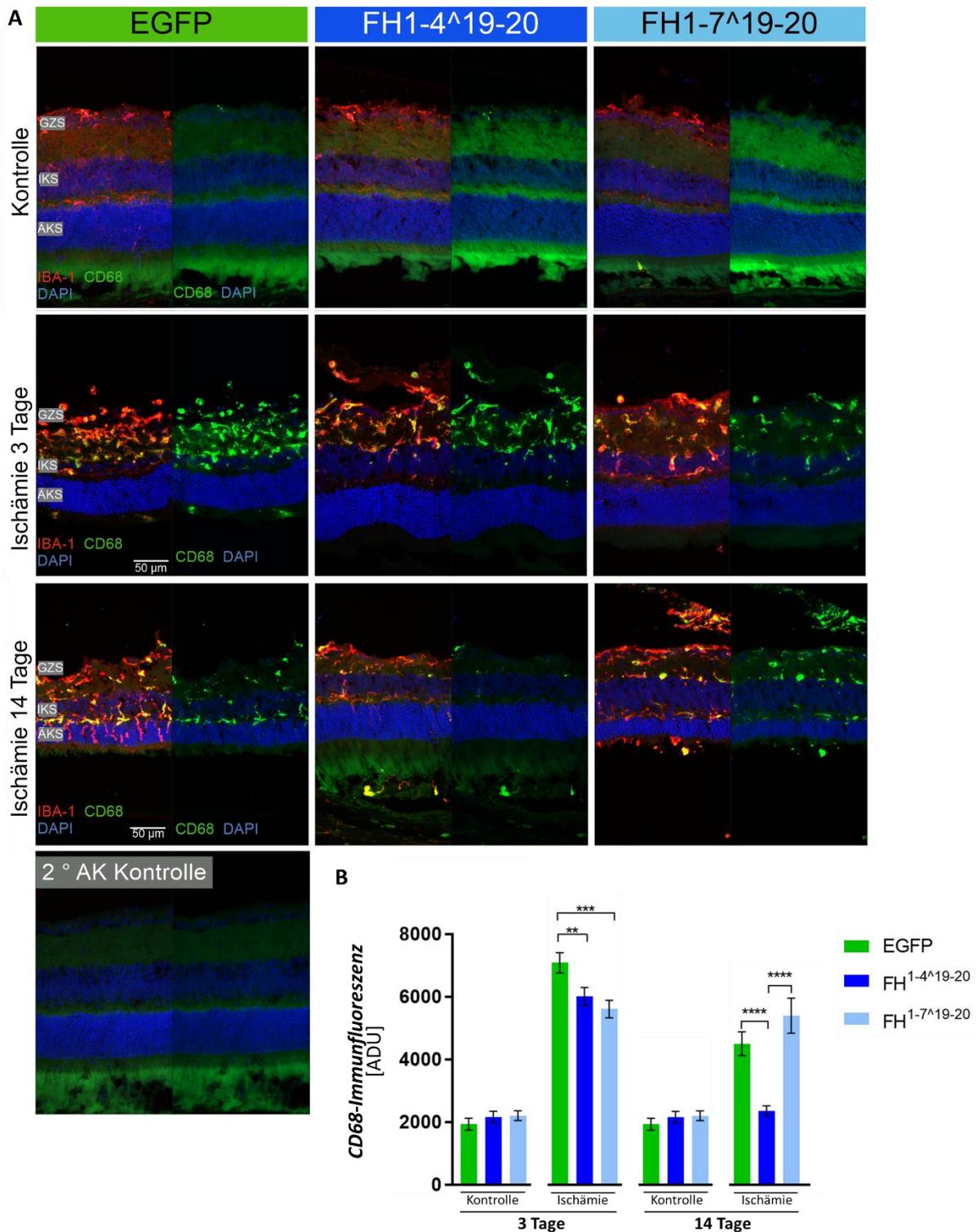


Abbildung 16: Mikroglia-Aktivierung basierend auf Immunfluoreszenz-Signalintensität des Aktivierungsmarkers CD68. **A:** IBA-1/CD68-Kofärbung auf retinalen Gewebeschnitten. Eine vergrößerte Darstellung dieser Abbildung ist im Anhang A zu finden. **B:** Quantitative Auswertung der CD68-Immunfluoreszenz pro Mikroglia-Soma. Im Balkendiagramm ist der Mittelwert \pm SEM dargestellt. Es wurden jeweils $n=8-24$ Mikroglia von je 4-5 Tieren pro Injektionsgruppe und Zeitpunkt analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede gemäß Mann-Whitney U-Test. *: $p < 0,05$. **: $p < 0,01$. ***: $p < 0,001$. ****: $p < 0,0001$. GZS: Ganglienzellschicht. IKS: Innere Körnerschicht. ÄKS: Äußere Körnerschicht.

3.1.5 Effekte auf die Akkumulation von C3-Spaltprodukten

Um den Einfluss von miniFH auf Ebene der Komplementfaktorverteilung zu evaluieren, wurde die Lokalisation von Spaltprodukten von Komplementfaktor 3, in dessen Spaltung FH eingreift, in der Retina immunhistologisch untersucht. Es erfolgte eine Färbung mit einem Antikörper gegen die C3d-Domäne (in Abbildung 17 A in grün) von C3-Spaltprodukten. Diese Domäne ist nicht nur im Spaltprodukt C3d selbst enthalten, sondern auch in den in der Kaskade vorausgehenden Fragmenten C3b, iC3b und auch C3dg (Abbildung 17 A). Daher kann in der Immunhistologie nicht genauer zwischen diesen Spaltprodukten unterschieden werden. Das C3b/iC3b/C3d -Signal zeigte in der Ko-Färbung mit Glutaminsynthetase, einem Müllerzellmarker (Shen et al., 2004), (Riepe & Norenburg, 1977), teilweise Überlappungen (Abbildung 17 B).

Die qualitative Auswertung des C3b/iC3b/C3d-Signals ergab einen Anstieg des Signals auf das Zwei- bis Dreifache nach 3 Tagen infolge der Ischämieperiode in den Gruppen **FH1-7¹⁹⁻²⁰** und **EGFP**, was nach 14 Tagen wieder merklich abklang, während die Gruppe **FH1-4¹⁹⁻²⁰** recht gleichbleibende Werte auf dem Niveau der Kontrollaugen ohne Läsion aufwies (Abbildung 17 C, siehe auch Abbildung 10). In der Gruppe **FH1-7¹⁹⁻²⁰** konnte erst zum 14-Tages-Zeitpunkt eine Überlegenheit gegenüber der Gruppe **EGFP** hinsichtlich des C3b/iC3b/C3d-Signals gesehen werden, wo die Werte für **FH1-7¹⁹⁻²⁰**-Tiere bereits wieder das Niveau der nicht-ischämischen Kontrollaugen erreichten. Zu diesem Zeitpunkt hatte die Gruppe **EGFP** noch 1,5-mal so hohe Werte zu verzeichnen.

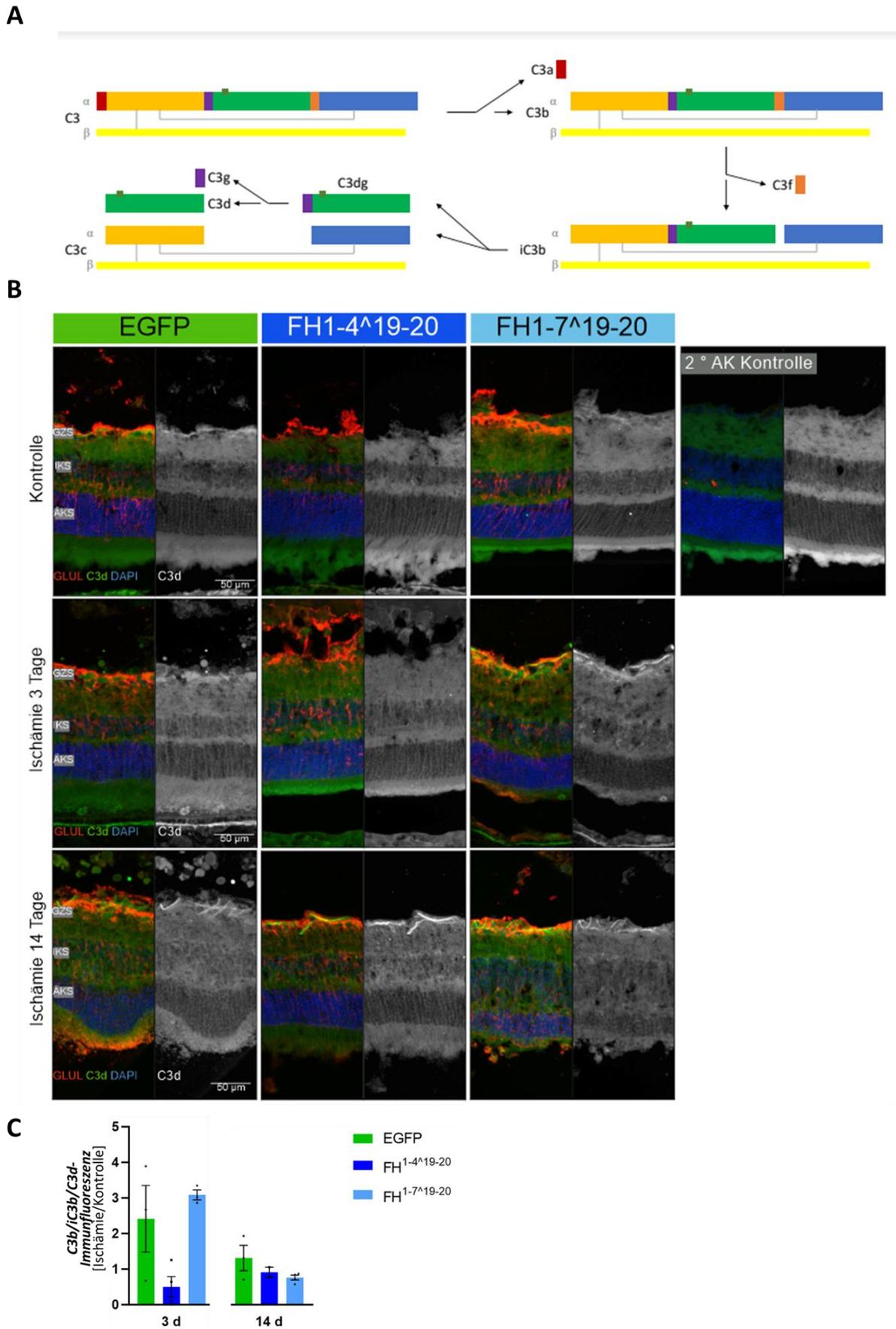


Abbildung 17: Akkumulation von C3-Spaltprodukten in der Retina. **A:** Schematische Übersicht über die Spaltung von C3. Adaptiert nach Łukawska et al. (2018) und Biber et al. (2024). **B:** Immunhistochemische C3d/-

Glutaminsynthetase-Kofärbung auf retinalen Gewebeschnitten mit DAPI-Gegenfärbung. Eine vergrößerte Darstellung der Abbildung 17 B ist im Anhang B zu finden. C: Quantitative Analyse des C3b/iC3b/C3d-Immunfluoreszenzsignals in ischämischen Augen im Vergleich zu nichtischämischen Kontrollaugen 3 und 14 Tage nach Ischämie/ Virusinjektion. Im Balkendiagramm ist der Mittelwert \pm SEM dargestellt. Pro Injektionsgruppe und Zeitpunkt wurden jeweils $n = 2-4$ Tiere (schwarze Punkte) analysiert. Analyse statistisch signifikanter Unterschiede gemäß Mann-Whitney U-Test. GZS: Ganglienzellschicht. IKS: Innere Körnerschicht. ÄKS: Äußere Körnerschicht. GLUL: Glutaminsynthetase. 3d: 3 Tage nach Ischämie/ Virusinjektion. 14d: 14 Tage nach Ischämie/ Virusinjektion.

3.1.6 Auswirkung der miniFH-Genadditionstherapie auf die Neurodegeneration im akuten Ischämie-/ Reperfusion-Schädigungsmodell

3.1.6.1 Leicht verminderte Apoptose in miniFH-behandelten Retinae

Mithilfe eines TUNEL-Assays (terminal desoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling) wurde das Ausmaß von apoptotischem Zelltod in den post-ischämischen Augen untersucht.

Die Tiere präsentierten nach 3 Tagen sehr unterschiedliche Raten TUNEL-positiver Zellen, die von 2% bis 59% reichten (Abbildung 18 A, B). Nach 14 Tagen konnte eine deutliche Abnahme der TUNEL-positiven Zellen auf Werte zwischen 0% und 10% beobachtet werden. Es zeigte sich zu diesem Zeitpunkt ein Trend zu niedrigeren Zelltodraten bei den Behandlungsgruppen **FH1-4¹⁹⁻²⁰** und **FH1-7¹⁹⁻²⁰** im Vergleich zur Gruppe **EGFP**, wobei diese Unterschiede nicht statistisch signifikant waren. Darüber hinaus zeigten die mit miniFH behandelten Gruppen signifikante und stärkere Reduzierungen der TUNEL-Raten zwischen 3 und 14 Tagen von bis zu 99% im Vergleich zu den Tieren der EGFP-Gruppe, die Abnahmen der TUNEL-Raten von ca. 80% aufwiesen. In den nicht-ischämischen, aber AAV-injizierten Kontrollaugen wurden in den meisten Fällen niedrige TUNEL-Raten von bis zu 2% beobachtet.

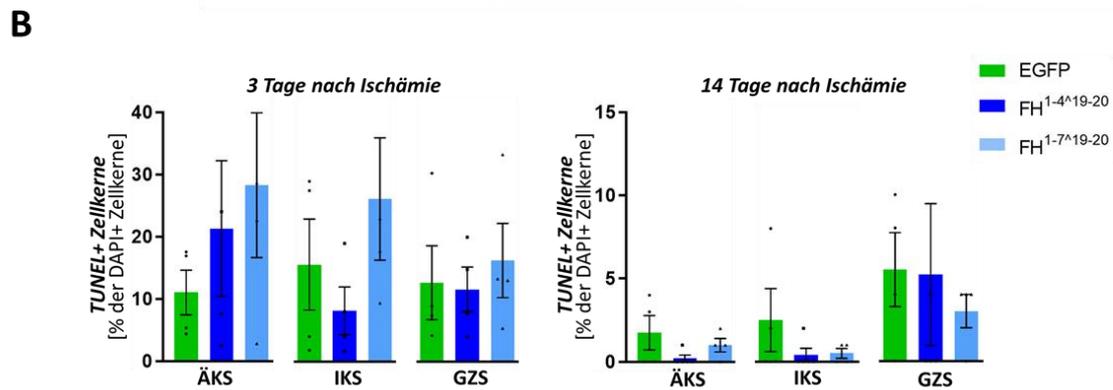
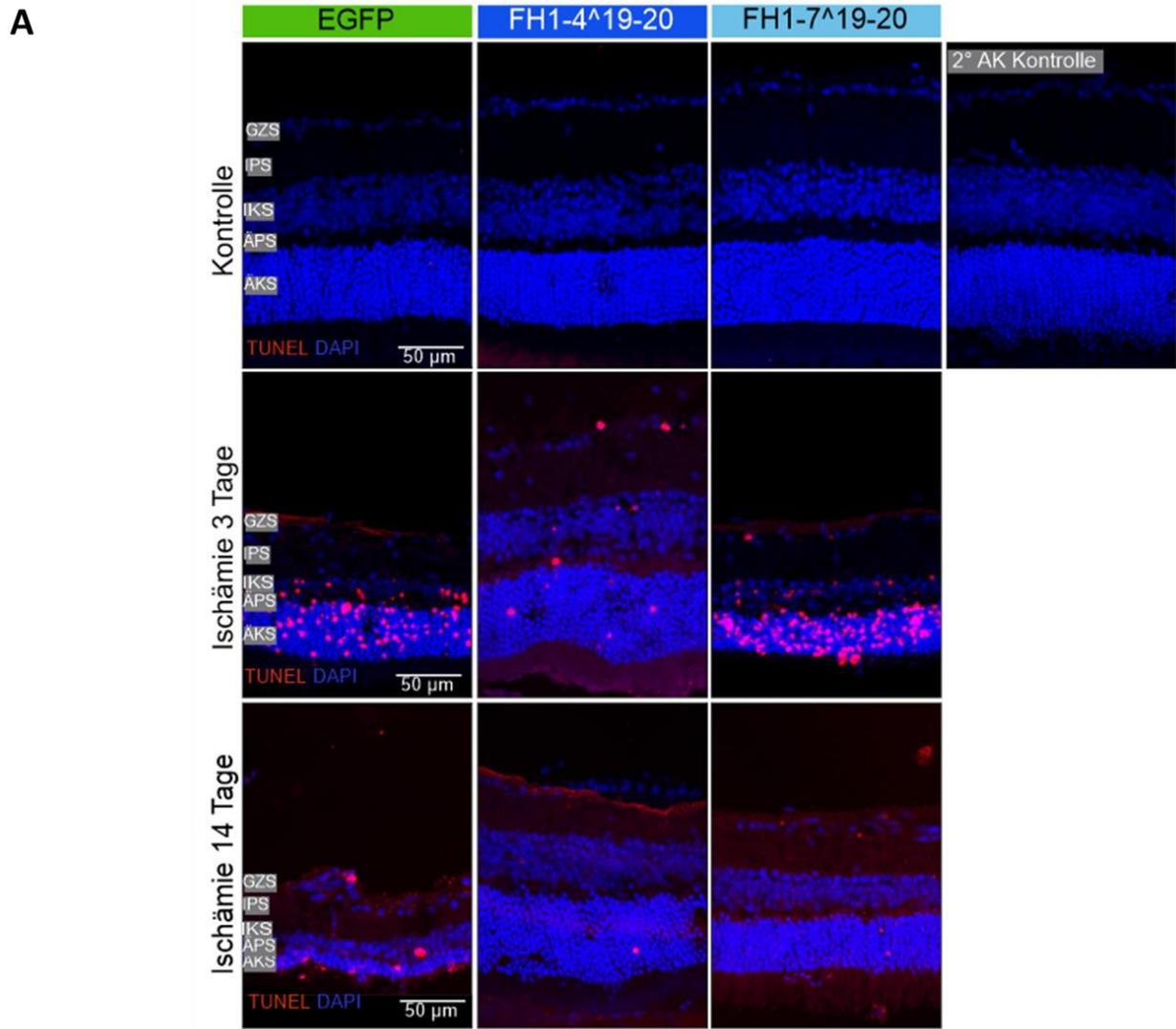


Abbildung 18: Zelltodanalyse via TUNEL-Assay. **A:** TUNEL-Färbung auf retinalen Gewebeschnitten mit DAPI-Gegenfärbung. **B:** Quantitative Auswertung TUNEL-positiver Zellkerne im Verhältnis zu DAPI-positiven Kernen pro 100 µm Retinabreite 3 und 14 Tage nach Ischämie/ Virusinjektion. Im Balkendiagramm ist der Mittelwert ± SEM dargestellt. Pro Injektionsgruppe und Zeitpunkt wurden jeweils n = 4-5 Tiere analysiert. Analyse statistisch signifikanter Unterschiede gemäß Mann-Whitney U-Test. GZS: Ganglienzellschicht. IPS: Innere plexiforme Schicht. IKS: Innere Körnerschicht. ÄPS: Äußere plexiforme Schicht. ÄKS: Äußere Körnerschicht.

3.1.6.2 Verbessertes neuronales Überleben durch miniFH-Genadditionstherapie

Zur Beurteilung der Neurodegeneration wurden morphometrische Analysen herangezogen. Die Ergebnisse wurden als Verhältnis zwischen post-ischämischen und kontralateralen nicht-ischämischen Augen angegeben, die jeweils dasselbe AAV-Konstrukt injiziert bekommen hatten.

Es war zu beobachten, dass die Verhältnisse in den meisten Fällen deutlich unter 1 lagen (Abbildung 19), wodurch die akute Schädigung, die dieses Ischämie-/ Reperfusionmodell verursacht und als Basis zur Beurteilung eines Therapieeffekts dient, zum Ausdruck kommt. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der DAPI-positiven Zellkerne um durchschnittlich ca. 50%. Aufgrund der breiten Streuung der Werte konnte in den meisten Fällen kein signifikanter Einfluss des miniFH-Konstruktes nachgewiesen werden, protektive Tendenzen sind jedoch erkennbar. Hervorzuheben ist hier, dass insbesondere zum 14-Tages-Zeitpunkt in jeder der drei untersuchten Zellschichten bei den mit *AAV_EGFP* injizierten Tieren nicht nur durchschnittlich postischämisch geringere Zellzahlen als bei den beiden miniFH-Behandlungsgruppen registriert wurden; beispielsweise war das Zell-Überlebensverhältnis in der **EGFP**-Gruppe in der inneren Körnerschicht um 34% geringer als in der **FH1-7^Δ19-20**-Gruppe. Die **EGFP**-Gruppe hatte jeweils auch stets den stärksten Zellverlust zwischen den beiden Analysezeitpunkten von 3 und 14 Tagen zu verzeichnen (Abbildung 19 A). Entsprechende Tendenzen stellten sich auch in der Auswertung der Schichtdicke der inneren Körnerschicht dar, hier jedoch ebenfalls ohne signifikante Unterschiede (Abbildung 19 B).

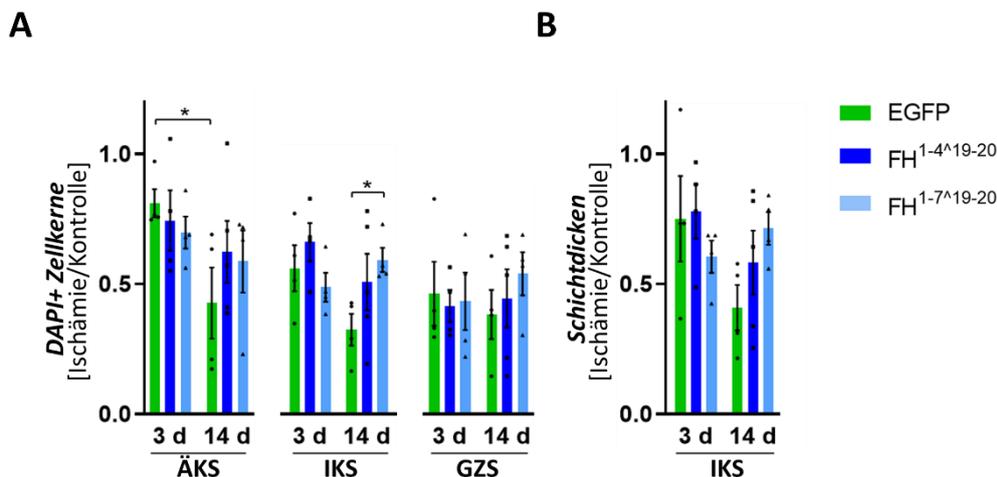


Abbildung 19: Auswertung über neuronales Überleben nach Ischämie. **A:** Quantitative Auswertung über den Erhalt DAPI-positiver Zellkerne nach Ischämie. **B:** Quantitative Auswertung der IKS-Schichtdicke nach Ischämie. In den Balkendiagrammen ist der Mittelwert \pm SEM dargestellt. Pro Injektionsgruppe und Zeitpunkt wurden jeweils $n = 4-5$ Tiere (schwarze Punkte) analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede gemäß Mann-Whitney U-Test. *: $p < 0,05$. ÄKS: Äußere Körnerschicht. IKS: Innere Körnerschicht. GZS: Ganglienzellschicht. 3d: 3 Tage nach Ischämie/ Virusinjektion. 14d: 14 Tage nach Ischämie/ Virusinjektion.

Des Weiteren erfolgte eine quantitative Bewertung der Schichtdicken der inneren und äußeren plexiformen Schicht, über welche Aussagen zur Integrität der synaptischen Verbindungen zwischen Neuronen getroffen werden können (Abbildung 20). Während es durch die Ischämie bei allen Behandlungsgruppen zu deutlichen und bis 14 Tage anhaltenden Abnahmen der Schichtdicken kam, war jene in der Behandlungsgruppe **EGFP** am deutlichsten. Bei diesen Tieren konnte eine signifikante durchschnittliche Reduktion um 47% von 3 auf 14 Tage in der inneren plexiformen Schicht registriert werden (Abbildung 20). Zudem präsentierten die Tiere der **EGFP**-Gruppe zum 14-Tages-Zeitpunkt durchschnittlich geringere Schichtdicken als die Tiere der Gruppen **FH1-4¹⁹⁻²⁰** und **FH1-7¹⁹⁻²⁰**, auch wenn die Unterschiede nicht signifikant und die Varianzen sehr hoch waren.

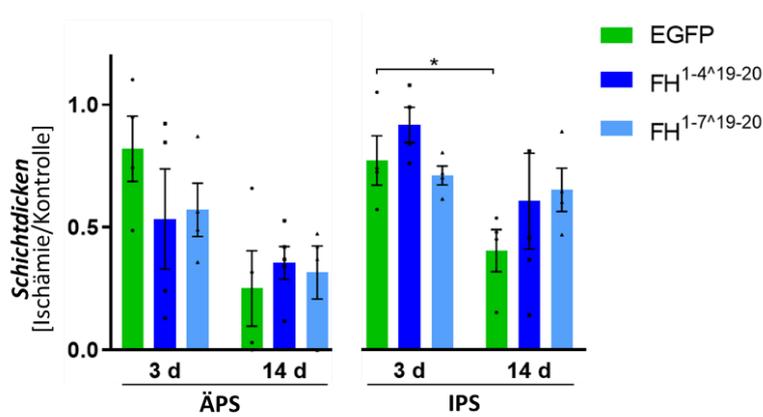


Abbildung 20: Quantitative Auswertung der Schichtdicken der plexiformen Schichten als Ausdruck synaptischer Integrität. Im Balkendiagramm ist der Mittelwert \pm SEM dargestellt. Pro Injektionsgruppe und Zeitpunkt wurden jeweils $n = 4-5$ Tiere analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede gemäß Mann-Whitney U-Test. *: $p < 0,05$. ÄPS: Äußere plexiforme Schicht. IPS: Innere plexiforme Schicht. 3d: 3 Tage nach Ischämie/ Virusinjektion. 14d: 14 Tage nach Ischämie/ Virusinjektion.

3.1.6.3 Einfluss der miniFH-Genadditionstherapie auf das Überleben von Amakrin- und Ganglienzellen

Das in dieser Studie eingesetzte Ischämie-/ Reperusionsmodell führt am schnellsten zu einer Degeneration der inneren Retinaschichten, welche die Ganglienzellschicht, die innere plexiforme Schicht und die innere Körnerschicht umfassen, da es hier zu einem vorübergehenden Perfusionsdefizit kommt (Neufeld et al., 2002). Da Ganglienzellen den neuronalen Zelltyp darstellen, der am anfälligsten für die Ischämie-bedingten Schädigungen ist (Neufeld et al., 2002), fokussierten sich weitere Auswertungen auf den Verlust dieses Zelltyps der inneren Retina. Auf Retinaschnitten wurde die Anzahl an Zellen, die sich immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen Calretinin anfärben ließen, ausgewertet (Abbildung 21 A, B).

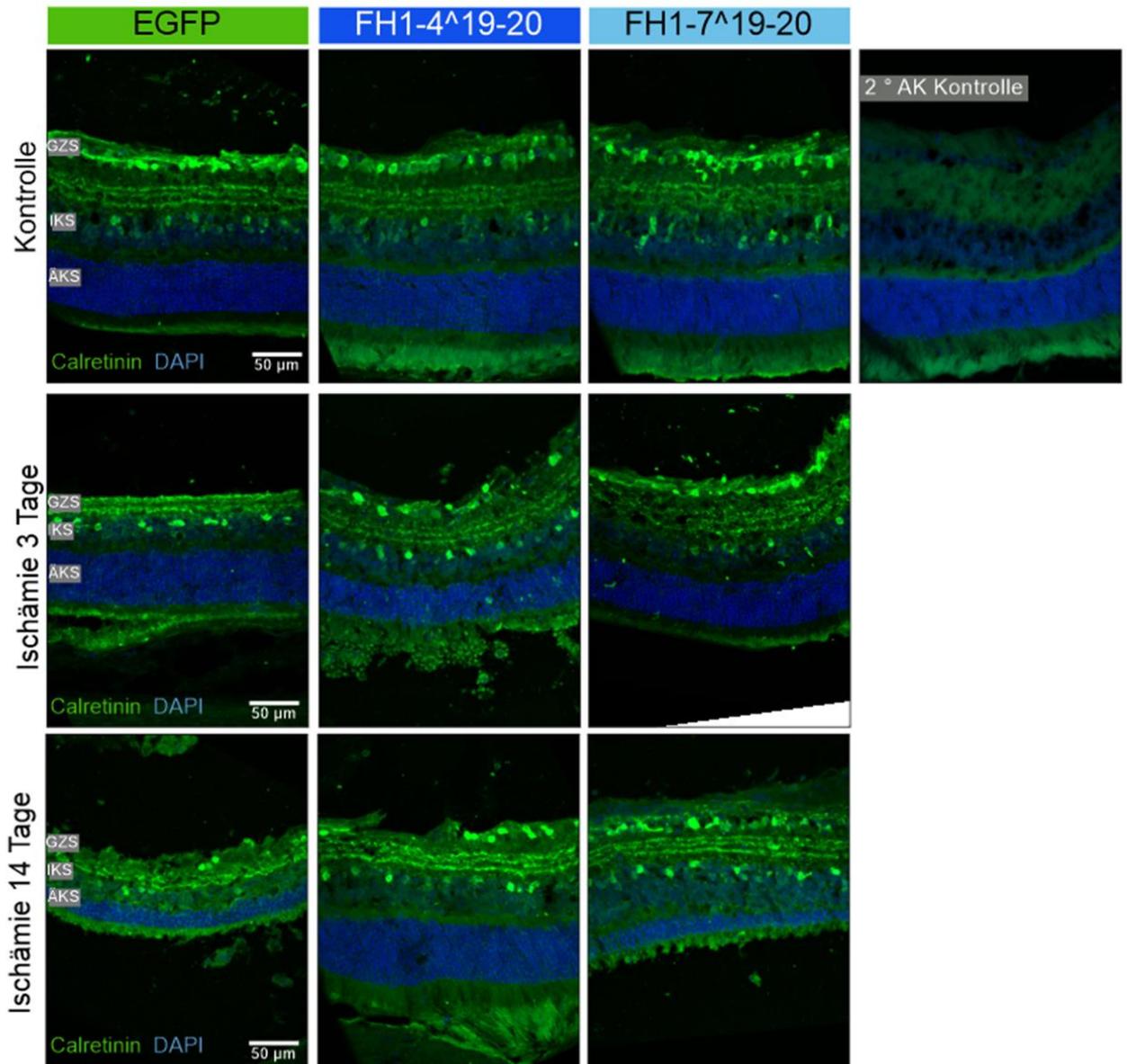
Calretinin färbt im ZNS und PNS verschiedene Zellarten an. In der Retina erscheinen in der inneren Körnerschicht Amakrinzellen positiv sowie deren Fortsätze, die sich in der inneren plexiformen Schicht in drei Banden organisieren (Lee et al., 2011). In der Ganglienzellschicht

färben sich mit diesem Antikörper Ganglienzellen und deplatzierte Amakrinzellen an (Lee et al., 2011), (Abbildung 21 A).

3 Tage nach der Läsion/ Injektion hatten die Retinae der mit *AAV_FH1-4¹⁹⁻²⁰*- und *AAV_EGFP*-injizierten Tiere einen Verlust von etwa 50-60% der Calretinin-positiven Zellen zu verzeichnen (Abbildung 21B). In der Ganglienzellschicht stieg die Zellzahl unter *AAV_1-4¹⁹⁻²⁰* nach 14 Tagen wieder um durchschnittlich 25% an, während sie sich unter *AAV_EGFP* kaum veränderte. Die Mäuse, die *AAV_1-7¹⁹⁻²⁰* erhalten hatten, zeigten hingegen initial lediglich einen Verlust von 30%, die Zellzahl fiel im zeitlichen Verlauf dann weiter leicht ab.

Hinsichtlich der Amakrinzellen in der inneren Körnerschicht förderte diesmal die Variante *AAV_FH1-4¹⁹⁻²⁰* ein besseres Zellüberleben 3 Tage nach Ischämie (Abbildung 21 B). Hier war ein etwa 10% geringerer Zellverlust im Vergleich zu den anderen beiden Behandlungsgruppen auffällig. Nach 14 Tagen kam es auch hier unter beiden miniFH-Varianten zu einem stärkeren Anstieg des Fluoreszenzsignals auf durchschnittlich 70-80% der Ausgangswerte, wobei auch die Tiere der **EGFP**-Gruppe einen leichten Wiederanstieg der Werte zu verzeichnen hatten.

A



B

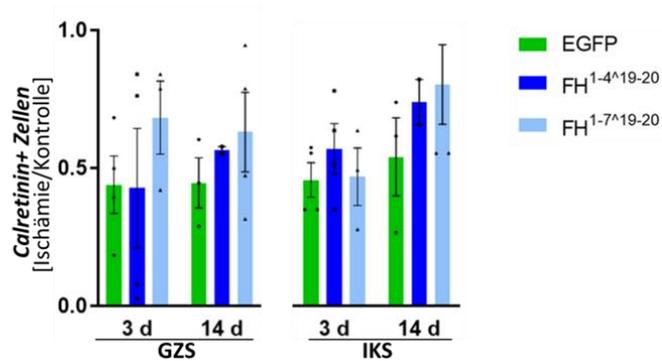


Abbildung 21: Überleben Calretinin-positiver Zellen nach Ischämie. **A:** Immunhistochemische Calretinin-Färbung auf retinalen Gewebeschnitten mit DAPI-Gegenfärbung. **B:** Quantitative Auswertung der Calretinin-positiven Zellen in der GZS und IKS nach Ischämie im Verhältnis zu nichtischämischen Kontrollaugen. Im Balkendiagramm ist der Mittelwert \pm SEM dargestellt. Pro Injektionsgruppe und Zeitpunkt wurden jeweils $n = 4-5$ Tiere (schwarze

Punkte) analysiert. Analyse statistisch signifikanter Unterschiede gemäß Mann-Whitney U-Test. GZS: Ganglienzellschicht. IKS: Innere Körnerschicht. ÄKS: Äußere Körnerschicht. 3d: 3 Tage nach Ischämie/ Virusinjektion. 14d: 14 Tage nach Ischämie/ Virusinjektion.

3.1.7 Co-Lokalisation von FH mit Mikroglia nach Ischämie-/ Reperfusionsschaden

Eine weitere Mikroglia-Ko-Färbung mit FH sollte der Frage nachgehen, wo Komplementfaktor H und die miniFH-Konstrukte nach der Applikation lokalisiert sind.

Signale für FH waren insbesondere in Mikroglia der beiden Gruppen, die mit den miniFH-tragenden AAVs injiziert worden waren, zu detektieren (Abbildung 22), was zu der Annahme veranlasst, dass miniFH von Mikroglia phagozytiert wird oder an ihre Oberfläche bindet. Das Signal ist auch nach 14 Tagen noch nachweisbar. Hierbei sei angemerkt, dass der verwendete Antikörper endogenes murines nicht vom überexprimierten humanen FH unterscheidet. Allerdings beschränkten sich FH-positive, zumindest teils ramifizierte Mikroglia auf die beiden miniFH-Behandlungsgruppen, wohingegen in der **EGFP**-Gruppe sowie in den nicht-ischämischen Kontrollaugen kein Signal in beziehungsweise an diesen Zellen detektiert werden konnte. Dies stützt die Hypothese, dass tatsächlich primär das überexprimierte miniFH nachgewiesen wird. In der **EGFP**-Gruppe sind nur die subretinalen amöboiden Mikroglia FH-positiv. Das heißt, auch endogenes FH bindet unter bestimmten Voraussetzungen vermehrt an Mikroglia. Da es sich bei dem FH-Antikörper um einen Antikörper aus dem Wirt „Maus“ handelt, hat der sekundäre anti-Maus-Antikörper ebenfalls Blutgefäße angefärbt, wie in der Negativkontrolle zu sehen ist.

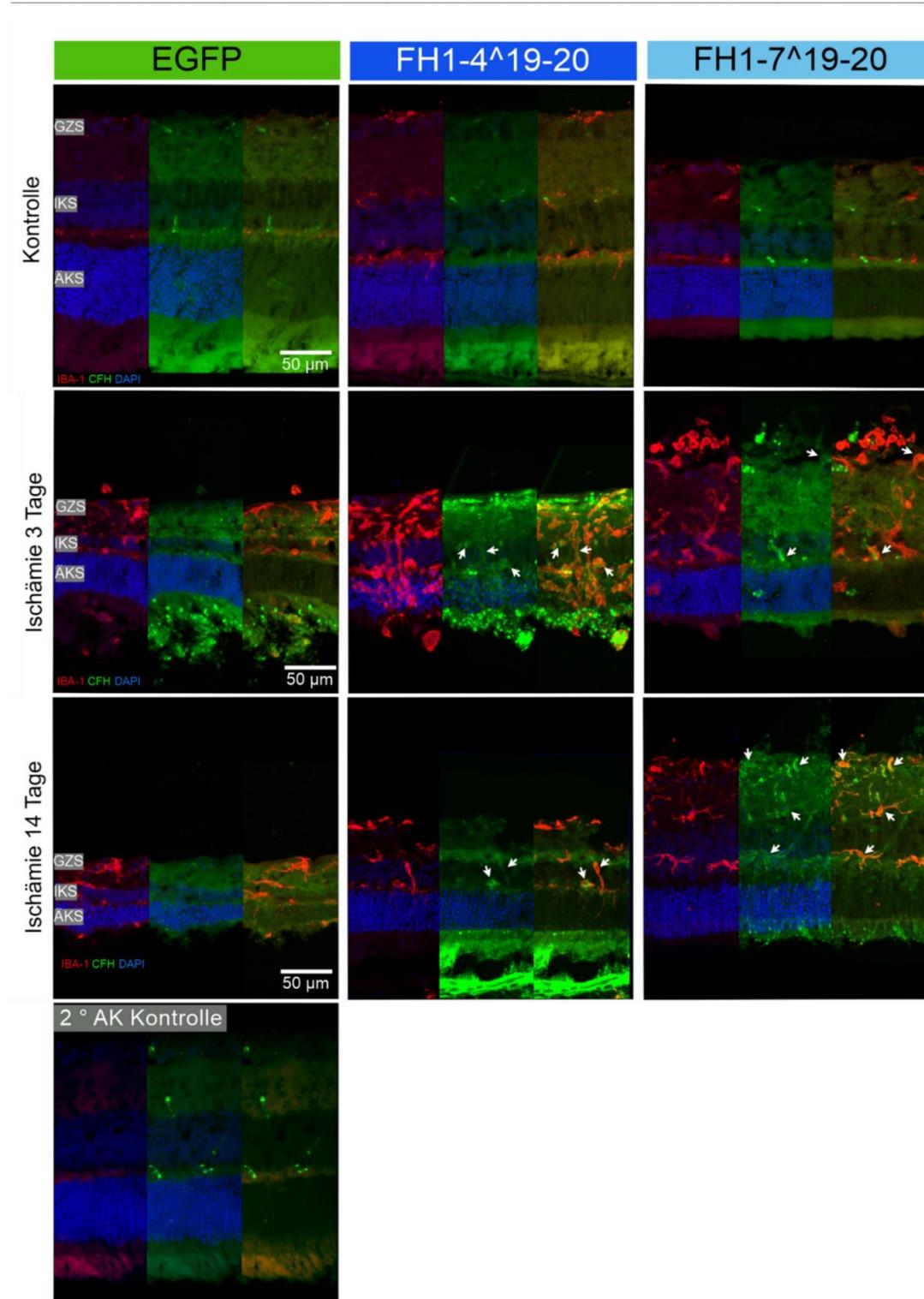


Abbildung 22: Immunhistochemische IBA1-/FH-Kofärbung mit DAPI-Gegenfärbung auf retinalen Gewebeschnitten. Pfeile markieren identische Strukturen in der IBA1- und der FH-Färbung und verweisen somit auf Mikroglia, welche FH-Signale exprimieren. Eine vergrößerte Darstellung dieser Abbildung ist im Anhang C zu finden.

3.2. Die ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Maus – Charakterisierung eines langsamen, genetischen Modells für Retinadegeneration

3.2.1 Verstärkte, altersabhängige RPE-Autofluoreszenz bei ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Mäusen

Vor dem Hintergrund, dass eine messbar erhöhte Autofluoreszenz aufgrund von Akkumulation von Bisretinoiden im retinalen Pigmentepithel (RPE) ein Charakteristikum in Stargardt-Patienten ist und bereits in früheren Arbeiten auch im Mausmodell demonstriert werden konnte (siehe auch 1.4.2 Die ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Knockoutmaus als Modell einer langsamen Retinadegeneration), führte ich Autofluoreszenzmessungen auf Wholemout-Präparaten des retinalen Pigmentepithels durch.

Hier konnte ich zeigen, dass in 4 Monate alten Mäusen kaum ein Unterschied zwischen RDH8^{-/-}-Single-Knockout- und ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout-Tieren zu verzeichnen war (Abbildung 23 A, siehe auch 2.2.5.3 Messung der RPE-Autofluoreszenz). Allerdings konnte bei beiden Genotypen ein signifikanter Anstieg der Autofluoreszenz im Alter von 9 Monaten im Vergleich zu 4 Monaten auf etwa das Doppelte beobachtet werden (Abbildung 23 B). Retinae der ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout-Mäuse zeigten zum 9-Monats-Zeitpunkt signifikant höhere Werte als die gleichaltrigen RDH8^{-/-}-Tiere; die Autofluoreszenzwerte waren hier durchschnittlich um 45% höher. Auch der prozentuale Anstieg über die Zeit war mit 160% bei den ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Mäusen stärker ausgeprägt als bei den RDH8^{-/-}-Mäusen, welche eine Zunahme der Autofluoreszenzwerte um 100% zeigten.

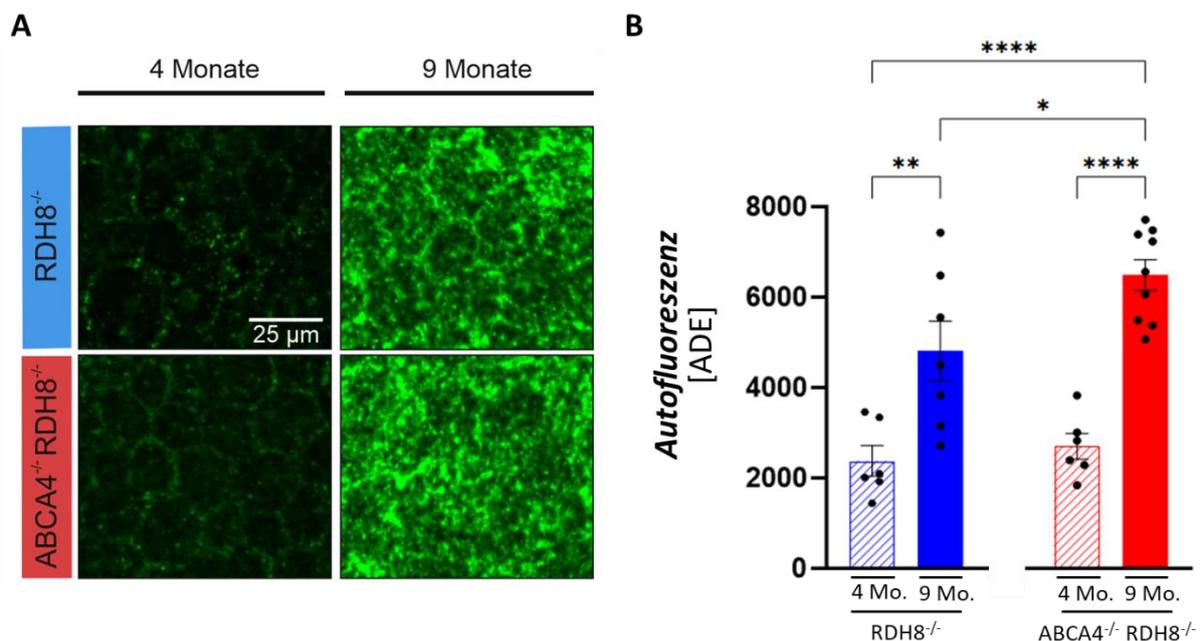


Abbildung 23: Messung der Autofluoreszenz im Wholemout-Präparat des retinalen Pigmentepithels von 4 und 9 Monate alten ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout-Mäusen im Vergleich zum RDH8^{-/-}-Single-Knockout, der als Kontrolle diente. **A**: Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahme von autofluoreszenten RPE-Wholemout-Präparaten. **B**: Quantitative Analyse der RPE-Autofluoreszenz. Im Balkendiagramm ist der Mittelwert ± SEM dargestellt. Pro Genotyp und Alter wurden n=6-9 Tiere analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede gemäß Mann-

Whitney U-Test. *: $p < 0,05$. **: $p < 0,01$. ***: $p < 0,001$. 4 Mo: 4 Monate alt. 9 Mo: 9 Monate alt. ADE: arbiträre digitale Einheit.

3.2.2 Erhöhte altersabhängige Mikroglia-Aktivierung in ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Mäusen

Infolge von Läsionen durchlaufen Mikroglia verschiedene Aktivierungszustände, die sich in morphologischen Veränderungen widerspiegeln: In Ruhe weisen sie eine sehr verzweigte („ramifizierte“) Struktur mit kleinem Soma und langen Fortsätzen auf. Bei akutem oder chronischem Stress ziehen sich die Fortsätze in Richtung des Zellkörpers zurück, der dann eine rundliche amöboide Struktur annimmt (Walker et al., 2013), (Stence et al., 2001). Das Soma ist in diesem Zustand größer, während die insgesamt eingenommene Fläche abnimmt (Abbildung 24 A, B). Bei Bedarf können Mikroglia in der Folge neue, kürzere Fortsätze bilden (Stence et al., 2001). Bei der Charakterisierung des ABCA4^{-/-}-Single-Knockout-Modells in Albino-Mäusen war bereits eine Zunahme der Mikroglia-Zellzahl bei gleichzeitiger Abnahme der Mikroglia-Gesamtfläche im Vergleich zu Wildtyp-Tieren, insbesondere in den inneren retinalen Schichten, beschrieben worden (Jabri et al., 2020). Der Aktivierungszustand von Mikroglia sollte daher auch in unserem Doppel-Knockout-Modell überprüft werden.

Es wurden die Anzahl der IBA-1-positiven Mikroglia in retinalen Wholemount-Präparaten pro Scan-Feld (Abbildung 24 C, siehe auch 2.2.5), die Fläche des Mikroglia-Somas (Abbildung 24 D) sowie die Gesamtfläche, die Mikroglia mit ihren Fortsätzen einnehmen (Abbildung 24 E), für innere (Ganglienzellschicht bis innere Körnerschicht) und äußere Retinaschichten (äußere plexiforme Schicht bis subretinaler Raum) getrennt ausgewertet. In 4 Monate alten ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout-Mäusen waren die Mikroglia weniger aktiviert als in RDH8^{-/-}-Single-Knockout-Tieren, was aus der um etwa 50% geringeren Zellzahl bei gleichzeitig durchschnittlich 25% geringerer Somagröße und 18% größerer Gesamtfläche geschlossen werden kann. Im Alter von 4 bis 9 Monaten stieg die Mikroglia-Zahl in der inneren Netzhaut der ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout-Mäuse an, während sie bei gleichaltrigen Kontrolltieren abnahm (Abbildung 24 C). Entsprechende Entwicklungen stellten sich auch hinsichtlich der Somagröße dar: Während ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Tiere einen signifikanten Anstieg der Somagröße in inneren Retina-Abschnitten als Indikator zunehmender Mikroglia-Aktivierung aufwiesen, stagnierten die Werte bei RDH8^{-/-}-Tieren bzw. fielen sogar etwas in den inneren Retinaschichten ab (Abbildung 24 D). In Hinblick auf die Gesamtfläche der Mikroglia zeigte sich hingegen eine signifikante Reduktion der Werte auf etwa ein Drittel des Ausgangswertes bei beiden Genotypen (Abbildung 24 E), was als eine zunehmende, altersbedingte Mikroglia-Aktivierung interpretiert werden kann. ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Tiere zeigten hier eine stärkere Abnahme der Größe, in der äußeren Retina bis auf ein Viertel des Ausgangswertes. Im Gegensatz dazu war bei den RDH8^{-/-} Tieren eine geringere Abnahme der Gesamtfläche auf etwa die Hälfte des Wertes nach 4 Monaten zu beobachten. Allerdings unterschieden sich die beiden Genotypen in den absoluten Werten der Mikrogliagesamtfläche

nicht nachweislich. Hinsichtlich der Mikroglia-Zellzahl war in beiden Retinaabschnitten kein signifikanter Unterschied zwischen RDH8^{-/-}-Single-Knockout-Mäusen und ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout-Mäusen nachzuweisen.

Generell ist anzumerken, dass Mikroglia in den äußeren Schichten der Netzhaut in geringerer Zahl und in einer stärker ramifizierten, d.h. möglicherweise weniger aktivierten Form vorkommen.

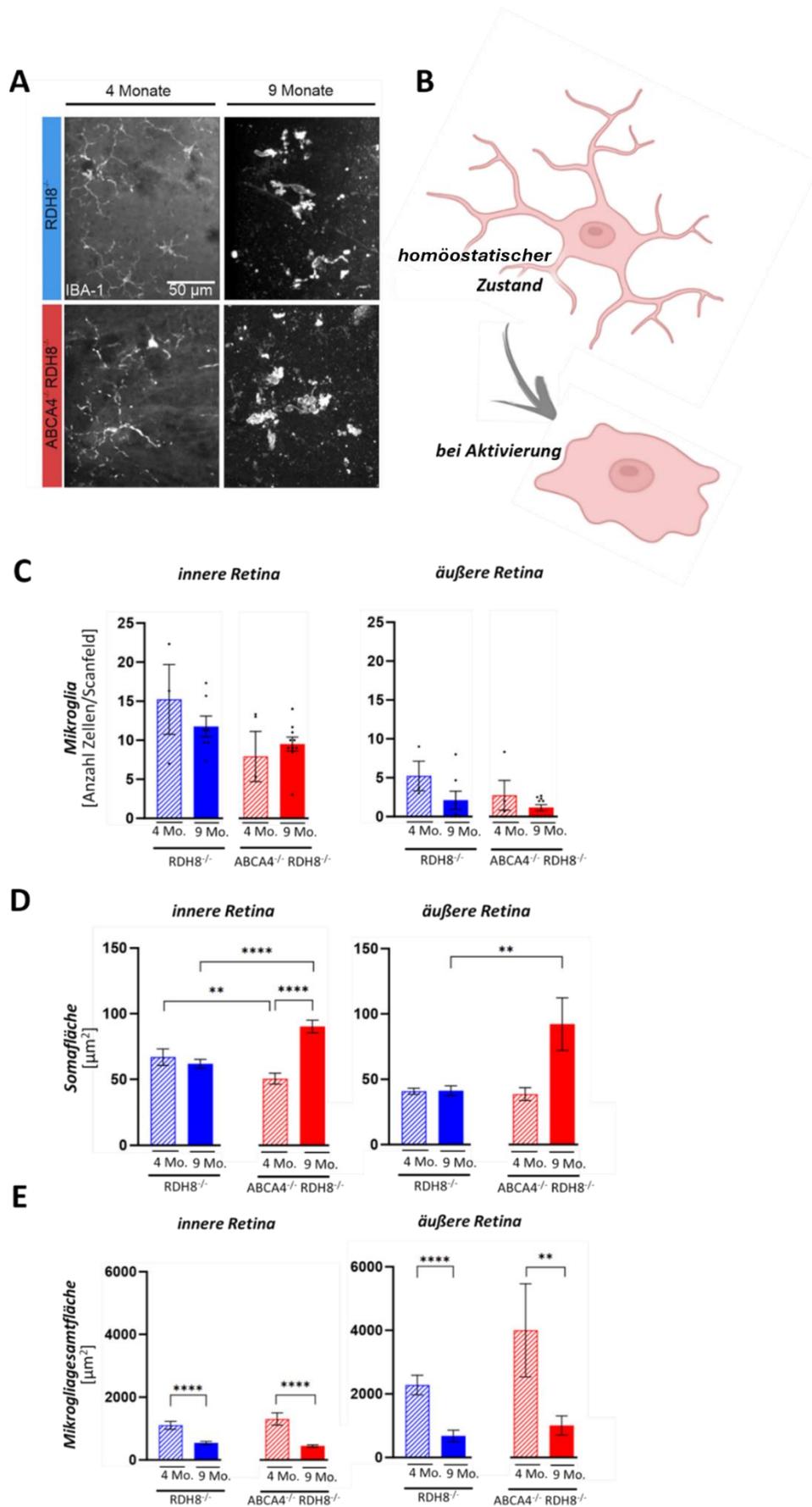


Abbildung 24: Analyse der Mikroglia-Aktivierung in 4 und 9 Monate alten ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout-Mäusen im Vergleich zum RDH8^{-/-}-Single-Knockout im retinalen Wholemount-Präparat. A: Repräsentative konfo-

*kalmikroskopische Aufnahmen von Immunfluoreszenzfärbungen für den Mikroglia-Marker IBA-1 in retinalen Whollemount-Präparaten. Eine vergrößerte Darstellung von Abbildung 24 A ist im Anhang D zu finden. B: Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen, die eine Mikrogliazelle bei Aktivierung durchläuft. Abbildung erstellt mit <https://BioRender.com>. C: Auszählung der Mikroglia pro Scan-Feld (etwa 0,2 mm²). D: Quantitative Analyse der Somafläche pro Mikrogliazelle. E: Quantitative Auswertung der Gesamtfläche, die pro Mikrogliazelle eingenommen wird. C-E: Im Balkendiagramm ist der Mittelwert ± SEM dargestellt. Es wurden n=4-10 Mikroglia von jeweils 6-9 Tieren pro Genotyp und Alter analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede gemäß Mann-Whitney U-Test. *: p < 0,05. **: p < 0,01. ***: p < 0,001. ****: p < 0,0001. 4 Mo: 4 Monate alt. 9 Mo: 9 Monate alt.*

3.2.3 Anzeichen neuronaler Degeneration in 9 Monate alten ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Mäusen

Die Arbeitsgruppe um Dr. Maeda berichtete über die frühe Manifestation der Netzhautdegeneration bei ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout-Mäusen in Form einer reduzierten Photorezeptorschichtdicke bzw. -kernzahl bereits im Alter von drei Monaten (Maeda et al., 2008). Andere Arbeiten konnten bei ABCA4^{-/-}-Albinomäusen eine Degeneration der äußeren Körnerschicht beginnend ab 8 Monaten (Wu et al., 2010) und der Ganglienzellschicht nach 6 Monaten (Jabri et al., 2020) nachweisen. Vor dem Hintergrund, dass Maeda et al. (2008) eine stärkere Degeneration in den zentralen inferioren als in den superioren Netzhautarealen postulierten, untersuchte ich bei den 9 Monate alten Tieren zusätzlich differenziert die superior und inferior zum Nervus opticus gelegenen Retinaabschnitte. Für den Vergleich mit den 4 Monate alten Tieren wurde der Mittelwert aus beiden Messwerten verwendet.

In 4 Monate alten Tieren war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen im Rahmen der morphometrischen Auswertungen nachweisbar (Abbildung 25). Bei den 9 Monate alten Tieren zeigte sich im Vergleich zu den 4 Monate alten Tieren eine tendenziell leichte, aber meist nicht signifikante Zunahme in der Anzahl der Zellkerne in allen drei Kernschichten der Retina (Abbildung 25 B). In allen untersuchten Schichten der Netzhaut, mit Ausnahme der Ganglienzellschicht, wiesen die ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout-Mäuse im Alter von 9 Monaten eine um durchschnittlich 10-20% geringere Anzahl von Zellkernen auf als die RDH8^{-/-}-Single-Knockout-Mäuse. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Dagegen nahmen die Dicken der einzelnen Schichten der Retina, und hier insbesondere die der plexiformen Schichten, deutlich ab (Abbildung 25 C, D). ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout-Mäuse zeigten hier im Vergleich stärkere relative Abnahmen der Schichtdicken um durchschnittlich etwa 40-50% in den plexiformen Schichten, welche bei RDH8^{-/-}-Tieren jeweils um etwa 30% geringer war.

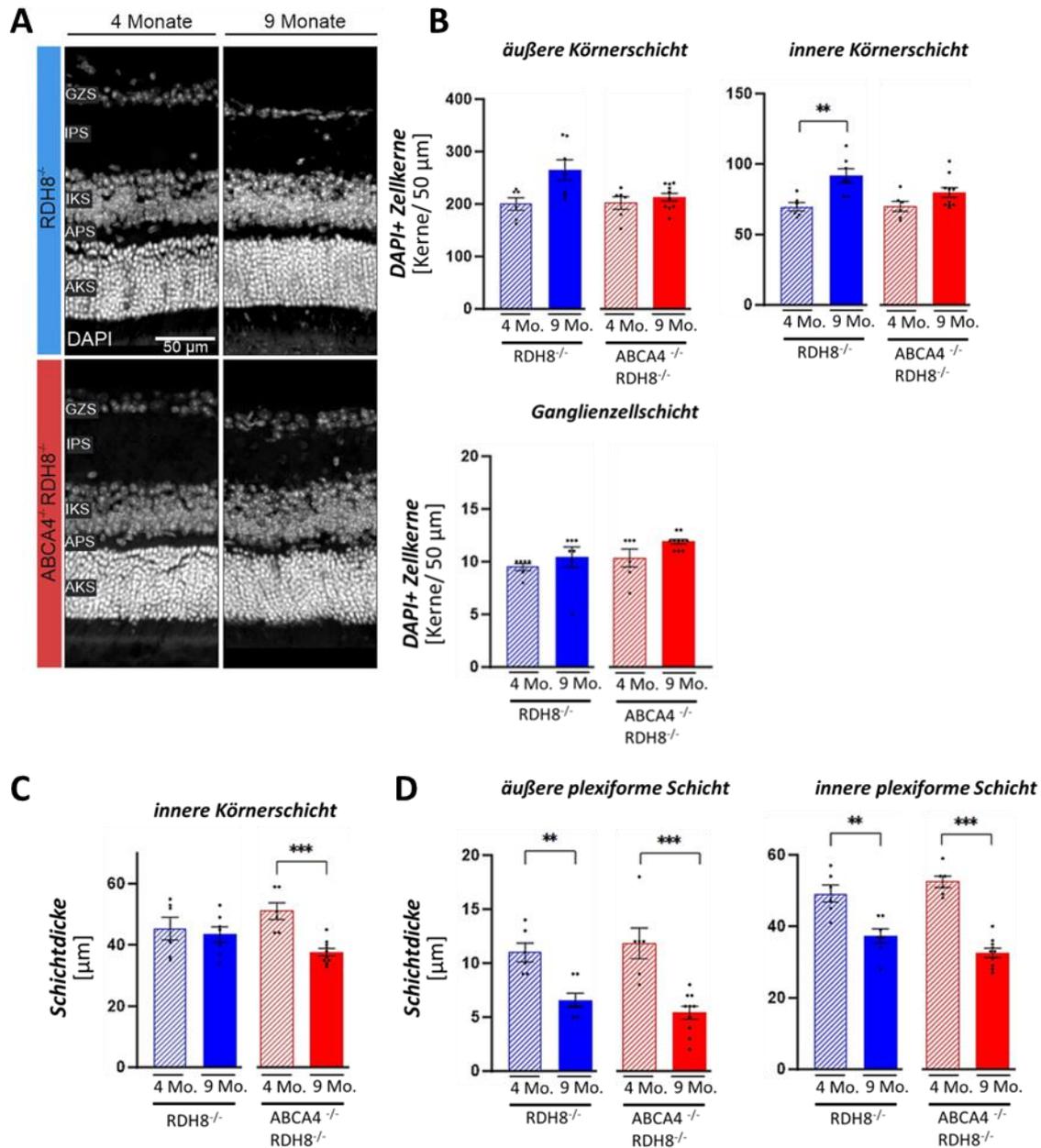


Abbildung 25: Morphometrische Analyse der Retinae von $ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}$ -Doppel-Knockout-Mäusen im Vergleich zu $RDH8^{-/-}$ -Single-Knockout-Mäusen im Alter von 4 und 9 Monaten. **A:** Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen der DAPI-Färbung in retinalen Sagittalschnitten. **B:** Auszählung DAPI-positiver Zellkerne pro 50 μm Retinabreite. **C:** Ausmessung der Schichtdicke der inneren Körnerschicht. **D:** Quantitative Analyse der Schichtdicken der plexiformen Schichten als Ausdruck synaptischer Integrität. **B-D:** Im Balkendiagramm ist der Mittelwert \pm SEM dargestellt. Pro Genotyp und Alter wurden $n=6-10$ Tiere analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede gemäß Mann-Whitney U-Test. *: $p < 0,05$. **: $p < 0,01$. ***: $p < 0,001$. 4 Mo: 4 Monate alt. 9 Mo: 9 Monate alt. GZS: Ganglienzellschicht; IPS: innere plexiforme Schicht; IKS: innere Körnerschicht; ÄPS: äußere plexiforme Schicht; ÄKS: äußere Körnerschicht.

3.2.4 Retinale Veränderungen nach Exposition gegenüber verschiedenen Lichtbedingungen bei 9 Monate alten Tieren

Bei 9 Monate alten Mäusen erfolgte zusätzlich eine Differenzierung zwischen Tieren, deren Käfige sich während der Haltung an lichtexponierten Orten (oberste Reihe im Regal) befanden, und solchen, in deren Käfigen lagerungsbedingt der Lichteinfall geringer war (unterste Reihe im Regal). Tiere mit höherer Lichtexposition zeigten im Mittel höhere RPE-

Autofluoreszenz-Werte als Tiere mit niedriger Lichtexposition (Abbildung 26 A, B), wobei ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout-Mäuse konsistent höhere Werte aufwiesen. Der Unterschied zwischen den Genotypen war jedoch nicht signifikant.

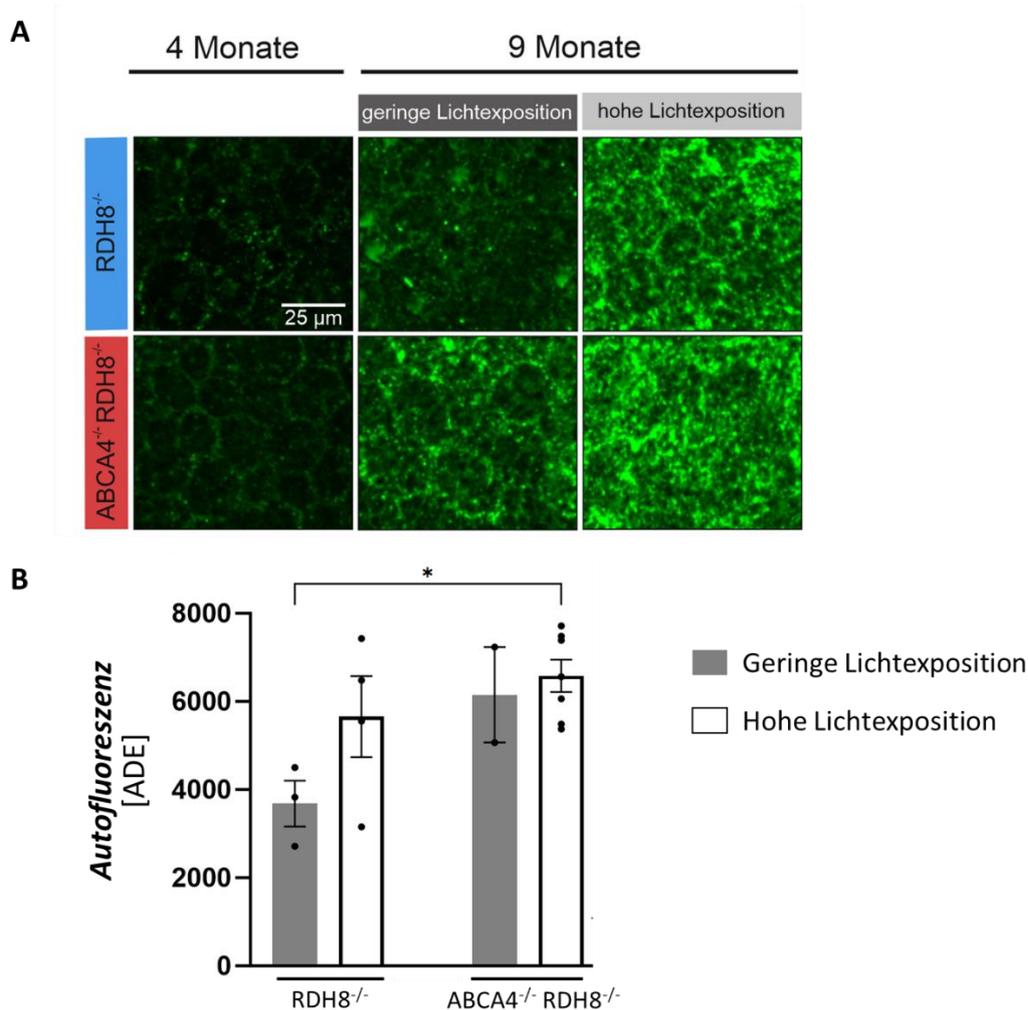


Abbildung 26: Messung der Autofluoreszenz in Wholmount-Präparaten des retinalen Pigmentepithels von ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout-Tieren im Vergleich zum RDH8^{-/-}-Single-Knockout nach Haltung bei hoher und niedriger Lichtexposition. **A**: Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen von autofluoreszenten RPE-Wholmount-Präparaten. **B**: Quantitative Analyse der RPE-Autofluoreszenz. Im Balkendiagramm ist der Mittelwert ± SEM dargestellt. Pro Genotyp und Lichtbedingung wurden n=2-7 Tiere analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede gemäß Mann-Whitney U-Test. *: p < 0,05. ADE: arbiträre digitale Einheit.

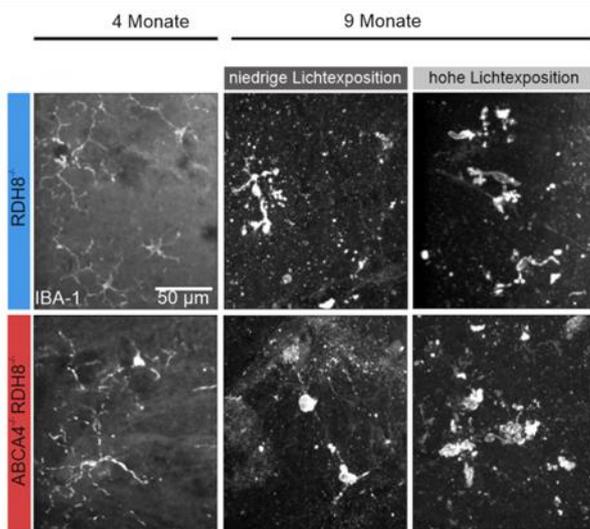
Eine höhere Lichtexposition führte in der inneren und der äußeren Retina insbesondere bei den RDH8^{-/-}-Single-Knockout-Mäusen zu einem durchschnittlich 1,5-fachen Anstieg der Mikroglia-Zellzahl (Abbildung 27 A, B). Ein ähnlicher Einfluss der Lichtexposition zeigte sich in den Messungen der Somagröße und der Gesamtfläche, die Mikroglia im Gewebe einnahmen, nur bei den RDH8^{-/-}-Single-Knockout-Mäusen und speziell in der inneren Retina. Hier konnte durchschnittlich eine Zunahme der Somagröße um 43% (Abbildung 27 C) und eine Abnahme der Gesamtfläche um 52% (Abbildung 27 D) im Vergleich zu den entsprechenden Tieren unter geringerer Belichtung registriert werden. Die Veränderungen dieser drei Parameter lassen auf einen verstärkten Aktivierungszustand der Mikroglia unter höherer Lichtex-

position schließen. Bei den ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout-Tieren konnte eine solche Korrelation nur in der äußeren Retina beobachtet werden, jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant (Abbildung 27).

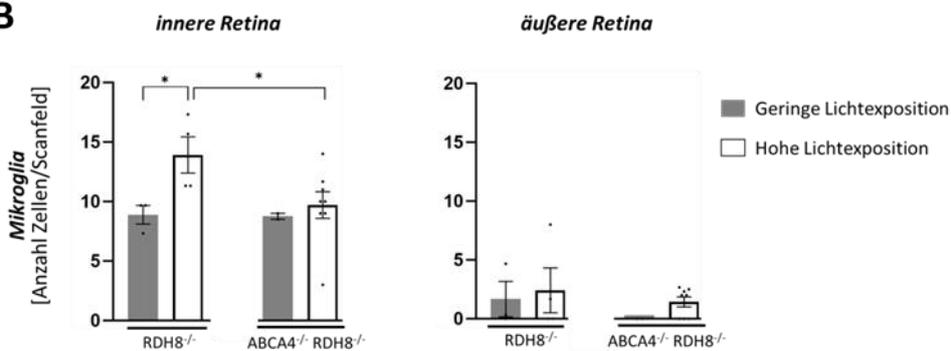
Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen unter vergleichbaren Lichtbedingungen waren hauptsächlich in der inneren Retina unter niedrigerer Lichtexposition zu beobachten. Bei niedrigerer Lichtexposition kamen Mikroglia in den ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout-Retinae mit etwa doppelt so großem Soma und halb so großer Gesamtfläche wie bei RDH8^{-/-}-Mäusen vor (Abbildung 27 C). Diese Unterschiede weisen darauf hin, dass die Mikroglia bei ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout-Mäusen einen stärkeren Aktivierungszustand als jene bei RDH8^{-/-}-Single-Knockout-Mäusen aufweisen, allerdings war es noch zu keinem Anstieg der Zellzahl gekommen (Abbildung 27 B). Diese war unter höherer Lichtexposition in der inneren Retina mit 30% Unterschied sogar signifikant niedriger als bei RDH8^{-/-}-Single-Knockout-Mäusen (Abbildung 27 B).

Bemerkenswert ist, dass bei Tieren mit ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout unter niedriger Lichtexposition keine Mikroglia in den äußeren Abschnitten der Retina zu verzeichnen waren, weshalb in diesen äußeren Abschnitten der Retina auch kein Vergleich zwischen den Genotypen bei niedriger Lichtexposition möglich war (Abbildung 27 B). Hier betrug die Somafläche bei höherer Lichtexposition 120% mehr bei ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout-Tieren als bei Tieren mit RDH8^{-/-}-Single-Knockout-Hintergrund (Abbildung 27 C). Hinsichtlich der weiteren untersuchten Parameter stellten sich bei großen Varianzen keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen dar.

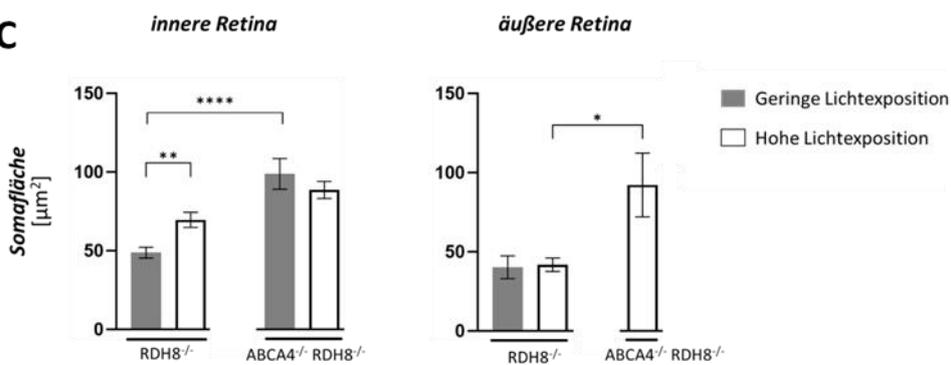
A



B



C



D

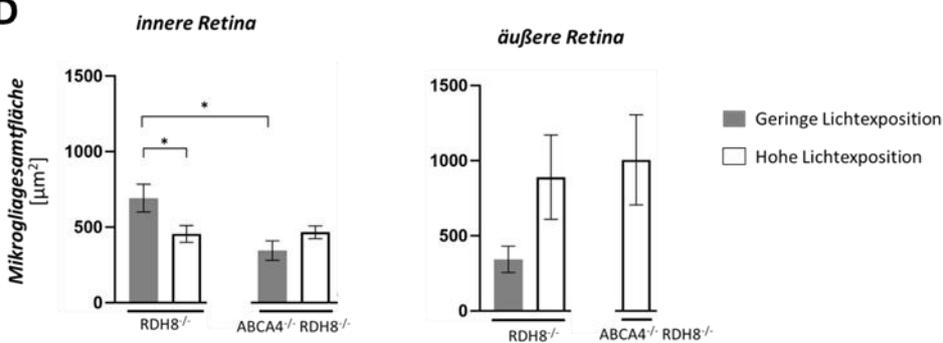


Abbildung 27: Mikroglia-Aktivierung unter verschiedenen Lichtbedingungen im 9 Monate alten ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout- im Vergleich zum RDH8^{-/-}-Single-Knockout-Mausmodell. A: Immunhistochemische IBA-1-Färbung auf retinalen Wholemount-Präparaten. Eine vergrößerte Darstellung von Abbildung 27 A ist im Anhang E

zu finden. **B:** Auszählung der Mikroglia pro Scan-Feld (etwa 0,2 mm²). **C:** Quantitative Analyse der Somafläche pro Mikrogliazelle. **D:** Quantitative Auswertung der Gesamtfläche, die pro Mikrogliazelle eingenommen wird. **B-D:** Im Balkendiagramm ist der Mittelwert ± SEM dargestellt. Es wurden jeweils n=1-10 Mikroglia bei 2-8 Tieren pro Genotyp und Lichtbedingung analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede gemäß Mann-Whitney U-Test. *: p < 0,05. **: p < 0,01. ***: p < 0,001. ****: p < 0,0001.

Eine erhöhte Lichtexposition war bei beiden Genotypen nicht mit einem Verlust an Zellkernen oder der retinalen Schichtdicke assoziiert (Abbildung 28). Auch nach Differenzierung bezüglich der Lichtbedingungen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden.

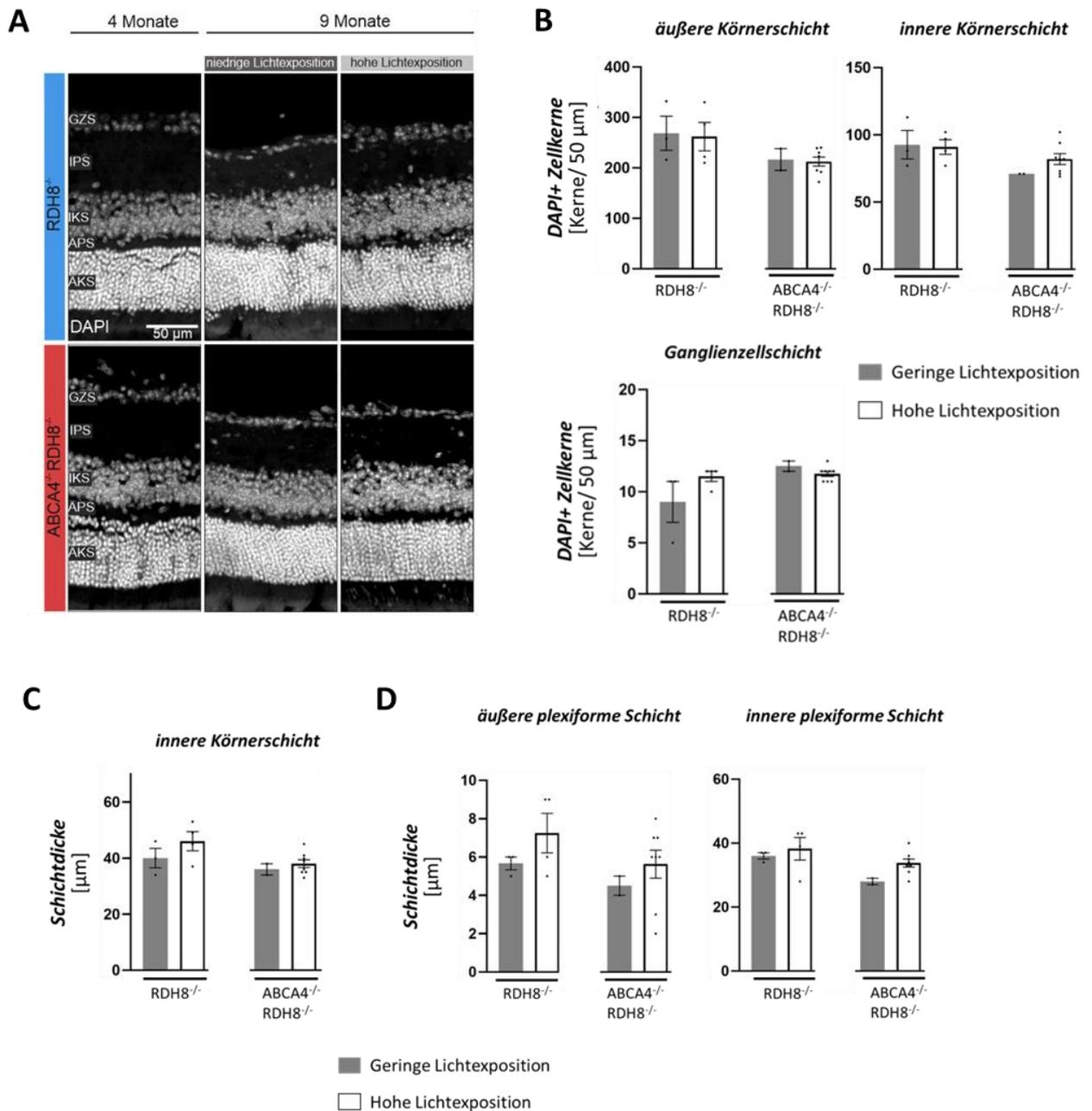


Abbildung 28: Morphometrische Analyse von 9 Monate alten ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout-Mäusen im Vergleich zu RDH8^{-/-}-Single-Knockout-Mäusen unter verschiedenen Lichtbedingungen. **A:** Repräsentative konfokal-

mikroskopische Aufnahmen der DAPI-Färbung in sagittalen Schnitten der zentralen Retina. **B:** Auszählung DAPI-positiver Zellkerne pro 50 μm Retinabreite. **C:** Ausmessung der Schichtdicke der inneren Körnerschicht. **D:** Quantitative Analyse der Schichtdicken der plexiformen Schichten als Ausdruck synaptischer Integrität. **B-D:** Im Balkendiagramm ist der Mittelwert \pm SEM dargestellt. Pro Genotyp und Lichtbedingung wurden $n=2-8$ Tiere analysiert. Analyse statistisch signifikanter Unterschiede gemäß Mann-Whitney U-Test.

3.2.5 Morphometrische Auswertung der 9 Monate alten Tiere differenziert nach Netzhautarealen: Nachweis lokaler Unterschiede der Netzhautdegeneration

Es konnten keine Unterschiede in der Ausprägung der Degeneration zwischen superioren und inferioren Netzhautarealen festgestellt werden (Abbildung 29). Beim Vergleich der inferioren Retinaabschnitte wiesen ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Mäuse jedoch eine um 20% geringere Zahl DAPI-positiver Zellkerne in der äußeren Körnerschicht sowie eine um 16% geringere Schichtdicke der inneren plexiformen Schicht als RDH8^{-/-}-Tiere auf (Abbildung 29 A). Die bereits beschriebenen Tendenzen zu reduzierter Zellkernzahl und Schichtdicke bei ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout-Mäusen (Abbildung 25) werden hier bestätigt, die Unterschiede waren abgesehen von den beschriebenen Fällen jedoch auch nach lokaler Differenzierung der Retinaabschnitte nicht signifikant.

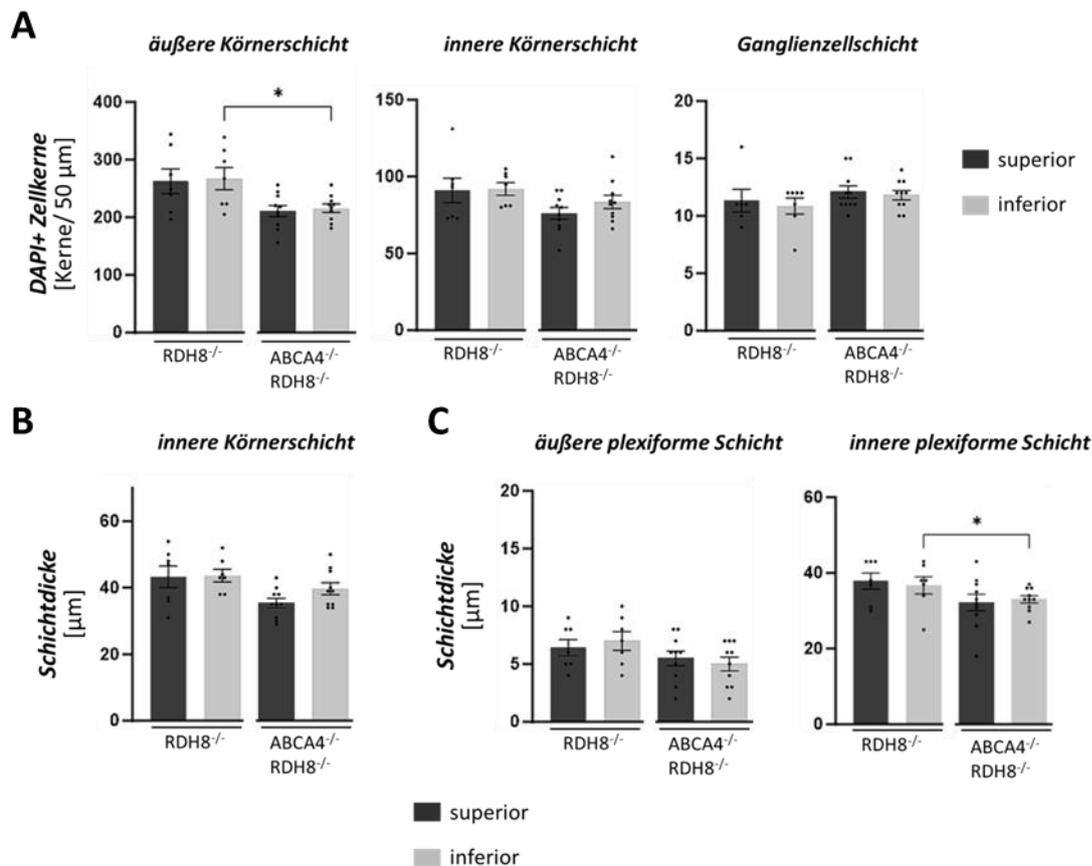


Abbildung 29: Vergleich von superior und inferior des Nervus opticus gelegenen Retinaabschnitten im Abstand von etwa 200 μm zum Sehnerv in 9 Monate alten ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout- und RDH8^{-/-}-Single-Knockout-Mäusen. **A:** Vergleich der Anzahl DAPI-positiver Zellkerne pro 50 μm Retinadicke. **B:** Ausmessung der Schichtdicke der inneren Körnerschicht. **C:** Quantitative Analyse der Schichtdicken der plexiformen Schichten. **A-D:** Im Balkendiagramm ist der Mittelwert \pm SEM dargestellt. Pro Genotyp wurden $n=7-10$ Tiere analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede gemäß Mann-Whitney U-Test. *: $p < 0,05$.

4 Diskussion

4.1 Wirksamkeit der miniFH-Genadditionstherapie im akuten retinalen Ischämie-/ Reperfusionmodell

4.1.1 Protektive Wirkung von miniFH auf den sekundären Zelltod nach Ischämie/ Reperfusion

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Möglichkeiten und Grenzen eines Therapieansatzes mit Applikation von humanem, Codon-optimiertem Komplementfaktor H im Mausmodell retinaler Ischämie/ Reperfusion untersucht. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Grosche konnte ich zeigen, dass das miniFH-Überexpressionssystem eine effektive und spezifische Transduktion von Müllerzellen erlaubt und im akuten Schädigungsmodell der retinalen Ischämie mit anschließender Reperfusion ein verbesserter Erhalt retinaler Strukturen/ Neurone erreicht wird (Biber et al., 2024).

Hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs wurden für den frühen Analysezeitpunkt (3 Tage nach Ischämie/ Reperfusion) therapeutische Effekte auf pro-inflammatorische Parameter wie GFAP-Expression in Müllerzellen, eine verstärkte Mikroglia-Aktivierung, die Ablagerung von C3-Spaltprodukten sowie die Apoptoserate erwartet, während ein protektiver Effekt auf morphometrische Parameter (insbesondere über die Anzahl überlebender Nervenzellen, zu verstehen als Marker für den sekundären Zelltod) erst für den späteren Analysezeitpunkt (14 Tage nach Ischämie/ Reperfusion) zu erwarten war.

4.1.1.1 Validierung einer stabilen Transduktion und miniFH-Expression in Müllerzellen

Das bei Schmidt et al. (2013) vorgestellte miniFH wurde in diesem Versuchsaufbau modifiziert durch das Anfügen eines Signalpeptids und eines Epitop-Tags sowie durch die Erweiterung um die funktionellen Domänen 6 und 7 in einer der beiden Varianten. Die miniFH-Expressionskonstrukte wurden in adeno-assoziierte virale Vektoren integriert, welche über eine intravitreale Injektion eine sichere Transduktion von Müllerzellen gewährleisten.

Zudem konnten wir eine seltene Transduktion bzw. Expression von EGFP auch in Astrozyten finden, welche bereits in der gesunden Retina große Mengen an GFAP exprimieren (Biber et al., 2024) und somit natürlich auch nach Transduktion durch unsere Vektoren über den GFAP-Promotor vermittelt das Transgen exprimieren. Da Astrozyten als zweiter Makrogliazelltyp der Netzhaut ähnlich den Müllerzellen als eng mit Nervenzellen (vor allem Ganglienzellen) interagierend bzw. als unterstützend angesehen werden, ist dieser Befund nicht beunruhigend, sondern eher positiv zu bewerten.

In einem vorausgegangenen *in-vitro*-Versuchsaufbau konnten beide FH-Varianten entsprechend ihrer zu erwartenden Größe von 44 und 68 kDa im Überstand und Zellysate transfizierter HEK293-Zellen detektiert werden, EGFP hingegen nur im Zellysate (Biber et al., 2024).

Dies lässt darauf schließen, dass die FH-Varianten erfolgreich sezerniert und nicht lediglich durch Ruptur der Zellen freigesetzt wurden (Biber et al., 2024). Im *in-vivo*-Experiment waren miniFH-Transkripte aus Müllerzellen im geringen Maß bereits nach 3, sehr viel stärker nach 14 Tagen nach AAV-Injektion nachweisbar (Biber et al., 2024), was eine frühe Expression des therapeutischen Transgens bestätigt. Die mRNA-Level von endogenem (Maus-)FH hingegen waren postischämisch in Müllerzellen und Neuronen nachweislich erniedrigt, unabhängig davon, mit welchem Virus das Auge injiziert worden war (Biber et al., 2024). Vor diesem Hintergrund erscheint die Gabe von exogenem Komplementfaktor H besonders sinnvoll und im Sinne einer anti-inflammatorischen Therapie vielversprechend.

4.1.1.2 miniFH-Überexpression führt zu reduzierter Inflammation nach retinaler Ischämie/ Reperfusion

Die GFAP-Immunreaktivität in Müllerzellen als sensibler Marker für eine retinale Schädigung stieg erwartungsgemäß nach Ischämie auf das Zehn- bis Zwanzigfache der Ausgangswerte an. Hier konnten keine Vorteile einer Behandlung mit miniFH aufgezeigt werden. Die weiterhin hohen GFAP-Level nach 2 Wochen stehen im Einklang mit den Ergebnissen der quantitativen PCR (qPCR) zum Nachweis der GFAP-Expression bei Müllerzellen auf Transkript-Ebene bei Biber et al. (2024), wo auch eine positive Korrelation zwischen GFAP- und EGFP-Expression in allen drei Behandlungsgruppen gezeigt werden konnte. Da hier auch die Kontrollaugen vergleichsweise hohe GFAP-Level zu verzeichnen hatten, wird eine mögliche immunologische Reaktion auf den viralen Vektor, das humane Transgen und/ oder Kontaminationen als Ursachen der hohen und hoch bleibenden Werte dieses retinalen Inflammationsmarkers diskutiert (Biber et al., 2024). Die im vorgestellten Ansatz verwendeten AAVs wurden zwar durch Polyethylenglykol-Präzipitation, Iodixanol-Gradienten und DNase-Einsatz aufgereinigt und dies durch Gelelektrophorese überprüft, jedoch ist trotz aller Sorgfalt eine immunologische Reaktion auf das zu injizierende Viruspräparat nicht zu vermeiden (Biber et al., 2024). Das Phänomen einer (unterschiedlich stark ausgeprägten) okulären Inflammation infolge der Applikation von viralen Vektoren in das Auge lässt sich in der Tat auch im klinischen Einsatz am Menschen beobachten. Okuläre Gentherapie zieht bei den meisten Patienten zwar nur eine leichte Entzündungsreaktion nach sich, die in den meisten Fällen durch topische oder systemische Glukokortikoide zu beherrschen ist, doch auch schwere Verläufe, die das Sehvermögen nachhaltig einschränken können, sind möglich (Ghoraba et al., 2022). Es scheint hier einen Zusammenhang zwischen der Schwere und Art der Immunreaktion und Faktoren wie der Applikationsform (intravitreal versus subretinal), der zugrundeliegenden okulären Pathologie und der Dosis eingebrachter viraler Vektoren zu geben (Ghoraba et al., 2022), (Chan et al., 2021).

Hinsichtlich Mikroglia-Aktivierung infolge der ischämischen Läsion zeigte sich ein deutlicher Anstieg des Aktivierungsparameters CD68 auf etwa das Dreifache, was bereits vorherbeschrie-

ben war (Abcouwer et al., 2021). Von 3 auf 14 Tage kam es zu einem Rückgang der CD68-Intensität. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit dem Befund unserer Arbeit über die postischämische Zunahme der Anzahl IBA-1-positiver Mikroglia, welche nach 14 Tagen bereits wieder abebbte (Biber et al., 2024). Aus Experimenten an Gehirnen von Ratten ist bekannt, dass die IBA-1/AIF-1-Expression 3,5 Stunden nach Wiedereröffnung der okkludierten Arteria cerebri media ansteigt und ihren Höhepunkt nach sieben Tagen erreicht (Ito et al., 2001). Zu diesem Zeitpunkt finden sich auch die meisten IBA-1-positiven Mikrogliazellen (Ito et al., 2001). Nach 14 Tagen kommt es zur Abnahme der Werte (Ito et al., 2001). Ich konnte zeigen, dass die Tiere der beiden miniFH-Behandlungsgruppen bereits 3 Tage nach Läsion signifikant niedrigere CD68-Immunfluoreszenz-Intensitäten aufwiesen als die Mäuse der Behandlungsgruppe **EGFP**. Nach 14 Tagen kam es in der Gruppe **FH1-4¹⁹⁻²⁰** zu einem Rückgang des Aktivierungsparameters bis fast auf das Niveau nichtischämischer Kontrollaugen und damit auf signifikant niedrigere Werte als in den anderen beiden Behandlungsgruppen. Mikroglia exprimieren insbesondere den Komplementrezeptor 3 CR3 (CD11b/CD18), über welchen iC3b und C3dg detektiert und Phagozytose und Mikroglia-Aktivierung reguliert werden (Kim et al., 2021). Infolge von Läsionen verschiedener Art wird die Expression von CR3 hochreguliert (Streit et al., 1999). Die deutlichen Ergebnisse in Hinblick auf Mikroglia-Aktivierung sind in diesem Sinne nicht überraschend, sondern legen nahe, dass Mikroglia schneller und empfindlicher auf Veränderungen in der Komplementhomöostase reagieren könnten als Müllerzellen.

Des Weiteren weisen die Daten meiner Kollegen darauf hin, dass die AIF-1-mRNA-Expression gemäß qPCR-Analyse bei Tieren, die mit **FH1-4¹⁹⁻²⁰** behandelt worden waren, 14 Tage nach Läsion signifikant niedriger war als bei den Vergleichstieren, denen der Kontrollvektor injiziert worden war (Biber et al., 2024). AIF-1 (allograft inflammatory factor-1) ist auch bekannt als IBA-1 (Deiningner et al., 2002).

Mithilfe einer immunhistochemischen GFAP-/C3d-Kofärbung konnte ich Ablagerungen von C3-Spaltprodukten in Müllerzellendfüßen zeigen. Diese Beobachtung deckt sich mit den Erkenntnissen bei Schäfer et al. (2017), die im Mausmodell mit akutem und anhaltendem Lichtschaden ebenfalls eine Kolo-kalisierung der C3d- und GFAP-Signale feststellten. Meine quantitative Analyse des Signals dokumentiert eine postischämische Zunahme von C3-Spaltprodukten, welche nach 14 Tagen wieder zurückging. Zudem fand ich Hinweise auf geringere C3-Ablagerungen in den Gruppen **FH1-4¹⁹⁻²⁰** und **FH1-7¹⁹⁻²⁰** im Vergleich zur Gruppe **EGFP** nach 14 Tagen. Die Unterschiede waren auch zum 14-Tages-Zeitpunkt nachweisbar, aber nicht signifikant. Für die Gruppe **FH1-4¹⁹⁻²⁰** zeigte sich eine signifikante Reduktion der C3-Ablagerung sogar bereits nach 3 Tagen. Hier schien überdies die initiale postischämische Komplement-„Flut“ deutlich abgemildert worden zu sein, da die Werte vergleichbar mit jenen der nicht-ischämischen Kontrollaugen waren. Dies unterstützt unsere

Hypothese zum Therapiekonzept einer verminderten C3b-Spaltung, vermittelt durch Faktor I und Faktor H. Westernblot-Analysen meiner Kollegen bestätigen zudem einen geringeren postischämischen Anstieg des C3b/C3-Verhältnisses bei miniFH-behandelten Tieren im Vergleich zu den Tieren der **EGFP**-Gruppe (Biber et al., 2024). Ein Anstieg ebendieses Verhältnisses kann als Zeichen der Komplementaktivierung interpretiert werden, indem intaktes C3 in seine Spaltprodukte, darunter C3b, zerteilt wird (Biber et al., 2024). Postischämische Augen der Gruppen **FH1-4¹⁹⁻²⁰** und **FH1-7¹⁹⁻²⁰** wiesen darüber hinaus in Westernblot-Analysen geringere Mengen der Spaltprodukte iC3b, C3dg und C3d auf als die Augen der Gruppe **EGFP** (Biber et al., 2024).

Zusammenfassend zeigen meine Daten und die meiner Kollegen, dass es nach Läsionen durch transiente Ischämie zu einer akuten Aktivierung des Komplementsystems kommt, die mit der Zeit abklingt und durch Applikation von miniFH-exprimierenden AAVs gedämpft werden kann.

4.1.1.3 Verzögerter Therapieeffekt der miniFH-Überexpression auf zelluläres Überleben

TUNEL-positive Zellen waren postischämisch zunächst zahlreich, ihre Anzahl nahm im Laufe von zwei Wochen deutlich ab. Es war zu beobachten, dass die Apoptoseraten der miniFH-Behandlungsgruppen erst nach 14 Tagen tendenziell niedriger waren als bei den entsprechenden **EGFP**-Tieren, wobei insbesondere die stärkere Abnahme der Apoptoseraten von 3 auf 14 Tage bei den **EGFP**-Tieren hervorzuheben ist. In den nicht-ischämischen Kontrollaugen wurden TUNEL-Raten von maximal 2% registriert, was als Hinweis auf eine relativ sichere Applikation durch intravitreale Injektion des Virus zu werten ist. Es ist hervorzuheben, dass der TUNEL-Assay nicht sicher zwischen Apoptose und Nekrose unterscheiden kann (Chimata et al., 2022). Die Beobachtung sehr hoher Raten TUNEL-positiver Zellen nach 3 Tagen ist höchstwahrscheinlich auf einen ersten Peak absterbender Zellen direkt infolge von Ischämie/ Reperfusion zurückzuführen. Unterschiede bei der morphometrischen Auswertungen fanden sich erst nach 14 Tagen. Dies unterstützt unsere Hypothese, dass die miniFH-Therapie zwar nicht den direkten, ischämiebedingten Zelltod beeinflussen oder reduzieren kann, wohl aber den sekundären Zelltod, der durch eine überschießende, andauernde Entzündung verursacht wird.

Diese Hypothese wurde unterstützt durch meine morphometrische Analyse, die neben einem starken Zellverlust infolge der Ischämieperiode kontinuierliche Abnahmen der Zellzahlen DAPI-positiver Zellkerne im Laufe der Zeit aufzeigte.

14 Tage nach Ischämie/ Reperfusion konnte ein protektiver Einfluss von miniFH auf den Erhalt der Schichtdicken der plexiformen Schichten als Ausdruck von synaptischer Integrität gesichert werden. Aus der Alzheimer-Forschung ist bekannt, dass das Komplementsystem zum Abbau von Synapsen im Gehirn beiträgt und dass C3-Defizienz den frühen Verlust von

Synapsen im Mausmodell reduziert (Hong et al., 2016). Die Relevanz des Zusammenhangs zwischen synaptischer Integrität und Dysregulation der Komplementaktivität wird hier nochmals deutlich und zeigt auf, dass ein Komplement-modulierender Therapieansatz über retinale Pathologien hinaus von Bedeutung sein kann.

Bei Calretinin-positiven Zellen hingegen kam es vom 3-Tages- zum 14-Tages-Zeitpunkt nach zunächst postischämisch erniedrigten Zellzahlen zu einem Wiederanstieg des Fluoreszenzsignals, insbesondere der Amakrinzellen in der inneren Körnerschicht, was Lee et al. (2011) ähnlich beobachtet hatten. Sie beschrieben eine Abnahme Calretinin-positiver Zellen von etwa 30% drei Tage nach Ischämie/ Reperfusion in der Retina von Ratten, nach 14 Tagen jedoch bereits wieder einen Anstieg der Zellzahl (Lee et al., 2011).

Calretinin-positive Ganglienzellen und Amakrinzellen blieben nach einer Injektion mit *AAV_FH1-4¹⁹⁻²⁰* oder *AAV_FH1-7¹⁹⁻²⁰* tendenziell in höherer Zahl erhalten. Die Auswertung zeigt somit ein ähnliches Bild wie die Quantifizierung der DAPI-positiven Kerne zum 14-Tages-Zeitpunkt: Eine Tendenz hin zur Überlegenheit einer Injektion mit *AAV_FH1-4¹⁹⁻²⁰* oder *AAV_1-7¹⁹⁻²⁰* im Sinne von effektivem Erhalt von Ganglien- und Amakrinzellen im Vergleich zur Verabreichung von *AAV_EGFP* zeigte sich erneut insbesondere nach 14 Tagen. Es muss allerdings nochmals darauf hingewiesen werden, dass unter hohen Varianzen keine signifikanten Unterschiede auftraten. Hervorzuheben ist, dass sich die miniFH-Behandlung in jeweils einer der beiden Versionen bereits nach 3 Tagen positiv auf das Überleben von Calretinin-positiven Ganglien- und Amakrinzellen auszuwirken schien. Diese Beobachtung ist insofern sinnvoll, als dass das Ischämiemodell vor allem die inneren Schichten der Netzhaut betrifft und hier Therapieeffekte am deutlichsten erwartbar sind bzw. sichtbar werden.

Hinweise auf die Frage, wo miniFH nach seiner Sekretion seine Wirkung entfaltet, lieferte die FH/IBA-1-Kofärbung. FH-positive Mikroglia zeigten sich nur in miniFH-behandelten ischämischen Augen. Da der FH-Antikörper nicht spezifisch gegen humanes FH gerichtet ist, wäre es auch prinzipiell möglich, hier endogenes Maus-FH detektiert zu haben. Hinzu kommt, dass sich das myc-Tag wider Erwarten nicht sicher immunhistochemisch darstellen ließ, über welches das transgene miniFH spezifisch hätte detektierbar sein sollen. Inwiefern und über welche Mechanismen Komplementfaktor H in bzw. an Mikroglia akkumuliert, ist noch weitgehend unerforscht. Im Folgenden werden einige Auszüge aus der derzeitigen Kontroverse zu diesem Thema dargestellt: Enzbrenner et al. publizierten ebenfalls ihre Beobachtung über die Co-Lokalisation von Komplementfaktor H und Mikroglia in einem retinalen Degenerationsmodell mit Komplementaktivierung (Enzbrenner et al., 2021), (Biber et al., 2024). Calippe et al. postulierten, dass die Bindung von Komplementfaktor H an mononukleäre Phagozyten wie Mikroglia und Makrophagen deren Inaktivierung inhibiere und somit einen Zustand chro-

nischer subretinaler Inflammation aufrechterhalte, der in der Pathogenese der AMD typisch ist. Dieser Zusammenhang konnte mit besonderer Dynamik für die Y402H-Variante des Komplementfaktor H gezeigt werden, welche viele AMD-Patienten tragen (Calippe et al., 2017), (Biber, et al., 2024). Nissilä et al. beschrieben eine Interaktion von Komplementfaktor H und Apolipoprotein E mit peripheren Blutmonozyten im Rahmen der Atherosklerosepathogenese, wobei Komplementfaktor H die Progression der Erkrankung zu unterdrücken scheint (Nissilä et al., 2018), (Biber et al., 2024). Es wird also deutlich, dass in Zukunft noch weitere Untersuchungen nötig sind, um die teils kontroversen Befunde über die Bedeutung von Mikroglia in der Retina zu klären, was allerdings über den Rahmen meiner Arbeit hinausgeht.

4.1.2 Vergleich des Wirkprofils der zwei miniFH-Varianten im akuten Ischämie-/ Reperfu-sionsmodell

Die Variante **FH1-7^Δ19-20** hatte sich in *in-vitro*-Experimenten hinsichtlich der Bindung an Glykosaminoglykane wie Heparin als überlegen gegenüber **FH1-4^Δ19-20** erwiesen (Biber et al., 2024). Eine verbesserte Erkennung körpereigener Strukturen war damit zu erwarten gewesen. In den *in vivo*-Analysen im Ischämie-/ Reperfu-sionsmodell zeigten die Mäuse, die mit **FH1-7^Δ19-20** behandelt worden waren, nach Ischämie/ Reperfusion Anzeichen höherer Entzündungsaktivität in Form von höheren Apoptoseraten im TUNEL-Assay nach 3 Tagen und vermehrter Ablagerung von C3-Spaltprodukten nach 3 Tagen im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen. Während sich diese beiden Parameter nach 14 Tagen wieder normalisier-ten, waren hinsichtlich der Müllerzellgliose anhand der GFAP-Level nach 14 Tagen die höchsten Werte zu verzeichnen. CD68-Level als Ausdruck von Mikroglia-Aktivierung waren nach 3 Tagen zwar niedriger als in der Gruppe **FH1-4^Δ19-20**, zeigten nach 14 Tagen jedoch keinen weiteren Abfall wie in den anderen beiden Gruppen, sondern stagnierten und über-stiegen nun die Werte der **EGFP**-Tiere. Hinsichtlich der retinalen Integrität war **FH1-7^Δ19-20** jedoch zum 14-Tages-Zeitpunkt in Form von erhöhtem Zellüberleben in der DAPI- und der Calretinin-Färbung sowie in Form von gesteigertem Schichtdickenerhalt in der inneren ple-xiformen Schicht und der inneren Körnerschicht der **FH1-4^Δ19-20**-Variante leicht überlegen. Möglicherweise erzielt die **FH1-7^Δ19-20**-Variante also stärkere Therapieeffekte, wobei sie eine ausgeprägtere Entzündungsreaktion als die **FH1-4^Δ19-20**-Variante hervorzurufen scheint.

Insgesamt sind die Ergebnisse nicht ausreichend bzw. schlüssig genug, um eine eindeutige Aussage treffen zu können, welche der beiden miniFH-Varianten potenter ist, so dass wei-tere Vergleiche zum Beispiel in Modellen langsamerer Formen der Netzhautdegeneration sinn-voll sind.

4.1.3 Limitation des Experiments der miniFH-Effekte im akuten Ischämie-/ Reperfusionmodell der Retinadegeneration

Die Beurteilung der Therapieeffekte wurde durch die vergleichsweise geringe Anzahl der Versuchstiere, die zur Verfügung standen, und die hohe Varianz der Messparameter erschwert, die sicherlich teilweise auch auf den unterschiedlichen Schweregrad der ischämischen Läsionen zurückzuführen sind. Zu beachten ist hierbei, dass auch individuelle Prädispositionen und intraoperative Faktoren wie Körpertemperatur und Verabreichung der anästhetischen Medikamente Einfluss auf das individuelle Ausmaß der Läsion haben können (Hartsock et al., 2016). Eine Möglichkeit, solche Varianzen beim experimentellen Design mit einzubeziehen, bestünde in der Quantifizierung der Läsionsschwere im Rahmen eines Elektretinogramms (ERG), wie es häufig in Ischämie-/ Reperfusionsexperimenten praktiziert wird (Hartsock et al., 2016). Funktionseinschränkungen sind schon lange vor dem eigentlichen Verlust der entsprechenden Zelltypen im ERG darstellbar, sodass die diese Erkenntnisse genutzt werden könnten, um die quantitativen Studienergebnisse auf das ERG-ermittelte Degenerationsausmaß zu normalisieren. Der Ausschluss von Mäusen aus den Auswertungen, deren Retinae unverhältnismäßig schweren oder minimalen ischämischen Schaden erfahren hatten, könnte zum Sichtbarwerden feinerer Therapieeffekte beitragen.

In die Beurteilung der Effektstärke der Therapie mit miniFH sollte auch mit einfließen, dass meine Kollegen keine Interaktion von **FH1-4¹⁹⁻²⁰** mit Glykosaminoglykanen *in vitro* nachweisen konnten (Biber et al., 2024). Grund könnte eine mögliche Interferenz des myc-Tags an der Domäne 20 des Transgens sein. Die Erkennung polyanionischer (körpereigener) Oberflächen durch die Domänen 19 und 20 könnte dadurch möglicherweise behindert werden, da die Glykosaminoglykanbindung des originalen miniFH von Christoph Schmidt et al. (2013) (ohne myc-Tag) nicht reproduziert werden konnte (Biber et al., 2024).

Die hier vorgestellte Therapie stellt einen neuen Ansatz dar, dessen Einsatz im ischämischen Degenerationsmodell als grundlegende Machbarkeitsstudie angesehen werden sollte und weiterentwickelt werden kann. Eine möglicherweise modifizierbare Einflussgröße auf die Wirksamkeit könnte eine Optimierung der Müllerzelltransduktionsrate sein. Mit dem verwendeten ShH10-Kapsid können nur etwa 20% der Müllerzellen transduziert werden (Klimczak et al., 2009), während die Y445F-Version des ShH10-Kapsids in Retinae von Ratten Transduktionsraten von 53% erreichte (Dalkara et al., 2011). Man könnte darüber hinaus in Betracht ziehen, andere, für die okuläre Gentherapie optimierte, AAV-Vektoren einzusetzen, beispielsweise die rekombinanten AAV2-Kapsidvarianten AAV2.GL und AAV2.NN, welche bei intravitrealer Applikation eine panretinale Transduktion demonstrierten, mit Fokus auf Photorezeptoren (Pavlou et al., 2021). Über den GFAP-Promotor könnte trotzdem eine Müllerzell-spezifische Transgen-Expression sichergestellt werden. Weiteres Optimierungspotential liegt möglicherweise in der Sequenz des miniFH selbst. Eine weitere Optimierung der Co-

donsequenz könnte die Translationseffizienz und die Genauigkeit der Proteinfaltung steigern (Hanson & Coller, 2018), (Biber et al., 2024).

Des Weiteren muss darauf hingewiesen werden, dass das experimentelle Setup eines Ischämie-/ Reperusionsmodells nur bedingt geeignet ist, um das Potential einer Genadditionstherapie mit miniFH zu erforschen. Unser Ansatz zielt darauf ab, eine breit einsetzbare Therapie zu entwickeln, die ein gemeinsames Merkmal verschiedener degenerativer Netzhauterkrankungen adressiert, indem sie das Komplementsystem kontinuierlich ausbalanciert und so der Pathogenese in frühen Stadien entgegenwirkt. In dem verwendeten Mausmodell konnten die Viren hingegen erst unmittelbar nach der 60-minütigen Ischämieperiode appliziert werden, die zu einem schweren, akuterem Schaden der Retina führte. Für weitere Validierungsarbeiten sollten genetische Degenerationsmodelle mit einer langsameren Manifestation der Erkrankung, wie es beispielsweise im zweiten Teil dieser Arbeit charakterisiert wurde, zum Einsatz kommen. Nichtsdestotrotz bot das Modell der Ischämie/ Reperfusion die Möglichkeit, Grundsätze und Funktionsweisen der Genadditionstherapie unter bekannt starker Komplementaktivierung zu untersuchen. Darüber hinaus ist es als Krankheitsmodell von großer Bedeutung, da ischämischen Zuständen eine Rolle in der Pathogenese vieler verschiedener Krankheiten zugeschrieben wird, darunter Glaukom, diabetische Retinopathie und Frühgeborenen-Retinopathie (retinopathy of prematurity, ROP), (Osborne et al., 2004).

4.2 Charakterisierung des ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Mausphänotyps

4.2.1 Nachweis eines milden Phänotyps erst nach 9 Monaten

Im zweiten Abschnitt dieser Doktorarbeit sollte der Phänotyp eines ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout-Mausmodells charakterisiert werden und seine Eignung als experimentelle Umgebung für die Erprobung der beschriebenen miniFH-Genadditionstherapie bewertet werden.

Da für den RDH8^{-/-}-Single-Knockout keine strukturelle Degeneration beschrieben werden konnte (Maeda et al., 2007), dienten Tiere dieses Genotyps als Referenz. Die Ergebnisse wurden auch mit den bisherigen Arbeiten zur Charakterisierung des Phänotyps verglichen (Maeda et al., 2008), (A. Maeda et al., 2009), (T. Maeda et al., 2009).

Untersucht wurden die Parameter Autofluoreszenz des retinalen Pigmentepithels (RPE), Mikrogliaaktivierung und strukturelle retinale Integrität im Alter von 4 und 9 Monaten.

Zum 4-Monats-Zeitpunkt war in keinem der untersuchten Parameter ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen zu verzeichnen. In den Auswertungen der Mikroglia zeigten sich diese Zellen bei den ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout-Mäusen sogar in geringerem Aktivierungszustand als bei Tieren mit RDH8^{-/-}-Hintergrund.

Während die Messung der RPE-Autofluoreszenz mit der Zeit zunehmende Ablagerungen von autofluoreszente Lipofuszin offenbarte, die nach 9 Monaten bei ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-

Doppel-Knockout-Mäusen signifikant stärker waren als bei den gleichaltrigen Referenztieren und positiv mit der Stärke der Lichtexposition korrelierten, zeigte sich der Phänotyp in den übrigen Auswertungen weniger eindeutig.

Hinsichtlich des Zustandes der Mikroglia wiesen beide Genotypen im zeitlichen Verlauf Zeichen verstärkter Aktivierung auf. Beispielsweise war eine Abnahme der eingenommenen Gesamtfläche bei beiden Genotypen zu verzeichnen. Bei ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout-Mäusen zeigte sich die zunehmende Mikroglia-Aktivierung insgesamt weniger im Sinne höherer Mikrogliazellzahlen, sondern eher in der Tendenz, morphologisch in eine aktivere, amöboidere Form mit größerem Soma und kürzeren Fortsätzen überzugehen, während sich die Morphologie der Mikroglia bei RDH8^{-/-}-Tieren kaum veränderte im Vergleich zum 4-Monats-Zustand. ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Mäuse zeigten zwar auch in den absoluten Werten Mikroglia mit etwas aktiverer Morphologie, gemessen an Somagröße und Gesamtfläche, als RDH8^{-/-}-Mäuse zum 9-Monats-Zeitpunkt, allerdings waren diese Unterschiede nur hinsichtlich der Somagröße signifikant. Für ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Tiere konnte ich auch nach 9 Monaten keine stärkere numerische Akkumulation dieser Immunzellen verglichen mit RDH8^{-/-}-Tieren nachweisen, jedoch im Vergleich zum 4-Monats-Zustand eine Tendenz zur Zunahme der Zellzahl, welche bei RDH8^{-/-}-Tieren abnahm. Diese Trends waren insbesondere bei Mikroglia in den inneren Schichten der Retina zu beobachten.

Vermehrte Lichtexposition war nur bei RDH8^{-/-}-Mäusen mit signifikant steigender Zellzahl und einer signifikanten Veränderung der Mikrogliamorphologie in die erwartete Richtung vergesellschaftet, welche größere Zellkörper bei kleinerer Gesamtfläche vorsieht. Weitere Unterschiede im Aktivierungszustand der Mikroglia wurden erst nach Differenzierung hinsichtlich der Lichtbedingungen offenkundig. Hier konnten bei ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Doppel-Knockout-Mäusen signifikant größere Somaflächen und geringere Gesamtflächen der Mikroglia in den inneren Retinaschichten nur unter niedrigerer Lichtexposition gesichert werden. Während die Mikroglia somit im Doppel-Knockout-Modell einen gering stärkeren Aktivierungszustand zu präsentieren scheinen, spiegelt sich dies noch nicht in einer verstärkten Rekrutierung weiterer Mikroglia wider, wie die Zellzahlen offenbarten.

Hinsichtlich struktureller Integrität zeigten die ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Mäuse im direkten Vergleich zwar meistens dezent geringere Zellzahlen als RDH8^{-/-}-Mäuse, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Die Schichtdicken der inneren Körnerschicht sowie der plexiformen Schichten offenbarten hingegen deutlichere Unterschiede im zeitlichen Degenerationsverhalten. Die Abnahmen der Schichtdicken von 4 auf 9 Monate waren in den ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Retinae jeweils ausgeprägter als in den Retinae der RDH8^{-/-}-Mäuse. Das bei Maeda et al. (2009) beschriebene Ausmaß an Degeneration, es seien nur noch 4-6 Reihen unorganisierter Photorezeptoren in der äußeren Körnerschicht gesehen worden, konnte allerdings in den

vorliegenden Auswertungen nicht reproduziert werden. Es sei auch darauf hingewiesen, dass sich im Laufe der Zeit lediglich die Schichtdicken der äußeren und inneren plexiformen Schicht und der inneren Körnerschicht reduzierten, die Anzahl an DAPI+ Kernen hingegen hielt sich von 4 auf 9 Monate sehr stabil. Auch nach Differenzierung hinsichtlich der Lichtbedingungen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen. Ein Zusammenhang zwischen Lichtexposition und Degenerationsausmaß konnte auf Ebene struktureller retinaler Integrität ebenfalls nicht beobachtet werden. Eine weitere Auswertung hinsichtlich lokaler Differenzen im Degenerationsverhalten zeigte sehr vergleichbare Zellkernzahlen und Schichtdicken zwischen superioren und inferioren zentralen Abschnitten der Retina innerhalb eines Genotyps. Sie offenbarte jedoch, dass sich signifikant geringere Zellzahlen in der äußeren Körnerschicht und geringere Schichtdicken in der inneren plexiformen Schicht lediglich in den inferioren Abschnitten der Retina finden lassen. Die Unterschiede betragen hier maximal 20%. Deutliche Diskrepanzen im Degenerationsausmaß zwischen zentralen superioren und inferioren Retinaabschnitten konnten somit hinsichtlich DAPI+ Zellkernzahlen und Schichtdicken der plexiformen Schichten nicht bestätigt werden. Maeda et al. (2008) hatten hier eine etwa 65% stärkere Degeneration im inferioren Teil der Retina im Sinne reduzierter Dicke der Photorezeptorschicht bereits nach sechs Monaten beschrieben.

In dieser Arbeit berichteten sie außerdem über eine frühe Manifestation des Phänotyps bei ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Mäusen. Unter anderem eine reduzierte Anzahl an Photorezeptoren sei dort schon nach 3 Monaten messbar gewesen (Maeda et al., 2008). Auch diese Beobachtung konnte in den vorliegenden Auswertungen nicht bestätigt werden. Zum 4-Monats-Zeitpunkt waren in keiner der untersuchten Kernzahlen und Schichtdicken signifikante Unterschiede zu RDH8^{-/-}-Tieren zu detektieren.

Nach Veröffentlichung der Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Dr. Akiko Maeda wurde offenkundig, dass die untersuchten Mäuse der C57BL/6N-Linie eine homozygote Rd8-Mutation des Crb1-Gens (Crb^{rd8}-Mutation) tragen, die Publikationen wurden allerdings nicht nachträglich korrigiert. 2012 konnten Mattapallil et al. nachweisen, dass die C57BL/6N-Mauslinien aller großen Mauseanbieter der Vereinigten Staaten und Japan homozygot für die Crb^{rd8}-Mutation waren und diese Mutation wahrscheinlich bereits seit 1951 in diesen Mauslinien besteht (Mattapallil et al., 2012). Zuvor hatten Mehalow et al. bereits bemerkt, dass der Phänotyp bei Mäusen mit gemischtem C57BL/6-Hintergrund und nachgewiesener Crb^{rd8}-Mutation, deren Ursprung sie damals einem unspezifischen C57BL/6-Stamm zuschrieben, nach intensivem Rückkreuzen mit der C57BL/6J-Linie verloren ging (Mehalow et al., 2003). Nach heutigem Erkenntnisstand weisen die Mäuse der Linie C57BL/6J, welche in meiner Arbeit zum Einsatz kamen, diese Mutation nicht auf (Mattapallil et al., 2012).

Die Rd8-Mutation bezeichnet eine autosomal rezessiv vererbte Deletion im Crb1-Gen, welche bekanntermaßen zu fokaler Photorezeptor-Degeneration insbesondere in den inferior-nasalen Anteilen der Retina führt (Mehalow et al., 2003). Nach Herauszüchten der Crb1-Mutation sei laut privater Korrespondenz mit Dr. Maeda zwar weiterhin eine A2E-Akkumulation nachweisbar gewesen, deutliche retinale Degeneration sei jedoch nur noch in Zusammenhang mit akutem Lichtschaden aufgetreten.

4.2.2 Eignung als Modell zur Applikation der Gentherapie

Aus diesen Resultaten kann subsumiert werden, dass ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Mäuse im Alter von 4 Monaten noch keine messbare Degeneration zeigen. Nach 9 Monaten sind Veränderungen in der RPE-Autofluoreszenz und der Morphologie von Mikroglia nachweisbar, allerdings (noch) nicht signifikant auf Ebene der retinalen Integrität. Wahrscheinlich stellen die Akkumulation von autofluoreszentem Lipofuszin und die Aktivierung von Mikroglia frühere Merkmale der Krankheitsentwicklung bei diesem Genotyp dar. Hierdurch würde sich auch erklären, dass ein Zusammenhang mit höherer Lichtexposition nur für die Höhe des Autofluoreszenz-Niveaus und in geringerem Ausmaß für die Zellzahl und Morphologie der Mikroglia zu beobachten war, nicht aber in den Analysen zu DAPI+ Kernen oder retinalen Schichtdicken. Aufgrund des nur milden Phänotyps nach 9 Monaten und der begrenzten Lebenserwartung von Mäusen erweist sich das ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-}-Knockoutmodell als unzureichende Simulation eines Morbus Stargardt und ungeeignet, um den Effekt der miniFH-Genadditionstherapie daran zu erforschen. Zur Evaluierung eines möglichen Therapieeffekts wäre ein stärkerer Phänotyp mit deutlicherem Degenerationsverhalten im zeitlichen Verlauf nötig, weshalb dieser Genotyp hier keinen Einsatz finden kann. Um einen deutlicheren Phänotyp zu modellieren, wäre der Zusatz eines weiteren Knockoutgens wie beispielsweise RPE65 denkbar. Für Mäuse mit einem RPE65^{-/-}-Knockout wurden verkürzte sowie irregulär angeordnete Photorezeptoraußensegmente bereits nach 2 Monaten beschrieben (Tanabu et al., 2019), eine Abnahme der Schichtdicke der äußeren Körnerschicht sei ab einem Alter von 6 Monaten zu registrieren (Lai et al., 2004). Die homozygote RPE65^{rd12}-Mutation bringt durch eine *nonsense*-Mutation ebenfalls einen retinalen Phänotyp ähnlich zu einem konstruierten Knockout hervor (Redmond, 2009). Es wird hier von Schichtdickenreduktion der äußeren Körnerschicht auf etwa die Hälfte nach 7 Monaten berichtet (Wu et al., 2014), (Pang et al., 2005). Als genetisches Degenerationsmodell als Grundlage der Erprobung möglicher Therapieansätze könnte daher möglicherweise ein ABCA4^{-/-} RPE65^{-/-} beziehungsweise ABCA4^{-/-} RPE65^{rd12} Modell oder sogar ein ABCA4^{-/-} RDH8^{-/-} RPE65^{-/-}-Triple-Knockout zum Einsatz kommen.

4.3 Andere Retinadegenerationsmodelle mit Angriffspunkt Komplementsystem

Verschiedene therapeutische Ansätze für AMD greifen in das Komplementsystem ein. Hier sei beispielsweise auf die Arbeit von Cashman et al. verwiesen, in der gezeigt werden konnte, dass sich die AAV-vermittelte Expression von Komplementfaktor H in einem Mausmodell für retinale Degeneration im Rahmen einer C3-Überexpression protektiv auf Photorezeptoren und RPE auswirkte (Cashman et al., 2015). Weitere Arbeiten berichteten von reduziertem Ganglienzellsterben und verminderter Bildung des Membranangriffskomplexes (MAC) im Diabetesmodell der Maus nach okulärer Applikation des Komplementinhibitors CD59 (Adhi et al., 2013). Die Arbeitsgruppe Rohrer stellte dar, dass die intraperitoneale Injektion eines Fusionsproteins aus FH und einem Komplementrezeptor in einem Zigarettenrauch-Mausmodell die Ausdünnung der Retina verminderte und vor typischen morphologischen Veränderungen des RPEs und der Bruchmembran schützte (Woodell et al., 2016). In einer weiteren Arbeit demonstrierte sie ähnliche Effekte für die Kombination von FH mit einem Autoantikörper, der Neoepitope nach retinaler Schädigung detektiert (Annamalai, 2021). Gemeinsam ist diesen Ansätzen der Versuch, Komplementinhibition auf Situationen und Lokalisationen überschießender Komplementaktivierung zu begrenzen, um die normale Komplementhomöostase nicht zu beeinträchtigen. Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Ansatz setzt dazu einen GFAP-Promotor ein, sodass die Expression des Komplementinhibitors auf den Zustand der Müllerzellgliose im Falle retinaler Stresssituationen limitiert ist. Die funktionellen Domänen des Faktors H wurden so ausgesucht, dass die Fähigkeit zur Erkennung körpereigener Strukturen in miniFH erhalten bleibt, um die Opsonierung und Elimination von Pathogenen nicht zu beeinträchtigen und somit physiologische Funktionen des Komplementsystems möglichst unberührt zu lassen.

Dass die Expression von humanem Komplementfaktor H Wirkung in der Mausretina zeigt, bestätigt die Arbeit von Ding et al. (2015). Hier konnte gezeigt werden, dass transgene FH^{-/-}-Knockoutmäuse, die humanes FH exprimierten, dosisabhängig geringere Aktivierung des alternativen Aktivierungsweges des Komplementsystems sowie besser erhaltene Photorezeptorschichten bei verbesserter visueller Funktion im Vergleich zu FH^{-/-}-Knockoutmäusen ohne humanes FH präsentierten (Ding et al., 2015).

Angriffspunkte der experimentellen Pharmakotherapie bei AMD in Bezug auf das Komplementsystem sind vielseitig. Inhibitoren gegen die Komplementfaktoren D (Lampalizumab) und I (GT005) sowie einige C5-Inhibitoren (Eculizumab und LFG316) verfehlten in Phase II- und Phase III-Studien ihre klinischen Endpunkte in Bezug auf AMD und geographische Atrophie (ClinicalTrials.gov-IDs: NCT02247479, NCT02247531, NCT04437368, NCT00935883, NCT01624636), (Deutsches Ärzteblatt, 2017), (Novartis, 2023), (Yehoshua et al., 2014), (Novartis, 2016). Präklinische Studien untersuchen zudem Therapiemöglichkeiten mit Anti-

körpern gegen Properdin und Komplementfaktor B (Volz & Pauly, 2015). Eine Therapie mit intravitrealer Applikation rekombinant produzierten humanen full-length Faktor Hs bei AMD-Patienten mit CFH-Risiko-Varianten wird aktuell in der Phase 2a-Studie REGATTA getestet (ClinicalTrials.gov-ID: NCT04643886), (Biggs et al., 2022). Mit ANX007 befindet sich aktuell auch ein C1q-Inhibitor in klinischer Testung in einer Phase-3-Studie (ARCHER II, ClinicalTrials.gov-ID NCT06510816).

Außerhalb der Augenheilkunde ist die Therapie mit Komplementinhibitoren bereits etabliert. Hier sei auf die intravenös verabreichten C5-Inhibitoren Eculizumab (Soliris) und Ravulizumab (Ultomiris) verwiesen, die für die Indikationen paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH), atypisches hämolytisch-urämisches Syndrom (aHUS), generalisierte Myasthenia gravis und AQP4-positive Neuromyelitis optica Spektrum Erkrankung (NMOSD) zugelassen sind (European Medicines Agency, 10/2019), (European Medicines Agency, 11/2022b), (European Medicines Agency, 03/2023). Im Mai 2021 erteilte die FDA die Zulassung für den subkutan zu verabreichenden C3-Inhibitor Pegcetacoplan (Aspaveli) für Patienten mit PNH (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie, 2022). Die Zulassung durch die EMA erfolgte im Dezember desselben Jahres (European Medicines Agency, 2021). Pegcetacoplan (Syfovre) erlangte 2023 als erstes Medikament für die Behandlung der AMD-assozierten geographischen Atrophie die Zulassung durch die FDA (Apellis Pharmaceuticals, 02/2023), (Heier et al., 2023). In den zugehörigen Phase-III-Studien (O-AKS und DERBY, ClinicalTrials.gov- IDs NCT03525613 und NCT03525600) wurden insgesamt 1258 Patienten eingeschlossen, die entweder Pegcetacoplan- oder Sham-Injektionen erhielten (Apellis Pharmaceuticals, 06/2023), (Apellis Pharmaceuticals, 07/2023). Die EMA lehnte die Zulassung bei nicht ausreichend nachgewiesenem klinischem Nutzen zunächst ab. Auf Antrag des Herstellers Apellis Pharmaceuticals erfolgte eine Re-Evaluierung der Entscheidung, wobei sich die EMA erneut gegen eine Marktzulassung aussprach (European Medicines Agency, 06/2024), (European Medicines Agency, 09/2024). Im gleichen Jahr konnte ein weiterer Komplementinhibitor, der C5-Inhibitor avacincaptad pegol (ACP, Izervay), die FDA-Zulassung für geographische Atrophie bei AMD erlangen (Shakeel et al., 2024). In die Phase-III-Studie GATHER-2 (ClinicalTrials.gov-ID NCT04435366) wurden 448 Patienten eingeschlossen und erhielten entweder ACP oder Sham intravitreal (Astellas Pharma, 2024). Im Oktober 2024 hat Astellas Pharma GmbH den Antrag auf Erstzulassung zurückgezogen (European Medicines Agency, 11/2024). Während diese Therapeutika direkt an die Effektormoleküle C3 und C5 binden und die Komplementkaskade in ihrer gemeinsamen Strecke inhibieren, soll die Therapie mit miniFH eine differenziertere Reduktion überschießender Komplementaktivierung erlauben, indem ein Komplementmodulator überexprimiert wird. Die Erkennung von Pathogenen und die Reaktion des Komplementsystems gegen diese soll nicht eingeschränkt werden. Lediglich die Reaktivität gegen körpereigene Oberflächen soll

minimiert und hier die Amplifikation der Komplementantwort durch den alternativen Weg unterbunden werden.

4.4 AAV-Gentherapie

Der Einsatz rekombinanter adeno-assoziiierter Viren (AAV) ist aktuell das führende Vektorsystem zur Applikation okulärer Gentherapie (Bucher et al., 2021). AAVs sind nicht-behüllte, einzelsträngige DNA-Viren (Hastie & Samulski, 2015). Es können verschiedene natürlich vorkommende Serotypen mit unterschiedlichen Kapsiden unterschieden werden, die ihren Gewebetropismus definieren. Von diesen sind AAV2, AAV3 und AAV5 wahrscheinlich menschlichen Ursprungs, während AAV1, AAV4, AAV7, AAV8 und AAV9 ihren Ursprung in nicht-menschlichen Primaten haben (Blacklow et al., 1968), (Wu et al., 2006). AAV6, AAV10 und AAV11 werden nicht als echte Serotypen verstanden, da die Serologie von AAV6 fast identisch zu der von AAV1 ist und die serologischen Profile von AAV10 und AAV11 kaum charakterisiert sind (Wu et al., 2006). Sie werden von speziell generierten Varianten ergänzt, die auf eine spezifischere und effektivere Transduktion bestimmter Gewebe, Spezies oder Zellarten abzielen (Wu et al., 2006). Vorteile sind, dass AAVs selbst nicht pathogen sind (Muzyczka, 1994), dass sich rekombinante AAVs kaum ins Wirtszellgenom integrieren (Smith, 2008) und nicht fähig zur Replikation sind, da sie auf einen Hilfsvirus wie Herpesviren, Papillomaviren oder Adenoviren angewiesen sind, um ihren Replikationszyklus zu vervollständigen (Bucher et al., 2021): Atchison et al. demonstrierten 1965, dass die von ihnen beschriebenen AAVs alleine nicht zur Replikation in der Nierenzellkultur aus Primaten fähig waren, jedoch nach Zugabe eines Adenovirus (Atchison et al., 1965). Ihr Einsatz wird daher als relativ sicher angesehen, wobei Abnahmen der Effektivität nach initialem Erfolg beschrieben wurden und Hinweise auf okuläre und systemische Immunreaktionen infolge ihrer Verabreichung ins Auge zunehmen (Bainbridge et al., 2015), (Bucher et al., 2021). Für diese klinische Beobachtung wird inzwischen der Begriff Gentherapie-assoziierte Uveitis (GTAU) verwendet (Bucher et al., 2021). Diskutiert werden auch immunologische Reaktionen durch Kontamination der AAV-Lösung mit beispielsweise DNA-Fragmenten (Biber et al., 2024). Seitz et al. konnten zudem in einer Studie an Affen Vektorgenome in allen Bioflüssigkeiten bis zu 7 Tage nach okulärer Applikation von AAV8 nachweisen, wobei intravitreale Verabreichung mit stärkerer und langanhaltenderer Streuung der Genome im Vergleich zur subretinalen Applikation assoziiert war (Seitz et al., 2017). Da AAVs beim Menschen endemisch sind, können neutralisierende Antikörper (insbesondere gegen AAV2) nach vorangegangener natürlicher Infektion die Effektivität der AAV-basierten Gentherapie einschränken (Calcedo et al., 2011), (Boutin et al., 2010).

4.5 Limitationen des Mausmodells

Letztlich ist auch eine gewisse Vorsicht bei der Übertragung von Ergebnissen aus Mausexperimenten auf den Menschen geboten, schließlich sind Mausmodelle nur bedingt für das Studium retinaler Erkrankungen beim Menschen geeignet. Im Folgenden sei auf einige relevante Unterschiede hingewiesen, Differenzen sind jedoch zahlreicher und häufig schon allein durch die unterschiedlichen Dimensionen menschlicher und muriner Retina bedingt (5 mm vs. 40 mm Durchmesser) (Grunert & Martin, 2020).

Es sollte insbesondere ins Auge gefasst werden, dass die Komplement-Expression in humaner Retina von jener in der Maus abweicht. Nicht nur unterscheidet sich das Expressionsprofil der einzelnen retinalen Zelltypen in ihrer genauen Zusammensetzung, sondern auch einzelne Funktionsweisen des Komplementsystems scheinen voneinander abzuweichen (Zauhar et al., 2022). Beispielsweise weisen Mausretinae unter physiologischen Bedingungen die beim Menschen bekannten membrangebundenen Oberflächenmoleküle CD46 und CD55 nicht auf, welche im humanen System zur Inaktivierung von C3b und C4b beitragen, sodass man von alternativen Wegen der Komplementregulation in Mäusen ausgeht (Zauhar et al., 2022).

Weiterhin unterscheidet sich die Netzhaut von Mäusen strukturell von der humanen Netzhaut insbesondere darin, dass sie keine Makula (Volland et al., 2015) und zentral weniger Zapfen besitzt (Abbildung 30), wodurch Modelle, die Makuladystrophien wie insbesondere AMD untersuchen, die menschliche Pathogenese nur eingeschränkt widerspiegeln können. Die Mausretina enthält 6,4 Millionen Stäbchen (97,2%) und 180.000 Zapfen (2,8%) (Jeon et al., 1998), in der humanen Retina finden sich etwa 14-mal mehr Stäbchen (92 Millionen, 95,2%) und etwa 25-mal mehr Zapfen (4,6 Millionen, 4,8%) (Curcio et al., 1990). Allerdings weisen Mausaugen eine höhere Photorezeptordichte mit durchschnittlich 400.000 Stäbchen/mm² und 12.000 Zapfen/mm² auf, die nach zentral nur leicht ansteigt (Jeon et al., 1998). In der menschlichen Retina hingegen sind Zapfen und Stäbchen sehr unterschiedlich verteilt, mit einer Zapfendichte von etwa 200.000 Zellen/mm² foveal, welche in der Netzhautperipherie auf unter 5.000/mm² abfällt (Curcio et al., 1990). Bei den Stäbchen verhält es sich andersherum, sie fehlen in der Fovea und erreichen ihr Maximum von bis zu 176.000 Zellen/mm² etwa 3-5 mm parafoveal, um peripher auf 30.000 Zellen/mm² abzufallen (Curcio et al., 1990). Ein weiterer struktureller Unterschied liegt in der Organisation der Ganglienzellschicht, die bei Menschen zentral bis zu 8 Schichten umfassen kann, während die Ganglienzellen bei Mäusen nur in einer Schicht organisiert sind (Grunert & Martin, 2020). In den periphereren Anteilen der menschlichen Makula zeigt sich jedoch ein vergleichbares Verhältnis zwischen Stäbchen und Zapfen verglichen mit entsprechenden Regionen der Mausretina (Volland et

al., 2015), wodurch diese Stellen am ehesten zur Beurteilung der AMD-Entwicklung herangezogen werden könnten.

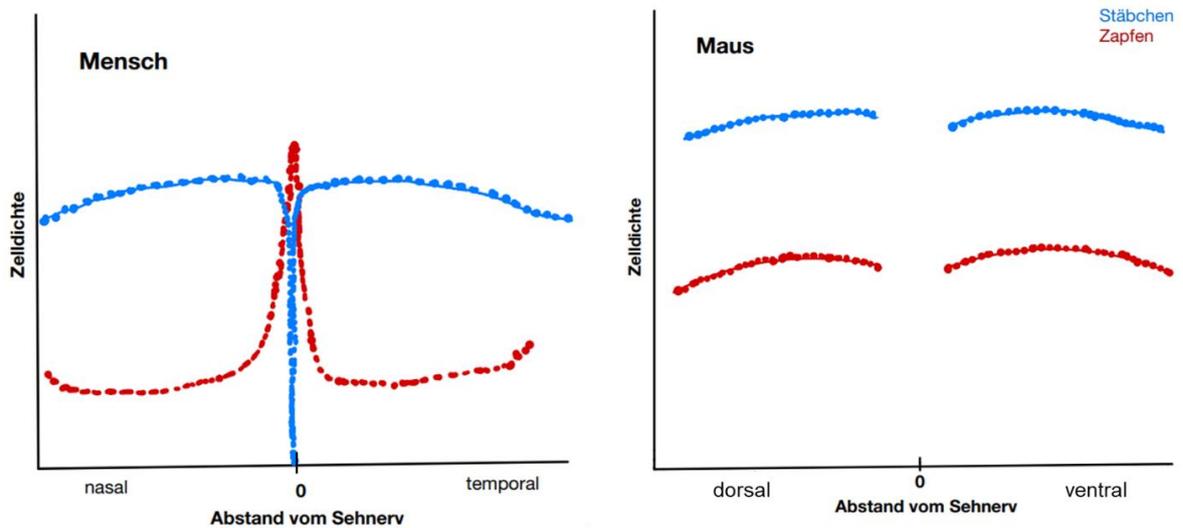


Abbildung 30: Vergleich der Photorezeptordichte in der menschlichen (links) und Mausretina (rechts). Adaptiert nach Grunert & Martin (2020). Mausretinae (rechts) besitzen keine Makula und zeigen daher eine andere Verteilung zwischen Stäbchen und Zapfen. Während die humane Retina durch eine erhebliche Diskrepanz in den Dichten der beiden Photorezeptorarten zwischen zentralen und peripheren Anteilen gekennzeichnet ist, ändern sich die Dichten von Zapfen und Stäbchen von zentral nach peripher kaum. Allerdings sind die Stäbchen hier insbesondere in den peripheren Anteilen der Retina deutlich dichter verteilt.

Beide Spezies zeigen eine Ausdünnung der Bruchmembran nach zentral (Volland et al., 2015), die hier auch poröser ist (Chong et al., 2005), was essenziell zu ihrer Funktion im Austausch verschiedenster Moleküle zwischen RPE und Choroid beiträgt, diese Region aber auch anfälliger für die Entwicklung einer AMD, beispielsweise über die Entstehung von Neovaskularisationen macht (Volland et al., 2015). Allerdings ist der Gradient zwischen zentralen und peripheren Abschnitten bei Menschen deutlich größer als bei Mäusen (Volland et al., 2015).

Durch die erhöhte Photorezeptordichte bei Mäusen ergibt sich hingegen ein erhöhter Umfang zu phagozytischer Außensegmente für das RPE, wodurch sie eine größere Disposition für Ineffektivitäten in diesem Prozess aufweisen, was beim Menschen zu Akkumulation von Stoffwechselprodukten und damit zur Entstehung von Makuladegeneration beitragen kann (Volland et al., 2015).

Literaturverzeichnis

- Abcouwer, S. F., Shanmugam, S., Muthusamy, A., Lin, C. M., Kong, D., Hager, H., Liu, X., & Antonetti, D. A. (2021). Inflammatory resolution and vascular barrier restoration after retinal ischemia reperfusion injury. *J Neuroinflammation*, *18*(1), 186.
<https://doi.org/10.1186/s12974-021-02237-5>
- Adhi, M., Cashman, S. M., & Kumar-Singh, R. (2013). Adeno-associated virus mediated delivery of a non-membrane targeted human soluble CD59 attenuates some aspects of diabetic retinopathy in mice. *PLoS One*, *8*(10), e79661.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079661>
- Allikmets, R., Singh, N., Sun, H., Shroyer, N. F., Hutchinson, A., Chidambaram, A., Gerrard, B., Baird, L., Stauffer, D., Peiffer, A., Rattner, A., Smallwood, P., Li, Y., Anderson, K. L., Lewis, R. A., Nathans, J., Leppert, M., Dean, M., & Lupski, J. R. (1997). A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet*, *15*(3), 236-246.
<https://doi.org/10.1038/ng0397-236>
- Annamalai, B. P., Nathaniel, Crystal; Joseph, Kusumam; Coughlin, Beth; Yang, Xiaofeng; Jones, Bryan W.; Tomlinson, Stephen; Rohrer, Bärbel. (2021). Natural immunoglobulin M-based delivery of a complement alternative pathway inhibitor in mouse models of retinal degeneration. *Experimental Eye Research*, *207*.
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2021.108583>
- Apellis Pharmaceuticals, I. (02/2023, 17.02.2023). *FDA Approves SYFOVRE™ (pegcetacoplan injection) as the First and Only Treatment for Geographic Atrophy (GA), a Leading Cause of Blindness*. Retrieved 05.03.2025 from <https://investors.apellis.com/news-releases/news-release-details/fda-approves-syfovretm-pegcetacoplan-injection-first-and-only>
- Apellis Pharmaceuticals, I. (06/2023, 18.06.2023). *Study to Compare the Efficacy and Safety of Intravitreal APL-2 Therapy With Sham Injections in Patients With Geographic Atrophy (GA) Secondary to Age-Related Macular Degeneration*. Retrieved 02.09.2024 from <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03525600>
- Apellis Pharmaceuticals, I. (07/2023, 06.07.2023). *A Study to Compare the Efficacy and Safety of Intravitreal APL-2 Therapy With Sham Injections in Patients With Geographic Atrophy (GA) Secondary to Age-Related Macular Degeneration*. Retrieved 02.09.2024 from <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03525613>
- Astellas Pharma. (2024, 23.02.2024). *A Phase 3 Safety and Efficacy Study of Intravitreal Administration of Zimura (Complement C5 Inhibitor)*. Retrieved 02.09.2024 from <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04435366?id=NCT04435366&rank=1>

- Atchison, R. W., Casto, B. C., & Hammon, W. M. (1965). Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science*, *149*(3685), 754-756.
<https://doi.org/10.1126/science.149.3685.754>
- Bainbridge, J. W., Mehat, M. S., Sundaram, V., Robbie, S. J., Barker, S. E., Ripamonti, C., Georgiadis, A., Mowat, F. M., Beattie, S. G., Gardner, P. J., Feathers, K. L., Luong, V. A., Yzer, S., Balaggan, K., Viswanathan, A., de Ravel, T. J., Casteels, I., Holder, G. E., Tyler, N.,...Ali, R. R. (2015). Long-term effect of gene therapy on Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med*, *372*(20), 1887-1897.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1414221>
- Barnett, N. L., & Pow, D. V. (2000). Antisense knockdown of GLAST, a glial glutamate transporter, compromises retinal function. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *41*(2), 585-591.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10670492>
- Bassetto, M., Kolesnikov, A. V., Lewandowski, D., Kiser, J. Z., Halabi, M., Einstein, D. E., Choi, E. H., Palczewski, K., Kefalov, V. J., & Kiser, P. D. (2024). Dominant role for pigment epithelial CRALBP in supplying visual chromophore to photoreceptors. *Cell Rep*, *43*(5), 114143. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114143>
- Beinrohr, L., Dobo, J., Zavodszky, P., & Gal, P. (2008). C1, MBL-MASPs and C1-inhibitor: novel approaches for targeting complement-mediated inflammation. *Trends Mol Med*, *14*(12), 511-521. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.09.009>
- Biber, J., Jabri, Y., Glanzer, S., Dort, A., Hoffelner, P., Schmidt, C. Q., Bludau, O., Pauly, D., & Grosche, A. (2024). Gliosis-dependent expression of complement factor H truncated variants attenuates retinal neurodegeneration following ischemic injury. *J Neuroinflammation*, *21*(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s12974-024-03045-3>
- Biggs, R. M., Makou, E., Lauder, S., Herbert, A. P., Barlow, P. N., & Katti, S. K. (2022). A Novel Full-Length Recombinant Human Complement Factor H (CFH; GEM103) for the Treatment of Age-Related Macular Degeneration Shows Similar In Vitro Functional Activity to Native CFH. *Curr Eye Res*, *47*(7), 1087-1093.
<https://doi.org/10.1080/02713683.2022.2053725>
- Blacklow, N. R., Hoggan, M. D., & Rowe, W. P. (1968). Serologic evidence for human infection with adenovirus-associated viruses. *J Natl Cancer Inst*, *40*(2), 319-327.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4295610>
- Blackmore, T. K., Sadlon, T. A., Ward, H. M., Lublin, D. M., & Gordon, D. L. (1996). Identification of a heparin binding domain in the seventh short consensus repeat of complement factor H. *J Immunol*, *157*(12), 5422-5427.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8955190>
- Bonne, C., Muller, A., & Villain, M. (1998). Free radicals in retinal ischemia. *Gen Pharmacol*, *30*(3), 275-280. [https://doi.org/10.1016/s0306-3623\(97\)00357-1](https://doi.org/10.1016/s0306-3623(97)00357-1)

- Booij, J. C., Baas, D. C., Beisekeeva, J., Gorgels, T. G., & Bergen, A. A. (2010). The dynamic nature of Bruch's membrane. *Prog Retin Eye Res*, 29(1), 1-18.
<https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2009.08.003>
- Borucki, D. M., Toutonji, A., Couch, C., Mallah, K., Rohrer, B., & Tomlinson, S. (2020). Complement-Mediated Microglial Phagocytosis and Pathological Changes in the Development and Degeneration of the Visual System. *Front Immunol*, 11, 566892.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.566892>
- Boutin, S., Monteilhet, V., Veron, P., Leborgne, C., Benveniste, O., Montus, M. F., & Masurier, C. (2010). Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors. *Hum Gene Ther*, 21(6), 704-712.
<https://doi.org/10.1089/hum.2009.182>
- Brew, H., & Attwell, D. (1987). Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retinal glial cells. *Nature*, 327(6124), 707-709.
<https://doi.org/10.1038/327707a0>
- Bringmann, A., Pannicke, T., Biedermann, B., Francke, M., Iandiev, I., Grosche, J., Wiedemann, P., Albrecht, J., & Reichenbach, A. (2009). Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochem Int*, 54(3-4), 143-160.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2008.10.014>
- Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S. N., Osborne, N. N., & Reichenbach, A. (2006). Muller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res*, 25(4), 397-424.
<https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2006.05.003>
- Bringmann, A., & Reichenbach, A. (2001). Role of Muller cells in retinal degenerations. *Front Biosci*, 6, E72-92. <https://doi.org/10.2741/bringman>
- Bucher, K., Rodriguez-Bocanegra, E., Dauletbekov, D., & Fischer, M. D. (2021). Immune responses to retinal gene therapy using adeno-associated viral vectors - Implications for treatment success and safety. *Prog Retin Eye Res*, 83, 100915.
<https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2020.100915>
- Burke, T. R., Duncker, T., Woods, R. L., Greenberg, J. P., Zernant, J., Tsang, S. H., Smith, R. T., Allikmets, R., Sparrow, J. R., & Delori, F. C. (2014). Quantitative fundus autofluorescence in recessive Stargardt disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 55(5), 2841-2852. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-13624>
- Byrne, L. C., Khalid, F., Lee, T., Zin, E. A., Greenberg, K. P., Visel, M., Schaffer, D. V., & Flannery, J. G. (2013). AAV-mediated, optogenetic ablation of Muller Glia leads to structural and functional changes in the mouse retina. *PLoS One*, 8(9), e76075.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076075>

- Calcedo, R., Morizono, H., Wang, L., McCarter, R., He, J., Jones, D., Batshaw, M. L., & Wilson, J. M. (2011). Adeno-associated virus antibody profiles in newborns, children, and adolescents. *Clin Vaccine Immunol*, 18(9), 1586-1588.
<https://doi.org/10.1128/CVI.05107-11>
- Calippe, B., Augustin, S., Beguier, F., Charles-Messance, H., Poupel, L., Conart, J. B., Hu, S. J., Lavalette, S., Fauvet, A., Rayes, J., Levy, O., Raoul, W., Fitting, C., Deneffe, T., Pickering, M. C., Harris, C., Jorieux, S., Sullivan, P. M., Sahel, J. A.,...Sennlaub, F. (2017). Complement Factor H Inhibits CD47-Mediated Resolution of Inflammation. *Immunity*, 46(2), 261-272. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.01.006>
- Cashman, S. M., Gracias, J., Adhi, M., & Kumar-Singh, R. (2015). Adenovirus-mediated delivery of Factor H attenuates complement C3 induced pathology in the murine retina: a potential gene therapy for age-related macular degeneration. *J Gene Med*, 17(10-12), 229-243. <https://doi.org/10.1002/jgm.2865>
- Chakravarthy, U., Wong, T. Y., Fletcher, A., Piau, E., Evans, C., Zlateva, G., Buggage, R., Pleil, A., & Mitchell, P. (2010). Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *BMC Ophthalmol*, 10, 31.
<https://doi.org/10.1186/1471-2415-10-31>
- Chan, Y. K., Dick, A. D., Hall, S. M., Langmann, T., Scribner, C. L., Mansfield, B. C., & Ocular Gene Therapy Inflammation Working, G. (2021). Inflammation in Viral Vector-Mediated Ocular Gene Therapy: A Review and Report From a Workshop Hosted by the Foundation Fighting Blindness, 9/2020. *Transl Vis Sci Technol*, 10(4), 3.
<https://doi.org/10.1167/tvst.10.4.3>
- Charbel Issa, P., Barnard, A. R., Singh, M. S., Carter, E., Jiang, Z., Radu, R. A., Schraermeyer, U., & MacLaren, R. E. (2013). Fundus autofluorescence in the Abca4(-/-) mouse model of Stargardt disease--correlation with accumulation of A2E, retinal function, and histology. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54(8), 5602-5612.
<https://doi.org/10.1167/iovs.13-11688>
- Chimata, A. V., Deshpande, P., Mehta, A. S., & Singh, A. (2022). Protocol to study cell death using TUNEL assay in Drosophila imaginal discs. *STAR Protoc*, 3(1), 101140.
<https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101140>
- Chong, N. H., Keonin, J., Luthert, P. J., Frennesson, C. I., Weingeist, D. M., Wolf, R. L., Mullins, R. F., & Hageman, G. S. (2005). Decreased thickness and integrity of the macular elastic layer of Bruch's membrane correspond to the distribution of lesions associated with age-related macular degeneration. *Am J Pathol*, 166(1), 241-251.
[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62248-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62248-1)
- ClinicalTrials.gov. (18.06.2023). *ClinicalTrials.gov*. (18. 06 2023). *Study to Compare the Efficacy and Safety of Intravitreal APL-2 Therapy With Sham Injections in Patients*

- With Geographic Atrophy (GA) Secondary to Age-Related Macular Degeneration*. Retrieved 26.01.2025 from <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03525600?term=NCT03525600&rank=1>
- ClinicalTrials.gov. (13.05.2017). *Complement Inhibition With Eculizumab for the Treatment of Non-Exudative Macular Degeneration (AMD) (COMPLETE)*. Retrieved 26.01.2025 from <https://clinicaltrials.gov/study/NCT00935883?term=eculizumab%20complete%20amd&rank=1&tab=table>
- ClinicalTrials.gov. (18.06.2020). *EXPLORE: A Phase II Study to Evaluate the Safety and Efficacy of Two Doses of GT005*. Retrieved 12.04.2023 from
- ClinicalTrials.gov. (24.12.2020). *A Multiple Dose Study of Repeat Intravitreal Injections of GEM103 in Neovascular Age-related Macular Degeneration*. Retrieved 12.04.2023 from
- ClinicalTrials.gov. (12.12.2024). *A Phase 3 Safety and Efficacy Study of Intravitreal Administration of Zimura (Complement C5 Inhibitor)*. Retrieved 26.01.2025 from <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04435366?term=NCT04435366&rank=1>
- ClinicalTrials.gov. (19.12.2020). *Safety and Tolerability of Intravenous LFG316 in Wet Age-related Macular Degeneration (AMD)*. Retrieved 26.01.2025 from <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01624636?term=lf316&rank=2>
- ClinicalTrials.gov. (04.12.2024). *A Study Investigating the Efficacy and Safety of Intravitreal (IVT) Injections of ANX007 in Participants With Geographic Atrophy (GA) (ARCHER II)*. Retrieved 26.01.2025 from <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06510816?term=ANX007&rank=4>
- ClinicalTrials.gov. (26.06.2019). *A Study Investigating the Efficacy and Safety of Lampalizumab Intravitreal Injections in Participants With Geographic Atrophy Secondary to Age-Related Macular Degeneration (CHROMA)*. Retrieved 26.01.2025 from <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02247479>
- ClinicalTrials.gov. (15.10.2019). *A Study Investigating the Safety and Efficacy of Lampalizumab Intravitreal Injections in Participants With Geographic Atrophy Secondary to Age-Related Macular Degeneration (SPECTRI)*. Retrieved 26.01.2025 from <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02247531>
- ClinicalTrials.gov. (06.07.2023). *A Study to Compare the Efficacy and Safety of Intravitreal APL-2 Therapy With Sham Injections in Patients With Geographic Atrophy (GA) Secondary to Age-Related Macular Degeneration*. Retrieved 26.01.2025 from <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03525613?term=NCT03525613&rank=1>
- Cremers, F. P., van de Pol, D. J., van Driel, M., den Hollander, A. I., van Haren, F. J., Knoers, N. V., Tijmes, N., Bergen, A. A., Rohrschneider, K., Blankenagel, A., Pinckers, A. J.,

- Deutman, A. F., & Hoyng, C. B. (1998). Autosomal recessive retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy caused by splice site mutations in the Stargardt's disease gene ABCR. *Hum Mol Genet*, 7(3), 355-362. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.3.355>
- Cugati, S., Mitchell, P., Rochtchina, E., Tan, A. G., Smith, W., & Wang, J. J. (2006). Cataract surgery and the 10-year incidence of age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*, 113(11), 2020-2025. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2006.05.047>
- Curcio, C. A., Sloan, K. R., Kalina, R. E., & Hendrickson, A. E. (1990). Human photoreceptor topography. *J Comp Neurol*, 292(4), 497-523. <https://doi.org/10.1002/cne.902920402>
- Dalkara, D., Kolstad, K. D., Guerin, K. I., Hoffmann, N. V., Visel, M., Klimczak, R. R., Schaffer, D. V., & Flannery, J. G. (2011). AAV mediated GDNF secretion from retinal glia slows down retinal degeneration in a rat model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther*, 19(9), 1602-1608. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.62>
- Danciger, M., Matthes, M. T., Yasamura, D., Akhmedov, N. B., Rickabaugh, T., Gentleman, S., Redmond, T. M., La Vail, M. M., & Farber, D. B. (2000). A QTL on distal chromosome 3 that influences the severity of light-induced damage to mouse photoreceptors. *Mamm Genome*, 11(6), 422-427. <https://doi.org/10.1007/s003350010081>
- Darzynkiewicz, Z., Galkowski, D., & Zhao, H. (2008). Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods*, 44(3), 250-254. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.11.008>
- Das, S. R., Bhardwaj, N., Kjeldbye, H., & Gouras, P. (1992). Muller cells of chicken retina synthesize 11-cis-retinol. *Biochem J*, 285 (Pt 3)(Pt 3), 907-913. <https://doi.org/10.1042/bj2850907>
- Deininger, M. H., Meyermann, R., & Schluesener, H. J. (2002). The allograft inflammatory factor-1 family of proteins. *FEBS Lett*, 514(2-3), 115-121. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)02430-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)02430-4)
- Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie. (2022, 01.07.2022). *Stellungnahme zur Nutzenbewertung des G-BA von Arzneimitteln für seltene Leiden gemäß § 35a SGB V Pegcetacoplan*. Retrieved 13.04.2023 from <https://www.dgho.de/publikationen/stellungnahmen/fruehe-nutzenbewertung/pegcetacoplan/pegcetacoplan-stellungnahme-20220722.pdf>
- Deutsches Ärzteblatt. (2017, 12.09.2017). *AMD: Lampalizumab kann geographische Atrophie in Studie nicht aufhalten*. Retrieved 26.01.2025 from <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/78196/AMD-Lampalizumab-kann-geographische-Atrophie-in-Studie-nicht-aufhalten>

- Ding, J. D., Kelly, U., Landowski, M., Toomey, C. B., Groelle, M., Miller, C., Smith, S. G., Klingeborn, M., Singhapricha, T., Jiang, H., Frank, M. M., & Bowes Rickman, C. (2015). Expression of human complement factor H prevents age-related macular degeneration-like retina damage and kidney abnormalities in aged Cfh knockout mice. *Am J Pathol*, *185*(1), 29-42. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.08.026>
- Ding, X., Patel, M., & Chan, C. C. (2009). Molecular pathology of age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res*, *28*(1), 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2008.10.001>
- Enzbrenner, A., Zulliger, R., Biber, J., Pousa, A. M. Q., Schafer, N., Stucki, C., Giroud, N., Berrera, M., Kortvely, E., Schmucki, R., Badi, L., Grosche, A., Pauly, D., & Enzmann, V. (2021). Sodium Iodate-Induced Degeneration Results in Local Complement Changes and Inflammatory Processes in Murine Retina. *Int J Mol Sci*, *22*(17). <https://doi.org/10.3390/ijms22179218>
- European Medicines Agency. (01/2019, 11.01.2019). *Luxturna: EPAR - All authorised presentations*. Retrieved 03.04.2023 from https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/luxturna-epar-product-information_en.pdf
- European Medicines Agency. (02/2023, 28.02.2023). *Hemgenix : EPAR - Medicine overview*. Retrieved 14.04.2024 from https://www.ema.europa.eu/de/documents/overview/hemgenix-epar-medicine-overview_de.pdf
- European Medicines Agency. (02/2024, 28.02.2024). *Casgevy : EPAR - Medicine overview*. Retrieved 14.04.2024 from https://www.ema.europa.eu/de/documents/product-information/casgevy-epar-product-information_de.pdf
- European Medicines Agency. (03/2023, 30.03.2023). *Summary of opinion (post authorisation) - Ultomiris*. Retrieved 13.04.2023 from https://www.ema.europa.eu/en/documents/smop/chmp-post-authorisation-summary-positive-opinion-ultomiris-ii-32_en.pdf
- European Medicines Agency. (06/2024, 28.06.2024). *Refusal of the marketing authorisation for Syfovre*. Retrieved 25.08.2024 from https://www.ema.europa.eu/en/documents/smop-initial/questions-answers-refusal-marketing-authorisation-syfovre_en.pdf
- European Medicines Agency. (07/2022, 08.07.2022). *Strimvelis: EPAR - Product Information*. Retrieved 03.04.2023 from <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/strimvelis>
- European Medicines Agency. (09/2024, 19.09.2024). *Syfovre - opinion*. Retrieved 26.01.2025 from <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/syfovre>

- European Medicines Agency. (10/2019, 30.10.2019). *Soliris: EPAR - Medicine overview*. Retrieved 13.04.2023 from https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/soliris-epar-medicine-overview_en.pdf
- European Medicines Agency. (11/2022a, 22.11.2022). *Imlygic: EPAR - Product Information*. Retrieved 03.04.2023 from https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/imlygic-epar-product-information_en.pdf
- European Medicines Agency. (11/2022b, 23.11.2022). *Ultomiris: EPAR - Medicine overview*. Retrieved 13.04.2023 from https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/ultomiris-epar-medicine-overview_en.pdf
- European Medicines Agency. (11/2024, 15.11.2024). *Izelvay - Application withdrawn*. Retrieved 26.01.2025 from <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/izelvay>
- European Medicines Agency. (2017, 29.11.2017). *Glybera: EPAR - Product Information*. Retrieved 03.04.2023 from https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/glybera-epar-product-information_en.pdf
- European Medicines Agency. (2021, 16.12.2021). *Aspaveli: EPAR - Medicine overview*. Retrieved 13.04.2023 from https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/aspaveli-epar-medicine-overview_en.pdf
- Evans, J. R., & Lawrenson, J. G. (2017). Antioxidant vitamin and mineral supplements for slowing the progression of age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev*, 7(7), CD000254. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000254.pub4>
- Fearon, D. T., & Austen, K. F. (1975). Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J Exp Med*, 142(4), 856-863. <https://doi.org/10.1084/jem.142.4.856>
- Franze, K., Grosche, J., Skatchkov, S. N., Schinkinger, S., Foja, C., Schild, D., Uckermann, O., Travis, K., Reichenbach, A., & Guck, J. (2007). Muller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(20), 8287-8292. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611180104>
- Gaboriaud, C., Gupta, R. K., Martin, L., Lacroix, M., Serre, L., Teillet, F., Arlaud, G. J., Rossi, V., & Thielens, N. M. (2013). The serine protease domain of MASP-3: enzymatic properties and crystal structure in complex with ecotin. *PLoS One*, 8(7), e67962. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067962>
- Gange, W. S., Sisk, R. A., Besirli, C. G., Lee, T. C., Havunjian, M., Schwartz, H., Borchert, M., Sengillo, J. D., Mendoza, C., Berrocal, A. M., & Nagiel, A. (2022). Perifoveal

- Chorioretinal Atrophy after Subretinal Voretigene Neparvovec-rzyl for RPE65-Mediated Leber Congenital Amaurosis. *Ophthalmol Retina*, 6(1), 58-64.
<https://doi.org/10.1016/j.oret.2021.03.016>
- Genead, M. A., Fishman, G. A., Stone, E. M., & Allikmets, R. (2009). The natural history of stargardt disease with specific sequence mutation in the ABCA4 gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50(12), 5867-5871. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-3611>
- Gerhardt, M. J., Michalakis, S., Rudolph, G., Priglinger, C., & Priglinger, S. G. (2022). [RPE65-associated retinal dystrophies: gene therapy preserves vision]. *MMW Fortschr Med*, 164(Suppl 4), 40-41. <https://doi.org/10.1007/s15006-022-0765-7>
(RPE65-assoziierte Netzhautdystrophie: Gentherapie kann das Sehen verbessern.)
- Ghaseminejad, F., Kaplan, L., Pfaller, A. M., Hauck, S. M., & Grosche, A. (2020). The role of Muller cell glucocorticoid signaling in diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 258(2), 221-230. <https://doi.org/10.1007/s00417-019-04521-w>
- Ghoraba, H. H., Akhavanrezayat, A., Karaca, I., Yavari, N., Lajevardi, S., Hwang, J., Regenold, J., Matsumiya, W., Pham, B., Zaidi, M., Mobasserian, A., DongChau, A. T., Or, C., Yasar, C., Mishra, K., Do, D., & Nguyen, Q. D. (2022). Ocular Gene Therapy: A Literature Review with Special Focus on Immune and Inflammatory Responses. *Clin Ophthalmol*, 16, 1753-1771. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S364200>
- Goicoechea de Jorge, E., Caesar, J. J., Malik, T. H., Patel, M., Colledge, M., Johnson, S., Hakobyan, S., Morgan, B. P., Harris, C. L., Pickering, M. C., & Lea, S. M. (2013). Dimerization of complement factor H-related proteins modulates complement activation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(12), 4685-4690.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1219260110>
- Grunert, U., & Martin, P. R. (2020). Cell types and cell circuits in human and non-human primate retina. *Prog Retin Eye Res*, 100844.
<https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2020.100844>
- Haines, J. L., Hauser, M. A., Schmidt, S., Scott, W. K., Olson, L. M., Gallins, P., Spencer, K. L., Kwan, S. Y., Nouredine, M., Gilbert, J. R., Schnetz-Boutaud, N., Agarwal, A., Postel, E. A., & Pericak-Vance, M. A. (2005). Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science*, 308(5720), 419-421.
<https://doi.org/10.1126/science.1110359>
- Hanson, G., & Collier, J. (2018). Codon optimality, bias and usage in translation and mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(1), 20-30. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.91>
- Harboe, M., Ulvund, G., Vien, L., Fung, M., & Mollnes, T. E. (2004). The quantitative role of alternative pathway amplification in classical pathway induced terminal complement activation. *Clin Exp Immunol*, 138(3), 439-446. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02627.x>

- Hartsock, M. J., Cho, H., Wu, L., Chen, W. J., Gong, J., & Duh, E. J. (2016). A Mouse Model of Retinal Ischemia-Reperfusion Injury Through Elevation of Intraocular Pressure. *J Vis Exp*(113). <https://doi.org/10.3791/54065>
- Hastie, E., & Samulski, R. J. (2015). Adeno-associated virus at 50: a golden anniversary of discovery, research, and gene therapy success--a personal perspective. *Hum Gene Ther*, 26(5), 257-265. <https://doi.org/10.1089/hum.2015.025>
- Heier, J. S., Lad, E. M., Holz, F. G., Rosenfeld, P. J., Guymer, R. H., Boyer, D., Grossi, F., Bauman, C. R., Korobelnik, J. F., Slakter, J. S., Waheed, N. K., Metlapally, R., Pearce, I., Steinle, N., Francone, A. A., Hu, A., Lally, D. R., Deschatelets, P., Francois, C.,...investigators, D. s. (2023). Pegcetacoplan for the treatment of geographic atrophy secondary to age-related macular degeneration (OAKS and DERBY): two multicentre, randomised, double-masked, sham-controlled, phase 3 trials. *Lancet*, 402(10411), 1434-1448. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)01520-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01520-9)
- Herrmann, M. (2020). Luxturna® — erste Gentherapie in der Augenheilkunde. *MMW - Fortschritte der Medizin*, 73. <https://doi.org/10.1007/s15006-020-0708-0>
- Hong, S., Beja-Glasser, V. F., Nfonoyim, B. M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., Merry, K. M., Shi, Q., Rosenthal, A., Barres, B. A., Lemere, C. A., Selkoe, D. J., & Stevens, B. (2016). Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science*, 352(6286), 712-716. <https://doi.org/10.1126/science.aad8373>
- Hughes, A. E., Orr, N., Esfandiary, H., Diaz-Torres, M., Goodship, T., & Chakravarthy, U. (2006). A common CFH haplotype, with deletion of CFHR1 and CFHR3, is associated with lower risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet*, 38(10), 1173-1177. <https://doi.org/10.1038/ng1890>
- Ito, D., Tanaka, K., Suzuki, S., Dembo, T., & Fukuuchi, Y. (2001). Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. *Stroke*, 32(5), 1208-1215. <https://doi.org/10.1161/01.str.32.5.1208>
- Jabri, Y., Biber, J., Diaz-Lezama, N., Grosche, A., & Pauly, D. (2020). Cell-Type-Specific Complement Profiling in the ABCA4(-/-) Mouse Model of Stargardt Disease. *Int J Mol Sci*, 21(22). <https://doi.org/10.3390/ijms21228468>
- Jeon, C. J., Strettoi, E., & Masland, R. H. (1998). The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci*, 18(21), 8936-8946. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-21-08936.1998>
- Johnson, L. V., Leitner, W. P., Staples, M. K., & Anderson, D. H. (2001). Complement activation and inflammatory processes in Drusen formation and age related macular degeneration. *Exp Eye Res*, 73(6), 887-896. <https://doi.org/10.1006/exer.2001.1094>

- Joussen, A. M., Poulaki, V., Le, M. L., Koizumi, K., Esser, C., Janicki, H., Schraermeyer, U., Kociok, N., Fauser, S., Kirchhof, B., Kern, T. S., & Adamis, A. P. (2004). A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *FASEB J*, *18*(12), 1450-1452. <https://doi.org/10.1096/fj.03-1476fje>
- Kashii, S., Mandai, M., Kikuchi, M., Honda, Y., Tamura, Y., Kaneda, K., & Akaike, A. (1996). Dual actions of nitric oxide in N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity in cultured retinal neurons. *Brain Res*, *711*(1-2), 93-101. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01330-x](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01330-x)
- Katz, M. L., & Redmond, T. M. (2001). Effect of Rpe65 knockout on accumulation of lipofuscin fluorophores in the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *42*(12), 3023-3030. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11687551>
- Kennedy, C. J., Rakoczy, P. E., & Constable, I. J. (1995). Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: a review. *Eye (Lond)*, *9* (Pt 6), 763-771. <https://doi.org/10.1038/eye.1995.192>
- Kim, B. J., Mastellos, D. C., Li, Y., Dunaief, J. L., & Lambris, J. D. (2021). Targeting complement components C3 and C5 for the retina: Key concepts and lingering questions. *Prog Retin Eye Res*, *83*, 100936. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2020.100936>
- Kim, S. R., Fishkin, N., Kong, J., Nakanishi, K., Allikmets, R., & Sparrow, J. R. (2004). Rpe65 Leu450Met variant is associated with reduced levels of the retinal pigment epithelium lipofuscin fluorophores A2E and iso-A2E. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(32), 11668-11672. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403499101>
- Kipp, M., & Radlanski, K.,. (2017). *Neuroanatomie. Nachschlagen, Lernen, Verstehen* (Vol. 1). KVM - Der Medizinverlag.
- Kirschner, J., & Cathomen, T. (2020). Gene Therapy for Monogenic Inherited Disorders. *Dtsch Arztebl Int*, *117*(51-52), 878-885. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2020.0878>
- Kiser, P. D., Golczak, M., & Palczewski, K. (2014). Chemistry of the retinoid (visual) cycle. *Chem Rev*, *114*(1), 194-232. <https://doi.org/10.1021/cr400107q>
- Klimczak, R. R., Koerber, J. T., Dalkara, D., Flannery, J. G., & Schaffer, D. V. (2009). A novel adeno-associated viral variant for efficient and selective intravitreal transduction of rat Muller cells. *PLoS One*, *4*(10), e7467. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007467>
- Kofuji, P., Biedermann, B., Siddharthan, V., Raap, M., Iandiev, I., Milenkovic, I., Thomzig, A., Veh, R. W., Bringmann, A., & Reichenbach, A. (2002). Kir potassium channel subunit expression in retinal glial cells: implications for spatial potassium buffering. *Glia*, *39*(3), 292-303. <https://doi.org/10.1002/glia.10112>

- Lachmann, P. J., & Halbwachs, L. (1975). The influence of C3b inactivator (KAF) concentration on the ability of serum to support complement activation. *Clin Exp Immunol*, 21(1), 109-114. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/52423>
- Lachmann, P. J., & Hughes-Jones, N. C. (1984). Initiation of complement activation. *Springer Semin Immunopathol*, 7(2-3), 143-162. <https://doi.org/10.1007/BF01893018>
- Lai, C. M., Yu, M. J., Brankov, M., Barnett, N. L., Zhou, X., Redmond, T. M., Narfstrom, K., & Rakoczy, P. E. (2004). Recombinant adeno-associated virus type 2-mediated gene delivery into the Rpe65(-/-) knockout mouse eye results in limited rescue. *Genet Vaccines Ther*, 2, 3. <https://doi.org/10.1186/1479-0556-2-3>
- Law, S. K., & Dodds, A. W. (1997). The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4. *Protein Sci*, 6(2), 263-274. <https://doi.org/10.1002/pro.5560060201>
- Lee, J. H., Shin, J. M., Shin, Y. J., Chun, M. H., & Oh, S. J. (2011). Immunochemical changes of calbindin, calretinin and SMI32 in ischemic retinas induced by increase of intraocular pressure and by middle cerebral artery occlusion. *Anat Cell Biol*, 44(1), 25-34. <https://doi.org/10.5115/acb.2011.44.1.25>
- Liang, F. Q., Aleman, T. S., Dejneka, N. S., Dudus, L., Fisher, K. J., Maguire, A. M., Jacobson, S. G., & Bennett, J. (2001). Long-term protection of retinal structure but not function using RAAV.CNTF in animal models of retinitis pigmentosa. *Mol Ther*, 4(5), 461-472. <https://doi.org/10.1006/mthe.2001.0473>
- Lim, L. S., Mitchell, P., Seddon, J. M., Holz, F. G., & Wong, T. Y. (2012). Age-related macular degeneration. *Lancet*, 379(9827), 1728-1738. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60282-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60282-7)
- Linsenmeier, R. A. (1986). Effects of light and darkness on oxygen distribution and consumption in the cat retina. *J Gen Physiol*, 88(4), 521-542. <https://doi.org/10.1085/jgp.88.4.521>
- Ljubimov, A. V., Burgeson, R. E., Butkowski, R. J., Couchman, J. R., Zardi, L., Ninomiya, Y., Sado, Y., Huang, Z. S., Nesburn, A. B., & Kenney, M. C. (1996). Basement membrane abnormalities in human eyes with diabetic retinopathy. *J Histochem Cytochem*, 44(12), 1469-1479. <https://doi.org/10.1177/44.12.8985139>
- Long, K. O., Fisher, S. K., Fariss, R. N., & Anderson, D. H. (1986). Disc shedding and autophagy in the cone-dominant ground squirrel retina. *Exp Eye Res*, 43(2), 193-205. [https://doi.org/10.1016/s0014-4835\(86\)80087-2](https://doi.org/10.1016/s0014-4835(86)80087-2)
- Maeda, A., Maeda, T., Golczak, M., Chou, S., Desai, A., Hoppel, C. L., Matsuyama, S., & Palczewski, K. (2009). Involvement of all-trans-retinal in acute light-induced retinopathy of mice. *J Biol Chem*, 284(22), 15173-15183. <https://doi.org/10.1074/jbc.M900322200>

- Maeda, A., Maeda, T., Golczak, M., & Palczewski, K. (2008). Retinopathy in mice induced by disrupted all-trans-retinal clearance. *J Biol Chem*, 283(39), 26684-26693. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804505200>
- Maeda, A., Maeda, T., Sun, W., Zhang, H., Baehr, W., & Palczewski, K. (2007). Redundant and unique roles of retinol dehydrogenases in the mouse retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(49), 19565-19570. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707477104>
- Maeda, T., Maeda, A., Matosky, M., Okano, K., Roos, S., Tang, J., & Palczewski, K. (2009). Evaluation of potential therapies for a mouse model of human age-related macular degeneration caused by delayed all-trans-retinal clearance. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50(10), 4917-4925. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-3581>
- Maguire, A. M., Russell, S., Wellman, J. A., Chung, D. C., Yu, Z. F., Tillman, A., Wittes, J., Pappas, J., Elci, O., Marshall, K. A., McCague, S., Reichert, H., Davis, M., Simonelli, F., Leroy, B. P., Wright, J. F., High, K. A., & Bennett, J. (2019). Efficacy, Safety, and Durability of Voretigene Neparvovec-rzyl in RPE65 Mutation-Associated Inherited Retinal Dystrophy: Results of Phase 1 and 3 Trials. *Ophthalmology*, 126(9), 1273-1285. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2019.06.017>
- Maguire, A. M., Simonelli, F., Pierce, E. A., Pugh, E. N., Jr., Mingozzi, F., Bennicelli, J., Banfi, S., Marshall, K. A., Testa, F., Surace, E. M., Rossi, S., Lyubarsky, A., Arruda, V. R., Konkle, B., Stone, E., Sun, J., Jacobs, J., Dell'Osso, L., Hertle, R.,...Bennett, J. (2008). Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med*, 358(21), 2240-2248. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802315>
- Matsui, K., Hosoi, N., & Tachibana, M. (1999). Active role of glutamate uptake in the synaptic transmission from retinal nonspiking neurons. *J Neurosci*, 19(16), 6755-6766. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-16-06755.1999>
- Mattapallil, M. J., Wawrousek, E. F., Chan, C. C., Zhao, H., Roychoudhury, J., Ferguson, T. A., & Caspi, R. R. (2012). The Rd8 mutation of the Crb1 gene is present in vendor lines of C57BL/6N mice and embryonic stem cells, and confounds ocular induced mutant phenotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53(6), 2921-2927. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-9662>
- Mehalow, A. K., Kameya, S., Smith, R. S., Hawes, N. L., Denegre, J. M., Young, J. A., Bechtold, L., Haider, N. B., Tepass, U., Heckenlively, J. R., Chang, B., Naggert, J. K., & Nishina, P. M. (2003). CRB1 is essential for external limiting membrane integrity and photoreceptor morphogenesis in the mammalian retina. *Hum Mol Genet*, 12(17), 2179-2189. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg232>
- Merle, N. S., Church, S. E., Fremeaux-Bacchi, V., & Roumenina, L. T. (2015a). Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol*, 6, 262. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00262>

- Merle, N. S., Noe, R., Halbwachs-Mecarelli, L., Fremeaux-Bacchi, V., & Roumenina, L. T. (2015b). Complement System Part II: Role in Immunity. *Front Immunol*, *6*, 257. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00257>
- Minhas, G., Sharma, J., & Khan, N. (2016). Cellular Stress Response and Immune Signaling in Retinal Ischemia-Reperfusion Injury. *Front Immunol*, *7*, 444. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00444>
- Morimura, H., Fishman, G. A., Grover, S. A., Fulton, A. B., Berson, E. L., & Dryja, T. P. (1998). Mutations in the RPE65 gene in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa or leber congenital amaurosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(6), 3088-3093. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3088>
- Mukai, R., Okunuki, Y., Husain, D., Kim, C. B., Lambris, J. D., & Connor, K. M. (2018). The Complement System Is Critical in Maintaining Retinal Integrity during Aging. *Front Aging Neurosci*, *10*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00015>
- Muniz, A., Villazana-Espinoza, E. T., Hatch, A. L., Trevino, S. G., Allen, D. M., & Tsin, A. T. (2007). A novel cone visual cycle in the cone-dominated retina. *Exp Eye Res*, *85*(2), 175-184. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2007.05.003>
- Muzyczka, N. (1994). Adeno-associated virus (AAV) vectors: will they work? *J Clin Invest*, *94*(4), 1351. <https://doi.org/10.1172/JCI117468>
- Nagelhus, E. A., Veruki, M. L., Torp, R., Haug, F. M., Laake, J. H., Nielsen, S., Agre, P., & Ottersen, O. P. (1998). Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes. *J Neurosci*, *18*(7), 2506-2519. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-07-02506.1998>
- Neufeld, A. H., Kawai, S., Das, S., Vora, S., Gachie, E., Connor, J. R., & Manning, P. T. (2002). Loss of retinal ganglion cells following retinal ischemia: the role of inducible nitric oxide synthase. *Exp Eye Res*, *75*(5), 521-528. <https://doi.org/10.1006/exer.2002.2042>
- Nicol, P. A., & Lachmann, P. J. (1973). The alternate pathway of complement activation. The role of C3 and its inactivator (KAF). *Immunology*, *24*(2), 259-275. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4632688>
- Nissilä, E., Hakala, P., Leskinen, K., Roig, A., Syed, S., Van Kessel, K. P. M., Metso, J., De Haas, C. J. C., Saavalainen, P., Meri, S., Chroni, A., Van Strijp, J. A. G., Oorni, K., Jauhainen, M., Jokiranta, T. S., & Haapasalo, K. (2018). Complement Factor H and Apolipoprotein E Participate in Regulation of Inflammation in THP-1 Macrophages. *Front Immunol*, *9*, 2701. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02701>
- Novartis. (2016, 26.04.2016). *Novartis Clinical Trial Results Website: A multicenter, randomized, sham-control, proof-of-concept study of intravitreal LF316 in patients with geographic atrophy associated with age-related macular degeneration*. Retrieved

- 27.03.2023 from
<https://www.novctrd.com/ctrdweb/trialresult/trialresults/pdf?trialResultId=15033>
- Novartis. (2023, 11.09.2023). *GT005 (PPY988): Development Program in Geographic Atrophy*. Retrieved 26.01.2025 from <https://www.novartis.com/news/gt005-ppy988-development-program-geographic-atrophy>
- Oppermann, M., Manuelian, T., Jozsi, M., Brandt, E., Jokiranta, T. S., Heinen, S., Meri, S., Skerka, C., Gotze, O., & Zipfel, P. F. (2006). The C-terminus of complement regulator Factor H mediates target recognition: evidence for a compact conformation of the native protein. *Clin Exp Immunol*, *144*(2), 342-352. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03071.x>
- Osborne, N. N., Casson, R. J., Wood, J. P., Chidlow, G., Graham, M., & Melena, J. (2004). Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res*, *23*(1), 91-147. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2003.12.001>
- Pang, J. J., Chang, B., Hawes, N. L., Hurd, R. E., Davisson, M. T., Li, J., Noorwez, S. M., Malhotra, R., McDowell, J. H., Kaushal, S., Hauswirth, W. W., Nusinowitz, S., Thompson, D. A., & Heckenlively, J. R. (2005). Retinal degeneration 12 (rd12): a new, spontaneously arising mouse model for human Leber congenital amaurosis (LCA). *Mol Vis*, *11*, 152-162. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15765048>
- Pangburn, M. K., & Muller-Eberhard, H. J. (1986). The C3 convertase of the alternative pathway of human complement. Enzymic properties of the bimolecular proteinase. *Biochem J*, *235*(3), 723-730. <https://doi.org/10.1042/bj2350723>
- Pannicke, T., Frommherz, I., Biedermann, B., Wagner, L., Sauer, K., Ulbricht, E., Hartig, W., Krugel, U., Ueberham, U., Arendt, T., Illes, P., Bringmann, A., Reichenbach, A., & Grosche, A. (2014). Differential effects of P2Y1 deletion on glial activation and survival of photoreceptors and amacrine cells in the ischemic mouse retina. *Cell Death Dis*, *5*(7), e1353. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.317>
- Paul-Ehrlich-Institut. (2023, 22.12.2023). *Erstes Geneditierungsarzneimittel basierend auf der Genschere CRISPR/Cas erhält Zulassungsempfehlung*. Retrieved 14.04.2024 from <https://www.pei.de/DE/newsroom/hp-meldungen/2023/231222-zulassungsempfehlung-geneditierungsarzneimittel.html>
- Paul Ehrlich Insitut. (2025, 24.01.2025). *Gentherapie*. Retrieved 22.03.2025 from <https://www.pei.de/DE/arzneimittel/atmp/gentherapie/gentherapie-node.html>
- Paulson, O. B., & Newman, E. A. (1987). Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? *Science*, *237*(4817), 896-898. <https://doi.org/10.1126/science.3616619>
- Pauly, D., Agarwal, D., Dana, N., Schafer, N., Biber, J., Wunderlich, K. A., Jabri, Y., Straub, T., Zhang, N. R., Gautam, A. K., Weber, B. H. F., Hauck, S. M., Kim, M., Curcio, C. A.,

- Stambolian, D., Li, M., & Grosche, A. (2019). Cell-Type-Specific Complement Expression in the Healthy and Diseased Retina. *Cell Rep*, 29(9), 2835-2848 e2834. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.084>
- Pavlou, M., Schon, C., Occelli, L. M., Rossi, A., Meumann, N., Boyd, R. F., Bartoe, J. T., Siedlecki, J., Gerhardt, M. J., Babutzka, S., Bogedein, J., Wagner, J. E., Priglinger, S. G., Biel, M., Petersen-Jones, S. M., Buning, H., & Michalakis, S. (2021). Novel AAV capsids for intravitreal gene therapy of photoreceptor disorders. *EMBO Mol Med*, 13(4), e13392. <https://doi.org/10.15252/emmm.202013392>
- Perkins, S. J., Nan, R., Li, K., Khan, S., & Miller, A. (2012). Complement factor H-ligand interactions: self-association, multivalency and dissociation constants. *Immunobiology*, 217(2), 281-297. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.10.003>
- Pow, D. V., & Crook, D. K. (1995). Immunocytochemical evidence for the presence of high levels of reduced glutathione in radial glial cells and horizontal cells in the rabbit retina. *Neurosci Lett*, 193(1), 25-28. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)11657-i](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)11657-i)
- Pow, D. V., & Crook, D. K. (1996). Direct immunocytochemical evidence for the transfer of glutamine from glial cells to neurons: use of specific antibodies directed against the d-stereoisomers of glutamate and glutamine. *Neuroscience*, 70(1), 295-302. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00363-n](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00363-n)
- Pow, D. V., & Robinson, S. R. (1994). Glutamate in some retinal neurons is derived solely from glia. *Neuroscience*, 60(2), 355-366. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90249-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90249-6)
- Radu, R. A., Hu, J., Yuan, Q., Welch, D. L., Makshanoff, J., Lloyd, M., McMullen, S., Travis, G. H., & Bok, D. (2011). Complement system dysregulation and inflammation in the retinal pigment epithelium of a mouse model for Stargardt macular degeneration. *J Biol Chem*, 286(21), 18593-18601. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.191866>
- Redmond, T. M. (2009). Focus on Molecules: RPE65, the visual cycle retinol isomerase. *Exp Eye Res*, 88(5), 846-847. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2008.07.015>
- Redmond, T. M., Yu, S., Lee, E., Bok, D., Hamasaki, D., Chen, N., Goletz, P., Ma, J. X., Crouch, R. K., & Pfeifer, K. (1998). Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. *Nat Genet*, 20(4), 344-351. <https://doi.org/10.1038/3813>
- Reichel, F. F., Seitz, I., Wozar, F., Dimopoulos, S., Jung, R., Kempf, M., Kohl, S., Kortum, F. C., Ott, S., Pohl, L., Stingl, K., Bartz-Schmidt, K. U., Stingl, K., & Fischer, M. D. (2023). Development of retinal atrophy after subretinal gene therapy with voretigene neparvovec. *Br J Ophthalmol*, 107(9), 1331-1335. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2021-321023>

- Reichenbach, A., & Bringmann, A. (2013). New functions of Muller cells. *Glia*, 61(5), 651-678. <https://doi.org/10.1002/glia.22477>
- Renner, M., Stute, G., Alzureiqi, M., Reinhard, J., Wiemann, S., Schmid, H., Faissner, A., Dick, H. B., & Joachim, S. C. (2017). Optic Nerve Degeneration after Retinal Ischemia/Reperfusion in a Rodent Model. *Front Cell Neurosci*, 11, 254. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00254>
- Riepe, R. E., & Norenburg, M. D. (1977). Muller cell localisation of glutamine synthetase in rat retina. *Nature*, 268(5621), 654-655. <https://doi.org/10.1038/268654a0>
- Roche. (2016, 03/2016). *In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red. Version 12*. Retrieved 14.04.2024 from <https://labettor.com/uploads/products/protocols/162.pdf>
- Rudolph, G., Kalpadakis, P., Haritoglou, C., Rivera, A., & Weber, B. H. (2002). [Mutations in the ABCA4 gene in a family with Stargardt's disease and retinitis pigmentosa (STGD1/RP19)]. *Klin Monbl Augenheilkd*, 219(8), 590-596. <https://doi.org/10.1055/s-2002-34425> (Mutationen im ABCA4-Gen in einer Familie mit Stargardtscher Erkrankung und Retinitis pigmentosa (STGD1/RP19).)
- Russell, S., Bennett, J., Wellman, J. A., Chung, D. C., Yu, Z. F., Tillman, A., Wittes, J., Pappas, J., Elci, O., McCague, S., Cross, D., Marshall, K. A., Walshire, J., Kehoe, T. L., Reichert, H., Davis, M., Raffini, L., George, L. A., Hudson, F. P.,...Maguire, A. M. (2017). Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet*, 390(10097), 849-860. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31868-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31868-8)
- Sachsenweger, M. (2003). *Duale Reihe Augenheilkunde* (Vol. 2). Thieme.
- Santos, A. M., Calvente, R., Tassi, M., Carrasco, M. C., Martin-Oliva, D., Marin-Teva, J. L., Navascues, J., & Cuadros, M. A. (2008). Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina. *J Comp Neurol*, 506(2), 224-239. <https://doi.org/10.1002/cne.21538>
- Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., Ransohoff, R. M., Greenberg, M. E., Barres, B. A., & Stevens, B. (2012). Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron*, 74(4), 691-705. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026>
- Schafer, N., Grosche, A., Schmitt, S. I., Braunger, B. M., & Pauly, D. (2017). Complement Components Showed a Time-Dependent Local Expression Pattern in Constant and Acute White Light-Induced Photoreceptor Damage. *Front Mol Neurosci*, 10, 197. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00197>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V.,

- Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9(7), 676-682.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schmidt, C. Q., Bai, H., Lin, Z., Risitano, A. M., Barlow, P. N., Ricklin, D., & Lambris, J. D. (2013). Rational engineering of a minimized immune inhibitor with unique triple-targeting properties. *J Immunol*, 190(11), 5712-5721.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203548>
- Seddon, J. M., Cote, J., Davis, N., & Rosner, B. (2003). Progression of age-related macular degeneration: association with body mass index, waist circumference, and waist-hip ratio. *Arch Ophthalmol*, 121(6), 785-792. <https://doi.org/10.1001/archopht.121.6.785>
- Seddon, J. M., Willett, W. C., Speizer, F. E., & Hankinson, S. E. (1996). A prospective study of cigarette smoking and age-related macular degeneration in women. *JAMA*, 276(14), 1141-1146. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8827966>
- Seddon, J. M., Yu, Y., Miller, E. C., Reynolds, R., Tan, P. L., Gowrisankar, S., Goldstein, J. I., Triebwasser, M., Anderson, H. E., Zerbib, J., Kavanagh, D., Souied, E., Katsanis, N., Daly, M. J., Atkinson, J. P., & Raychaudhuri, S. (2013). Rare variants in CFI, C3 and C9 are associated with high risk of advanced age-related macular degeneration. *Nat Genet*, 45(11), 1366-1370. <https://doi.org/10.1038/ng.2741>
- Seitz, I. P., Michalakis, S., Wilhelm, B., Reichel, F. F., Ochakovski, G. A., Zrenner, E., Ueffing, M., Biel, M., Wissinger, B., Bartz-Schmidt, K. U., Peters, T., Fischer, M. D., & Consortium, R.-C. (2017). Superior Retinal Gene Transfer and Biodistribution Profile of Subretinal Versus Intravitreal Delivery of AAV8 in Nonhuman Primates. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 58(13), 5792-5801. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-22473>
- Sengillo, J. D., Gregori, N. Z., Sisk, R. A., Weng, C. Y., Berrocal, A. M., Davis, J. L., Mendoza-Santiesteban, C. E., Zheng, D. D., Feuer, W. J., & Lam, B. L. (2022). Visual Acuity, Retinal Morphology, and Patients' Perceptions after Voretigene Neparovec-rzyl Therapy for RPE65-Associated Retinal Disease. *Ophthalmol Retina*, 6(4), 273-283.
<https://doi.org/10.1016/j.oret.2021.11.005>
- Shakeel, L., Khan, A., & Akilimali, A. (2024). "Izervay (avacincaptad pegol): paving the way for vision preservation in geographic atrophy". *Ann Med Surg (Lond)*, 86(5), 2413-2416. <https://doi.org/10.1097/MS9.0000000000002021>
- Shen, F., Chen, B., Danias, J., Lee, K. C., Lee, H., Su, Y., Podos, S. M., & Mittag, T. W. (2004). Glutamate-induced glutamine synthetase expression in retinal Muller cells after short-term ocular hypertension in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(9), 3107-3112. <https://doi.org/10.1167/iovs.03-0948>
- Shen, W., Fruttiger, M., Zhu, L., Chung, S. H., Barnett, N. L., Kirk, J. K., Lee, S., Coorey, N. J., Killingsworth, M., Sherman, L. S., & Gillies, M. C. (2012). Conditional Muller cell

- ablation causes independent neuronal and vascular pathologies in a novel transgenic model. *J Neurosci*, 32(45), 15715-15727. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2841-12.2012>
- Skowronek, K., Boniecki, M. J., Kluge, B., & Bujnicki, J. M. (2012). Rational engineering of sequence specificity in R.MwoI restriction endonuclease. *Nucleic Acids Res*, 40(17), 8579-8592. <https://doi.org/10.1093/nar/gks570>
- Smith, R. H. (2008). Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene Ther*, 15(11), 817-822. <https://doi.org/10.1038/gt.2008.55>
- Smith, W., Assink, J., Klein, R., Mitchell, P., Klaver, C. C., Klein, B. E., Hofman, A., Jensen, S., Wang, J. J., & de Jong, P. T. (2001). Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents. *Ophthalmology*, 108(4), 697-704. [https://doi.org/10.1016/s0161-6420\(00\)00580-7](https://doi.org/10.1016/s0161-6420(00)00580-7)
- Stargardt, K. (1909). Über familiäre, progressive Degeneration in der Maculagegend des Auges. *Graefes Archiv für Ophthalmologie*, 71, 534-550.
- Stargardt, K. (1913). I. Über familiäre, progressive Degeneration in der Maculagegend des Auges. *Zeitschrift für Augenheilkunde*, 30, 95-116.
- Stargardt, K. (1916). IV. Zur Kasuistik der „Familiären, progressiven Degeneration in der Maculagegend des Auges“. *Zeitschrift für Augenheilkunde*, 35, 249-255.
- Stence, N., Waite, M., & Dailey, M. E. (2001). Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia*, 33(3), 256-266. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11241743>
- Stevens, B., Allen, N. J., Vazquez, L. E., Howell, G. R., Christopherson, K. S., Nouri, N., Micheva, K. D., Mehalow, A. K., Huberman, A. D., Stafford, B., Sher, A., Litke, A. M., Lambris, J. D., Smith, S. J., John, S. W., & Barres, B. A. (2007). The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*, 131(6), 1164-1178. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.036>
- Stingl, K., Kempf, M., Bartz-Schmidt, K. U., Dimopoulos, S., Reichel, F., Jung, R., Kelbsch, C., Kohl, S., Kortum, F. C., Nasser, F., Peters, T., Wilhelm, B., Wissinger, B., Wozar, F., Zrenner, E., Fischer, M. D., & Stingl, K. (2022). Spatial and temporal resolution of the photoreceptors rescue dynamics after treatment with voretigene neparvovec. *Br J Ophthalmol*, 106(6), 831-838. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2020-318286>
- Stone, J., & Dreher, Z. (1987). Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina. *J Comp Neurol*, 255(1), 35-49. <https://doi.org/10.1002/cne.902550104>
- Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev*, 85(3), 845-881. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2004>

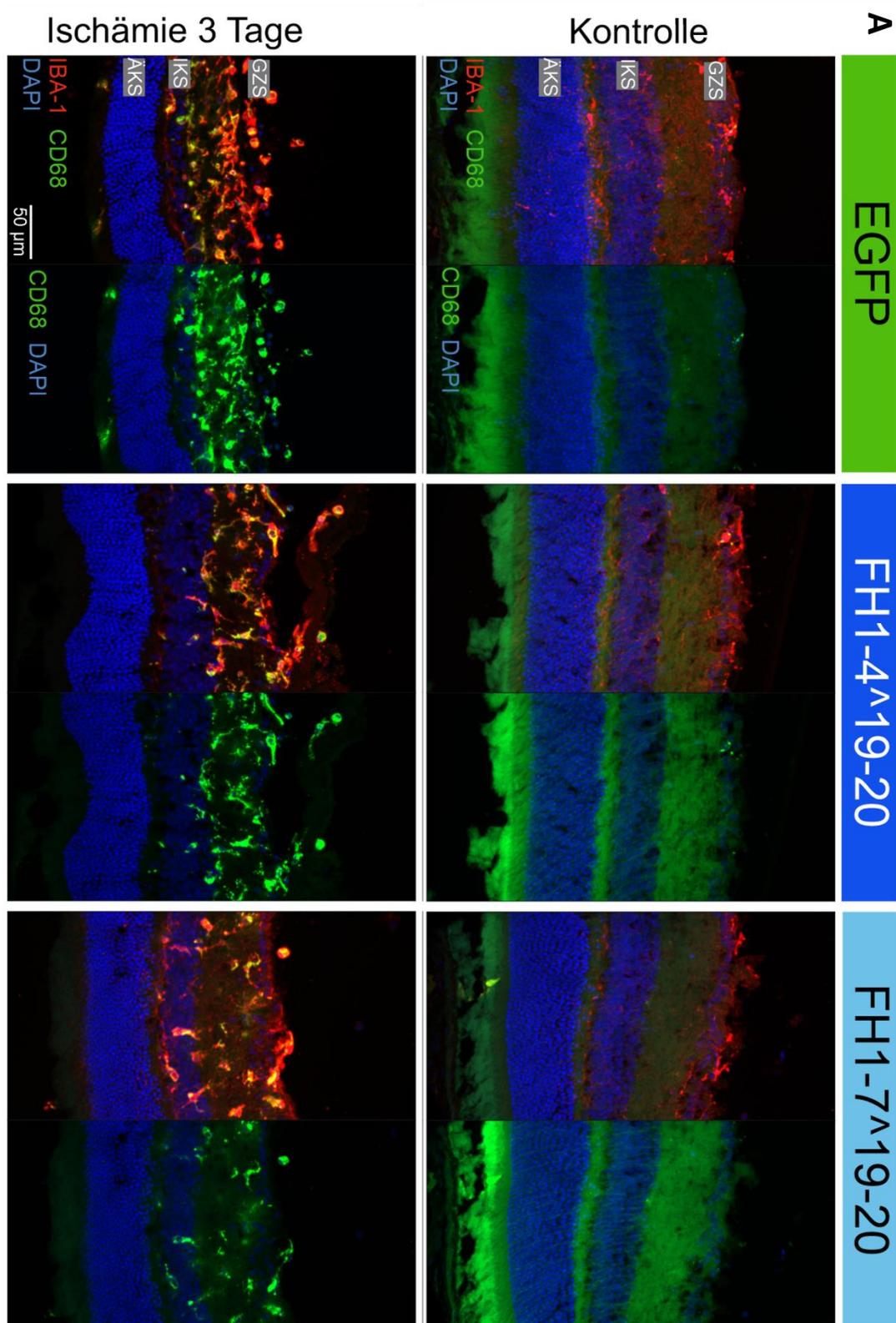
- Streit, W. J., Walter, S. A., & Pennell, N. A. (1999). Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol*, 57(6), 563-581. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(98\)00069-0](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(98)00069-0)
- Sudharsan, R., Beiting, D. P., Aguirre, G. D., & Beltran, W. A. (2017). Involvement of Innate Immune System in Late Stages of Inherited Photoreceptor Degeneration. *Sci Rep*, 7(1), 17897. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18236-7>
- Tanabu, R., Sato, K., Monai, N., Yamauchi, K., Gonome, T., Xie, Y., Takahashi, S., Ishiguro, S. I., & Nakazawa, M. (2019). The findings of optical coherence tomography of retinal degeneration in relation to the morphological and electroretinographic features in RPE65^{-/-} mice. *PLoS One*, 14(1), e0210439. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210439>
- The Jackson Laboratory. (2023a, 2023). *Protocol 21392: Standard PCR Assay - Rdh8<tm1Kpal>-Alternate 2, Version 1.0*. Retrieved 11.04.2023 from <https://www.jax.org/Protocol?stockNumber=030503&protocolID=21392>
- The Jackson Laboratory. (2023b, 2023). *Protocol 28323: Standard PCR Assay - Abca4<tm1Ght> Alternate3, Version 1.2*. Retrieved 11.04.23 from <https://www.jax.org/Protocol?stockNumber=030503&protocolID=28323>
- Tout, S., Chan-Ling, T., Hollander, H., & Stone, J. (1993). The role of Muller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neuroscience*, 55(1), 291-301. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90473-s](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90473-s)
- Trepel, M. (2017). *Neuroanatomie - Struktur und Funktion* (Vol. 7). Elsevier/ Urban & Fischer.
- Uckermann, O., Vargova, L., Ulbricht, E., Klaus, C., Weick, M., Rillich, K., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Sykova, E., & Bringmann, A. (2004). Glutamate-evoked alterations of glial and neuronal cell morphology in the guinea pig retina. *J Neurosci*, 24(45), 10149-10158. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3203-04.2004>
- Vecino, E., Rodriguez, F. D., Ruzafa, N., Pereiro, X., & Sharma, S. C. (2016). Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res*, 51, 1-40. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.06.003>
- ViGeneron GmbH. (2023, 22.08.2023). *ViGeneron announces EMA Approval of Clinical Trial Application for VG901, a gene therapy to treat Retinitis Pigmentosa*. Retrieved 14.04.2024 from <https://vigeneron.com/press/vigeneron-announces-ema-approval-of-clinical-trial-application-for-vg901-a-gene-therapy-to-treat-retinitis-pigmentosa/>
- ViGeneron GmbH. (2025, 08.01.2025). *ViGeneron Announces FDA Rare Pediatric Disease Designation for VG901 and DSMB Approval to Advance Dose Escalation in Phase 1b Retinitis Pigmentosa Trial*. Retrieved 26.01.2025 from <https://vigeneron.com/press/vigeneron-announces-fda-rare-pediatric-disease-designation-for-vg901-and-dsmb-approval-to-advance-dose-escalation-in-phase-1b-retinitis-pigmentosa-trial/>

- Volland, S., Esteve-Rudd, J., Hoo, J., Yee, C., & Williams, D. S. (2015). A comparison of some organizational characteristics of the mouse central retina and the human macula. *PLoS One*, *10*(4), e0125631. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125631>
- Volz, C., & Pauly, D. (2015). Antibody therapies and their challenges in the treatment of age-related macular degeneration. *Eur J Pharm Biopharm*, *95*(Pt B), 158-172. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.02.020>
- Wagner, L., Pannicke, T., Frommherz, I., Sauer, K., Chen, J., & Grosche, A. (2016). Effects of IP3R2 Receptor Deletion in the Ischemic Mouse Retina. *Neurochem Res*, *41*(4), 677-686. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1735-6>
- Walker, F. R., Nilsson, M., & Jones, K. (2013). Acute and chronic stress-induced disturbances of microglial plasticity, phenotype and function. *Curr Drug Targets*, *14*(11), 1262-1276. <https://doi.org/10.2174/13894501113149990208>
- Wang, J. S., & Kefalov, V. J. (2011). The cone-specific visual cycle. *Prog Retin Eye Res*, *30*(2), 115-128. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2010.11.001>
- Weber, B. H., Charbel Issa, P., Pauly, D., Herrmann, P., Grassmann, F., & Holz, F. G. (2014). The role of the complement system in age-related macular degeneration. *Dtsch Arztebl Int*, *111*(8), 133-138. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2014.0133>
- Weismann, D., Hartvigsen, K., Lauer, N., Bennett, K. L., Scholl, H. P., Charbel Issa, P., Cano, M., Brandstatter, H., Tsimikas, S., Skerka, C., Superti-Furga, G., Handa, J. T., Zipfel, P. F., Witzum, J. L., & Binder, C. J. (2011). Complement factor H binds malondialdehyde epitopes and protects from oxidative stress. *Nature*, *478*(7367), 76-81. <https://doi.org/10.1038/nature10449>
- Wenzel, A., Reme, C. E., Williams, T. P., Hafezi, F., & Grimm, C. (2001). The Rpe65 Leu450Met variation increases retinal resistance against light-induced degeneration by slowing rhodopsin regeneration. *J Neurosci*, *21*(1), 53-58. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-01-00053.2001>
- Whaley, K., & Ruddy, S. (1976). Modulation of the alternative complement pathways by beta 1 H globulin. *J Exp Med*, *144*(5), 1147-1163. <https://doi.org/10.1084/jem.144.5.1147>
- Willbold, E., Berger, J., Reinicke, M., & Wolburg, H. (1997). On the role of Muller glia cells in histogenesis: only retinal spheroids, but not tectal, telencephalic and cerebellar spheroids develop histotypical patterns. *J Hirnforsch*, *38*(3), 383-396. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9350510>
- Woodell, A., Jones, B. W., Williamson, T., Schnabolk, G., Tomlinson, S., Atkinson, C., & Rohrer, B. (2016). A Targeted Inhibitor of the Alternative Complement Pathway Accelerates Recovery From Smoke-Induced Ocular Injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *57*(4), 1728-1737. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-18471>

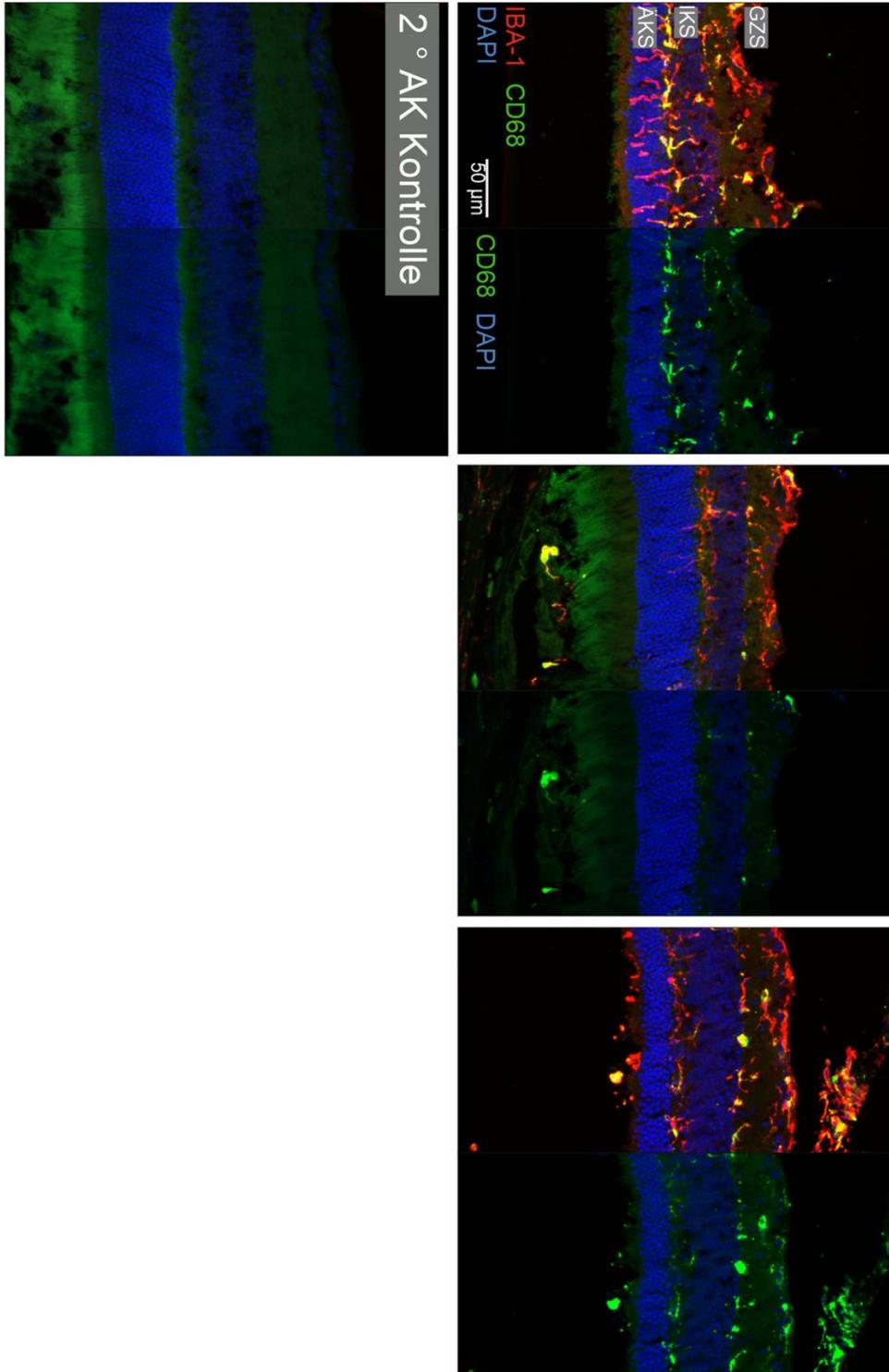
- Wu, J., Wu, Y. Q., Ricklin, D., Janssen, B. J., Lambris, J. D., & Gros, P. (2009). Structure of complement fragment C3b-factor H and implications for host protection by complement regulators. *Nat Immunol*, *10*(7), 728-733. <https://doi.org/10.1038/ni.1755>
- Wu, L., Nagasaki, T., & Sparrow, J. R. (2010). Photoreceptor cell degeneration in Abcr (-/-) mice. *Adv Exp Med Biol*, *664*, 533-539. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1399-9_61
- Wu, L., Ueda, K., Nagasaki, T., & Sparrow, J. R. (2014). Light damage in Abca4 and Rpe65rd12 mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *55*(3), 1910-1918. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-13867>
- Wu, Z., Asokan, A., & Samulski, R. J. (2006). Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther*, *14*(3), 316-327. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.05.009>
- Yehoshua, Z., de Amorim Garcia Filho, C. A., Nunes, R. P., Gregori, G., Penha, F. M., Moshfeghi, A. A., Zhang, K., Sadda, S., Feuer, W., & Rosenfeld, P. J. (2014). Systemic complement inhibition with eculizumab for geographic atrophy in age-related macular degeneration: the COMPLETE study. *Ophthalmology*, *121*(3), 693-701. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2013.09.044>
- Yoshida, N., Ikeda, Y., Notomi, S., Ishikawa, K., Murakami, Y., Hisatomi, T., Enaida, H., & Ishibashi, T. (2013). Clinical evidence of sustained chronic inflammatory reaction in retinitis pigmentosa. *Ophthalmology*, *120*(1), 100-105. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2012.07.006>
- Zauhar, R., Biber, J., Jabri, Y., Kim, M., Hu, J., Kaplan, L., Pfaller, A. M., Schafer, N., Enzmann, V., Schlotzer-Schrehardt, U., Straub, T., Hauck, S. M., Gamlin, P. D., McFerrin, M. B., Messinger, J., Strang, C. E., Curcio, C. A., Dana, N., Pauly, D., ... Stambolian, D. (2022). As in Real Estate, Location Matters: Cellular Expression of Complement Varies Between Macular and Peripheral Regions of the Retina and Supporting Tissues. *Front Immunol*, *13*, 895519. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.895519>
- Zhang, J., Gerhardinger, C., & Lorenzi, M. (2002). Early complement activation and decreased levels of glycosylphosphatidylinositol-anchored complement inhibitors in human and experimental diabetic retinopathy. *Diabetes*, *51*(12), 3499-3504. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.12.3499>

Anhang

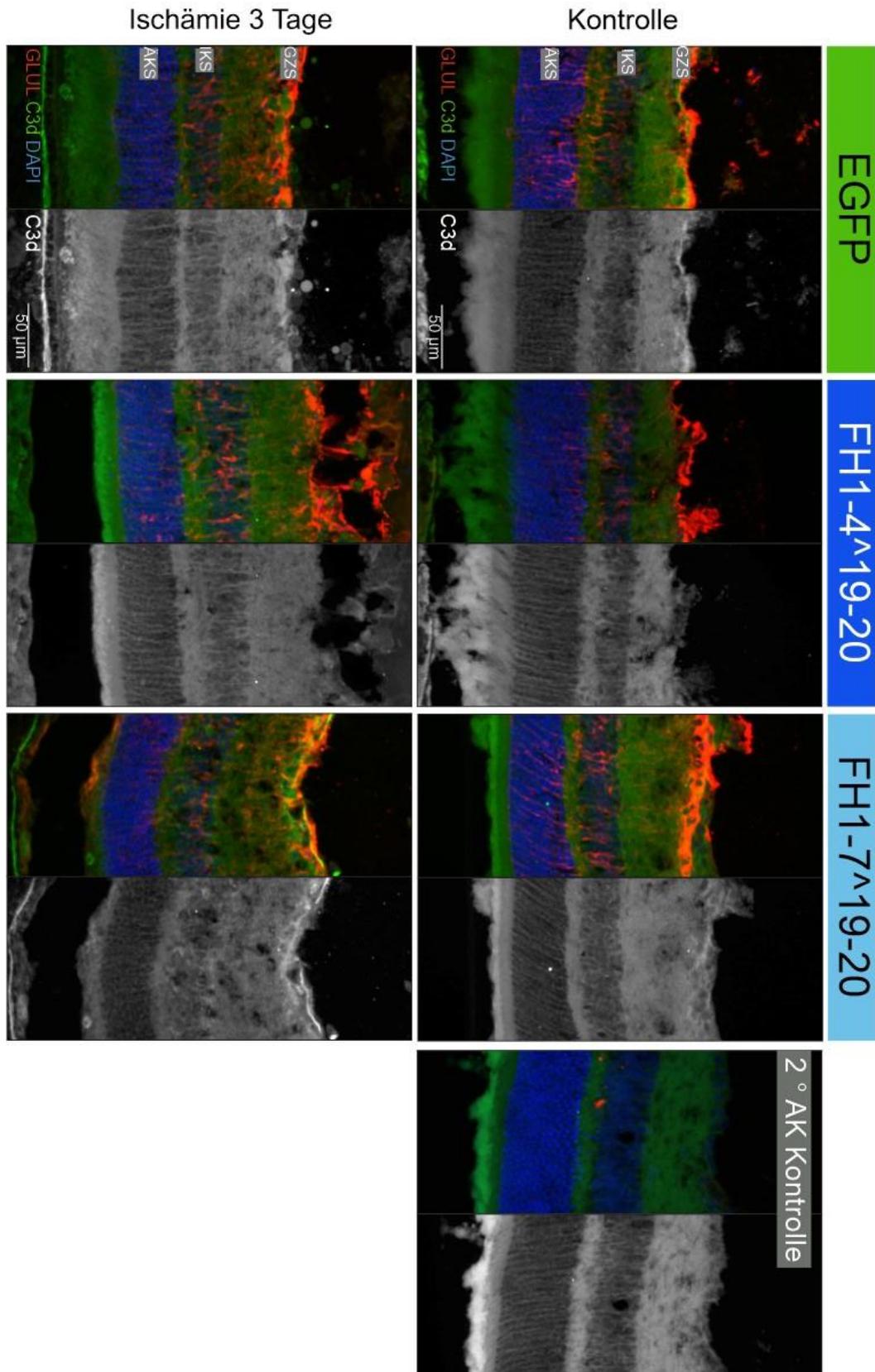
Anhang A: Vergrößerte Darstellung von Abbildung 16 A



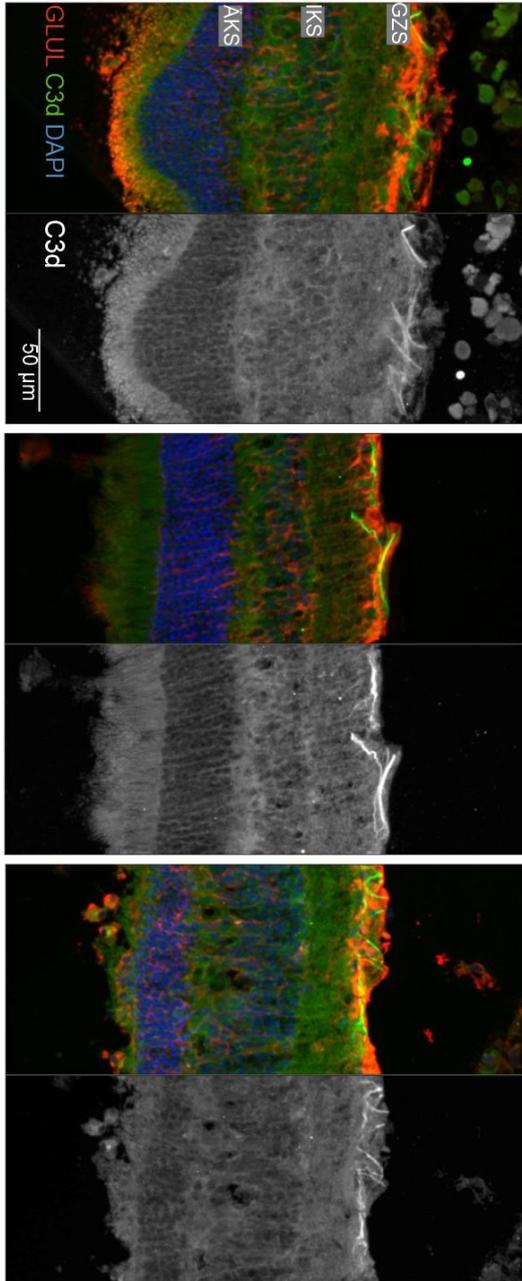
Ischämie 14 Tage



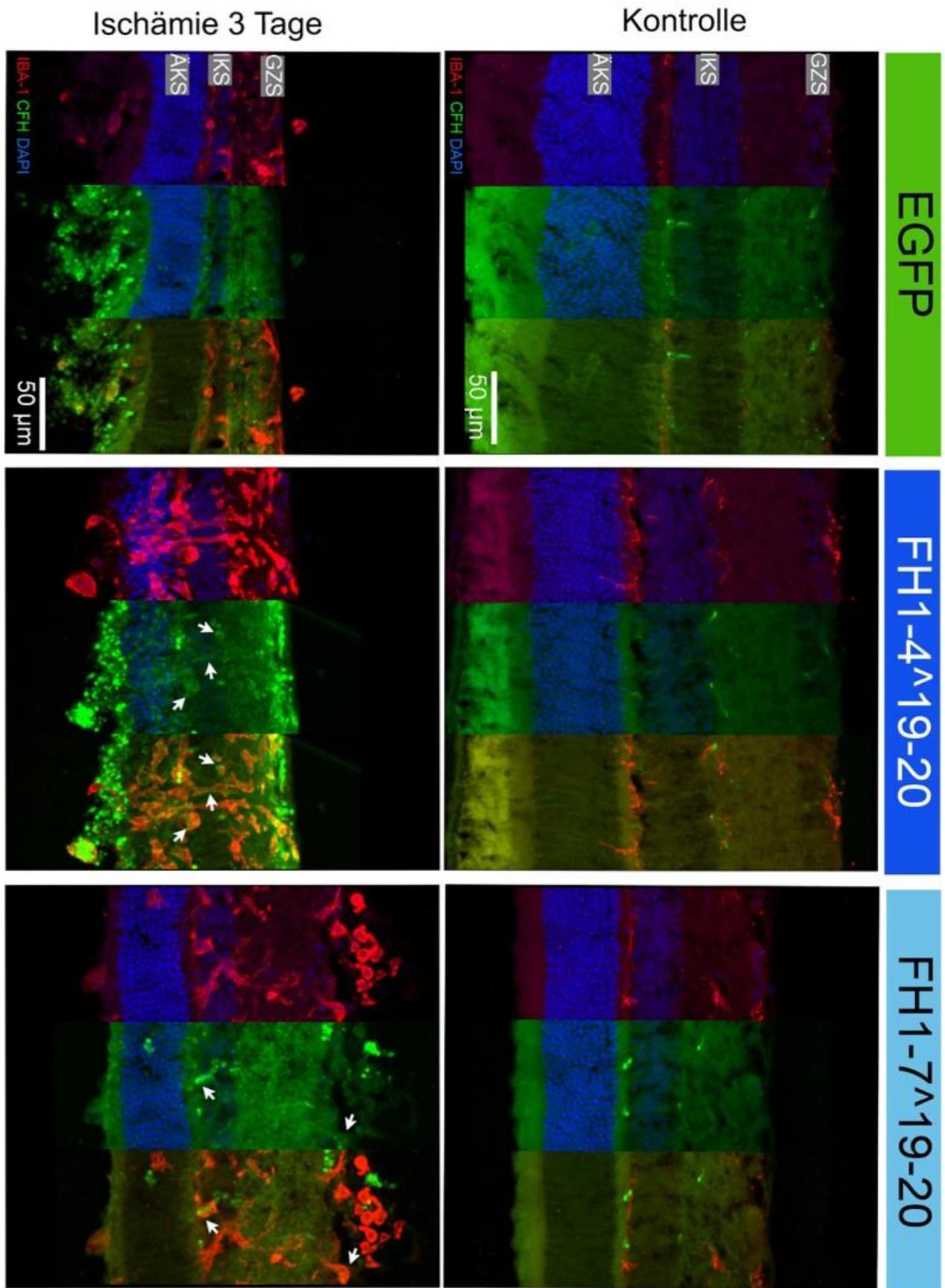
Anhang B: Vergrößerte Darstellung von Abbildung 17 B



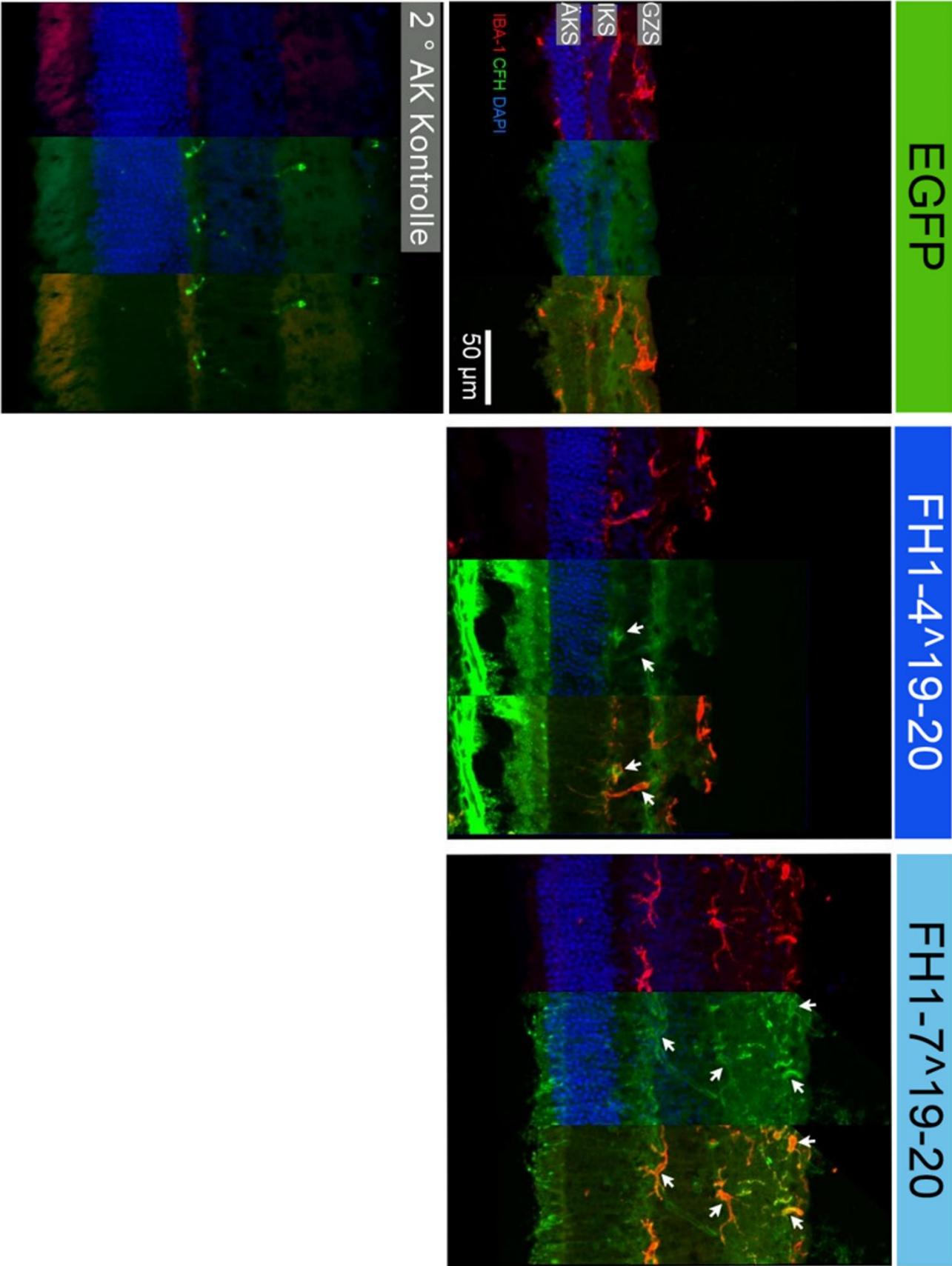
Ischämie 14 Tage



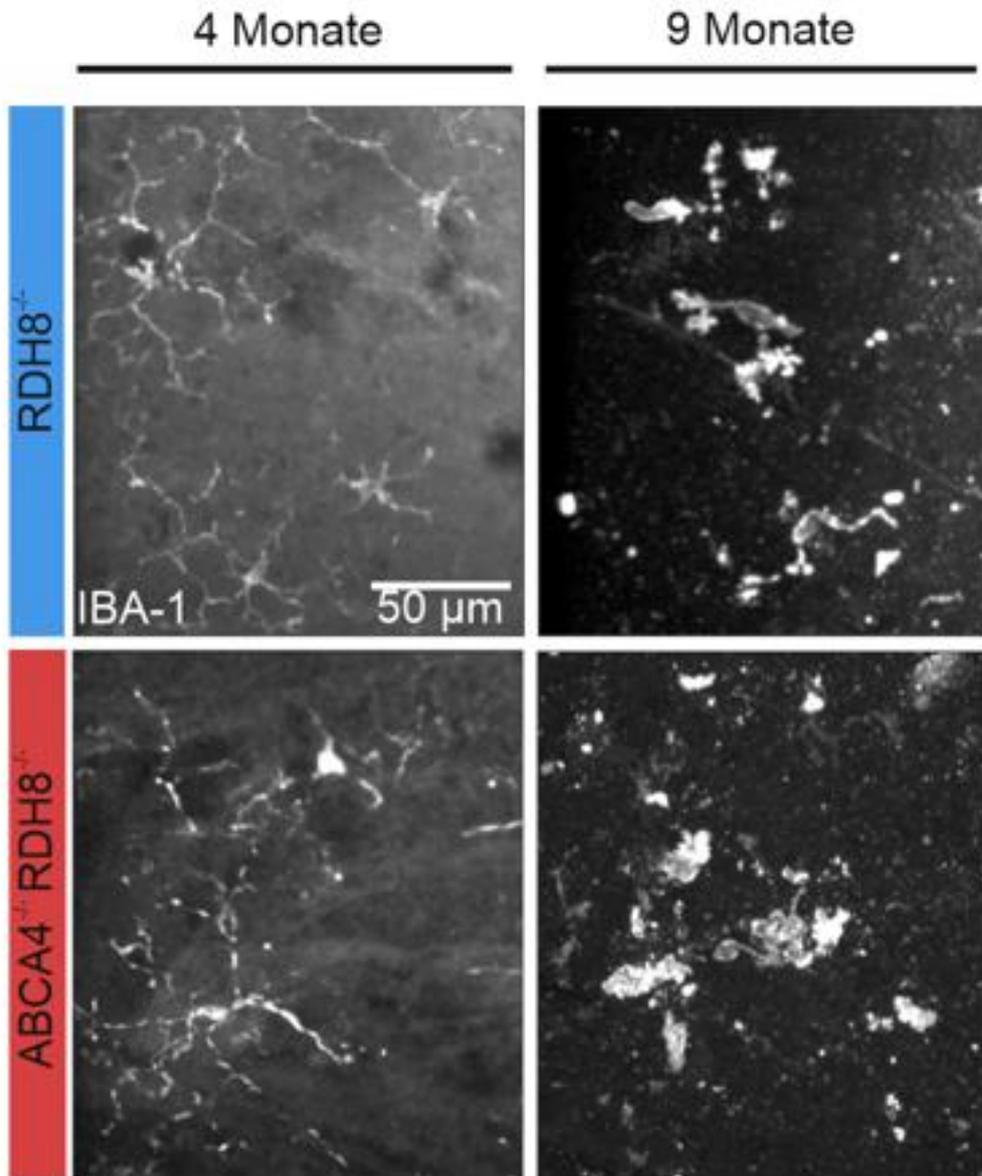
Anhang C: Vergrößerte Darstellung von Abbildung 22



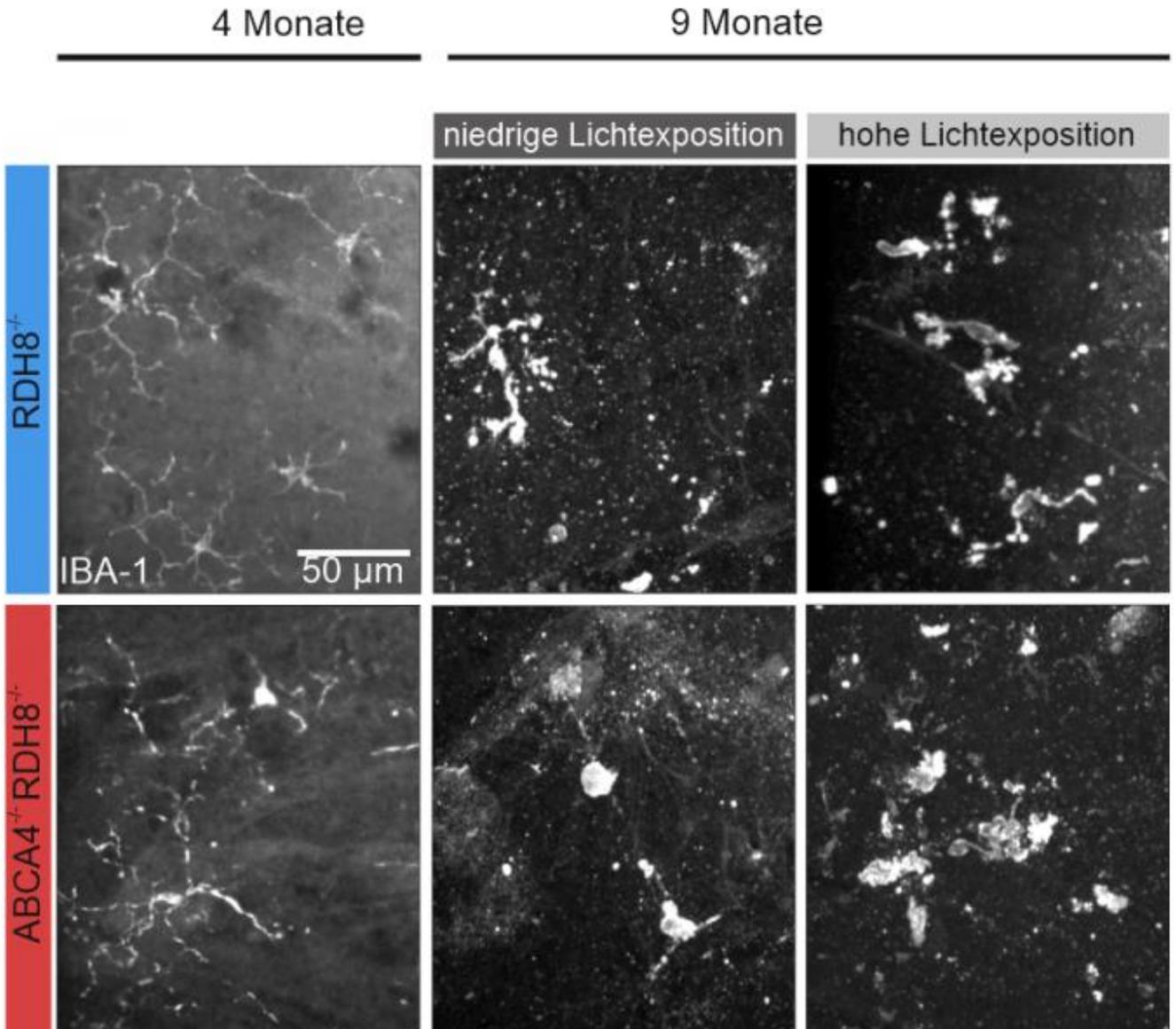
Ischämie 14 Tage



Anhang D: Vergrößerte Darstellung von Abbildung 24 A



Anhang E: Vergrößerte Darstellung von Abbildung 27 A



Danksagung

An erster Stelle möchte ich meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Antje Grosche, meinen tiefen Dank aussprechen. Ihre unermüdliche Unterstützung, ihr wertvoller Rat und ihre Motivation haben mich während meiner gesamten Promotionszeit begleitet. Ohne ihre fachliche Expertise und Ihre ständige Ermutigung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ebenso möchte ich Frau Prof. Dr. Susanne Koch und Herrn Prof. Dr. Stylianos Michalakis danken, die mich als Zweit- und Drittbetreuer unterstützt haben. Ihre konstruktiven Rückmeldungen und wertvollen Anregungen haben maßgeblich zur Qualität dieser Arbeit beigetragen.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Josef Biber, unter dessen Leitung ich in das Forschungsprojekt einsteigen durfte. Seine kontinuierliche Unterstützung, sein praktisches Wissen und seine Geduld haben mir geholfen, mich in die Thematik einzuarbeiten und meine wissenschaftlichen Fähigkeiten zu vertiefen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Oliver Bludau, Dr. Lew Kaplan und Patricia Hoffelner. Nicht nur ihre fachliche Unterstützung und die inspirierenden Diskussionen haben meine Forschung bereichert, sondern auch unsere gemeinsame Zeit, sei es stets bei den Mittagspausen oder in geselliger Runde außerhalb des Labors. Eure Freundschaft hat meine Promotionszeit nicht nur produktiver, sondern auch angenehmer gemacht.

Sophie Knoll danke ich sowohl für ihre wissenschaftliche Zusammenarbeit als medizinische Ko-Doktorandin als auch für die gute Freundschaft, die sich während unserer gemeinsamen Arbeit entwickelt hat. Ihre Unterstützung und ihr Humor haben das Arbeitsumfeld erheblich bereichert.

Ich möchte auch Frau Gabriela Jäger für ihre Unterstützung als wissenschaftliche Assistentin danken. Ihre zuverlässige und sorgfältige Arbeit und Anleitung im Labor war von unschätzbarem Wert für den Erfolg meiner Experimente.

Abschließend möchte ich meiner Familie danken – meinen Eltern und meiner Schwester – für ihre beständige Unterstützung und ihr Vertrauen. Sie haben mir stets den Rücken gestärkt und mir geholfen, den Fokus zu bewahren.



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro



Eidesstattliche Versicherung

Glänzer, Sarah

Name, Vorname

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

Effekte einer komplementmodulierenden Genadditionstherapie im retinalen Ischämie-/ Reperusionsmodell und Charakterisierung des ABCA4/RDH8-Knockoutmodells in der Maus

selbständig 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 in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 28.11.2025

Ort, Datum

Sarah Glänzer

Unterschrift Sarah Glänzer

Publikationsliste

Publikationen

Biber J., Jabri Y., **Glänzer S.**, Dort A., Hoffelner P., Schmidt C.Q., Bludau O., Pauly D., Grosche A. (2024). Gliosis-dependent expression of complement factor H truncated variants attenuates retinal neurodegeneration following ischemic injury. *Journal of Neuroinflammation* 21(1). doi: 10.1186/s12974-024-03045-3

Pfaller, A.M., Kaplan, L., Carido, M., Grassmann, F., Díaz-Lezama, N., Ghaseminejad, F., Wunderlich, K.A., **Glänzer, S.**, Bludau, O., Pannicke, T., Weber, B.H.F., Koch, S.F., Bonev, B., Hauck, S., Grosche, A (2024). The glucocorticoid receptor as a master regulator of the Müller cell response to diabetic conditions in mice. *Journal of Neuroinflammation* 21(33). doi: 10.1186/s12974-024-03021-x

Vorträge

04/2022 Kurzvortrag „Efficacy of a complement modulating gene addition therapy in the retinal ischemia/ reperfusion model“ auf dem jährlichen ProRetina Meeting in Potsdam, *Auszeichnung mit einem Posterpreis*

Posterpräsentationen

04/2022 Posterpräsentation auf dem jährlichen ProRetina Meeting in Potsdam:
„Efficacy of a complement modulating gene addition therapy in the retinal ischemia/ reperfusion model“

Sarah Glänzer, Josef Biber, Yassin Jabri, Diana Pauly, Antje Grosche

04/2023 Posterpräsentation auf dem jährlichen ProRetina Meeting in Potsdam:
„Efficacy of a complement modulating gene addition therapy in the retinal ischemia/ reperfusion model“

Sarah Glänzer, Josef Biber, Yassin Jabri, Diana Pauly, Antje Grosche



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro



Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung

Glänzer, Sarah

Name, Vorname

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel:

**Effekte einer komplementmodulierenden Genadditionstherapie im retinalen Ischämie-/
Reperusionsmodell und Charakterisierung des ABCA4/RDH8-Knockoutmodells in der Maus**

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

München, 28.11.2025

Ort, Datum

Sarah Glänzer

Unterschrift Sarah Glänzer