

Choriokapillaris-Flussausfälle bei Patienten mit Pseudoxanthoma elasticum

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Anne-Sophie Löwinger

aus Erfurt

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Frank G. Holz
2. Gutachter: Prof. Dr. Lechoslaw Turski

Tag der Mündlichen Prüfung: 17.09.2024

Aus der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	5
1.	Deutsche Zusammenfassung	6-25
1.1	Einleitung	6-7
1.2	Material und Methoden	7-11
1.2.1	OCT-A/OCT Bildgebung und Verarbeitung	8-10
1.2.2	Statistische Analyse	11
1.3	Ergebnisse	11-16
1.3.1	Choriokapilläre Flussausfälle	12-14
1.3.2	Dicke der Choroidea	15
1.3.3	Dicke der Photorezeptorschichten und des RPEDC	15-16
1.4	Diskussion	17-20
1.5	Zusammenfassung	20-21
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	21-27
2.	Veröffentlichung	28-36
	Abstract	28
	Introduction	28-29
	Materials and Methods	29-30
	Results	30-31
	Discussion	31-34
	Conclusion	34
	References	34-36

3. Danksagung

37

Abkürzungsverzeichnis

AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
AS	(Photorezeptor-) Außensegmente
BAF	Blaulicht-Fundusautofluoreszenz
BrM	Bruch'sche Membran
CK	Choriokapillaris
ETDRS	Early Treatment Diabetic Retinopathy Study
IQR	Interquartilsabstand
IS	(Photorezeptor-) Innensegmente
KI	Konfidenzintervall
KS	(Photorezeptor-) Körnerschicht
OCT	Optische Kohärenztomographie
OCT-A	Optische Kohärenztomographie-Angiographie
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PXE	Pseudoxanthoma Elasticum
RPE	Retinales Pigmentepithel
RPEDC	Retinaler Pigmentepithel-Drusen-Complex
SFD	Sorsby Fundusdystrophie
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Pseudoxanthoma elasticum (PXE; Online Mendelian Inheritance in Man [OMIM] #264800, #177850) ist eine seltene, autosomal-rezessiv vererbte, ektope Mineralisationsstörung (Burghaus et al., 2022), die durch bi-allelische Mutationen im *ABCC6*-Gen ausgelöst wird und zu einer progredienten Kalzifizierung elastischer Fasern führt (Bergen et al., 2000; Chassaing et al., 2005; Risseeuw et al., 2024; Schulz et al., 2006). Die Hauptmanifestationsorte sind die Haut, das kardiovaskuläre System sowie die Augen (Bergen et al., 2000; Chassaing et al., 2005; Lebwohl M und R, 1993; Lefthériotis et al., 2013; Neldner, 1988; Schulz et al., 2006). Die okulären Manifestationen beruhen auf der Mineralisierung elastischer Fasern in der Bruch'schen Membran (BrM), die zwischen der Choroidea und dem retinalen Pigmentepithel (RPE) liegt und dort als pentalaminäre Basalmembran eine zentrale Rolle als Diffusionsbarriere zwischen den physiologisch eng miteinander in Verbindung stehenden Strukturen übernimmt (Booij et al., 2010). Wichtige, vom RPE produzierte Regulationsfaktoren (z. B. Vascular Endothelial Growth Factor [VEGF]) müssen die BrM passieren, um zu Ihrem Wirkungsort – der Choriokapillaris (CK) – zu gelangen. *Vice versa* ist das RPE (und die Photorezeptoren) auf wichtige Nährstoffe aus der systemischen Blutzirkulation der CK angewiesen (Saint-Geniez et al., 2009; Spaide, 2016).

Primäre klinische Charakteristika der okulären Manifestation von PXE sind angioide Streifen („Risse“ in der mineralisierten BrM) und *Peau d'orange* („Übergangszone“ der mineralisierten zur nicht-mineralisierten, gesunden Netzhaut). Als Fakultativa können Kometenläsionen, Drusen des Sehnervenkopfes sowie im protrahierten Krankheitsverlauf chorioretinale Atrophien und sekundäre chorioretinale Neovaskularisationen auftreten (Charbel Issa et al., 2010; Finger et al., 2009; Gliem et al., 2016; Gliem et al., 2013).

Aktuell steht keine kausale Therapie für die Behandlung von Patienten mit PXE zur Verfügung. Bisherige Therapiestudien mit beispielsweise Magnesium und Etidronat wurden mit dermatologischen oder angiologischen Endpunkten durchgeführt und

erwiesen sich – trotz erfolgreicher Phase II Studien – in Phase III als nicht positiv (Kranenburg et al., 2018; LaRusso et al., 2009; Rose et al., 2019; Schenk et al., 1973).

Vor dem Hintergrund der engen funktionellen Vernetzung zwischen Choroidea, CK, BrM und RPE könnten PXE-assoziierte Veränderungen der BrM auch indirekt über Veränderungen angrenzender Strukturen messbar sein und daher zukünftig als Endpunkte für (Therapie-) Studien dienen. Hierbei gibt es bereits erste Indizien, dass Patienten mit PXE eine morphologisch alterierte Choroidea sowie Veränderungen des CK-Blutflusses in der optischen Kohärenztomographie (OCT) aufweisen (Gliem et al., 2014; Spaide, 2017). Nach heutigem Stand der Erkenntnisse gibt es diesbezüglich jedoch noch keine umfassende Analyse.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, choriokapilläre Flussausfälle bei Patienten mit PXE bereits im prä-atrophen Frühstadium der Erkrankung mittels der nun verfügbaren optischen Kohärenztomographie Angiographie (OCT-A), die neue Einblicke in die Mikrostruktur der Choriokapillaris bietet, zu charakterisieren und zu quantifizieren sowie des Weiteren mit Veränderungen der angrenzenden Strukturen in der optischen Kohärenztomographie zu korrelieren.

1.2 Material und Methoden

Die prospektive Querschnittsstudie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn bewilligt (positives Ethikvotum, Nr. 025/14) und auf Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki durchgeführt.

Dabei wurden von September 2017 bis Februar 2021 Patienten der Spezialsprechstunde für seltene genetisch-bedingte Netzhauterkrankungen der Universitäts-Augenklinik Bonn rekrutiert. Eingeschlossen wurden Patienten mit einer nach den Kriterien von Plomp et al. bestätigten PXE-Diagnose (Plomp et al., 2010), die mindestens zwei der drei nachfolgenden Charakteristika erfordern:

- (I) zwei pathogene Mutationen im *ABCC6*-Gen und/oder
- (II) krankheits-spezifische Hautveränderungen und/oder
- (III) krankheits-spezifische okuläre Veränderungen.

Ausschlusskriterium war jegliche Vorbehandlung mittels intravitrealer Applikation von VEGF-Inhibitoren, das Vorhandensein von exsudativen oder nicht-exsudativen (quieszenten) Neovaskularisationen sowie von chorioretinalen Atrophien mit einem größeren Ausmaß als zwei Papillendurchmesser. Des Weiteren wurden auch Augen mit signifikanten Trübungen optischer Medien oder anderen beeinflussenden Vorerkrankungen nicht für die Studie berücksichtigt. Die Akquirierung von gesunden Probanden ohne okuläre oder andere manifeste Vorerkrankungen erfolgte aus dem Umfeld der Arbeitsgruppe.

1.2.1 OCT-A/OCT Bildgebung und Verarbeitung

Sowohl von Patienten als auch von gesunden Kontrollen wurden nach identischem Studienprotokoll jeweils spezifische OCT-A und OCT Aufnahmen angefertigt und nachfolgend einem aufwendigen Bildbearbeitungsprozess unterzogen:

OCT-A Aufnahmen wurden als nominaler 6 x 6mm Scan unter Verwendung des PLEX Elite 9000 Swept-Source OCT (Carl Zeiss Meditec, Jena, Deutschland) erzeugt. Dabei wurde die voreingestellte choriokapilläre Schnitttiefe des Geräts von +29µm bis +49µm unterhalb der RPE-Segmentierungslinie verwendet und diese im Bedarfsfall manuell korrigiert. Nach Akquirierung der OCT-A Bilder wurden die Aufnahmen exportiert und unter Zuhilfenahme der Bildbearbeitungssoftware FIJI ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) einem bereits vorbeschriebenem Bildbearbeitungsprozess unterzogen (Chu et al., 2020; Chu et al., 2019; Muller et al., 2018; Zhang et al., 2018). Exportiert und in die Analyse eingeschlossen wurden dabei nur Bilder ohne extensive Artefakte, wie beispielsweise Glaskörpertrübungen, Blinzel- und Bewegungsalterationen oder größere Verschattungen. In einem ersten Bildbearbeitungsschritt wurde die ursprüngliche Pixelzahl der Strukturaufnahme der CK von 1024 x 1024 auf 512 x 512 reduziert. Um potentielle Verschattungseffekte zu kompensieren, wurden die Aufnahmen im Folgenden mit einer invertierten Version der weichgezeichneten Strukturaufnahme der CK (Gaußscher Weichzeichner, 3-Pixel Sigma) multipliziert (siehe Abb. 1A-C). Nach Festlegen eines lokalen Schwellenwertes (Phansalkar-Methode, 4-Pixel Radius) und Binarisierung des Gesamtbildes (siehe Abb. 1D), wurde ein Early Treatment Diabetic

Retinopathy Study (ETDRS) - Raster über die Aufnahmen zentriert, um die Dichte choriokapillärer Flussausfälle für jedes einzelne ETDRS-Feld in Prozent quantifizieren zu können (siehe Abb. 1F). Zur Vermeidung von Störvariablen wurden sowohl größere retinale Gefäße (siehe Abb. 1E) als auch ETDRS-Felder mit Anzeichen für chorioretinale Atrophien oder kleinere Artefakte von der Analyse ausgeschlossen (Borrelli et al., 2017).

Die OCT Aufnahmen wurden unter Verwendung des Spectralis HRA+OCT (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Deutschland) als $30^\circ \times 25^\circ$ Volumenscans mit je 121 Einzelscans erzeugt und im Nachfolgenden mit einem Deep-learning basierten Algorithmus bearbeitet. Dieser wurde bereits in früheren Studien der Arbeitsgruppe vorbeschrieben (Pfau et al., 2022; Pfau et al., 2020a; Pfau et al., 2020b). Dabei wurden mittels automatischer Segmentierung der äußeren Körnerschicht (äußere plexiforme Schicht/Grenze der äußeren Körnerschicht [KS] bis Lamina limitans externa), der Photorezeptor-Innensegmente (IS; Lamina limitans externa bis ellipsoide Zone), der Photorezeptor-Außensegmente (AS; ellipsoide Zone bis RPE-Drusen-Complex [RPEDC]), des RPEDC (RPE bis BrM) und der Choroidea aller 121 Scans, en-face Dickenkarten der jeweiligen Schichten erstellt (siehe Abb. 1G). Über diese wurde in einem weiteren Bearbeitungsschritt erneut ein ETDRS-Gitter gelegt und die Durchschnittsdicke der erwähnten Schichten für jedes einzelne ETDRS-Feld berechnet.

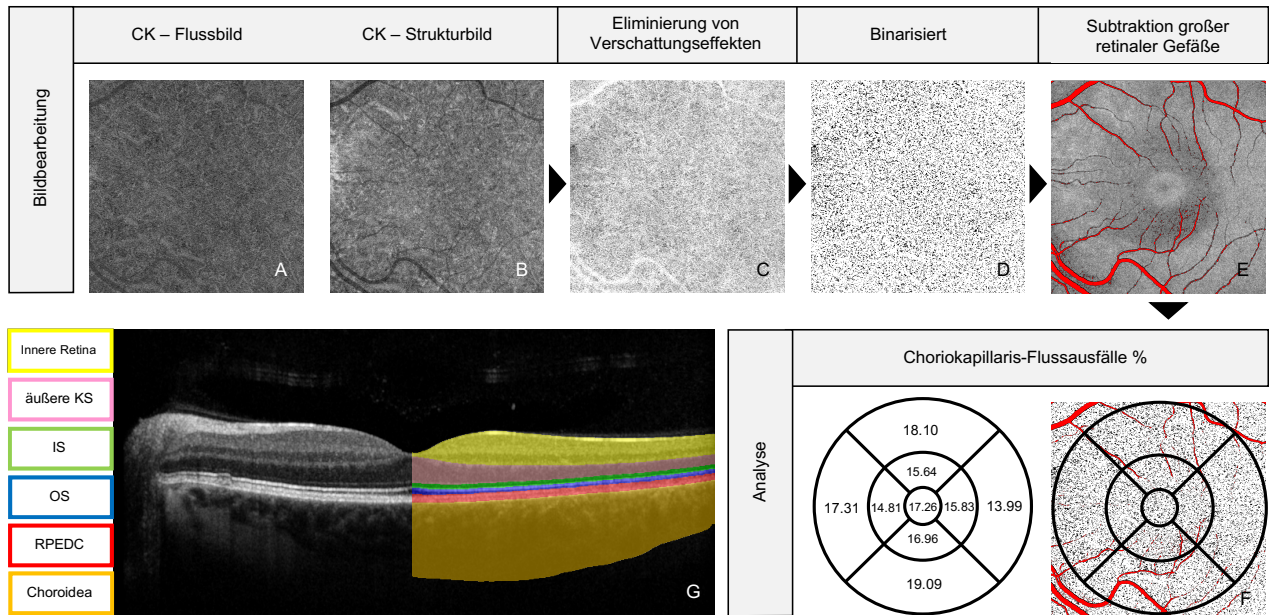


Abb. 1: Bildbearbeitung und Analyse (Abbildung modifiziert nach Loewinger et al., 2023)

A-D: Eliminierung von Verschattungseffekten (C) durch Multiplikation des Choriokapillaris (CK)-Flussbildes (A) mit dem invertierten Choriokapillaris (CK)-Strukturbild (B); anschließende Binarisierung (D).

E: Nachfolgend Subtraktion größerer retinaler Gefäße (in rot markiert).

F: Quantifizierung von Flussausfällen der Choriokapillaris mithilfe eines Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS)-Rasters in Prozent (%).

G: Anfertigung von Dickenkarten der OCT Volumenscans (30° x 25°). Berechnung der Dicken für die äußere Körnerschicht (KS), die Photorezeptorinnensegmente/-außensegmente (IS, OS), den retinalen Pigmentepithel-Drusen-Complex (RPEDC) und die Choroidea mittels automatischer Segmentierung für jedes einzelne ETDRS-Feld (Hess et al., 2020).

1.2.2 Statistische Analyse

Die statistischen Auswertungen erfolgten unter Verwendung der Software R Studio 1.2.5033 (R Vereinigung für statistisches Rechnen, Wien, Österreich). Durchschnitt und Standardabweichungen wurden dabei für normalverteilte Variablen verwendet. Nicht normalverteilte Variablen wurden mittels Median und Interquartilsabstand (IQR) beschrieben. Um die gegebene hierarchische Struktur der Daten bestmöglich abzubilden, wurden lineare gemischte Modelle verwendet. Bei Einschluss beider Augen eines Patienten wurden diese innerhalb des Patienten genestet. Als signifikant wurden mittels T-Statistik ermittelte p-Werte von $<0,05$ angesehen.

1.3 Ergebnisse

In die Studie eingeschlossen wurden 32 Augen von 21 Patienten mit PXE und 35 Augen von 35 gesunden Kontrollprobanden. Das untersuchte PXE-Patientenkollektiv (Median 48,7 Jahre; IQR 33,9 – 53,3 Jahre; Spannweite 25,5 – 74,5 Jahre; 17 Frauen) wies dabei im Vergleich zur Kontrollgruppe (Median 59,6 Jahre; IQR 51,1 – 66,0 Jahre; Spannweite 21,8 – 83,3 Jahre; 13 Frauen) ein jüngeres Durchschnittsalter auf.

29 ETDRS-Felder von 9 Augen der PXE-Subgruppe mussten aufgrund von kleinen fokalen Atrophien oder Artefakten von der Analyse ausgeschlossen werden. Dabei waren in absteigender Reihenfolge nasale (äußere nasale Felder, $n = 7$; innere nasale Felder, $n = 5$), vor inferioren (innere inferiore Felder, $n = 5$; äußere inferiore Felder, $n = 1$), temporalen (äußere temporale Felder, $n = 2$; innere temporale Felder, $n = 2$), superioren (innere superiore Felder, $n = 3$; äußere superiore Felder, $n = 1$) und zentralen Feldern ($n = 3$) betroffen.

Die Areale die aufgrund von größeren retinalen Gefäßen von der Analyse ausgeschlossen werden mussten, stellten sich in beiden untersuchten Gruppen als quantitativ vergleichbar dar (Kontrollgruppe: Durchschnitt 2,62%, Konfidenzintervall [KI, 95%] 1,93 – 3,32; Patienten mit PXE: Durchschnitt 3,42%, KI [95%] 2,55 – 4,30; $p = 0,149$).

1.3.1 Choriokapilläre Flussausfälle

Die Analyse des multivariablen Modells zeigte einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen choriokapillären Flussausfällen und der Diagnose PXE (+13,6; KI [95%] 9,87 – 17,3; $p < 0,001$), steigendem Alter (+0,22% pro Jahr; KI [95%] 0,12 – 0,33; $p < 0,001$) sowie der Position des ETDRS-Feldes, mit signifikant höheren CK-Flussausfällen in nasalen im Vergleich zu temporalen Feldern (siehe Abb. 2). Insgesamt wiesen 76 ETDRS-Felder von 10 PXE-Patienten Ausfälle von mehr als 40% des choriokapillären Blutflusses auf, mit auch hier nasaler Prädominanz (äußere nasale Felder, $n = 8$; innere nasale Felder, $n = 10$; zentrale Felder, $n = 9$; äußere temporale Felder, $n = 6$; innere temporale Felder, $n = 6$). Ein signifikanter Unterschied von mit zunehmendem Alter ebenfalls steigenden choriokapillären Flussausfällen von PXE-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe ließ sich in der Analyse nicht darstellen, der Trend ist jedoch in Abb. 2B zu erkennen.

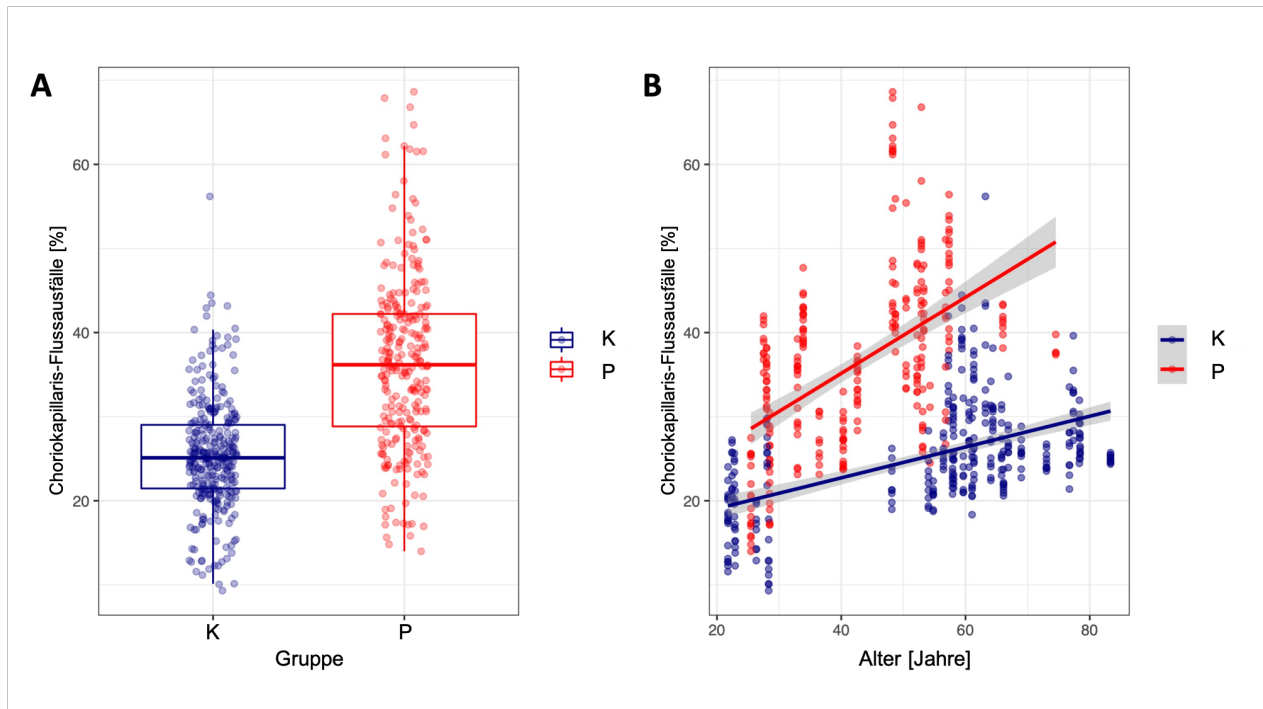


Abb. 2: Choriokapilläre Flussausfälle (Abbildung modifiziert nach Loewinger et al., 2023)

A: Assoziation choriokapillärer Flussausfälle, quantifiziert in Prozent (%), mit der Diagnose Pseudoxanthoma elasticum (P, rot) im Vergleich zur Kontrollgruppe (K, blau).

B: Assoziation choriokapillärer Flussausfälle, quantifiziert in Prozent (%), mit steigendem Alter von Patienten mit Pseudoxanthoma elasticum (P, rot) im Vergleich zur Kontrollgruppe (K, blau).

In Abb. 3 sind exemplarisch die OCT, OCT-A und Blaulicht-Fundusautofluoreszenz (BAF) Aufnahmen sowie die Quantifizierung choriokapillärer Flussausfälle von PXE-Patienten mit verschiedenen Manifestationsstadien im Vergleich zum gesunden Kontrollprobanden dargestellt.

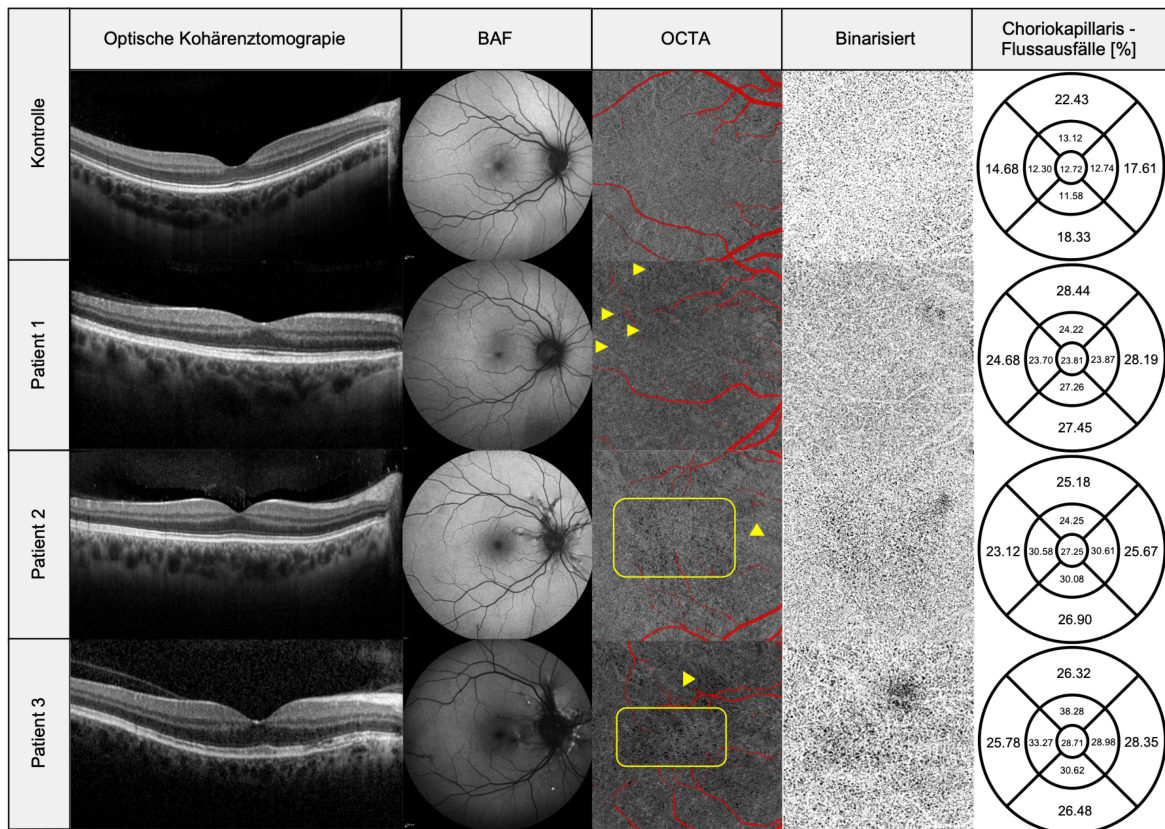


Abb. 3: Choriokapillaris-Flussausfälle bei Patienten mit Pseudoxanthoma elasticum (Abbildung modifiziert nach Loewinger et al., 2023)

1. Spalte: Optische Kohärenztomographie B-Scan: Keine oder nur milde Veränderungen im B-Scan der optischen Kohärenztomographie bei Patienten mit Pseudoxanthoma elasticum im Vergleich zur gesunden Kontrolle.

2. Spalte: Blaulicht-Fundusautofluoreszenz (BAF): Leichte (Patient 1) bis stärker ausgeprägte (Patient 2) angioider Streifen mit zusätzlichen Muster-Dystrophie-artigen Veränderungen (Patient 3) bei Patienten mit Pseudoxanthoma elasticum.

3.&4. Spalte: Optische Kohärenztomographie-Angiographie (OCTA): Choriokapillaris-Flussausfall-Areale (gelbe Pfeilköpfe) in Flussbildern der Choriokapillaris im nativen Bild (3. Spalte) mit korrespondierenden binarisierten Aufnahmen (4. Spalte); in rot markierte retinale Gefäße (3. Spalte) wurden von der Analyse ausgeschlossen.

5. Spalte: In Prozent (%) quantifizierte Flussausfälle der Choriokapillaris für jedes einzelne Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS)-Feld.

1.3.2 Dicke der Choroidea

Choroidale Dicke und choriokapilläre Flussausfälle zeigten sowohl in der Kontrollgruppe als auch bei PXE-Patienten ein invers-lineares Verhältnis zueinander. Das heißt mit zunehmenden choriokapillären Flussausfällen zeigte sich eine abnehmende Choroidealdicke (-1,92µm pro % CK-Flussausfälle; KI [95%] -2,81 bis -1,03; $p < 0,001$). Obwohl die choroidale Dicke des PXE-Patientenkollektivs im Vergleich zur Kontrollgruppe insgesamt leicht vermindert war (-44,05µm; KI [95%] -92,98 – 4,87), stellte sich hier kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,078$) dar.

1.3.3 Dicke der Photorezeptorschichten und des RPEDC

Mit zunehmender choriokapillärer Minderperfusion imponierte eine signifikante Verdünnung aller drei Photorezeptor-Laminae (siehe Abb. 4): der inneren Photorezeptorschicht (-0,12µm pro % CK-Flussausfälle; KI [95%] -0,15 bis -0,09; $p = 0,001$), der äußeren Photorezeptorschicht (-0,21 pro % CK-Flussausfälle; KI [95%] -0,26 bis -0,15; $p < 0,001$) und der äußeren nukleären Schicht (-0,72µm pro % CK-Flussausfälle; KI [95%] -0,93 – 0,50; $p < 0,001$).

Die mediane Dicke des RPEDC stellte sich in der Kontrollgruppe im Mittel dünner (36,91µm; KI [95%] 33,55 – 40,27) als bei PXE-Patienten (41,8µm; KI [95%] 37,5 – 46,2) dar. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Dicke des RPEDC und choriokapillären Flussausfällen ließ sich in der Analyse nicht darstellen ($p = 0,107$).

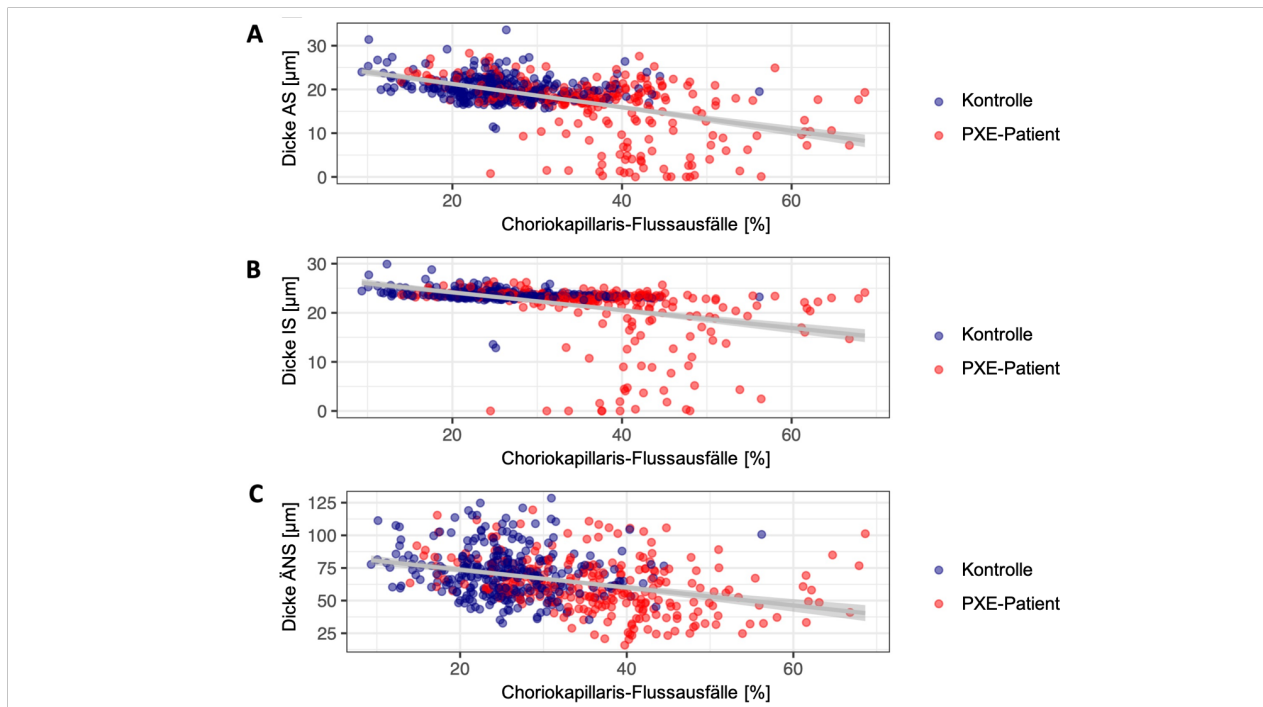


Abb. 4: Assoziation choriokapillärer Flussausfälle mit der Dicke der Photorezeptorschichten (Abbildung modifiziert nach Loewinger et al., 2023)

A: Assoziation choriokapillärer Flussausfälle in Prozent (%) mit der Dicke der Photorezeptor-Außensegmente (AS) bei Patienten mit Pseudoxanthoma elasticum (PXE, rot) im Vergleich zur Kontrollgruppe (blau).

B: Assoziation choriokapillärer Flussausfälle in Prozent (%) mit der Dicke der Photorezeptor-Innensegmente (IS) bei Patienten mit Pseudoxanthoma elasticum (PXE, rot) im Vergleich zur Kontrollgruppe (blau).

C: Assoziation choriokapillärer Flussausfälle in Prozent (%) mit der Dicke der äußeren nukleären Schicht (ÄNS) bei Patienten mit Pseudoxanthoma elasticum (PXE, rot) im Vergleich zur Kontrollgruppe (blau).

1.4 Diskussion

Die Studienergebnisse zeigten signifikante, in der OCT-A quantifizierbare, CK-Flussausfälle bei Patienten mit PXE im prä-atrophen Frühstadium der Erkrankung im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Diese gingen zusätzlich in der OCT mit einer Verdünnung der Choroidea sowie der angrenzenden Photorezeptorschichten einher.

Die primäre okuläre Manifestation von PXE beruht auf einer Kalzifizierung der BrM, die als pentalaminäre Basalmembran zwischen dem retinalen Pigmentepithel und der Choriokapillaris gelegen, eine wichtige Rolle in Bezug auf Barriere- und Stützfunktionen für die Netzhaut übernimmt (Booij et al., 2010). Die aktuelle Studienlage deutet mehrfach auf einen Zusammenhang zwischen einer pathologisch veränderten BrM und morphologischen Alterationen angrenzender benachbarter Strukturen hin (Booij et al., 2010; Gliem et al., 2014; Nickla und Wallman, 2010). CK und RPE stehen in einem gegenseitig abhängigen Verhältnis zueinander, da die CK auf regulatorische, vom RPE-produzierte Faktoren (z.B. VEGF) und das RPE wiederum auf Sauerstoff und Nährstoffe aus der systemischen Zirkulation zur Ernährung der Photorezeptoren angewiesen ist (Saint-Geniez et al., 2009). Ein Molekül aus der Systemzirkulation was dabei insbesondere im Vordergrund steht ist Vitamin A, das essentiell für den Sehzyklus und damit eine physiologische Photorezeptorfunktion ist. Bereits in der Vergangenheit wurde die Hypothese aufgestellt, dass pathologische Veränderungen der BrM – wie beispielsweise die Kalzifizierungen bei PXE-Patienten – eine erhöhte Diffusionsbarriere darstellen und somit auf beiden Seiten zu einer Minderversorgung der angrenzenden Strukturen führen. Frühere Studienergebnisse ließen hier bereits den Rückschluss auf einen Zusammenhang von funktionellen Auswirkungen zwischen einer pathologisch veränderten BrM und einem verminderten Transport von Vitamin A über die BrM zu. Sowohl bei PXE als auch bei anderen Erkrankungen mit veränderter BrM konnte eine verlangsamte Dunkeladaptation festgestellt werden (Hess et al., 2022; Hess et al., 2020; Jacobson et al., 1995; Nigalye et al., 2022; Owsley et al., 2016). Der verminderte Transport könnte weiterführend in sekundären Alterationen wie CK-Atrophie mit nachfolgenden Flussausfällen sowie Photorezeptoratrophy resultieren.

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Analysen lag auf der Assoziation zwischen choriokapillären Flussausfällen und choroidaler Dicke. Auch hier stellten frühere Studien bereits einen Zusammenhang zwischen einer veränderten BrM bei PXE, Sorsby Fundusdystrophie (SFD) oder altersbedingter Makuladegeneration (AMD) und einer verdünnten Choroidea her (Esmaeelpour et al., 2014; Gliem et al., 2014; Hess et al., 2021). Diese Studien wiesen jedoch vergleichsweise breite Manifestationsspektren der zugrundeliegenden Pathologien auf. In der hier vorliegenden Datenanalyse imponierte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhten CK-Flussausfällen bei Patienten mit PXE im prä-atrophen und prä-exsudativem Stadium und einer verminderten Choroidea-Dicke. Ein quantitativ signifikanter Unterschied der choroidalen Dicke zwischen PXE-Patienten und gesunden Kontrollen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Dies lässt den Rückschluss zu, dass choroidale Verdünnung sich erst in späteren Stadien von PXE (dh. auch bei Vorliegen von höheren choriokapillären Flussausfällen) manifestiert und einer hohen interindividuellen Variabilität unterliegt. Dem Gegenüber ließ sich bei PXE-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine in der OCT-A messbare, statistisch signifikante choriokapilläre Minderperfusion im Frühstadium der Erkrankung quantifizieren (siehe Abb. 3). Insbesondere im Hinblick auf die engen Einschlußkriterien und das junge PXE-Patientenkollektiv favorisiert die Analyse daher choriokapilläre Flussausfälle noch vor einer Verdünnung der Choroidea als reproduzierbare Biomarker sowie ggf. potentielle Endpunkte in zukünftigen Studien. Dies gilt es in weiteren Arbeiten mit Fokus auf den Vergleich zu anderweitigen potentiellen funktionalen und morphologischen Endpunkte (z. B. Dunkeladaptation) weiterführend zu eruieren.

Des Weiteren stellte sich auch die Lokalisation des ETDRS-Feldes als unabhängig-assoziierte Variable in Bezug auf choriokapilläre Flussausfälle heraus. Es zeigten sich signifikant erhöhte Ausfälle in nasalen im Vergleich zu temporalen Feldern. Vor dem Hintergrund der Tatsache, dass Atrophie ein Indikator für das Voranschreiten einer okulären Manifestation von PXE ist und insbesondere mit Blick auf das vergleichsweise junge untersuchte Patientenkollektiv, deutet dieses Mismatch auf CK-Flussausfälle als strukturelles Surrogat PXE-bedingter, zentrifugaler Kalzifizierungen der Bruch'schen Membran hin (Charbel Issa et al., 2010). Einschränkend gilt es hierbei jedoch zu beachten, dass ebenfalls mehr nasale als temporale ETDRS-Felder von der Analyse

aufgrund von Atrophien ausgeschlossen werden mussten, was eine artifizielle Vortäuschung von erhöhten Choriokapillaris-Flussausfällen in nasalen Bereichen zur Folge haben könnte.

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen choriokapillärer Minderperfusion und der Dicke des retinalen Pigmentepithel-Drusen-Complexes ließ sich in den vorliegenden Studienergebnissen nicht nachweisen ($p = 0,107$). Im Unterschied zu anderen BrM-alterierenden Erkrankungen wie beispielsweise SFD oder AMD, bei denen es insbesondere im Frühstadium aufgrund von subretinalen Ablagerungen zu einer Dickenzunahme des RPEDC kommt, entsteht die Dysfunktion der BrM bei PXE durch Kalzifizierungen ohne relevante Dickenzunahme. Erwartungsgemäß bietet sich die Dicke des RPEDC daher bei PXE-Patienten nicht als suffizienter Parameter zum Monitoring des Krankheitsverlaufes oder zur Frühdetektion an (Folgar et al., 2016; Khan et al., 2020).

Im Gegensatz hierzu zeigte sich eine starke Assoziation zwischen choriokapillärer Minderperfusion und einer Verdünnung der drei Photorezeptorschichten (AS, IS und äußere KS). Das Vorliegen einer Photorezeptordegeneration mit konsekutiver retinaler Atrophie vor dem Hintergrund einer morphologischen Verminderung von CK und RPE wurde bereits in früheren Studien beschrieben (Nickla und Wallman, 2010; Saint-Geniez et al., 2009). Limitierend gilt es hier jedoch den Querschnitts-Charakter der vorliegenden Studie zu betonen, der zwar Assoziationen hervorhebt, aber keine kausalen Schlüsse zulässt, sodass zur genaueren Differenzierung der einzelnen Faktoren in zukünftigen Studien beispielsweise ein longitudinales Studiendesign erforderlich ist.

Ein weiterer limitierender Faktor ist die kleine Stichprobengröße, die eine allgemeine Herausforderung bei Studien über seltene genetische Erkrankungen darstellt. Bei insgesamt auf die Gesamtpopulation bezogen niedriger Prävalenz von PXE und den zusätzlich vergleichsweise engen Einschlusskriterien (prä-atroph und prä-exsudativ) könnte die vorliegende Arbeit jedoch trotzdem eine der umfangreichsten, bisher in der Literatur beschriebenen Analysen über PXE im Frühstadium sein. Des Weiteren waren ähnlich zu vergleichbaren Studien auch im vorliegendem Patientenkollektiv Frauen gegenüber Männern überrepräsentiert (17 Frauen, 4 Männer), was in einem Gender-Bias resultieren könnte. Aufgrund der engen Einschlusskriterien besteht die Möglichkeit, dass

die Assoziation zwischen choriokapillären Flussausfällen und strukturellen Alterationen insbesondere durch eine kleine Anzahl von zwar prä-atrophen aber trotzdem subnormalen Augen beeinflusst wurde. Statistisch berücksichtigt wurden die multiplen Testungen eines Auges (dh. mehrere ETDRS-Felder in einem Auge) sowie multiple Testungen innerhalb eines Patienten (dh. 2 Augen in einem Patienten).

Des Weiteren bleibt nach derzeitigem Wissensstand noch zu klären, ob die bei PXE-Patienten in dieser Studie beobachteten Alterationen primär auf einer pathologisch modifizierten BrM beruhen oder auch durch systemische kardiovaskuläre Risikofaktoren (z. B. arterielle Hypertonie) bedingt sein könnten (Chua et al., 2021; Terheyden et al., 2020).

Als weiterer limitierender Aspekt der Studie kann die Verwendung der voreingestellten choriokapillären Schnitttiefe von +29µm bis +49µm unterhalb der RPE-Segmentierungslinie angesehen werden. Eine andere Schnitttiefe oder global ein anderer Bildbearbeitungsansatz (z.B. bzgl. Binarisierung, Verwendung des ETDRS-Gitters, etc.) könnte ggf. einen Einfluss auf das Signifikanzniveau der einzelnen Komponenten haben. Dies gilt auch für die BrM Reflektivität, die als Biomarker für eine kalzifizierte BrM in der OCT Messung bereits als bei PXE-Patienten erhöht vorbeschrieben wurde (Risseeuw et al., 2020). Um den konfundierenden Einfluss struktureller Alterationen bestmöglich zu minimieren wurden in der vorliegenden Arbeit die OCT-Aufnahmen mit einer invertierten Version der weichgezeichneten Strukturaufnahme der CK multipliziert. Ein Einfluss der pathologisch veränderten BrM auf die Messergebnisse kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

1.5 Zusammenfassung

Bei Patienten mit Pseudoxanthoma elasticum im prä-atrophen und prä-exsudativem Stadium imponierten signifikant erhöhte Choriokapillaris-Flussausfälle mit zusätzlich assoziierten morphologischen Alterationen angrenzender Strukturen. Eine Verdünnung der Choroidea hingegen konnte nur in Augen mit deutlich verminderter choriokapillärer Perfusion nachgewiesen werden.

Die erhobenen Daten und Ergebnisse unterstützen daher die Hypothese, dass Choriokapillaris-Flussausfälle – insbesondere im Hinblick auf Frühstadien der Manifestation – als Surrogatparameter in zukünftigen Therapiestudien für Pseudoxanthoma elasticum besser zur Detektierbarkeit der Erkrankung dienen könnten als der Parameter choroidale Dicke. Um choriokapilläre Flussausfälle ggf. als potentielle primäre Endpunkte in zukünftigen Interventionsstudien in Betracht ziehen zu können, gilt es longitudinale Studiendesigns sowie den direkten Vergleich mit anderen funktionell morphologischen Endpunkten (z. B. Dunkeladaption und Mikroperimetrie) in den Fokus der Forschung zu rücken.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Bergen AA, Plomp AS, Schuurman EJ, Terry S, Breuning M, Dauwerse H, Swart J, Kool M, van Soest S, Baas F, ten Brink JB, de Jong PT. Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat Genet.* 2000; 25: 228-231

Booij JC, Baas DC, Beisekeeva J, Gorgels TG, Bergen AA. The dynamic nature of Bruch's membrane. *Prog Retin Eye Res.* 2010; 29: 1-18

Borrelli E, Uji A, Sarraf D, Sadda SR. Alterations in the Choriocapillaris in Intermediate Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017; 58: 4792-4798

Burghaus J, Schneiderbauer R, Toberer F. [Pseudoxanthoma elasticum: the dermatologist as a guide]. *Dermatologie (Heidelb).* 2022; 73: 804-808

Charbel Issa P, Finger RP, Gotting C, Hendig D, Holz FG, Scholl HP. Centrifugal fundus abnormalities in pseudoxanthoma elasticum. *Ophthalmology.* 2010; 117: 1406-1414

Chassaing N, Martin L, Calvas P, Le Bert M, Hovnanian A. Pseudoxanthoma elasticum: a clinical, pathophysiological and genetic update including 11 novel ABCC6 mutations. *J Med Genet.* 2005; 42: 881-892

Chu Z, Cheng Y, Zhang Q, Zhou H, Dai Y, Shi Y, Gregori G, Rosenfeld PJ, Wang RK. Quantification of Choriocapillaris with Phansalkar Local Thresholding: Pitfalls to Avoid. *Am J Ophthalmol.* 2020; 213: 161-176

Chu Z, Gregori G, Rosenfeld PJ, Wang RK. Quantification of Choriocapillaris with Optical Coherence Tomography Angiography: A Comparison Study. *Am J Ophthalmol.* 2019; 208: 111-123

Chua J, Le TT, Tan B, Ke M, Li C, Wong DWK, Tan ACS, Lamoureux E, Wong TY, Chin CWL, Schmetterer L. Choriocapillaris microvasculature dysfunction in systemic hypertension. *Sci Rep.* 2021; 11: 4603

Esmaeelpour M, Ansari-Shahrezaei S, Glittenberg C, Nemetz S, Kraus MF, Hornegger J, Fujimoto JG, Drexler W, Binder S. Choroid, Haller's, and Sattler's layer thickness in intermediate age-related macular degeneration with and without fellow neovascular eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014; 55: 5074-5080

Finger RP, Charbel Issa P, Ladewig MS, Gotting C, Szliska C, Scholl HP, Holz FG. Pseudoxanthoma elasticum: genetics, clinical manifestations and therapeutic approaches. *Surv Ophthalmol.* 2009; 54: 272-285

Folgar FA, Yuan EL, Sevilla MB, Chiu SJ, Farsiu S, Chew EY, Toth CA. Drusen Volume and Retinal Pigment Epithelium Abnormal Thinning Volume Predict 2-Year Progression of Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology.* 2016; 123: 39-50.e31

Gliem M, Fimmers R, Muller PL, Brinkmann CK, Finger RP, Hendig D, Holz FG, Charbel Issa P. Choroidal changes associated with Bruch membrane pathology in pseudoxanthoma elasticum. *Am J Ophthalmol.* 2014; 158: 198-207 e193

Gliem M, Muller PL, Birtel J, Hendig D, Holz FG, Charbel Issa P. Frequency, Phenotypic Characteristics and Progression of Atrophy Associated With a Diseased Bruch's

Membrane in Pseudoxanthoma Elasticum. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016; 57: 3323-3330

Gliem M, Zaeytijd JD, Finger RP, Holz FG, Leroy BP, Charbel Issa P. An update on the ocular phenotype in patients with pseudoxanthoma elasticum. *Front Genet.* 2013; 4: 14

Hess K, de Silva T, Grisso P, Wiley H, Thavikulwat AT, Keenan TDL, Chew EY, Cukras CA. Evaluation of Cone- and Rod-Mediated Parameters in Dark Adaptation Testing as Outcome Measures in Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmol Retina.* 2022; 6: 1173-1184

Hess K, Gliem M, Birtel J, Müller P, Hendig D, Andrews C, Murray IJ, Holz FG, Charbel Issa P. IMPAIRED DARK ADAPTATION ASSOCIATED WITH A DISEASED BRUCH MEMBRANE IN PSEUDOXANTHOMA ELASTICUM. *Retina.* 2020; 40: 1988-1995

Hess K, Raming K, Gliem M, Charbel Issa P, Herrmann P, Holz FG, Pfau M. Choriocapillaris Flow Signal Impairment in Sorsby Fundus Dystrophy. *Ophthalmologica.* 2021:

Jacobson SG, Cideciyan AV, Regunath G, Rodriguez FJ, Vandenberg K, Sheffield VC, Stone EM. Night blindness in Sorsby's fundus dystrophy reversed by vitamin A. *Nat Genet.* 1995; 11: 27-32

Khan KN, Borooh S, Lando L, Dans K, Mahroo OA, Meshi A, Kalitzeos A, Agorogiannis G, Moghimi S, Freeman WR, Webster AR, Moore AT, McKibbin M, Michaelides M. Quantifying the Separation Between the Retinal Pigment Epithelium and Bruch's Membrane using Optical Coherence Tomography in Patients with Inherited Macular Degeneration. *Transl Vis Sci Technol.* 2020; 9: 26

Kranenburg G, de Jong PA, Bartstra JW, Lagerweij SJ, Lam MG, Ossewaarde-van Norel J, Risseeuw S, van Leeuwen R, Imhof SM, Verhaar HJ, de Vries JJ, Slart R, Luurtsema G, den Harder AM, Visseren FLJ, Mali WP, Spiering W. Etidronate for Prevention of

Ectopic Mineralization in Patients With Pseudoxanthoma Elasticum. *J Am Coll Cardiol.* 2018; 71: 1117-1126

LaRusso J, Li Q, Jiang Q, Uitto J. Elevated dietary magnesium prevents connective tissue mineralization in a mouse model of pseudoxanthoma elasticum (*Abcc6(-/-)*). *J Invest Dermatol.* 2009; 129: 1388-1394

Lebwohl M SE, Lemlich G, Lovelace O, Shaikh-Bahai F., R F. Abnormalities of connective tissue components in lesional and non-lesional tissue of patients with pseudoxanthoma elasticum. *Arch Dermatol Res.* 1993; 285: 121-126

Lefthériotis G, Omarjee L, Le Saux O, Henrion D, Abraham P, Prunier F, Willoteaux S, Martin L. The vascular phenotype in Pseudoxanthoma elasticum and related disorders: contribution of a genetic disease to the understanding of vascular calcification. *Front Genet.* 2013; 4: 4

Loewinger AS, Pfau M, Herrmann P, Holz FG, Pfau K. Choriocapillaris Flow Signal Impairment in Patients With Pseudoxanthoma Elasticum. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2023; 64: 21

Muller PL, Pfau M, Moller PT, Nadal J, Schmid M, Lindner M, de Sisternes L, Stohr H, Weber BHF, Neuhaus C, Herrmann P, Schmitz-Valckenberg S, Holz FG, Fleckenstein M. Choroidal Flow Signal in Late-Onset Stargardt Disease and Age-Related Macular Degeneration: An OCT-Angiography Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018; 59: AMD122-AMD131

Neldner KH. Pseudoxanthoma elasticum. *Clin Dermatol.* 1988; 6: 1-159

Nickla DL, Wallman J. The multifunctional choroid. *Prog Retin Eye Res.* 2010; 29: 144-168

Nigalye AK, Hess K, Pundlik SJ, Jeffrey BG, Cukras CA, Husain D. Dark Adaptation and Its Role in Age-Related Macular Degeneration. *J Clin Med*. 2022; 11:

Owsley C, McGwin G, Jr., Clark ME, Jackson GR, Callahan MA, Kline LB, Witherspoon CD, Curcio CA. Delayed Rod-Mediated Dark Adaptation Is a Functional Biomarker for Incident Early Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology*. 2016; 123: 344-351

Pfau M, Cukras CA, Huryn LA, Zein WM, Ullah E, Boyle MP, Turriff A, Chen MA, Hinduja AS, Siebel HE, Hufnagel RB, Jeffrey BG, Brooks BP. Photoreceptor degeneration in ABCA4-associated retinopathy and its genetic correlates. *JCI Insight*. 2022; 7:

Pfau M, von der Emde L, de Sisternes L, Hallak JA, Leng T, Schmitz-Valckenberg S, Holz FG, Fleckenstein M, Rubin DL. Progression of Photoreceptor Degeneration in Geographic Atrophy Secondary to Age-related Macular Degeneration. *JAMA Ophthalmol*. 2020a; 138: 1026-1034

Pfau M, von der Emde L, Dysli C, Möller PT, Thiele S, Lindner M, Schmid M, Rubin DL, Fleckenstein M, Holz FG, Schmitz-Valckenberg S. Determinants of Cone and Rod Functions in Geographic Atrophy: AI-Based Structure-Function Correlation. *Am J Ophthalmol*. 2020b; 217: 162-173

Plomp AS, Toonstra J, Bergen AA, van Dijk MR, de Jong PT. Proposal for updating the pseudoxanthoma elasticum classification system and a review of the clinical findings. *Am J Med Genet A*. 2010; 152A: 1049-1058

Risseeuw S, Bennink E, Poirot MG, de Jong PA, Spiering W, Imhof SM, van Leeuwen R, Ossewaarde-van Norel J. A Reflectivity Measure to Quantify Bruch's Membrane Calcification in Patients with Pseudoxanthoma Elasticum Using Optical Coherence Tomography. *Transl Vis Sci Technol*. 2020; 9: 34

Risseeuw S, Pilgrim MG, Bertazzo S, Brown CN, Csincsik L, Fearn S, Thompson RB, Bergen AA, Ten Brink JB, Kortvely E, Spiering W, Ossewaarde-van Norel J, van Leeuwen

R, Lengyel I. Bruch's Membrane Calcification in Pseudoxanthoma Elasticum: Comparing Histopathology and Clinical Imaging. *Ophthalmol Sci.* 2024; 4: 100416

Rose S, On SJ, Fuchs W, Chen C, Phelps R, Kornreich D, Haddican M, Singer G, Wong V, Baum D, Vekaria A, Gagliotti M, Huang R, Suárez-Fariñas M, Terry SF, Lebwohl M. Magnesium supplementation in the treatment of pseudoxanthoma elasticum: A randomized trial. *J Am Acad Dermatol.* 2019; 81: 263-265

Saint-Geniez M, Kurihara T, Sekiyama E, Maldonado AE, D'Amore PA. An essential role for RPE-derived soluble VEGF in the maintenance of the choriocapillaris. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106: 18751-18756

Schenk R, Merz WA, Mühlbauer R, Russell RG, Fleisch H. Effect of ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (EHDP) and dichloromethylene diphosphonate (Cl 2 MDP) on the calcification and resorption of cartilage and bone in the tibial epiphysis and metaphysis of rats. *Calcif Tissue Res.* 1973; 11: 196-214

Schulz V, Hendig D, Henjakovic M, Szliska C, Kleesiek K, Gotting C. Mutational analysis of the ABCC6 gene and the proximal ABCC6 gene promoter in German patients with pseudoxanthoma elasticum (PXE). *Hum Mutat.* 2006; 27: 831

Spaide RF. Choriocapillaris Flow Features Follow a Power Law Distribution: Implications for Characterization and Mechanisms of Disease Progression. *Am J Ophthalmol.* 2016; 170: 58-67

Spaide RF. CHORIOCAPILLARIS SIGNAL VOIDS IN MATERNALLY INHERITED DIABETES AND DEAFNESS AND IN PSEUDOXANTHOMA ELASTICUM. *Retina.* 2017; 37: 2008-2014

Terheyden JH, Wintergerst MWM, Pizarro C, Pfau M, Turski GN, Holz FG, Finger RP. Retinal and Choroidal Capillary Perfusion Are Reduced in Hypertensive Crisis Irrespective of Retinopathy. *Transl Vis Sci Technol.* 2020; 9: 42

Zhang Q, Zheng F, Motulsky EH, Gregori G, Chu Z, Chen CL, Li C, de Sisternes L, Durbin M, Rosenfeld PJ, Wang RK. A Novel Strategy for Quantifying Choriocapillaris Flow Voids Using Swept-Source OCT Angiography. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018; 59: 203-211

2. Veröffentlichung

Retina

Choriocapillaris Flow Signal Impairment in Patients With Pseudoxanthoma Elasticum

Anne-Sophie Loewinger,¹ Maximilian Pfau,^{1,2} Philipp Herrmann,¹ Frank G. Holz,¹ and Kristina Pfau^{1,3}

¹Department of Ophthalmology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany

²Ophthalmic Genetics and Visual Function Branch, National Eye Institute, Bethesda, Maryland, United States

³Division of Epidemiology and Clinical Applications, National Eye Institute, Bethesda, Maryland, United States

Correspondence: Kristina Pfau (née Hess), Department of Ophthalmology, University Hospital Bonn, Ernst-Abbe-Strasse 2, 53111 Bonn, Germany; kristina.pfau@ukbonn.de.

Received: August 8, 2022

Accepted: January 24, 2023

Published: February 21, 2023

Citation: Loewinger A-S, Pfau M, Herrmann P, Holz FG, Pfau K. Choriocapillaris flow signal impairment in patients with pseudoxanthoma elasticum. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2023;64(2):21. <https://doi.org/10.1167/iov.64.2.21>

PURPOSE. To quantify choriocapillaris flow alterations in patients with pseudoxanthoma elasticum (PXE) in pre-atrophic stages and its association with structural changes of the choroid and outer retina.

METHODS. Thirty-two eyes of 21 patients with PXE and 35 healthy eyes of 35 controls were included. The density of choriocapillaris flow signal deficits (FDs) was quantified on 6 × 6-mm optical coherence tomography angiography (OCTA) images. Spectral-domain optical coherence tomography (SD-OCT) images were analyzed for thicknesses of the choroid and outer retinal microstructure and correlated with choriocapillaris FDs in the respective Early Treatment Diabetic Retinopathy Study subfield.

RESULTS. The multivariable mixed model analysis for choriocapillaris FDs revealed significantly higher FDs associated with the group (PXE patients vs. controls +13.6; 95% confidence interval [CI] 9.87–17.3; $P < 0.001$), with increasing age (+0.22% per year; 95% CI 0.12–0.33; $P < 0.001$), and with retinal location (significantly higher FDs in nasal compared to temporal subfields). Choroidal thickness (CT) did not differ significantly between both groups ($P = 0.078$). The CT and choriocapillaris FDs were inversely correlated (−1.92 μm per %FDs; interquartile range −2.81 to −1.03; $P < 0.001$). Larger values of the choriocapillaris FDs were associated with significant thinning of the overlying photoreceptor layers (outer segments: −0.21 μm per %FDs, $P < 0.001$; inner segments:

CONCLUSIONS. Patients with PXE display significant alterations of the choriocapillaris on OCTA even in pre-atrophic stages and in the absence of significant choroidal thinning. The analysis favors choriocapillaris FDs over choroidal thickness as a potential early outcome measure for future interventional trials in PXE. Further, increased FDs in nasal compared to temporal locations mirror the centrifugal spread of Bruch's membrane calcification in PXE.

Keywords: pseudoxanthoma elasticum, PXE, choriocapillaris, bruch's membrane, optical coherence tomography angiography, spectral-domain optical coherence tomography, outcome measures, clinical trials

Pseudoxanthoma elasticum (PXE; Online Mendelian Inheritance in Man [OMIM] #264800, #177850) is an autosomal-recessive inherited, multisystemic disease caused by various mutations in the *ABCC6* gene.^{1–3} The primary pathology is the calcification of elastic fibers, predominantly affecting the skin, eye, and cardiovascular system.^{1–8}

The ocular hallmark of PXE is the mineralization of Bruch's membrane (BrM). BrM is a pentalaminar structure, situated between the retinal pigment epithelium (RPE) and the choriocapillaris (CC), where it regulates the interchange of molecules between these tissues (i.e., the retina and systemic circulation).⁹ Funduscopically, peau d'orange and angioid streaks are visible as a surrogate of a diseased BrM, and both centrifugally spread toward the periphery with increasing age. Further funduscopy alterations include pattern dystrophy-like changes, optic disc drusen, and (mid)peripheral comet tail lesions.^{10–12} In later stages,

the disease progresses to chorioretinal atrophy and/or macular neovascularization, often secondary to angioid streaks representing breaks in BrM.^{10–14}

For early disease detection and for future interventional trials in PXE, sensitive and disease-specific biomarkers are needed. Ideally, such a biomarker should be able to detect change over time in pre-atrophic stages of the disease. Risseeuw et al.¹⁵ have recently shown that BrM calcification can be measured in vivo based on the increased reflectivity of the RPE–BrM retinal band on optical coherence tomography (OCT). However, with current imaging and image analysis techniques, the reproducibility of reflectivity metrics is limited.¹⁵

BrM alterations might also be indirectly measurable through alterations of adjacent structures. One of these, the CC, is strongly dependent on soluble viability factors from the RPE. After secretion by the RPE, these molecules must

pass BrM to reach the CC as their site of action.^{16–18} An increased BrM barrier due to calcification, as in PXE, might therefore result in impaired interchange between the RPE and CC and subsequently lead to choroidal or CC alterations.

Some evidence is given by a previous study highlighting alterations in thickness and structure of the choroid in patients with PXE.¹⁹ However, there was considerable overlap between healthy controls and eyes with pre-atrophic PXE in terms of choroidal thickness. More recently, another study reported a case series of four eyes of three patients with pre-atrophic PXE, exhibiting marked alterations of the choriocapillaris using optical coherence tomography angiography (OCTA).²⁰ These findings suggest that alterations in CC flow deficit density (FD) may outweigh choroidal thinning in PXE in early stages. However, to date, no comprehensive analysis of CC degeneration in PXE and its association with morphological alterations of the choroid, as well as overlying outer retina, has been performed.²¹

This study, therefore, aimed to characterize the magnitude of CC FDs in pre-atrophic and pre-exudative PXE and its association with choroidal thickness. Furthermore, we aimed to assess the association of CC FDs with subtle degeneration of the overlying photoreceptor laminae using spectral-domain optical coherence tomography (SD-OCT).

MATERIALS AND METHODS

Subjects

This prospective cross-sectional study was conducted at the University of Bonn, Germany, recruiting patients between September 2017 and February 2021 from the dedicated clinic for inherited retinal diseases at the Department of Ophthalmology. The study adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki and obtained institutional review board approval by the ethics committee of the medical faculty, University of Bonn (Ethikkommission, Medizinische Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Germany).

The inclusion criterion was a confirmed diagnosis of PXE based on the criteria of Plomp et al,²² that require two out of three PXE-related characteristics: (1) two pathogenic mutations in the *ABCC6*-gene, and/or (2) disease-specific dermatological, and/or (3) disease-specific ocular alterations. Exclusion criteria were any pretreatment with intravitreal injections of anti-vascular endothelial growth factor inhibitors, current exudative or non-exudative (quiescent) neovascularization, and areas of retinal atrophy that were larger than two disc areas. Furthermore, eyes with any other confounding disease and eyes with significant ocular media opacities were excluded.

OCT Acquisition and Processing

The imaging acquisition and processing steps were similar for PXE and controls. All subjects underwent multimodal imaging, including SD-OCT (Spectralis HRA+OCT; Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany), with 30° × 25° volume scans (121 scans). Segmentation of the outer nuclear layer (outer plexiform layer/outer nuclear layer boundary to external limiting membrane), the photoreceptor inner segments (external limiting membrane to ellipsoid zone), the outer segments (ellipsoid zone to the RPE–drusen complex [RPEDC]), the RPEDC (RPE to BrM), and the choroid was performed applying a fully automated deep-learning-based segmentation algorithm to the OCT B-scans.^{23–26} The algorithm was previously shown in eyes with atrophic macular degeneration to segment with an accuracy within the limits of human-expert inter-reader-variability.²³ Based on these segmentations of all 121 B-scans, en face thickness maps were created for each of the segmented layers. Last, an Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) grid was centered on the maps, and average thicknesses for each ETDRS subfield were extracted for each layer (Fig. 1).

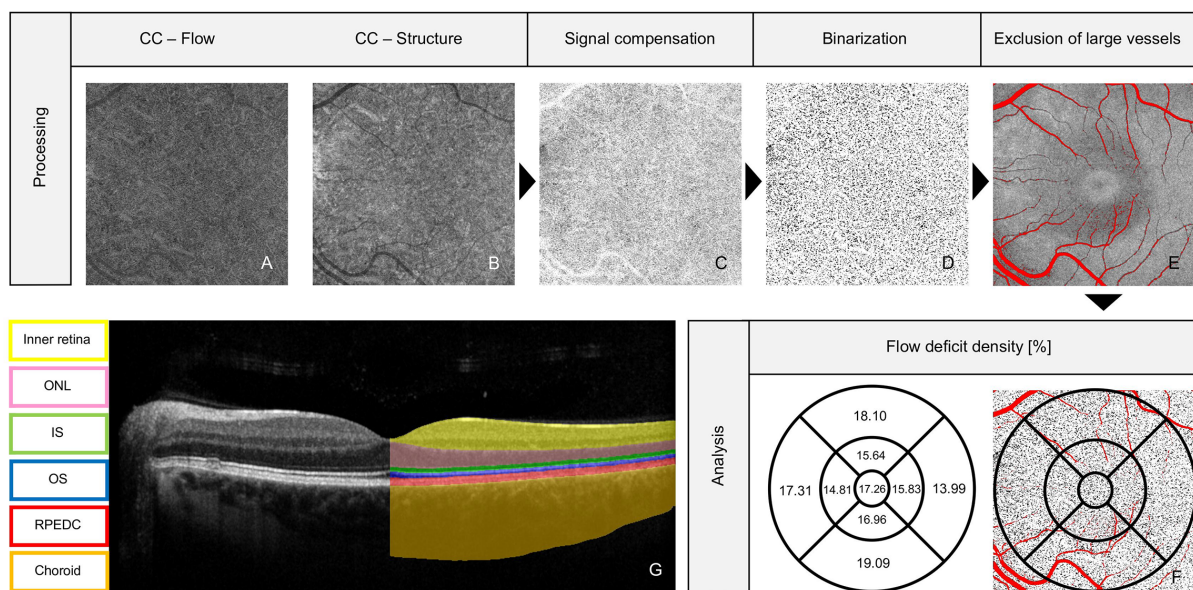


FIGURE 1. Data processing and analysis. For the image processing, OCTA images of the CC flow and corresponding structural slab (inverted, smoothed) were multiplied to compensate for shadowing effects. Subsequently, the images were binarized to identify CC FDs. To further account for interference, areas with overlying large vessels were identified on superficial scans and excluded from analysis (marked in red). The density of FDs was quantified and analyzed for each ETDRS subfield. From SD-OCT data, thickness maps for comparison with OCTA data were created by automatic segmentation of the OCT B-scans.

OCTA Acquisition and Processing

OCTA images were acquired using the PLEX Elite 9000 Swept-Source OCT (Carl Zeiss Meditec, Jena, Germany) using a nominal 6×6 -mm scan with preset slab depths of the device (+29 to +49 μm below the RPE-fit segmentation line). Segmentation was manually corrected if necessary. The processing steps for OCT-A images have been described in previous studies and are briefly outlined here.^{27–29} Only images without extensive artifacts (e.g., extensive shadowing, floaters or alterations due to eye movements) were exported and included for analysis. In case of localized artifacts (e.g., small floater), the respective ETDRS subfield (see below) was excluded. Decentered images (i.e., fovea not in the center of the image) were retaken or excluded if centralization was not achievable.

The processing has been described previously.^{30,31} In short, the image data were exported and processed using FIJI ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The CC structure image was downsampled to 512×512 pixels from initially 1024×1024 pixels. Then, the OCTA images were multiplied with the inverted, smoothed structural image (Gaussian smoothing with a sigma of 3 pixels) to compensate for shadowing effects.

After applying a local threshold level (Phansalkar method, 4-pixel radius) and image binarization, an ETDRS grid was centered on the image. The choriocapillaris FD (quantified in terms of the density [%]) was defined for each ETDRS subfield. To account for interference of choriocapillaris FDs and large central retinal vessels, these areas were excluded from the analysis to avoid confounding factors, as shown in Figure 1.³² The denominator was adjusted for calculation of the FDs. Further, ETDRS subfields with any focus of atrophy were excluded from the analysis.

Statistical Analyses

All statistical analyses were performed using the software R Studio 1.2.5033 (R Foundation for Statistical Computing,

Vienna, Austria). Continuous, normally distributed variables were described using the mean and standard deviation, and non-normally distributed variables were described using median and interquartile ranges (IQRs). Mixed-effect models were used to account for the hierarchical nature of the data (ETDRS subfields nested in eye nested in patient). *P* values < 0.05 obtained using *t*-statistics were considered significant.

First, the associations of age, PXE diagnosis, and location (ETDRS subfield) as the explanatory (independent) variables with FDs as the dependent variable were analyzed. Next, we evaluated the association of FDs with established biomarkers for BrM diseases (choroidal thickness or RPEDC thickness). Finally, we examined associations of FDs with putative downstream degenerative changes of the outer retina. Specifically, we evaluated the association of FDs as the explanatory variable with outer nuclear layer (ONL), inner segment (IS), or outer segment (OS) thickness as the dependent variable.

RESULTS

A total of 32 eyes from 21 patients with PXE (median age 48.7 years; IQR 33.9–53.3; range 25.5–74.5; 17 female) and 35 eyes from 35 healthy controls (median age 59.6 years; IQR 51.1–66.0; range 21.8–83.3; 13 female) without any ocular pathologies were included. Further PXE-associated demographic data are summarized in Supplementary Table S1. A total of 29 ETDRS subfields from nine eyes (PXE subgroup) were excluded from the analysis due to small atrophic foci visible on OCT or artifacts on OCTA. Nasal subfields were predominantly affected by exclusion (outer nasal, $n = 7$; inner nasal, $n = 5$), followed by the inferior (inner inferior, $n = 5$; outer inferior, $n = 1$), temporal (outer temporal, $n = 2$; inner temporal, $n = 2$), superior (inner superior, $n = 3$; outer superior, $n = 1$), and central ($n = 3$) subfields. The areas excluded from analysis due to overlying retinal vessels were not significantly different in both groups (controls: mean, 2.62%; 95%

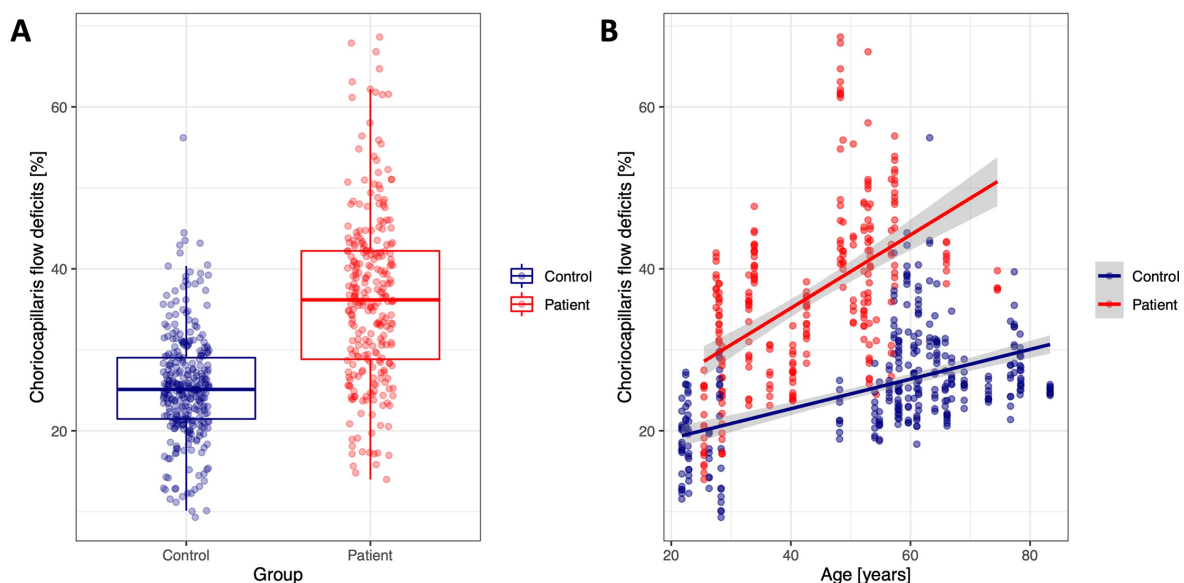


FIGURE 2. Association of choriocapillaris FDs with group and age. (A) CC FD was significantly higher in PXE patients and was more variable than in controls. CC FD increased with age in patients and controls. (B) Although a trend for steeper FD increases with age in the PXE group compared to controls was visible, there was no statistically significant interaction effect in our multivariable analysis. Each data point represents one ETDRS grid subfield.

CI 1.93–3.32; patients with PXE: 3.42%; 95% CI 2.55–4.30; $P = 0.149$).

Choriocapillaris Flow Signal Deficits

The multivariable mixed model analysis for choriocapillaris FDs revealed that the diagnosis of PXE (estimate +13.6; 95% CI 9.87–17.3; $P < 0.001$), increasing age (estimate +0.22% per year; 95% CI 0.12–0.33; $P < 0.001$), and position in the ETDRS subfield (increased FDs in nasal compared to temporal subfields; see Supplementary Table S2) were explanatory variables. Figure 2 shows the correlation of FDs with age in PXE and controls. Although there is a positive trend for a steeper FD increase with age in the PXE group compared to controls, this was not significant in our multivariable analysis (e.g., no interaction term of age and group). Supplementary Table S1 also displays characteristics of eyes with high choriocapillaris FDs (>40% FDs) separately. A total of 76 subfields from 10 patients showed more than 40% FDs. Nasal subfields were slightly more often affected (outer nasal, $n = 8$; inner nasal, $n = 10$; central, $n = 9$) than temporal subfields (inner temporal, $n = 6$; outer temporal, $n = 6$).

Choroidal Thickness

The choroidal thickness (CT) was slightly lower in (by definition of our inclusion criteria all pre-atrophic) PXE patients (estimate $-44.05 \mu\text{m}$; 95% CI -92.98 to 4.87) (Fig. 3). However, the difference between PXE patients and controls was not statistically significant ($P = 0.078$). CT and FDs exhibited an inverse linear association in all subjects (i.e., a choroidal thinning was observed with increasing FDs) (Fig. 3) of $-1.92 \mu\text{m}$ per %FDs (95% CI -2.81 to -1.03 ; $P < 0.001$) (Fig. 3). Logarithmic or square-root transformation of the variables did not further improve the model.

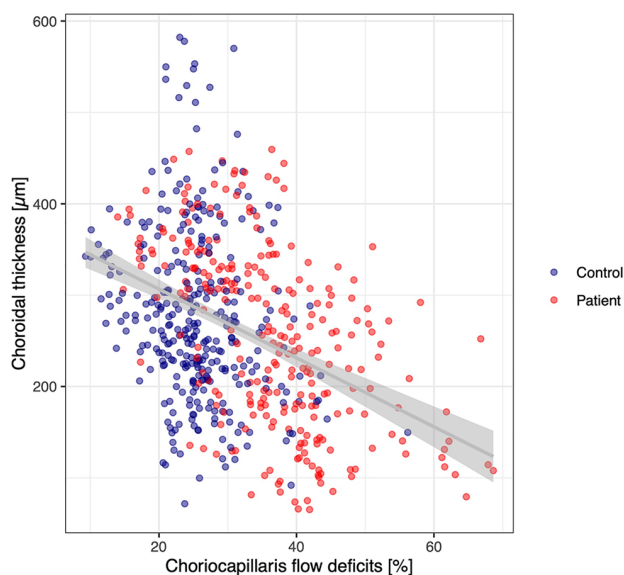


FIGURE 3. Association of CC FDs with CT. CT was not significantly different between patients and controls; however, CC FDs and CT exhibited an inversely linear association. Each data point represents one ETDRS grid subfield. The statistical analysis accounted for multiple testing within one patient.

RPEDC Thickness

The mean RPEDC was $36.91 \mu\text{m}$ (95% CI 33.55–40.27) in controls and $41.8 \mu\text{m}$ (95% CI 37.5–46.2; $P = 0.072$) in patients. No significant association was found between RPEDC thickness and FDs ($P = 0.107$).

Association with Photoreceptor Laminae

Although only eyes without large areas of atrophy were included and ETDRS subfields with smaller atrophic areas were excluded, PXE patients showed overall lower thicknesses of the three layers representing photoreceptor integrity (Supplementary Table S3). All three layers—OS thickness (estimate $-0.21 \mu\text{m}$ per %FDs; 95% CI -0.26 to

B-scans.

Model for Sequence of Alterations

Supplementary Figure S1 shows all imaging biomarkers across eyes ordered according to the choriocapillaris FDs. The choriocapillaris FD values exhibited a left-skewed distribution (i.e., multiple abnormally low values in eyes of patients with PXE). Subclinical photoreceptor laminae thinning was predominantly evident in eyes with severely reduced choriocapillaris FD density.

DISCUSSION

Our study revealed significant choriocapillaris flow alterations in patients with PXE in pre-atrophic stages. These alterations were associated with a thinner choroid in the structural OCT. Furthermore, the OCT layers representing photoreceptor integrity were significantly thinned in the presence of choriocapillaris FDs. PXE is hallmarked by calcification of elastic fibers, and BrM mineralization is the initial insult in the eye. The BrM is an acellular pentalaminar basement membrane with a strategic location between the RPE and the choriocapillaris.⁹ Its primary functions are the formation of a diffusion barrier and correspondingly regulation of the interchange of molecules (e.g., nutrients, molecular waste, oxygen, growth factors) by diffusion between the RPE and the choroid (i.e., neuroretina and between the systemic circulation), as well as stabilization of adjacent structures.⁹

There are multiple lines of evidence that a diseased BrM impacts adjacent anatomical structures regarding their function and morphology.^{9,16,19} Choriocapillaris and RPE form a co-dependent relationship, with the choriocapillaris being dependent on regulatory factors (e.g., vascular endothelial growth factor inhibitors) secreted by the RPE. Vice versa, the RPE is dependent on receiving nutrients and oxygen from the systemic circulation via the choriocapillaris blood flow to supply the photoreceptors.^{18,33} Among those molecules is vitamin A, which is necessary for the normal function of photoreceptors. A previous study has evidenced functional

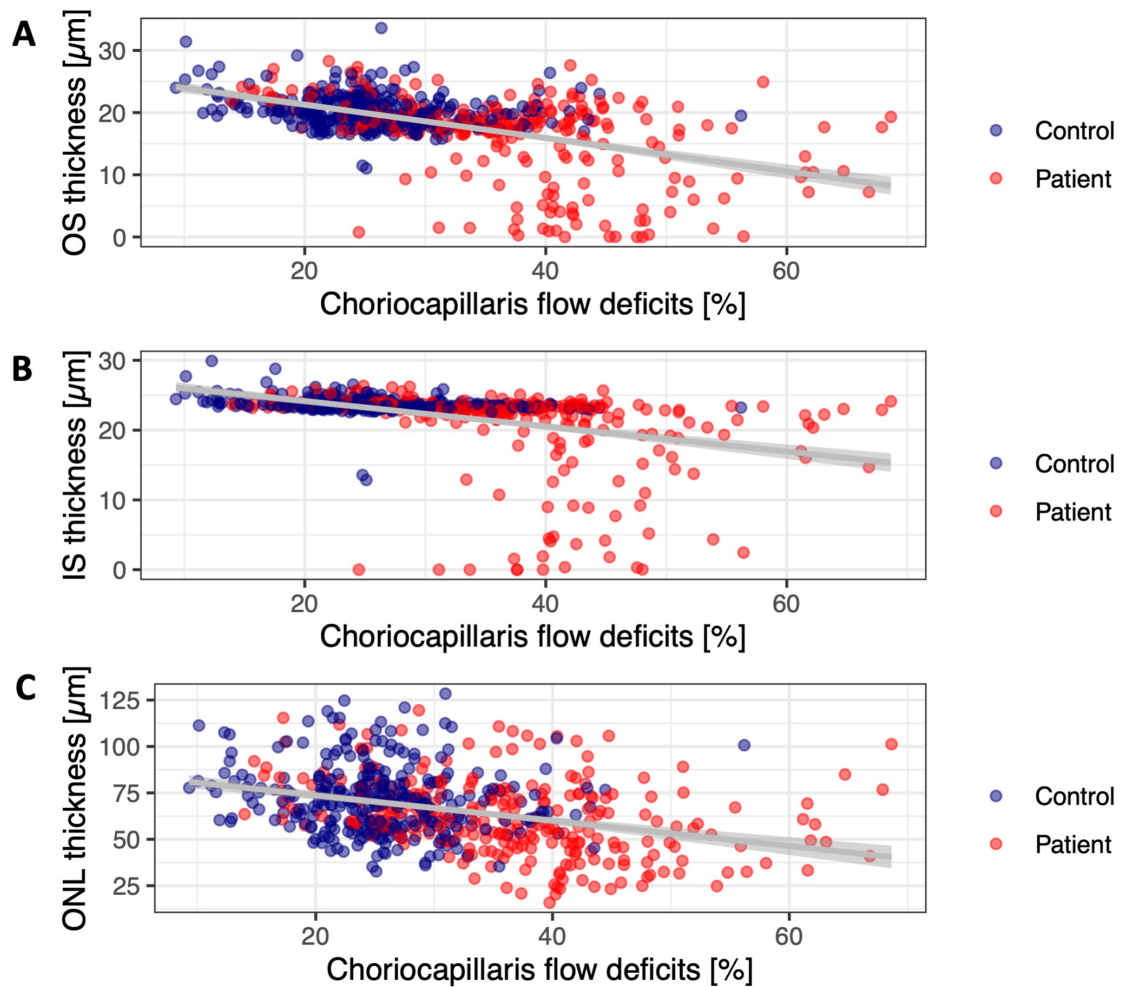


FIGURE 4. Association of photoreceptor laminae with CC FDs. The thicknesses of photoreceptor inner segments, outer segments, and outer nuclear layer exhibited a proportional relationship with choriocapillaris flow, displaying a marked thinning in eyes with high CC FDs.

impairments in PXE in line with an impaired vitamin A transport over BrM.³⁴ Moreover, animal studies have shown that long-standing vitamin A deficiency can lead to photoreceptor degeneration.^{35–37} It can be hypothesized that microvascular impairment and finally atrophy of the choriocapillaris layer lead to an additional shortage of vital nutrients for the photoreceptors. Thus, BrM calcification interfering with interactive processes of the tissues on both sides of the BrM may result in secondary alterations, such as an impaired choriocapillaris flow and subsequent photoreceptor atrophy.

Our findings indicate that increased FDs are measurable in early PXE disease stages. In contrast to that, our data showed marked choroidal thinning in eyes with severe FDs. Therefore, CC FDs, rather than choroidal thickness, could also serve as a biomarker for a diseased BrM and as a potential outcome measure for interventional trials in BrM-affecting diseases. However, direct comparisons with other functional and morphological potential outcome measures (e.g., dark adaptation, fundus-controlled perimetry, BrM reflectivity) are necessary to evaluate the usefulness of CC FDs.

An underscoring that PXE-specific processes are measured is given in our multivariate model. In addition to age and disease, the retinal location is significantly and independently associated with choriocapillaris FDs. This finding differs from a similar study in Sorsby fundus dystrophy (SFD), another primary BrM disease, that is characterized by diffuse subretinal deposits.³⁸ In our study, we found significantly increased FDs in nasal subfields and significantly decreased FDs in temporal subfields. Although it should be taken into consideration that having to exclude more nasal than temporal subfields due to atrophy could artifactually increase the amount of FD seen in nasal compared to temporal subfields, this mismatch could also be an indicator for the previously described calcification process in PXE, which develops centrifugally from the optic nerve head toward the periphery (with regard to the ETDRS grid, from nasal to temporal subfields).¹⁰ The fact that the overall total number of subfields with more than 40% FD was slightly higher in nasal subfields supports this hypothesis. Because our study included young patients with mild disease stages, it can also be hypothesized that

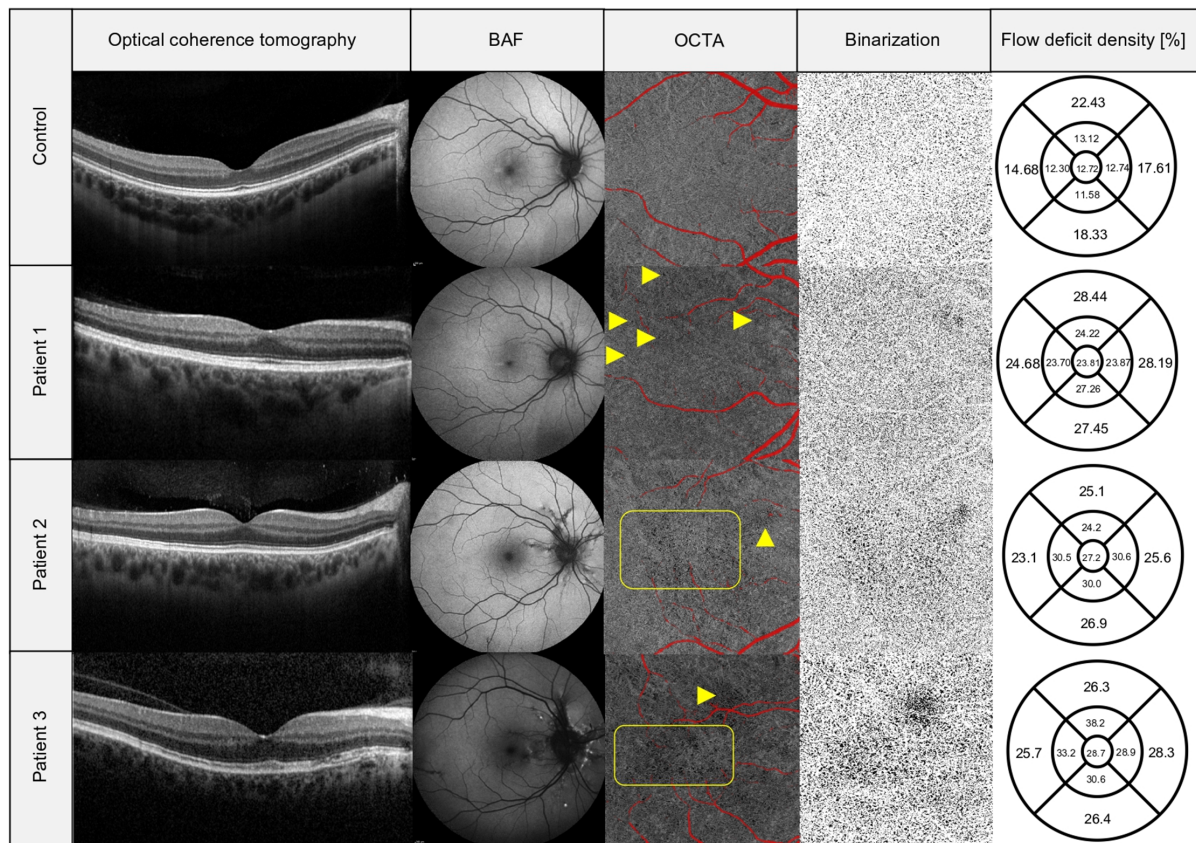


FIGURE 5. CC FDs in exemplary patients. All exemplary patients showed no or only mild alterations in the central OCT B-scan (first column) and are comparable to the control. Blue fundus autofluorescence (BAF; second column) showed mild alterations with faint angioid streaks in patient 1, more obvious streaks in patient 2, and additional pattern dystrophy-like alterations in patient 3. The CC flow images (third column) and corresponding binarized images (fourth column), however, show areas of FDs (yellow arrows, yellow rectangle) in the absence of obvious retinal alterations on OCT and BAF. The percentage of CC flow voids for each ETDRS subfield is presented in the fifth column. Also, choroidal thickness in patients 1 and 2 is not obviously thinner than in the control eye. Red areas were excluded from the quantitative analysis due to overlying retinal vessels.

the temporal part of the central retina is less calcified than the nasal part. Therefore, our analyses strongly suggest that FDs are indeed a surrogate of calcification severity in PXE, allowing earlier discrimination of intermediately affected retinal regions.

Further, we investigated the association of choriocapillaris FDs and choroidal thickness on OCT. Previous studies investigating patients with PXE¹⁹ or other BrM-impacting diseases (e.g., SFD,³⁸ age-related macular degeneration [AMD]³⁹) have already linked a diseased BrM to a thinned choroid. However, these studies included a wide range of the disease spectrum and were not specifically focused on early stages. Our findings showed a significant correlation of choriocapillaris FDs and choroidal thickness but noticeably no significant difference in choroidal thickness between the two groups. This implies that the choroidal thinning is a feature evident in later stages of PXE (i.e., with higher choriocapillaris FDs), but not decreased in the overall cohort due to the rather larger interindividual variability in choroidal thickness. Further, the R^2 value of this association is rather low, indicating that many other factors not taken into account currently result in a high variability. Figure 3 underlines this with the high interindividual difference of choroidal thickness in controls.

Supplementary Figure S1 shows that CC flow is also impaired in eyes with only mild alterations of choroid and photoreceptors. Therefore, choroidal and photoreceptor thickness is an associated finding of increased choriocapillaris FDs but not sufficient to detect early alterations. We could not observe an association of choriocapillaris flow deficits with RPEDC thickness. In other BrM diseases, such as SFD or AMD, sub-RPE deposits are the predominant finding in the early stages; however, subclinical changes at the level of the BrM have been evidenced histologically and functionally.^{40,41} In these, RPEDC volume increases in the early stages and might be a correlate of disease severity.^{42,43}

Last, the thickness of all three photoreceptor layers (IS, OS, and ONL) exhibited a strong association with choriocapillaris flow deficits, displaying thinner layers associated with higher FDs. Photoreceptor degeneration and subsequent retinal atrophy following the loss of choriocapillaris and RPE have been described in previous studies.^{16,18} Our PXE patients, although representing a comparatively young and pre-atrophic patient cohort, still exhibited significantly lower values in the thicknesses of these layers (Supplementary Table S3). This might give further support for the hypothesis of choriocapillaris flow being involved in the course of photoreceptors on their way to degeneration. However,

given the cross-sectional design of our study, the contribution of these multiple factors should be investigated more in depth in future studies featuring a longitudinal design. Additionally, despite the association of FDs and photoreceptor layer thicknesses being significant, the R^2 values indicate that other determinants might contribute. Although the characterization of all determinants of photoreceptor degeneration in PXE is warranted, such analyses would extend beyond the scope of this manuscript.

There are some limitations to our study that should be taken into consideration. The low sample size is a common challenge in inherited retinal diseases. Because our inclusion criteria were strict (pre-atrophic and pre-exudative stages), associations of FDs and structural alterations might be driven by a low number of eyes with “subnormal” but pre-atrophic photoreceptor layer thicknesses. However, we accounted for multiple testing within one eye (i.e., subfields nested in eye) and for multiple testing within one patient (i.e., eyes nested in patient) by introducing a random-effects term in all the models (R package *lme4*) of our analyses. On the upside, given the narrow inclusion criteria, this might be one of the most extensive descriptions of early PXE stages.

Similar to previous studies, our cohort also exhibited an overrepresentation of females (17 female and four male patients),^{1,44} resulting in gender bias. For example, the skin is usually the first organ system displaying clinical manifestations of PXE and leading to diagnosis.^{12,45–47} Women might be more likely to have skin findings⁴⁸ (and/or more self-aware of clinical manifestations in general) and consequently more prone to the diagnosis of PXE in an earlier stage of disease than men. However, a distinct cause for this frequently described female predominance has not yet been identified. Further, the cross-sectional approach of this study can give insight in associations of different features but does not allow us to deduce causal links.

Our controls were on average nearly 10 years older than the PXE patients. However, given the previously described positive association of FDs with age, the difference between PXE and controls is thereby likely underestimated.⁴⁹ It remains to be elucidated whether the observed alterations between PXE patients and control participants in this study are predominantly driven by BrM alterations or systemic cardiovascular risk factors. Importantly, patients with PXE have a higher prevalence of cerebrovascular disease and hypertension, which themselves can have an effect on the CC.^{50,51}

Another limitation of our study is the use of preset slab depths of the PLEX Elite in the quantitative analysis of choriocapillaris FDs.⁵² Different slab selection or processing approaches in general (regarding, for example, thresholding, binarization, or ETDRS subfield selection) might have an impact on the stated differences between patients and controls. Furthermore, we did not adjust the scans prior to analysis for refractive errors or axial length, which could be a possible confounding factor in our analysis regarding the use of ETDRS subfields (i.e., PXE patients were predominantly female, who are known to have shorter axial lengths than males, which could result in a slight variation of retinal subfield size being analyzed).^{53,54} Finally, BrM reflectivity as a biomarker of BrM calcification in structural OCT imaging was shown to be increased in patients with PXE.¹⁵ For this study, we accounted for structural changes by multiplying the inversed smoothed structural image with the flow image, thereby accounting for structural alterations affecting CC. However, it is possible that unknown factors associ-

ated with BrM calcification affected our findings. Regarding BrM reflectivity measures as an outcome measure, head-to-head comparison of BrM reflectivity and choriocapillaris FDs with regard to reproducibility and ability to detect change is warranted.

CONCLUSIONS

The density of choriocapillaris FDs is significantly increased in patients with PXE, even in pre-atrophic stages. Choroidal thinning was observed in eyes with markedly elevated FD density. Nevertheless, our findings might give rise to the hypothesis that FDs can discriminate PXE from healthy controls better than the choroidal thickness in the early stages. Longitudinal studies are necessary to investigate this on an intra- and inter-participant basis. Photoreceptor layers are thinner in the presence of an increased FDs density, which underlines the contribution of FDs to photoreceptor degeneration.

Acknowledgments

The authors thank the anonymous reviewers for their constructive comments and remarks in the review process of this manuscript.

Supported by grants from the BONFOR program at the University Bonn (2019 1A-13 to KH) and the German Research Foundation (PF 950/1-1 to MP; HE 8960/1-1). The sponsor and funding organization had no role in the design or conduct of this research.

Disclosure: **A.-S. Loewinger**, None; **M. Pfau**, Apellis (C); **P. Herrmann**, Novartis (F), Bayer Health (F), Allergan (F), Heidelberg Engineering (N), Carl Zeiss Meditec (N), Optos (N); **F.G. Holz**, Heidelberg Engineering (F, R), Novartis (F, R), Genentech (F, R), Acucela (F, R), Boehringer Ingelheim (R), Alcon (F, R), Allergan (F, R), Optos (F, R), Carl Zeiss Meditec (N); **K. Pfau**, Novartis (F)

References

1. Chassaing N, Martin L, Calvas P, Le Bert M, Hovnanian A. Pseudoxanthoma elasticum: a clinical, pathophysiological and genetic update including 11 novel *ABCC6* mutations. *J Med Genet*. 2005;42:881–892.
2. Bergen AA, Plomp AS, Schuurman EJ, et al. Mutations in *ABCC6* cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat Genet*. 2000;25:228–231.
3. Schulz V, Hendig D, Henjakovic M, Szliska C, Kleesiek K, Götting C. Mutational analysis of the *ABCC6* gene and the proximal *ABCC6* gene promoter in German patients with pseudoxanthoma elasticum (PXE). *Hum Mutat*. 2006;27:831.
4. Costrop LM, Vanakker OO, Van Laer L, et al. Novel deletions causing pseudoxanthoma elasticum underscore the genomic instability of the *ABCC6* region. *J Hum Genet*. 2010;55:112–117.
5. Le Saux O, Martin L, Aherrahrou Z, Leftheriotis G, Varadi A, Brampton CN. The molecular and physiological roles of *ABCC6*: more than meets the eye. *Front Genet*. 2012;3:289.
6. Lebwohl M, Schwartz E, Lemlich G, Lovelace O, Shaikh-Bahai F, Fleischmajer R. Abnormalities of connective tissue components in lesional and non-lesional tissue of patients with pseudoxanthoma elasticum. *Arch Dermatol Res*. 1993;285:121–126.
7. Lefthériotis G, Omarjee L, Le Saux O, et al. The vascular phenotype in pseudoxanthoma elasticum and related

- disorders: contribution of a genetic disease to the understanding of vascular calcification. *Front Genet.* 2013;4:4.
8. Neldner KH. Pseudoxanthoma elasticum. *Clin Dermatol.* 1988;6:1–159.
 9. Booi JC, Baas DC, Beisekeeva J, Gorgels TG, Bergen AA. The dynamic nature of Bruch's membrane. *Prog Retin Eye Res.* 2010;29:1–18.
 10. Charbel Issa P, Finger RP, Götting C, Hendig D, Holz FG, Scholl HP. Centrifugal fundus abnormalities in pseudoxanthoma elasticum. *Ophthalmology.* 2010;117:1406–1414.
 11. Gliem M, Zaeytijd JD, Finger RP, Holz FG, Leroy BP, Charbel Issa P. An update on the ocular phenotype in patients with pseudoxanthoma elasticum. *Front Genet.* 2013;4:14.
 12. Finger RP, Charbel Issa P, Ladewig MS, et al. Pseudoxanthoma elasticum: genetics, clinical manifestations and therapeutic approaches. *Surv Ophthalmol.* 2009;54:272–285.
 13. Hu X, Plomp AS, van Soest S, Wijnholds J, de Jong PTVM, Bergen AAB. Pseudoxanthoma elasticum: a clinical, histopathological, and molecular update. *Surv Ophthalmol.* 2003;48:424–438.
 14. Gliem M, Muller PL, Birtel J, Hendig D, Holz FG, Charbel Issa P. Frequency, phenotypic characteristics and progression of atrophy associated with a diseased Bruch's membrane in pseudoxanthoma elasticum. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57:3323–3330.
 15. Risseuw S, Bennink E, Poirot MG, et al. A reflectivity measure to quantify Bruch's membrane calcification in patients with pseudoxanthoma elasticum using optical coherence tomography. *Transl Vis Sci Technol.* 2020;9:34.
 16. Nickla DL, Wallman J. The multifunctional choroid. *Prog Retin Eye Res.* 2010;29:144–168.
 17. Chirco KR, Sohn EH, Stone EM, Tucker BA, Mullins RF. Structural and molecular changes in the aging choroid: implications for age-related macular degeneration. *Eye (Lond).* 2017;31:10–25.
 18. Saint-Geniez M, Kurihara T, Sekiyama E, Maldonado AE, D'Amore PA. An essential role for RPE-derived soluble VEGF in the maintenance of the choriocapillaris. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:18751–18756.
 19. Gliem M, Fimmers R, Muller PL, et al. Choroidal changes associated with Bruch membrane pathology in pseudoxanthoma elasticum. *Am J Ophthalmol.* 2014;158:198–207.e3.
 20. Spaide RF. Choriocapillaris signal voids in maternally inherited diabetes and deafness and in pseudoxanthoma elasticum. *Retina.* 2017;37:2008–2014.
 21. Le HM, Souied EH, Halouani S, et al. Quantitative analysis of choriocapillaris using swept-source optical coherence tomography angiography in eyes with angioid streaks. *J Clin Med.* 2022;11:2134.
 22. Plomp AS, Toonstra J, Bergen AA, van Dijk MR, de Jong PT. Proposal for updating the pseudoxanthoma elasticum classification system and a review of the clinical findings. *Am J Med Genet A.* 2010;152A:1049–1058.
 23. Pfau M, von der Emde L, de Sisternes L, et al. Progression of photoreceptor degeneration in geographic atrophy secondary to age-related macular degeneration. *JAMA Ophthalmol.* 2020;138:1026–1034.
 24. Pfau M, von der Emde L, Dysli C, et al. Determinants of cone and rod functions in geographic atrophy: AI-based structure-function correlation. *Am J Ophthalmol.* 2020;217:162–173.
 25. Chiu SJ, Izatt JA, O'Connell RV, Winter KP, Toth CA, Farsiu S. Validated automatic segmentation of AMD pathology including drusen and geographic atrophy in SD-OCT images. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53:53–61.
 26. Pfau M, Cukras CA, Huryan LA, et al. Photoreceptor degeneration in ABCA4-associated retinopathy and its genetic correlates. *JCI Insight.* 2022;7:e155373.
 27. Chu Z, Zhang Q, Gregori G, Rosenfeld PJ, Wang RK. Guidelines for imaging the choriocapillaris using OCT angiography. *Am J Ophthalmol.* 2021;222:92–101.
 28. Chu Z, Cheng Y, Zhang Q, et al. Quantification of choriocapillaris with Phansalkar local thresholding: pitfalls to avoid. *Am J Ophthalmol.* 2020;213:161–176.
 29. Chu Z, Gregori G, Rosenfeld PJ, Wang RK. Quantification of choriocapillaris with optical coherence tomography angiography: a comparison study. *Am J Ophthalmol.* 2019;208:111–123.
 30. Muller PL, Pfau M, Moller PT, et al. Choroidal flow signal in late-onset Stargardt disease and age-related macular degeneration: an OCT-angiography study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018;59:AMD122–AMD131.
 31. Zhang Q, Zheng F, Motulsky EH, et al. A novel strategy for quantifying choriocapillaris flow voids using swept-source OCT angiography. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018;59:203–211.
 32. Borrelli E, Uji A, Sarraf D, Sadda SR. Alterations in the choriocapillaris in intermediate age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58:4792–4798.
 33. Spaide RF. Choriocapillaris flow features follow a power law distribution: implications for characterization and mechanisms of disease progression. *Am J Ophthalmol.* 2016;170:58–67.
 34. Hess K, Gliem M, Birtel J, et al. Impaired dark adaptation associated with a diseased Bruch membrane in pseudoxanthoma elasticum. *Retina.* 2020;40:1988–1995.
 35. Redmond TM, Yu S, Lee E, et al. Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. *Nat Genet.* 1998;20:344–351.
 36. Hayes KC. Retinal degeneration in monkeys induced by deficiencies of vitamin E or A. *Invest Ophthalmol.* 1974;13:499–510.
 37. el-Hifnawi el-S, Lincoln DT, Dashti H. Nutritionally induced retinal degeneration in rats. *Nutrition.* 1995;11:705–707.
 38. Hess K, Raming K, Gliem M, et al. Choriocapillaris flow signal impairment in Sorsby fundus dystrophy. *Ophthalmologica.* 2022;245:265–274.
 39. Esmaelpour M, Ansari-Shahrezaei S, Glittenberg C, et al. Choroid, Haller's, and Sattler's layer thickness in intermediate age-related macular degeneration with and without fellow neovascular eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55:5074–5080.
 40. Curcio CA, Johnson M, Rudolf M, Huang JD. The oil spill in ageing Bruch membrane. *Br J Ophthalmol.* 2011;95:1638–1645.
 41. Owsley C, McGwin G, Jr, Clark ME, et al. Delayed rod-mediated dark adaptation is a functional biomarker for incident early age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 2016;123:344–351.
 42. Folgar FA, Yuan EL, Sevilla MB, et al. Drusen volume and retinal pigment epithelium abnormal thinning volume predict 2-year progression of age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 2016;123:39–50.e1.
 43. Khan KN, Borooh S, Lando L, et al. Quantifying the separation between the retinal pigment epithelium and Bruch's membrane using optical coherence tomography in patients with inherited macular degeneration. *Transl Vis Sci Technol.* 2020;9:26.
 44. Strub B, Neldner KH, Rao VS, St Jean P, Lindpaintner K. Mapping of both autosomal recessive and dominant variants of pseudoxanthoma elasticum to chromosome 16p13.1. *Hum Mol Genet.* 1997;6:1823–1828.
 45. Germain DP. Pseudoxanthoma elasticum. *Orphanet J Rare Dis.* 2017;12:85.
 46. Hacker SM, Ramos-Caro FA, Beers BB, Flowers FP. Juvenile pseudoxanthoma elasticum: recognition and management. *Pediatr Dermatol.* 1993;10:19–25.

47. Laube S, Moss C. Pseudoxanthoma elasticum. *Arch Dis Child*. 2005;90:754–756.
48. Uitto J, Varadi A, Bercovitch L, Terry PF, Terry SF. Pseudoxanthoma elasticum: progress in research toward treatment: summary of the 2012 PXE international research meeting. *J Invest Dermatol*. 2013;133:1444–1449.
49. Zheng F, Zhang Q, Shi Y, et al. Age-dependent changes in the macular choriocapillaris of normal eyes imaged with swept-source optical coherence tomography angiography. *Am J Ophthalmol*. 2019;200:110–122.
50. Chua J, Le TT, Tan B, et al. Choriocapillaris microvasculature dysfunction in systemic hypertension. *Sci Rep*. 2021;11:4603.
51. Terheyden JH, Wintergerst MWM, Pizarro C, et al. Retinal and choroidal capillary perfusion are reduced in hypertensive crisis irrespective of retinopathy. *Transl Vis Sci Technol*. 2020;9:42.
52. Byon I, Alagorie AR, Ji Y, Su L, Sadda SR. Optimizing the repeatability of choriocapillaris flow deficit measurement from optical coherence tomography angiography. *Am J Ophthalmol*. 2020;219:21–32.
53. Hashemi H, Khabazkhoob M, Miraftab M, et al. The distribution of axial length, anterior chamber depth, lens thickness, and vitreous chamber depth in an adult population of Shahroud, Iran. *BMC Ophthalmol*. 2012;12:50.
54. Ojaimi E, Rose KA, Morgan IG, et al. Distribution of ocular biometric parameters and refraction in a population-based study of Australian children. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:2748–2754.

3. Danksagung

Mein vorrangiger Dank gilt Herrn Prof. Dr. Frank G. Holz, unter dessen Leitung der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Universität Bonn mir optimale Arbeitsbedingungen zur Durchführung dieser Arbeit zur Verfügung standen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau PD Dr. Kristina Pfau für die Bereitstellung des überaus interessanten Themas sowie die unermüdliche Unterstützung und fachlich herausragende Betreuung bedanken.

Mein Dank gilt außerdem Herrn PD Dr. Maximilian Pfau und Herrn PD Dr. Philipp Herrmann für die wertvollen Anregungen und stetige Hilfsbereitschaft.

Des Weiteren danke ich allen Studienteilnehmern und vor allem der Selbsthilfegruppe für PXE-Erkrankte Deutschlands e.V. für ihre Offenheit, Zeit und Bereitschaft zur Studienteilnahme.

Abschließend möchte ich mich insbesondere bei meinen Eltern, Heinz und Michaela Löwinger sowie bei meinen Brüdern, Sebastian und Jakob Löwinger, bedanken, die mir mit ihrer liebevollen Fürsorge und uneingeschränkten Unterstützung meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht haben und denen meine Dissertation daher gewidmet ist.