

Aus dem Dr. Rolf M. Schwiete Zentrum für Limbusstammzellforschung und kongenitale Aniridie

Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Institutsleiterin: Prof. Dr. Nóra Szentmáry

**Untersuchung der differentiellen Gen- und Proteinexpression  
humaner kornealer Fibroblasten aus gesunden und Keratokonus-  
Hornhäuten vor und nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

vorgelegt von: Tim Patrick Berger

geboren am: 05.11.1994 in Ludwigsburg

Tag der Promotion: 06. Mai 2021

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Nóra Szentmáry

Prof. Dr. rer. nat. Magali Cucchiarini-Madry

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>3</b>
2.1	Zusammenfassung - Deutsch.....	3
2.2	Zusammenfassung - Englisch.....	5
<b>3</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>7</b>
3.1	Anatomie und Physiologie der Kornea .....	7
<b>3.2</b>	<b>Keratokonus.....</b>	<b>10</b>
3.2.1	Definition .....	10
3.2.2	Epidemiologie.....	11
3.2.3	Symptome.....	11
3.2.4	Ätiologie .....	11
3.2.5	Diagnose.....	13
3.2.6	Behandlungsmöglichkeiten .....	14
<b>3.3</b>	<b>Korneales Crosslinking.....</b>	<b>15</b>
3.3.1	Definition und Hintergrund.....	15
3.3.2	Klinische Durchführung.....	16
3.3.3	Postoperative Beschwerden, Komplikationen und Kontraindikationen .....	16
<b>3.4</b>	<b>Fragestellung und Zielsetzung.....</b>	<b>17</b>
<b>4</b>	<b>Materialien und Methoden.....</b>	<b>19</b>
4.1	Genehmigung der Ethikkommission .....	19
4.2	Materialien.....	19
4.3	Versuchsaufbau und Durchführung .....	22
<b>4.4</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>24</b>
4.4.1	Isolierung der primären humanen Keratozyten .....	24
4.4.2	Riboflavin-UV-A-Bestrahlungs-Versuch und Ernten der kornealen Fibroblasten .....	25
4.4.3	RNA-Isolierung.....	26
4.4.4	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	26
4.4.5	Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) .....	27
4.4.6	Quantitative Proteinbestimmung .....	28
4.4.7	Western Blot.....	29
4.4.8	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	30

4.4.9	Statistische Analyse .....	31
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>32</b>
5.1	Nukleärer Faktor kappa B .....	32
5.2	Induzierbare NO-Synthase .....	34
5.3	Interleukin-6 .....	36
5.4	Kollagen 1 .....	43
5.5	Kollagen 5 .....	45
5.6	Superoxiddismutase 1 .....	47
5.7	Genexpressionsuntersuchung einer alleinigen UV-A-Bestrahlung.....	49
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>51</b>
6.1	<b>Unterschiede im Expressionsprofil inflammatorischer Marker (NFkB, iNOS, IL-6) zwischen unbehandelten gesunden und Keratokonus-Fibroblasten .....</b>	<b>51</b>
6.1.1	Unterschiede im Expressionsprofil von NFkB in Keratokonus-Fibroblasten im Vergleich zu gesunden kornealen Fibroblasten.....	51
6.1.2	Unterschiede im Expressionsprofil von iNOS in Keratokonus-Fibroblasten im Vergleich zu gesunden kornealen Fibroblasten.....	52
6.1.3	Unterschiede im Expressionsprofil von IL-6 in Keratokonus-Fibroblasten im Vergleich zu gesunden kornealen Fibroblasten .....	52
6.2	<b>Veränderungen im Expressionsprofil inflammatorischer Marker (NFkB, iNOS, IL-6) nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung .....</b>	<b>54</b>
6.2.1	Veränderungen im Expressionsprofil von NFkB in gesunden und Keratokonus-Fibroblasten nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung.....	54
6.2.2	Veränderungen im Expressionsprofil von iNOS in gesunden und Keratokonus-Fibroblasten nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung.....	54
6.2.3	Veränderungen im Expressionsprofil von IL-6 in gesunden und Keratokonus-Fibroblasten nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung.....	55
6.3	<b>Unterschiede im Expressionsprofil von Kollagen 1 und 5 in Keratokonus-Fibroblasten im Vergleich zu gesunden kornealen Fibroblasten und deren Veränderungen nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung .....</b>	<b>57</b>
6.4	<b>Auswirkungen auf das antioxidative Enzym Superoxiddismutase 1 nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung .....</b>	<b>60</b>
6.5	<b>Abschließende Bewertung und Ausblick.....</b>	<b>62</b>

<b>7</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i></b> .....	<b>64</b>
<b>8</b>	<b><i>Abbildungsverzeichnis</i></b> .....	<b>73</b>
<b>9</b>	<b><i>Tabellenverzeichnis</i></b> .....	<b>74</b>
<b>10</b>	<b><i>Danksagung</i></b> .....	<b>76</b>
<b>11</b>	<b><i>Publikationen</i></b> .....	<b>77</b>
<b>12</b>	<b><i>Lebenslauf</i></b> .....	<b>78</b>

## 1 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Erläuterung</b>
%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AGE	Advanced glycation end products
AK	Antikörper
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	Komplementäre DNA
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CT-wert	Schwellenwertzyklus (Cycle Threshold)
CXL	Crosslinking
DALK	Tiefe anteriore lamelläre Keratoplastik
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetales Kälberserum
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCF	Humane korneale Fibroblasten
HRP	Meerrettichperoxidase
HSP47	Hitzeschockprotein 47
IFN-γ	Interferon-γ
IL-6	Interleukin-6
IL-17	Interleukin-17
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
J	Joule
KC	Keratokonius
KC-HCF	Keratokonius-Humane korneale Fibroblasten
Kol 1	Kollagen 1
Kol 5	Kollagen 5

## Abkürzungsverzeichnis

LOX	Lysyloxidase
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloprotease
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
mW	Milliwatt
NFκB	Nukleärer Faktor-kappa B
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDT	Photodynamische Therapie
pg	Pikogramm
PKP	Perforierende Keratoplastik
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPM	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
SEM	Standardfehler
SIRT1	Sirtuin-1
SOD1	Superoxiddismutase 1
Tab.	Tabelle
TBP	TATA-bindendes Protein
TGF-β1	Transforming Growth Factor- β1
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TNF-β	Tumornekrosefaktor-β
UV-A	Ultraviolettstrahlung-A
UV/Vis-Spektroskopie	ultraviolet and visible-Spektroskopie
WB	Western Blot
μl	Mikroliter

## 2 Zusammenfassung

### 2.1 Zusammenfassung - Deutsch

**Fragestellung:** Das Crosslinking (CXL) stellt eine minimal-invasive Therapiemöglichkeit dar, um die Progression des Keratokonus (KC) zu verlangsamen. Durch den simultanen Einsatz von Riboflavin als Photosensibilisator und einer UV-A-Bestrahlung entsteht oxidativer Stress, wodurch die Kollagenfibrillen im kornealen Stroma quervernetzt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, Expressionsveränderungen bei humanen kornealen Fibroblasten (HCF) und Keratokonus-HCF (KC-HCF) vor und nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung aufzuzeigen. Hierbei wurden Expressionsauswirkungen der inflammatorischen Marker Nukleärer Transkriptionsfaktor kappa B p65 (NFkB), induzierbare NO-Synthase (iNOS) und Interleukin-6 (IL-6) untersucht. Auch die Expression der im kornealen Stroma vorkommenden Kollagene von Typ 1 (Kol 1) und 5 (Kol 5) wurde analysiert. Das Expressionsprofil des antioxidativen Enzyms Superoxiddismutase 1 (SOD1) wurde aufgrund möglicher Veränderungen durch die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung überprüft.

**Methoden:** Keratozyten wurden aus gesunden und KC-Hornhäuten isoliert und in Basalmedium mit 5% fetalem Kälberserum kultiviert, was eine Transformation in Fibroblasten bewirkte. Die gesunden und KC-Zellkulturen wurden mit 0,01% (jeweils n=5) oder 0,1% (jeweils n=3) Riboflavin für 250 s mit UV-A-Licht bestrahlt. Das Expressionsprofil von NFkB, iNOS, IL-6, Kol 1, Kol 5 wurde mittels qPCR und Western Blot untersucht. Die IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand und im Zelllysat wurde mit einem ELISA gemessen. Die SOD1-Genexpressionsanalyse erfolgte mit einer qPCR.

**Ergebnisse:** Die unbehandelten KC-HCF zeigten im Vergleich zu unbehandelten HCF eine erhöhte NFkB- ( $p=0,0002$ ), eine erhöhte iNOS- ( $p=0,0019$ ), sowie eine erniedrigte IL-6- ( $p=0,0057$ ) mRNA-Genexpression. Zudem lag eine erhöhte Kol 1- ( $p=0,0286$ ) und Kol 5- ( $p=0,0054$ ) mRNA-Genexpression in unbehandelten KC-HCF vor.

In der HCF-Gruppe führte eine 0,1%ige-Riboflavin-UV-A-Bestrahlung zum Anstieg der NFkB- ( $p=0,0286$ ) und IL-6- ( $p=0,0057$ ) mRNA-Genexpression. Die IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand wurde bei HCF ( $p=0,0485$ ) und KC-HCF ( $p=0,0485$ ) nach einer 0,1%igen-Riboflavin-UVA-Bestrahlung signifikant erhöht. Eine UV-A-Bestrahlung mit einer Riboflavin-Konzentration von 0,01% ( $p=0,0357$ ) oder 0,1% ( $p=0,0357$ ) führte lediglich bei KC-HCF zu einem signifikanten Anstieg der intrazellulären IL-6-Konzentration. In der HCF-Gruppe ( $p=0,0286$ ) lag eine erhöhte Kol 1-mRNA-Genexpression nach einer 0,1%igen-Riboflavin-UV-A-Bestrahlung vor. Bei KC-HCF ( $p=0,0424$ ) konnte ein signifikanter Anstieg der Kol 1-Proteinexpression nach einer 0,01%igen-Riboflavin-UV-A-Bestrahlung gemessen

## Zusammenfassung

werden. Signifikante Veränderungen der SOD1-mRNA-Genexpression nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung wurden weder in der HCF- noch in der KC-HCF-Gruppe nach 24 h oder 48 h beobachtet. Auch zwischen unbehandelten HCF und KC-HCF lagen keine signifikanten SOD1-mRNA-Genexpressionsunterschiede vor.

### **Schlussfolgerung:**

Die unbehandelten KC-HCF zeigten im Gegensatz zu unbehandelten HCF eine veränderte Expression inflammatorischer Marker, was für eine zugrundeliegende lokale inflammatorische Komponente bei KC sprechen könnte. Eine 0,1%ige-Riboflavin-UV-A-Bestrahlung führte sowohl bei HCF als auch bei KC-HCF zu einem signifikanten Anstieg der IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand. Zusätzlich konnte eine erhöhte intrazelluläre IL-6-Konzentration nach UV-A-Bestrahlung mit beiden Riboflavin-Konzentrationen (0,01% / 0,1%) lediglich bei KC-HCF gemessen werden, was darauf hindeutet, dass KC-HCF im Vergleich zu HCF diesen induzierten Stressreiz nur eingeschränkt kompensieren könnten. Eine erhöhte Kol 1- und Kol 5-Genexpression in KC-HCF ist möglicherweise ein Hinweis auf eine krankheitsbedingte Störung der Kollagensynthese bei KC. Die Kollagen-Quervernetzungen, die durch das Crosslinking entstehen, gehen vermutlich nicht mit einer bedeutenden Kollagen-Expressionsänderung einher. Auch der induzierte oxidative Stress im Rahmen einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung führte zu keinen signifikanten SOD1-Genexpressionsveränderungen. Somit zeigten KC-HCF im Vergleich zu HCF teilweise eine veränderte Reaktion auf die Riboflavin-UV-A-Bestrahlung, was möglicherweise durch vorbestehende pathologische metabolische Funktionen zu erklären ist.

## Zusammenfassung

### 2.2 Zusammenfassung - Englisch

**Purpose:** Crosslinking (CXL) is a minimally invasive treatment option to slow down the progression of keratoconus (KC). The simultaneous use of riboflavin as a photosensitizer and UV-A irradiation generated oxidative stress, resulting in crosslinking of the collagen fibrils in the corneal stroma.

The aim of this work was to identify changes in gene and protein expression in human corneal fibroblasts (HCF) and keratoconus HCF (KC-HCF) before and after riboflavin UV-A irradiation. Expression changes of the inflammatory markers nuclear transcription factor kappa B (NFkB), inducible NO synthase (iNOS), and interleukin-6 (IL-6) were investigated and type 1 (Kol 1), and 5 (Kol 5) collagen expression was determined. In addition, the expression profile of the antioxidative enzyme superoxide dismutase 1 (SOD1) has been examined for possible changes due to the formation of reactive oxygen species after riboflavin UV-A irradiation.

**Methods:** Keratocytes were isolated from healthy and KC corneas and cultivated in basal medium with 5% fetal calf serum, which resulted in their transformation into fibroblasts. The healthy and KC cell cultures were irradiated with 0.01% (n=5) or 0.1% (n=3) riboflavin for 250 s with UV-A light. NFkB, iNOS, IL-6, Kol 1, Kol 5 were investigated by qPCR and Western blot analysis. IL-6 concentration in cell culture supernatant and cell lysate was determined by ELISA, and the SOD1 gene expression analysis was performed by qPCR.

**Results:** Compared to untreated HCF, untreated KC-HCF showed increased NFkB ( $p=0.0002$ ), increased iNOS ( $p=0.0019$ ), and decreased IL-6 ( $p=0.0057$ ) gene expression. In addition, there was an increased Kol 1 ( $p=0.0286$ ) and Kol 5 ( $p=0.0054$ ) mRNA gene expression in untreated KC-HCF. In the HCF group, 0.1% riboflavin UV-A irradiation led to an increase of NFkB ( $p=0.0286$ ) and IL-6 ( $p=0.0057$ ) gene expression. The IL-6 concentration in the cell culture supernatant was significantly increased in HCF ( $p=0.0485$ ) and KC-HCF ( $p=0.0485$ ) after 0.1% riboflavin UVA irradiation. A riboflavin concentration of 0.01% or 0.1% led to a significant increase of intracellular IL-6 concentration after UV-A irradiation only in KC-HCF ( $p=0.0357$ ). In the HCF group ( $p=0.0286$ ), there was an increased Kol 1 gene expression after 0.1% riboflavin UV-A irradiation. A significant increase in Kol 1 protein expression was measured in KC-HCF after 0.01% riboflavin UV-A irradiation ( $p=0.0424$ ). Significant changes in SOD1 gene expression after riboflavin UV-A irradiation were not observed either in the HCF nor in the KC-HCF group after 24 h or 48 h, and there was also no significant difference in SOD1 gene expression between untreated HCF and KC-HCF.

## Zusammenfassung

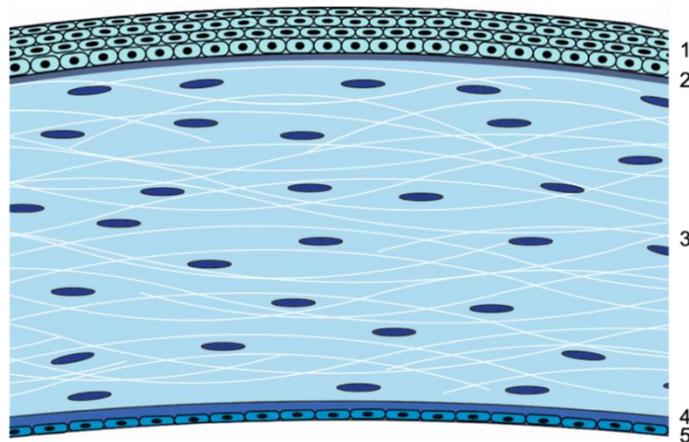
**Conclusion:** In contrast to untreated HCF, untreated KC-HCF showed an altered expression of inflammatory markers, which could indicate an underlying local inflammatory component in keratoconus. A 0.1% riboflavin UV-A irradiation led to a significant increase in IL-6 concentration in the cell culture supernatant in HCF and KC-HCF. In addition, an increased intracellular IL-6 concentration after UV-A irradiation with both riboflavin concentrations (0.01% / 0.1%) could only be measured in KC-HCF, indicating that KC-HCF, compared to HCF, could only compensate this induced stress stimulus to a limited extent. Increased Kol 1 and Kol 5 gene expression in KC-HCF may be an indication of a disease-related alteration of collagen synthesis in KC. The collagen crosslinking resulting from CLX is probably not associated with a substantial change in collagen expression. Also, the induced oxidative stress during riboflavin UV-A irradiation did not lead to significant SOD1 expression changes. Thus, KC-HCF showed a partially altered response to riboflavin UV-A irradiation compared to HCF, which may be explained by pre-existing pathological metabolic functions.

### 3 Einleitung

#### 3.1 Anatomie und Physiologie der Kornea

Die Kornea (Hornhaut) befindet sich im vorderen Augenabschnitt und nimmt eine Vielzahl an funktionalen Rollen ein. Sie ist in die Sklera zirkulär eingelassen und bildet mit ihr die äußere Augenhaut. Von vorne wird die Kornea durch den Tränenfilm und von hinten durch das Vorderkammerwasser begrenzt [40]. Sie zeichnet sich nicht nur durch ihre mechanische Schutzfunktion aus, sondern sie ist als Teil des optischen Apparats maßgeblich am Sehprozess beteiligt. Im gesunden Zustand ist sie transparent und gefäßfrei, sodass Lichtstrahlen ungehindert das Augeninnere erreichen können [53]. Die Nährstoffversorgung erfolgt durch Diffusion über das Vorderkammerwasser, den Tränenfilm sowie durch perikorneale Gefäße. Sie ist durch einen subepithelialen und einen tiefen stromalen Plexus des *Nervus ophthalmicus* innerviert [53].

Die Kornea weist einen vertikalen Durchmesser von 11,5 mm und einen horizontalen Durchmesser von 12,0 mm auf. Sie ist somit eine horizontale elliptische Scheibe mit zusätzlicher sphärischer Wölbung. Im Zentrum beträgt die zur Peripherie hin zunehmende Dicke der Hornhaut durchschnittlich 540  $\mu\text{m}$  [53]. Mit einer Brechkraft von 43 Dioptrien nimmt sie den höchsten Anteil am Gesamtbrechwert des Auges ein. Diese hohe Brechkraft ist Folge der Differenz zwischen den Brechungsindizes der Luft (1,0) und Hornhaut (1,33), sowie der Hornhautwölbung [40]. Histologisch besteht die Kornea aus 5 Schichten (Abb. 1).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des histologischen Aufbaus der Kornea

1: Epithel 2: Bowman-Lamelle 3: Stroma 4: Descemet-Membran 5: Endothel. (Eigene Darstellung)

## Einleitung

Die Hornhautoberfläche wird durch einen Tränenfilm benetzt, der sich aus 3 unterschiedlichen Schichten zusammensetzt. Die innere Muzinschicht wird von konjunktivalen Becherzellen gebildet und verbessert die Anheftung des Tränenfilms auf dem Hornhautepithel. Darauf folgt eine wässrige Schicht, die von der Tränendrüse sezerniert wird und neben der Sauerstoffversorgung der Kornea, der antibakteriellen Aktivität durch das Vorhandensein von Immunglobulin A (IgA), Lysozym und Lactoferrin, auch eine glatte optische Oberfläche der Hornhaut durch den Ausgleich mikroskopischer Unregelmäßigkeiten gewährleistet. Die von den Meibomdrüsen sezernierte äußere Lipidschicht sorgt dafür, dass einer Verdunstung der wässrigen Phase des Tränenfilms entgegengewirkt wird [53].

Die Epithelzellschicht bildet die Oberfläche der Kornea und ist aus einem 50 µm dicken unverhornten Epithel aufgebaut. Das Epithel umfasst fünf bis sechs Zellschichten und besteht aus den Basal-, Flügel- und Schuppenzellen. Die Basalzellschicht ist durch Hemidesmosomen mit der darunterliegenden Basalmembran verankert und verhindert ein Ablösen des Epithels. Es folgen zwei bis drei Schichten Flügelzellen, die durch interzelluläre Verbindungen ebenfalls zur Aufrechterhaltung des Zellverbandes beitragen. Schuppenzellen bilden die obersten Schichten des Epithels und verhindern ein Eindringen von Tränenflüssigkeit und infektiösen Erregern [22]. Außerdem besitzen die äußersten Zellen Mikrofalten sowie Mikrovilli, um durch eine damit einhergehende Oberflächenvergrößerung die Anheftung des Muzins und des restlichen Tränenfilms zu erleichtern. Die obersten Epithelzellen besitzen nur eine Lebenszeit von wenigen Tagen bevor sie von den darunterliegenden Zellen ersetzt werden [53]. Stammzellen in der basalen Schicht des *Limbus corneae* sind für die ständige Erneuerung des Epithels unverzichtbar [97].

Die Bowman-Lamelle, die sich zwischen der Basalmembran des Epithels und dem Stroma befindet, besteht vorwiegend aus Fibrillen des Kollagens von Typ 1, 3 und 5 [68,69]. Im Gegensatz zum Stroma sind die Kollagenfibrillen der Bowman-Lamelle ungeordnet angelegt und weisen zudem einen niedrigeren Durchmesser auf [47]. Durch die fehlende Regenerationsfähigkeit der Bowman-Lamelle führen Verletzungen dieser Schicht zur Ausbildung epithelial-stromaler Verbindungen, die mit einer kornealen Wundheilungsstörung in Form einer Narbenbildung einhergehen können [85].

Das Stroma macht ungefähr 90% der Hornhautdicke aus und besteht überwiegend aus parallel angeordneten Kollagenfibrillen, Extrazellulärmatrix und Keratozyten. Die in der Kornea vorkommenden Kollagene sind hauptsächlich von Typ 1 und 5 [81]. Dabei ist das Kol 5 eng mit Kol 1 verbunden und nimmt an wichtigen regulatorischen Prozessen, wie beispielsweise der Fibrillenbildung oder am Aufbau der extrazellulären Matrix, teil. Im Tierversuch führte ein Kol 5-Gen-Knockout zu einer schweren dysfunktionalen Störung der Fibrillogenese. Infolgedessen waren die Fibrillendurchmesser vergrößert und die Fibrillenstruktur ungeordnet, was mit einer Trübung und einem Funktionsverlust der Kornea

## Einleitung

einherging [109]. Die im Stroma vorkommenden fibroblastenartigen Keratozyten synthetisieren neben Kollagenen auch weitere Komponenten der Extrazellulärmatrix wie beispielsweise Proteoglykane und Glykosaminoglykane [22]. Der einheitliche Durchmesser sowie die regelmäßige Anordnung der Kollagenfibrillen sind für den Erhalt einer transparenten funktionsfähigen Kornea unerlässlich [12]. Hierbei sind nicht nur die Kollagenfibrillen von besonderer Bedeutung, sondern auch die Proteoglykane wie das Lumican, welche regulatorische Funktionen ausüben. Im Tierversuch wurde gezeigt, dass durch eine Abschaltung des Lumican-Gens sowohl die Anordnung als auch der Durchmesser der Kollagenfibrillen beeinflusst wird. Infolgedessen führte die fehlende Lumican-Genexpression zur postnatalen Eintrübung der Kornea [16].

Die Descemet-Membran liegt zwischen dem Stroma und der Endothelzellschicht. Im Gegensatz zum Stroma besteht sie neben den Kollagenen 1 und 5 zusätzlich aus dem Kollagen 8 [111]. Sie wird in eine anteriore, geordnete Zone, die sich *in utero* entwickelt und in eine posteriore, ungeordnete Zone, die von den Endothelzellen gebildet wird, eingeteilt [53]. Im Laufe des Lebens nimmt die hintere Zone der Descemet-Membran an Dicke zu und kann im Alter von 80 Jahren bis zu 10  $\mu\text{m}$  betragen [48].

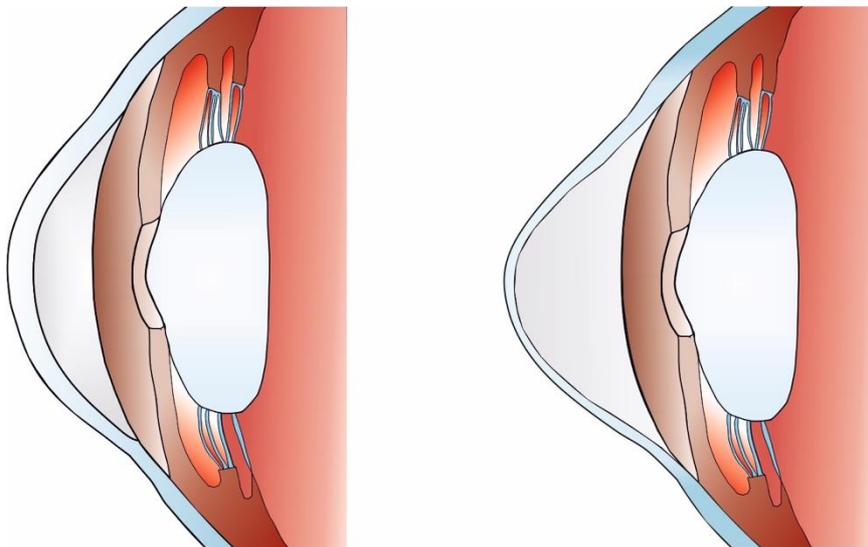
Die Hauptaufgabe der Endothelzellschicht liegt in der Regulation des Hydratationszustandes der Kornea, wodurch die Transparenz gewährleistet wird. Die Endothelzelldichte beträgt im gesunden Zustand 3500 Zellen/ $\text{mm}^2$ . Im Falle einer zu niedrigen Endothelzellzahl besteht die Gefahr einer endothelialen Dekompensation [26].

## Einleitung

### 3.2 Keratokonus

#### 3.2.1 Definition

Der Keratokonus (KC) ist eine bilaterale, progressive Hornhautektasie, zu denen neben der pelluziden marginalen Degeneration auch der Keratoglobus zählt. Die kegelförmige Vorwölbung der Hornhaut (Abb. 2) führt im Laufe der Erkrankung zu einer zunehmenden stromalen Verdünnung, wodurch sich eine ausgeprägte Visusminderung durch eine fortschreitende Myopie und einen irregulären Astigmatismus entwickelt [53]. Zu den am häufigsten verwendeten klinischen Einteilungen des KC zählen die Klassifikationssysteme nach Amsler und Krumeich [52] oder nach Belin [11].



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung einer gesunden und einer Keratokonus-Kornea

Links: gleichmäßig gewölbte Hornhaut Rechts: Hornhaut bei KC mit der charakteristischen Vorwölbung und Verdünnung. (Eigene Darstellung)

Die lokalisierte stromale Verdünnung findet sich vorwiegend zentral oder parazentral, dann meist im inferioren oder inferotemporalen Bereich der Hornhaut. Der Krankheitsverlauf ist variabel und kann mit moderaten bis stark ausgeprägten Seheinschränkungen einhergehen [89].

Der akute KC gilt als ophthalmologischer Notfall und führt durch ein Einreißen der Endothelzellschicht und der Descemet-Membran zum Aufquellen der Hornhaut mit Kammerwasser, in dessen Folge sich ein stromales Ödem mit begleitender kornealer Trübung entwickelt [21].

Sofern dauerhafte Visuseinschränkungen bestehen, ist eine Hornhauttransplantation als letzte Therapiemöglichkeit, häufig in Form einer perforierenden Keratoplastik, indiziert. Sie wurde erstmals 1905 durchgeführt und ist nicht nur die älteste, sondern auch die

## Einleitung

erfolgreichste und am häufigsten durchgeführte Gewebstransplantation beim Menschen [71,101].

### 3.2.2 Epidemiologie

In der Literatur wird sich auf eine allgemeine jährliche Inzidenzrate von 2/100 000 und eine Prävalenzrate von 54,5/100 000 berufen [59]. Diese Daten basieren auf einer US-amerikanischen Langzeitstudie von 1935-1982 und könnten aufgrund diagnostischer Fortschritte nicht mehr aktuell sein. Diese Aussage stützt sich unter anderem auf den Ergebnissen von Godefrooij et al., die in ihrer Studie darauf schließen, dass Inzidenz und Prävalenz weitaus höher als bislang angenommen sein könnten. Sie berichteten von einer jährlichen Inzidenz von 13,3/100 000 und einer Prävalenz von 265/100 000 [36].

Obwohl der KC grundsätzlich beide Geschlechter betrifft, bestehen in der Literatur Uneinigkeiten bezüglich der Geschlechterverteilung. Aus Ergebnissen mehrerer Studien lässt sich schließen, dass der KC entweder beide Geschlechter gleichermaßen [45,89] oder das männliche Geschlecht bevorzugt (60%) betreffen kann [36].

Zusätzlich bestehen Inzidenzunterschiede abhängig von geographischer und ethnischer Zugehörigkeit. Im Gegensatz zur europäischen zeigt die asiatische Bevölkerung eine höhere Inzidenz [34,87]. Die Erkrankung beginnt häufig während der Pubertät und zeigt in den meisten Fällen eine Progression bis in die vierte Lebensdekade [36].

### 3.2.3 Symptome

Aufgrund seiner degenerativen Natur schreitet der KC nur sehr langsam fort und daher wird eine operative Therapie in der Regel erst nach einer längeren Krankheitsdauer notwendig. Die Symptomatik kann initial auch eher unspezifisch sein und es bedarf einer zielgerichteten Diagnostik um den KC als solchen in einem Frühstadium zu erkennen. Der Keratokonus ist eine bilaterale Erkrankung, sodass eine Diagnose bei zunächst einseitiger Ausprägung erschwert sein kann [88]. Neben einem irregulären myopen Astigmatismus und einer fortschreitenden Visusminderung können monokulare Doppelbilder auftreten [40].

Bei Krankheitsprogression kann ein Einreißen des Endothels und der Descemet-Membran das Auftreten eines akuten KC begünstigen. Dieser ophthalmologische Notfall führt zu Schmerzen, plötzlichem Visusverlust, Photophobie, Epiphora und einem roten Auge [40].

### 3.2.4 Ätiologie

Die Ätiologie des KC ist bislang nicht geklärt, jedoch wird von einem komplexen multifaktoriellen Geschehen ausgegangen. Der KC tritt in den meisten Fällen als isolierte Erkrankung, ohne den Hinweis auf eine zugrundeliegende Begleiterkrankung, auf. Mögliche Einflussfaktoren sind weitreichend und umfassen neben genetischen Prädispositionen,

## Einleitung

Assoziationen mit Systemerkrankungen auch biochemische, biomechanische, mikrostrukturelle Veränderungen sowie Umweltfaktoren, die letztendlich zur Krankheitsentwicklung beitragen können [89].

Genetische Einflüsse scheinen von zentraler Bedeutung zu sein. Eine Assoziation des Down-Syndroms mit dem KC ist beschrieben [17]. Die Autoren einer weiteren Studie vermuten, dass die höhere Prävalenz unter anderem auf die mechanische Einwirkung bei chronischem Augenreiben zurückzuführen sein könnte. Zusätzlich wurde bei Patienten mit Down-Syndrom eine erniedrigte zentrale Hornhautdicke festgestellt, welche unabhängig vom Augenreiben für die Entwicklung eines KC prädisponieren könnte [5]. Eine genetische Studie konnte einen Zusammenhang zwischen Einzelnukleotidpolymorphismen im Kollagen 5A1-Gen und der zentralen kornealen Dicke bei KC-Patienten nachweisen [65]. Das Enzym Lysyloxidase (LOX), welches für die Ausbildung der natürlichen Quervernetzungen der Kollagene verantwortlich ist, zeigte bei KC-Patienten ebenfalls Einzelnukleotidpolymorphismen, die prädisponierend für die Erkrankung sein könnten [15]. Zusammenhänge mit Systemerkrankungen wie Schilddrüsenerkrankungen werden gegenwärtig diskutiert. Verglichen mit der Gesamtpopulation bestand bei KC-Patienten eine höhere Prävalenz an einer Hypothyreose zu leiden [3]. Daneben konnte eine erhöhte Thyroxin-Konzentration in der Tränenflüssigkeit gemessen werden und auch die kultivierten KC-Fibroblasten wiesen eine erhöhte Thyroxinrezeptor-Expression auf [112].

Assoziationen mit atopischen Erkrankungen wurden ebenfalls beschrieben. Das damit verbundene chronische Augenreiben könnte sich förderlich auf die Entwicklung eines KC auswirken [9]. Ein zunächst unilateraler KC entwickelte sich in den meisten Fällen auch auf der Seite der dominanten Hand und lässt eine mögliche mechanische Einflussnahme in der Pathogenese vermuten [42].

Ebenso finden sich mikrostrukturelle Veränderungen der Hornhautarchitektur, die die mechanische Stabilität beeinträchtigen und somit die Vorwölbung und Verdünnung der Kornea fördern. Es wurde gezeigt, dass die im Stroma in Lamellen organisierten Kollagenfibrillen bei KC eine abnormale Anordnung aufweisen [74]. Zusätzlich nimmt bei KC die Lamellen-Dichte im anterioren und posterioren Stroma zu, was durch eine Auftrennung bereits existierender Lamellen erklärt wird [70].

Der KC wird in der Literatur häufig als nicht-inflammatorische Erkrankung klassifiziert, jedoch bestehen Hinweise einer entzündlichen Komponente. Beispielsweise ließ sich in der Tränenflüssigkeit von KC-Patienten eine Erniedrigung von Immunglobulin A und Lactoferrin messen. Beide Proteine sind aufgrund ihrer antiinflammatorischen und antimikrobiellen Eigenschaft für die Aufrechterhaltung der Homöostase des Auges von Nutzen [6]. Eine signifikante Konzentrationserhöhung von Interleukin-6 (IL-6), Matrix-Metalloprotease-9 (MMP-9) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) konnte in der Tränenflüssigkeit von KC-

## Einleitung

Patienten ebenfalls nachgewiesen werden. Dabei war die Erhöhung der genannten Proteine vom Schweregrad des KC abhängig [64]. Matrix-Metalloproteasen (MMP) sind Enzyme, die für den Abbau von Proteinen der extrazellulären Matrix verantwortlich sind und als Antwort auf Zytokine, wie beispielsweise Interleukine (IL), oder Wachstumsfaktoren ausgeschüttet werden [35]. In einer Studie von Balasubramanian et al. wurde eine signifikante Erhöhung von MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-13, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  und TNF- $\beta$  in der Tränenflüssigkeit von KC-Patienten beschrieben [7]. Damit in Einklang steht eine Erhöhung von Kol 1-Abbauprodukten in der Tränenflüssigkeit von KC-Patienten [1]. Beide Studien lassen darauf schließen, dass eine erhöhte proteolytische Aktivität bei KC maßgeblich am Kollagenabbau und mit der damit verbundenen stromalen Verdünnung in Verbindung stehen könnte. Die Zytokin-Blutserumspiegel bei KC-Patienten zeigten im Gegensatz zur gesunden Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede [50].

Ebenfalls wird eine Assoziation zwischen der Anwendung formstabiler Kontaktlinsen und der Entwicklung eines KC diskutiert. Vor der bestätigten Diagnose eines KC verwendeten 26% aller Patienten formstabile Kontaktlinsen [33]. Es konnte gezeigt werden, dass das Tragen von Kontaktlinsen eine erhöhte IL-6-Konzentration in der Tränenflüssigkeit verursachte, was auf eine herbeigeführte lokale inflammatorische Reaktion schließen lässt [98].

Innerhalb der Kornea werden ungefähr 80% des UV-B-Lichtes absorbiert, was dazu führt, dass sie gegenüber oxidativen Schäden durch entstehende reaktive Sauerstoffspezies (ROS) besonders anfällig ist. Es wird vermutet, dass die erkrankte Kornea über unzureichende Schutzmechanismen verfügt [13]. *In-vitro* wurde gezeigt, dass KC-Keratozyten im Vergleich zu gesunden Keratozyten vermehrt oxidativem Stress ausgesetzt sind [57]. Die immunhistochemisch festgestellte Aktivität der extrazellulären Form des antioxidativen Enzyms Superoxiddismutase 1 (SOD1) ist in KC-Hornhäuten verringert. Die Autoren nehmen an, dass dies auf eine reduzierte Synthese zurückzuführen sein könnte [10].

### 3.2.5 Diagnose

Die ersten Hinweise auf das Vorliegen eines KC ergeben sich durch häufige Refraktionsänderungen in Folge einer fortschreitenden Myopisierung und Veränderungen des Zylinderwertes oder der -achse. Eine langsam einseitige Sehverschlechterung oder eine Sehschärfe, die trotz Brillenanpassung unzureichend ist, deuten ebenfalls auf die Erkrankung hin [14].

Zusätzlich können die spaltlampenmikroskopischen Untersuchungsergebnisse herangezogen werden. Hierbei sind neben der zentralen oder parazentralen stromalen Verdünnung auch feine prädescemetale Linien (Vogtsche-Linien) charakteristisch [40]. Gelegentlich ist ein Fleischer-Ring zu erkennen, der durch Hämosiderinablagerungen im

## Einleitung

Bereich der Konusbasis einen bräunlich-grün erscheinenden Ring hinterlässt. Ein weiteres typisches Merkmal ist das Munson-Zeichen mit der typischen V-förmigen Ausbuchtung des Unterlides beim Blick nach unten, das für einen fortgeschrittenen KC spricht [92].

Die Hornhauttopografie ist für die Diagnose einer Keratektasie zielführend [99] und gilt als Goldstandard in der KC-Diagnostik [37]. Daneben bestehen mit der Hornhauttomographie, der Aberrometrie, sowie der Messung der Biomechanik weitere diagnostische Möglichkeiten. In der Strichskioskopie kann ein Scherenreflex auf das Vorliegen eines Astigmatismus hindeuten. Diese Untersuchungsmöglichkeit bietet sich an, falls eine Diagnose mit den sonst verlässlichen Untersuchungsmethoden nicht möglich ist [38].

### 3.2.6 Behandlungsmöglichkeiten

Die zur Verfügung stehenden nicht-operativen und operativen Therapiemöglichkeiten sind von der Progression des KC abhängig. In den frühen Stadien lassen sich Refraktionsfehler mithilfe einer Brille oder weichen Kontaktlinsen korrigieren. Bei progressivem Befund ist mit den genannten Therapiemöglichkeiten häufig kein zufriedenstellender Visus zu erreichen, da sich die weichen Kontaktlinsen dem Konus nicht mehr anpassen und eine Brille den hohen Astigmatismus nicht korrigieren kann, weshalb formstabile Kontaktlinsen verwendet werden müssen [23]. Sowohl die Kontaktlinsen- als auch die Brillenanwendung kann ein Fortschreiten der Erkrankung nicht verhindern.

Zu den minimal-invasiven operativen Therapieoptionen zählen das Crosslinking [116] und intrakorneale Ringsegmente [20], die entweder isoliert oder kombiniert durchgeführt werden können. Zuletzt besteht die Möglichkeit einer lamellären oder perforierenden Keratoplastik. Die perforierende Keratoplastik (PKP) ist unter den chirurgischen Behandlungen der Goldstandard, aber auch lamelläre Techniken wie beispielsweise die tiefe anteriore lamelläre Keratoplastik (Deep anterior lamellar keratoplasty, DALK) können alternativ zur PKP erfolgen. Technisch ist die DALK anspruchsvoller, weist aber ein geringeres Abstoßungsrisiko als eine PKP auf [100].

## Einleitung

### 3.3 Korneales Crosslinking

#### 3.3.1 Definition und Hintergrund

Das Enzym Lysyloxidase ist an der physiologischen Quervernetzung der Kollagenmoleküle beteiligt, wodurch die natürliche Struktur, Festigkeit und die gewebsspezifische Elastizität des Kollagens beibehalten wird, um die Aufrechterhaltung der biomechanischen Stabilität der Kornea zu gewährleisten [43]. Eine nicht-enzymatische Quervernetzung wird beispielsweise im Rahmen der endogenen Glykation im hyperglykämischen Zustand bei Diabetes mellitus unter Mitbeteiligung von advanced glycation end products (AGE) vermittelt. Diese Art der Quervernetzung betrifft vorwiegend langlebige Proteine wie Kollagene oder Glykoproteine und führt durch die Ausbildung von inter- und intramolekularen Kollagenvernetzungen zur erhöhten Festigkeit der Extrazellulärmatrix [73].

Der Einsatz des Crosslinkings (CXL) zur Behandlung von Keratektasien am Auge wurde erstmals 1998 von Spoerl et al. beschrieben [105]. Als photodynamische Therapie (PDT) zielt das CXL darauf ab, die Steifigkeit der Hornhaut durch die Ausbildung weiterer Quervernetzungen zu erhöhen. Die mechanische Stabilität der Kornea wird primär durch die Anordnung der Kollagenmoleküle bestimmt. Demnach soll der simultane Einsatz von Riboflavin (Vitamin B2) als Photosensibilisator und UV-A-Licht der Wellenlänge 370 nm durch eine photochemische Reaktion weitere Querverbindungen zwischen den Kollagenfibrillen ausbilden und folglich zu einer Stabilisierung des momentanen Zustandes führen [105]. Das Riboflavin wird durch die absorbierte Energie der UV-A-Strahlung angeregt (Singulett-Riboflavin) und weitergehend in einen Triplettzustand überführt. Zudem können Typ I- und Typ II-Reaktionen unterschieden werden. Für die Reaktion von Typ II ist Sauerstoff nötig, um schließlich Singulett-Sauerstoff, ein Sauerstoffradikal, zu bilden, welches mit der Carbonylgruppe des Kollagens reagiert. Sobald der benötigte Sauerstoff erschöpft ist, findet primär die Typ I-Reaktion statt [90]. In dieser Reaktion kann das angeregte Riboflavin im Triplettzustand Wasserstoffatome oder Elektronen auf Biomoleküle wie Lipide, Proteine oder Nukleinsäuren übertragen oder in Verbindung mit O<sub>2</sub> reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Hyperoxid-Anionen (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>), Hydroxylradikale (OH<sup>·</sup>) oder Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) erzeugen [49]. Das Riboflavin dient hierbei nicht nur als Photosensibilisator zur Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies, sondern absorbiert auch einen Hauptteil des UV-Lichtes, sodass das Endothel und die darunterliegenden Strukturen (Linse, Netzhaut) nicht beeinträchtigt werden [62].

Im Jahr 2003 publizierten Wollensak et al. die ersten klinischen Ergebnisse des CXL mit der Schlussfolgerung, dass die Progression des KC verlangsamt werden könnte [116]. Zu den strukturellen Veränderungen nach CXL zählen eine Abnahme des Kollagenfaserdurchmessers [119] und eine erhöhte Resistenz gegenüber enzymatischer

## Einleitung

Verdauung [106]. Zusätzlich treten Brüche in der Bowman-Lamelle sowie eine verstärkte Keratozyten-Apoptose im oberen Hornhautstroma auf [76].

### 3.3.2 Klinische Durchführung

Riboflavin besitzt ein relativ hohes Molekulargewicht (376 g/mol), sodass ein intaktes Epithel eine Diffusionsbarriere darstellt. Um die Diffusion zu erleichtern, wird im Vorfeld der Riboflavin-Applikation das Epithel mechanisch entfernt, damit das Riboflavin innerhalb von 30 min in das Hornhautstroma diffundieren kann. Bei dünnen Hornhäuten mit einer Stromadicke kleiner als 400 µm wird die Applikation einer hypoosmolaren Riboflavin-Lösung empfohlen, um die Hornhaut aufzuquellen [44].

Die ambulant durchgeführte Operation wird in der Regel in Tropfanästhesie durchgeführt. Nach mechanischem Entfernen des Epithels wird das Riboflavin in regelmäßigen Abständen für eine Dauer von 30 min auf die Hornhaut getropft, um auch das tieferliegende Stroma zu erreichen und eine optimale Sättigung zu gewährleisten. Es folgt die Bestrahlung der Hornhaut mit UV-A-Licht der Wellenlänge 370 nm und einer Bestrahlungsintensität von 3 mW/cm<sup>2</sup>. Parallel dazu wird im Abstand von 5 min erneut Riboflavin getropft, um die notwendige Sättigung aufrecht zu erhalten und ein Austrocknen der Hornhautoberfläche zu verhindern. Die Operation endet mit der Applikation antibiotischer Augentropfen, dem Einsetzen einer therapeutischen Kontaktlinse und einem Augenverband [44].

Bezüglich der Anwendung existieren zahlreiche verschiedene Protokolle, wobei das Dresden-Protokoll am häufigsten genutzt wird [116]. In klinischen Studien wurden CXL-bedingte Schäden der Endothelzellschicht bei Hornhäuten unter 400 µm Dicke festgestellt [117,118]. Daher ist es von besonderer Bedeutung die Endothelzellschicht vor der apoptotischen Wirkung des CXL und einer damit verbundenen endothelialen Dekompensation zu schützen. Zur Vermeidung von Endothelzellschäden sollte das Riboflavin nicht bis in die tiefen stromalen Bereiche diffundieren. Um mögliche Komplikationen im Bereich des Epithels zu reduzieren, besteht die Möglichkeit das Epithel zu erhalten und das Riboflavin direkt auf das Auge zu tropfen. Diese Methode wird gegenwärtig aufgrund fehlender Evidenz selten durchgeführt [90].

### 3.3.3 Postoperative Beschwerden, Komplikationen und Kontraindikationen

Zu den häufigsten Beschwerden nach dem CXL zählen postoperative Schmerzen. Als direkte Folge der operativ abgetragenen Epithelschicht oder durch eine persistierende epitheliale Wundheilungsstörung wird die Entwicklung einer infektiösen Keratitis begünstigt. Auch die Entwicklung eines temporären Hornhautödems sowie Schäden an der Endothelzellschicht wurden beschrieben [27].

## Einleitung

Zu den absoluten Kontraindikationen zählen eine frühere Herpesinfektion, floride Infektionen des Auges, eine korneale Narbe oder eine bekannte epitheliale Wundheilungsstörung. Eine relative Kontraindikation stellt eine gemessene Hornhautdicke unter 400 µm dar [32].

### 3.4 Fragestellung und Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit verfolgte zum einen das Ziel, Gen- und Proteinexpressionsunterschiede zwischen den unbehandelten HCF und KC-HCF darzustellen. Obwohl der KC in der Literatur als nicht-inflammatorische Erkrankung eingeteilt wird, konnte gezeigt werden, dass KC-HCF eine erhöhte NFκB-mRNA- und Proteinexpression sowie eine erhöhte iNOS-mRNA-Genexpression aufweisen [108]. Sowohl NFκB als auch iNOS sind an entzündlichen Prozessen beteiligt, weshalb die Klassifizierung als nicht-inflammatorische Erkrankung überdacht werden sollte. Neben NFκB und iNOS wurde deshalb zusätzlich IL-6 als weiterer inflammatorischer Marker hinzugezogen.

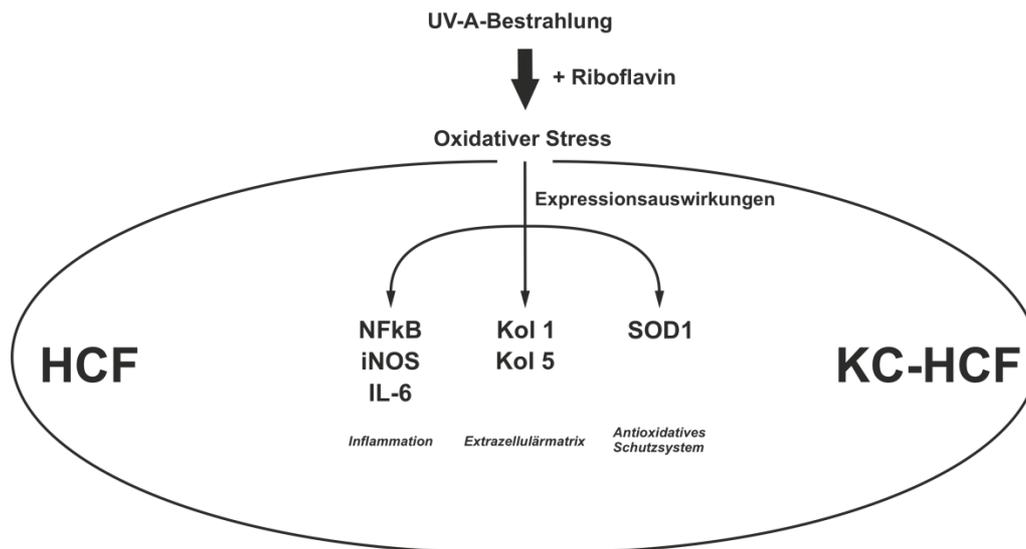
Die Expression von Kol 1 und 5 wurde gemessen, um mögliche Unterschiede auf Gen- und Proteinebene aufzuzeigen, die von pathogenetischer Bedeutung sein könnten. Die SOD1 wurde als beschriebenes Kandidatengen bei KC ebenfalls betrachtet [114].

Des Weiteren wurden transkriptionelle und translationelle Veränderungen nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung untersucht, um die zellulären Auswirkungen eines CXL darzulegen. Ein Schwerpunkt lag auf der Untersuchung einer inflammatorischen Reaktion durch eine vermehrte Bildung freier Sauerstoffspezies. Im Hinblick auf eine dadurch entstehende Entzündungsreaktion konnte eine erhöhte Apoptoserate nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung bei KC-HCF in einer früheren Studie beschrieben werden [104], weshalb Veränderungen der inflammatorischen Marker (NFκB, iNOS, IL-6) untersucht wurden.

Die Hauptwirkung des CXL liegt in der Ausbildung weiterer Quervernetzungen zwischen den Kollagenmolekülen. Es wurde überprüft, ob eine Riboflavin-UV-A-Bestrahlung einen Einfluss auf die Kollagenexpression (Kol 1 / Kol 5) vermittelt und die KC-Progression dadurch beeinflusst werden könnte. Als Antwort auf den erhöhten oxidativen Stress überprüfte man mögliche Expressionsveränderungen des antioxidativen Enzyms SOD1. Auch die Beeinflussung einer alleinigen UV-A-Bestrahlung wurde betrachtet, um zu zeigen, dass hauptsächlich das photoaktivierte Riboflavin an potentiellen Expressionsveränderungen beteiligt ist.

Demzufolge lag das Augenmerk auf der Untersuchung zugrundeliegender Expressionsunterschiede zwischen unbehandelten HCF und KC-HCF sowie der Messung von Expressionsveränderungen nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung.

## Einleitung



**Abbildung 3:** Hypothetische Expressionsauswirkungen

Dargestellt sind potentielle Expressionsauswirkungen auf HCF und KCF-HCF nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung. Die Expression der inflammatorischen Marker (NFkB, iNOS, IL-6) und der Kollagene (Kol 1, Kol 5) als Hauptbestandteile des kornealen Stromas wurden untersucht. Es wurde ebenfalls überprüft, ob die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies im Rahmen einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung zu einer veränderten Expression von SOD1 führen könnte. (Eigene Darstellung)

## 4 Materialien und Methoden

### 4.1 Genehmigung der Ethikkommission

Die Arbeit wurde im Vorfeld durch die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes (Ethikvotum-Nr. 41/18) genehmigt. Zudem haben alle Teilnehmer mit bestätigter Diagnose eines KC vor der Keratoplastik der Teilnahme an der Studie zugestimmt. Gesunde Hornhäute, die für eine Hornhauttransplantation nicht geeignet waren, wurden von der LIONS Hornhautbank Saar-Lor-Lux, Trier/Westpfalz bereitgestellt.

### 4.2 Materialien

**Tabelle 1:** Verwendete Kits und Hersteller

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller (Firma, Stadt, Land)</b>
Human IL-6 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA
OneTaq <sup>®</sup> RT-PCR Kit	New England BioLabs, Frankfurt a. M., Deutschland
Pierce <sup>™</sup> BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
RNAse-free DNase I Kit	Norgen Biotek Corp., Thorold, Kanada
Total RNA Purification Plus Micro Kit	Norgen Biotek Corp., Thorold, Kanada

**Tabelle 2:** Verwendete Lösungen, Medien, Puffer und Hersteller

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller (Firma, Stadt, Land)</b>
AceQ SYBR qPCR Master Mix	Vazyme Biotech, Nanjing, China
anti-mouse- / anti-rabbit-Blockinglösung WesternFroxx	neoFroxx GmbH, Einhausen, Deutschland
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol, absolut	Fisher Chemical, Waltham, Massachusetts, USA
Fetales Kälberserum	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Gibco DMEM/F12 - Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Kollagenase A	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Nuklease freies Wasser	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NuPAGE <sup>™</sup> MOPS SDS Running Buffer (20X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Precision Plus Protein <sup>™</sup> Dual Color Standards	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Riboflavin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RIPA Lysis and Extraction Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Western Lightning <sup>®</sup> Plus-ECL	PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, USA
WesternFroxx Stripping-Puffer	neoFroxx GmbH, Einhausen, Deutschland
WesternFroxx Waschlösung, 10X	neoFroxx GmbH, Einhausen, Deutschland

## Materialien und Methoden

**Tabelle 3:** Verwendete Verbrauchsmaterialien und Hersteller

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller (Firma, Stadt, Land)</b>
CELLSTAR R Polypropylen Röhrrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Filterpipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Alpha Laboratories, Eastleigh, UK
MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
NuPAGE™ Bis-Tris Gel	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
PCR Röhrrchen 0,2 ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
PyroMark Q96 Plate	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Trans-Blot R Turbo™ Mini Nitrocellulose Transfer Pack	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Zellkulturflaschen T-75 für adhärenente Zellen	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

**Tabelle 4:** Verwendete Geräte und Hersteller

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller (Firma, Stadt, Land)</b>
Biometra TB2 Thermoblock	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
Heraeus™ Megafuge 16 Universalzentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Heraeus™ Pico 17 Mikrozentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
ImageQuant LAS 400	GE Healthcare, Chicago, USA
Inkubator HERAcell 240i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Lichtmikroskop Primovert	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikrovolumen-Spektralphotometer ScanDrop	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
PIPETBOY acu 2	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Präzisionswaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
QuantStudio 5 Real-Time-PCR-System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Sterilwerkbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Tecan Infinite F50 Absorbance Microplate Reader	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Thermozykler Primus 25	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
UV-A-Bestrahlungsbox (Inventarnummer: 1201201616)	Technische Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern, Deutschland
Vertikale Elektrophoresekammer Biometra ECO-Mini	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
Zeiss AxioCam ERc 5s	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

## Materialien und Methoden

**Tabelle 5:** Verwendete qPCR-Primer und Hersteller

<b>Primer</b>	<b>Primersequenz oder QIAGEN-Artikelnummer</b>	<b>Hersteller (Firma, Stadt, Land)</b>
Induzierbare NO-Synthase	CTGGCAAGCCCAAGGTCTAT GGAGGCTCCGATCAATCCAG	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland
Interleukin-6	QT00083720	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Kollagen 1A1	QT00037793	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Kollagen 5A1	QT00044527	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Nukleärer Faktor kappa B p65	QT02324308	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Superoxiddismutase 1	QT01008651	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Tata-bindendes Protein Protein	QT249900	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande

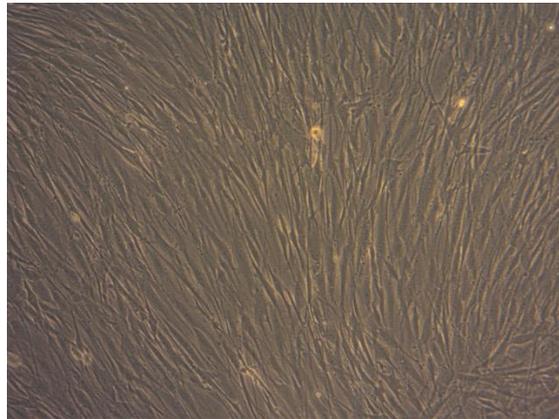
**Tabelle 6:** Verwendete Western Blot-Antikörper und Hersteller

<b>Antikörper</b>	<b>Artikelnummer</b>	<b>Hersteller (Firma, Stadt, Land)</b>
Calnexin	ADI-SPA-865	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
Induzierbare NO-Synthase	ab3523	Abcam, Cambridge, UK
Kollagen 1A1	84336	Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA
Kollagen 5A1	ab7046	Abcam, Cambridge, UK
Nukleärer Faktor kappa B p65	8242	Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA

### 4.3 Versuchsaufbau und Durchführung

Die aus humanen Hornhäuten isolierten Keratozyten differenzierten sich im Laufe der Kultivierung durch den Einfluss von fetalem Kälberserum (FCS) in korneale Fibroblasten. Bei Erreichen einer Konfluenz wurde der Einfluss einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung auf die Gen- und Proteinexpression kornealer Fibroblasten für zwei Riboflavin-Konzentrationen untersucht. Für die Versuchsreihe mit einer 0,01%igen-Riboflavin-Konzentration wurden für die Kontroll- und Interventionsgruppe jeweils Zellen von 5 gesunden- und 5 KC-Hornhäuten verwendet. Versuche mit einer Riboflavin-Konzentration von 0,1% erfolgten an Zellen von jeweils 3 gesunden- und 3 KC-Hornhäuten. Die im folgenden Text als Nährmedium bezeichnete Lösung stellt sich aus den Komponenten Basismedium (DMEM/F12), 5% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) zusammen.

Sämtliche Versuche wurden an konfluenten Zellkulturen durchgeführt (Abb. 4).



**Abbildung 4:** Kultivierte humane korneale Fibroblasten

Die Versuchsreihen mit beiden Riboflavin-Konzentrationen (0,01% + 0,1%) wurden wie folgt eingeteilt (Tab. 7):

**Tabelle 7:** Einteilung der Versuchsgruppen mit der entsprechenden Intervention

<b>Versuchsgruppe</b>	<b>Intervention</b>
Unbehandelte Kontrolle (n=8)	Inkubation mit Nährmedium in der Dunkelkammer für 250 s
0,01%-Riboflavin-UV-A-Bestrahlung (n=5)	Inkubation mit 0,01%-Riboflavin und UV-A-Bestrahlung für 250 s
0,1%-Riboflavin-UV-A-Bestrahlung (n=3)	Inkubation mit 0,1%-Riboflavin und UV-A-Bestrahlung für 250 s

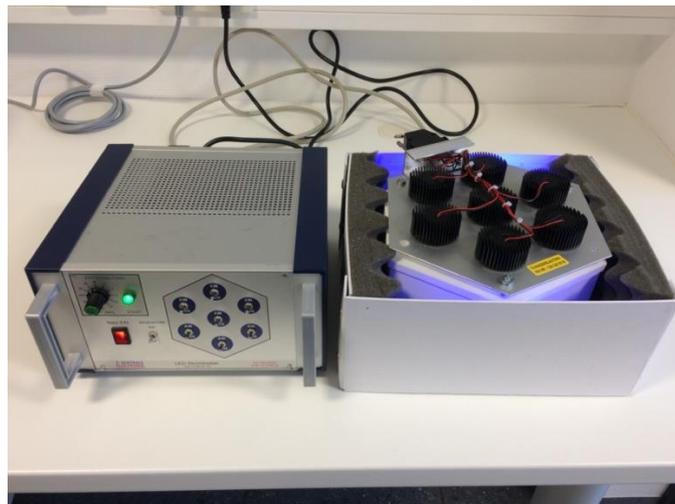
## Materialien und Methoden

Zusätzlich bestand eine weitere Untergruppe, die nur die alleinige UV-A-Bestrahlung berücksichtigte (Tab. 8):

**Tabelle 8:** Gruppe der alleinigen UV-A-Bestrahlung

Versuchsgruppe	Intervention
UV-A-Bestrahlung (n=5)	Inkubation mit Nährmedium und UV-A-Bestrahlung für 250 s

Die Zellkulturen befanden sich entweder in einer Dunkelkammer oder in einer Bestrahlungsbox für jeweils 250 s. In der Bestrahlungsbox wurden die Zellkulturen mit UV-A-Licht der Wellenlänge 375 nm ( $2 \text{ J/cm}^2$ ) für den festgelegten Zeitraum bestrahlt (Abb. 5). Die benötigte Zeitdauer der Bestrahlung wurde anhand des Dresden-Crosslinking-Protokolls im Vorfeld berechnet. Während der Versuche waren die Zellkulturen entweder einer 0,01%igen-Riboflavin-Nährmedium-Lösung, einer 0,1%igen-Riboflavin-Nährmedium-Lösung oder einer Nährmedium-Lösung ausgesetzt.



**Abbildung 5:** Versuchsaufbau

Mithilfe des LED-Stromtreibers (links) wurde die UV-A-Bestrahlung gestartet. In der Bestrahlungsbox (rechts) wurden die kornealen Fibroblasten für jeweils 250 s bestrahlt.

Zur Genexpressionsuntersuchung wurden die Zellen entweder 4 h, 24 h oder 48 h nach den Versuchen geerntet. Dabei wurde der geeignete Zeitpunkt der Genexpressionsmessung anhand von Vorversuchen ermittelt. Es erfolgte eine RNA-Isolierung, eine Umschreibung in eine cDNA und schließlich die Genexpressionsmessung mithilfe einer quantitativen PCR. Die Zellen für die Proteinanalyse (jeweils n=3) wurden 48 h nach dem Riboflavin-UV-A-Bestrahlungs-Versuch geerntet.

## Materialien und Methoden

Die Genexpression wurde für folgende Gene mit jeweils beiden Riboflavin-Konzentrationen (0,01% oder 0,1%) untersucht (Tab. 9):

**Tabelle 9:** Untersuchte Gene mit den jeweiligen Zeitpunkten der Expressionsmessung

<b>Gen</b>	<b>Zeitpunkt der Genexpressionsmessung</b>
Induzierbare NO-Synthase (iNOS)	48 h
Interleukin-6 (IL-6)	24 h + 48 h
Kollagen 1A1 (Kol 1)	24 h
Kollagen 5A1 (Kol 5)	24 h
Nukleärer Faktor kappa B p65 (NFkB)	4 h + 24 h
Superoxiddismutase 1 (SOD1)	24 h + 48 h
Tata-bindendes Protein (TBP)	4 h + 24 h + 48 h

Die Proteinanalyse erfolgte ebenfalls mit beiden Riboflavin-Konzentrationen für folgende Proteine (Tab. 10):

**Tabelle 10:** Untersuchte Proteine mit den jeweiligen Zeitpunkten der Expressionsmessung

<b>Protein</b>	<b>Zeitpunkt der Proteinexpressionsmessung</b>
Calnexin (Referenzprotein)	48 h
Induzierbare NO-Synthase (iNOS)	48 h
Interleukin-6 (IL-6)	48 h
Kollagen 1A1 (Kol 1)	48 h
Kollagen 5A1 (Kol 5)	48 h
Nukleärer Faktor kappa B p65 (NFkB)	48 h

Die Expressionsanalyse der oben genannten Proteine (Tab. 10) geschah mit Ausnahme des IL-6 mithilfe eines Western Blots.

Die Messung der IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand erfolgte für beide Riboflavin-Konzentrationen (0,01% / 0,1%) nach 24 h und 48 h. Die IL-6-Konzentration im Zelllysat wurde für beide Riboflavin-Konzentrationen nach 48 h bestimmt. Sowohl die Messung im Zellkulturüberstand als auch im Zelllysat geschah mithilfe eines Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA).

## 4.4 Methoden

### 4.4.1 Isolierung der primären humanen Keratozyten

Die gesunden humanen Hornhäute wurden von der LIONS Hornhaut Bank Saar-Lor-Lux, Trier/Westpfalz bereitgestellt. Die KC-Hornhäute stammten von elektiven perforierenden Keratoplastiken. Aufgrund einer möglichen Kontaminationsgefahr erfolgten alle Zellkulturarbeiten unter sterilen Bedingungen. Für die Isolierung der Keratozyten wurden die Korneoskleralscheiben mit einem Skalpell in Stücke geschnitten und anliegende sklerale Anteile entfernt. Die zerkleinerte Hornhaut wurde in einem Mikroreaktionsgefäß zusammen

## Materialien und Methoden

mit 200 µl Kollagenase A (1,0 mg/ml) und 200 µl Nährmedium für 24 h im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurde das verdaute Gewebe für 1 min mit 10.000 RPM zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgte die Resuspension des erhaltenen Zellpellets mit 500 µl Nährmedium und dessen Überführung in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit 13 ml Nährmedium (DMEM/F12 + 5% FCS + 1% P/S). In regelmäßigen Abständen von ungefähr drei bis vier Tagen wurde das Nährmedium gewechselt. Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C mit 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Bei vollständiger Konfluenz wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA geerntet und in mehrere 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen passagiert, sodass man die entsprechende Anzahl an Zellkulturflaschen für die jeweiligen Versuchsabläufe erhielt. Hierfür wurde das Nährmedium aus der Zellkulturflasche entfernt und einmalig mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, um Rückstände des Zellkulturmediums zu entfernen. Darauf folgte eine 5-minütige Inkubation mit jeweils 4 ml Trypsin-EDTA im Brutschrank. Das Trypsin wurde mit 10 ml Nährmedium neutralisiert und die Zellsuspension zentrifugiert (10 000 RPM für 5 min). Der Überstand wurde dekantiert, das entstandene Zellpellet mit 1 ml Nährmedium resuspendiert und in gleichen Anteilen auf neue 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen verteilt. Durch den Einfluss des fetalen Kälberserums erfolgte eine Differenzierung der Keratozyten in Fibroblasten, sodass im Folgenden von kornealen Fibroblasten gesprochen wird. Die Versuche wurden mit Zellen der Passage drei bis acht durchgeführt.

### 4.4.2 Riboflavin-UV-A-Bestrahlungs-Versuch und Ernten der kornealen Fibroblasten

Sobald die Zellkulturen eine Konfluenz zeigten, wurden diese für den weiteren Versuchsablauf als geeignet eingestuft. Alle Zellkulturflaschen erhielten 24 h vor den Versuchen ein frisches Nährmedium. Die entsprechende Riboflavin-Konzentration (0,01% bzw. 0,1%) wurde im Vorfeld mit Nährmedium in einem 50 ml Polypropylen-Röhrchen gelöst, mit Aluminiumfolie vor Lichteinwirkung geschützt und bei 4 °C aufbewahrt. Unter der sterilen Werkbank wurde das Nährmedium aus der Zellkulturflasche entfernt und verworfen. Abhängig von der jeweiligen Versuchsgruppe wurde entweder 5 ml Nährmedium oder 5 ml 0,01%ige-/0,1%ige-Riboflavin-Nährmedium-Lösung in die Zellkulturflasche pipettiert und zügig in eine Dunkelkammer gestellt oder mit UV-A-Licht der Wellenlänge 375 nm (2 J/cm<sup>2</sup>) in einer Bestrahlungsbox bestrahlt. Die Zellkulturen wurden für einen Zeitraum von 250 s der Dunkelheit oder der UV-A-Bestrahlung ausgesetzt. Danach wurde das Nährmedium oder die Riboflavin-Nährmedium-Lösung entfernt und zweimalig mit jeweils 10 ml PBS gespült. Schließlich erhielt jede Zellkultur 10 ml Nährmedium und wurde für den jeweiligen Zeitraum im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Untersuchung der Genexpression erfolgte abhängig von dem zu untersuchenden Gen für die zuvor definierten Zeitpunkte. Die Zellen wurden entweder 4 h, 24 h oder 48 h nach den Versuchen geerntet.

## Materialien und Methoden

Für eine Bestimmung der IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand wurden 1,5 ml Nährmedium aus der Zellkulturflasche in ein Mikroreaktionsgefäß pipettiert, welches für später durchgeführte ELISAs verwendet wurde. Die mithilfe der Trypsin-EDTA-Lösung vom Flaschenboden abgelösten Zellen wurden mit 10 ml Nährmedium resuspendiert und in einem 50 ml Polypropylenröhrchen zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet mit 1 ml PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß pipettiert und erneut mit 10.000 RPM für 1 min zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet bei -80 °C für die weitere Verwendung tiefgefroren.

### 4.4.3 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem RNA Purification Plus Micro Kit (Norgen Biotek Corp., Thorold, Kanada) anhand der bereitgestellten Anleitung bei Raumtemperatur. Zur Optimierung des Isolationsergebnisses wurde eine 15-minütige Inkubation mit DNase 1 (Norgen Biotek Corp., Thorold, Kanada) als optionaler Zwischenschritt durchgeführt. Die RNA wurde mit 30 µl Elutions-Puffer eluiert und bei -80 °C für die weitere Verwendung aufbewahrt. Mit dem Mikrovolumen-Spektralphotometer ScanDrop (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland) wurde die RNA-Konzentration gemessen. Das Messverfahren basiert auf der UV/VIS-Spektroskopie. Die Blindwert-Messung erfolgte mit 50 µl Nuklease-freiem Wasser und die jeweiligen Proben wurden in einer Verdünnung von 1:10 (45 µl Wasser und 5 µl RNA) gemessen.

### 4.4.4 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem OneTaq RT-PCR Kit (New England BioLabs, Frankfurt a. M., Deutschland) anhand der bereitgestellten Anleitung bei Raumtemperatur. Die cDNA-Synthese benötigte 1000 ng der zuvor isolierten RNA. Das entsprechende Volumen der eluierten RNA wurde aus den Ergebnissen der Spektroskopie-Messungen berechnet und in ein PCR-Röhrchen pipettiert. Zusätzlich wurde der Reaktionsmix mit 2 µl des Primers Oligo d(T)<sub>23</sub>VN und einer entsprechenden Menge Nuklease-freiem Wasser auf ein Reaktionsvolumen von 8 µl ergänzt. Nachdem die PCR-Röhrchen in einem Thermozykler bei 70 °C für 5 min inkubiert wurden, erfolgte ein Abkühlen der Proben auf Eis. Es wurden jeweils 2 µl M-MuLV Enzyme Mix und 10 µl M-MuLV Reaction Mix in die PCR-Röhrchen pipettiert und erneut im Thermozykler bei 42 °C für 1h inkubiert. Abschließend wurde die Temperatur auf 80 °C für weitere 4 min erhöht. Die synthetisierte cDNA wurde mit 30 µl Wasser ergänzt und für die weitere Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

## Materialien und Methoden

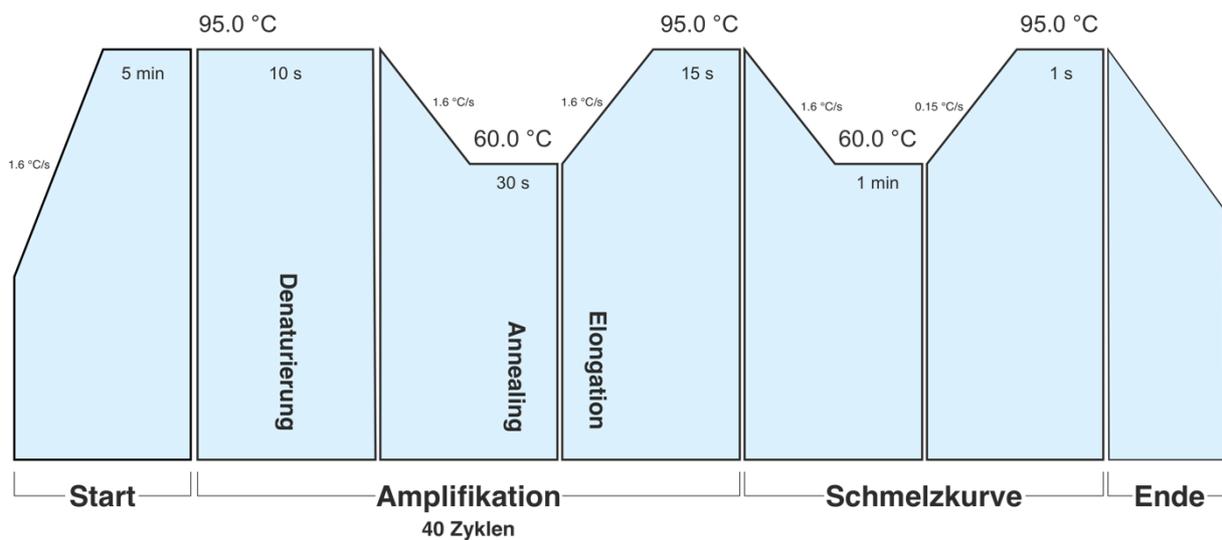
### 4.4.5 Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Die Messung der Genexpression erfolgte in einer 96-Well-Platte. Der Reaktionsmix (9  $\mu$ l) bestand pro Well aus den folgenden Komponenten (Tab. 11):

**Tabelle 11:** Ansatz für einen Reaktionsmix für die qPCR-Messungen

Reaktionsmix	Volumen (Gesamtvolumen 9 $\mu$ l)
Spezifischer Primer	1 $\mu$ l
SYBR Green	5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	3 $\mu$ l

Die PCR-Platte wurde mit dem entsprechenden Reaktionsmix pipettiert und mit 1,5  $\mu$ l der jeweiligen cDNA ergänzt. Sämtliche Proben wurden in Doppelwerten gemessen. Die Amplifikation und Messung erfolgte mit dem QuantStudio 5 Real-Time-PCR-System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) unter der Verwendung eines selbst erstellten PCR-Profiles (Abb. 6):



**Abbildung 6:** Verwendetes PCR-Profil (Eigene Darstellung)

Die Templates wurden für die Amplifikation (40 Zyklen) zunächst denaturiert (95 °C für 10s), es folgte das Primer-Annealing (60 °C für 30s) und endete schließlich mit der Elongation, welche aufgrund der kurzen Sequenzlänge der Amplicons bereits während der Temperaturerhöhung geschah.

## Materialien und Methoden

Folgende Primer wurden verwendet (Tab. 12):

**Tabelle 12:** Verwendete Primer mit Sequenz und Amplifikationsgröße

Primer	Abkürzung	Primersequenz oder QIAGEN-Artikelnummer	Amplifikationsgröße (bp)
Induzierbare NO-Synthase	iNOS	CTGGCAAGCCCAAGGTCTAT GGAGGCTCCGATCAATCCAG	517
Interleukin-6	IL-6	QT00083720	107
Kollagen 1A1	Kol 1	QT00037793	118
Kollagen 5A1	Kol 5	QT00044527	105
Nukleärer Faktor kappa B p65	NF-kB	QT02324308	136
Superoxiddismutase	SOD1	QT01008651	66
Tata-bindendes Protein	TBP	QT00000721	132

Als Referenzgen wurde TATA-bindendes Protein (TBP) ausgewählt, das unter denselben Bedingungen gemessen wurde. Die Ergebnisse der quantitativen PCR wurden mit der zum PCR-Gerät kompatiblen Software QuantStudio dargestellt. Die Messdaten (CT-Werte) wurden in eine Microsoft Excel-Datei exportiert. Der CT-Wert gibt den Anfang des exponentiellen Wachstums einer Kurve an und wird für die Quantifizierung der DNA-Moleküle während der qPCR verwendet. Für die Ermittlung der Genexpression wurde das  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Modell gewählt, hierbei wurde der CT-Wert des Referenzgens vom CT-Wert des zu bestimmenden Gens subtrahiert ( $\Delta\text{CT-Wert} = \text{CT-Wert}_{\text{Zielgen}} - \text{CT-Wert}_{\text{TBP}}$ ). Aus den Doppelwerten wurde der  $\Delta\text{CT}$ -Mittelwert errechnet. Den  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert erhielt man, indem man den  $\Delta\text{CT}$ -Mittelwert der Kontrollgruppe von dem  $\Delta\text{CT}$ -Mittelwert der jeweiligen Versuchsgruppe subtrahierte ( $\Delta\Delta\text{CT-Wert} = \Delta\text{CT-Mittelwert}_{\text{Intervention}} - \Delta\text{CT-Mittelwert}_{\text{Kontrolle}}$ ). Daraus wurde der Fold change ( $2^{\Delta\Delta\text{CT-Wert}}$ ) errechnet, welcher für die weitere Analyse genutzt wurde. Für die statistische Auswertung und die Erstellung der Diagramme wurde GraphPad Prism 8.2.1 verwendet. Die gesunden humanen kornealen Fibroblasten, die sich mit dem Zellkulturmedium für 250 s in einer Dunkelkammer befanden, dienten hierbei als Kontrolle (Fold change=1,00).

### 4.4.6 Quantitative Proteinbestimmung

Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte mit dem Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) anhand der bereitgestellten Anleitung bei Raumtemperatur. Die Zellpellets wurden mit jeweils 50  $\mu\text{l}$  RIPA Lysis and Extraction Buffer bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurde das Zelllysate zentrifugiert und der Überstand in neue Mikroreaktionsgefäße pipettiert. Die photometrische Messung erfolgte mit dem Tecan Infinite F50 Absorbance Microplate Reader an einer 96-Well Platte mit einer Wellenlänge von 560 nm. Als Standard wurde bovines Serumalbumin (BSA) in

## Materialien und Methoden

absteigenden Konzentrationen verwendet. Die Messungen erfolgten in Doppelwerten. Die extrahierten Proteine wurden bei -20 °C aufbewahrt.

### 4.4.7 Western Blot

Der Western Blot erfolgte mit jeweils 3 HCF- und 3 KC-HCF-Zellkulturen nach UV-A-Bestrahlung mit Riboflavin (0,01% oder 0,1%). Als Kontrolle dienten unbehandelte HCF- bzw. KC-HCF-Zellkulturen (n=3). Es wurde eine Proteinmenge von 20 µg verwendet, welche aus den Ergebnissen der quantitativen Proteinbestimmung berechnet wurde. Aus den extrahierten Proteinen wurde das benötigte Volumen in ein Mikroreaktionsgefäß pipettiert und mit 5 µl Loading Buffer ergänzt. Die Proben wurden in einem Thermoblock bei 95 °C für 5 Minuten inkubiert und anschließend mit Eis heruntergekühlt. Die Proteinauftrennung erfolgte in der Biometra Eco-Mini Kammer (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland). Als Elektrophoresepuffer wurde NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer (20X) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) verwendet, der mit destilliertem Wasser in einem Verhältnis von 1:20 verdünnt wurde. Die Proteinauftrennung erfolgte mit einem NuPAGE Bis-Tris Gel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), welches in die Elektrophoresekammer eingesetzt wurde. Danach wurde die Kammer mit dem verdünnten MOPS Puffer bis zur Markierung aufgefüllt. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurden als Referenz 3 µl Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) in die erste Tasche des Gels pipettiert. Die weiteren Taschen wurden mit den entsprechenden Protein-Proben pipettiert. Die Gelelektrophorese begann mit einer Spannung von 120 Volt für 20 min und wurde bis zum Erreichen des unteren Gelrandes mit einer Spannung von 180 Volt fortgeführt. Nach Herauslösen des Gels aus seiner Plastikkassette wurde dieses auf einer Nitrozellulose-Membran ausgerichtet. Das Semi-Dry-Blotten geschah mithilfe des Trans-Blot Turbo Transfer Systems (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) anhand des vorinstallierten Blottingprotokolls (List → 1 Minigel → HIGH MW). Es erfolgte ein dreimaliges Waschen der Membran mit jeweils 15 ml einer zubereiteten Waschlösung, die sich aus 10 ml WesternFroxx Waschlösung und 90 ml destilliertem Wasser zusammensetzte. Darauf folgte eine Inkubation mit einem spezifischen Antikörper (AK) bei 4 °C nachdem diese in der WesternFroxx anti-Mouse HRP-/anti-Rabbit HRP-Lösung in einer entsprechenden Konzentration verdünnt wurden. Die Verdünnung und die Dauer der AK-abhängigen Inkubationsdauer sind aus der folgenden Tabelle zu entnehmen (Tab. 13).

## Materialien und Methoden

**Tabelle 13:** Verwendete Western Blot-Antikörper mit der jeweiligen Verdünnung und Inkubationszeit

Antikörper	Abkürzung	Verdünnung	Inkubationszeit
Induzierbare NO-Synthase (anti-Rabbit)	iNOS	1:1000	24 h
Nukleärer Faktor kappa B p65 (anti-Rabbit)	NFkB	1:1000	1 h
Calnexin (anti-Rabbit)	Cal	1:1000	1 h
Kollagen 1A1 (anti-Rabbit)	Kol 1	1:1000	24 h
Kollagen 5A1 (anti-Rabbit)	Kol 5	1:5000	24 h

Als Referenzprotein diente hierbei Calnexin. Nach der AK-Inkubation wurde die Membran nochmals dreimalig für 5 min mit 15 ml Waschlösung gewaschen. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mithilfe der Western Lightning Plus Chemiluminescence Reagenz (PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, USA).

Das Chemilumineszenz-Signal wurde mit dem ImageQuant LAS 400 registriert und mit dem Bildbearbeitungsprogramm Image Studio Lite ausgewertet. Zur Quantifizierung der Proteinmenge wurde der Quotient aus der Bande des Zielproteins und der des Referenzproteins Calnexin berechnet. Die Entfernung der AK von der Membran erfolgte mit dem Stripping Puffer der Firma WesternFroxx für jeweils 45 min bei Raumtemperatur. Nach einem dreimaligen Waschen mit jeweils 15 ml der Waschlösung für 5 min wurde die Membran entweder mit einem neuen AK inkubiert oder für eine spätere Messung aufbewahrt.

### 4.4.8 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Bestimmung der IL-6-Konzentration wurde ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) verwendet. Die IL-6-Messung erfolgte jeweils im Zellkulturüberstand sowie im Zelllysat. Zur Untersuchung der IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand wurde 1 ml des Nährmediums vor dem Ernten der Zellen aus den Zellkulturflaschen in Mikroreaktionsgefäße pipettiert. Der Zellkulturüberstand der Versuchsreihen mit einer 0,01%igen-Riboflavin-Konzentration wurde vor der Messung bei -80 °C aufbewahrt. Dagegen erfolgte die Messung der Versuchsreihen mit einer 0,1%igen-Riboflavin-Konzentration direkt nach der Entnahme aus der Zellkulturflasche, sodass der Zellkulturüberstand nicht zwischengefroren wurde.

Das Nachweisverfahren basierte auf dem Prinzip der Sandwich-ELISA-Technik unter Verwendung des Human IL-6 Quantikine ELISA Kits der Firma R&D anhand der bereitgestellten Anleitung bei Raumtemperatur und wurde in Doppelwerten durchgeführt. Hierfür wurde eine 96-Well-Platte verwendet, die mit einem spezifischen monoklonalen humanen IL-6-AK beschichtet war. In jedes Well wurden jeweils 100 µl einer Blockierungslösung pipettiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Die Blockierungslösung wurde entweder mit 100 µl der Standard-Lösung (rekombinantes

## Materialien und Methoden

humanes IL-6) in absteigender Konzentration oder mit 100 µl der antigenhaltigen Probenlösung (Zellkulturüberstand- oder lysat) ergänzt. Nach einer zweistündigen Inkubation wurde der Inhalt der Wells verworfen und viermalig mit jeweils 400 µl Waschlösung gewaschen. Anschließend wurden 200 µl einer sekundären humanen IL-6-AK-Lösung mit Meerrettichperoxidase als Teil des Immunkonjugates jedem Well hinzugefügt und erneut für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen der AK-Lösung wurden die Wells viermalig mit 400 µl Waschlösung gewaschen und mit jeweils 200 µl der Substratlösung (Tetramethylbenzidin + Wasserstoffperoxid) als Reaktionsstarter für den Farbumschlag ergänzt. Nach 20-minütiger Inkubation wurden 50 µl Stop-Lösung hinzugefügt, um den Farbumschlag zu stoppen. Der quantitative Nachweis der IL-6-Konzentration erfolgte durch den Tecan Infinite F50 Absorbance Microplate Reader mithilfe einer mitgeführten Standardkurve. Die gemessenen IL-6-Konzentrationen wurden durch die Gesamtprotein-Konzentrationen dividiert, sodass man die IL-6-Konzentration in pg pro mg Protein erhielt ( $\frac{\text{IL-6 Konzentration pg/ml}}{\text{Gesamtprotein-Konzentration mg/ml}}$ ). Der erhaltene Quotient (pg IL-6/ mg Protein) wurde für die weitere statistische Auswertung verwendet.

### 4.4.9 Statistische Analyse

Für die statistische Analyse, sowie für die Erstellung der Diagramme wurde GraphPad Prism 8.2.1 verwendet. Dabei wurden die Versuchsergebnisse mit dem Mittelwert sowie dem Standardfehler (SEM) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte bei Vergleich zwischen zwei Gruppen mithilfe eines Mann-Whitney-U-Tests. Für den Vergleich innerhalb einer Gruppe wurde eine einfache Varianzanalyse verwendet. P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Zur graphischen Umsetzung diente ein Balkendiagramm mit Darstellung des Mittelwertes und des SEM.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Nukleärer Faktor kappa B

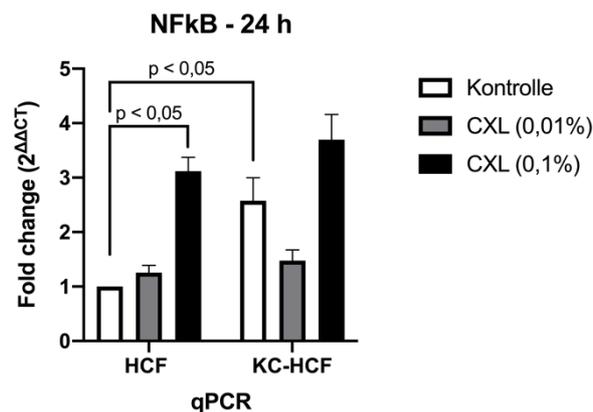
Die NFkB-mRNA-Genexpression wurde 24 h nach der Riboflavin-UV-A-Bestrahlung untersucht (Abb. 7 und Tab. 14).

Eine UV-A-Bestrahlung mit der niedrigen Riboflavin-Konzentration (0,01%) führte in der HCF-Gruppe zu keinen signifikanten Veränderungen ( $p=0,1270$  - Fold change=1,25).

Dagegen ging die UV-A-Bestrahlung mit einer Riboflavin-Konzentration von 0,1% mit einer signifikanten Erhöhung der NFkB-mRNA-Expression in der HCF-Gruppe einher ( $p=0,0286$  - Fold change=3,12).

In der KC-HCF-Gruppe waren für beide Konzentrationen keine signifikanten Veränderungen durch eine Riboflavin-UV-A-Bestrahlung festzustellen (0,01%-Riboflavin:  $p=0,1274$  - Fold change=1,47 / 0,1%-Riboflavin:  $p=0,2788$  - Fold change=3,67).

Im Vergleich zur HCF-Kontrollgruppe zeigte die KC-HCF-Kontrollgruppe eine signifikant höhere NFkB-mRNA-Genexpression ( $p=0,0002$  - Fold change=2,57).



**Abbildung 7:** Genexpressionsdaten von NFkB 24 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

In der HCF-Gruppe führte eine 0,1%ige-Riboflavin-UV-A-Bestrahlung zu einem signifikanten Anstieg der NFkB-mRNA-Genexpression ( $p=0,0286$ ). Die KC-HCF-Kontrollgruppe zeigte im Vergleich zur HCF-Kontrollgruppe eine 2,5-fach erhöhte NFkB-mRNA-Genexpression, die mit einer statistischen Signifikanz einherging ( $p=0,0002$ ).

## Ergebnisse

**Tabelle 14:** Fold changes und p-Werte der NFkB-mRNA-Genexpression in der HCF- und KC-HCF-Gruppe 24 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

\* p-Wert: Vergleich zwischen der HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

\*\* p-Wert: Vergleich zwischen der KC-HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

Versuchsgruppe		Fold change	* p-Wert	** p-Wert
HCF	Kontrolle	1,00	-	-
	CXL (0,01%)	1,25	0,1270	-
	CXL (0,1%)	3,12	<b>0,0286</b>	-
KC-HCF	Kontrolle	2,57	<b>0,0002</b>	-
	CXL (0,01%)	1,47	-	0,1274
	CXL (0,1%)	3,67	-	0,2788

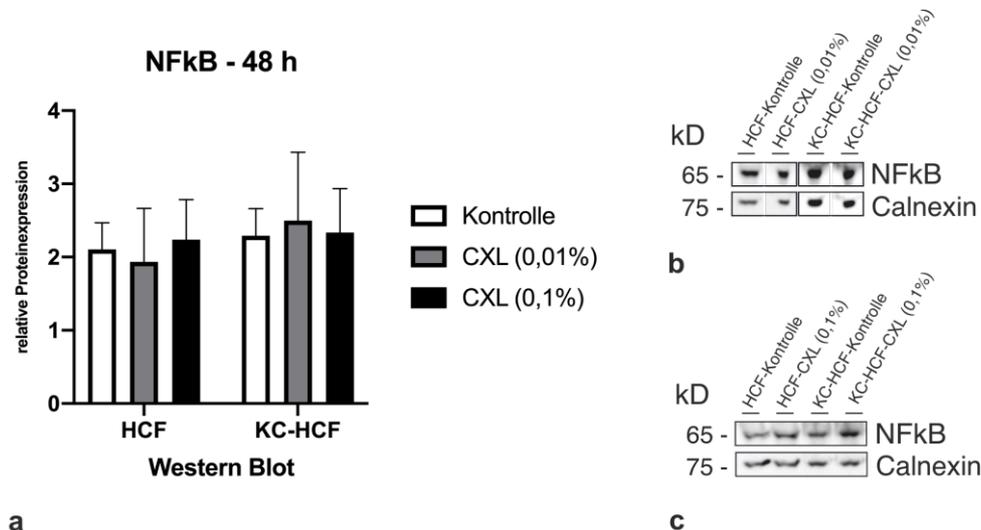
Die Ergebnisse der Western-Blot-Messung sind in Tabelle 15 angegeben. Es bestand kein signifikanter NFkB-Proteinexpressionsunterschied zwischen den Kontrollgruppen der HCF und der KC-HCF ( $p=0,7308$ ) (Abb. 8).

**Tabelle 15:** Proteinexpressionsdaten von NFkB in der HCF- und KC-HCF-Gruppe 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

\* p-Wert: Vergleich zwischen der HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

\*\* p-Wert: Vergleich zwischen der KC-HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

Versuchsgruppe		Durchschnittlicher NFkB-Calnexin-Quotient	* p-Wert	** p-Wert
HCF	Kontrolle	2,10	-	-
	CXL (0,01%)	1,93	0,9143	-
	CXL (0,1%)	2,23	0,9999	-
KC-HCF	Kontrolle	2,29	0,7308	-
	CXL (0,01%)	2,49	-	0,7879
	CXL (0,1%)	2,33	-	0,9999



**Abbildung 8:** Darstellung der NFkB-Proteinexpression 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

**a** Densitometrische Analyse des NFkB-Western Blots. Eine UV-A-Bestrahlung führte in der HCF- und KC-HCF-Gruppe mit beiden Riboflavin-Konzentrationen (0,01% / 0,1%) zu keinen signifikanten Veränderungen der NFkB-Proteinexpression. Auch zwischen der HCF- und KC-HCF-Kontrollgruppe konnte kein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden. Die Darstellung zeigt den Mittelwert  $\pm$  SEM. **b,c** Darstellung repräsentativer Western Blots nach UV-A-Bestrahlung mit beiden Riboflavin-Konzentrationen (0,01% / 0,1%).

## Ergebnisse

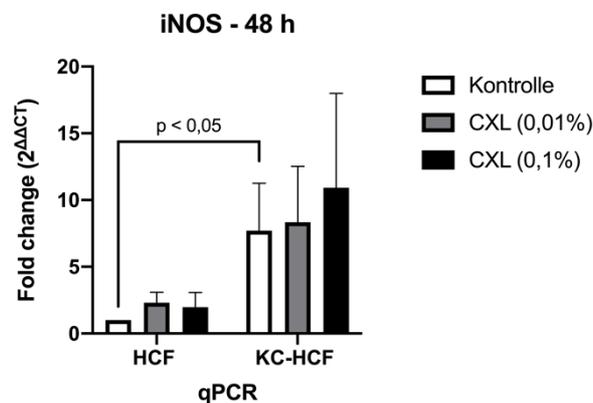
### 5.2 Induzierbare NO-Synthase

Die Untersuchung der iNOS-mRNA-Genexpression erfolgte 48 h nach der Riboflavin-UV-A-Bestrahlung (Abb. 9 und Tab. 16).

In der HCF-Gruppe konnte keine signifikante Erhöhung der iNOS-mRNA-Expression durch eine 0,01%ige-Riboflavin-UV-A-Bestrahlung nachgewiesen werden ( $p=0,1270$  - Fold change=2,31). Dies war ebenso mit der höheren Riboflavin-Konzentration (0,1%) zu beobachten ( $p=0,3143$  - Fold change=1,98).

Auch innerhalb der KC-HCF-Gruppe waren durch eine Riboflavin-UV-A-Bestrahlung keine signifikanten Veränderungen festzustellen (0,01%-Riboflavin:  $p=0,8981$  - Fold change=7,71 / 0,1%-Riboflavin:  $p=0,7457$  - Fold change=10,92).

Die Kontrollgruppe der KC-HCF zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe der HCF eine signifikant höhere iNOS-mRNA-Genexpression ( $p=0,0019$  - Fold change=7,71).



**Abbildung 9:** Genexpressionsdaten von iNOS 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

Eine Riboflavin-UV-A-Bestrahlung führte sowohl in der HCF- als auch in der KC-HCF-Gruppe zu keinen signifikanten Veränderungen der iNOS-mRNA-Genexpression. Die KC-HCF-Kontrollgruppe zeigte im Vergleich zur HCF-Kontrollgruppe eine signifikant höhere iNOS-mRNA-Genexpression ( $p=0,0019$ ).

**Tabelle 16:** Fold changes und p-Werte der iNOS-mRNA-Genexpression in der HCF- und KC-HCF-Gruppe 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

\* p-Wert: Vergleich zwischen der HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

\*\* p-Wert: Vergleich zwischen der KC-HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

Versuchsgruppe		Fold change	* p-Wert	** p-Wert
<b>HCF</b>	Kontrolle	1,00	-	-
	CXL (0,01%)	2,31	0,1270	-
	CXL (0,1%)	1,98	0,3143	-
<b>KC-HCF</b>	Kontrolle	7,71	<b>0,0019</b>	-
	CXL (0,01%)	7,71	-	0,8981
	CXL (0,1%)	10,92	-	0,7457

## Ergebnisse

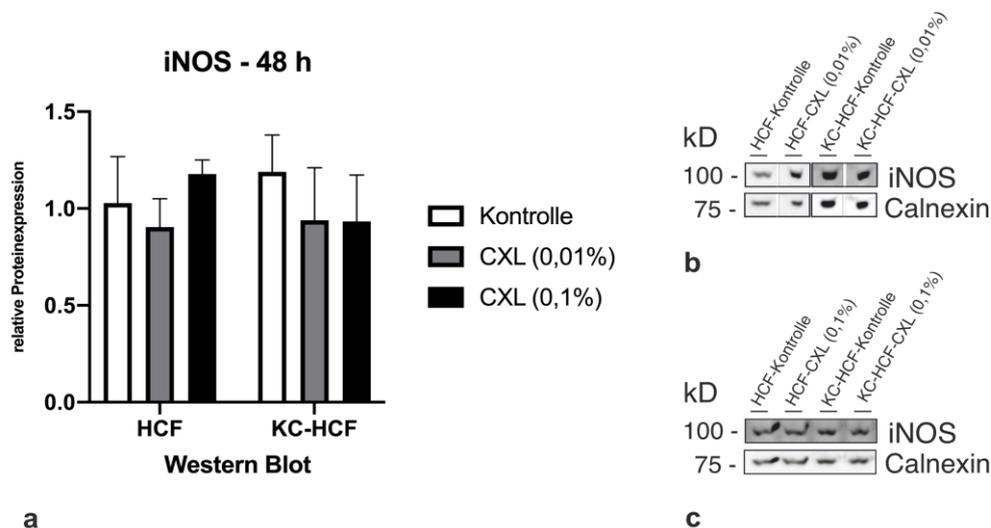
Die Ergebnisse der Western-Blot-Messung sind in Tabelle 17 angegeben. Zwischen der HCF- und KC-HCF-Kontrollgruppe bestanden keine signifikanten iNOS-Proteinexpressionsunterschiede ( $p=0,6282$ ) (Abb. 10).

**Tabelle 17:** Proteinexpressionsdaten von iNOS in der HCF- und KC-HCF-Gruppe 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

\* p-Wert: Vergleich zwischen der HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

\*\* p-Wert: Vergleich zwischen der KC-HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

Versuchsgruppe		Durchschnittlicher iNOS-Calnexin-Quotient	* p-Wert	** p-Wert
HCF	Kontrolle	1,02	-	-
	CXL (0,01%)	0,90	0,7619	-
	CXL (0,1%)	1,17	0,9999	-
KC-HCF	Kontrolle	1,18	0,6282	-
	CXL (0,01%)	0,93	-	0,5273
	CXL (0,1%)	0,93	-	0,6667



**Abbildung 10:** Darstellung der iNOS-Proteinexpression 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

**a** Densitometrische Analyse des iNOS-Western Blots. In der HCF- und KC-HCF-Gruppe konnten keine signifikanten Veränderungen nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung beschrieben werden. Selbiges gilt auch für den Vergleich zwischen den Kontrollgruppen von HCF und KC-HCF. Die Darstellung zeigt den Mittelwert  $\pm$  SEM.

**b,c** Darstellung repräsentativer Western Blots nach UV-A-Bestrahlung mit beiden Riboflavin-Konzentrationen (0,01% / 0,1%).

## Ergebnisse

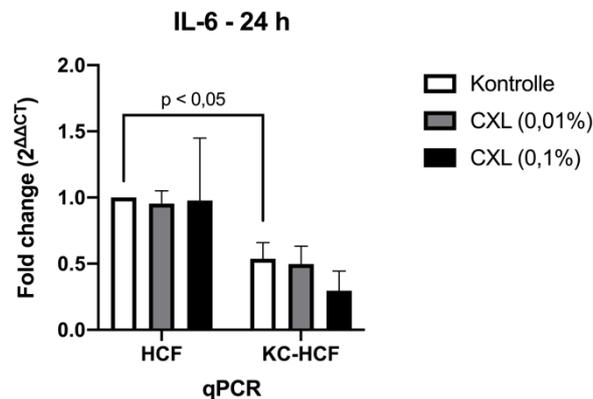
### 5.3 Interleukin-6

Die IL-6-mRNA-Genexpression wurde 24 h (Abb. 11 und Tab. 18) und 48 h (Abb. 12 und Tab. 19) nach der Riboflavin-UV-A-Bestrahlung gemessen.

In der HCF-Gruppe zeigten sich 24 h nach UV-A-Bestrahlung mit beiden Riboflavin-Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede. Sowohl für die Riboflavin-Konzentration von 0,01% ( $p=0,6825$  - Fold change=0,95) als auch für die höhere Riboflavin-Konzentration von 0,1% ( $p=0,4857$  - Fold change=0,97) konnte man keine statistisch signifikanten IL-6-mRNA-Genexpressionsänderungen durch eine UV-A-Bestrahlung beschreiben.

Auch innerhalb der KC-HCF-Gruppe ließen sich keine signifikanten Veränderungen nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung feststellen (0,01%-Riboflavin:  $p=0,9433$  - Fold change=0,49 / 0,1%-Riboflavin:  $p=0,2788$  - Fold change=0,29).

Die Kontrollgruppe der KC-HCF zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe der HCF eine signifikant niedrigere IL-6-mRNA-Genexpression ( $p=0,0057$  - Fold change=0,53).



**Abbildung 11:** Genexpressionsdaten von IL-6 24 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung. In beiden Gruppen (HCF und KC-HCF) zeigte die IL-6-mRNA-Genexpression nach einer UV-A-Bestrahlung mit beiden Riboflavin-Konzentrationen keine signifikanten Veränderungen. Zwischen den unbehandelten Kontrollgruppen von HCF und KC-HCF bestand ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p=0,0057$ ).

## Ergebnisse

**Tabelle 18:** Fold changes und p-Werte der IL-6-mRNA-Genexpression in der HCF- und KC-HCF-Gruppe 24 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung.

\* p-Wert: Vergleich zwischen der HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

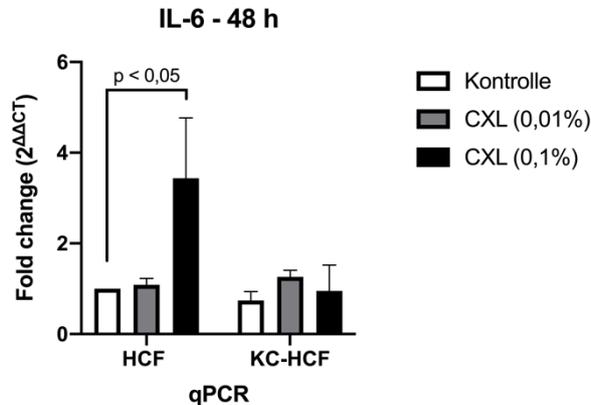
\*\* p-Wert: Vergleich zwischen der KC-HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

Versuchsgruppe		Fold change	* p-Wert	** p-Wert
<b>HCF</b>	Kontrolle	1,00	-	-
	CXL (0,01%)	0,95	0,6825	-
	CXL (0,1%)	0,97	0,4857	-
<b>KC-HCF</b>	Kontrolle	0,53	<b>0,0057</b>	-
	CXL (0,01%)	0,49	-	0,9433
	CXL (0,1%)	0,29	-	0,2788

Nach 48 h traten keine Veränderungen der IL-6-mRNA-Genexpression in der HCF-Gruppe nach einer UV-A-Bestrahlung mit einer 0,01%igen-Riboflavin-Konzentration auf ( $p=0,1270$  - Fold change=1,08). Nach einer UV-A-Bestrahlung mit der höheren Riboflavin-Konzentration (0,1%) konnte eine signifikante Erhöhung der IL-6-Genexpression in der HCF-Gruppe gezeigt werden ( $p=0,0286$  - Fold change=3,43).

Innerhalb der KC-HCF-Gruppe waren keine signifikanten Veränderungen durch die UV-A-Bestrahlung mit beiden Riboflavin-Konzentrationen festzustellen (0,01%-Riboflavin:  $p=0,1898$  - Fold change=1,26 / 0,1%-Riboflavin:  $p=0,9706$  - Fold change=0,95).

Zwischen den Kontrollen von HCF und KC-HCF konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden ( $p=0,2235$  - Fold change=0,74).



**Abbildung 12:** Genexpressionsdaten von IL-6 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

Eine signifikante Erhöhung der IL-6-mRNA-Genexpression konnte lediglich in der HCF-Gruppe nach einer 0,1%igen-Riboflavin-UV-A-Bestrahlung beobachtet werden.

## Ergebnisse

**Tabelle 19:** Fold changes und p-Werte der IL-6-mRNA-Genexpression in der HCF- und KC-HCF-Gruppe 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

\* p-Wert: Vergleich zwischen der HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

\*\* p-Wert: Vergleich zwischen der KC-HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

Versuchsgruppe		Fold change	* p-Wert	** p-Wert
<b>HCF</b>	Kontrolle	1,00	-	-
	CXL (0,01%)	1,08	0,1270	-
	CXL (0,1%)	3,43	<b>0,0286</b>	-
<b>KC-HCF</b>	Kontrolle	0,74	0,2235	-
	CXL (0,01%)	1,26	-	0,1898
	CXL (0,1%)	0,95	-	0,9706

## Ergebnisse

Die Messung der IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand erfolgte mithilfe eines ELISA für beide Zeitpunkte (24 h und 48 h nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung).

Die durchschnittliche IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand zum Zeitpunkt von 24 h nach erfolgter Riboflavin-UV-A-Bestrahlung ist aus der folgenden Tabelle zu entnehmen (Tab. 20).

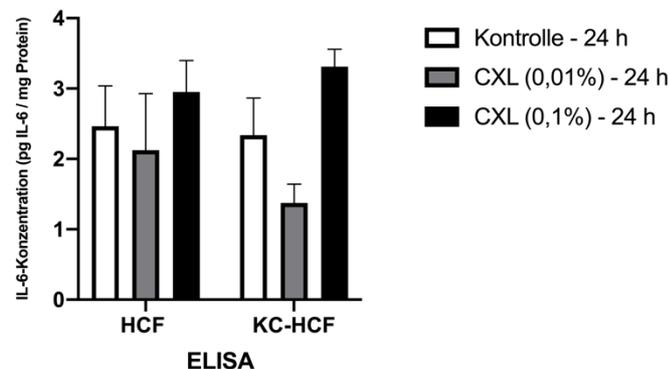
**Tabelle 20:** Durchschnittliche IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand (pg IL-6/mg Protein) 24 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung  
Dargestellt sind die IL-6 Konzentrationen mit dem SEM 24 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung mit beiden Konzentrationen (0,01% / 0,1%).

Versuchsgruppe	Durchschnittliche IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand (pg IL-6/mg Protein) mit SEM	
	HCF	KC-HCF
Kontrolle - 24 h	2,46 ± 0,57	2,33 ± 0,52
CXL (0,01%) - 24 h	2,12 ± 0,80	1,37 ± 0,26
CXL (0,1%) - 24 h	2,95 ± 0,44	3,31 ± 0,24

Nach 24 h konnten in der HCF- und in der KC-HCF-Gruppe keine signifikanten Veränderungen der IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand festgestellt werden. (Abb. 13 und Tab. 21).

Dies zeigte sich sowohl nach UV-A-Bestrahlung mit einer 0,01%igen- (HCF:  $p=0,4351$  / KC-HCF:  $p=0,8785$ ) als auch mit einer 0,1%igen- (HCF:  $p=0,4970$  / KC-HCF:  $p=0,1333$ ) Riboflavin-Konzentration. Zwischen der Kontrollgruppe von HCF- und KC-HCF waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar ( $p=0,0785$ ).

**IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand - 24 h**



**Abbildung 13:** IL-6-Konzentration (pg IL-6/mg Protein) im Zellkulturüberstand 24 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

Sowohl in der HCF- als auch in der KC-HCF-Gruppe konnten 24 h und 48 h nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung keine statistisch signifikanten Veränderungen beschrieben werden. Auch zwischen der Kontrollgruppe von HCF und KC-HCF bestand kein signifikanter Unterschied.

## Ergebnisse

**Tabelle 21:** p-Werte der IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand in der HCF- und KC-HCF-Gruppe 24 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

\* p-Wert: Vergleich zwischen der HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

\*\* p-Wert: Vergleich zwischen der KC-HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

Versuchsgruppe		* p-Wert	** p-Wert
<b>HCF</b>	Kontrolle	-	-
	CXL (0,01%)	0,4351	-
	CXL (0,1%)	0,4970	-
<b>KC-HCF</b>	Kontrolle	0,8785	-
	CXL (0,01%)	-	0,8785
	CXL (0,1%)	-	0,1333

Die IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand wurde ebenfalls 48 h nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung bestimmt. Die durchschnittlichen IL-6-Konzentrationen im Zellkulturüberstand nach 48 h sind der folgenden Tabelle zu entnehmen (Tab. 22).

**Tabelle 22:** Durchschnittliche IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand (pg IL-6/mg Protein) 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

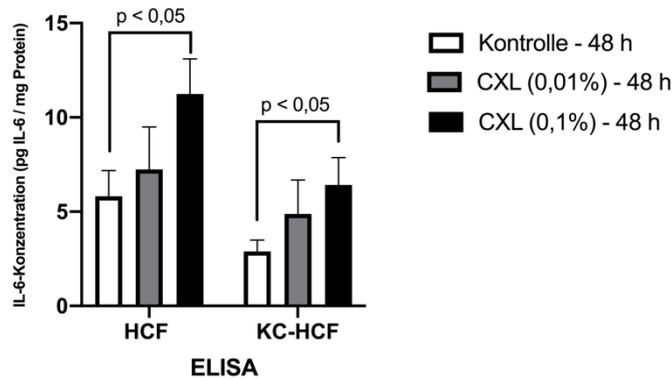
Dargestellt sind die IL-6 Konzentrationen mit dem SEM 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung mit beiden Konzentrationen (0,01% / 0,1%).

Versuchsgruppe	Durchschnittliche IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand (pg IL-6/mg Protein) mit SEM	
	HCF	KC-HCF
Kontrolle - 24 h	5,82 ± 1,35	2,89 ± 0,60
CXL (0,01%) - 24 h	7,24 ± 2,25	4,88 ± 1,79
CXL (0,1%) - 24 h	11,23 ± 1,87	6,42 ± 1,45

Eine UV-A-Bestrahlung mit einer Riboflavin-Konzentration von 0,01% (Abb. 14 und Tab. 23) führte im Vergleich zu den Kontrollgruppen nach 48 h sowohl bei HCF- ( $p=0,7242$ ) als auch bei KC-HCF ( $p=0,4351$ ) zu keinen signifikanten IL-6-Konzentrationsunterschieden im Zellkulturüberstand.

Dagegen ging eine 0,1%ige-Riboflavin-UV-A-Bestrahlung mit einer signifikanten Erhöhung der IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand in der HCF- ( $p=0,0485$ ) und KC-HCF-Gruppe ( $p=0,0485$ ) einher. Zwischen der HCF- und KC-HCF-Gruppe bestand kein signifikanter Unterschied ( $p=0,0650$ ).

**IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand - 48 h**



**Abbildung 14:** IL-6-Konzentration (pg IL-6/mg Protein) im Zellkulturüberstand 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

Nach 48 h führte eine 0,1%ige-Riboflavin-UV-A-Bestrahlung sowohl in der HCF- ( $p=0,0485$ ) als auch in der KC-HCF-Gruppe ( $p=0,0485$ ) zu einem signifikanten Anstieg der IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand.

**Tabelle 23:** p-Werte der IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand in der HCF- und KC-HCF-Gruppe 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

\* p-Wert: Vergleich zwischen der HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

\*\* p-Wert: Vergleich zwischen der KC-HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

Versuchsgruppe		* p-Wert	** p-Wert
<b>HCF</b>	Kontrolle	-	-
	CXL (0,01%)	0,7242	-
	CXL (0,1%)	<b>0,0485</b>	-
<b>KC-HCF</b>	Kontrolle	0,0650	-
	CXL (0,01%)	-	0,4351
	CXL (0,1%)	-	<b>0,0485</b>

Zudem wurde die IL-6-Konzentration im Zelllysat 48 h nach erfolgter Riboflavin-UV-A-Bestrahlung bestimmt. Die durchschnittlichen IL-6-Konzentrationen im Zelllysat sind der folgenden Tabelle zu entnehmen (Tab. 24).

**Tabelle 24:** Durchschnittliche IL-6-Konzentration im Zelllysat (pg IL-6/mg Protein) nach UV-A-Bestrahlung mit beiden Riboflavin-Konzentrationen (0,01% / 0,1%) für den Zeitraum von 48 h

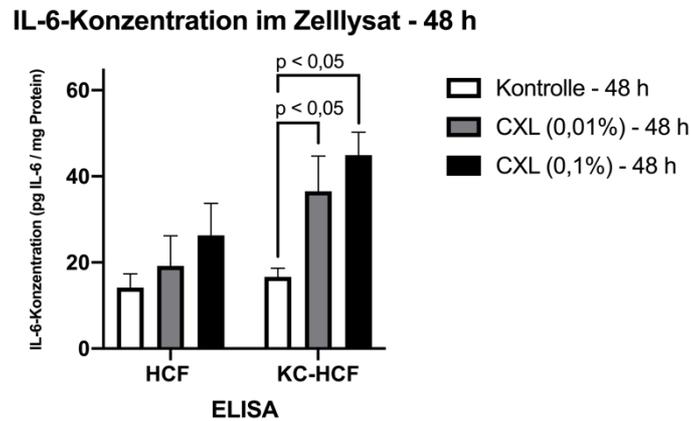
Versuchsgruppe	Durchschnittliche IL-6-Konzentration im Zelllysat (pg IL-6/mg Protein) mit SEM	
	HCF	KC-HCF
Kontrolle - 48 h	14,16 ± 3,19	16,67 ± 2,00
CXL (0,01%) - 48 h	19,18 ± 6,69	36,51 ± 8,21
CXL (0,01%) - 48 h	26,28 ± 7,42	44,96 ± 5,29

Die HCF-Gruppe zeigte sowohl nach einer UV-A-Bestrahlung mit 0,01%-Riboflavin ( $p=0,5476$ ) als auch mit 0,1%-Riboflavin ( $p=0,1667$ ) keine signifikante Veränderung der intrazellulären IL-6-Konzentration.

Demgegenüber steht ein signifikanter Anstieg der intrazellulären IL-6-Konzentration in der KC-HCF-Gruppe nach einer Bestrahlung mit beiden Riboflavin-Konzentrationen (0,01%-Riboflavin:  $p=0,0357$  / 0,1%-Riboflavin:  $p=0,0357$ ).

## Ergebnisse

Zwischen der HCF- und KC-HCF-Kontrollgruppe bestand kein signifikanter Unterschied ( $p=0,7922$ ) (Abb. 15 und Tab. 25).



**Abbildung 15:** Durchschnittliche IL-6-Konzentration im Zelllysate (pg IL-6/mg Protein) nach UV-A-Bestrahlung mit beiden Riboflavin-Konzentrationen (0,01% / 0,1%) für den Zeitpunkt von 48 h

In der KC-HCF-Gruppe zeigte sich ein signifikanter Anstieg der intrazellulären IL-6-Konzentration nach UV-A-Bestrahlung mit beiden Riboflavin-Konzentrationen. In der HCF-Gruppe bestanden keine signifikanten Veränderungen. Zwischen HCF- und KC-HCF-Kontrollgruppe waren ebenfalls keine signifikanten IL-6-Konzentrationsunterschiede messbar.

**Tabelle 25:** p-Werte der IL-6-Konzentration im Zelllysate in der HCF- und KC-HCF-Gruppe 48 h nach erfolgter Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

\* p-Wert: Vergleich zwischen der HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

\*\* p-Wert: Vergleich zwischen der KC-HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

Versuchsgruppe		* p-Wert	** p-Wert
<b>HCF</b>	Kontrolle	-	-
	CXL (0,01%)	0,5476	-
	CXL (0,1%)	0,1667	-
<b>KC-HCF</b>	Kontrolle	0,7922	-
	CXL (0,01%)		<b>0,0357</b>
	CXL (0,1%)		<b>0,0357</b>

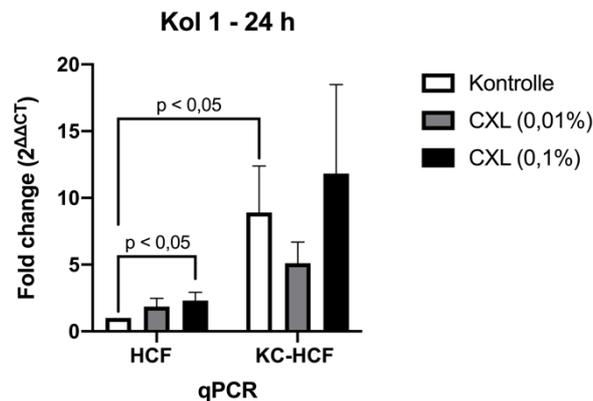
## Ergebnisse

### 5.4 Kollagen 1

Die Untersuchung der Kollagen 1-mRNA-Genexpression erfolgte 24 h nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung (Abb. 16 und Tab. 26).

Nach einer 0,01%igen-Riboflavin-UV-A-Bestrahlung konnten in der HCF-Gruppe keine signifikanten Unterschiede auf mRNA-Ebene ( $p=0,6825$  - Fold change=1,86) nachgewiesen werden. Dagegen führte eine UV-A-Bestrahlung mit einer 0,1%igen Riboflavin-Konzentration zu einem signifikanten Anstieg der Kol 1-mRNA-Genexpression ( $p=0,0286$  - Fold change=2,30).

Innerhalb der KC-HCF-Gruppe konnten keine signifikanten Auswirkungen auf die Kol 1-mRNA-Genexpression durch eine Riboflavin-UV-A-Bestrahlung festgestellt werden (0,01%-Riboflavin:  $p=0,7921$  - Fold change=5,10 / 0,1%-Riboflavin:  $p=0,6938$  - Fold change=11,81). Im Vergleich zur Kontrollgruppe der HCF bestand eine signifikant höhere Kol 1-mRNA-Genexpression in der Kontrollgruppe der KC-HCF ( $p=0,0019$  - Fold change=8,91).



**Abbildung 16:** Genexpressionsdaten von Kol 1 24 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

Eine UV-A-Bestrahlung mit einer Riboflavin-Konzentration von 0,1% führte in der HCF Gruppe zu einem signifikanten Genexpressionsanstieg ( $p=0,0286$ ). Die Kol 1-mRNA-Genexpression war in der KC-HCF-Kontrollgruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe der HCF ( $p=0,0019$ ).

**Tabelle 26:** Fold changes und p-Werte der Kol 1-mRNA-Genexpression in der HCF- und KC-HCF-Gruppe 24 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

\* p-Wert: Vergleich zwischen der HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

\*\* p-Wert: Vergleich zwischen der KC-HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

Versuchsgruppe		Fold change	* p-Wert	** p-Wert
<b>HCF</b>	Kontrolle	1,00	-	-
	CXL (0,01%)	1,86	0,6825	-
	CXL (0,1%)	2,30	<b>0,0286</b>	-
<b>KC-HCF</b>	Kontrolle	8,91	<b>0,0019</b>	-
	CXL (0,01%)	5,10	-	0,7921
	CXL (0,1%)	11,81	-	0,6938

## Ergebnisse

Die Ergebnisse der Western-Blot-Messung sind der folgenden Tabelle zu entnehmen (Tab. 27).

In der HCF-Gruppe waren nach UV-A-Bestrahlung keine signifikanten Veränderungen auf Proteinebene zu messen (0,01%-Riboflavin:  $p=0,6095$  / 0,1%-Riboflavin:  $p=0,6429$ ).

Dagegen konnte man in der KC-HCF-Gruppe durch die UV-A-Bestrahlung mit einer Riboflavin-Konzentration von 0,01% eine signifikante Erhöhung der Kol 1-Proteinexpression feststellen ( $p=0,0424$ ). Mit einer höheren Riboflavin-Konzentration (0,1%) waren nach einer UV-A-Bestrahlung sowohl in der HCF- als auch in der KC-HCF-Gruppe keine signifikanten Proteinexpressionsveränderungen vorhanden ( $p=0,5167$ ).

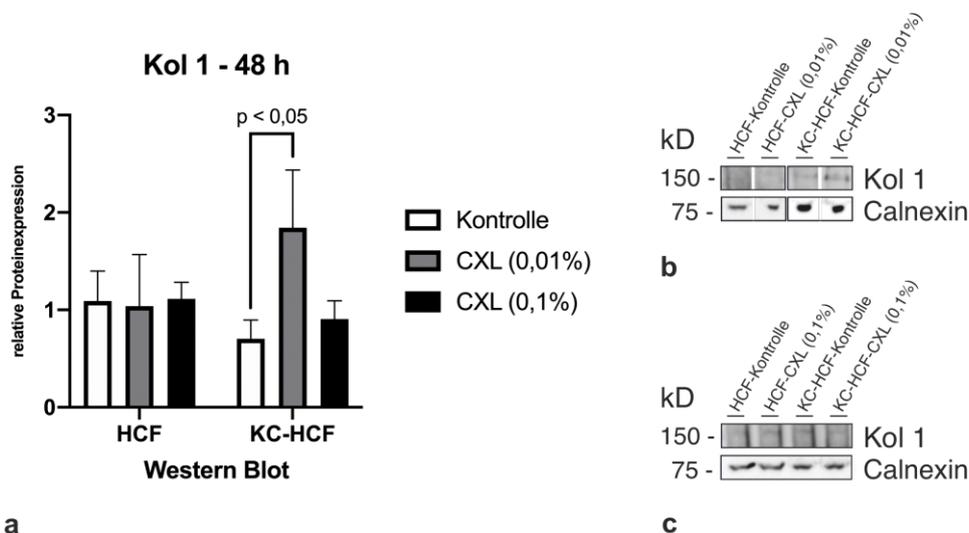
Zwischen der HCF- und KC-HCF-Kontrollgruppe lag kein signifikanter Proteinexpressionsunterschied vor ( $p=0,3660$ ) (Abb. 17).

**Tabelle 27:** Proteinexpressionsdaten von Kol 1 in der HCF- und KC-HCF-Gruppe 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

\* p-Wert: Vergleich zwischen der HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

\*\* p-Wert: Vergleich zwischen der KC-HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

Versuchsgruppe		Durchschnittlicher Kol 1-Calnexin-Quotient	* p-Wert	** p-Wert
<b>HCF</b>	Kontrolle	1,09	-	-
	CXL (0,01%)	1,03	0,6095	-
	CXL (0,1%)	1,11	0,6429	-
<b>KC-HCF</b>	Kontrolle	0,70	0,3660	-
	CXL (0,01%)	1,84	-	<b>0,0424</b>
	CXL (0,1%)	0,90	-	0,5167



**Abbildung 17:** Darstellung der Kol 1-Proteinexpression 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

**a** Densitometrische Analyse des Kol 1-Western Blots. Innerhalb der HCF-Gruppe führte eine Riboflavin-UV-A-Bestrahlung zu keinen signifikanten Veränderungen auf Proteinebene. Ein signifikanter Anstieg der Proteinexpression war in der KC-HCF-Gruppe nach einer 0,01%igen-Riboflavin-UV-A-Bestrahlung zu messen ( $p=0,0424$ ). Eine 0,1%ige-Riboflavin-UV-A-Bestrahlung führte dagegen zu keinen signifikanten Unterschieden. Ebenso konnte zwischen der HCF- und KC-HCF-Kontrollgruppe keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden. Die Darstellung zeigt den Mittelwert  $\pm$  SEM. **b,c** Darstellung repräsentativer Western Blots nach UV-A-Bestrahlung mit beiden Riboflavin-Konzentrationen (0,01% / 0,1%).

## Ergebnisse

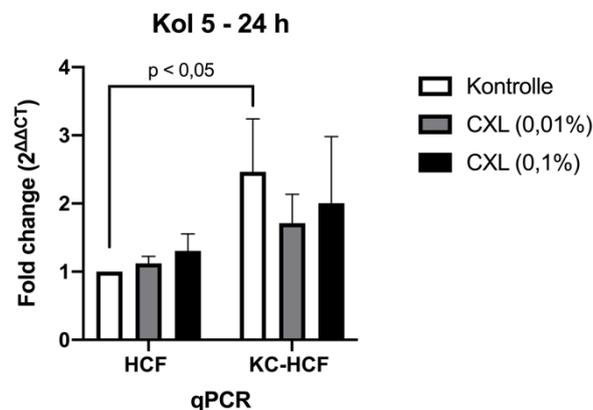
### 5.5 Kollagen 5

Die Untersuchung der Kol 5-mRNA-Genexpression erfolgte 24 h nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung (Abb. 18 und Tab. 28).

In der HCF-Gruppe waren keine signifikanten Veränderungen nach einer UV-A-Bestrahlung mit einer 0,01%igen- ( $p=0,6825$  - Fold change=1,12) oder einer 0,1%igen-Riboflavin-Konzentration ( $p=0,0971$  - Fold change=1,30) zu messen.

Auch innerhalb der KC-HCF-Gruppe konnten keine signifikanten Veränderungen durch eine Riboflavin-UV-A-Bestrahlung beobachtet werden (0,01%-Riboflavin:  $p=0,4295$  - Fold change=1,71 / 0,1%-Riboflavin:  $p=0,4623$  - Fold change=2,00).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe der HCF bestand eine signifikant höhere Kol 5-mRNA-Genexpression in der Kontrollgruppe der KC-HCF ( $p=0,0054$  - Fold change=2,46).



**Abbildung 18:** Genexpressionsdaten von Kol 5 24 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

Eine Riboflavin-UV-A-Bestrahlung führte sowohl in der HCF- als auch in der KC-HCF-Gruppe zu keinen statistisch signifikanten Veränderungen der Kol 5-Genexpression. Die Kol 5-Genexpression war in der KC-HCF-Kontrollgruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe der HCF ( $p=0,0054$ ).

**Tabelle 28:** Fold changes und p-Werte der Kol 5-mRNA-Genexpression in der HCF- und KC-HCF-Gruppe 24 h nach erfolgter Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

\* p-Wert: Vergleich zwischen der HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

\*\* p-Wert: Vergleich zwischen der KC-HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

Versuchsgruppe		Fold change	* p-Wert	** p-Wert
HCF	Kontrolle	1,00	-	-
	CXL (0,01%)	1,12	0,6825	-
	CXL (0,1%)	1,30	0,0971	-
KC-HCF	Kontrolle	2,46	<b>0,0054</b>	-
	CXL (0,01%)	1,71	-	0,4295
	CXL (0,1%)	2,00	-	0,4623

Die Ergebnisse der Western Blot-Messung (Abb. 19) zeigten keinen signifikanten Einfluss einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung auf Veränderungen der Kol 5-Proteinexpression sowohl in der HCF- als auch in der KC-HCF-Gruppe.

Es bestand kein signifikanter Proteinexpressionsunterschied zwischen der Kontrollgruppe von HCF und KC-HCF ( $p=0,1255$ ). Die jeweiligen p-Werte sind in der folgenden Tabelle aufgetragen (Tab. 29).

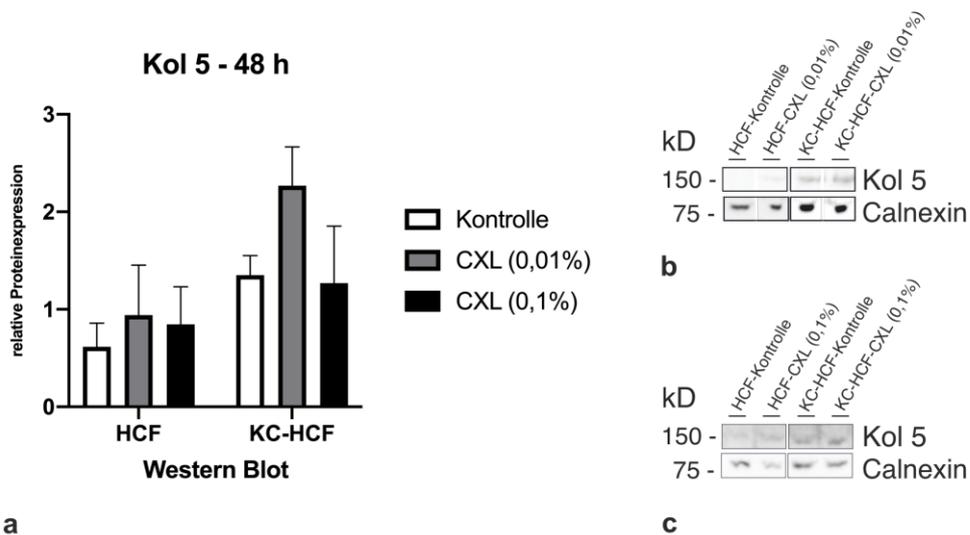
## Ergebnisse

**Tabelle 29:** Proteinexpressionsdaten von Kol 5 in der HCF- und KC-HCF-Gruppe 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

\* p-Wert: Vergleich zwischen der HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

\*\* p-Wert: Vergleich zwischen der KC-HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

Versuchsgruppe		Durchschnittlicher Kol 5-Calnexin-Quotient	* p-Wert	** p-Wert
HCF	Kontrolle	0,61	-	-
	CXL (0,01%)	0,94	0,5714	-
	CXL (0,1%)	0,84	0,8571	-
KC-HCF	Kontrolle	1,35	0,1255	-
	CXL (0,01%)	2,26	-	0,0952
	CXL (0,1%)	1,26	-	0,5714



**Abbildung 19:** Darstellung der Kol 5-Proteinexpression 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

**a** Densitometrische Analyse des Kol 5-Western Blots. Eine Riboflavin-UV-A-Bestrahlung führte in der HCF- und KC-HCF-Gruppe zu keinen statistisch signifikanten Veränderungen der Kol 5-Proteinexpression. Zwischen der HCF- und KC-HCF-Kontrollgruppe bestand kein signifikanter Kol 5-Proteinexpressionsunterschied. Die Darstellung zeigt den Mittelwert  $\pm$  SEM.

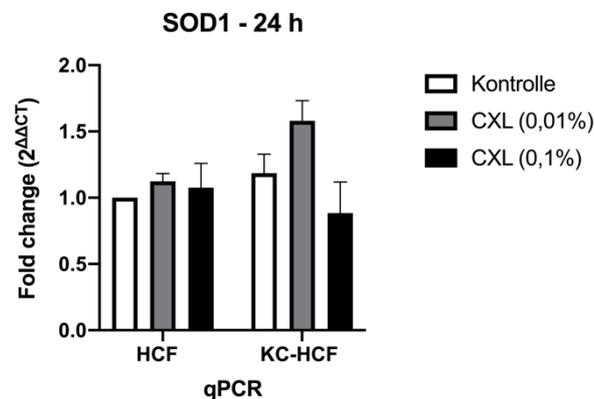
**b,c** Darstellung repräsentativer Western Blots nach UV-A-Bestrahlung mit beiden Riboflavin-Konzentrationen (0,01% / 0,1%).

## Ergebnisse

### 5.6 Superoxiddismutase 1

Die mRNA-Genexpression wurde für SOD1 24 h (Abb. 20 und Tab. 30) und 48 h (Abb. 21 und Tab. 31) nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung bestimmt.

Nach 24 h konnten weder in der HCF- noch in der KC-HCF-Gruppe signifikante Genexpressionsveränderungen nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung beobachtet werden. Es waren keine signifikanten Unterschiede in der HCF-Gruppe nachweisbar (0,01%-Riboflavin:  $p=0,1270$  - Fold change=1,12 / 0,1%-Riboflavin:  $p=0,3636$  - Fold change=1,07). Dasselbe galt für eine Riboflavin-UV-A-Bestrahlung in der KC-HCF-Gruppe (0,01%-Riboflavin:  $p=0,0653$  - Fold change=1,58 / 0,1%-Riboflavin:  $p=0,1921$  - Fold change=0,88). Zwischen den Kontrollgruppen bestand kein signifikanter Unterschied auf mRNA-Ebene ( $p=0,4042$  - Fold change=1,18).



**Abbildung 20:** Genexpressionsdaten von SOD1 24 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

Nach 24 h führte eine Riboflavin-UV-A-Bestrahlung zu keinen signifikanten Veränderungen der SOD1-mRNA-Genexpression. Ebenfalls konnte zwischen der HCF- und KC-HCF Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied gemessen werden.

**Tabelle 30:** Fold changes und p-Werte der SOD1-mRNA-Genexpression in der HCF- und KC-HCF-Gruppe 24 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

\* p-Wert: Vergleich zwischen der HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

\*\* p-Wert: Vergleich zwischen der KC-HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

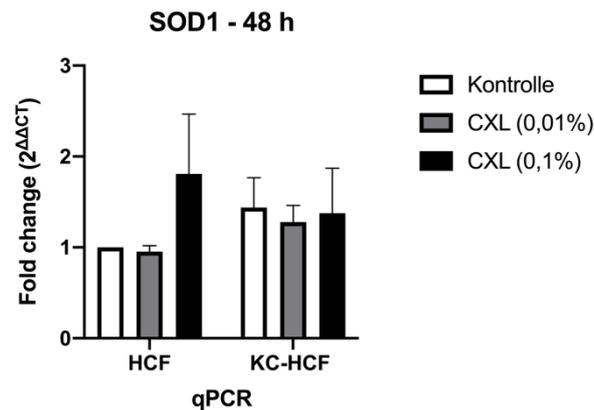
Versuchsgruppe		Fold change	* p-Wert	** p-Wert
HCF	Kontrolle	1,00	-	-
	CXL (0,01%)	1,12	0,1270	-
	CXL (0,1%)	1,07	0,3636	-
KC-HCF	Kontrolle	1,18	0,4042	-
	CXL (0,01%)	1,58	-	0,0653
	CXL (0,1%)	0,88	-	0,1921

## Ergebnisse

Selbiges gilt für die Genexpressionsanalyse nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung zum späteren Zeitpunkt (48 h).

Sowohl in der HCF- (0,01%-Riboflavin:  $p=0,1270$  - Fold change=0,95 / 0,1%-Riboflavin:  $p=0,3630$  - Fold change=1,80) als auch in der KC-HCF-Gruppe (0,01%-Riboflavin:  $p=0,6216$  - Fold change=1,27 / 0,1%-Riboflavin:  $p=0,5138$  - Fold change=1,37) konnten keine signifikanten Veränderungen gezeigt werden.

Ebenso bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe von HCF- und KC-HCF ( $p=0,4042$  - Fold change=1,43).



**Abbildung 21:** Genexpressionsdaten von SOD1 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung  
Auch 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung konnten keine statistisch signifikanten Veränderungen der SOD1-mRNA-Genexpression festgestellt werden. Es bestand ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollgruppen von HCF- und KC-HCF.

**Tabelle 31:** Fold changes und p-Werte der SOD1-mRNA-Genexpression in der HCF- und KC-HCF-Gruppe 48 h nach erfolgter Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

\* p-Wert: Vergleich zwischen der HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

\*\* p-Wert: Vergleich zwischen der KC-HCF-Kontrollgruppe und der dazugehörigen Versuchsgruppe

Versuchsgruppe		Fold change	* p-Wert	** p-Wert
<b>HCF</b>	Kontrolle	1,00	-	-
	CXL (0,01%)	0,95	0,1270	-
	CXL (0,1%)	1,80	0,3630	-
<b>KC-HCF</b>	Kontrolle	1,43	0,4042	-
	CXL (0,01%)	1,27	-	0,6216
	CXL (0,1%)	1,37	-	0,5138

## Ergebnisse

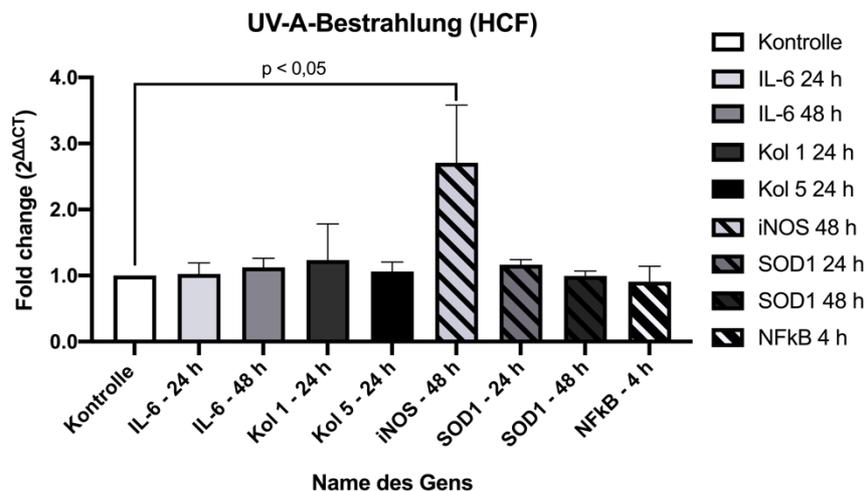
### 5.7 Genexpressionsuntersuchung einer alleinigen UV-A-Bestrahlung

Zu den Vorversuchen zählte die Untersuchung potentieller Auswirkungen einer alleinigen UV-A-Bestrahlung auf die Expression ausgewählter Gene. Die statistische Auswertung erfolgte mit einer ANOVA.

In der HCF-Gruppe zeigte eine alleinige UV-A-Bestrahlung lediglich für iNOS eine signifikante Genexpressionserhöhung ( $p=0,0132$ ). Die weiteren Gene wurden durch eine alleinige UV-A-Bestrahlung nicht beeinflusst (Abb. 22). Zur besseren Darstellung ist dies in der folgenden Tabelle aufgetragen (Tab. 32).

**Tabelle 32:** Expressionsdaten ausgewählter Gene mit Zeitpunkt der Genexpressionsmessung nach alleiniger UV-A-Bestrahlung in der HCF-Gruppe

Gen (HCF)	Fold-change	p-Wert
Interleukin-6 24 h	1,02	0,9999
Interleukin-6 48 h	1,12	0,9997
Kollagen 1 24 h	1,23	0,9974
Kollagen 5 24 h	1,06	0,9999
Induzierbare NO-Synthase 48 h	2,71	<b>0,0132</b>
Superoxiddismutase 1 24 h	1,16	0,9996
Superoxiddismutase 1 48 h	0,99	0,9999
Nukleärer Faktor kappa B 4 h	0,91	0,9997



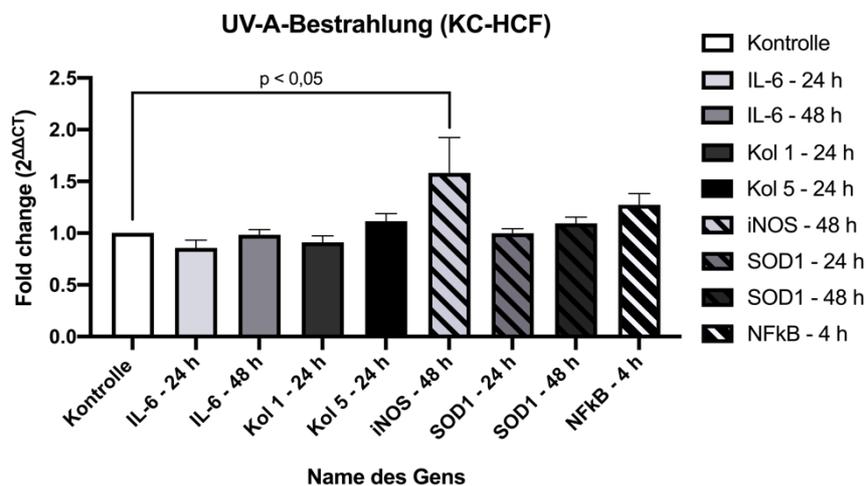
**Abbildung 22:** Genexpressionsdaten einer alleinigen UV-A-Bestrahlung in der HCF-Gruppe  
Eine alleinige UV-A-Bestrahlung führte in der HCF-Gruppe zu einem signifikanten iNOS-mRNA-Genexpressionsanstieg. Als Kontrolle dienten unbehandelte korneale Fibroblasten aus gesunden Hornhäuten.

## Ergebnisse

Auch in der KC-HCF-Gruppe (Abb. 23) führte eine alleinige UV-A-Bestrahlung lediglich bei iNOS zu einem signifikanten Genexpressionsanstieg. Die weiteren Expressionsdaten sind in Tabelle 33 veranschaulicht.

**Tabelle 33:** Expressionsdaten ausgewählter Gene mit Zeitpunkt der Genexpressionsmessung nach alleiniger UV-A-Bestrahlung in der KC-HCF-Gruppe

Gen (KC-HCF)	Fold-change	p-Wert
Interleukin-6 24 h	0,85	0,9659
Interleukin-6 48 h	0,98	0,9999
Kollagen 1 24 h	0,91	0,9972
Kollagen 5 24 h	1,11	0,9899
Induzierbare NO-Synthase 48 h	1,58	<b>0,0198</b>
Superoxiddismutase 1 24 h	0,99	0,9999
Superoxiddismutase 1 48 h	1,09	0,9969
Nukleärer Faktor kappa B 4 h	1,27	0,5557



**Abbildung 23:** Genexpressionsdaten einer alleinigen UV-A-Bestrahlung in der KC-HCF-Gruppe  
Eine alleinige UV-A-Bestrahlung führte in der KC-HCF-Gruppe zu einem signifikanten iNOS-mRNA-Genexpressionsanstieg. Als Kontrolle dienten unbehandelte korneale Fibroblasten aus KC-Hornhäuten.

## 6 Diskussion

### 6.1 Unterschiede im Expressionsprofil inflammatorischer Marker (NFkB, iNOS, IL-6) zwischen unbehandelten gesunden und Keratokonus-Fibroblasten

#### 6.1.1 Unterschiede im Expressionsprofil von NFkB in Keratokonus-Fibroblasten im Vergleich zu gesunden kornealen Fibroblasten

Zur NFkB-Familie zählen fünf verschiedenen Proteinen (p65 (RelA), RelB, c-Rel, p105/p50 (NF-kB1), p100/52 (NF-kB2)), die ein Homo- oder Heterodimer bilden, um als Transkriptionsfaktor an der DNA binden zu können [77,86]. Der NFkB wird unter anderem durch den Einfluss von Zytokinen, Infektionen oder als Folge einer zellulären Stressantwort wie beispielsweise durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und den Einfluss einer Gamma- und UV-Strahlung aktiviert [86]. Hierdurch reguliert der Transkriptionsfaktor NFkB zahlreiche Gene, die mit Apoptose, Zellüberleben, Proliferation oder der Immun- und Entzündungsantwort in Verbindung stehen [86]. In dieser Arbeit wurde die Expression der p65 Untereinheit als Teil der NFkB-Familie gemessen.

Im Vergleich zu HCF konnte eine erhöhte NFkB-mRNA-Genexpression in KC-HCF ( $p=0,0002$ ) festgestellt werden, jedoch ohne signifikanten Unterschied auf Proteinebene. Stachon et al. konnte neben einer erhöhten NFkB-mRNA-Genexpression auch eine erhöhte NFkB-Proteinexpression in KC-HCF nachweisen [108]. Es wird angenommen, dass NFkB an der Regulation von mehr als 500 Genen beteiligt ist, weshalb dessen exakte Rolle bei KC nur vermutet werden kann. Hierzu zählen vor allem Gene, die mit Entzündungen assoziiert sind [41]. Sowohl die iNOS- [79] als auch die IL-6-Genexpression [66] kann durch NFkB reguliert werden. Eine Interaktion zwischen NFkB als Regulator von iNOS oder IL-6 könnte somit auf eine inflammatorische Komponente bei KC hindeuten.

Der TNF- $\alpha$  könnte ebenfalls eine bedeutende Rolle bei KC einnehmen, der unter anderem an Nekrose, Apoptose sowie an akuten und chronischen Infektionen beteiligt ist [19]. Bei KC wurde neben einer erhöhten TNF- $\alpha$ -Konzentration in der Tränenflüssigkeit [7], Einzelnukleotidpolymorphismen im Bereich des TNF- $\alpha$ -Gens, erhöhten TNF- $\alpha$ -Serumwerten auch eine erhöhte TNF- $\alpha$ -mRNA-Genexpression im kornealen Gewebe bei KC nachgewiesen [4]. Die Studie von Mohan et al. zeigte, dass TNF- $\alpha$  die Apoptose von kornealen Fibroblasten bei gleichzeitiger Hemmung von NFkB erhöht. Infolgedessen wäre es vorstellbar, dass NFkB als Regulator der TNF- $\alpha$ -vermittelten Apoptose das Zellüberleben kornealer Fibroblasten beeinflusst [78].

Im Hinblick auf die erhöhte NFkB-Genexpression in KC-HCF sollte eine pathologische metabolische Funktion in Betracht gezogen werden. Die Arbeitsgruppe um Karamichos et al. konnte in mehreren Studien einen veränderten Metabolismus bei KC nachweisen. Unter

## Diskussion

anderem wurden metabolische Veränderungen in der Tränenflüssigkeit von KC-Patienten gemessen, die sich auf die KC-Progression auswirken könnten [58]. Eine erniedrigte Glutathion-Konzentration sowie ein erhöhter Lactat-Pyruvat-Quotient weisen auf eine veränderte Stoffwechsellage mit erhöhtem oxidativem Stress hin. Ebenso waren Metaboliten von Harnstoff- und Citratzyklus in der Tränenflüssigkeit von KC-Patienten verändert [58]. Daneben konnte im Zellkultorexperiment ein erhöhter oxidativer Stress in kornealen Zellen von KC-Patienten beschrieben werden, weshalb eine zugrundeliegende metabolische Fehlfunktion bei KC vermutet werden könnte [57].

### 6.1.2 Unterschiede im Expressionsprofil von iNOS in Keratokonus-Fibroblasten im Vergleich zu gesunden kornealen Fibroblasten

Die induzierbare NO-Synthase ist eines von drei Schlüsselenzymen, die Stickstoffmonoxid (NO) aus der Aminosäure L-Arginin erzeugen. Das von iNOS synthetisierte NO ist bei zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen von Bedeutung [63].

Im Vergleich zur HCF-Gruppe war die iNOS-Genexpression in KC-HCF um das 8-fache erhöht ( $p=0,0019$ ). Eine signifikant erhöhte iNOS-mRNA-Genexpression in KC-HCF konnte bereits von Stachon et al. beschrieben werden. Auf Proteinebene bestanden jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen HCF und KC-HCF [108].

Im Rahmen einer entzündlichen Reaktion ist die iNOS an der zellulären Stressantwort beteiligt und wird unter anderem von proinflammatorischen Zytokinen wie dem Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und dem Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) reguliert [96]. Trotz des fehlenden Nachweises einer erhöhten TNF- $\alpha$ - und IFN- $\gamma$ -Membranrezeptorexpression bei KC-HCF [28], ist eine Beteiligung beider Entzündungsmediatoren an der Pathogenese des KC vorstellbar. Diese Aussage stützt sich auf die Tatsache, dass erhöhte TNF- $\alpha$ - und IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in der Tränenflüssigkeit bei KC-Patienten gemessen werden konnten [7,46,64]. Eine Wechselwirkung zwischen iNOS und NF $\kappa$ B könnte hierbei von wesentlicher Bedeutung sein. Das von iNOS synthetisierte NO führt zur S-Nitrosylierung der Histondeacetylase Sirtuin-1 (SIRT1). Infolgedessen entfällt die hemmende Wirkung von SIRT1, was mit einer verstärkten NF $\kappa$ B-Aktivität einhergeht [79,99].

Die iNOS-Genexpression könnte möglicherweise infolge einer gesteigerten Entzündungsaktivität bei KC erhöht sein.

### 6.1.3 Unterschiede im Expressionsprofil von IL-6 in Keratokonus-Fibroblasten im Vergleich zu gesunden kornealen Fibroblasten

Der Entzündungsmarker IL-6 zählt zur Gruppe der Zytokine und wird mit chronischen Entzündungen in Verbindung gebracht [31]. Die IL-6-Synthese kann unter anderem durch weitere Interleukine wie beispielsweise IL-17 gefördert werden, welches ebenfalls in erhöhter

## Diskussion

Konzentration in der Tränenflüssigkeit von KC-Patienten gemessen werden konnte [50]. Hierbei ist zu erwähnen, dass Assoziationen zwischen IL-6 und KC in der Literatur mehrfach beschrieben wurden [7,50,64], jedoch ist dessen funktionelle Rolle gegenwärtig noch nicht geklärt. Die in der Tränenflüssigkeit von KC-Patienten erhöhte IL-6-Konzentration könnte auf eine lokale entzündliche Komponente hinweisen [7,64].

In dieser Arbeit zeigten die unbehandelten KC-HCF im Gegensatz zu den unbehandelten HCF eine erniedrigte IL-6-mRNA-Genexpression ( $p=0,0057$ ) nach 24 h. Es stellt sich die Frage, welchen Einfluss das IL-6 auf die KC-Pathogenese ausüben könnte und wie die Ergebnisse dieser Arbeit unter Berücksichtigung der momentanen Studienlage zu bewerten sind. Die Studie von Du et al. konnte sowohl eine höhere IL-6- als auch eine höhere MMP-1-Gen- und Proteinexpression in KC-HCF zeigen [24]. Die Inkubation einer KC-HCF-Zellkultur mit TNF- $\alpha$  führte unter Beteiligung von IL-6 zu einer erhöhten MMP-1-mRNA- und Proteinexpression in KC-HCF [24]. Somit wäre es denkbar, dass das IL-6 direkt am Umbauprozess beteiligt sein könnte. Durch die Beeinflussung der Matrixmetalloproteasen und dem damit verbundenen Abbau der Kollagenfasern könnte die biomechanische Stabilität der Hornhaut vermindert werden [7,24].

Eine fortschreitende stromale Verdünnung der Hornhaut wird von mikrostrukturellen Veränderungen begleitet. Die dadurch entstehenden Mikroverletzungen der Kornea könnten ebenfalls einen Einfluss auf die IL-6-Synthese ausüben, da ein positiver Einfluss des IL-6 auf die epitheliale Wundheilung der Kornea beschrieben wurde [83].

Atopische Erkrankungen, die mit chronischem Augenreiben einhergehen oder das Tragen formstabiler Kontaktlinsen wurden ebenfalls mit der Entwicklung eines KC in Verbindung gebracht [33,42]. Sowohl das Augenreiben als auch die Anwendung formstabiler Kontaktlinsen führten zu einer erhöhten IL-6-Konzentration in der Tränenflüssigkeit, wodurch sich eine lokale inflammatorische Reaktion durch Erhöhung der Zytokine bei KC erklären lassen könnte [8,98]. Zudem wurde eine Beeinflussung der Kollagenexpression durch IL-6 beschrieben, worauf im entsprechenden Unterkapitel eingegangen wird [2,25].

### 6.2 Veränderungen im Expressionsprofil inflammatorischer Marker (NFkB, iNOS, IL-6) nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

#### 6.2.1 Veränderungen im Expressionsprofil von NFkB in gesunden und Keratokonus-Fibroblasten nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

Bereits 1993 konnte gezeigt werden, dass eine photodynamische Therapie die NFkB-DNA-Bindungsaktivität um das 10-fache erhöht [93]. In dieser Arbeit führte eine 0,01%ige Riboflavin-Konzentration in beiden Gruppen zu keinen signifikanten Genexpressionsveränderungen. Im Gegensatz dazu konnte eine erhöhte NFkB-mRNA-Genexpression nach einer 0,1%igen-Riboflavin-UV-A-Bestrahlung lediglich in der HCF-Gruppe ( $p=0,0286$ ) gemessen werden. Somit zeigten KC-HCF im Vergleich zu HCF eine veränderte Reaktion auf eine Riboflavin-UV-A-Bestrahlung. Ebenso ging eine 0,01%ige-Riboflavin-UV-A-Bestrahlung mit keinen signifikanten Auswirkungen der NFkB-mRNA-Genexpression einher. Dies deutet darauf hin, dass eine zu geringe Riboflavin-Konzentration die Zellen nicht wesentlich beeinflusst. Die beschriebene Genexpressionserhöhung in HCF nach einer 0,1%igen-Riboflavin-UV-A-Bestrahlung könnte dazu führen, dass regulatorische Prozesse im Rahmen einer Entzündungsreaktion in Gang gesetzt werden.

Zudem wäre eine Gegenregulation der HCF denkbar, die das Zellüberleben durch die antiapoptische Eigenschaft von NFkB nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung verbessert [86]. Die KC-HCF könnten aufgrund einer zugrundeliegenden zellulären Stoffwechselstörung eine reduzierte Gegenregulation auf diesen induzierten Stress aufweisen.

#### 6.2.2 Veränderungen im Expressionsprofil von iNOS in gesunden und Keratokonus-Fibroblasten nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

In dieser Arbeit konnten weder in der HCF- noch in der KC-HCF-Gruppe Auswirkungen auf die iNOS-Gen- und Proteinexpression nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung festgestellt werden. In der Literatur wurden Veränderungen der iNOS nach einer photodynamischen Therapie beschrieben. Fahey et. al zeigten, dass eine Bestrahlung von Tumorzellen mit einem Photosensibilisator nicht nur mit einer erhöhten iNOS-Proteinexpression, sondern auch mit einem Anstieg des von iNOS erzeugten Stickstoffmonoxids (NO) einhergeht [29]. Das NO vermittelte zytoprotektive Effekte, indem es das Überleben von Tumorzellen nach einer PDT verbesserte. Durch eine Behandlung mithilfe eines iNOS-Blockers (1400W) wurde die Apoptose der Tumorzellen signifikant erhöht. Die Autoren schließen daraus, dass die Stress-induzierte iNOS gemeinsam mit dem produzierten NO zytoprotektive Effekte vermitteln könnte [29]. Es konnte gezeigt werden, dass der bei einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung induzierte Zellstress nicht zwingend mit einem Einfluss auf die iNOS-Gen- und

## Diskussion

Proteinexpression bei HCF und KC-HCF einhergehen muss. Im Hinblick auf metabolische Veränderungen bei KC und eine bereits erhöhte iNOS-Genexpression bei unbehandelten KC-HCF (Fold change=7,71) könnte eine weitere Expressionsänderung nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung aufgrund einer eingeschränkten zellulären Regulationsfähigkeit erschwert sein.

### 6.2.3 Veränderungen im Expressionsprofil von IL-6 in gesunden und Keratokonus-Fibroblasten nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

In dieser Arbeit wurde neben der IL-6-mRNA-Genexpression auch die IL-6-Konzentrationen im Zelllysat und im Zellkulturüberstand nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung bestimmt. Die HCF-Gruppe zeigte eine 3,5-fache Erhöhung ( $p=0,0286$ ) der IL-6-mRNA-Genexpression für den Zeitraum von 48 h nach erfolgter 0,1%iger-Riboflavin-UV-A-Bestrahlung. In der KC-HCF-Gruppe konnte dies nicht beobachtet werden. Sowohl in der HCF- ( $p=0,0485$ ) als auch in der KC-HCF-Gruppe ( $p=0,0485$ ) führte eine UV-A-Bestrahlung mit einer 0,1%igen-Riboflavin-Konzentration zum IL-6-Konzentrationsanstieg im Zellkulturüberstand.

Lediglich in der KC-HCF-Gruppe erhöhte sich die IL-6-Konzentration im Zelllysat nach einer 0,01%igen- ( $p=0,0357$ ) und einer 0,1%igen-Riboflavin-UV-A-Bestrahlung ( $p=0,0357$ ). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass insbesondere bei KC-HCF eine inflammatorische Reaktion nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung auftrat. Damit in Einklang stehen die Ergebnisse von Song et al., die in ihrer Studie eine Abnahme der Zellviabilität sowie eine Zunahme der Apoptose in KC-HCF nach einer 0,1%igen-Riboflavin-UV-A-Bestrahlung feststellen konnten [104]. Es deutet darauf hin, dass die KC-HCF aufgrund einer vorbestehenden pathologischen metabolischen Funktion den induzierten Stress nicht ausreichend kompensieren könnten.

In *in-vivo* Versuchen wurde eine erhöhte IL-6-mRNA- und Proteinexpression nach photodynamischer Therapie bei Tumorzellen bereits 1998 beschrieben [39]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die gesteigerte IL-6-mRNA- und Proteinexpression nach einer photodynamischen Therapie hauptsächlich durch den Transkriptionsfaktor Aktivator-Protein-1 und nicht durch NF $\kappa$ B reguliert wird [61].

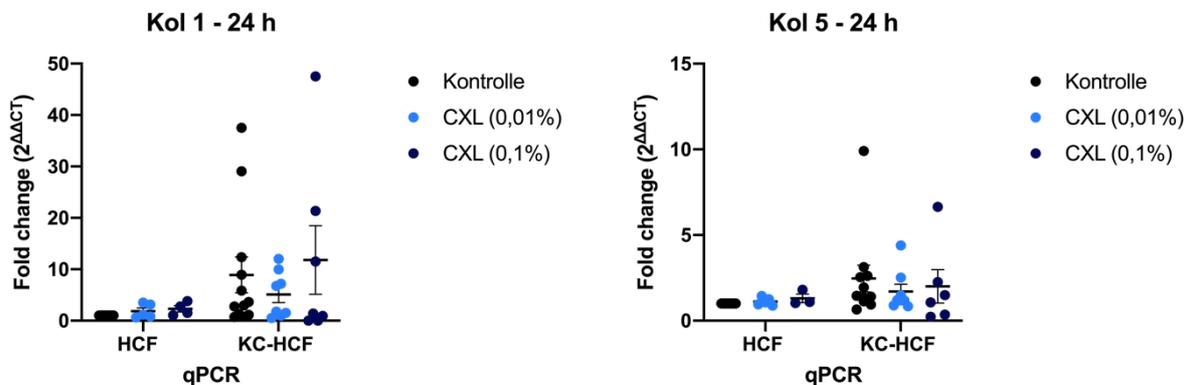
Die im Rahmen der Riboflavin-UV-A-Bestrahlung durch ROS auftretenden DNA-Schäden führen zu einer vermehrten Apoptose [76,104]. Sowohl Apoptose wie auch Nekrose wurden im Rahmen einer photodynamischen Therapie beschrieben und gehen in der Regel ineinander über. Letzteres wird entweder durch eine zu hohe Konzentration des Photosensibilisators oder durch eine zu starke Bestrahlung ausgelöst [80]. Eine erhöhte IL-6-Produktion steht hauptsächlich mit einer Nekrose und weniger mit einer Apoptose in Verbindung. Daher könnte die IL-6-Erhöhung nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung auch auf eine erhöhte Nekroserate zurückzuführen sein [115].

## Diskussion

Andererseits konnte gezeigt werden, dass das IL-6 die induzierte Apoptose bei oxidativen Schäden hemmen kann [67]. Außerdem wurde eine Beteiligung des IL-6 an der DNA-Reparatur beschrieben [18]. Insofern wäre es denkbar, dass die Erhöhung der IL-6-Konzentration im Zellysat und im Zellkulturüberstand nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung auch antiapoptotische Effekte ausübt, und sich somit positiv auf das Zellüberleben auswirken könnte.

### 6.3 Unterschiede im Expressionsprofil von Kollagen 1 und 5 in Keratokonus-Fibroblasten im Vergleich zu gesunden kornealen Fibroblasten und deren Veränderungen nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

In dieser Arbeit konnte sowohl für Kol 1 ( $p=0,0019$ ) als auch für Kol 5 ( $p=0,0054$ ) eine erhöhte mRNA-Genexpression bei KC-HCF gemessen werden. Auf Proteinebene bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen HCF und KC-HCF. Im Rahmen der Genexpressionsmessung war eine größere Streuung der Einzelwerte in der KC-HCF-Gruppe auffällig, welche durch eine erneute Messung reproduzierbar waren (Abb. 24). Dies deutet darauf hin, dass sich die Genexpression innerhalb der KC-Patienten deutlich unterscheidet und möglicherweise vom KC-Stadium, von der Aktivität des KC oder von der Morphologie der Hornhaut abhängig sein könnte.



**Abbildung 24:** Darstellung der Einzelwerte der Kol 1- und Kol-5-Genexpressionsmessung 24 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

Innerhalb der KC-HCF-Gruppe zeigte sich eine deutliche Streuung der Einzelwerte sowohl in den Kontroll- als auch in den Versuchsgruppen nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung.

Sharif et al. untersuchte die Kollagen-Proteinexpression in einer 3D-Zellkultur und zeigte, dass das Kol 1 stärker in den KC-HCF exprimiert war, jedoch ohne signifikanten Unterschied zu den HCF. Die Kol 5-Proteinexpression war hingegen bei KC-HCF signifikant höher als in den HCF [102].

In der Studie von Foster et al. konnte eine quantitative Verminderung des extrazellulären Kollagens mithilfe mit einer Spezialfärbung (Sirius Red/Fast Green-Färbung) bei KC-HCF nachgewiesen werden. Außerdem wurde eine signifikante Abnahme des Hitzeschockproteins 47 (HSP47) in KC-HCF beschrieben, welches an der korrekten Faltung des Prokollagens und an der Ausschleusung des Proteins aus der Zelle beteiligt ist [30].

Es wäre denkbar, dass das intrazelluläre Kol in KC-HCF quantitativ erhöht und in der Extrazellulärmatrix erniedrigt sein könnte. Dies lässt entweder eine erniedrigte Sekretionsfähigkeit oder eine Synthesestörung vermuten. Aufgrund verschiedener posttranslationaler Störungen wäre eine inkorrekte Faltung des Kollagens möglich, wodurch dieses nicht ausreichend ausgeschleust werden könnte und infolgedessen in der Zelle

## Diskussion

akkumuliert. Zusätzlich könnte das inkorrekt gefaltete Kollagen eine erniedrigte biomechanische Stabilität aufweisen, was im Laufe der Erkrankung zur charakteristischen Verdünnung der Kornea führt.

Veränderungen des IL-6-Stoffwechsels bei KC-HCF wurden bereits an voriger Stelle genannt. Zusätzlich ist das IL-6 in der Lage, die Kollagensynthese zu fördern [2,25]. So konnte im Tierversuch ein fibrotischer Umbauprozess des Herzens durch eine IL-6-Mitbeteiligung beschrieben werden [75]. Im Zellkulturversuch mit kardialen Fibroblasten führte eine IL-6-Inkubation zum signifikanten Anstieg der Proliferationsrate und der Kol 1-Synthese. Hierbei wurde dem TGF- $\beta$ 1 eine zentrale Bedeutung zugemessen, der durch IL-6 signifikant erhöht wurde. Die Studie schließt aus ihren Ergebnissen, dass der TGF- $\beta$ 1 einen entscheidenden Einfluss auf die profibrotische Wirkung des IL-6 ausüben könnte [120].

Eine TGF- $\beta$ 1-Inkubation führte bei HCF zu einer gesteigerten Kol 3-Sekretion. Bei KC-HCF bestand bereits eine erhöhte Kol 3-Sekretion, wodurch sich keine signifikanten Veränderungen nach TGF- $\beta$ 1-Inkubation ergaben [56]. Als fibrotischer Marker wird das Kol 3 im Rahmen einer Narbenbildung im kornealen Stroma vermehrt gebildet [55]. Durch eine nachgewiesene TGF- $\beta$ 1-Genexpressionserhöhung in KC-HCF ist eine mögliche Beteiligung am Umbauprozess des kornealen Stromas vorstellbar [95]. Daneben kann auch die Kol 5-mRNA-Genexpression durch TGF- $\beta$ 1 gesteigert werden [51]. Demzufolge wäre eine Interaktion zwischen IL-6, TGF- $\beta$ 1 und dem Kol 1 oder 5 durchaus vorstellbar. Expressionsänderungen von Kol 1 und 5 wurden ebenfalls nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung betrachtet, um neben den Kollagenquervernetzungen auch potentielle Auswirkungen auf die Kollagenexpression durch ein CXL zu untersuchen.

Eine UV-A-Bestrahlung mit einer 0,1%igen-Riboflavin-Konzentration führte lediglich in der HCF-Gruppe ( $p=0,0019$ ) zu einem Anstieg der Kol 1-Genexpression. Zusätzlich erhöhte sich die Kol 1-Proteinexpression in der KC-HCF-Gruppe ( $p=0,0424$ ) nach einer 0,01%igen-Riboflavin-UV-A-Bestrahlung. Die Studie von Sharif et al. konnte eine signifikante Abnahme der Kol 1- und der Kol 5-Proteinexpression bei KC-HCF in einer 3D-Zellkultur nach einer 0,1%igen-Riboflavin-UV-A-Bestrahlung beschreiben. Derartige Veränderungen konnten in HCF jedoch nicht gemessen werden [102].

Die Wirkung des kornealen CXL beruht hauptsächlich auf der Entstehung weiterer Quervernetzungen zwischen den Kollagenmolekülen, die durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies entstehen. Hierbei werden kovalente Bindungen zwischen den Carbonylgruppen der Kollagenmoleküle infolge der ROS-Produktion geschaffen [90]. Änderungen auf RNA- und Proteinebene sind durchaus möglich und konnten sowohl in dieser Arbeit wie auch in der Arbeit von Sharif et al. beschrieben werden. Inwiefern sich die Ergebnisse beider Arbeiten vergleichen lassen steht ebenfalls zur Diskussion, da berücksichtigt werden muss, dass die Gruppe um Sharif et al. eine 3D-Zellkultur verwendete,

## Diskussion

was eine Reproduzierbarkeit und Interpretation ihrer Ergebnisse mit denen dieser Arbeit nur bedingt zulässt. 3D-Zellkulturen unterscheiden sich von konventionellen Zellkulturen in der Zellmorphologie, -polarität, -teilung und zellulären Interaktionen [54].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Riboflavin-UV-A-Bestrahlung durchaus einen Einfluss auf die Kollagenexpression haben könnte. Inwiefern diese Veränderungen aber von zellbiologischer oder klinischer Relevanz sein könnten, muss kritisch hinterfragt werden.

### 6.4 Auswirkungen auf das antioxidative Enzym Superoxiddismutase 1 nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung

Reaktive Sauerstoffspezies werden hauptsächlich von den Mitochondrien gebildet und sind in einer geringen Konzentration an physiologischen Zellfunktionen beteiligt [84]. Die anfallenden reaktiven Sauerstoffspezies werden unter anderem durch antioxidative Enzyme wie die SOD1 neutralisiert. Übersteigt die ROS-Produktion jedoch das physiologische Gleichgewicht, entsteht infolgedessen eine verstärkte zelluläre Stressreaktion, wodurch es zum Auftreten von DNA-, Lipid- oder Proteinschäden kommen kann [84].

Eine mögliche Assoziation zwischen oxidativen Schäden und der KC-Pathogenese wird vermutet, da man in KC-Hornhäuten eine gesteigerte Akkumulation zytotoxischer Nebenprodukte der Lipidperoxidation und von NO vorfinden konnte [13]. Zusätzlich ist die Kornea aufgrund ihrer anatomischen Lage ständigen Umwelteinflüssen wie beispielsweise der Sonneneinstrahlung ausgesetzt [60]. Kenney et al. stellten die Hypothese auf, dass durch Einwirkung verschiedener Faktoren (UV-B-Licht, mechanische Verletzungen, Atopie) die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies gefördert wird. Der anfallende oxidative Stress resultiert zusammen mit einer reduzierten Aktivität antioxidativer Enzyme in einer oxidativen Schädigung der Kornea [60]. Es wird vermutet, dass die SOD1 als Kandidatengen bei KC maßgeblich an der Krankheitsentstehung beteiligt sein könnte. Diese Aussage stützt sich auf die Tatsache, dass man Deletionen und Veränderungen der RNA-Prozessierung im SOD1-Gen bei KC-Patienten nachweisen konnte [114].

In dieser Arbeit bestanden keine signifikanten SOD1-mRNA-Genexpressionsunterschiede zwischen HCF und KC-HCF. Damit in Einklang stehen die Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe, die ebenfalls keine differenziellen Genexpressionsunterschiede zwischen gesunden und KC-Hornhäuten messen konnten [95]. Daher muss nicht zwangsläufig eine veränderte SOD1-Genexpression vorliegen. Vielmehr könnte eine eingeschränkte Aktivität des SOD1-Proteins für mögliche pathologische Veränderungen verantwortlich sein [114].

Im Rahmen einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung wird oxidativer Stress durch die Eigenschaft des Riboflavins als Photosensibilisator in Verbindung mit UV-A-Licht herbeigeführt, sodass man potentielle SOD-1-Veränderungen nach einer solchen Behandlung untersuchte. Eine erhöhte Apoptoserate bei KC-HCF nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung könnte auf eine erniedrigte antioxidative Enzymaktivität zurückzuführen sein [60,104]. Die Durchführung des CXL sollte jedoch möglichst nicht mit einer verstärkten Keratozyten-Apoptose einhergehen, welche vorwiegend im anterioren Stroma beschrieben wurde. In dieser Arbeit konnten keine signifikanten Genexpressionsänderungen von SOD1 nach einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung gemessen werden.

Es wäre vorstellbar, dass die verwendete Riboflavin-Konzentration in Verbindung mit der UV-A-Bestrahlung keine Gegenregulation der kornealen Fibroblasten notwendig werden lässt.

## Diskussion

Auch im Tierversuch wurden keine Veränderungen der SOD1-Aktivität nach einer 30-minütigen Riboflavin-UV-A-Bestrahlung gemessen [113].

Das Riboflavin ist nicht nur an der Produktion freier Radikale beteiligt, sondern ist als Radikalfänger auch in der Lage, ein Gleichgewicht zwischen der Bildung und Eliminierung reaktiver Sauerstoffspezies zu schaffen, wodurch es zu keiner Änderung der SOD1-mRNA-Genexpression kommen könnte [107].

Die bei Tumorerkrankungen durchgeführte photodynamische Therapie, die ein deutlich intensiveres Bestrahlungs-Protokoll beinhaltet, verfolgt das Ziel eine möglichst große Anzahl an Zellen abzutöten. Bei malignen Meningeomzellen führte eine photodynamische Therapie zu keinen signifikanten Veränderungen der SOD1-mRNA-Genexpression [110]. Im Gegensatz dazu zeigten Adenokarzinom-Zellen des Kolons eine signifikante Erhöhung der zytosolischen SOD1-Aktivität [94].

Natürlich muss man berücksichtigen, dass die Aktivität von SOD1 durch den verwendeten Photosensibilisator, die Bestrahlungsintensität und den jeweiligen Zelltypen beeinflusst werden kann. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine Riboflavin-UV-A-Bestrahlung nicht zwangsläufig mit einer SOD-1-mRNA-Genexpressionsveränderung einhergehen muss.

### 6.5 Abschließende Bewertung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit den Auswirkungen einer Riboflavin-UV-A-Bestrahlung im Hinblick auf potentielle Veränderungen der Gen- und Proteinexpression. Zusätzlich wurden Expressionsunterschiede zwischen unbehandelten gesunden und erkrankten Fibroblasten betrachtet.

Die Expression von Genen, die mit einer Inflammation (iNOS, NFκB, IL-6) in Verbindung stehen, waren in KC-HCF verändert, was auf eine zugrundeliegende entzündliche Komponente bei KC hinweisen könnte. Zudem führte eine 0,1%ige-Riboflavin-UV-A-Bestrahlung in beiden Gruppen zu einem Anstieg der IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand. Lediglich bei KC-HCF konnte ein Anstieg der intrazellulären IL-6-Konzentration nach einer UV-A-Bestrahlung mit beiden Riboflavin-Konzentrationen nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass eine vorbestehende pathologische Funktion bei KC-HCF, die Kompensation des induzierten Zellstress erschwert und die Zellen daraufhin mit einer erhöhten IL-6-Synthese im Rahmen einer inflammatorischen Antwort reagieren könnten.

Die unbehandelte KC-HCF-Gruppe zeigte eine höhere Kol 1- und Kol 5-Genexpression, was auf einen beeinträchtigten Kollagenstoffwechsels bei KC hindeuten könnte. Die erhöhte Steifigkeit der Kornea nach einem CXL ist wahrscheinlich nicht auf Expressionsveränderungen der Keratozyten, sondern hauptsächlich auf die entstehenden Quervernetzungen zwischen den Kollagenen zurückzuführen, die durch den oxidativen Stress entstehen.

Es bestanden weder bei HCF noch bei KC-HCF signifikante SOD1-Veränderungen nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung, was möglicherweise auf eine ausreichende Kompensationsfähigkeit der Fibroblasten hinweisen könnte.

Dennoch müssen sämtliche Ergebnisse unter Berücksichtigung mehrerer Einflussfaktoren beurteilt werden und kritisch hinterfragt werden.

Zum einen stellt das avaskuläre Stroma ein nährstoffarmes Gewebe dar, weshalb *in-vitro* Versuche eine limitierende Aussagekraft besitzen. Die isolierten Keratozyten differenzierten sich im Laufe der Zellkultivierung durch den Einfluss des Zellkulturmediums und des fetalen Kälberserums in Fibroblasten. Zudem wurde gezeigt, dass Keratozyten in einem Glukose-reduzierten Medium nicht nur ihre charakteristische Morphologie, sondern auch ihre Oberflächenmarker beibehalten und keinen fibroblastenähnlichen Phänotyp einnehmen [30]. In den *in-vitro* Versuchen dieser Arbeit herrschte somit ein Nährstoffangebot vor, welches in diesem Ausmaß im kornealen Stroma nicht vorhanden ist und wahrscheinlich einen bedeutenden Einfluss auf die Gen- und Proteinexpression ausüben könnte.

Ein weiterer Einflussfaktor sind Expressionsveränderungen, die aufgrund einer zunehmenden Zellpassage entstehen. In niedrigen Zellpassagen sezernierten Keratozyten

## Diskussion

signifikant weniger Kol 1 als dermale Fibroblasten. Dieser Unterschied wurde mit einer steigenden Zellpassage aufgehoben, was darauf schließen lässt, dass der spezifische Keratozyten-Phänotyp im Laufe der Kultivierung verloren geht [91].

Natürlich muss man auch berücksichtigen, dass durch die Verwendung einer 2D-Zellkultur keinesfalls ein realistisches Modell verwendet werden konnte, welches den Eigenschaften einer humanen Kornea am ehesten entspricht.

Hierbei ist zu erwähnen, dass die Sättigung des kornealen Stromas mit Riboflavin konzentrationsabhängig abnimmt. Die Keratozyten des anterioren Stromas sind während eines CXL einer anderen Konzentration ausgesetzt als Keratozyten im Bereich des posterioren Stromas. Dies könnte möglicherweise mit einer erhöhten Keratozyten-Apoptose im anterioren Stroma zusammenhängen [76].

Zudem können Gen- und Proteinexpressionsunterschiede durchaus von der Grunderkrankung abhängig sein. Die Indikation einer Keratoplastik kann im Rahmen einer refraktiven Visusbeeinträchtigung (z.B. hoher Astigmatismus) oder aufgrund einer morphologischen Veränderung (z.B. stromale Narbenbildung) gestellt werden. Eine Keratoplastik kann somit an einer narbenfreien oder an einer vernarbten Hornhaut erfolgen. Fibroblasten einer vernarbten KC-Hornhaut könnten beispielsweise aufgrund einer unterschiedlichen Extrazellulärmatrix ein verändertes Expressionsprofil aufweisen als Fibroblasten einer nicht-vernarbten KC-Hornhaut [72]. Dasselbe gilt auch für gesunde Hornhäute, die aufgrund verschiedener Kriterien nicht für eine Transplantation geeignet waren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in KC-HCF im Vergleich zu HCF durchaus veränderte metabolische Funktionen bestanden. Es ist zu klären, inwieweit sich korneale Fibroblasten von Keratozyten unterscheiden. Dies könnte beispielsweise durch eine Kultivierung der isolierten Keratozyten in einem nährstoffarmen und Glukose-reduzierten Kulturmedium erfolgen, sodass eine Differenzierung in Fibroblasten unterbleibt. Über eine Optimierung zukünftiger Zellkulturexperimente (bspw. als 3D-Zellkultur) sollte ebenfalls nachgedacht werden.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Abalain JH, Dossou H, Colin J, Floch HH (2000) Levels of collagen degradation products (telopeptides) in the tear film of patients with keratoconus. *Cornea* 19:474–476
2. Andersen MB, Pingel J, Kjær M, Langberg H (2011) Interleukin-6: A growth factor stimulating collagen synthesis in human tendon. *J Appl Physiol* 110:1549–1554
3. Appelbaum A (1936) Keratoconus. *Arch Ophthalmol* 15:900–921
4. Arbab M, Tahir S, Niazi MK, Ishaq M, Hussain A, Siddique PM, Saeed S, Khan WA, Qamar R, Butt AM, Azam M (2017) TNF- $\alpha$  genetic predisposition and higher expression of inflammatory pathway components in keratoconus. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 58:3481–3487
5. Aslan L, Aslankurt M, Yüksel E, Özdemir M, Aksakal E, Gümüşalan Y, Özdemir G (2013) Corneal thickness measured by Scheimpflug imaging in children with Down syndrome. *J AAPOS* 17:149–152
6. Balasubramanian SA, Pye DC, Willcox MDP (2012) Levels of lactoferrin, secretory IgA and serum albumin in the tear film of people with keratoconus. *Exp Eye Res* 96:132–137
7. Balasubramanian SA, Mohan S, Pye DC, Willcox MDP (2012) Proteases, proteolysis and inflammatory molecules in the tears of people with keratoconus. *Acta Ophthalmol* 90:303–309
8. Balasubramanian SA, Pye DC, Willcox MDP (2013) Effects of eye rubbing on the levels of protease, protease activity and cytokines in tears: Relevance in keratoconus. *Clin Exp Optom* 96:214–218
9. Bawazeer AM, Hodge WG, Lorimer B, Rapuano CJ (2001) Atopy and keratoconus: A multivariate analysis. *Evidence-Based Eye Care* 2:84–85
10. Behndig A, Karlsson K, Johansson BO, Brännström T, Marklund SL (2001) Superoxide dismutase isoenzymes in the normal and diseased human cornea. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 42:2293–2296
11. Belin MW, Duncan JK (2016) Keratoconus: The ABCD Grading System. *Klin Monbl Augenheilkd* 233:701–707
12. Boote C, Dennis S, Meek K (2004) Spatial mapping of collagen fibril organisation in primate cornea - An X-ray diffraction investigation. *J Struct Biol* 146:359–367
13. Buddi R, Lin B, Atilano SR, Zorapapel NC, Kenney MC, Brown DJ (2002) Evidence of oxidative stress in human corneal diseases. *J Histochem Cytochem* 50:341–351
14. Bühren J, Bischoff G, Kohnen T (2011) Keratokonus: Klinik, Diagnostik, Therapiemöglichkeiten. *Klin Monbl Augenheilkd* 228:932–942
15. Bykhovskaya Y, Li X, Epifantseva I, Haritunians T, Siscovick D, Aldave A, Szczotka-

## Literaturverzeichnis

- Flynn L, Iyengar SK, Taylor KD, Rotter JI, Rabinowitz YS (2012) Variation in the lysyl oxidase (LOX) gene is associated with keratoconus in family-based and case-control studies. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 53:4152–4157
16. Chakravarti S, Magnuson T, Lass JH, Jepsen KJ, LaMantia C, Carroll H (1998) Lumican regulates collagen fibril assembly: Skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *J Cell Biol* 141:1277–1286
  17. Chang HYP, Chodosh J (2013) The genetics of keratoconus. *Semin Ophthalmol* 28:275–280
  18. Chen Y, Zhang F, Tsai Y, Yang X, Yang L, Duan S, Wang X, Keng P, Lee SO (2015) IL-6 signaling promotes DNA repair and prevents apoptosis in CD133+ stem-like cells of lung cancer after radiation. *Radiat Oncol* 10:1–10
  19. Chu WM (2013) Tumor necrosis factor. *Cancer Lett* 328:222–225
  20. Colin J, Cochener B, Savary G, Malet F (2000) Correcting keratoconus with intracorneal rings. *J Cataract Refract Surg* 26:1117–1122
  21. Davidson AE, Hayes S, Hardcastle AJ, Tuft SJ (2014) The pathogenesis of keratoconus. *Eye* 28:189–195
  22. DelMonte DW, Kim T (2011) Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg* 37:588–598
  23. Downie LE, Lindsay RG (2015) Contact lens management of keratoconus. *Clin Exp Optom* 98:299–311
  24. Du G, Liu C, Li X, Chen W, He R, Wang X, Feng P, Lan W (2016) Induction of matrix metalloproteinase-1 by tumor necrosis factor- $\alpha$  is mediated by interleukin-6 in cultured fibroblasts of keratoconus. *Exp Biol Med* 241:2033–2041
  25. Dufour AM, Alvarez M, Russo B, Chizzolini C (2018) Interleukin-6 and Type-I collagen production by systemic sclerosis fibroblasts are differentially regulated by interleukin-17A in the presence of transforming growth factor-beta 1. *Front Immunol* 9:1–13
  26. Eghrari AO, Riazuddin SA, Gottsch JD (2015) Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development. *Prog Mol Biol Transl Sci* 134:7–23
  27. Evangelista CB, Hatch KM (2018) Corneal Collagen Cross-Linking Complications. *Semin Ophthalmol* 33:29–35
  28. Fabre EJ, Bureau J, Pouliquen Y, Lorans G (1991) Binding sites for human interleukin 1  $\alpha$ , gamma interferon and tumor necrosis factor on cultured fibroblasts of normal cornea and keratoconus. *Curr Eye Res* 10:585–592
  29. Fahey JM, Girotti AW (2017) Nitric oxide-mediated resistance to photodynamic therapy in a human breast tumor xenograft model: Improved outcome with NOS2 inhibitors. *Nitric Oxide - Biol Chem* 62:52–61
  30. Foster JW, Shinde V, Soiberman US, Sathe G, Liu S, Wan J, Qian J, Dauoud Y,

## Literaturverzeichnis

- Pandey A, Jun AS, Chakravarti S (2018) Integrated stress response and decreased ECM in cultured stromal cells from keratoconus corneas. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 59:2977–2986
31. Gabay C (2006) Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther* 8:1–6
  32. Galvis V, Tello A, Ortiz AI, Escaf LC (2017) Patient selection for corneal collagen cross-linking: An updated review. *Clin Ophthalmol* 11:657–668
  33. Gasset AR, Houde WL, Garcia-Bengochea M (1978) Hard contact lens wear as an environmental risk in keratoconus. *Am J Ophthalmol* 85:339–341
  34. Georgiou T, Funnell CL, Cassels-Brown A, O’Conor R (2004) Influence of ethnic origin on the incidence of keratoconus and associated atopic disease in Asians and white patients. *Eye* 18:379–383
  35. Girard MT, Matsubara M, Fini ME (1991) Transforming growth factor- $\beta$  and interleukin-1 modulate metalloproteinase expression by corneal stromal cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 32:2441–2454
  36. Godefrooij DA, de Wit GA, Uiterwaal CS, Imhof SM, Wisse RPL (2017) Age-specific Incidence and Prevalence of Keratoconus: A Nationwide Registration Study. *Am J Ophthalmol* 175:169–172
  37. Goebels S, Eppig T, Seitz B, Langenbucher A (2013) Früherkennung des Keratokonus – systemassistierte Screening-Verfahren heute. *Klin Monbl Augenheilkd* 230:998–1004
  38. Goebels S, Käsmann-Kellner B, Eppig T, Seitz B, Langenbucher A (2015) Can retinoscopy keep up in keratoconus diagnosis? *Contact Lens Anterior Eye* 38:234–239
  39. Gollnick SO, Musser DA, Henderson BW (1998) Photodynamic therapy affects the expression of IL6 and IL10 in vivo. *Proc SPIE - Int Soc Opt Eng* 3254:19–26
  40. Grehn F (2019) *Augenheilkunde*. 32. Auflage. Springer Verlag
  41. Gupta SC, Sundaram C, Reuter S, Aggarwal BB (2010) Inhibiting NF- $\kappa$ B activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* 1799:775–787
  42. Harrison RJ, Klouda PT, Easty DL, Manku M, Stewart JCCM (1989) Association between keratoconus and atopy. *Br J Ophthalmol* 73:816–822
  43. Herchenhan A, Uhlenbrock F, Eliasson P, Weis M, Eyre D, Kadler KE, Magnusson SP, Kjaer M (2015) Lysyl oxidase activity is required for ordered collagen fibrillogenesis by tendon cells. *J Biol Chem* 290:16440–16450
  44. Hoyer A, Spoerl E, Pillunat LE (2010) Kollagenvernetzung mit Riboflavin und UVA-Licht. *Klin Monbl Augenheilkd* 227:723–728
  45. Hwang S, Lim DH, Chung TY (2018) Prevalence and Incidence of Keratoconus in

## Literaturverzeichnis

- South Korea: A Nationwide Population-based Study. *Am J Ophthalmol* 192:56–64
46. Ionescu IC, Corbu C, Tanase C, Ionita G, Nicula C, Coviltir V, Vasile P, Constantin M, Codrici E, Mihai S, Popescu D, Enciu A-M, Dascalescu D, Burcel M, Ciuluvica R, Voinea L (2018) Overexpression of tear inflammatory cytokines as additional finding in keratoconus patients and their first degree family members. *Mediators Inflamm* 13:1–9
  47. Jacobsen IE, Jensen OA, Prause JU (1984) Structure and composition of Bowman's membrane. Study by frozen resin cracking. *Acta Ophthalmol* 62:39–53
  48. Johnson DH, Bourne WM, Campbell RJ (1983) The ultrastructure of Descemet's membrane. I. Changes with age in normal corneas. *Arch Ophthalmol* 100:1942–1947
  49. Juarranz Á, Jaén P, Sanz-Rodríguez F, Cuevas J, González S (2008) Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clin Transl Oncol* 10:148–154
  50. Jun AS, Cope L, Speck C, Feng X, Lee S, Meng H, Hamad A, Chakravarti S (2011) Subnormal cytokine profile in the tear fluid of keratoconus patients. *PLoS One* 6:e16437
  51. Kahai S, Vary CPH, Gao Y, Seth A (2004) Collagen, type V,  $\alpha 1$  (COL5A1) is regulated by TGF- $\beta$  in osteoblasts. *Matrix Biol* 23:445–455
  52. Kamiya K, Ishii R, Shimizu K, Igarashi A (2014) Evaluation of corneal elevation, pachymetry and keratometry in keratoconic eyes with respect to the stage of Amsler-Krumeich classification. *Br J Ophthalmol* 98:459–463
  53. Kanski J, Bowling B (2012) *Klinische Ophthalmologie*. 7. Auflage. Elsevier Urban&Fischer Verlag
  54. Kapalczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, Ibbs M, Bliźniak R, Łuczewski Ł, Lamperska K (2016) 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci* 14:910–919
  55. Karamichos D, Guo XQ, Hutcheon AEK, Zieske JD (2010) Human corneal fibrosis: An in vitro model. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 51:1382–1388
  56. Karamichos D, Zareian R, Guo X, Hutcheon A, Ruberti J, Zieske J (2012) Novel in Vitro Model for Keratoconus Disease. *J Funct Biomater* 3:760–775
  57. Karamichos D, Hutcheon AEK, Rich CB, Trinkaus-Randall V, Asara JM, Zieske JD (2014) In vitro model suggests oxidative stress involved in keratoconus disease. *Sci Rep* 4:1–7
  58. Karamichos D, Zieske JD, Sejersen H, Sarker-Nag A, Asara JM, Hjortdal J (2015) Tear metabolite changes in keratoconus. *Exp Eye Res* 132:1–8
  59. Kennedy RH, Bourne WM, Dyer JA (1986) A 48-year clinical and epidemiologic study of keratoconus. *Am J Ophthalmol* 101:267–273
  60. Kenney MC, Brown DJ (2003) The cascade hypothesis of keratoconus. *Contact Lens Anterior Eye* 26:139–146

## Literaturverzeichnis

61. Kick G, Messer G, Goetz A, Plewig G, Kind P (1995) Photodynamic therapy induces expression of interleukin 6 by activation of AP-1 but not NF-kappa B DNA binding. *Cancer Res* 55:2373–2379
62. Kohlhaas M (2008) Kollagen-Crosslinking mit Riboflavin und UVA-Licht beim Keratokonus. *Ophthalmologe* 105:785–796
63. Lechner M, Lirk P, Rieder J (2005) Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: The two sides of the same coin. *Semin Cancer Biol* 15:277–289
64. Lema I, Durán JA (2005) Inflammatory molecules in the tears of patients with keratoconus. *Ophthalmology* 112:654–659
65. Li X, Bykhovskaya Y, Canedo ALC, Haritunians T, Siscovick D, Aldave AJ, Szczotka-Flynn L, Iyengar SK, Rotter JI, Taylor KD, Rabinowitz YS (2013) Genetic association of COL5A1 variants in keratoconus patients suggests a complex connection between corneal thinning and keratoconus. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 54:2696–2704
66. Libermann TA, Baltimore D (1990) Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol* 10:2327–2334
67. Lin MT, Juan CY, Chang KJ, Chen WJ, Kuo ML (2001) IL-6 inhibits apoptosis and retains oxidative DNA lesions in human gastric cancer AGS cells through up-regulation of anti-apoptotic gene mcl-1. *Carcinogenesis* 22:1947–1953
68. Marshall GE, Konstas AG, Lee WR (1991) Immunogold fine structural localization of extracellular matrix components in aged human cornea - I. Types I-IV collagen and laminin. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 229:157–163
69. Marshall GE, Konstas AG, Lee WR (1991) Immunogold fine structural localization of extracellular matrix components in aged human cornea - II. Collagen types V and VI. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 229:164–171
70. Mathew JH, Goosey JD, Söderberg PG, Bergmanson JPG (2015) Lamellar changes in the keratoconic cornea. *Acta Ophthalmol* 93:767–773
71. Matthaei M, Sandhaeger H, Hermel M, Adler W, Jun AS, Cursiefen C, Heindl LM (2017) Changing indications in penetrating keratoplasty: A systematic review of 34 years of global reporting. *Transplantation* 101:1387–1399
72. Maycock NJR, Marshall J (2014) Genomics of corneal wound healing: A review of the literature. *Acta Ophthalmol* 92:1–15
73. McKay, Priyadarsini, Karamichos (2019) Mechanisms of Collagen Crosslinking in Diabetes and Keratoconus. *Cells* 8:1239
74. Meek KM, Tuft SJ, Huang Y, Gill PS, Hayes S, Newton RH, Bron AJ (2005) Changes in collagen orientation and distribution in keratoconus corneas. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 46:1948–1956
75. Meléndez GC, McLarty JL, Levick SP, Du Y, Janicki JS, Brower GL (2010) Interleukin

## Literaturverzeichnis

- 6 mediates myocardial fibrosis, concentric hypertrophy, and diastolic dysfunction in rats. *Hypertension* 56:225–231
76. Messmer EM, Meyer P, Herwig MC, Loeffler KU, Schirra F, Seitz B, Thiel M, Reinhard T, Kampik A, Auw-Haedrich C (2013) Morphological and immunohistochemical changes after corneal cross-linking. *Cornea* 32:111–117
77. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A (2016) Signaling via the NF $\kappa$ B system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 8:227–241
78. Mohan RR, Mohan RR, Kim WJ, Wilson SE (2000) Modulation of TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in corneal fibroblasts by transcription factor NF- $\kappa$ B. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 41:1327–1336
79. Morris KR, Lutz RD, Choi HS, Kamitani T, Chmura K, Chan ED (2003) Role of the NF- $\kappa$ B signaling pathway and  $\kappa$ B cis-regulatory elements on the IRF-1 and iNOS promoter regions in mycobacterial lipoarabinomannan induction of nitric oxide. *Infect Immun* 71:1442–1452
80. Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB, Hamblin MR (2011) Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers (Basel)* 3:2516–2539
81. Nakayasu T, Tanaka M, Konomi H, Hayashi T (1986) Distribution of types I, II, III, IV and V collagen in normal and keratoconus corneas. *Ophthalmic Res* 18:1–10
82. Nakazawa H, Chang K, Shinozaki S, Yasukawa T, Ishimaru K, Yasuhara S, Yu YM, Martyn JAJ, Tompkins RG, Shimokado K, Kaneki M (2017) iNOS as a driver of inflammation and apoptosis in mouse skeletal muscle after burn injury: Possible involvement of sirt1 S- nitrosylation-mediated acetylation of p65 NF $\kappa$ B and p53. *PLoS One* 12:1–18
83. Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T, Hikida M (1992) Interleukin 6 facilitates corneal epithelial wound closure in vivo. *Arch Ophthalmol* 110:1292–1294
84. Nita M, Grzybowski A (2016) The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. *Oxid Med Cell Longev* 2016:1–23
85. Obata H, Tsuru T (2007) Corneal wound healing from the perspective of keratoplasty specimens with special reference to the function of the Bowman layer and Descemet membrane. *Cornea* 26:82–89
86. Oeckinghaus A, Ghosh S (2009) The NF- $\kappa$ B family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:1–15
87. Pearson AR, Soneji B, Sarvananthan N, Sanford-Smith JH (2000) Does ethnic origin influence the incidence or severity of keratoconus? *Eye* 14:625–628
88. Rabinowitz YS, Nesburn AB, McDonnell PJ (1993) Videokeratography of the fellow

## Literaturverzeichnis

- eye in unilateral keratoconus. *Ophthalmology* 100:181–186
89. Rabinowitz YS (1998) Keratoconus. *Surv Ophthalmol* 42:297–319
  90. Raiskup F, Spoerl E (2013) Corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A. I. Principles. *Ocul Surf* 11:65–74
  91. Ravelojaona V, Robert AM, Robert L, Renard G (2008) Collagen biosynthesis in cell culture: Comparison of corneal keratocytes and skin fibroblasts. Effect of rhamnose-rich oligo- and polysaccharides. *Pathol Biol* 56:66–69
  92. Romero-Jiménez M, Santodomingo-Rubido J, Wolffsohn JS (2010) Keratoconus: A review. *Contact Lens Anterior Eye* 33:157–166
  93. Ryter SW, Gomer CJ (1993) Nuclear Factor kB binding activity in mouse L1210 cells following photofrin II- mediated photosensitization. *Photochem Photobiol* 58:753–756
  94. Saczko J, Kulbacka J, Chwilkowska A, Pola A, Lugowski M, Marcinkowska A, Malarska A, Banas T (2007) Cytosolic superoxide dismutase activity after photodynamic therapy, intracellular distribution of Photofrin II and hypericin, and P-glycoprotein localization in human colon adenocarcinoma. *Folia Histochem Cytobiol* 45:93–97
  95. Saeed-Rad S, Raoofian R, Mahbod M, Miraftab M, Mojarrad M, Asgari S, Rezvan F, Hashemi H (2013) Analysis of superoxide dismutase 1, dual-specificity phosphatase 1, and transforming growth factor, beta 1 genes expression in keratoconic and non-keratoconic corneas. *Mol Vis* 19:2501–2507
  96. Salim T, Sershen CL, May EE (2016) Investigating the role of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  activation on the dynamics of iNOS gene expression in LPS stimulated macrophages. *PLoS One* 11:e0153289
  97. Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE (2005) Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res* 81:247–264
  98. Schultz CL, Kunert KS (2000) Interleukin-6 levels in tears of contact lens wearers. *J Interf Cytokine Res* 20:309–310
  99. Seitz B, Behrens A, Langenbucher A (1997) Corneal topography. *Curr Opin Ophthalmol* 8:8–24
  100. Seitz B, Cursiefen C, El-Husseiny M, Viestenz A, Langenbucher A, Szentmáry N (2013) DALK und perforierende Laserkeratoplastik bei fortgeschrittenem Keratokonus. *Ophthalmologe* 110:839–848
  101. Seitz B, Szentmáry N, Langenbucher A, Hager T, Viestenz A, Janunts E, El-Husseiny M (2016) Perforierende Keratoplastik bei fortgeschrittenem Keratokonus - vom Hand-/Motortrepan hinauf zum Excimerlaser und zurück zum Femtosekundenlaser. *Klin Monbl Augenheilkd* 233:727–736
  102. Sharif R, Hjortdal J, Sejersen H, Frank G, Karamichos Di (2017) Human in vitro Model

## Literaturverzeichnis

- Reveals the Effects of Collagen Cross-linking on Keratoconus Pathogenesis. *Sci Rep* 7:1–11
103. Shinozaki S, Chang K, Sakai M, Shimizu N, Yamada M, Tanaka T, Nakazawa H, Ichinose F, Yamada Y, Ishigami A, Ito H, Ouchi Y, Starr ME, Saito H, Shimokado K, Stamer JS, Kaneki M (2014) Inflammatory stimuli induce inhibitory S-nitrosylation of the deacetylase SIRT1 to increase acetylation and activation of p53 and p65. *Sci Signal* 7:1–13
  104. Song X, Stachon T, Wang J, Langenbacher A, Seitz B, Szentmáry N (2015) Viability, apoptosis, proliferation, activation, and cytokine secretion of human keratoconus keratocytes after cross-linking. *Biomed Res Int* 2015:254237
  105. Spoerl E, Huhle M, Seiler T (1998) Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp Eye Res* 66:97–103
  106. Spoerl E, Wollensak G, Seiler T (2004) Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. *Curr Eye Res* 29:35–40
  107. Spoerl E, Raiskup-Wolf F, Pillunat LE (2008) Biophysikalische Grundlagen der Kollagenvernetzung. *Klin Monbl Augenheilkd* 225:131–137
  108. Stachon T, Latta L, Kolev K, Seitz B, Langenbacher A, Szentmáry N (2019) Erhöhte NF-κB- und iNOS-Expression in Keratozyten von Keratokonuspatienten – Hinweise auf eine entzündliche Komponente? *Klin Monbl Augenheilkd* doi: 10.1055/a-1002-0100
  109. Sun M, Chen S, Adams SM, Florer JB, Liu H, Kao WWY, Wenstrup RJ, Birk DE (2011) Collagen V is a dominant regulator of collagen fibrillogenesis: Dysfunctional regulation of structure and function in a corneal-stroma-specific Col5a1-null mouse model. *J Cell Sci* 124:4096–4105
  110. Takahashi T, Suzuki S, Misawa S, Akimoto J, Shinoda Y, Fujiwara Y (2018) Photodynamic therapy using talaporfin sodium induces heme oxygenase-1 expression in rat malignant meningioma KMY-J cells. *J Toxicol Sci* 43:353–358
  111. Tamura Y, Konomi H, Sawada H, Takashima S, Nakajima A (1991) Tissue distribution of type VIII collagen in human adult and fetal eyes. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 32:2636–2644
  112. Thanos S, Oellers P, Meyer Zu Hörste M, Prokosch V, Schlatt S, Seitz B, Gatziofias Z (2016) Role of thyroxine in the development of keratoconus. *Cornea* 35:1338–1346
  113. Turkcu UO, Yuksel N, Novruzlu S (2016) Protein oxidation levels after different corneal collagen cross-linking methods. *Cornea* 35:388–391
  114. Udar N, Atilano SR, Brown DJ, Holguin B, Small K, Nesburn AB, Kenney MC (2006) SOD1: A candidate gene for keratoconus. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 47:3345–3351
  115. Vanden Berghe T, Kalai M, Denecker G, Meeus A, Saelens X, Vandenabeele P

## Literaturverzeichnis

- (2006) Necrosis is associated with IL-6 production but apoptosis is not. *Cell Signal* 18:328–335
116. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T (2003) Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol* 135:620–627
117. Wollensak G, Spoerl E, Reber F, Pillunat L, Funk R (2003) Corneal endothelial cytotoxicity of riboflavin/UVA treatment in vitro. *Ophthalmic Res* 35:324–328
118. Wollensak G, Spoerl E, Wilsch M, Seiler T (2003) Endothelial cell damage after riboflavin-ultraviolet-A treatment in the rabbit. *J Cataract Refract Surg* 29:1786–1790
119. Wollensak G, Wilsch M, Spoerl E, Seiler T (2004) Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA. *Cornea* 23:503–507
120. Zhang Y, Wang JH, Zhang YY, Wang YZ, Zhao Y, Jin XX, Xue GL, Li PH, Sun YL, Huang QH, Song XT, Zhang ZR, Gao X, Yang BF, Du ZM, Pan ZW (2016) Deletion of interleukin-6 alleviated interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy of mice through affecting TGF $\beta$ 1 and miR-29 pathways. *Sci Rep* 6:1–11

## 8 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung des histologischen Aufbaus der Kornea .....	7
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung einer gesunden und einer Keratokonus-Kornea ..	10
<b>Abbildung 3:</b> Hypothetische Expressionsauswirkungen .....	18
<b>Abbildung 4:</b> Kultivierte humane korneale Fibroblasten .....	22
<b>Abbildung 5:</b> Versuchsaufbau .....	23
<b>Abbildung 6:</b> Verwendetes PCR-Profil (Eigene Darstellung) .....	27
<b>Abbildung 7:</b> Genexpressionsdaten von NFkB 24 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung ....	32
<b>Abbildung 8:</b> Darstellung der NFkB-Proteinexpression 48 h nach Riboflavin-UV-A- Bestrahlung .....	33
<b>Abbildung 9:</b> Genexpressionsdaten von iNOS 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung ....	34
<b>Abbildung 10:</b> Darstellung der iNOS-Proteinexpression 48 h nach Riboflavin-UV-A- Bestrahlung .....	35
<b>Abbildung 11:</b> Genexpressionsdaten von IL-6 24 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung .....	36
<b>Abbildung 12:</b> Genexpressionsdaten von IL-6 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung .....	37
<b>Abbildung 13:</b> IL-6-Konzentration (pg IL-6/mg Protein) im Zellkulturüberstand 24 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung .....	39
<b>Abbildung 14:</b> IL-6-Konzentration (pg IL-6/mg Protein) im Zellkulturüberstand 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung .....	41
<b>Abbildung 15:</b> Durchschnittliche IL-6-Konzentration im Zelllysat (pg IL-6/mg Protein) nach UV-A-Bestrahlung mit beiden Riboflavin-Konzentrationen (0,01% / 0,1%) für den Zeitpunkt von 48 h .....	42
<b>Abbildung 16:</b> Genexpressionsdaten von Kol 1 24 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung ...	43
<b>Abbildung 17:</b> Darstellung der Kol 1-Proteinexpression 48 h nach Riboflavin-UV-A- Bestrahlung .....	44
<b>Abbildung 18:</b> Genexpressionsdaten von Kol 5 24 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung ...	45
<b>Abbildung 19:</b> Darstellung der Kol 5-Proteinexpression 48 h nach Riboflavin-UV-A- Bestrahlung .....	46
<b>Abbildung 20:</b> Genexpressionsdaten von SOD1 24 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung .	47
<b>Abbildung 21:</b> Genexpressionsdaten von SOD1 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung .	48
<b>Abbildung 22:</b> Genexpressionsdaten einer alleinigen UV-A-Bestrahlung in der HCF-Gruppe .....	49
<b>Abbildung 23:</b> Genexpressionsdaten einer alleinigen UV-A-Bestrahlung in der KC-HCF- Gruppe .....	50
<b>Abbildung 24:</b> Darstellung der Einzelwerte der Kol 1- und Kol-5-Genexpressionsmessung 24 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung .....	57

## 9 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Verwendete Kits und Hersteller .....	19
<b>Tabelle 2:</b> Verwendete Lösungen, Medien, Puffer und Hersteller .....	19
<b>Tabelle 3:</b> Verwendete Verbrauchsmaterialien und Hersteller.....	20
<b>Tabelle 4:</b> Verwendete Geräte und Hersteller .....	20
<b>Tabelle 5:</b> Verwendete qPCR-Primer und Hersteller .....	21
<b>Tabelle 6:</b> Verwendete Western Blot-Antikörper und Hersteller .....	21
<b>Tabelle 7:</b> Einteilung der Versuchsgruppen mit der entsprechenden Intervention .....	22
<b>Tabelle 8:</b> Gruppe der alleinigen UV-A-Bestrahlung .....	23
<b>Tabelle 9:</b> Untersuchte Gene mit den jeweiligen Zeitpunkten der Expressionsmessung .....	24
<b>Tabelle 10:</b> Untersuchte Proteine mit den jeweiligen Zeitpunkten der Expressionsmessung.....	24
<b>Tabelle 11:</b> Ansatz für einen Reaktionsmix für die qPCR-Messungen .....	27
<b>Tabelle 12:</b> Verwendete Primer mit Sequenz und Amplifikationsgröße .....	28
<b>Tabelle 13:</b> Verwendete Western Blot-Antikörper mit der jeweiligen Verdünnung und Inkubationszeit .....	30
<b>Tabelle 14:</b> Fold changes und p-Werte der NFkB-mRNA-Genexpression in der HCF- und KC-HCF-Gruppe 24 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung .....	33
<b>Tabelle 15:</b> Proteinexpressionsdaten von NFkB in der HCF- und KC-HCF-Gruppe 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung.....	33
<b>Tabelle 16:</b> Fold changes und p-Werte der iNOS-mRNA-Genexpression in der HCF- und KC-HCF-Gruppe 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung .....	34
<b>Tabelle 17:</b> Proteinexpressionsdaten von iNOS in der HCF- und KC-HCF-Gruppe 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung.....	35
<b>Tabelle 18:</b> Fold changes und p-Werte der IL-6-mRNA-Genexpression in der HCF- und KC- HCF-Gruppe 24 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung. ....	37
<b>Tabelle 19:</b> Fold changes und p-Werte der IL-6-mRNA-Genexpression in der HCF- und KC- HCF-Gruppe 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung .....	38
<b>Tabelle 20:</b> Durchschnittliche IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand (pg IL-6/mg Protein) 24 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung .....	39
<b>Tabelle 21:</b> p-Werte der IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand in der HCF- und KC-HCF- Gruppe 24 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung.....	40
<b>Tabelle 22:</b> Durchschnittliche IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand (pg IL-6/mg Protein) 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung .....	40
<b>Tabelle 23:</b> p-Werte der IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand in der HCF- und KC-HCF- Gruppe 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung.....	41

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 24:</b> Durchschnittliche IL-6-Konzentration im Zelllysat (pg IL-6/mg Protein) nach UV-A-Bestrahlung mit beiden Riboflavin-Konzentrationen (0,01% / 0,1%) für den Zeitraum von 48 h .....	41
<b>Tabelle 25:</b> p-Werte der IL-6-Konzentration im Zelllysat in der HCF- und KC-HCF-Gruppe 48 h nach erfolgter Riboflavin-UV-A-Bestrahlung .....	42
<b>Tabelle 26:</b> Fold changes und p-Werte der Kol 1-mRNA-Genexpression in der HCF- und KC-HCF-Gruppe 24 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung .....	43
<b>Tabelle 27:</b> Proteinexpressionsdaten von Kol 1 in der HCF- und KC-HCF-Gruppe 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung .....	44
<b>Tabelle 28:</b> Fold changes und p-Werte der Kol 5-mRNA-Genexpression in der HCF- und KC-HCF-Gruppe 24 h nach erfolgter Riboflavin-UV-A-Bestrahlung .....	45
<b>Tabelle 29:</b> Proteinexpressionsdaten von Kol 5 in der HCF- und KC-HCF-Gruppe 48 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung .....	46
<b>Tabelle 30:</b> Fold changes und p-Werte der SOD1-mRNA-Genexpression in der HCF- und KC-HCF-Gruppe 24 h nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung .....	47
<b>Tabelle 31:</b> Fold changes und p-Werte der SOD1-mRNA-Genexpression in der HCF- und KC-HCF-Gruppe 48 h nach erfolgter Riboflavin-UV-A-Bestrahlung .....	48
<b>Tabelle 32:</b> Expressionsdaten ausgewählter Gene mit Zeitpunkt der Genexpressionsmessung nach alleiniger UV-A-Bestrahlung in der HCF-Gruppe .....	49
<b>Tabelle 33:</b> Expressionsdaten ausgewählter Gene mit Zeitpunkt der Genexpressionsmessung nach alleiniger UV-A-Bestrahlung in der KC-HCF-Gruppe .....	50

## Danksagung

### 10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionsschrift niemals zustande gekommen wäre.

Zunächst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Nóra Szentmáry, Institutsleiterin des Rolf M. Schwiete Zentrums für Limbusstammzellforschung und kongenitale Aniridie, Universität des Saarlandes, für die Überlassung des Themas und die hervorragende Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken. Durch die Anfertigung dieser Dissertation habe erste Einblicke in wissenschaftliches Arbeiten erhalten, wofür ich mich recht herzlich bedanken möchte.

Für eine exzellente Betreuung und Unterstützung möchte ich mich bei Frau Dr. Tanja Stachon bedanken, die mich in diese experimentelle Thematik eingearbeitet hat und mir jederzeit für Ratschläge und Anregungen zur Seite stand. Danke für die Betreuung, die nicht besser hätte sein können!

Herrn Dr. Lorenz Latta danke ich für die fachliche Unterstützung und die interessanten Gespräche während dieser Arbeit. Außerdem danke ich für das Korrekturlesen und die konstruktive Kritik.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Berthold Seitz, Klinikdirektor der Klinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Saarland, Homburg (Saar), für die Möglichkeit einer Promotion und Bereitstellung der Räumlichkeiten und Gerätschaften im biologischen Labor seiner Klinik.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie danke ich für die Bereitstellung der Gerätschaften zur Auswertung der Experimente dieser Arbeit.

Zuletzt danke ich meiner Familie für die uneingeschränkte Unterstützung und Motivation während meines Studiums und meiner Dissertation.

Publikationen

## 11 Publikationen

### Publikation:

Berger T, Szentmáry N, Latta L, Seitz B, Stachon T:

**NF-κB, iNOS, IL-6 and collagen 1 and 5 expression in healthy and keratoconus corneal fibroblasts after 0.1% riboflavin UV-A illumination**

Ergebnisse dieser Dissertation wurden bei Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology zur Publikation angenommen (18.12.2020).

### Präsentation:

Berger T, Szentmáry N, Latta L, Seitz B, Stachon T:

**Expressionsveränderungen inflammatorischer Marker (NFκB, iNOS und IL-6) in kornealen Keratokonus-Fibroblasten nach Riboflavin-UV-A-Bestrahlung**

Ergebnisse dieser Dissertation wurde im Rahmen eines Online-Kongresses der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft präsentiert (09.10.2020 - 11.10.2020, Berlin).

Lebenslauf

## 12 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht