

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

Leitung: Univ.-Prof. Dr. Nóra Szentmáry

**Einfluss von Retinoiden und Retinoid-Rezeptor-Antagonisten auf
die humanen Limbusepithelzelllinien L-TERT und L-W (PAX6^{+/-})**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2022

vorgelegt von

Frederika Marie Parow

geb. am 23.01.1995 in Reinbek

Tag der Promotion: 30.10.2023

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

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Nóra Szentmáry

Prof. Dr. Jörg Reichrath

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
1. Zusammenfassung/Summary	3
1.1. Zusammenfassung (Deutsch).....	3
1.2. Summary (English).....	5
2. Einleitung.....	7
2.1. Anatomie.....	7
2.1.1. Auge.....	7
2.1.2. Hornhaut	7
2.1.3. Limbus und Limbusepithelzellen.....	8
2.2. Limbusstammzellinsuffizienz und kongenitale Aniridie	10
2.2.1. Limbusstammzellinsuffizienz	10
2.2.2. Definition der kongenitalen Aniridie	11
2.2.3. Genetik der kongenitalen Aniridie	12
2.2.4. Aniridie-assoziierte Keratopathie (AAK).....	13
2.2.5. Therapie der AAK.....	14
2.3. Retinolstoffwechsel.....	15
2.3.1. Allgemeine Aspekte des Retinolstoffwechsels	15
2.3.2. Retinoidrezeptoren (RAR/RXR).....	16
2.3.3. Augenspezifische Rolle von Retinol.....	17
2.3.4. Auswirkungen von Störungen des Retinolstoffwechsels auf das menschliche Auge	17
2.3.5. Retinoidrezeptorantagonisten (RAR/RXR-Antagonisten).....	18
2.4. Einfluss von Retinolderivaten auf primäre Limbusepithelzellen im Kontext von Aniridie-relevanten Markergenen.....	19
2.4.1. Übersicht Aniridie-relevanter Gene	19
2.4.2. Stammzell- und Differenzierungsmarker.....	20
2.4.3. Korneal- und konjunktivalspezifische Strukturproteine und Adhäsionsmarker	23
2.4.4. Retinolstoffwechsel-relevante Marker	25
2.4.5. Proliferationsmarker.....	26
2.5. Immortalisierte humane Limbusepithelzellen.....	26
2.5.1. Eigenschaften von immortalisierten Zelllinien	26
2.5.2. Limbal-TERT (L-TERT)	27
2.5.3. Limbal-W (L-W).....	27
2.6. Zielsetzung dieser Arbeit	28
3. Material und Methoden.....	29
3.1. Material	29

3.2. Methoden	33
3.2.1. Zellkultur und Behandlung mit Retinolderivaten und RAR/RXR-Antagonisten	33
3.2.2. RNA-/Protein-Isolation	35
3.2.3. cDNA-Synthese und quantitative Polymerasekettenreaktion	36
3.2.4. Western Blot	39
3.2.5. Statistische Analyse	42
4. Ergebnisse	43
4.1. Genexpressionsergebnisse der Stammzell- und Differenzierungsmarker nach Behandlung von L-TERT und L-W mit Retinolderivaten, bzw. Retinoidrezeptorantagonisten.....	43
4.1.1. Genexpression von PAX6.....	43
4.1.2. Genexpression von ADH7	45
4.1.3. Genexpression von SPINK7	46
4.2. Genexpressionsergebnisse der Korneal- und konjunktival-spezifischen Strukturproteine und Adhäsionsmarker nach Behandlung von L-TERT und L-W mit Retinolderivaten, bzw. Retinoidrezeptorantagonisten	47
4.2.1. Genexpression von DSG1	47
4.2.2. Genexpression von KRT12	48
4.2.3. Genexpression von KRT3	48
4.2.4. Genexpression von KRT19	49
4.3. Genexpression Retinolstoffwechsel-relevanter Gene nach Behandlung von L-TERT und L-W mit Retinolderivaten, bzw. Retinoidrezeptorantagonisten	50
4.3.1. Genexpression von FABP5	50
4.3.2. Genexpression von PPARG	52
4.3.3. Genexpression von ELOVL7.....	53
4.4. Genexpression der Proliferationsmarker nach Behandlung von L-TERT und L-W mit Retinolderivaten, bzw. Retinoidrezeptorantagonisten	54
4.4.1. Genexpression von MKI67	54
4.5. Zusammenfassung der Ergebnisse	55
4.5.1. Genexpression.....	55
4.5.2. Proteinexpression.....	55
5. Diskussion.....	55
5.1. Interpretation der Ergebnisse	56
5.1.1. Effekt der Zelllinie.....	56
5.1.2. Effekt der Behandlung	59
5.1.3. Fazit der Ergebnisse.....	61
5.2. Unterschiede zwischen L-TERT und primären, gesunden LEZ	62
5.2.1. Veränderungen im PAX6-Gen oder PAX6-Protein in L-TERT	62
5.2.2. Geringerer basaler PAX6-Gehalt in L-TERT im Vergleich zu primären, gesunden LEZ..	62
5.2.3. Differenzierungsstörungen von L-TERT	63

5.3. Limitationen	64
5.4. Ausblick	65
6. Schlussfolgerung	66
7. Literaturverzeichnis	67
8. Abbildungsverzeichnis.....	74
9. Tabellenverzeichnis	75
10. Danksagung.....	76
11. Publikation	77
12. Lebenslauf.....	78

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
AAK	Aniridie-assoziierte Keratopathie
ACTB	Beta-Aktin
ADH	Alkoholdehydrogenase
ANOVA	Varianzanalyse
at-RA	all-trans Retinsäure
BPE	Bovine Pituitary Extract
BSA	Bovines Serum Albumin
c	Zenti (10 ⁻²)
CBBG-250	Coomassie-Brillant-Blau G-250
cDNA	Komplementäre DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CRBPI	Cellular retinol binding protein 1
Ct-Wert	cycle-threshold-Wert
Ctrl.	Kontroll
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dpt.	Dioptrien
DSG	Desmoglein
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epithel growth factor
ELOVL	Fettsäure-Elongase 7
et al	et alia
FABP	Fettsäurebindendes Protein
FC	Fold Change
FCS	Fetales Kälber Serum
g	Gramm
g	Relative Zentrifugalkraft
G-Phase	Gap-Phase
GUSB	Beta-Glucuronidase
h	Stunden
HRP	Meerrettichperoxidase
KCS	Keratoconjunktivitis sicca
kDa	Kilodalton
KRT	Keratin
KSFM	Keratinocyte serum free Medium
l	Liter
LEC	Limbal epithelial cell
LEZ	Limbusepithelzelle
LRAT	Lecithin-Retinol-Acyltransferase
LSZI	Limbusstammzellinsuffizienz
LSZT	Limbusstammzelltransplantation
m	Meter
m	Milli (10 ⁻³)
M	mol/l
M-Phase	Mitose-Phase
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
n	Nano (10 ⁻⁹)
n	Stichprobengröße
p	Signifikanzwert

PAX6	Paired-Box-Protein 6
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PK	Perforierende Keratoplastik
PMZ	post-mitotischen Zellen
PPAR	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor
qPCR	Quantitative PCR
RA	Retinsäure
RAR	Retinoic-X-Rezeptor Alpha
RBP	Retinol-Bindeprotein
Ret.	Retinol
RNA	Ribonukleinsäure
RT PCR	Echtzeit PCR
RXR	Retinoic-X-Rezeptoren
s	Sekunde
S-Phase	Synthese-Phase
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
SPINK	Serinprotease-Inhibitor vom Kazal-Typ
TAZ	transient amplifizierende Zelle
TBP	Tata-binding Protein
TERT	Telomerase-Reverse-Transkriptase
TMZ	terminal differenzierte Zellen
TTR	Transthyretin
U	Units
%	Prozent
°C	Grad Celsius

1. Zusammenfassung/Summary

1.1. Zusammenfassung (Deutsch)

Hintergrund und Ziele

Die PAX6-Haploinsuffizienz-assoziierte Aniridie ist eine seltene panokuläre Erkrankung, die unter anderem mit Limbusstammzellinsuffizienz und Aniridie-assoziiierter Keratopathie einhergeht und die Sehkraft entscheidend mindern kann. Aufgrund einer verminderten Paired-Box-Protein 6 (PAX6)-Genexpression ist vor allem die Differenzierung von Limbusepithelzellen (LEZ) zu kornealen Epithelzellen gestört. Als Ursache dafür werden Störungen im Retinolstoffwechsel und dessen Signalwegen vermutet, da Gene (wie Fettsäurebindendes Protein 5 (FABP5) und Alkoholdehydrogenase 7 (ADH7)) dieser Wege in PAX6^{+/-}-LEZ ebenfalls vermindert exprimiert werden und ein Überangebot an Retinsäure zu einem Aniridie-ähnlichen Genprofil führt, in dem Gene wie Desmolgein 1 (DSG1), Keratin 3 (KRT3) und Serinprotease-Inhibitor vom Kazal-Typ 7 (SPINK7) herunterreguliert sind.

Aniridie-Primärzellen sind sehr selten zugänglich, weshalb vergleichbare Studien zu diesem Thema bisher nur an Zellmodellen durchgeführt werden konnten. Nun soll geprüft werden, ob sich die immortalisierten Zelllinien L-TERT und L-W für zukünftige Studien eignen.

Material und Methoden

Die Zelllinien L-TERT und L-W wurden in Keratinozyten Serumfreiem Medium (KSFM) kultiviert und nach Erreichen von 90%-iger Konfluenz für 24h mit Retinoiden (Retinol oder at-Retinsäure) oder Retinoidrezeptorantagonisten (AGN oder UVI) inkubiert. Anschließend wurden mittels qPCR folgende Transkripte analysiert: die Stammzell- und Differenzierungsmarker PAX6, ADH7 und SPINK7; Strukturproteine und Adhäsionsmarker DSG1, Keratin 12 (KRT12), KRT3 und KRT19; die Retinolstoffwechsel-relevanten Marker FABP5, Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor (PPARG) und Fettsäure-Elongase 7 (ELOVL7); und zuletzt der Proliferationsmarker MKI67. Zusätzlich wurden die Proteinmengen von PAX6 und FABP5 mittels eines Western-Blots analysiert.

Ergebnisse

Signifikante Unterschiede in der basalen Genexpression der Zelllinien zeigten sich bei nur PAX6 (at-RA p=0,0001, Ret p<0,0001, AGN<0,0001, UVI p<0,0001) und KRT19 (at-RA p=0,0052, Ret p=0,0006, AGN p=0,0007, UVI p=0,0060). L-TERT-LEZ enthielten mehr PAX6, dafür aber weniger KRT19 als L-W. Die Proteinmenge in L-TERT war sowohl bei PAX6 (at-RA p<0,0001, Ret p=0,0006, AGN p=0,0010, UVI p=0,0149) als auch bei FABP5 (at-RA p=0,0272, AGN p=0,0056) signifikant höher als in L-W.

Auf Behandlung mit Retinoiden oder Retinoidrezeptorantagonisten reagierten die Zelllinien generell nur sehr schwach. Signifikant verändert war die Genexpression von PAX6 in L-TERT bei Behandlung mit Retinoiden (Hochregulierung, at-RA $p=0,0005$, Ret $p=0,0012$) und bei Behandlung mit Retinoid-Rezeptor-Antagonisten (Herunterregulierung, AGN $p=0,0124$, UVI $p=0,0305$). Sowohl in L-TERT als L-W zeigten sich signifikante Effekte der Behandlung für die Genexpression von FABP5 (L-TERT: Hochregulierung bei at-RA $p=0,0451$, L-W: Herunterregulierung bei UVI $p=0,0417$, L-TERT und L-W: Herunterregulierung bei AGN $p=0,0498$ (L-TERT) und $p<0,0265$ (L-W)) sowie PPARG (L-TERT: Hochregulierung bei at-RA $p=0,0057$, Ret $p=0,0388$ und AGN $p=0,0251$, L-W: Hochregulierung bei UVI $p=0,0429$). KRT19 war bei Behandlung mit Retinoiden (Hochregulierung, $p<0,0488$) und RAR/RXR-Antagonisten (Herunterregulierung, $p<0,0428$) nur in L-W signifikant verändert exprimiert.

Nur vereinzelt veränderten sich die Genexpression von ADH7 (L-W: Hochregulierung bei UVI $p=0,0229$), DSG1 (L-TERT: Hochregulierung bei AGN $p=0,0189$) und ELOVL7 (L-TERT: Hochregulierung bei AGN $p=0,0022$). Auf SPINK7 ($p>0,1243$), KRT3 ($p>0,2173$) sowie MKI67 ($p>0,1342$) hatte die Behandlung mit Retinoiden oder RAR/RXR-Antagonisten keinen Effekt.

Auf Proteinebene zeigten sich ebenfalls nur vereinzelt Effekte der Behandlung bei PAX6 (at-RA: Herunterregulierung bei L-TERT $p=0,0018$ und L-W $p=0,0055$, AGN: Herunterregulierung bei L-TERT $p=0,0010$). Die Proteinexpression von FABP5 veränderte sich nicht bei Behandlung ($p>0,1677$).

Zelllinienspezifische Effekte der Behandlung auf die Genexpression zeichneten sich lediglich bei DSG1 (AGN $p=0,0055$) und PPARG (at-RA $p=0,0479$ und AGN $p=0,0108$) ab und auf die Proteinexpression nur bei PAX6 (AGN $p=0,0285$).

Schlussfolgerungen

Die Zelllinien L-TERT und L-W eignen sich nicht als alternatives Model zu primären LEZ und Aniridie-LEZ um vergleichend Einflüsse des Retinolstoffwechsels auf gesunde sowie PAX6^{+/-}-LEZ zu untersuchen.

L-TERT und L-W sind sich in ihrer Genexpression zu ähnlich, was möglicherweise an einem zu geringen PAX6-Gehalt in beiden Zellen liegen könnte. Die PAX6-Expression in L-TERT war zwar höher als in L-W, aber im Vergleich zu primären LEZ entspricht die PAX6-Expression nur etwa einem Viertel.

1.2. Summary (English)

Background and purpose

PAX6 haploinsufficiency-associated aniridia is a rare panocular disease associated with limbal stem cell insufficiency and aniridia-related keratopathy, which may critically reduce vision. Due to decreased PAX6 gene expression, the differentiation of limbal epithelial cells (LECs) into corneal epithelial cells is particularly impaired. This may be caused by disturbances in retinol metabolism and signaling, as expression of signaling components (such as FABP5 and ADH7) in PAX6^{+/-}-LECs is also decreased and an oversupply of retinoic acid leads to an aniridia-like gene profile, with downregulation of DSG1, KRT3 and SPINK7 genes.

Aniridia primary cells are hardly accessible. Therefore, comparative studies related to this topic have so far mainly been performed using cell models. In the present study, we aimed to analyse whether the immortalized limbal cell lines L-TERT and L-W are suitable for future studies related to AAK.

Materials and methods

L-TERT and L-W were cultured in keratinocyte serum-free medium and were incubated to retinoids (retinol or retinoic acid) or retinoid receptor antagonists (AGN or UVI) for 24 hours after reaching 90% confluence. Subsequently, using qPCR, expression of the stem cell and differentiation markers PAX6, ADH7 and SPINK7; the structural proteins and adhesion markers DSG1, KRT12, KRT3 and KRT19; the retinol metabolism-related markers FABP5, PPARG and ELOVL7; and lastly the proliferation marker MKI67 were analysed. In addition, PAX6 and FABP5 protein levels were determined by WesternBlot.

Results

Significant differences in gene expression between L-TERT and L-W cell lines were only observed for PAX6 (at-RA p=0.0001, Ret p<0.0001, AGN<0.0001, UVI p<0.0001) and KRT19 (at-RA p=0.0052, Ret p=0.0006, AGN p=0.0007, UVI p=0.0060). There was a higher PAX6 and a lower KRT19 expression in L-TERT-LECs than in L-W. PAX6 (at-RA p<0.0001, Ret p=0.0006, AGN p=0.0010, UVI p=0.0149) and FABP5 (at-RA p=0.0272, AGN p=0.0056) protein expression was significantly higher in L-TERT than in L-W.

Both cell lines responded only very slightly to any kind of treatment. There was a significantly altered PAX6 gene expression in L-TERT after treatment with retinoids (up-regulation, at-RA p=0.0005, Ret p=0.0012) and retinoid receptor antagonists (down-regulation, AGN p=0.0124, UVI p=0.0305). There was a significant treatment effect on both L-TERT and L-W regarding FABP5 (L-TERT: up-regulation, at-RA p=0.0451, L-W: down-regulation, UVI p=0.0417, L-TERT and L-W: down-regulation, AGN p=0.0498 (L-TERT) and p<0.0265 (L-W)) and PPARG (L-TERT: up-regulation, at-

RA $p=0.0057$, Ret $p=0.0388$ and AGN $p=0.0251$, L-W: down-regulation, UVI $p=0.0429$) gene expression. In L-W, KRT19 expression was significantly altered upon treatment with retinoids (up-regulation, $p<0.0488$) and RAR/RXR antagonists (down-regulation, $p<0.0428$).

Sporadically, ADH7 gene expression (L-W: up-regulation, UVI $p=0.0229$), DSG1 (L-TERT: up-regulation, AGN $p=0.0189$) and ELOVL7 (L-TERT: up-regulation, AGN $p=0.0022$) were also altered. No treatment showed an effect on SPINK7 ($p>0.1243$), KRT3 ($p>0.2173$) or MKI67 ($p>0.1342$) gene expression.

At protein level, we observed a significant treatment effect on PAX6 protein expression (at-RA: down-regulation in L-TERT $p=0.0018$ and L-W $p=0.0055$, AGN: down-regulation in L-TERT $p=0.0010$), while FABP5 protein expression did not change ($p>0.1677$).

There was a cell line specific treatment effect on DSG1 (AGN $p=0.0055$) and PPARG (at-RA $p=0.0479$ and AGN $p=0.0108$) gene expression and on PAX6 (AGN $p=0.0285$) protein expression.

Conclusion

The L-TERT and L-W cell lines are not suitable alternative models to primary LECs and Aniridia-LECs to investigate and compare the effect of retinol metabolism on healthy and PAX6^{+/-}-LECs.

L-TERT and L-W cell lines are both too similar to each other in their gene expression, maybe due to a relatively low PAX6 expression in both cell lines. PAX6 expression in L-TERT is higher than in L-W. However, it is only about a quarter of PAX6 expression in human primary LECs.

2. Einleitung

2.1. Anatomie

2.1.1. Auge

Das in der Orbita liegende Auge ist das Sehorgan des Menschen. Der Bulbus oculi (Augapfel) ist zum Großteil aus drei Schichten aufgebaut (von außen nach innen): Sklera (Lederhaut), Choroidea (Aderhaut) und Retina (Netzhaut) [84] (**Abbildung 1**). Der vordere Teil des Auges unterscheidet sich von diesem Aufbau, da dort die Außenhülle des Auges von der Kornea (Hornhaut) gebildet wird, die am Limbus corneae in die Sklera übergeht, die von Konjunktiva (Bindehaut) überzogen ist.

2.1.2. Hornhaut

Die Kornea bildet die äußere Begrenzung an der Vorderseite des Auges. Sie ist avaskulär und transparent und besteht histologisch aus fünf Schichten: mehrschichtiges unverhorntes Plattenepithel, Lamina limitans anterior (Bowman-Lamelle), Substantia propria (Stroma), Lamina limitans posterior (Descemet-Membran) und Endothel (von distal zu proximal) [84](**Abbildung 1**).

Die Aufgabe des Epithels ist es hauptsächlich als Barriere für Störfaktoren der Hornhaut wie Mikroben, Wasser und Chemikalien zu fungieren. Zudem bildet es zusammen mit dem Tränenfilm eine glatte Oberfläche, die essenziell zur Brechkraft des Auges beiträgt. Die Bowman-Lamelle unterstützt die Formhaltung der Kornea. Das Stroma hat den größten Anteil an der Brechkraft der Kornea und bedingt die mechanische Belastbarkeit. Das Endothel haftet an der Descemet-Membran und sorgt durch seine Pumpfunktion dafür, dass Wasser aus der Kornea gepumpt wird und die Kornea somit transparent bleibt [93].

Die Kornea schützt somit das Auge als mechanische Barriere und hat mit 43 dpt den größten Anteil an der Gesamtbrechkraft des Auges. Fehlfunktion und/oder strukturelle Veränderungen bzw. Oberflächenveränderungen der Kornea haben eine Verminderung der Sehkraft, sowie ein erhöhtes Risiko für Verletzungen oder Infektionen des Auges zur Folge.

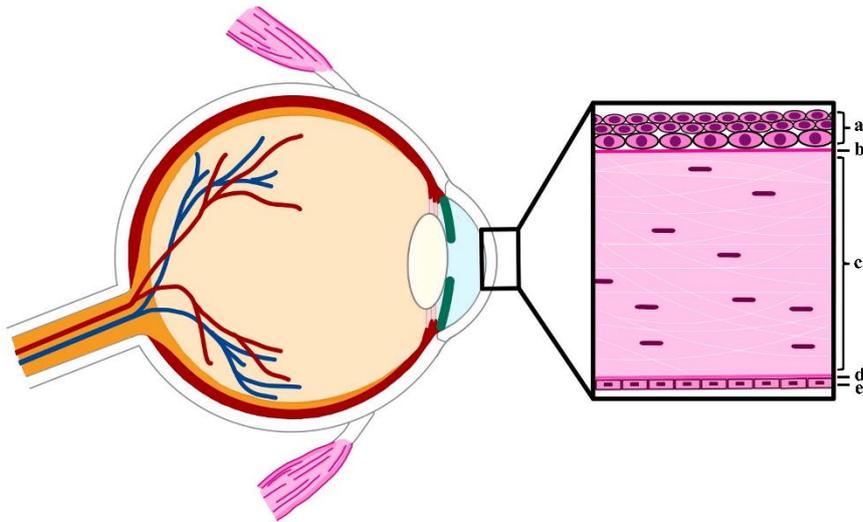


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Bulbus oculi und des histologischen Aufbau der Kornea. Dargestellt ist der Augapfel in seinem dreischichtigen Aufbau aus Sklera (weiß), Choroidea (rot) und Retina (gelb). An der Vorderseite des Bulbus verändert sich dieser Aufbau, da die Außenhülle des Auges dort von der Kornea gebildet wird. Die Kornea besteht aus fünf Schichten: (a) mehrschichtiges unverhorntes Plattenepithel, (b) Lamina limitans anterior (Bowman-Lamelle), (c) Substantia propria (Stroma), (d) Lamina limitans posterior (Descemet-Membran) und (e) Endothel. (Eigene Darstellung)

2.1.3. Limbus und Limbusepithelzellen

Zur Sklera hin wird die Kornea vom Limbus corneae (Limbus) begrenzt. Unter anderem verhindert der Limbus das Einwachsen von konjunktivalen Epithelzellen und Blutgefäßen in die Kornea [9][51]. Innerhalb des Limbus befinden sich die Vogt'schen Palisaden (**Abbildung 2**), die als fibrovaskuläre Furchen oder Trabekulae beschrieben werden. In der Basalzellschicht der Vogt'schen Palisaden liegen in einer Stammzellnische [51][21] die Limbusstammzellen, aus denen die Limbusepithelzellen (LEZ) hervorgehen [95].

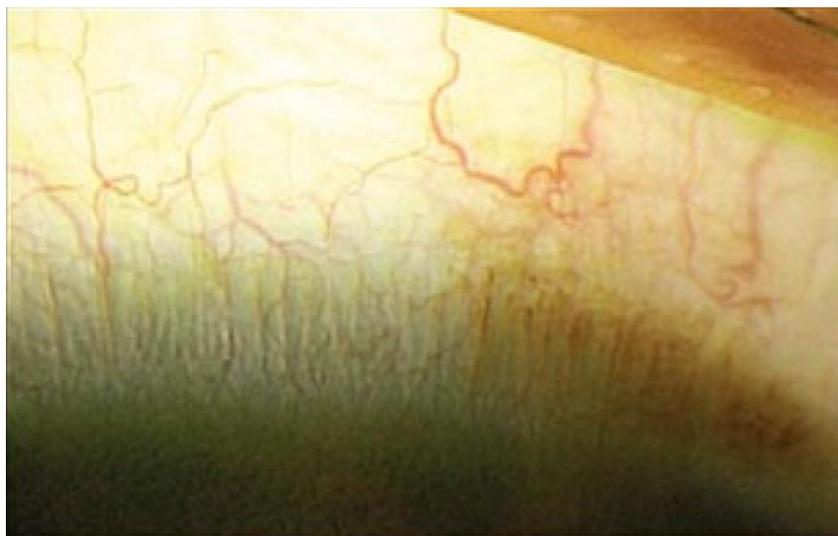


Abbildung 2: Lokalisation der Vogt'schen Palisaden. Klinische Lokalisation der Vogt'schen Palisaden am superioren Limbussaum [32].

Das Limbusepithel ist ein mehrschichtiges Epithel und mit mehr als 10 Schichten deutlich dicker als das Konjunktivaepithel (4-6 Schichten) und Korneaepithel (1-2 Schichten) [95]. Bei Defekten oder Reparaturprozessen des Korneaepithels können durch Proliferation, Migration und Differenzierung neue Epithelzellen aus Limbusstammzellen regeneriert werden [37][95].

Die Differenzierung der epithelialen Stammzellen zu Korneaepithel beginnt mit einer asymmetrischen Stammzellteilung, bei der eine Tochterzelle eine Stammzelle bleibt und sich die andere Tochterzelle zu einer transient amplifizierenden Zelle (TAZ) differenziert [16]. Die TAZ befinden sich neben den Limbusepithelstammzellen in der Basalschicht des Limbusepithels und differenzieren weiter zu postmitotischen Zellen (PMZ). Diese migrieren in die Kornea und differenzieren dort schließlich zu terminal differenzierten Zellen (TMZ), die an der Oberfläche der zentralen Kornea liegen. TMZ können sich nicht weiter teilen oder differenzieren und werden im gesundem Gewebe regelmäßig abgestoßen und ersetzt [43][16] (**Abbildung 3**).

In der Literatur wird als wichtiger Differenzierungsfaktor unter anderem Kalzium genannt, der die Differenzierung von einer Vielzahl von Epithelzellen initiiert [15][25], so auch die Differenzierung von kornealen Epithelzellen in Mäusen [56] sowie in Menschen [33].

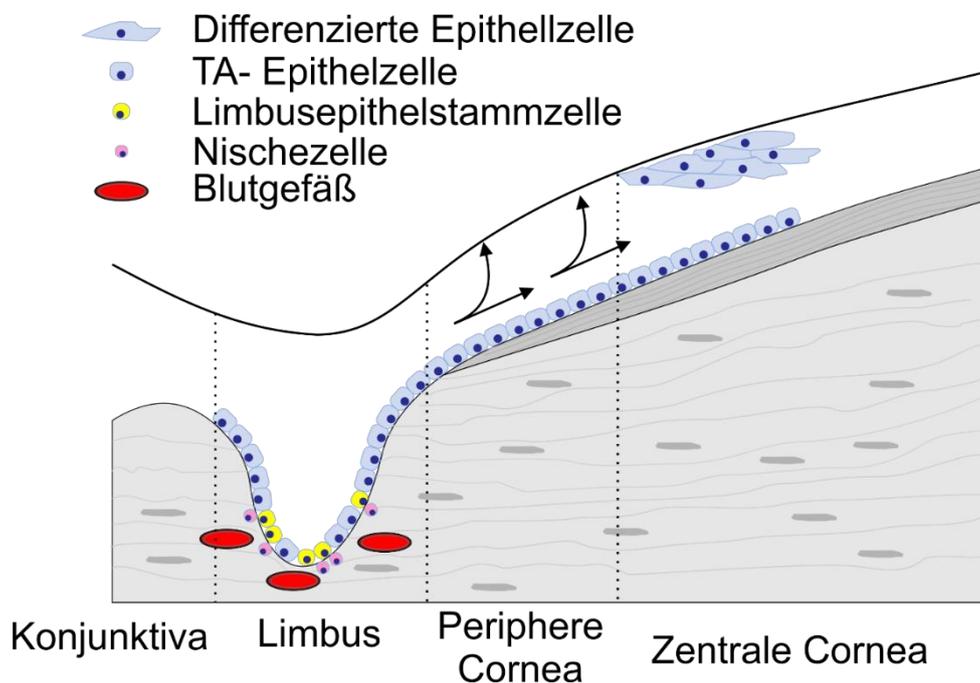


Abbildung 3: Anatomie des Limbus mit Differenzierung der Limbusepithelstammzelle bis hin zur differenzierten Epithelzelle. Die Abbildung zeigt die in den Vogt'schen Pallisaden sitzende Limbusepithelstammzelle, die sich über eine TAZ zur differenzierten kornealen Epithelzelle (TMZ) differenziert und dabei aus dem Limbus ins Zentrum der Kornea migriert. Quelle: Latta et al., 2019

2.2. Limbusstammzellinsuffizienz und kongenitale Aniridie

2.2.1. Limbusstammzellinsuffizienz

Die Limbusstammzellinsuffizienz (LSZI) wird durch eine Zerstörung, zum Beispiel durch Trauma oder chemische sowie thermische Verletzungen [34][65], der Limbusepithelstammzellen oder eine Dysfunktion der Stammzellnische in den Vogt'schen Palisaden verursacht. Dies führt zu einer gestörten Wundheilung [9] sowie zu einer Beeinträchtigung der Barrierefunktion des Limbus. Durch den Verlust der schützenden Barriere kann konjunktivales Epithel vom Limbus aus in die Kornea einwandern und sich dort begleitet von superfiziellen und stromalen Blutgefäßen pannusartig über die Hornhaut verbreiten. Langfristig führt dies zu Eintrübungen in der Kornea, die mit einem starken Visusverlust bis hin zur völligen Erblindung einhergehen [28][51][65].

Ursachen einer LSZI können primär (ohne äußere Einflüsse) oder sekundär (durch äußere Einflüsse sein. Während die sekundäre LSZI vor allem durch thermische oder chemische Verletzungen, Tragen von Kontaktlinsen und Operationen am Limbus bedingt sind, sind primäre Limbusstammzelldefekte mit Krankheiten der Augenoberfläche assoziiert, wie Aniridie und kongenitale Erythrokeratodermie [43].

Bei Aniridie-Patienten sind die Vogt'schen Palisaden, und somit die Stammzellnische, nicht vollständig ausgebildet oder morphologisch so verändert, dass sie ihre Funktion nicht vollständig ausüben können [17][51]. Die Regeneration von Korneaepithelzellen aus Limbusstammzellen ist demnach stark eingeschränkt und Defekte in der Hornhaut können nicht ausreichend gedeckt werden, was unter anderem zu Ulzerationen der Hornhaut führt.

Diese Stammzellnischendefekte treten sowohl diffus als auch sektorial bzw. partiell auf. Partielle Defekte betreffen nur den jeweilig angrenzenden Abschnitt der Kornea, während die Stammzellen im Rest des Limbus in der Lage sind, Epithel normal zu regenerieren. Somit können die nicht betroffenen Bereiche (vorübergehend) kompensatorisch die Hornhaut regenerieren, was zum Beispiel milde Verläufe oder die Möglichkeit eines Fortschreitens von Krankheiten bedingt [16].

Am häufigsten treten partielle Defekte am superioren Limbus auf. Bei einer Studie mit 22 Augen mit LSZI zeigten 21 von 22 Augen eine superiore Beteiligung. Dabei war der Defekt bei 7 Augen isoliert auf den superioren Abschnitt beschränkt, bei 10 Augen auch in angrenzenden nasalen oder temporalen Bereichen und bei 4 Augen subtotal, also fast im gesamten Limbus, vorhanden [34].

Größere Hornhautdefekte, die durch eine Limbusstammzellinsuffizienz verursacht wurden, können operativ meist nicht einfach durch eine Keratoplastik behoben werden, wenn dabei nicht auch die Limbusstammzellnischendefekte behoben werden, was allerdings sehr schwierig ist [52].

Eine medikamentöse Therapie ist in der Regel nur bei leichten, partiellen Limbusdefekten erfolgsversprechend, die zum Beispiel bei Irritation der Hornhaut durch dauerhaftes Kontaktlinsentragen oder in Folge von toxischen Nebenwirkungen einer Glaukomtherapie auftraten [34]. Bei starker oder totaler LSZI, zum Beispiel durch Verätzungen des Auges oder genetisch bedingter LSZI wie im Rahmen einer Aniridie, ist eine Limbusstammzelltransplantation (LSZT) nötig [52].

Grundsätzlich kommen für die Transplantation von Limbusstammzellen verschiedene Verfahren in Frage: Limbusstammzellen können entweder in Form von Limbusgewebe direkt oder in Form von zuvor auf Fibrin- oder Kollagenstrukturen oder Biomaterial wie Amnionmembranen kultivierten Limbusstammzellen transplantiert werden [40][75]. Das Ursprungsgewebe kann dabei entweder autolog von gesundem Gewebe des Patienten selbst oder allogon von einem Spender stammen, wobei autologes Gewebe eine geringere Rate an postoperativen Komplikationen aufweist [52].

2.2.2. Definition der kongenitalen Aniridie

Die kongenitale Aniridie ist eine seltene panokuläre Erkrankung (Inzidenz zwischen 1:64.000 und 1:100.000), die Kornea, Vorderkammer, Iris, Linse, Retina, Macula und den Nervus opticus betrifft [53] (**Abbildung 4**). Charakteristisch für diese Krankheit ist die vollständige oder partielle Hypoplasie der Iris, sowie eine Makula- und oftmals auch Papillenhypoplasie. Bereits bei Geburt sind Sehverminderungen und Nystagmen vorhanden. Die Iris Hypoplasie kann sehr variabel sein, und ist ein Indikator für den Krankheitsverlauf. Je ausgeprägter die Aniridie, desto häufiger und früher treten Komplikationen auf [32]. Im weiteren Verlauf können Katarakte, Glaukome und korneale Eintrübungen zu weiterer Sehverschlechterung bis hin zur völligen Erblindung führen [53].

Im weiteren Krankheitsverlauf ist die kongenitale Aniridie vor allem durch die Limbusstammzellinsuffizienz und sekundäre Glaukome geprägt. Jährliche Tensiokontrollen und Gesichtsfeldprüfungen sind sehr wichtig. Allerdings sind viele Patienten bei Entwicklung des Sekundärglaukoms noch so jung, dass Untersuchungen zusätzlich erschwert und oftmals kaum aussagekräftig sind [32].

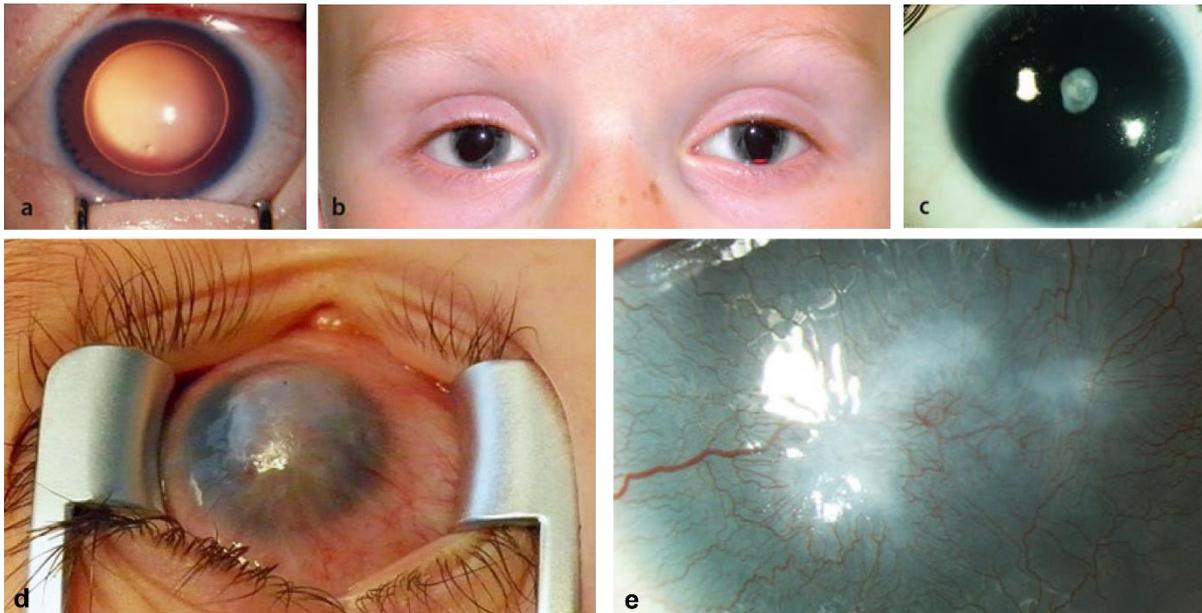


Abbildung 4: Manifestation und Komplikationen der kongenitalen Aniridie. (a) leichte Mikrosphärophakie, Ziliarzotten sichtbar. (b) Junge, 3 Jahre: inkomplette Aniridie, atypische Kolobome, Irishypoplasie. (c) Cataracta polaris anterior, beginnender Pannus. (d) schwerster Verlauf der LSZI bei Zustand nach mehrfachen Zyklorkryotherapien. Rezidivierende Epithelinfekte und Ulzera. (e) schwere LSZI bei PAX6-assoziiierter Aniridie [32].

2.2.3. Genetik der kongenitalen Aniridie

Bei der kongenitalen Aniridie treten sowohl sporadische als auch hereditäre Formen auf [32]. Etwa zwei Drittel der Fälle sind hereditär bedingt mit einer fast kompletten Penetranz innerhalb einer Familie, das restliche Drittel tritt sporadisch aufgrund von de novo Mutationen auf [99][53]. Die hereditäre Form wird autosomal dominant vererbt.

Des Weiteren wird unterschieden zwischen PAX6-Gen-assoziierten Formen und Formen, die ohne eine Veränderung von PAX6 auftreten. Die PAX6-assoziierten Aniridieformen sind dabei deutlich häufiger und zeigen vermehrt die für Limbusstammzellinsuffizienz charakteristische Pannusbildung und Vaskularisation der Hornhaut [32]. Ursache der PAX6-assoziierten Aniridie ist eine heterozygote Mutation des PAX6-Gens. PAX6 liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 (11p13) und kodiert für einen Transkriptionsfaktor, dem eine zentrale Rolle bei der Embryonalentwicklung des Auges zukommt [97][64]. Homozygote Mutationen von PAX6 führen in Mäusen zu einem lebensunfähigen Phänotyp ohne Augen und Nasen [55].

Die PAX6-assoziierte Form kann dabei isoliert oder als Teil eines Syndroms auftreten, beispielsweise als WAGR-Syndrom, das etwa 30% der sporadischen Aniridie-Fälle bedingt. Beim WAGR-Syndrom handelt es sich um eine Mikrodeletion der 11p13 Region, die sowohl das PAX6-Gen als auch das Wilms-Tumor 1 (WT1) -Gen betrifft. Teil dieses Syndroms sind Wilms-Tumor (Nephroblastom), Aniridie, genitourethrale Anomalien und geistige Retardierung [99].

Es wurden bisher fast 400 Mutationen des PAX6-Gens in der Human Gene Mutation Database (HGMD) erfasst, von denen eine Vielzahl mit der isolierten, nicht-syndromalen Form der Aniridie zusammenhängen. Bei den Mutationen handelt es sich vor allem um Missense-Mutationen, bei denen ein vorzeitiges Stop-Codon eingebaut wird, Insertion oder Deletion in kodierenden Sequenzen oder Spleiß-Mutationen. Diese resultieren in einer Haploinsuffizienz des PAX6-Gens [64].

2.2.4. Aniridie-assoziierte Keratopathie (AAK)

Die AAK ist einer der Hauptfaktoren der fortschreitenden Sehverminderung bei kongenitaler PAX6-assoziiierter Aniridie [97]. Während Augenoberflächenveränderungen bei etwa 90% der Aniridie-Patienten auftreten, tritt die AAK in voller Ausprägung nur bei etwa 20% auf [55].

Die bereits beschriebenen charakteristischen Pathologien der PAX6-Mutation-abhängigen Limbusstammzellinsuffizienz (Pannusbildung und Vaskulation der Hornhaut) führen zu einer verdickten, vaskularisierten Hornhaut, die stark anfällig ist für Entzündungen, Erosionen und Eintrübungen, welche die Sehkraft entscheidend vermindern. Auch chronische Schmerzen treten häufig auf und können das Alltagsleben der Patienten zusätzlich stark erschweren [32][97].

Erste Veränderungen können bereits in den ersten zehn Jahren der Erkrankung auftreten und immer weiter fortschreiten, bis die Hornhaut vollständig eingetrübt ist [55]. Die Sehkraft wird zusätzlich sekundär verschlechtert, da viele Aniridie-Patienten an einem gestörten Tränenfilm und einer Keratoconjunktivitis sicca (KCS) leiden [46]. Als Ursache dafür wird eine Meibomdrüsen Dysfunktion vermutet, da diese bei Aniridie-Patienten vermehrt auftreten [45].

Als Ursache der AAK wird die durch PAX6-Haploinsuffizienz bedingte Differenzierungsstörung von kornealen Epithelzellen vermutet. Vor allem anhand des bei AAK stark verminderten PAX6-abhängigen Differenzierungsmarker Keratin 12 kann eine nicht ausreichende Differenzierung nachgewiesen werden. Bei Keratin 12-Mangel zeigt sich das Epithel sehr fragil und durchsetzt mit Vakuolen. Zusätzlich reguliert PAX6 die Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie Desmosomen, weshalb sich bei PAX6-Mangel Löcher im Epithel bilden und auch die Adhäsion des Epithels an der Basalmembran gestört ist [55]. Es zeigt sich somit eine gleichzeitige Störung der Regeneration als auch eine Destruktion des vorhandenen Epithels.

Anhand der Limbusstammzellinsuffizienz kann man die AAK in verschiedene Stadien mit spezifischen Symptomen einteilen (**Tabelle 1**).

Tabelle 1: Klassifikation von Aniridie-assoziiertes Keratopathie (AAK) in vier Stadien [28].

Aniridie-assoziiertes Keratopathie	Stadium
Klare, vollständig transparente Hornhaut, ohne Zeichen einer Limbusstammzellinsuffizienz	0
Vereinzelte Trübungen in der Peripherie/am Limbus, die auf das Einwachsen von Gefäßen und Limbusstammzellinsuffizienz hinweisen (<1mm)	1
Geringfügige Eintrübung mit einwachsenden Gefäßen und Limbusstammzellinsuffizienz, die die Sehschärfe jedoch nicht beeinträchtigen (>1mm, aber nicht in Zentrum)	2
Schwierigkeiten bei der Untersuchung der Netzhaut aufgrund einer ausgeprägten zentralen Keratopathie mit Eintrübungen des Hornhautstromas und zentripetalem Einwachsen von Gefäßen, verminderte Sehschärfe	3
Trübung der gesamten Hornhaut mit dichter undurchsichtiger Pannus, vollständig vaskularisierte Hornhaut	4

2.2.5. Therapie der AAK

Die Therapie der AAK ist sehr limitiert und dient hauptsächlich der Symptominderung. Zum Beispiel können Tränenersatzmitteln wie Hyalurontröpfchen den gestörten Tränenfilm ersetzen und die damit einhergehende Trockenheit und Reizung des Auges bessern. Auch autologe Serumtröpfchen können eingesetzt werden [55].

Operationen an der Kornea, wie zum Beispiel eine perforierende Keratoplastik (PK) bei einer medikamentös nicht mehr behandelbaren AAK oder Katarakt- und Glaukom-Operationen, haben aufgrund der schlechten Wundheilung grundsätzlich eine schlechte Prognose und sollten nur angewendet werden, wenn keine andere Möglichkeit zur Behandlung mehr zur Verfügung steht. Bei Manipulation des Limbus während einer okulären Operation kann sich die AAK zusätzlich verschlechtern [87][97]. Sollte eine PK nach Abwägen eventueller Komplikationen dennoch in Frage kommen, wird sie in Kombination mit einer Amnionmembrantransplantation als Patch empfohlen. Amnionmembranen haben vor allem durch ihre Wachstumsfaktoren einen positiven Effekt auf die Wundheilung und mindern das Risiko von Vernarbung, Infektionen und Entzündungen [86].

Leider führt eine PK, bei der ausschließlich Hornhautgewebe transplantiert wird, nur temporär zur Symptomlinderung, da ein Austausch der Hornhaut nur dann langfristig erfolversprechend ist, wenn auch die Limbusstammzellinsuffizienz behandelt wird [52][87]. Stattdessen kommt zum Beispiel eine Limbo-Keratoplastik in Frage, bei der im Gegensatz zur PK zusätzlich zum Hornhautgewebe auch Limbusgewebe transplantiert wird. Auch hier wird eine Amnionmembran als Patch zur Verbesserung der Prognose verwendet. Zusätzlich ist eine systemische Immunsuppression nötig, um eine Abstoßungsreaktion zu verhindern [74].

Alternativ kommen auch LSZT von kultivierten LSZ in Frage, die auch bei nicht AAK LSZI Verwendung finden (siehe Abschnitt 2.2.1.).

2.3. Retinolstoffwechsel

2.3.1. Allgemeine Aspekte des Retinolstoffwechsels

Retinol (Ret, Vitamin A) spielt eine wichtige regulatorische Rolle bei biologischen Prozessen, wie Zelldifferenzierung, Embryonalentwicklung (insbesondere des Zentralen Nervensystems) und Organbildung [19]. Auch für die Funktion des Auges ist Retinol essenziell.

Da Vitamin A nicht im menschlichen Körper gebildet werden kann, ist es ein essenzielles Vitamin und muss mit der Nahrung in Form von freiem Retinol, Retinyl-Estern oder als pro-Vitamin A in Form von Carotinoiden (β -Carotin) aufgenommen und verstoffwechselt werden, bevor es als aktiver Metabolit im Körper wirken kann. Freies Retinol und Retinyl-Ester befinden sich vor allem in tierischen Produkten wie Milch oder Fleisch, Carotinoide vor allem in Gemüse wie Spinat oder Früchten [70].

Im intestinalen Lumen werden die Retinyl-Ester sowie die Carotinoide in Retinol umgewandelt und in die Zelle aufgenommen, wo sie durch Lecithin-Retinol-Acyltransferase (LRAT) mit langkettigen Fettsäuren zurück zu Retinyl-Ester verestert und in Chylomikronen verpackt über das lymphatische System zur Leber transportiert werden. Ein Teil wird wieder zu Retinol gespalten und an Cellular retinol binding protein I (CRBPI) gebunden in den Hepatocyten gespeichert. Der Großteil des Vitamin A-Vorrats wird allerdings in Form von Retinyl-Estern gespeichert [70].

Bei Bedarf werden die Retinyl-Ester wieder zu Retinol gespalten und über den Blutkreislauf zum Wirkungsort transportiert. Im Plasma ist Retinol an einen Komplex aus Retinol-Bindeprotein (RBP) und Transthyretin (TTR) gebunden. In den Zielorganen bindet dieser RBP-TTR-Retinol-Komplex an STRA6 (stimulated by retinol acid 6) -Membranrezeptoren woraufhin Retinol freigesetzt und in die Zelle aufgenommen wird [70]. Auch im Wirkorgan wird Retinol an CRBP gebunden.

Im Zytosol der Zielzellen wird Retinol über zwei Oxidationsschritte zu seinem aktiven Metaboliten Retinsäure umgewandelt. Zuerst wird Retinol durch Retinoldehydrogenase 10 zu Retinaldehyd (Ral) oxidiert, welches anschließend von Retinaldehyd-Dehydrogenase zu all-trans Retinsäure (at-RA) oxidiert wird [57].

Die all-trans Retinsäure gelangt an CRABP (cellular retinoid acid binding proteine) oder FABP (fatty-acid binding proteine) gebunden in den Zellkern [59] (**Abbildung 5**).

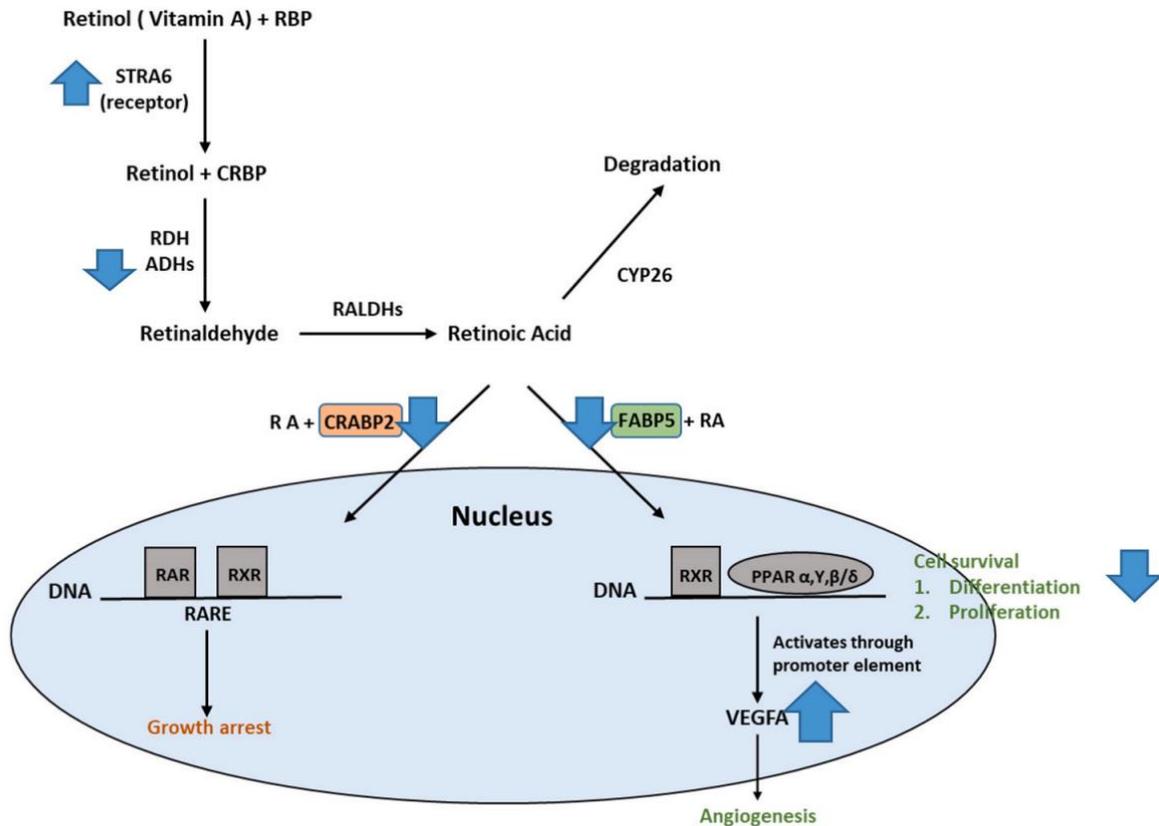


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Retinolstoffwechsel sowie seine Wirkung im Nucleus der Zielzelle. Retinol wird im Plasma an Retinol-Bindeprotein (RBP) gebunden zum Wirkort transportiert und zunächst zu Retinaldehyd und anschließend zur aktiven Form des Vitamin A, at-RA, umgewandelt. Am Wirkort transportieren CRABP und FABP5 at-RA zu den jeweiligen nukleären Retinsäurerezeptoren RAR, RXR oder PPAR. Über diese aktiviert at-RA die Expression verschiedener Zielgene. Gebunden an FABP5 induziert at-RA die Differenzierung und Proliferation der Zelle und verstärkt somit das Zellwachstum, während es gebunden an CRABP das Zellwachstum hemmt. Über das Verhältnis der Expression von CRABP zu FABP5 in der Zielzelle wird bestimmt, welcher Signalweg überwiegt. Die blauen Pfeile symbolisieren Veränderungen im Retinolstoffwechsel, bzw. der Signalübertragung, bei Behandlung von LEZ gegen PAX6 mittels si-RNA [33].

2.3.2. Retinoidrezeptoren (RAR/RXR)

Im Zellkern bindet at-RA an Retinsäure-Rezeptoren (RAR), Retinoid-X-Rezeptoren (RXR) oder Peroxisom Proliferator-Aktivierte Rezeptoren (PPAR). Die von at-RA gebundenen Rezeptoren binden an das Retinoid-Acid Response Element an der Promotorregion der DNA, und regulieren so die Expression der Ziel-Gene [57].

Für jeden der Rezeptor sind verschiedene Isoformen bekannt: RAR α , β , γ , RXR α , β , γ und PPAR α , β/δ [59].

CRABP liefert all-trans Retinsäure an RAR, während FABP Retinsäure an den PPAR liefert. RXR dient den nukleären Rezeptoren RAR und PPAR vor allem als Bindungspartner für die RAR/RXR-, bzw. PPAR/RXR-Heterodimere. Die nukleären Rezeptoren vermitteln dabei gegenläufige Prozesse: Zellproliferation und Zell- bzw. Tumorwachstum oder Zell-Apoptose und Hemmung von Tumorwachstum. Durch die vermehrte Expression von CRABP oder FABP steuert die Zelle, welcher Weg vermehrt eingeschlagen wird [59].

2.3.3. Augenspezifische Rolle von Retinol

Retinolderivate spielen nicht nur bei der Augenentwicklung eine Rolle, sondern auch bei der Funktionalität des Auges [70][19].

In der Retina ist das Retinolderivat 11-cis Retinal essenziell für die Signaltransduktion in den Photorezeptoren, da es für die Regeneration von Rhodopsin unerlässlich ist. Bei einem Mangel an Retinolderivaten kommt es langfristig durch eine Verkürzung des Außensegments der Stäbchenzellen zu einer Degeneration der Retina, die letztlich zur Erblindung führen kann [70].

In der Kornea verbessern Retinolderivate die Wundheilung und wirken antiinflammatorisch. Im Limbus wirken sich Retinolderivate fördernd auf die Differenzierung von Limbusstammzellen zu TAZ aus [43] und unterstützen somit die Epithelialisierung der Kornea sowie die Barrierefunktion des Korneaepithels [35].

An der Augenoberfläche stimulieren Retinolderivate die Expression von membrangebundenen Muzinen, die für die Aufrechterhaltung des Tränenfilms wichtig sind, weshalb Retinsäure bereits Anwendung in der Behandlung von Keratokonjunktivitis sicca findet [26].

2.3.4. Auswirkungen von Störungen des Retinolstoffwechsels auf das menschliche Auge

Ein Retinolmangel führt in der Embryonalentwicklung zu schweren Fehlbildungen. Bei Versuchen mit Ratten Embryonen zeigte sich, dass sich die Augenfurche bei einem Retinol-Mangel nicht schließt, da die Expression des dafür zuständigen Pitx2-Gens stark herunterreguliert war. Zusätzlich war eine Einfaltung oder ein Kollabieren der Retina zu beobachten, unter anderem weil Adhäsionsmoleküle wie N-Cadherine und β -Catenin nicht ausreichend ausgebildet waren [85].

Die Xerophthalmie, ein vor allem frühkindliches Krankheitsbild, bei dem Austrocknung des Auges und Keratopathie bis hin zur Keratomalazie aufgrund von Vitamin A-Mangel charakteristisch sind, ist eine der Hauptursachen für kindliche Blindheit in Entwicklungsländern [5]. Die Xerophthalmie lässt sich zum Beispiel durch topische Anwendung am Auge in Form von Augentropfen behandeln [71].

Allerdings hat nicht nur ein Mangel an Retinol, sondern auch ein Überschuss an Retinolderivaten nachteilige Auswirkungen. Retinoltoxizität in Form von Hypervitaminose ist bekannt und zeigt sich unter anderem in Form von Osteoporose und Hüftfrakturen [69] sowie einem erhöhten Risiko für Lungenkrebs [81].

Bereits 1989 wurden trockene Augen und Blepharitis als typische Nebenwirkung von Retinolderivaten wie synthetischen Retinolen beschrieben [6]. Bei topischer Anwendung von Retinolderivaten am Auge zeigt sich zum Beispiel eine toxische Wirkung auf die Meibom-Drüsen, bei der es zu Zelltod, Atrophy

der Drüsen und verminderter Talgproduktion kommt, was letztlich zur Austrocknung des Auges durch einen gestörten Tränenfilm führt [82]. Bei Absetzen der Medikamente sind die Symptome rückläufig.

Störungen des Retinolstoffwechsels sowie Störungen in Signalkaskaden der Retinoide werden auch als ein möglicher Faktor in der Pathogenese der AAK untersucht.

Retinoide sind an der Differenzierung von LEZ beteiligt, verbessern die Wundheilung und wirken antiinflammatorisch [36]. Unter anderem genau diese Vorgänge sind bei AAK gestört. Zudem sind für den Retinolstoffwechsel relevante Gene bei PAX6-assoziiertes Aniridie herunterreguliert (**Tabelle 2**). Andererseits scheint auch ein Überangebot von Retinoiden in LEZ am Pathomechanismus der AAK beteiligt zu sein [49]. Wo genau diese Störungen in der Signalkaskade bzw. deren Regulation liegen und wie sie sich auf die LEZ auswirken ist bisher nicht bekannt.

Eine funktionelle Partnerschaft von PAX6 und Retinoiden ist von der Regulation von Kristallinen bekannt. Die Promotorregion der Kristalline haben neben einer Bindestelle für PAX6 auch RAR als Bindestelle für at-RA. Somit beeinflussen PAX6 und at-RA kooperativ die Expression dieser Gene [41]. In PAX6-Knockout-Mäusen können Gewebe, die embryologisch aus Oberflächen-Ektoderm entstanden sind, nicht auf Retinoide reagieren [18]. PAX6 beeinflusst also möglicherweise auch die RAR/RXR in ihrer Bindungsfähigkeit und/oder Schritte der Signalkaskade. Somit könnten auch Störungen der RAR/RXR an sich oder deren Interaktion mit PAX6 ursächlich für die AAK sein.

Dass Auswirkungen von Retinoiden über RAR/RXR mediiert werden können, wird sich bereits in der Therapie zunutze gemacht: Retinoidrezeptorantagonisten kommen als mögliches Antidot für Retinol-Intoxikation in Frage. Sie binden an die RAR/RXR und hemmen kompetitiv die Wirkung von Retinol und at-RA [73].

2.3.5. Retinoidrezeptorantagonisten (RAR/RXR-Antagonisten)

UVI 3003 (UVI)

UVI ist ein selektiver Retinoid-X-Rezeptor-Antagonist, der auf die Isoformen RXR α und γ wirkt [60]. RXR-Antagonisten, die strukturell RXR-Agonisten ähneln, können in zwei Gruppen untergliedert werden: (1) Verbindungen mit einer langkettigen Alkoxy-Seitenkette, (2) Verbindungen mit einer beliebigen anderen Seitenkette.

Bei Verbindungen mit Alkoxy-Seitenketten bestimmt die Anzahl der Kohlenstoffatome in der Seitenkette über die Potenz des Antagonisten. Verbindungen mit weniger als drei Kohlenstoffatomen in der Seitenkette zeigen keine oder nur schwache antagonistische Eigenschaften. Auch die Position der Alkoxy-Gruppe scheint von Bedeutung zu sein, da ein Strukturisomer von UVI eine deutlich schwächere Potenz hat [98].

Strukturell ähnelt UVI stark dem hoch potenten RXR-Agonisten CD3254 [62]. Die 3'-Methyl-Gruppe von CD3254 ist bei UVI eine Pentoxy-Gruppe [98]. RXR-Antagonisten binden an die Liganden-Bindestelle des Rezeptors und bewirken eine Konformationsänderung. Dadurch hemmen sie die Bindung von Liganden wie at-RA an den nukleären Rezeptor. Obwohl die jeweiligen Antagonisten eine Selektivität für die RXR-Isoformen aufweisen, konnte damit bisher kein spezifischer pharmakologischer Effekt erzielt werden [98].

AGN 193109 (AGN)

AGN ist ein synthetisches Retinoid, das je nach Struktur der Isoform als RAR-Agonist oder RAR-Antagonist wirkt. Ein zusätzlicher Benzolring in der Seitenkette der Antagonisten entscheidet über die Funktion [23].

Die Isoform AGN 193109 ist ein potenter pan-RAR-Antagonist [92]. Es bindet mit einer hohen Affinität an alle Isoformen des RAR und wirkt dort als kompetitiver Antagonist [73], weshalb es als Antidot für Retinol-Toxizität diskutiert wird. Versuche am Mausmodell zeigen eine gute Prognose für AGN als Antidot [94].

2.4. Einfluss von Retinolderivaten auf primäre Limbusepithelzellen im Kontext von Aniridie-relevanten Markergenen

2.4.1. Übersicht Aniridie-relevanter Gene

In vorhergehenden Studien wurden anhand von Primärzellen sowie PAX6-Knockdown Modellen verschiedene Transkripte von Aniridie-relevanten Genen identifiziert, deren Expression bei PAX6-assoziiierter Aniridie basal verändert ist und wie sich diese bei Behandlung mit Retinoiden und RAR/RXR-Antagonisten beeinflussen lässt. Diese Gene umfassen unter anderem Stammzell- und Differenzierungsmarker, Adhäsionsmarker und Strukturproteine, aber auch Gene aus Retinol Stoffwechsel- sowie Signalwegen [48][50] (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: Übersicht über die Herunter-/Hochregulierung von Aniridie-relevanten Markergenen bei PAX6-abhängiger Aniridie in PAX6^{+/+}-LEZ. Dargestellt wird eine erhöhte (↑), erniedrigte (↓) oder unveränderte (=) Genexpression der genannten PAX6^{+/+}-Zelle im Vergleich zu einer PAX6^{+/+}-Zelle. ¹=Primärzellen von Aniridie-Patienten [48], ²=Primärzellen von gesunden Patienten, die mit siRNA gegen PAX6 behandelt wurden [48]. Für einige Marker standen keine Daten zur Verfügung (-).

Marker	ADH7	SPINK7	DSG1	KRT12	KRT3	KRT19	FABP5	PPARG	ELOVL7	MKI67
Aniridie (PAX6 ^{+/+}) ¹ -LEZ /LEZ (siPAX6) ²	↓↓	↓↓	↓↓	↓/=	↓↓	-/-	↓↓	↑/↓	↑/=	-/-

Einige dieser Gene werden dabei in direkter Korrelation zu PAX6 besonders stark herunterreguliert. Dazu gehören DSG1 und ADH7 (**Abbildung 6**).

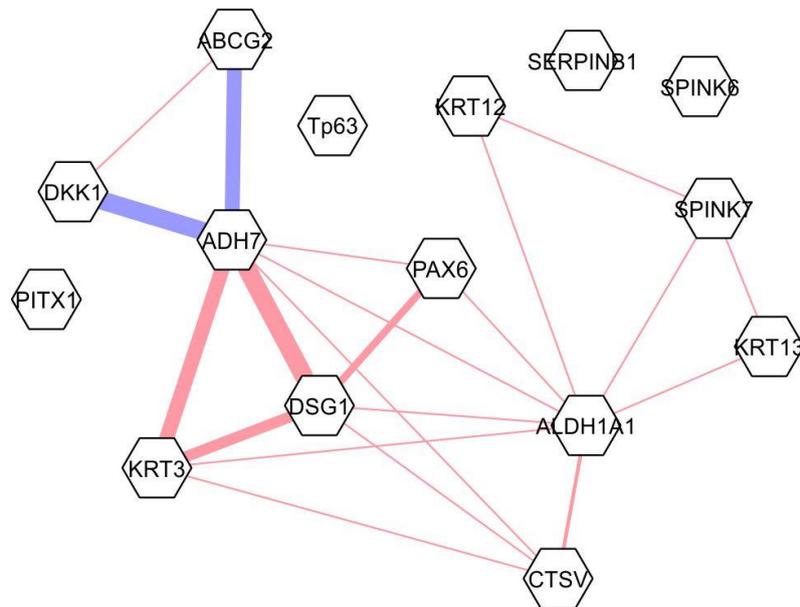


Abbildung 6: Korrelationsanalyse von Aniridie-relevanten Genen. Dargestellt ist die Korrelation zwischen Genen, die bei PAX6-abhängiger Aniridie in PAX6^{+/-}-LEZ verändert exprimiert werden. Rote Linien beschreiben eine positive und blaue Linie eine negative Korrelation. Die Stärke der Linien gibt an, wie stark die Korrelation ist. Quelle: Latta et al., 2019.

Basierend auf diesen Studien wurden Gene ausgewählt, deren Expression nun in den humanen Limbusepithelzelllinien L-TERT und L-W vergleichend untersucht werden sollen. Diese werden im Folgenden näher erläutert.

2.4.2. Stammzell- und Differenzierungsmarker

Paired Box Gene 6 (PAX6)

PAX6 gehört zur Familie der Paired Box Gene, die als Transkriptionsfaktoren zahlreiche Embryonalentwicklungsprozesse regulieren. PAX-Gene haben zwei DNA-Bindedomänen, die für verschiedene Zielgene kodieren: eine Paired Domäne und eine Homeodomäne [39].

Das Gen liegt auf der Bande p13 von Chromosom 11 (11p13), besteht aus 14 Exons und ist 22 kb lang. Exons 5-7 kodieren für die Paired Domäne, die aus zwei Subdomänen besteht: eine n-terminale Subdomäne und eine c-terminale Subdomäne. Beide Subdomänen haben DNA-BindungsKapazitäten und regulieren sich gegenseitig negativ [53].

Es existieren zwei Splicevarianten von PAX6 (PAX6-5a und PAX6-5b), welche sich durch eine Insertion von 14 Aminosäuren unterscheiden, die von Exon 5a codiert sind, und die DNA-Bindungsstelle der n-terminalen Subdomäne blockieren, wodurch die c-terminale DNA-Bindungsdomäne aktiviert wird [12]. Die beiden Subtypen PAX6 und PAX6-5a unterscheiden sich zum Beispiel darin, dass PAX6-5a vor allem die Expression des Strukturproteins Keratin 3 (KRT3) und PAX6-5b vor allem die Expression des Strukturproteins und kornealen Differenzierungsmarker Keratin 12 (KRT12) fördert [83].

PAX6 gilt als Master-Regulatorgen der Augenentwicklung und ist während der Augenentwicklung in allen Strukturen exprimiert, die sich aus dem Neuroektoderm (Optisches Vesikel, Optischer Becher, Retina) und dem Oberflächenektoderm (Linsenplakode, Linse und Teile der Hornhaut) entwickeln. Auch postnatal wird PAX6 in Retina, Linse, Kornea, Konjunktiva, Iris und Ziliarkörper exprimiert [12][54]. Während PAX6 demnach in jedem Embryonalstadium essenziell für die Entwicklung des Auges ist, reguliert es postnatal wohl vor allem die Regenerierung von kornealem Epithel, da sich die in Aniridie beobachtete Herunterregulierung von PAX6 vor allem in einer gestörten Differenzierung der Limbusstammzellen zu kornealen Epithelzellen bemerkbar macht [54].

PAX6-Gendefekte sind meist heterozygote Mutationen und resultieren in PAX6-Haploinsuffizienz, die sich vor allem im Krankheitsbild der Aniridie zeigt, aber auch in Form von Mikrophthalmie, Nervus opticus-Anomalien und Entwicklungsstörungen des Vorderaugenabschnitts. Auch für die Entwicklung des Zentralnervensystems spielt PAX6 eine Rolle [91].

Auch wenn größtenteils bekannt ist, welche Gene bei PAX6-abhängiger Aniridie in ihrer Expression verändert sind, ist bisher nicht eindeutig geklärt, welche Gene von PAX6 direkt reguliert werden oder welche vor allem über Retinoidstoffwechsel- und -Signalwege und demnach eher sekundär von PAX6 reguliert sind. Zum einen könnte PAX6 unabhängig voneinander Gene des Retinolstoffwechsels als auch zum Beispiel Strukturproteine direkt regulieren. Dies scheint zumindest bei FABP5 als auch DSG1 der Fall zu sein, da sich die Genexpression stetig in Korrelation zu PAX6 verändert [33] (**Abbildung 7**).

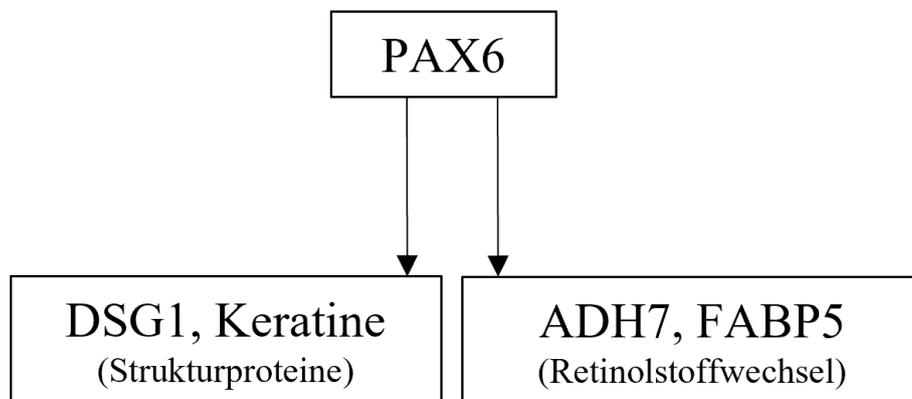


Abbildung 7: Regulation von bei Aniridie verändert exprimierten Genen durch PAX6 direkt. PAX6 reguliert als Transkriptionsfaktor die Expression von Retinolstoffwechsel-relevanten Genen, als auch von Genen wie Strukturproteinen und Adhäsionsmarkern, die bei Aniridie nachweislich verändert exprimiert sind.

Alternativ könnte PAX6 über den Zwischenschritt des Retinolstoffwechsels und dessen Signalwege wirken. Dabei könnte es am Retinolstoffwechsel selbst ansetzen, oder bei den RAR/RXR (**Abbildung 8**).

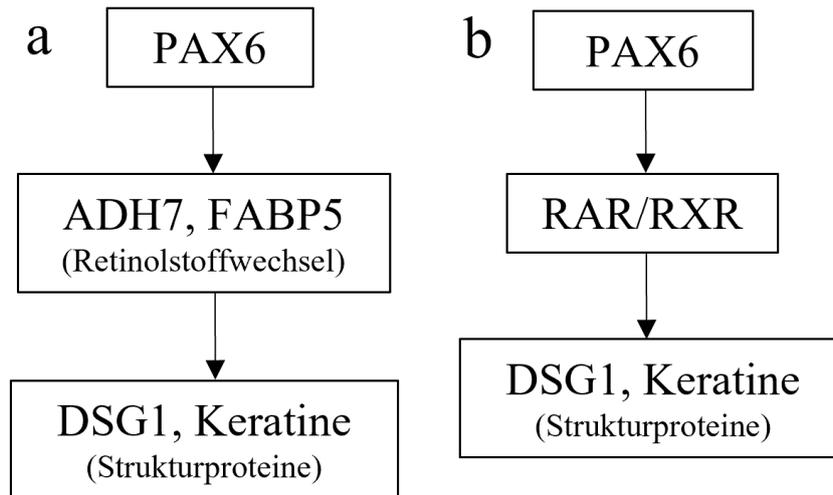


Abbildung 8: Regulation von Aniridie-relevanten Markergenen durch PAX6 über Gene des Retinolstoffwechsels (a) oder Retinoidrezeptoren (b). PAX6 reguliert den Stoffwechsel (a) oder die RAR/RXR (b) von Retinol, wodurch Signalwege gestört oder unterbrochen werden und retinolvermittelte Veränderungen in der Expression von Aniridie-relevanten Markergenen auftreten.

Alkohol-Dehydrogenase 7 (ADH7)

ADH7 gehört zur Gruppe der Alkohol-Dehydrogenase, die primäre und sekundäre Alkohole reversibel oxidieren [29]. Es oxidiert Retinol zu Retinaldehyd und ist somit für den Sehvorgang wichtig [104].

Im Vorderaugenabschnitt wird ADH7 vor allem in den Epithelzellen der Kornea exprimiert und kann somit als kornealer Differenzierungsmarker angesehen werden [33]. In den LEZ von Aniridie-Patienten und im Aniridie-Modell wird ADH7 vermindert exprimiert [48].

Serinprotease-Inhibitor Kazal Typ 7 (SPINK7)

SPINK7 gehört zur Familie der SPINK Protease-Inhibitoren und wird vor allem im Ösophagus und in der Haut exprimiert. Es wird auch als esophageal cancer-related gene 2 bezeichnet und wirkt als Tumorsuppressor in esophagealen Epithelzellen. Ebenfalls wird es als Biomarker für präkanzeröse Läsionen im Mund diskutiert [68][3]. Es spielt zudem eine essenzielle Rolle in der Zelldifferenzierung von Epithelzellen, die bei SPINK7-Mangel gestört ist und vor allem mit einer herabgesetzten Barrierefunktion des Epithels einhergeht [3].

Des Weiteren ist es an antiinflammatorischen Prozessen beteiligt [3,100]. Serinproteasen sind mit vielen zahlreichen entzündlichen Krankheiten wie Keratitis, Arthritis und Vaskulitis assoziiert, da sie die Expression von Entzündungsproteinen induzieren [30]. Als Inhibitor der Serinproteasen wirkt SPINK7 diesem entgegen und unterdrückt proteolytische und proinflammatorische Vorgänge [3].

Ein anderer, trypsin-ähnlicher Serinprotease-Hemmer (UAMC-00050) wird derzeit als Behandlung für trockene Augen und Augenentzündungen untersucht [30]. Möglicherweise spielt SPINK7 eine ähnliche Rolle als Induktor von entzündlichen Prozessen.

SPINK7 ist in Aniridie-Patienten und im Aniridie-Zellmodell herunterreguliert [48]. Es scheint dabei allerdings nicht direkt PAX6-reguliert zu sein, sondern über bisher unbekannte Mechanismen [33]. Es besteht eine starke Korrelation zwischen der SPINK7 und DSG1 Gen-Expression [3].

2.4.3. Korneal- und konjunktivalspezifische Strukturproteine und Adhäsionsmarker

Desmoglein 1 (DSG1)

DSG1 ist ein desmosomales Barriere-Protein aus der Gruppe der Cadherine [22]. Zusammen mit Desmocollin ist es ein wesentlicher Bestandteil von Desmosomen und bildet als Transmembranprotein Zell-Zell-Kontakte aus [24].

Es existieren mehrere Desmoglein Isoformen (1-4), die sehr differenzierungsabhängig exprimiert werden. Während DSG2 in allen Geweben die Desmosomen besitzen, exprimiert werden, werden DSG1 und DSG3 hauptsächlich in mehrschichtigem Epithel, beispielsweise in der Epidermis, exprimiert. DSG4 wird lediglich in Haarfollikeln und der Epidermis exprimiert. Die weniger spezifischen Desmogleine DSG2 und DSG3 kommen vor allem in den unteren Schichten der Epidermis vor, während DSG1 vor allem in den oberen Schichten vorkommt. Daher kommt DSG1 als potenzieller Differenzierungsmarker für stärker differenzierte Zellen in Frage [14]. Im Korneaepithel wird DSG1 ebenfalls stärker exprimiert als im undifferenzierten Limbusepithel [80]. Reduzierte DSG1-Expression triggert Proliferation anstatt Zelldifferenzierung und reduziert die Adhäsion von LEZ [33].

Die Expression von DSG1 wird von PAX6 beeinflusst [47]. Bei Aniridie-Patienten sowie im Aniridie-Zellmodell und Aniridie-Mausmodell ist die DSG1 Expression deutlich herunterreguliert [13][48].

Keratin 3 (KRT3) und Keratin 12 (KRT12)

Die Keratine 3 und 12 sind korneale Differenzierungsmarker [47] und bilden als Strukturproteine Intermediärfilamente aus [8]. Keratine werden in eine saure (Typ 1) und eine basische (Typ 2) Unterfamilie unterteilt, die oft zusammen ko-exprimiert werden. So werden auch das saure KRT12 und das basische KRT3 oft zusammen exprimiert [8]. Die beiden Keratine werden allerdings nicht zwangsläufig ko-exprimiert, da sie zum Beispiel abhängig von den PAX6-Isoformen unterschiedlich exprimiert werden [83].

Hauptsächlich kommen sie dabei im suprabasalen Limbusepithel sowie im gesamten Korneaepithel vor, aber weder im basalen Limbusepithel, noch in der angrenzenden Konjunktiva [43]. Andere Quellen beschränken die Expression von KRT3 und KRT12 sogar auf den apikalen, zentralen Teil der Kornea [47]. Im Verlauf der Limbusstammzelldifferenzierung zu kornealem Epithel werden KRT3 und KRT12 erst dann exprimiert, wenn sich die TAZ weiter differenzieren und in die zentrale Kornea einwandern, weshalb sie sich als korneale Differenzierungsmarker von ausdifferenzierten Zellen eignen [43]. In der zentralen Kornea unterstützen die Keratine die strukturelle Intaktheit der Kornea, was sich vor allem

dadurch zeigt, dass Mutationen im KRT3- und KRT12-Gen zu instabilem Korneaepithel führen [47], das von Zysten durchsetzt ist [38].

Die Genexpression von KRT3 und KRT12 ist vermutlich von PAX6 reguliert, indem es an deren Promotor bindet und direkt die Expression induziert [55][38]. Allerdings scheint die Expression von KRT12 schwieriger zu induzieren sein als die von KRT3. Bei einer Studie, in der die PAX6-Isoformen in Mundschleimhaut-Epithelzellen transduziert wurden, konnte PAX6-5a allein die Expression von KRT3 induzieren, während für die Induktion der KRT12-Expression die Anwesenheit von Yamanaka-Faktoren (Oct4 und Klf4) vonnöten war. Wahrscheinlich benötigt PAX6 also auch im Auge Kofaktoren, um die KRT12-Expression zu induzieren [83].

Bei PAX6-assoziiertes Aniridie sind beide Keratine vermindert exprimiert [47]. Dies deutet darauf hin, dass Aniridie-LEZ nicht in der Lage sind, zu kornealen Epithelzellen zu differenzieren [33]. Auch bei Versuchen mit primären humanen Korneaepithelzellen zeigte sich, dass eine Herunterregulierung von PAX6 auch eine Herunterregulierung von KRT 3 und KRT12 mit sich zieht [38].

Keratin 19 (KRT19)

Keratin 19 ist vor allem, aber nicht ausschließlich, ein konjunktivaler Marker [47]. Es wird besonders stark im konjunktivalen Epithel exprimiert, allerdings ebenso in der Kornea als auch im Limbus [77].

Im Gegensatz zu KRT3 und KRT12 ist KRT19 allerdings in der Basalschicht des Limbusepithels und zum Teil auch des peripheren Korneaepithels exprimiert, allerdings nicht im suprabasalen Limbus- und Korneaepithel. Zusätzlich wird KRT19 in menschlichen Feten dahingegen im gesamten Limbus- und Korneaepithel exprimiert. Diese Tatsachen deuten darauf hin, dass KRT19 vorrangig für wenig differenzierte Zellen, bzw. embryologisch junge Zellen wie Stammzellen, typisch ist [43].

Die KRT19-Expression in der peripheren Kornea könnte auch mit der Migration der sich differenzierenden Stammzellen ins Zentrum der Kornea zusammenhängen, was die Rolle von KRT19 im Korneaepithel nicht als Differenzierungsmarker, sondern eher als Stammzellmarker bestärkt [43].

Da KRT19 im konjunktivalen Epithel sehr stark exprimiert wird, könnte man annehmen, dass es sich als Marker für ein Einwachsen von konjunktivalem Gewebe in die Kornea im Rahmen einer Limbusstammzellinsuffizienz eignen könnte. Da es allerdings auch in der Kornea exprimiert wird, während ein anderes Keratin (KRT 13) nur in der Konjunktiva, nicht aber in der Kornea exprimiert wird, eignet sich KRT13 um einiges besser als konjunktivaler Differenzierungsmarker [77].

2.4.4. Retinolstoffwechsel-relevante Marker

Fatty Acid Binding Proteine 5 (FABP5)

FABP5 ist ein intrazelluläres Lipid-bindendes Protein, das Fettsäuren in den Zellkern und zu nukleären Rezeptoren transportiert [67]. Es hat eine hohe Affinität zu at-RA sowie langkettigen Fettsäuren und ist essentiell für Retinolhaushalt und -funktion [63].

FABP5 transportiert beispielsweise Retinsäure an PPAR β/δ und aktiviert somit unter anderem die Zellproliferation [63][59]. Es ist demnach ein wichtiger Faktor in Retinol Signalwegen und kann diese regulieren [33]. Zudem spielt es eine Rolle in der Differenzierung und Migration von Zellen, insbesondere Tumorzellen: FABP5-Genexpression korreliert bei Brustkrebs mit der Tumorgröße und mit Zellinvasion und -migration. Je größer der Tumor, desto mehr wird FABP5 exprimiert und desto invasiver schreitet der Tumor voran. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass durch den FABP5/PPARG-Signalweg Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) freigesetzt wird, welches diese Vorgänge induziert [31].

In Mäusen mit heterozygoter PAX6-Mutation wird FABP5 vermindert exprimiert [58]. Auch in primären humanen Aniridie-LEZ war die FABP5-Expression stark PAX6-abhängig vermindert, was eventuell eine Verlangsamung der Differenzierung von Limbusstammzellen zu TAZ bedingt als auch die Migration von TAZ in Richtung zentraler Kornea verhindert [33].

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG)

PPARG ist ein nuklearer Rezeptor, der unter anderem durch die Bindung von at-RA aktiviert wird [63][59]. Er kann aber auch durch Fettsäuren oder Eicosanoide aktiviert werden [1], die ihm von FABP5 präsentiert werden [59].

PPARG besteht aus einer n-terminalen Aktivierungsdomäne, einer zentralen DNA-Bindungsdomäne und einer c-terminalen Liganden-Bindungsdomäne [1]. Nach Aktivierung heterodimerisiert PPARG mit einem RXR, bindet die RARE Promotorregion der DNA und induziert die Expression von Ziel-Genen [57]. PPARG reguliert so verschiedene Gene, die unter anderem mit dem Glukose- und Lipidstoffwechsel, Insulinsignalübertragung, Osteoblasten- sowie Adipozytendifferenzierung und Entzündungsvorgängen assoziiert sind, und ist somit in verschiedene Pathologien wie Diabetes, Arteriosklerose und Osteoporose involviert [4].

In der Kornea reguliert PPARG vermutlich Prozesse, die der Neovaskularisierung und Fibrosierung der Kornea entgegenwirken, indem es zum Beispiel die Bildung von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Rezeptoren sowie Endothelzell-Differenzierung und -Proliferation hemmt. Auch die Transkription von Zytokinen wird von PPARG gehemmt und vermindert somit Entzündungsprozesse [105].

Außerdem wird berichtet, dass PPARG in der Lage ist, PAX6 zu inhibieren. Es ist allerdings noch unklar, wie genau dies funktioniert [42]. PPARG scheint nicht direkt von PAX6 reguliert zu sein, sondern durch andere Pathomechanismen der AAK beeinflusst zu werden. Bei Aniridie wird es vermehrt exprimiert, was möglicherweise zur Verlangsamung der Zelldifferenzierung beiträgt [33].

Fatty acid Elongase (ELOVL7)

ELOVL7 ist beteiligt an der Synthese von langkettigen, gesättigten Fettsäuren [90]. Insgesamt gibt es 7 Isoformen von Fatty acid Elongase (1-7), über die bisher nicht viel bekannt ist, außer dass sie essentiell sind für die Synthese von sehr langkettigen Fettsäure (VLCFA) [61].

In Aniridie-LEZ wird ELOVL7 vermehrt exprimiert. Dies könnte eine pathologisch vermehrte Synthese von RA zur Folge haben, was ein Überangebot von Retinoiden bedingt [33].

2.4.5. Proliferationsmarker

MKI67

MKI67 kodiert für das Ki-67 Protein, das vor allem aus der Tumordiagnostik als Tumormarker für verschiedene Krebsarten wie Magenkrebs, Hepatozellulärem Karzinom, aber am prominentesten für Brustkrebs bekannt ist [96][103][102].

Die Expressionsrate von MKI67 hängt weniger von der Gewebe- bzw. Zellart ab, sondern viel mehr vom Proliferationszustand. Während MKI67 in differenzierten Zellen wie Lymphozyten, Hepatozyten und Nieren- oder Hirnzellen nicht exprimiert wird, wird es in diversen proliferierenden Zellen exprimiert. Auch im Zellzyklus ist MKI67 vor allem in den aktiven Phasen (G1-, S-, G2-, M-Phase) nachweisbar, nicht aber in der inaktiven G0-Phase [66].

Da die MKI67-Expression bei proliferativer Stimulation induziert, bei Differenzierung der proliferierten Zellen allerdings wieder abwesend war, wird MKI67 als wichtiger Proliferationsmarker angesehen [66].

2.5. Immortalisierte humane Limbusepithelzellen

2.5.1. Eigenschaften von immortalisierten Zelllinien

Bisher wurden zahlreiche Studien zum Thema PAX6 und PAX6-assoziiertes Aniridie, sowie AAK durchgeführt. Beispielsweise anhand von Aniridie-Zellmodellen, Aniridie-Mausmodellen oder Aniridie-Primärzellen [76][48].

Humane Primärzellen sind allerdings sehr wenig verfügbar und Zellmodelle sind schwierig herzustellen. Meistens eignen sich diese nur für wenige Passagen, bevor sie in einen Wachstumsstillstand eintreten. Auch die endogene Kontamination ist hoch, sodass sie schnell ihre ursprünglichen Charakteristika verlieren [88].

Immortalisierte Zellen haben viele entscheidende Vorteile gegenüber Primärzellen und werden deshalb bereits in allen Bereichen der Forschung eingesetzt. Sie sind günstig und einfach zu kultivieren und liefern im Grunde einen unendlichen Vorrat an Material. Außerdem wird dabei jedes Mal nur ein homogener, identischer Zelltyp kultiviert, sodass die Proben konsistenter und die Ergebnisse reproduzierbarer sind [10][7]. Des Weiteren müssen sie nicht aus Tieren oder Menschengewebe entnommen werden und sind demnach ethisch vertretbarer [10][88].

Leider beschränken sich die Vorteile von immortalisierten Zellen vor allem darauf, große Mengen an homogenem, reproduzierbarem Material herzustellen [2]. Der größte Nachteil von immortalisierten Zellen ist, dass sie nicht als „normale Zellen“ angesehen werden können, da sie sich unbegrenzt teilen und dabei manchmal einzigartige Genmuster exprimieren, die in keinem Zelltyp *in vivo* vorkommen. Vor allem in höheren Passagen können sie ihre Zelleigenschaften verändern und stark von ihrer Ursprungszelle abweichen [2][7].

Um Aniridie und AAK in einem kontrollierten Rahmen zu untersuchen, wurden nun erstmals immortalisierte Limbusepithel-Zelllinien von der Arbeitsgruppe um J. Rheinwald (Boston, USA) hergestellt [20], um die Ergebnisse der vorherigen Studien zu erweitern. Anschließend wurden diese immortalisierten Zellen von der Arbeitsgruppe Roux et al. (Paris, Frankreich) mithilfe von CRISPR/Cas9 so verändert, dass die PAX6-Expression wie in einer Aniridie-Zelle herunterreguliert ist [78][79]. Diese Zelllinien sind bisher nicht kommerziell zu erhalten, wurden uns allerdings freundlicherweise für unsere Versuche zur Verfügung gestellt.

2.5.2. Limbal-TERT (L-TERT)

Bei L-TERT handelt es sich um immortalisierte LEZ, die aus humanen Limbusepithelzellen hergestellt wurden. Durch sequenzielle Transduktion wurden zuerst der humane Tumorsuppressor p53 sowie Cyclic Dependent Kinase 4 (CDK4) so verändert, dass die Zellen Zellseneszenz Mechanismen umgehen können. Anschließend wurden sie mit humaner Telomerase reverse transcriptase (TERT), einer katalytischen Untereinheit von Telomerase, versehen, sodass die Zellen ihre Telomere behalten und sich beliebig oft teilen können. Schließlich wurden die immortalisierten Zellen anhand ihrer Muzinproduktion mit den Primärzellen verglichen, wobei sie sich idem verhielten [20].

2.5.3. Limbal-W (L-W)

In die immortalisierten LEZ L-TERT wurde mithilfe von Gen editing mit CRISPR/Cas9 eine heterozygote Nonsense-Mutation des PAX6-Genes eingefügt, die auch in LEZs von AAK-Patienten vorkommt. Die entstandene Zelllinie zeigte in der qPCR-Analyse Aniridie-typische Veränderungen im Genprofil wie die deutliche Verringerung der PAX6-Expression auf etwa 50%, die sich auch auf Proteinebene im Western-Blot zeigte [79].

2.6. Zielsetzung dieser Arbeit

Der kongenitalen Aniridie, sowie der AAK, liegt meist eine PAX6-Haploinsuffizienz zugrunde, die sich in einer gestörten Wundheilung, vermehrten Entzündungen und einer aufgehobenen epithelialen Barriere zeigt [28][53][64][32]. Retinolderivate zeigen eine medikamentöse Wirkung genau bei diesen Pathologien und werden bereits zur Behandlung von verschiedenen Augenkrankheiten eingesetzt [27][35][43]. In zu hoher Konzentration zeigen sie jedoch eine toxische Wirkung und ein Überangebot von Retinol und Retinsäure führt zu ähnlichen Veränderungen in der Gen-Expression wie ein PAX6-Mangel [6][49][82]. Möglicherweise ist also eine veränderte Regulierung der Retinolderivate durch PAX6-Haploinsuffizienz ursächlich für den Pathomechanismus der Aniridie, bzw. AAK [33][49]. Wie genau diese Regulierung erfolgt, ist bisher nicht bekannt.

In vorherigen Studien ist beschrieben, inwieweit sich die Expression von ausgewählten Genen in Aniridie-LEZ von gesunden LEZ unterscheiden [33][49][48]. Dabei wurde vor allem eine starke Korrelation zwischen PAX6 und DSG1, ADH7 sowie SPINK7 festgestellt [33][48]. Auch verschiedene wichtige Gene des Retinolstoffwechsels (ADH7, FABP5, PPARG usw.) werden bei einer verminderten PAX6-Expression ebenfalls weniger exprimiert [49]. PAX6 könnte zum Beispiel die Retinolderivate also direkt über den Stoffwechsel oder aber über RAR/RXR beeinflussen [33].

Bisher wurden Studien an Primärzellen sowie Zellmodellen unternommen [33][49][48][76], was einen erheblich größeren Arbeitsaufwand sowie inkonsistentere Rahmenbedingungen mit sich bringt, als es bei Zelllinien der Fall wäre [7][10][88]. Hinzu kommt, dass die Kultivierung von Primärzellen von Aniridie Patienten schwierig ist, und sehr wenig Material zur Verfügung steht [20][79]. Nun wurden erstmals immortalisierte LEZ mit Retinolderivaten und RAR/RXR-Antagonisten behandelt, um zu prüfen, wie sich die Differenzierung oder die Genexpression von PAX6 abhängigen Markern in diesen Zellen verändert. Um den Einfluss von PAX6 zu untersuchen, wurden dazu Zelllinien verwendet, die unterschiedlich viel PAX6 enthalten und somit eine gesunde LEZ und eine Aniridie-LEZ darstellen sollen, um einen direkten Vergleich in kontrolliertem Umfeld zu ermöglichen.

Basierend auf den Erkenntnissen bisheriger Studien [33][49][48] soll überprüft werden, ob sich diese mit den verwendeten Zelllinien reproduzieren lassen und sich L-TERT und L-W zukünftig zur Aniridie-Forschung im Hinblick auf die Auswirkungen von PAX6-Haploinsuffizienz eignen.

3. Material und Methoden

3.1. Material

Verwendete Zellen

L-TERT: humane telomerase-immortalisierte korneale Limbusepithelzellen, hergestellt von J. Rheinwald (Boston, USA), bereitgestellt von Roux et al. (Arbeitsgruppe von Daniel Aberdam, Paris, Frankreich)

L-W: PAX6^{+/-} humane telomerase-immortalisierte korneale Limbusepithelzellen, hergestellt von Roux et al. (Paris, Frankreich), bereitgestellt von Roux et al. (Arbeitsgruppe von Daniel Aberdam, Paris, Frankreich)

Geräte

Tabelle 3: Verwendete Geräte und Hersteller.

Bezeichnung	Hersteller
Biometra Eco-Mini Elektrophorese System	Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland
Heraeus Pico 17 Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
iBright™ System 1500	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Infinite® F50 Mikroplatten-Reader	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Inkubator HERAcell 240i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Megafuge Heraeus16R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Primovert - inverses Lichtmikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH; Jena, Deutschland
QuantStudio 5 Real-Time-PCR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
ScanDrop® – Nano-Volume Spectrophotometer	Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland
Shaker Dos-10L	neoLab Migge GmbH; Heidelberg, Deutschland
Sterilwerkbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Thermoblock TB2	Biometra GmbH Analytik Jena, Jena, Deutschland
Thermocycler CFX Connect	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Trans Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., New York, USA

Labormaterialien

Tabelle 4: Verwendete Labormaterialien und Hersteller.

Material	Hersteller
Biosphere® Filter tips, 0,1 – 10 µl	Sarstedt AG & Co. KG; Nürmbrecht, Deutschland
Biosphere® Filter tips, 2 – 100 µl	Sarstedt AG & Co. KG; Nürmbrecht, Deutschland
Biosphere® Filter tips, 100 – 1000 µl	Sarstedt AG & Co. KG; Nürmbrecht, Deutschland
Cellstar Serological Pipette 5 ml	Greiner Bio One International GmbH; Kremsmünster, Österreich
Cellstar Serological Pipette 10 ml	Greiner Bio One International GmbH; Kremsmünster, Österreich
Cellstar Serological Pipette 25 ml	Greiner Bio One International GmbH; Kremsmünster, Österreich
Cellstar Tubes 15 ml	Greiner Bio One International GmbH; Kremsmünster, Österreich
Cellstar Tubes 50 ml	Greiner Bio One International GmbH; Kremsmünster, Österreich
Eppendorf Reference Pipette 0,5 – 10 µl	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
Eppendorf Reference Pipette 10 – 100 µl	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
Eppendorf Reference Pipette 100 – 1000 µl	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
Eppendorf Reference Pipette 1000 - 5000 µl	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
Eppendorf-Gefäße, Größe 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG; Nürmbrecht, Deutschland
epT.I.P.S. Standard Pipettenspitzen 0,1-5 µl	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
epT.I.P.S. Standard Pipettenspitzen 2 – 200 µl	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
epT.I.P.S. Standard Pipettenspitzen 50-1000 µl	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
Kryotubes, Größe 1,8 ml	Sarstedt AG & Co. KG; Nürmbrecht, Deutschland
MicroAmp™ Optical 96-Well Reaktionsplatte	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
PCR-Tubes 0,2 ml	Greiner Bio One International GmbH; Kremsmünster, Österreich
PIPETBOY acu 2	INTEGRA Biosciences AG; Zizers, Schweiz
UV-transparente Einmal-Küvetten	Sarstedt AG & Co. KG; Nürmbrecht, Deutschland
TC-Zellkulturflasche T25	Sarstedt AG & Co. KG; Nürmbrecht, Deutschland
TC-Zellkulturflasche T75	Sarstedt AG & Co. KG; Nürmbrecht, Deutschland

Chemikalien und Kits

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien/Kits und Hersteller.

Chemikalie/Kit	Hersteller
AceQ DNA SYBR Green Master Mix	Vazyme Biotech, Nanjing, China
All-trans-Retinsäure	Sigma-Aldrich GmbH Deisenheim, Deutschland
AGN 193109	Sigma-Aldrich GmbH Deisenheim, Deutschland
anti-mouse-/oder anti-rabbit-Fertiglösung zur Detektion Western Froxx	BioFroxx GmbH, Einhausen, Deutschland
BPE	Gibco, Life Technologies, Paisley, UK
Bradford Reagenz	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
BSA	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Grüssing, Filsum, Deutschland
Cryo-SFM	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
DMEM/F12	Sigma-Aldrich GmbH Deisenheim, Deutschland
DMSO	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dulbeccos PBS	Sigma-Aldrich GmbH Deisenheim, Deutschland
EGF	Gibco, Life Technologies, Paisley, UK
Fetales Kälberserum	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Glutamin	Sigma-Aldrich GmbH Deisenheim, Deutschland
Keratinocyte serum free Medium	Gibco, Carlsbad, USA
NuPAGE™ 4-12% iges Bis-Tris SDS Gel	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer (20X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
One Taq RT-PCR Kit	New England BioLabs, Frankfurt a.M., Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich GmbH Deisenheim, Deutschland
Precision Plus Protein Standard „Dual-Colour“	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Retinol	Sigma-Aldrich GmbH Deisenheim, Deutschland
RNA/DNA/Protein Purification Plus Kit	Norgen Biotek CORP. Canada
RNAse freies Wasser	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trans-Blot Turbo Transfer Pack	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Trypsin-EDTA-Lösung (0,05% Trypsin, 0,002% EDTA)	Sigma-Aldrich GmbH Deisenheim, Deutschland
UVI 3003	Sigma-Aldrich GmbH Deisenheim, Deutschland
WesternFroxx Kit anti-mouse HRP für die Immunodetektion	BioFroxx GmbH, Einhausen, Deutschland
WesternFroxx Kit anti-rabbit HRP für die Immunodetektion	BioFroxx GmbH, Einhausen, Deutschland
WesternFroxx Stripping Puffer 10x	BioFroxx GmbH, Einhausen, Deutschland

WesternFroxx Waschlösung	BioFroxx GmbH, Einhausen, Deutschland
Western lightning chemo luminescence Plus ECL Reagenz	PerkinElmer Life Sciences, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH Deisenheim, Deutschland

Primer für die PCR

Tabelle 6: Verwendete Primer und Hersteller.

Primer	Katalognummer	Amplifikationsgröße (bp)	Hersteller
ADH7	QT00000217	85 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
DSG1	QT00001617	96 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
ELOVL7	QT01025976	89 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
FABP5	QT00225561	97 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
KRT3	QT00050365	118 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
KRT12	QT00011949	104 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
KRT19	QT00081137	117 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
MKI67	QT00014203	86 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
PAX6	QT00071169	113 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
PPARG	QT00029841	113 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
SPINK7	QT00039585	126 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
TBP	QT00000721	132 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
GUSB	QT00046046	96 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

Antikörper

Tabelle 7: Verwendete Antikörper und Hersteller.

Antikörper	Katalognummer	Hersteller	Verdünnung
PAX6 (anti-Maus)	Sc-32766	Santa Cruz Biotechnology, California, USA	1:200
FABP5 (anti-Maus)	Sc-365236	Santa Cruz Biotechnology, California, USA	1:500
ACTB (anti- Kaninchen)	A8227	Abcam, Cambridge, UK	1:5000

Hergestellte Medien und Puffer

Zellmedium

- 500 ml KSFM
- 2,5 µg EGF
- 25 mg BPE
- 100 U/ml Penicillin/Streptomycin
- 0,4 mM CaCl₂ (2 ml Lösung)
- 2 mM Glutamin (5 ml Lösung)

Laemmli-Puffer:

- 125 mM TRIS (pH 6,8)
- 60% Glycerin
- 2,5% SDS
- 0,01% Bromphenolblau
- 63 µl/ml Mercaptoethanol

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur und Behandlung mit Retinolderivaten und RAR/RXR-Antagonisten

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Versuche bei Raumtemperatur durchgeführt.

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde das Passagieren und Behandeln der Zellkulturen unter einer Sterilwerkbank mit vertikalem Abzug durchgeführt. Die Zellkulturen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert.

Kultivieren der Limbusepithelzellen

Das Kultivieren der L-TERT und L-W LEZ erfolgte in Keratinocyte serum free Medium (KSFM). Das Medium wurde in regelmäßigen Abständen von etwa 3 Tagen gewechselt.

Eine maximale Konfluenz von 90% wurde zum Passagieren festgelegt, um eine Kontakthemmung der Zellen zu vermeiden (**Abbildung 9**).

Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen entweder in 75 cm² Kulturflaschen, um ein weiteres Wachstum zu gewährleisten, oder in 25 cm² Kulturflaschen, für die spätere Behandlung mit Retinoiden oder RAR/RXR-Antagonisten, passagiert.

Dazu wurde zunächst das Medium aus der Kulturflasche entfernt und die Zellen einmalig mit PBS gewaschen, um eventuelle Rückstände des Nährmediums zu entfernen. Danach wurden 5 ml Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung dazugegeben und die Zellen 5 bis 10 Minuten bei 37°C

inkubiert. Nach vollständiger Lösung der Zellen vom Boden der Kulturflasche, wurden 5 ml DMEM/F12 (mit 5% FCS) dazugegeben, um das Trypsin zu neutralisieren. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Röhrchen pipettiert und bei 800 g für 5 Minuten zentrifugiert.

Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen, 5 ml PBS zum Waschen zum erhaltenen Zellpellet gegeben und erneut bei 800 g für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das PBS verworfen, das Zellpellet in Medium resuspendiert und auf 75 cm² Kulturflaschen im Verhältnis 1:3 oder auf 25 cm² Kulturflaschen im Verhältnis 1:9 verteilt. In die Kulturflasche wurde zusätzlich 13 ml KSFM für die 75 cm² Kulturflaschen, bzw. 5 ml für die 25 cm² Kulturflaschen, pipettiert. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C inkubiert, bis erneut 90% Konfluenz erreicht war.

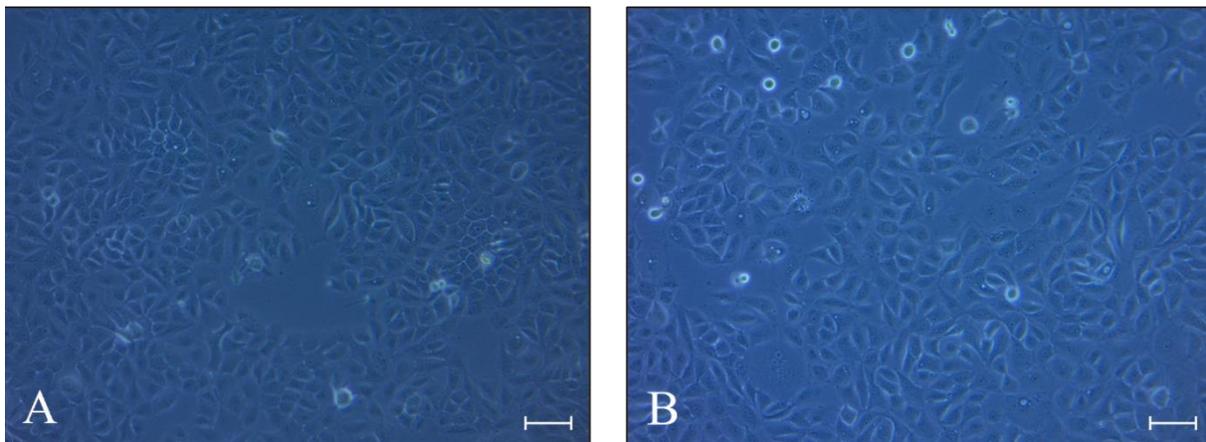


Abbildung 9: Morphologie der limbalen Zelllinien. Die in KSFM kultivierten Zellen der Zelllinien L-TERT (A) und L-W (B) bildeten Kulturen aus kleinen, homologen Zellen mit typischem Pflasterstein-artigem Erscheinungsbild. Morphologisch unterschieden sich die Zelllinien nicht. Der Messbalken zeigt 50 µm an.

Behandlung mit Retinoiden und RAR/RXR-Antagonisten

Ret, at-RA, AGN 193109 und UVI 3003 wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und mit KSFM verdünnt, um verschiedenen Endkonzentrationen des Mediums für die Behandlung der LEZ zu erhalten (**Tabelle 8**). Für die Kontrolle wurde in das KSFM nur DMSO als Trägersubstanz gegeben.

Die jeweiligen Zellkulturen von L-TERT und L-W wurden im unten aufgeführten Schema (**Tabelle 8**) mit den Retinoiden oder RAR/RXR-Antagonisten in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt und bei 37°C für 24h inkubiert.

Nach 24h Behandlung wurden die Zellen geerntet und in Pellets bei -80°C aufbewahrt.

Dazu wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 1,5 ml Trypsin inkubiert. Nach 5 bis 10-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion mit 2,5 ml DMEM +FCS abgestoppt, die Zellsuspension in Röhrchen übertragen und bei 800 g 5 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in Eppendorfgläsern zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und erneut bei 800 g 5 Minuten lang zentrifugiert.

Anschließend wurde das PBS vom Zellpellet verworfen und die Eppendorfgefäße mit dem Zellpellet bei -80°C eingefroren.

Tabelle 8: Behandlungsschema für L-TERT und L-W mit Behandlungssubstanzen und Endkonzentrationen. Die LEZ wurden für 24h mit Retinoiden oder RAR/RXR-Antagonisten in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Die Kontrolle erfolgte mit DMSO.

Behandlung at-RA	Behandlung mit	Endkonzentration at-RA
Kulturflasche 1	DMSO-Kontrolle	0
Kulturflasche 2	at-RA	100 nM
Kulturflasche 3	at-Ra	1 µM
Behandlung mit Retinol	Behandlung mit	Endkonzentration Retinol
Kulturflasche 1	DMSO-Kontrolle	0
Kulturflasche 2	Retinol	100 nM
Kulturflasche 3	Retinol	1 µM
Behandlung mit Retinol	Behandlung mit	Endkonzentration AGN
Kulturflasche 1	DMSO-Kontrolle	0
Kulturflasche 2	AGN	0,5 µM
Kulturflasche 3	AGN	1,0 µM
Kulturflasche 4	AGN	1,5 µM
Behandlung mit Retinol	Behandlung mit	Endkonzentration Retinol
Kulturflasche 1	DMSO-Kontrolle	0
Kulturflasche 2	UVI	0,5 µM
Kulturflasche 3	UVI	1,0 µM
Kulturflasche 4	UVI	1,5 µM

3.2.2. RNA-/Protein-Isolation

Zur RNA-/Protein-Isolation wurde zunächst 300 µl Natriumdodecylsulfat (SDS) als Lysepuffer auf die gefrorenen Zellpellets pipettiert. Der Lysepuffer reguliert den pH-Wert und die Osmolarität des Lysats und hilft somit, bei der Zellyse die RNA/Proteine zu isolieren und in einer stabilen Umgebung zu halten. Dadurch wird die enzymatische Zersetzung der Proteine verhindert und Tertiärstrukturen zerstört oder Proteine entfaltet [72].

Aus dem Zelllysat wurden anschließend mithilfe des RNA/DNA/Protein Purification Plus Kit (Norgen Biotek CORP. Canada, catlog.no 47700) nach Anleitung des Herstellers RNA und Proteine isoliert. Es handelt sich dabei um ein Siliziumkarbid-Säulensystem mit dem mittels Spin-Säulen-Chromatographie DNA, RNA und Proteine aus einem Lysat isoliert werden können.

Die RNA-Konzentration (in ng/ μ l) wurde mithilfe des Scan-Drop Spektralphotometers mittels Ultraviolett/Visible (UV/VIS)-Spektroskopie und dem modifizierten Lambert-Beerschen Gesetz $c = (A \cdot e) / b$ berechnet.

3.2.3. cDNA-Synthese und quantitative Polymerasekettenreaktion

cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden 1000 ng RNA/ μ L RNA pro cDNA-Synthese verwendet. Die erforderliche Menge an RNA wurde dafür mithilfe der RNA-Konzentration berechnet.

Die cDNA-Synthese wurde mit dem OneTaq RT-PCR Kit (New England BioLabs) durchgeführt. Dabei wird RNA von Reverse-Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben.

Dafür wurden folgende Reaktionsmische verwendet:

Tabelle 9: Reaktionsmische für die cDNA-Synthese.

Reaktionsmix 1	Volumen [μ l]
RNA	Je nach RNA-Konzentration (maximal 6)
Oligo d(T)23 Primer	2
H ₂ O (Nuclease-frei)	Gesamtvolumen – Oligo d(T)23 Primer Volumen – RNA-Volumen
Gesamt	8
Reaktionsmix 2	Volumen [μ l]
Reaktionsmix 1	8
M-MuLV Reaction Mix	10
M-MuLV Enzyme Mix	2
H ₂ O (Nuclease-frei)	30
Gesamt	50

Reaktionsmix 1 wurde in 0,2 ml PCR-Tubes pipettiert und im Thermocycler CFX Connect (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) für 5 Minuten bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe gevortext und mit Eis abgekühlt.

M-MuLV Reaction Mix und M-MuLV Enzyme Mix wurden zu Reaktionsmix 1 in die PCR-Tubes pipettiert und im Thermocycler CFX Connect für 1 Stunde bei 42°C inkubiert. Anschließend folgte eine Temperaturerhöhung für 4 Minuten auf 80°C zur Enzymaktivierung und eine kurze Zentrifugation der Probe bei 14.000 g. Schließlich wurde Reaktionsmix 2 mit 30 μ l Nuclease-freiem H₂O verdünnt und die Proben bei -20°C aufbewahrt.

Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Anschließend wurde mittels qPCR über die Amplifikationszyklen verschiedener Gene deren Ct-Wert (kritischer Schwellenwert) ermittelt. Der Ct-Wert wurde mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode normalisiert. Er gibt Auskunft über die relative cDNA- bzw. mRNA-Menge eines Gens in der Probe.

Für die qPCR wurden folgende Primermixe und Templatemixe auf einer 96 Well Platte verwendet:

Tabelle 10: Primer- und Templatemix für die qPCR.

Primermix	Volumen (pro Well) [μl]
Primer	1,25
SYBR-Green	5
H ₂ O	1,25
Gesamt	7,5
Templatemix	Volumen (pro Well) [μl]
cDNA	0,5
H ₂ O	2
Gesamt	2,5

Verwendet wurden Primer für die Zielgene PAX6, ADH7, SPINK7, DSG1, KRT3, KRT12, KRT19, FABP5, PPARG, ELOVL7 und MKI67 sowie TBP und GUSB als Referenz (**Tabelle 6**).

Die qPCR lief nach folgendem Profil im QuantStudio 5 Real-Time-PCR-Gerät (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) ab (**Abbildung 10**):

Zu Beginn gab es eine Aufwärm- sowie eine initiale Denaturierungsphase (Step 1: 5 Minuten bei 95°C).

Während der anschließenden Amplifikationszyklen erfolge zuerst die Denaturierung der Templates (Step 1: 10 Sekunden bei 95°C), dann die Primerhybridisierung (Step 2: 30 Sekunden bei 60°C) und letztlich die Elongation (bei 72°C). Die Elongation benötigte dabei keine eigene Phase im PCR-Profil, da die Stränge aufgrund der kurzen Sequenz-Längen der Amplikons während der Aufwärmphasen vollständig repliziert werden konnten. Die Amplifikation wurden für 40 Zyklen wiederholt. Während der Zyklen bindet sich der SYBR Green Fluoreszenzfarbstoff an die DNA-Doppelstränge. Bei Fluoreszenzmessung entspricht die Fluoreszenzintensität der DNA-Menge im Template, die nach jedem Zyklus gemessen wird. So kann detektiert werden, bei welchem Zyklus der kritische Schwellenwert überschritten wird.

Zuletzt wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um eventuelle Verunreinigungen der Templates zu detektieren. Dazu wurden zunächst die im letzten Zyklus der Amplifikation entstandenen DNA-Doppelstränge denaturiert (Step 1: 15 Sekunden bei 95°C). Es folgte eine erneute

Primerhybridisierung (Step 2: 1 Minute bei 60°C) und Elongation. Anschließend wurde bei kontinuierlicher Fluoreszenzmessung die Temperatur um 0,15°C/s erhöht, wobei die DNA-Doppelstränge langsam aufgeschmolzen wurden und sich bei dem für das jeweilige Amplikon spezifischen Schmelzpunkt auftrennten. Bei Auftrennen der Doppelstränge wird der verwendete SYBR Green Farbstoff freigesetzt, was als Fluoreszenzabnahme detektiert wird. Die Fluoreszenzmessung wurde graphisch in einer Schmelzkurve dargestellt, in der das jeweilige Amplikon an seinem Peak identifiziert werden konnte. Mehrere Peaks in einem Template treten dabei nur bei unerwünschten Nebenprodukten auf.

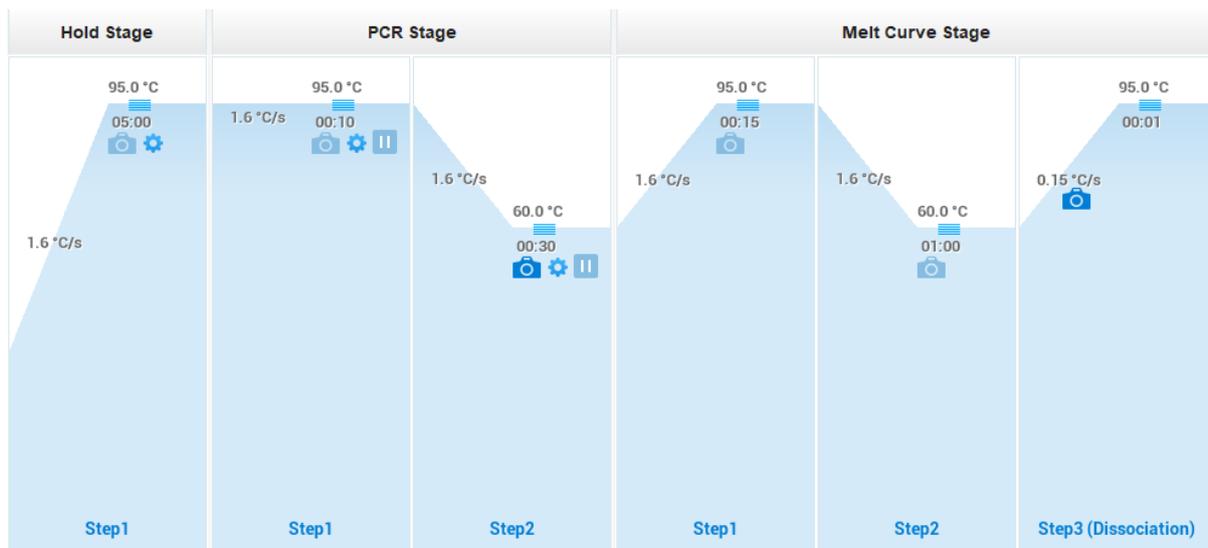


Abbildung 10: qPCR-Profil der QuantStudio™ Design & Analysis-Software. Die qPCR besteht aus drei Stufen mit unterschiedlich vielen Phasen: Hold-Stufe (Aufwärm- und initiale Denaturierungsphase), PCR-Stufe (Amplifikation mit Denaturierungsphase und Primerhybridisierungsphase) und Schmelzkurven-Stufe (Schmelzkurvenanalyse mit Denaturierungsphase, Primerhybridisierungsphase und Schmelzphase). Das Kamera-Symbol zeigt Fluoreszenzmessungen an.

Anschließend wurde mithilfe der von der QuantStudio™ Design & Analysis Software ermittelten Ct-Werte, der ΔCt -Wert, der $\Delta\Delta Ct$ -Wert und der Fold Change berechnet (**Abbildung 11**).

Die Proben wurden in Doppelwerten gemessen, aus deren Ct-Werten der Mittelwert gebildet wurde. Davon wurde zur Normalisierung der Mittelwert der Referenzgene GUSB und TBP subtrahiert ($\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen-Mittelwert}} - Ct_{\text{Referenz-Mittelwert}}$). Zur weiteren Normalisierung wurde der ΔCt -Wert der Behandlungsprobe vom Mittelwert der ΔCt -Werte der Kontrollproben subtrahiert ($\Delta\Delta Ct = \text{Mittel } \Delta Ct_{\text{Kontrollproben-Mittelwert}} - \Delta Ct_{\text{Behandlungsprobe}}$). Schließlich wurde der Fold Change ($FC = 2^{\Delta\Delta Ct}$) berechnet, der Hoch- (>1) oder Herunterregulierungen (<1) der Genexpression des analysierten Gens im Vergleich zur Kontrollprobe beschreibt (**Abbildung 11**).

Probe	Zielgen	Ct 1	Ct 2	Ct Mittel	Ct GUSB	Ct TBP	Ct Ref. Mittel	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	FC
Ctrl.	PAX6	22,477	22,532	22,505	21,929	21,944	21,937	0,569	0,013	1,009
Ctrl.	PAX6	22,589	22,483	22,536	21,931	21,953	21,942	0,594	-0,013	0,991
								ΔCt Mittel		
								0,581		
	Zielgen	Ct 1	Ct 2	Ct Mittel	GUSB	TBP	Ref. Mittel	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	FC
RA 1 μM	PAX6	23,364	23,253	23,309	21,898	21,915	21,906	1,403	-0,821	0,566

Abbildung 11: Beispiel der Berechnung des Fold Changes einer Behandlungsprobe. Die Ct-Werte wurden von der QuantStudio™ Design & Analysis Software ermittelt. Das Zielgen ist PAX6. Die Kontrollproben werden unter Ctrl. aufgeführt, die Behandlungsprobe unter RA 1 μM . Der ΔCt -Wert errechnet sich aus den Mittelwerten der Referenzgene GUSB und TBP subtrahiert vom Mittelwert der Ct-Doppelwerte des Zielgens (ΔCt -Wert=23,309-21,906=1,403). Der $\Delta\Delta Ct$ berechnet sich aus dem ΔCt -Wert der Behandlungsprobe subtrahiert vom Mittelwert der ΔCt -Werte der Kontrollproben ($\Delta\Delta Ct=0,581-1,403=-0,821$). Der Fold Change ($FC=2^{\Delta\Delta Ct}=2^{-0,821}=0,566$) zeigt an, dass die Genexpression von PAX6 der behandelten Probe im Vergleich zur Kontrollprobe (1,009) herunterreguliert ist.

3.2.4. Western Blot

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bradford-Test (Sigma-Aldrich (Katalognummer B6916)) photometrisch bestimmt. Der Bradford-Test ist eine Färbemethode zum Nachweis von Proteinen bei der der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG-250) verwendet wird. CBBG-250 bildet Komplexe mit kationischen und unpolaren Seitenketten in Proteinen und wechselt somit seine Farbe von rot zu blau, wodurch sich das Absorptionsspektrum des Farbstoffes von 470 nm zu 959 nm verschiebt [11].

Je 2,5 μl der Protein-Proben wurden zusammen mit 125 μl der Bradford-Reagenz in ein Well einer 96 Well Platte pipettiert. Zur Kalibrierung wurde eine BSA-Standardreihe mit je zwei Standards aufsteigender Konzentration von 0,1 $\mu g/ml$, 0,2 $\mu g/ml$, 0,4 $\mu g/ml$, 0,8 $\mu g/ml$ und 1,6 $\mu g/ml$ verwendet. Um Verunreinigungen der Bradford-Reagenz auszuschließen, wurden ebenfalls Kontrollproben mit 2,5 μl H₂O verwendet.

Die Extinktion wurde anschließend mit dem Infinite® F50 Mikroplatten-Reader (Tecan Group AG) bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen und anhand der Standardkurve ausgewertet.

Probenaufbereitung und Elektrophorese

Für die Elektrophorese wurden die Proben zunächst aufbereitet, indem sie mit 5-fach Laemmlipuffer (und H₂O) versetzt wurden. Die Probenmixe (**Tabelle 11**) wurden anschließend zur Denaturierung der Proteine für 5 Minuten im Thermoblock auf 95°C erhitzt.

Tabelle 11: Probenmix für die Proteinaufbereitung für die Elektrophorese. Pro Probe wurden 20 µg Protein verwendet. Das benötigte Volumen wurde anhand der zuvor bestimmten Proteinkonzentration errechnet.

Probenmix	Volumen [µl]
Probe	Je nach Proteinkonzentration (maximal 16)
H ₂ O	Gesamtvolumen – Volumen Laemmlipuffer – Volumen Proteinprobe
Laemmlipuffer (5-fach)	4
Gesamt	20

Als nächstes wurde eine NuPAGE™ 4-12%-iges Bis-Tris SDS-Gelplatte (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) in die Elektrophoresekammer eingespannt, die mit NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer (20X) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) aufgefüllt wurde. Das Gel wurde dann mit 5 µl Precision Plus Protein Standard „Dual-Colour“-Marker (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) und den 20 µl Proteinprobenmischen beladen.

Der „Dual-Colour“-Marker gibt Referenzbanden von 10–250 kDa an, anhand derer die Proteine an ihrer Molekülmasse identifiziert werden können.

Die Elektrophorese wurde mit 80 Volt begonnen und nach zehn Minuten für eine Stunde auf 120 Volt erhöht. Die Proteine wurden nach ihrer Molekülmasse (kDa) getrennt.

Blotten

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die Proteinbanden mithilfe des Trans-Blot Turbo Transfer Systems (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) nach einem vom Hersteller vorgegebenen Blottingprotokoll (1 Minigel im Protokoll „Hohe Molekülmasse“: 10 Minuten Blotzeit mit 1,3 Ampere bei bis zu 25 Volt) auf eine Nitrozellulosemembran geblottet.

Es folgte ein dreimaliges Waschen mit je 10 ml Waschlösung, die zuvor aus Western-Froxx-Waschlösung, verdünnt mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:10, hergestellt wurde.

Antikörper Inkubation

Zur Antikörper Inkubation wurden die in **Tabelle 7** aufgelisteten Primär-Antikörper im angegebenen Verhältnis mit der jeweiligen anti-mouse- oder anti-rabbit-Sekundär-Antikörper-Fertiglösung zur Immundetektion (BioFroxx GmbH, Einhausen, Deutschland) verdünnt und auf die Nitrozellulosemembran gegeben.

Begonnen wurde mit dem PAX6-Antikörper, mit dem die Membran unter Schütteln über Nacht bei 4°C inkubiert wurde. Nach der Inkubation erfolgte erneut ein dreimaliges Waschen mit je 10 ml Waschlösung.

Zur Proteindetektion wurde die Blotmembran dann für eine Minute mit einem Chemilumineszenz-Reagenz (Western Foxx) inkubiert und anhand des Chemilumineszenz-Signals in einer Charge-coupled device-Kamera (CCD-Kamera) (iBright™ System 1500 (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)) analysiert.

Um verschiedene an einer Blotmembran gebundene Proteine auswerten zu können, müssen die jeweiligen Primär-Antikörper nach der Detektion von der Membran gelöst werden, damit sie während der Detektion anderer Primär-Antikörper keine Überlagerungen oder Signalstörungen verursachen und somit die densitometrische Auswertung der Proteine verfälschen. Dazu wurde die Blotmembran für 30 Minuten mit 10 ml WesternFroxx Stripping Puffer 10x (BioFroxx GmbH, Einhausen, Deutschland) behandelt und anschließend erneut dreimal für fünf Minuten mit 10 ml Waschpuffer gewaschen. Der Stripping Puffer denaturiert die Antikörper durch eine Kombination aus saurem pH-Wert, Wärmeeinwirkung und Detergenzien und löst sie von der Blotmembran. Der Waschvorgang entfernt anschließend die denaturierten Antikörper sowie Rückstände der Chemilumineszenz-Reagenz.

Der gleiche Vorgang aus Inkubation über Nacht, Waschen, Chemilumineszenz-Inkubation, Auswertung mittels CCD-Kamera, Stripping und Waschen wurde mit dem FABP5-Antikörper durchgeführt, um FABP5-Proteinmengen zu quantifizieren.

Letztlich wurde eine Inkubation mit β -Actin (ACTB) durchgeführt, welche als Ladekontrolle diente, mit der die Proben verrechnet werden konnten, um eine einheitliche Proteinmenge zu erhalten. Dies erfolgte auf gleiche Weise wie PAX6 und FABP5, mit der Ausnahme, dass die Blotmembran nur für 30 Minuten mit dem Antikörper inkubiert wurde und nicht wie bei den anderen Antikörpern über Nacht.

Desitometrische Auswertung

Zur quantitativen Bestimmung der Proteinmenge wurden die vom iBright™ System 1500 erstellten Bilder mit der iBright™ Analysis-Software desitometrisch ausgewertet (**Abbildung 12**).

Für eine übersichtlichere und vergleichbarere Darstellung der WesternBlots wurden die erstellten Bilder der Blotmembranen der jeweiligen Proben graphisch vereinfacht und lediglich die untersuchten Proteinbanden zusammen mit ihren Referenzbanden abgebildet.

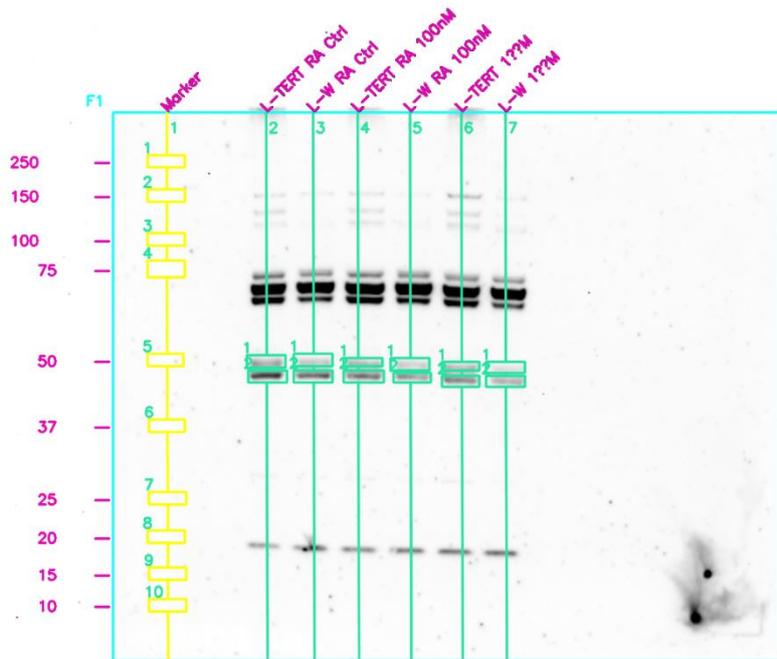


Abbildung 12: Densitometrische Auswertung der PAX6-Proteinmenge mittels iBright™ Analysis-Software. Die Precision Plus Protein Standard „Dual-Colour“-Markerbanden wurden markiert und ihren Molekülmassen zugeordnet (10 kDa bis 250 kDa). Die Linien wurden den jeweiligen Proben zugeordnet und die gesuchten Proteinbanden anhand des Precision Plus Protein Standard „Dual-Colour“-Markerbanden identifiziert und markiert. Die Proteinmenge wurde anschließend von der Software ermittelt. Gleiches wurde für die Ladekontrolle mit ACTB durchgeführt und anschließend die Proteinmenge von PAX6 mithilfe der Proteinmenge von ACTB normalisiert, indem der Quotient aus den jeweiligen Proben- und Referenzbanden gebildet wurde. Letztlich wurde die Signalstärke der Proben auf die L-TERT Kontrolle normalisiert und in % davon angegeben (L-TERT Kontrolle= 100%).

3.2.5. Statistische Analyse

Die Statistische Analyse der Genexpression in L-TERT und L-W anhand des Fold Changes ($FC = 2^{\Delta\Delta Ct}$) sowie der Proteinexpression anhand der Signalintensität in Prozent wurde mit GraphPad Prism 7.04 durchgeführt. Mittels zweifacher Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden die Genexpression und Proteinexpression auf einen Effekt der Zelllinie, Effekt der Behandlung und einen zelllinienspezifischen Effekt der Behandlung untersucht. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Eine graphische Darstellung der Ergebnisse in Form von Balkendiagrammen mit den Versuchsergebnissen im Geomittel sowie der Standardabweichung wurde ebenfalls von GraphPad Prism 7.04 erstellt und mit Signifikanzpfeilen ergänzt.

Der Effekt der Zelllinie wurde in einem weiteren Schritt mittels Šidák-Test genauer spezifiziert. Zur Darstellung der Unterschiede in der basalen Genexpression wurden dabei nur die Ergebnisse der Kontrollproben verwendet.

Der Effekt der Behandlung wurde mittels Dunnett's Post-Hoc-Test (multipler Vergleichstest) genauer analysiert.

4. Ergebnisse

4.1. Genexpressionsergebnisse der Stammzell- und Differenzierungsmarker nach Behandlung von L-TERT und L-W mit Retinolderivaten, bzw. Retinoidrezeptorantagonisten

4.1.1. Genexpression von PAX6

In der Genexpression von PAX6 (**Abbildung 13**) zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollproben der Zelllinien L-TERT und L-W in allen Versuchsreihen mit Behandlung mit Retinoiden (at-RA $p=0,0001$, Ret $p<0,0001$) sowie Behandlung mit den RAR/RXR-Blockern (AGN $p<0,0001$, UVI $p<0,0001$). Die basale PAX6-Genexpression in L-TERT war dabei deutlich höher als die PAX6-Expression der L-W LEZ.

Für L-TERT zeigte sich zudem eine Hochregulierung der PAX6-Genexpression sowohl bei Behandlung mit $1 \mu\text{M}$ at-RA ($p=0,0005$) und $1 \mu\text{M}$ Ret ($p=0,0012$) als auch bei Behandlung mit $1,0 \mu\text{M}$ AGN ($p=0,0142$) und $1,5 \mu\text{M}$ UVI ($p=0,0305$). Unter Behandlung mit anderen Konzentrationen zeigte sich kein signifikanter Effekt (at-RA $p=0,1915$, Ret $p=0,2730$, AGN $p>0,1148$, UVI $p>0,6561$). Für L-W zeigten sich bei keiner Behandlung mit Retinoiden und RAR/RXR-Antagonisten verschiedener Konzentration signifikante Effekte (at-RA $p>0,4620$, Ret $p>0,0987$, AGN $p>0,7324$, UVI $p>0,5220$).

Ein zelllinienspezifischer Effekt der Behandlung konnte nicht festgestellt werden ($p>0,1902$).

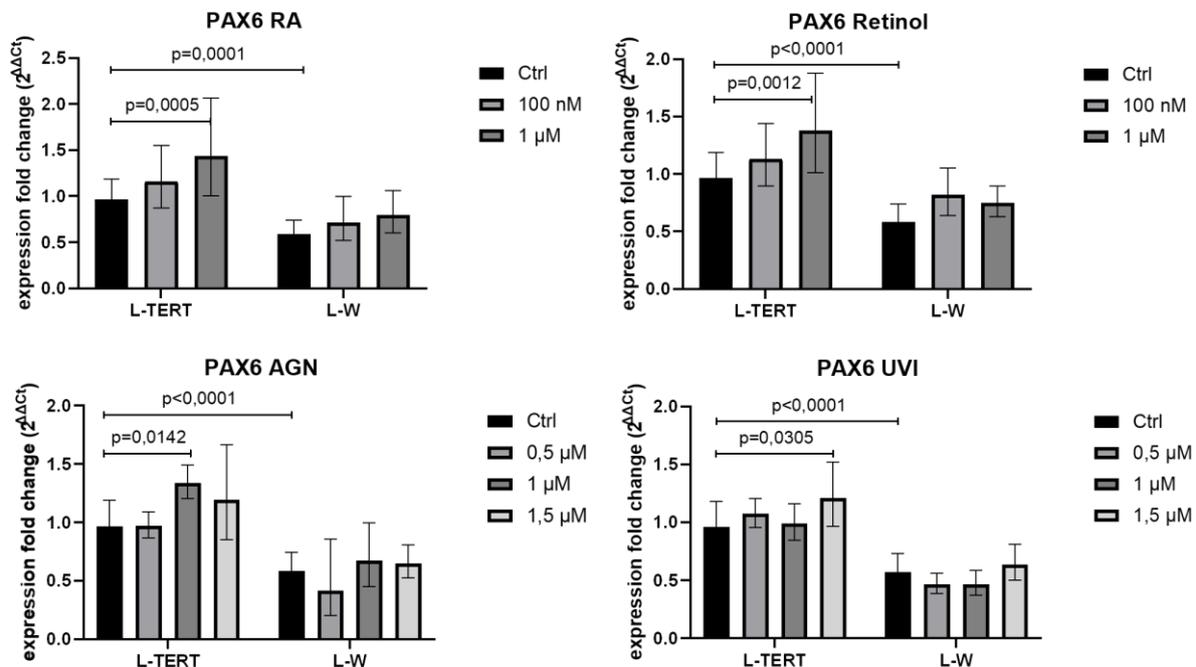


Abbildung 13: PAX6-Genexpression. Balkendiagramme zeigen den Fold Change der mit all-trans Retinsäure (Ctrl., 100 nM, 1 μM), Retinol (Ctrl., 100 nM, 1 μM), AGN (Ctrl., 0,5 μM, 1,0 μM, 1,5 μM) und UVI (Ctrl., 0,5 μM, 1,0 μM, 1,5 μM) behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle (Ctrl.). Die Versuche wurden mit Proben der Limbusepithel-Zelllinien L-TERT und L-W dreimal unter denselben Bedingungen durchgeführt ($n=3$).

Auch auf Proteinebene wurde ein Unterschied im PAX6 Gehalt zwischen L-TERT und L-W deutlich: In allen Versuchsreihen gab es einen signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollproben (at-RA $p < 0,0001$, Ret $p = 0,0006$, AGN $p = 0,001$, UVI $p = 0,0149$). Auch hier enthielten L-TERT LEZ mehr PAX6 als L-W (**Abbildung 14**).

Für L-TERT zeigte sich eine signifikante Hochregulierung der PAX6-Proteinexpression bei Behandlung mit at-RA in der Konzentration $1 \mu\text{M}$ ($p = 0,0055$). Die Behandlung mit 100 nM at-RA zeigte keinen signifikanten Effekt ($p = 0,2631$). Auch in L-W wurde die PAX6-Genexpression bei Behandlung vom $1 \mu\text{M}$ at-RA signifikant herunterreguliert ($p = 0,0055$). Wie bei L-TERT hatte auch in L-W die Behandlung mit 100 nM at-RA keinen signifikanten Effekt ($p = 0,0894$).

Bei Behandlung mit RAR/RXR-Antagonisten ergab sich lediglich für L-TERT eine Herunterregulierung der PAX6-Genexpression bei Behandlung mit $1,5 \mu\text{M}$ AGN ($p = 0,0010$). AGN in anderen Konzentrationen ($p > 0,9125$) sowie sämtliche Behandlungen mit UVI ($p > 0,4808$) hatten bei keiner der beiden Zelllinien einen signifikanten Effekt.

Auf Proteinebene konnte zusätzlich ein zelllinienspezifischer Effekt der Behandlung bei Behandlung mit AGN ($p = 0,0285$) festgestellt werden. Bei der Behandlung mit at-RA ($p = 0,8543$), Retinol ($p = 0,7141$) und UVI ($p = 0,7510$) war dies nicht der Fall.

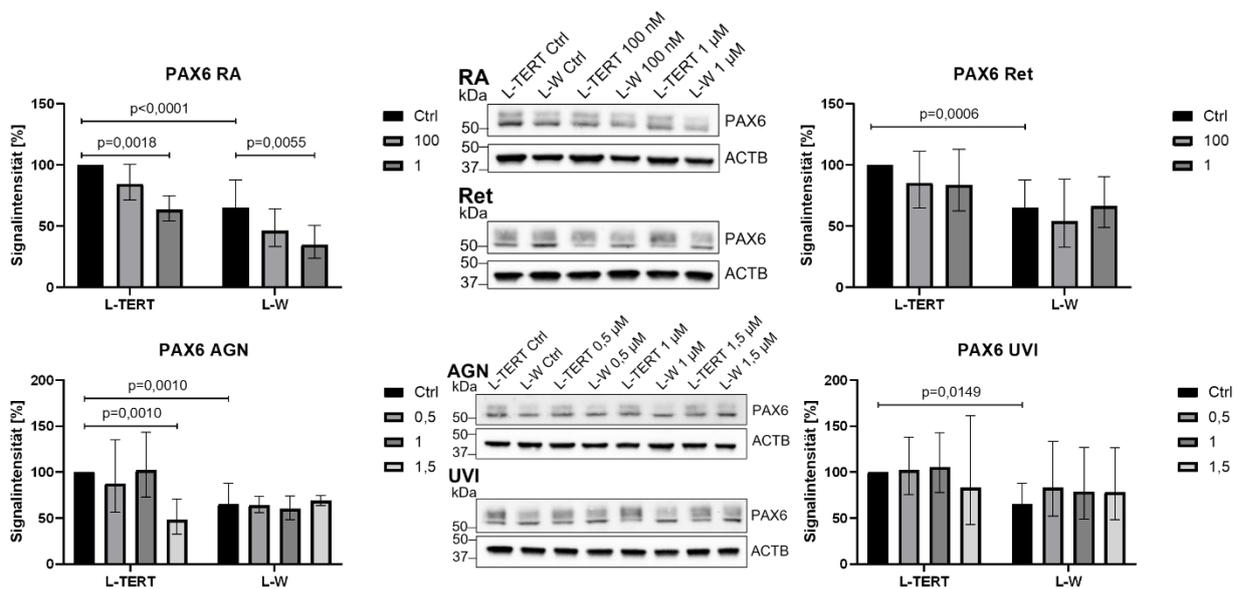


Abbildung 14: PAX6-Proteinexpression. Balkendiagramme zeigen die Signalintensität der mit at-RA (Ctrl., 100 nM , $1 \mu\text{M}$), Ret (Ctrl., 100 nM , $1 \mu\text{M}$), AGN (Ctrl., $0,5 \mu\text{M}$, $1,0 \mu\text{M}$, $1,5 \mu\text{M}$) und UVI (Ctrl., $0,5 \mu\text{M}$, $1,0 \mu\text{M}$, $1,5 \mu\text{M}$) behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle (Ctrl.). Die Proteinexpression von PAX6 ($46\text{-}48 \text{ kDa}$) wurde auf ACTB (41 kDa) normalisiert. Die Western-Blot-Versuche wurden mit Proben der Limbusepithel-Zelllinien L-TERT und L-W dreimal unter denselben Bedingungen durchgeführt ($n=3$).

4.1.2. Genexpression von ADH7

Die Genexpression von ADH7 war weder zwischen den Kontrollproben der Zelllinien (at-Ra $p=0,9948$, Ret $p=0,9665$, AGN $p=0,9897$, UVI $p=0,9084$) noch beim Großteil der Behandlung mit at-Ra ($p>0,0739$), Retinol ($p>0,5041$), AGN ($p>0,6821$) oder UVI ($p=0,3666$) signifikant verändert (**Abbildung 15**). Lediglich die Behandlung von L-W mit $1,0 \mu\text{M}$ UVI führte zu einer Hochregulation der ADH7-Genexpression ($p=0,0229$).

Ein zelllinienspezifischer Effekt der Behandlung konnte nicht festgestellt werden ($p>0,1117$).

Da ADH7 generell sehr wenig in den Zelllinien exprimiert war (Ct-Werte im Durchschnitt über 30), ergab sich eine sehr starke Streuung in den Fold Changes, weshalb die Auswertung nur wenig aussagekräftig ist. Der Vollständigkeit halber werden die Ergebnisse dennoch aufgeführt.

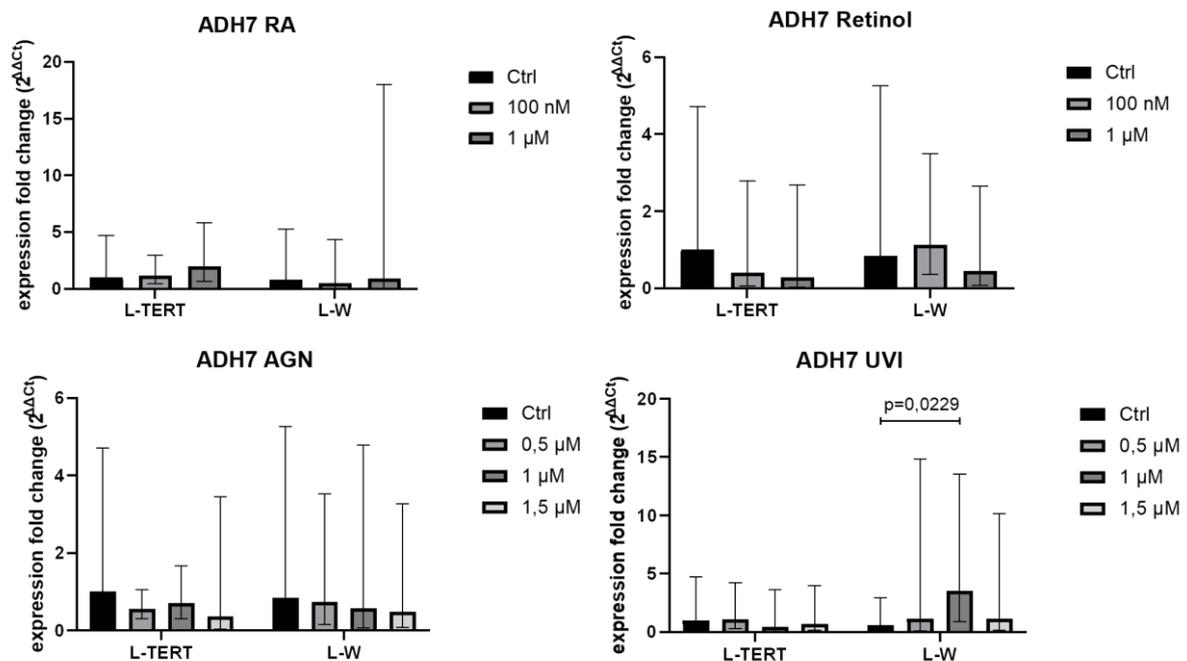


Abbildung 15: ADH7-Genexpression. Balkendiagramme zeigen den Fold Change der mit all-trans Retinsäure (Ctrl., 100 nM, 1 μM), Retinol (Ctrl., 100 nM, 1 μM), AGN (Ctrl., 0,5 μM , 1,0 μM , 1,5 μM) und UVI (Ctrl., 0,5 μM , 1,0 μM , 1,5 μM) behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle (Ctrl.). Die Versuche wurden mit Proben der Limbusepithel-Zelllinien L-TERT und L-W dreimal unter denselben Bedingungen durchgeführt ($n=3$).

4.1.3. Genexpression von SPINK7

Die Genexpression von SPINK7 war weder zwischen den Kontrollproben (at-RA $p=0,9960$, Ret $p=0,9952$, AGN $p=0,9989$, UVI $p=0,9989$) der Zelllinien noch bei Behandlung mit at-Ra ($p>0,1243$), Retinol ($p>0,8061$), AGN ($p>0,9325$) oder UVI ($p>0,7673$) signifikant verändert (**Abbildung 16**).

Ein zelllinienspezifischer Effekt der Behandlung konnte nicht festgestellt werden ($p>0,4749$).

Da SPINK7 ebenfalls sehr wenig in den Zelllinien exprimiert war (Ct-Werte im Durchschnitt >27), war die Auswertung auch hier nur wenig aussagekräftig. Der Vollständigkeit halber werden die Ergebnisse dennoch aufgeführt.

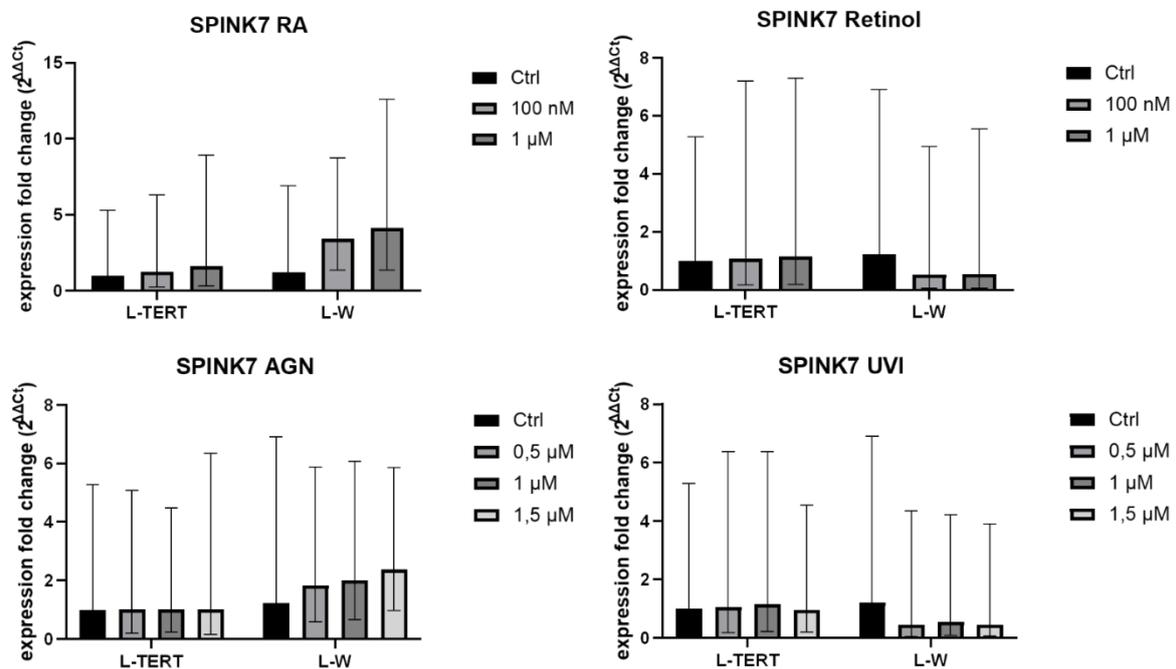


Abbildung 16: SPINK7-Genexpression. Balkendiagramme zeigen den Fold Change der mit at-RA (Ctrl., 100 nM, 1 μ M), Ret (Ctrl., 100 nM, 1 μ M), AGN (Ctrl., 0,5 μ M, 1,0 μ M, 1,5 μ M) und UVI (Ctrl., 0,5 μ M, 1,0 μ M, 1,5 μ M) behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle (Ctrl.). Die Versuche wurden mit Proben der Limbusepithel-Zelllinien L-TERT und L-W dreimal unter denselben Bedingungen durchgeführt (n=3).

4.2. Genexpressionsergebnisse der Korneal- und konjunktival-spezifischen Strukturproteine und Adhäsionsmarker nach Behandlung von L-TERT und L-W mit Retinolderivaten, bzw. Retinoidrezeptorantagonisten

4.2.1. Genexpression von DSG1

Die Genexpression von DSG1 war weder zwischen den Kontrollproben der Zelllinien (at-RA $p=0,6929$, Ret $p=0,7006$, AGN $p=0,9835$, UVI $p=0,8196$) noch beim Großteil der Behandlungen mit at-RA ($p>0,4695$), Retinol ($p>0,5015$), AGN ($p>0,2404$) oder UVI ($p>0,7975$) signifikant verändert (**Abbildung 17**). Einzig die Behandlung von L-TERT mit 0,5 μM AGN ($p=0,0189$) bewirkte eine Hochregulierung der DSG1-Genexpression.

Zusätzlich konnte ein zelllinienspezifischer Effekt der Behandlung bei Behandlung mit AGN ($p=0,0055$) festgestellt werden. Bei der Behandlung mit at-RA ($p=0,9840$), Retinol ($p=0,9759$) und UVI ($p=0,7312$) war dies nicht der Fall (**Abbildung 17**).

Da DSG1 generell sehr wenig in den Zelllinien exprimiert war (Ct-Werte im Durchschnitt >30), ergab sich eine sehr starke Streuung in den Fold Changes, weshalb die Auswertung nur wenig aussagekräftig ist. Der Vollständigkeit halber werden die Ergebnisse dennoch aufgeführt.

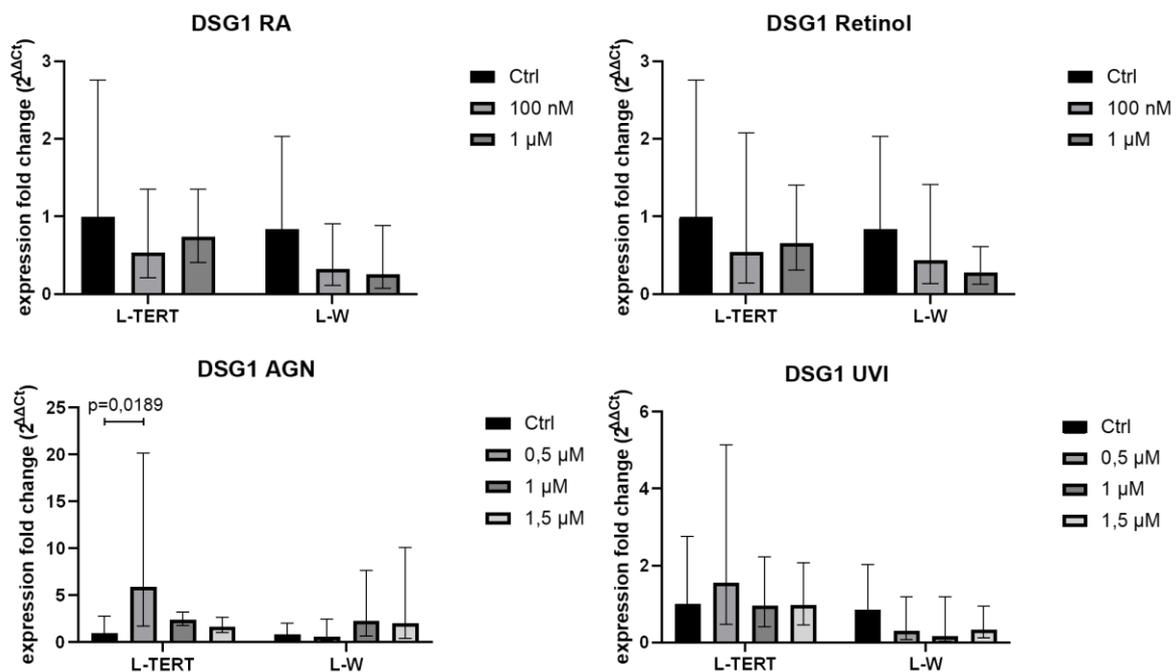


Abbildung 17: DSG1-Genexpression. Balkendiagramme zeigen den Fold Change der mit at-RA (Ctrl., 100 nM, 1 μM), Ret (Ctrl., 100 nM, 1 μM), AGN (Ctrl., 0,5 μM , 1,0 μM , 1,5 μM) und UVI (Ctrl., 0,5 μM , 1,0 μM , 1,5 μM) behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle (Ctrl.). Die Versuche wurden mit Proben der Limbusepithel-Zelllinien L-TERT und L-W dreimal unter denselben Bedingungen durchgeführt ($n=3$).

4.2.2. Genexpression von KRT12

Die Genexpression von KRT12 war in sämtlichen Versuchen unterhalb der Detektionsgrenze. Bei keiner der beiden Zelllinien vor oder nach Behandlung mit Retinoiden oder Retinoidrezeptorantagonisten war eine Expression mittels qPCR detektierbar.

4.2.3. Genexpression von KRT3

Die Genexpression von KRT3 war weder zwischen den Kontrollproben der Zelllinien (at-RA $p=0,0742$, Ret $p=0,0568$, AGN $p=0,1959$, UVI $p=0,0612$) noch bei Behandlung mit at-Ra ($p>0,5665$), Retinol ($p>0,2173$), AGN ($p>0,3456$) oder UVI ($p>0,4717$) signifikant verändert (**Abbildung 18**).

Ein zelllinienspezifischer Effekt der Behandlung konnte nicht festgestellt werden ($p>0,4133$).

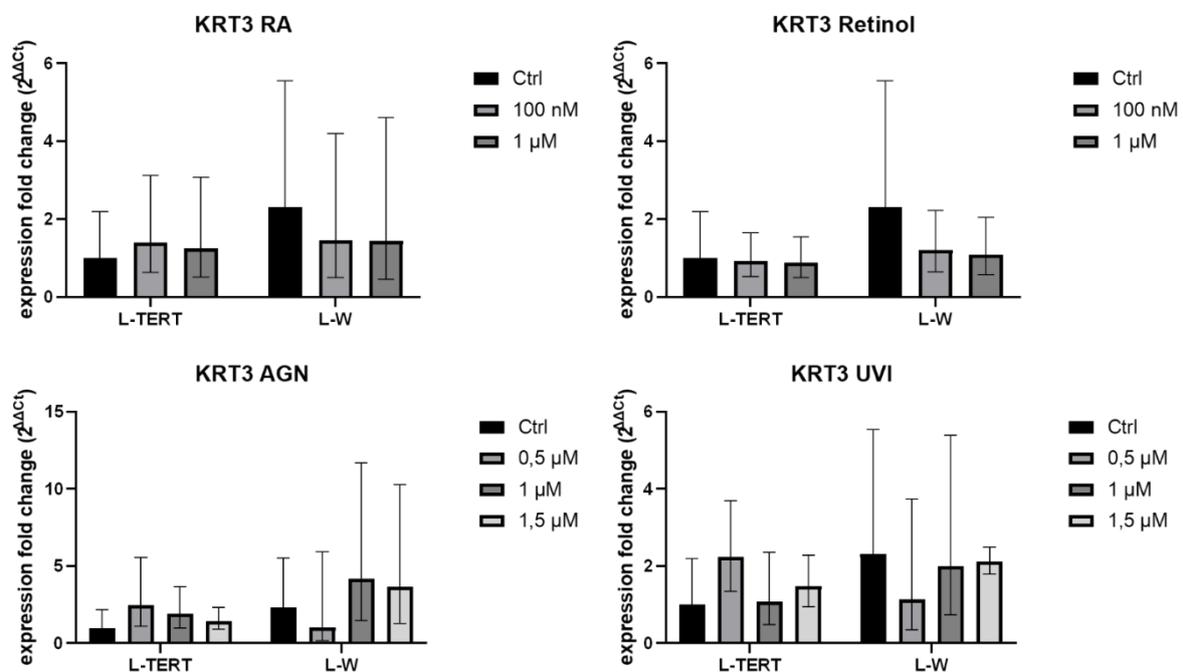


Abbildung 18: KRT3-Genexpression. Balkendiagramme zeigen den Fold Change der mit at-RA (Ctrl., 100 nM, 1 μ M), Ret (Ctrl., 100 nM, 1 μ M), AGN (Ctrl., 0,5 μ M, 1,0 μ M, 1,5 μ M) und UVI (Ctrl., 0,5 μ M, 1,0 μ M, 1,5 μ M) behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle (Ctrl.). Die Versuche wurden mit Proben der Limbusepithel-Zelllinien L-TERT und L-W dreimal unter denselben Bedingungen durchgeführt ($n=3$).

4.2.4. Genexpression von KRT19

Es zeigte sich eine signifikant höhere KRT19-Genexpression in den Kontrollproben von L-W (at-RA $p=0,0052$, Ret $p=0,0006$, AGN $p=0,0007$, UVI $p=0,006$) (**Abbildung 19**).

L-TERT zeigte keinen Effekt der Behandlung mit Retinoiden (at-RA $p>0,4638$, Ret $p>0,0921$) oder RAR/RXR-Antagonisten (AGN $p>0,1509$, UVI $p>0,6571$).

Für L-W gab es bei Behandlung mit 100 nM Retinol ($p=0,0488$) sowie 1 μM ($p=0,0107$) Retinol eine Hochregulierung der Genexpression von KRT19 und bei Behandlung mit 0,5 μM AGN ($p=0,0243$), 1,0 μM AGN sowie 1,5 μM ($p=0,0163$) AGN eine Herunterregulierung der Genexpression. Bei Behandlung mit RA ($p>0,6147$) und UVI ($p>0,3130$) hatte keinen signifikanten Effekt (**Abbildung 19**).

Ein zelllinienspezifischer Effekt der Behandlung konnte nicht festgestellt werden ($p>0,1135$).

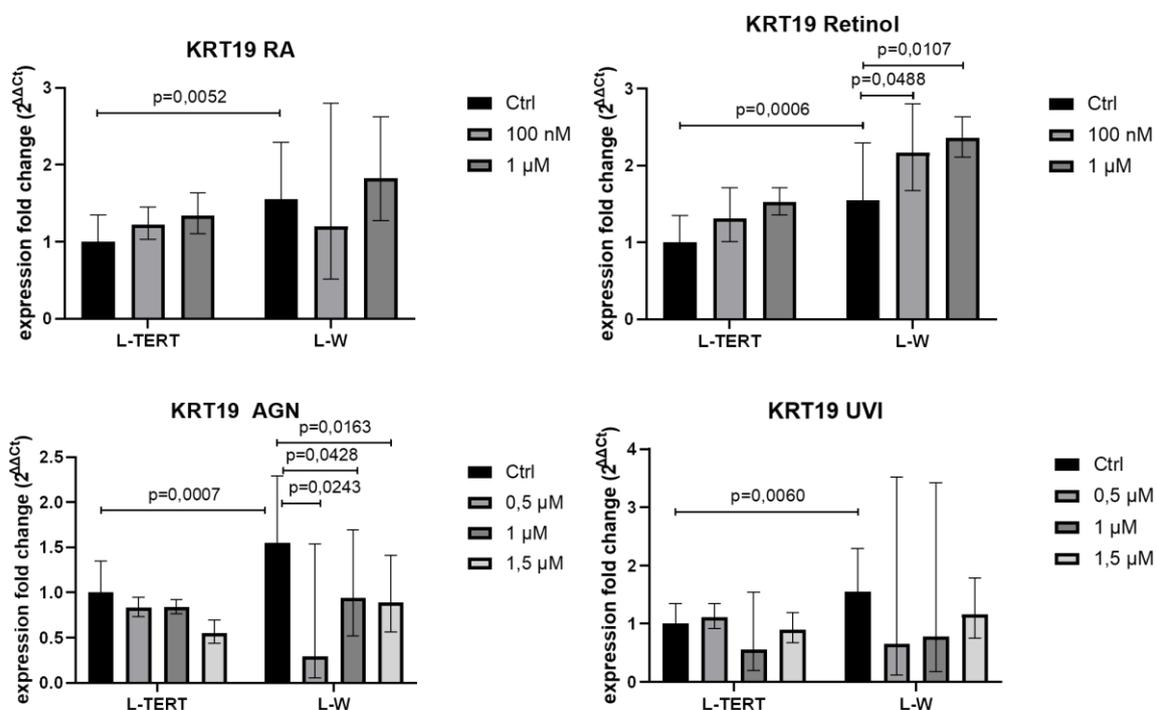


Abbildung 19: KRT19-Genexpression. Balkendiagramme zeigen den Fold Change der mit at-RA (Ctrl., 100 nM, 1 μM), Ret (Ctrl., 100 nM, 1 μM), AGN (Ctrl., 0,5 μM , 1,0 μM , 1,5 μM) und UVI (Ctrl., 0,5 μM , 1,0 μM , 1,5 μM) behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle (Ctrl.). Die Versuche wurden mit Proben der Limbusepithel-Zelllinien L-TERT und L-W dreimal unter denselben Bedingungen durchgeführt ($n=3$).

4.3. Genexpression Retinolstoffwechsel-relevanter Gene nach Behandlung von L-TERT und L-W mit Retinolderivaten, bzw. Retinoidrezeptorantagonisten

4.3.1. Genexpression von FABP5

In der Genexpression von FABP5 zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollproben von L-TERT und L-W (at-RA $p=0,9969$, Ret $p=0,9968$, AGN $p=0,9991$, UVI $p=0,9993$) (**Abbildung 20**).

Bei Behandlung von L-TERT mit $1 \mu\text{M}$ at-RA ($p=0,451$) gab es eine signifikante Hochregulation der FABP5-Genexpression, während die Behandlung von L-TERT mit $1 \mu\text{M}$ AGN ($p=0,0498$) eine Herunterregulierung bewirkte. Retinol ($p>0,7807$) und UVI ($p>0,3556$) erzielten in L-TERT keinen Effekt.

In L-W bewirkte die Behandlung mit $0,5 \mu\text{M}$ AGN ($p=0,0265$), $1,0 \mu\text{M}$ AGN ($p=0,0192$), $1,5 \mu\text{M}$ AGN ($p=0,0201$) sowie mit $1,5 \mu\text{M}$ UVI ($p=0,0417$) eine Herunterregulierung der FABP5-Genexpression. RA ($p>0,0892$) und Ret ($p>0,8187$) zeigten keinen Effekt (**Abbildung 20**).

Ein zelllinienspezifischer Effekt der Behandlung konnte nicht festgestellt werden ($p>0,2439$).

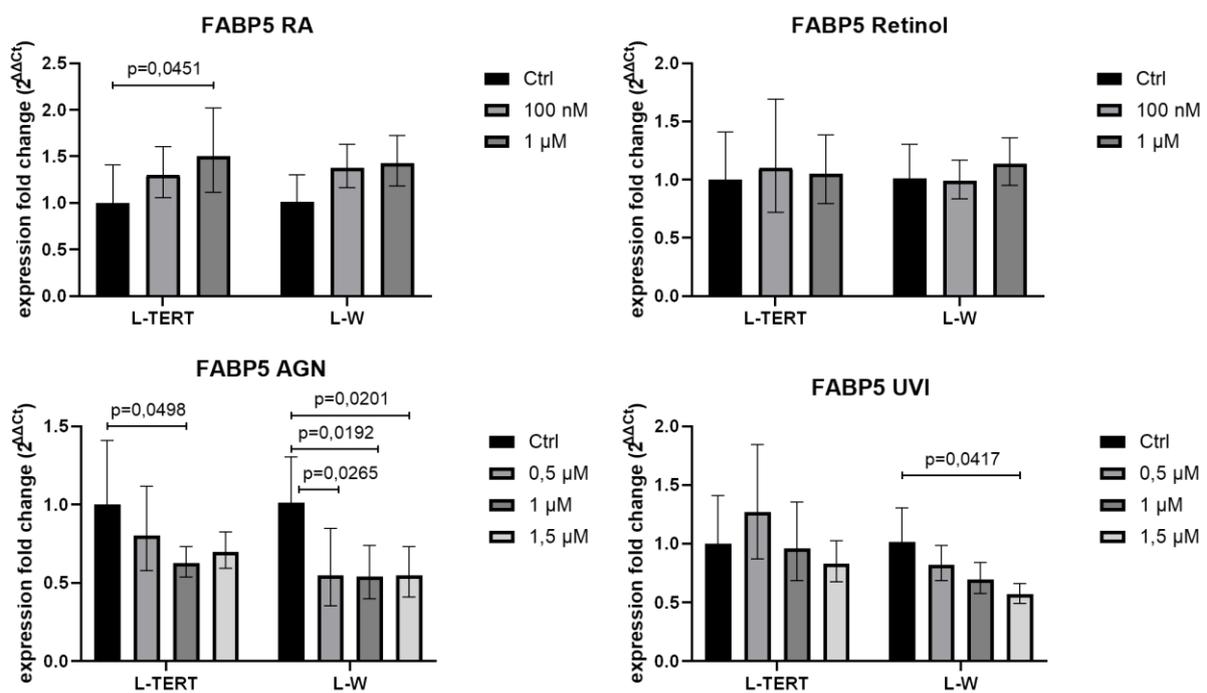


Abbildung 20: FABP5-Genexpression. Balkendiagramme zeigen den Fold Change der mit at-RA (Ctrl., 100 nM, $1 \mu\text{M}$), Ret (Ctrl., 100 nM, $1 \mu\text{M}$), AGN (Ctrl., $0,5 \mu\text{M}$, $1,0 \mu\text{M}$, $1,5 \mu\text{M}$) und UVI (Ctrl., $0,5 \mu\text{M}$, $1,0 \mu\text{M}$, $1,5 \mu\text{M}$) behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle (Ctrl.). Die Versuche wurden mit Proben der Limbusepithel-Zelllinien L-TERT und L-W dreimal unter denselben Bedingungen durchgeführt ($n=3$).

Im Gegensatz zur Genexpression wurde auf Proteinebene ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollproben der Versuchsreihe at-RA ($p=0,0272$) sowie mit AGN ($p=0,0056$) deutlich. Bei Ret ($p=0,4877$) und UVI ($p=0,2781$) war die nicht der Fall (**Abbildung 21**).

Ein Effekt der Behandlung zeigte sich allerdings nicht (at-RA $p>0,7128$, Ret $p>0,1677$, AGN $p>0,2798$, UVI $p>0,0572$).

Auch ein zelllinienspezifischer Effekt der Behandlung konnte nicht festgestellt werden ($p>0,5810$).

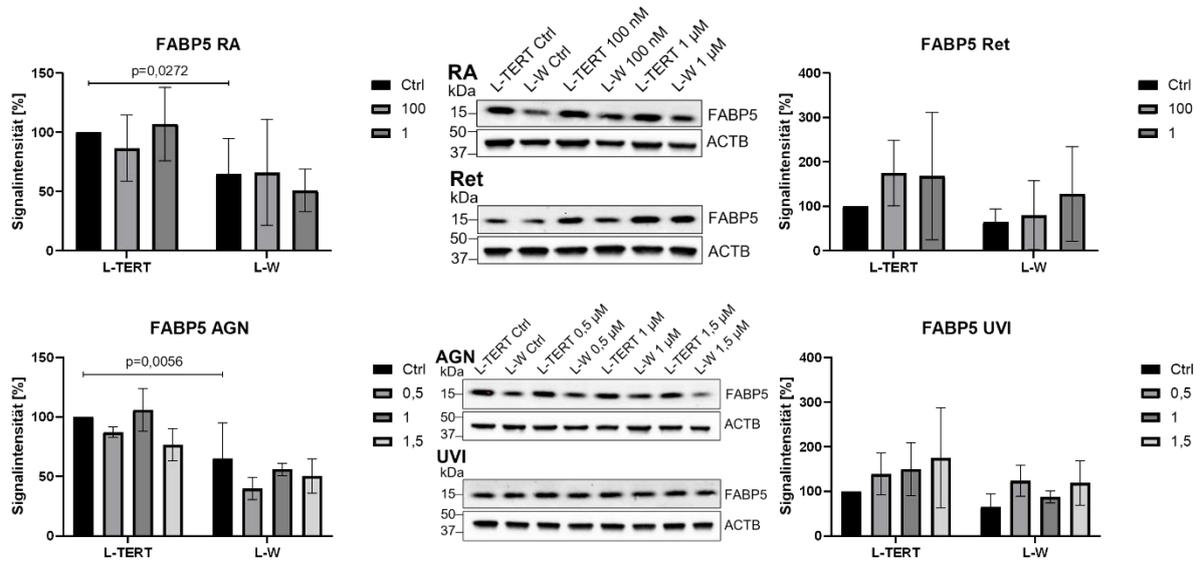


Abbildung 21: FABP5-Proteinexpression. Balkendiagramme zeigen die Signalintensität der mit at-RA (Ctrl., 100 nM, 1 μ M), Ret (Ctrl., 100 nM, 1 μ M), AGN (Ctrl., 0,5 μ M, 1,0 μ M, 1,5 μ M) und UVI (Ctrl., 0,5 μ M, 1,0 μ M, 1,5 μ M) behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle (Ctrl.). Die Proteinexpression von FABP5 (15 kDa) wurde auf ACTB (41 kDa) normalisiert. Die Western-Blot-Versuche wurden mit Proben der Limbusepithel-Zelllinien L-TERT und L-W dreimal unter denselben Bedingungen durchgeführt ($n=3$).

4.3.2. Genexpression von PPARG

Ein signifikanter Unterschied in der PPARG-Genexpression zwischen den Zelllinien war nicht festzustellen (at-RA $p=0,8950$, Ret $p=0,9311$, AGN $p=0,9985$, UVI $p=0,9608$) (**Abbildung 22**).

Für L-TERT zeigte sich eine signifikante Hochregulierung der PPARG-Genexpression bei Behandlung mit 1 μM RA ($p=0,0057$), 1 μM Retinol ($p=0,0388$) und 1,5 μM AGN ($p=0,0251$). Die Behandlung mit UVI ($p>0,5709$) bewirkte keinen Effekt.

In L-W führte lediglich die Behandlung mit 1,0 μM UVI ($p=0,0429$) zu einer signifikanten Hochregulierung der Genexpression. Behandlung mit at-RA ($p>0,7398$), Retinol ($p>0,1243$) und AGN ($p>0,3085$) zeigte keinen Effekt (**Abbildung 22**).

Zusätzlich konnte ein zelllinienspezifischer Effekt der Behandlung bei Behandlung mit RA ($p=0,0479$) und AGN ($p=0,0108$) festgestellt werden. Bei der Behandlung mit Ret ($p=0,4380$), und UVI ($p=0,5682$) war dies nicht der Fall.

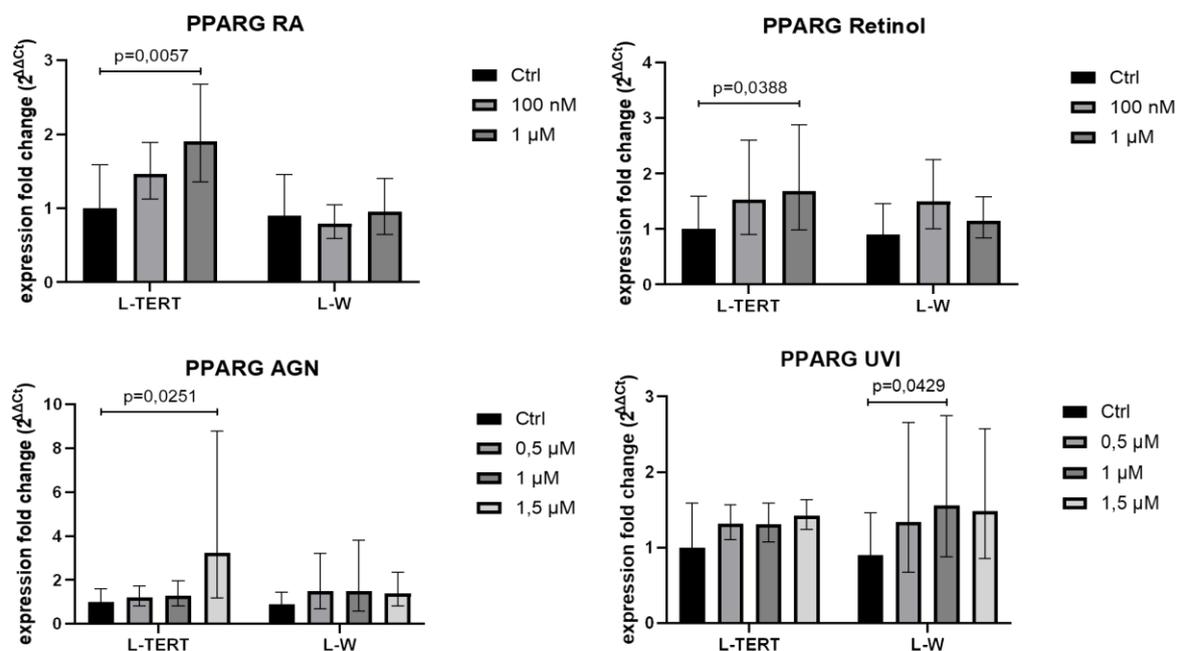


Abbildung 22: PPARG-Genexpression. Balkendiagramme zeigen den Fold Change der mit at-RA (Ctrl., 100 nM, 1 μM), Ret (Ctrl., 100 nM, 1 μM), AGN (Ctrl., 0,5 μM , 1,0 μM , 1,5 μM) und UVI (Ctrl., 0,5 μM , 1,0 μM , 1,5 μM) behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle (Ctrl.). Die Versuche wurden mit Proben der Limbusepithel-Zelllinien L-TERT und L-W dreimal unter denselben Bedingungen durchgeführt ($n=3$).

4.3.3. Genexpression von ELOVL7

Die Genexpression von ELOVL7 war weder zwischen den Kontrollproben der Zelllinien noch bei Behandlung mit at-Ra ($p=0,8123$), Retinol ($0,8442$), AGN ($p=0,9790$) oder UVI ($p=0,9565$) signifikant verändert (**Abbildung 23**). Ein Effekt der Behandlung zeigte sich nur für L-TERT bei Behandlung mit $1,5 \mu\text{M}$ AGN ($p=0,0022$) in einer Hochregulierung der ELOVL7-Genexpression.

Die restlichen Behandlungen führte zu keinen signifikanten Hoch- oder Herunterregulierungen der Genexpression (at-RA $p>0,2237$, Ret $p>0,4018$, L-W AGN $p>0,0604$, UVI $p>0,1990$) (**Abbildung 23**).

Auch ein zelllinienspezifischer Effekt der Behandlung konnte nicht festgestellt werden ($p>0,0689$).

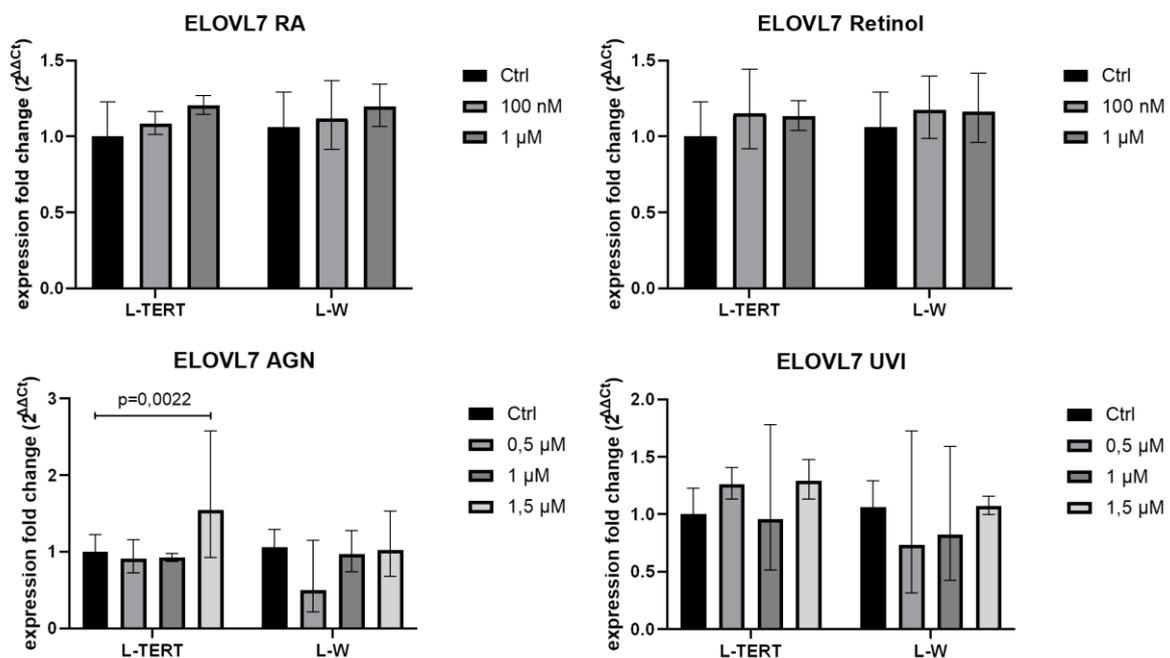


Abbildung 23: ELOVL7-Genexpression. Balkendiagramme zeigen den Fold Change der mit at-RA (Ctrl., 100 nM, 1 μM), Ret (Ctrl., 100 nM, 1 μM), AGN (Ctrl., 0,5 μM, 1,0 μM, 1,5 μM) und UVI (Ctrl., 0,5 μM, 1,0 μM, 1,5 μM) behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle (Ctrl.). Die Versuche wurden mit Proben der Limbusepithel-Zelllinien L-TERT und L-W dreimal unter denselben Bedingungen durchgeführt (n=3).

4.4. Genexpression der Proliferationsmarker nach Behandlung von L-TERT und L-W mit Retinolderivaten, bzw. Retinoidrezeptorantagonisten

4.4.1. Genexpression von MKI67

Die Genexpression von MKI67 war weder zwischen den Kontrollproben der Zelllinien (at-RA $p=0,1887$, Ret $p=0,2292$, AGN $p=0,2124$, UVI $p=0,2093$) noch bei Behandlung mit at-Ra ($p>0,1740$), Retinol ($p>0,3777$), AGN ($p>0,1768$) oder UVI ($p>0,1342$) signifikant verändert (**Abbildung 24**).

Auch ein zelllinienspezifischer Effekt der Behandlung konnte nicht festgestellt werden ($p>0,2907$).

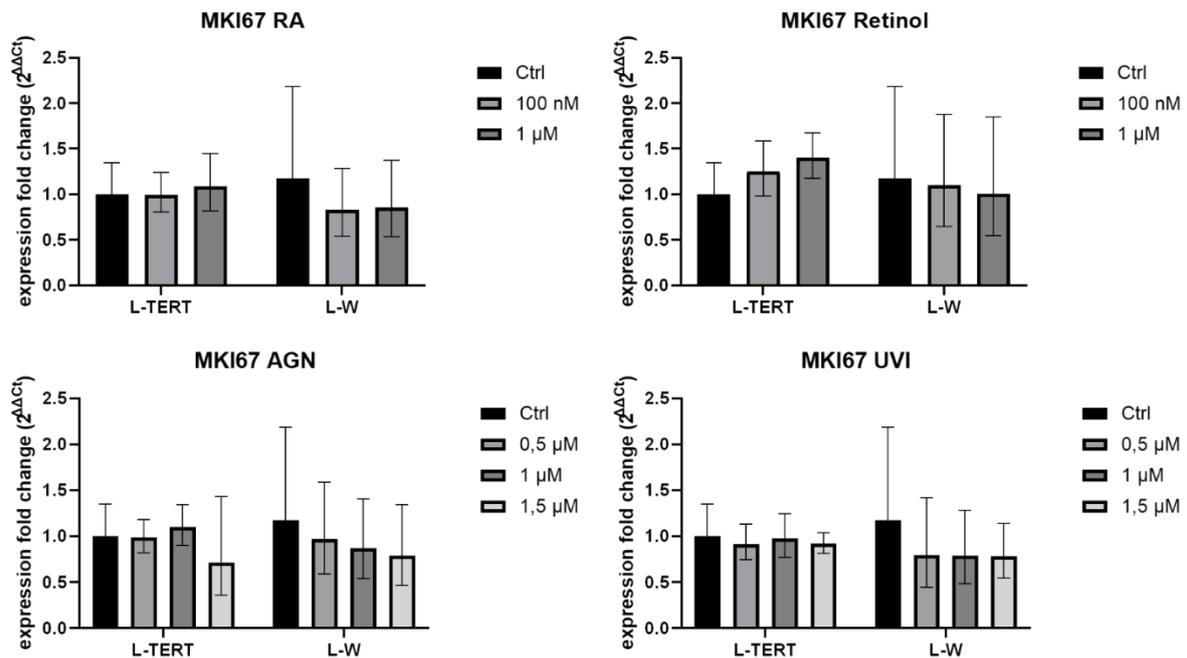


Abbildung 24: MKI67-Genexpression. Balkendiagramme zeigen den Fold Change der mit at-RA (Ctrl., 100 nM, 1 μ M), Ret (Ctrl., 100 nM, 1 μ M), AGN (Ctrl., 0,5 μ M, 1,0 μ M, 1,5 μ M) und UVI (Ctrl., 0,5 μ M, 1,0 μ M, 1,5 μ M) behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle (Ctrl.). Die Versuche wurden mit Proben der Limbusepithel-Zelllinien L-TERT und L-W dreimal unter denselben Bedingungen durchgeführt (n=3).

4.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

4.5.1. Genexpression

Effekt der Zelllinie

Tabelle 12: Tabellarische Zusammenfassung der veränderten Genexpression in Abhängigkeit von der Zelllinie. Dargestellt wird eine erhöhte (↑), erniedrigte (↓) oder unveränderte (=) Genexpression von L-W im Vergleich zu L-TERT. Für einige Marker standen keine Daten zur Verfügung (-).

Marker	PAX6	ADH7	SPINK7	DSG1	KRT12	KRT3	KRT19	FABP5	PPARG	ELOVL7	MKI67
L-W (PAX6 ^{+/-})	↓	=	=	=	-	=	↑	=	=	=	=

Effekt Behandlung

Tabelle 13: Tabellarische Zusammenfassung der veränderten Genexpression in Abhängigkeit von der Behandlung. Dargestellt ist die Veränderung der Genexpression in L-W und L-TERT bei 24h Behandlung mit Ret/at-RA in den Konzentrationen 100 nM und 1,0 µM sowie den RAR/RXR Antagonisten AGN und UVI in den Konzentrationen 0,5 µM, 1,0 µM und 1,5 µM im Vergleich zur jeweiligen Kontrollprobe. Festgehalten wurden Hochregulierung (↑) sowie Herunterregulierung (↓) der Genexpression, sowie unveränderte (=). Für einige Marker standen keine Daten zur Verfügung (-).

Marker	PAX6	ADH7	SPINK7	DSG1	KRT12	KRT3	KRT19	FABP5	PPARG	ELOVL7	MKI67
L-W + Ret/at-RA	=/=	=/=	=/=	=/=	-	=/=	=/↑	=/=	=/=	=/=	=/=
L-W + AGN/UVI	=/=	=/=	=/=	=/=	-	=/=	↓/=	↓↓	=/↑	=/=	=/=
L-TERT + Ret/at-RA	↑/↑	=/=	=/=	=/=	-	=/=	=/=	↑/=	↑/↑	=/=	=/=
L-TERT + AGN/UVI	↑/↑	=/=	=/=	↑/=	-	=/=	=/=	↓/=	↑/=	↑/=	=/=

4.5.2. Proteinexpression

Tabelle 14: Tabellarische Zusammenfassung der veränderten Proteinexpression in Abhängigkeit von der Zelllinie sowie in Abhängigkeit von der Behandlung. Dargestellt wird eine Hochregulierung (↑) oder Herunterregulierung (↓) der Proteinexpression sowie unveränderte (=). Für den Effekt der Zelllinie wird L-W im Vergleich zu L-TERT dargestellt. Für den Effekt der Behandlung die Veränderung der Proteinexpression in L-W und L-TERT bei 24h Behandlung mit Ret/at-RA in den Konzentrationen 100 nM und 1,0 µM sowie den RAR/RXR Antagonisten AGN und UVI in den Konzentrationen 0,5 µM, 1,0 µM und 1,5 µM im Vergleich zur jeweiligen Kontrollprobe.

Protein	Effekt der Zelllinie				Effekt der Behandlung							
	L-W (PAX6 ^{+/-})				L-W (PAX6 ^{+/-})				L-TERT			
	at-RA	Ret	AGN	UVI	at-RA	Ret	AGN	UVI	At-RA	Ret	AGN	UVI
PAX6	↓	↓	↓	↓	↓	=	=	=	↓	=	↓	=
FABP5	↓	=	↓	=	=	=	=	=	=	=	=	=

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, zu überprüfen, ob sich die immortalisierten humanen Zelllinien L-TERT und L-W für zukünftige Forschung an PAX6-Haploinsuffizienz und den Pathomechanismus der AAK eignen.

Dazu wurden beide Zelllinien für 24h mit Retinsäure, Retinol, AGN oder UVI in verschiedenen Konzentrationen behandelt, um Herunter- bzw. Hochregulierungen in den Genexpressionen von AAK-relevanten Markergenen zu beobachten. Diese Versuche wurden bisher nur an Primärzellen oder Zellmodellen durchgeführt [33][49] und sollten mithilfe von Zelllinien rekonstruiert werden, um zu überprüfen, ob die Versuche in ihren Ergebnissen vergleichbar sind. Die Verwendung von Zelllinien würde zukünftige Studien deutlich vereinfachen und ist deshalb sehr erstrebenswert.

5.1. Interpretation der Ergebnisse

5.1.1. Effekt der Zelllinie

Um zu untersuchen, wie PAX6 seine Zielgene reguliert und über welche Zwischenschritte diese Regulation stattfindet, sollen Zelllinien mit unterschiedlichem PAX6-Gehalt verglichen werden. Von den hier verwendeten Zelllinien soll L-TERT dabei eine gesunde LEZ mit normaler PAX6-Expression und L-W als PAX6^{+/-}-LEZ eine PAX6-assoziierte Aniridie-Zelle widerspiegeln.

Aus der Literatur ist bekannt, inwieweit sich die Genexpression von Aniridie-relevanten Markern verändert, wenn PAX6 wie bei einer Haploinsuffizienz herunterreguliert ist [33][48] (**Tabelle 2**). Um L-TERT und L-W für weitere Forschung verwenden zu können sollten die Zellen den bisherigen Erkenntnissen entsprechen und wesentliche Unterschiede in ihrem Genprofil aufweisen.

Um die beiden Zelllinien in ihrem Genprofil unabhängig von jeglicher Behandlung miteinander zu vergleichen, wurden dazu die jeweiligen Kontrollproben in ihrer Genexpression miteinander verglichen. Bei PAX6 und FABP5 wurde zusätzlich die Proteinexpression verglichen.

PAX6

Wie in **Abbildung 13** erkenntlich, zeigte sich zwischen den Zelllinien ein signifikanter Unterschied in der PAX6 Genexpression. Die Kontrollproben von L-W enthielten deutlich weniger PAX6 als die Kontrollproben von L-TERT. Auch auf Proteinebene (**Abbildung 14**) war deutlich, dass die L-W-Zellen signifikant weniger Protein exprimieren.

In Aniridie-LEZ ist PAX6 signifikant herunterreguliert[54], weshalb die Differenz des PAX6-Gehalts zwischen L-TERT und L-W hier den Erwartungen entspricht und Voraussetzung dafür ist, PAX6-abhängige Regulation von Aniridie-relevanten Markern zu untersuchen. Für den Rest der untersuchten Marker zeigte sich leider eine starke Abweichung von den basierend auf vorhergegangenen Studien erwarteten Ergebnissen.

Leider zeigten die Zelllinien nicht die deutlichen Unterschiede, die sich in Primärzellen abzeichnen (**Tabelle 15**), sondern waren sich in ihrer basalen Genexpression relativ ähnlich.

Tabelle 15: Veränderte basale Genexpression von Aniridie-relevanten Markern in PAX6^{+/-}-LEZ. Dargestellt wird eine erhöhte (↑), erniedrigte (↓) oder unveränderte (=) Genexpression der genannten PAX6^{+/-}-Zelle im Vergleich zu einer PAX6^{+/+}-Zelle. L-W (PAX6^{+/-}) wird dabei direkt mit L-TERT verglichen, während die Aniridie-LEZ sowie die siPAX6-LEZ mit gesunden Primärzellen verglichen werden. ¹=Primärzellen von Aniridie-Patienten [48], ²=Primärzellen von gesunden Patienten, die mit siRNA gegen PAX6 behandelt wurden[48]. Für einige Marker standen keine Daten zur Verfügung (-).

Marker	PAX6	ADH7	SPINK7	DSG1	KRT12	KRT3	KRT19	FABP5	PPARG	ELOVL7	MKI67
L-W (PAX6 ^{+/-})	↓	=	=	=	-	=	↑	=	=	=	=
Aniridie (PAX6 ^{+/-}) ¹ -LEZ /LEZ (siPAX6) ²	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓/=	↓↓	-/-	↓↓	↑↓	↑/=	-/-

ADH7, DSG1 und FABP5

Zwischen der Genexpression von PAX6 und dem kornealen Differenzierungsmarker ADH7 sowie dem Strukturprotein DSG1 besteht eine starke Korrelation. Wenn PAX6 herunterreguliert ist, sind es ADH7 und DSG1 ebenso [48]. Zudem sind ADH7, DSG1 und FABP5 sehr wahrscheinlich direkt von PAX6 reguliert [33]. Dementsprechend müsste die Expression dieser Gene in L-W signifikant geringer als in L-TERT sein, da diese Zelllinie signifikant weniger PAX6 exprimiert. Dies war allerdings nicht zu beobachten, da es keinen signifikanten Unterschied auf mRNA-Ebene gab.

Die DSG1-Expression war in beiden Zelllinien so gering, dass die CT-Werte bei ca. 30 und somit nur knapp oberhalb der Detektionsgrenze waren. Dies deutet darauf hin, dass die PAX6-Regulation dieser Zielgene in L-W als auch in L-TERT gestört ist. In Keratinozyten spielt DSG1 eine wichtige Rolle für die Differenzierung der Zellen, vermutlich indem es Signalwege der Proliferation supprimiert und somit die Differenzierung aktiviert. Ebenfalls ist bekannt, dass DSG1 die parallele Zelladhäsion von kornealen Epithelzellen im Mausmodell verstärkt. Demnach zeigen Zellen mit verringerter DSG1-Genexpression eine verstärkte Proliferation, anstelle von Differenzierung, sowie eine verringerte parallele Zelladhäsion, weshalb Kulturen dieser Zellen im Vergleich zu Zellen mit ausreichender DSG1-Genexpression einen weniger strukturierten Zellverband aufweisen. Dies könnte zu Lücken im Epithel führen [33,80].

Für FABP5 allerdings zeigte sich teilweise ein signifikanter Unterschied in der Proteinexpression, da L-TERT mehr FABP5-Protein exprimierten. Möglicherweise zeigen die Zelllinien auf Proteinebene deutlichere Unterschiede [33].

PPARG, SPINK7 und ELOVL7

Höchstwahrscheinlich reguliert PAX6 die Aniridie-relevanten Gene vor allem über den Retinolstoffwechsel und dessen Signalwege, zum Beispiel über FABP5 als Zwischenschritt [33].

PPARG, SPINK7 und ELOVL7, die alle eine wichtige Rolle im Retinolstoffwechsel spielen, waren ebenfalls in L-TERT und L-W ähnlich exprimiert. Auch dies deutet darauf hin, dass die PAX6-Regulation in den verwendeten Zelllinien gleichsam gestört ist oder nicht wie erwartet abläuft, da

bekannt ist, dass diese Gene im PAX6^(+/-)-Aniridie-Modell im Vergleich zu gesunden Limbusepithelzellen vermindert (SPINK7), bzw. vermehrt (PPARG, ELOVL7) exprimiert werden [33][49][48].

KRT12

Die Expression des kornealen Differenzierungsmarkers KRT12 blieb gänzlich unterhalb der Detektionsgrenze und wurde somit weder in L-TERT noch in L-W ausreichend exprimiert. Gleiches wurde in einer weiteren Studie mit Verwendung dieser Zelllinien berichtet [33].

Aus der Literatur ist bekannt, dass Aniridie-LEZ kaum KRT12 exprimieren, während gesunde LEZ eine deutliche KRT12-Genexpression aufweisen [47]. Aufgrund der geringen PAX6- und KRT12-Expression weicht die Zelllinie demnach deutlich von den erwarteten Expressionsmustern einer Primärzelle ab.

KRT12-Expression wird vor allem von der PAX6-5b-Isoform reguliert. Zusätzlich scheint die Anwesenheit verschiedener Kofaktoren für eine Induktion der Expression vonnöten zu sein [83]. Möglicherweise gibt es strukturelle Unterschiede im PAX6-Gen von PAX6^{+/-}-LEZ, die sich auch in L-TERT zeigen. Alternativ könnten Kofaktoren fehlen, die in gesunden Zellen vorhanden sind.

Zudem wird KRT12 in der Basalzellschicht der LEZ nicht exprimiert und eine Abwesenheit von KRT12 genutzt, um Limbusepithelstammzellen als Stammzellen zu identifizieren. Möglicherweise differenzieren gesunde Primärzellen in Kultur vereinzelt spontan von TAZ zu kornealen Epithelzellen, wodurch KRT12 vermehrt exprimiert wird, während die Aniridie-LEZ in Kultur dies nicht tun [47].

KRT12 wird vor allem in differenzierteren kornealen Epithelzellen exprimiert und gilt als kornealer Differenzierungsmarker [43]. Durch Supplementierung mit Kalzium ist es möglich, die Differenzierung der LEZ zu triggern, wodurch sich *in vivo* bei gesunden LEZ auch die KRT12 Genexpression erhöhen würde. Dies war allerdings für diese Zelllinien ebenfalls nicht der Fall [33], was darauf hindeutet, dass sowohl L-TERT als auch L-W kein KRT12 exprimieren und sich beide nicht zu funktionierendem kornealem Epithel differenzieren können.

KRT3

Die Keratine 3 und 12 werden oft als saure (KRT12) und basische (KRT3) Unterfamilien koexprimiert, weshalb sich die Genexpression in der Regel in Korrelation zueinander verändert [8].

In dieser Studie wurde KRT12 in keiner der Zelllinien ausreichend exprimiert, um detektiert werden zu können, während KRT3 durchaus exprimiert wurde. Dies war auch in Katiyars Studie der Fall und ist aus der Literatur für Aniridie-LEZ bekannt [47].

In L-TERT und L-W scheinen KRT3 und KRT12 demnach unabhängig voneinander exprimiert zu werden. Da KRT3 vor allem von der PAX6-5a-Isoform reguliert wird, könnte dies darauf hindeuten, dass in Aniridie-LEZ primär diese Isoform vorliegt.

KRT19

KRT19 zeigte als einziger Marker signifikante Unterschiede zwischen L-TERT und L-W. L-W wies eine höhere KRT19-Expression auf. Da KRT19 als Stammzellmarker vor allem in undifferenziertem Gewebe vorkommt [43], könnte dies dafür sprechen, dass in L-W Kulturen mehr Stammzellen vorliegen als in L-TERT und die Zellen sich noch weniger differenzieren als L-TERT.

Möglicherweise liegen L-TERT-LEZ vor allem als TAZ und junge Epithelzellen vor, während L-W einen größeren Stammzellanteil aufweist, da der PAX6-Gehalt nicht ausreicht, um weitere Differenzierung zu induzieren.

5.1.2. Effekt der Behandlung

Bei Retinoidbehandlung von LEZ zeigen diese eine Aniridie-ähnliche veränderte Genexpression, bei der Differenzierungsmarker, Strukturgene und Gene des Retinolstoffwechsels herunterreguliert werden. Die Behandlung mit RAR/RXR-Antagonisten hat einen gegenläufigen Effekt [49].

Wie bei der basalen Genexpression zeigte auch die Behandlung von L-TERT und L-W mit Retinoiden sowie RAR/RXR-Antagonisten nicht die erwarteten Effekte (**Tabelle 16**).

Tabelle 16: Veränderte Genexpression Aniridie-relevanter Marker bei Behandlung mit Ret/at-RA, bzw. RAR/RXR Antagonisten. Dargestellt ist die Veränderung der Genexpression in L-W und L-TERT bei 24h Behandlung mit Ret/at-RA in den Konzentrationen 100 nM und 1,0 µM sowie den RAR/RXR Antagonisten AGN und UVI in den Konzentrationen 0,5 µM, 1,0 µM und 1,5 µM im Vergleich zur jeweiligen Kontrollprobe. Festgehalten wurden Hochregulierung (↑) sowie Herunterregulierung (↓) der Genexpression, sowie unveränderte (=). Für einige Marker standen keine Daten zur Verfügung (-). ¹= gesunde Primärzellen wurden für 24h sowie 48h mit Ret/at-RA in den Konzentrationen 100 nM, 500 nM und 1,0 µM behandelt [49], ²= gesunde Primärzellen wurden für 24h sowie 48h mit den RAR/RXR Antagonisten AGN und UVI in den Konzentrationen 1,0 µM, 1,5 µM und 5 µM behandelt [49].

Marker	PAX6	ADH7	SPINK7	DSG1	KRT12	KRT3	KRT19	FABP5	PPARG	ELOVL7	MKI67
L-W + Ret/at-RA	=/=	=/=	=/=	=/=	-	=/=	=/↑	=/=	=/=	=/=	=/=
L-W + AGN/UVI	=/=	=/=	=/=	=/=	-	=/=	↓/=	↓/↓	=/↑	=/=	=/=
L-TERT + Ret/at-RA	↑/↑	=/=	=/=	=/=	-	=/=	=/=	↑/=	↑/↑	=/=	=/=
L-TERT + AGN/UVI	↑/↑	=/=	=/=	↑/=	-	=/=	=/=	↓/=	↑/=	↑/=	=/=
LEZ + Ret/at-RA ¹	↑/↓	↓	↓	↓	↑	↓	↑	=	unklar	↑	-
LEZ +RAR/RXR Antagonist ²	=	↑	=	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑	-

Generell zeigten sich kaum signifikante Effekte von Behandlungen, teilweise sind allerdings gewisse nicht-signifikante Trends zu erkennen. So wurde DSG1 bei Behandlung mit Retinoiden tendenziell hochreguliert und bei Behandlung mit AGN tendenziell herunterreguliert. Diese Tendenz ist vergleichbar mit der aus der Literatur bekannten Hoch- beziehungsweise Herunterregulierung bei Stimulierung von Retinoiden, bzw. Retinoidrezeptor-Antagonisten, die Veränderung der Genexpression war allerdings nicht ausgeprägt genug, um signifikant zu sein [49].

Nur für KRT19 zeigt sich ein signifikanter Effekt der Behandlung, der dem in vorangegangenen Studien beobachteten Effekt entspricht: Bei Behandlung mit Retinoiden wird die KRT19-Expression in beiden Zelllinien tendenziell hochreguliert (nicht signifikant) und bei Behandlung mit RAR/RXR-Antagonisten herunterreguliert (in L-W bei Behandlung mit AGN signifikant).

Zudem sind bei einigen Genen (FABP5 und PPARG) Effekte der Behandlung zu vermerken, die teilweise widersprüchlich zu bisherigen Erkenntnissen sind. Während die PPARG-Expression grundsätzlich hochreguliert wurde, wurde FABP5 bei Behandlung mit Retinoiden tendenziell eher hoch- und bei Behandlung mit RAR/RXR-Antagonisten herunterreguliert. Bei primären LEZ war dies genau gegensätzlich [49]. FABP5 transportiert Retinoide in den Zellkern hinein, wo diese an den nukleären Rezeptor PPARG binden. Über den FABP5/PPARG-Signalweg wird zum Beispiel EGFR freigesetzt und Proliferation stimuliert [31]. Dies könnte darauf hinweisen, dass Proliferation in den Zelllinien anders reguliert sein könnte als in den primären LEZ.

L-TERT und L-W scheinen demnach beide nicht in der Lage sein, auf Stimulierung mit Retinoiden oder RAR/RXR-Antagonisten entsprechend zu reagieren. Auch im Hinblick auf die Behandlung wird

kein Unterschied zwischen den Zelllinien deutlich, was sich auch darin bestätigt, dass ein zelllinienspezifischer Effekt der Behandlung nur sehr vereinzelt auftrat.

5.1.3. Fazit der Ergebnisse

L-TERT und L-W zeigen eine sehr ähnliche Genexpression, die sich kaum, bzw. nicht wie bei gesunden LEZ, durch Behandlung mit Retinoiden oder RAR/RXR-Antagonisten beeinflussen lässt. L-W entspricht als PAX6^{+/-}-LEZ annähernd einer Aniridie-LEZ. Da L-TERT sich im Wesentlichen nicht von L-W unterscheidet deutet dies darauf hin, dass L-TERT sich nicht wie erwartet wie eine gesunde LEZ verhält, und sich die Genexpression nach Manipulation zur Zelllinie deutlich von der zu erwartenden Genexpression der primären Zellen unterscheidet.

Weder direkt von PAX6-regulierte Gene noch Gene, die wahrscheinlich über den Retinolstoffwechsel sekundär von PAX6 reguliert werden, sind in ihrer Genexpression erwartungsgemäß verändert. Nicht einmal Gene, für die eine starke Korrelation zu PAX6 bekannt sind, unterscheiden sich signifikant zwischen den Zelllinien. Sie scheinen sich demnach beide stark von gesunden LEZ [48][33] zu unterscheiden. Während dies für die Zelllinie L-W nachvollziehbar ist, ist für L-TERT fraglich, warum dies der Fall ist. Die Zelllinien unterscheiden sich im Hinblick auf Differenzierungsmarker wie ADH7, DSG1 und KRT3 unwesentlich voneinander und enthalten beide kein KRT12. Auch im Hinblick auf diese Zielgene entspricht das Genprofil von L-TERT nicht dem von gesunden Primärzellen.

Als Ursache dafür kommen verschiedene mögliche Veränderungen der L-TERT-Zelllinie in Betracht:

1. Veränderungen im PAX6-Gen oder PAX6-Protein in L-TERT
2. Ein geringerer basaler PAX6-Gehalt in L-TERT im Vergleich zu primären, gesunden LEZ
3. Differenzierungsstörungen von L-TERT

Diese Ansätze werden im Folgenden näher erläutert.

5.2. Unterschiede zwischen L-TERT und primären, gesunden LEZ

5.2.1. Veränderungen im PAX6-Gen oder PAX6-Protein in L-TERT

Immortalisierte Zellen sind nicht mit Primärzellen gleichzusetzen. Es ist bekannt, dass sie Mutationen und Funktionsänderungen aufweisen, die *in vivo* so nicht vorkommen. Besonders in hohen Passagen können sie sich stark von ihrer Ursprungszelle unterscheiden [2][7].

Demnach ist es möglich, dass sich die immortalisierten LEZ so weit von den primären LEZ entfernt haben, dass sich PAX6 selbst verändert hat. Dabei ist es unwahrscheinlich, dass PAX6 aufgrund von Mutationen seine Funktion völlig verloren oder verändert hat. Vielmehr könnte eine vermehrte Expression der PAX6-5a-Isoform und/oder verminderte Expression der PAX6-5b-Isoform Ursache dafür sein, dass die basale Expression bestimmter Zielgene in L-TERT verschoben ist.

Höchstwahrscheinlich werden verschiedene Aspekte der PAX6 Funktion von den verschiedenen Isoformen reguliert[44]. Dabei ist zum Großteil nicht bekannt welche Zielgene von welcher Isoform reguliert werden. Lediglich bei den Keratinen wird KRT3 nachweislich eher von PAX6-5a und KRT12 von PAX6-5b reguliert[83]. Eine Verschiebung der Expression Isoformen zugunsten von PAX6-5a würde demnach eine mögliche Erklärung für die fehlende KRT12 Expression in L-TERT bieten.

Wenn PAX6 aufgrund der Immortalisierung oder des Alters der Passage in seiner Struktur verändert ist und somit seine Funktion nicht nachkommen kann, würde der unterschiedliche PAX6-Gehalt in L-TERT und L-W demnach auch keine unterschiedliche Expression der Zielgene bewirken können. Dies würde auch erklären, warum sich die Zelllinien auch in der Genexpression nicht von ADH7, DSG1 und FABP5 unterscheiden, die eine besonders starke Korrelation zu PAX6 aufweisen.

5.2.2. Geringerer basaler PAX6-Gehalt in L-TERT im Vergleich zu primären, gesunden LEZ

Alternativ kommt in Frage, dass PAX6 nicht in seiner Struktur oder Funktion verändert ist, sondern vielmehr die basale PAX6-Expression in L-TERT generell deutlich geringer als in primären, gesunden LEZ ist und PAX6 somit die Zielgene nicht ausreichend regulieren kann. In diesem Fall würden L-TERT und L-W in ihrem PAX6-Gehalt nicht eine gesunde und eine Aniridie-LEZ widerspiegeln, sondern vielmehr zwei Aniridie-LEZ.

Im Vergleich zwischen L-TERT und primären LEZ zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der PAX6-Genexpression ($p < 0,0001$) (**Abbildung 25**).

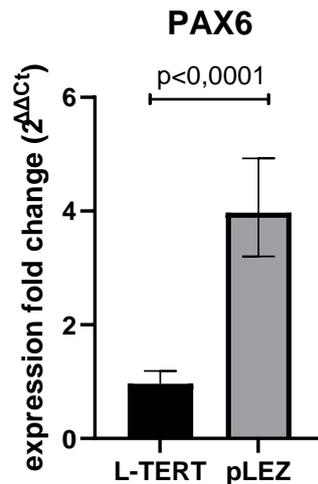


Abbildung 25: Vergleich der PAX6-Genexpression in L-TERT und primären LEZ. Die in dieser Studie verwendeten Kontrollproben der L-TERT Zellen werden mit Kontrollproben von Limbusepithelzellen von gesunden Spenderhornhäuten verglichen [49].

Auch bei einer Studie an einer humanen kornealen Epithelzelllinie (HCE-T) zeigte sich eine geringere PAX6-Expression als bei primären LEZ [80].

Ebenfalls wurde beschrieben, dass L-W eine geringere PAX6-Expression aufweist als PAX6^{+/-}-Primärzellen, die mit siRNA gegen PAX6 behandelt wurden [33]. Da die L-W-Zelllinie aus der L-TERT-Zelllinie hergestellt wurde, könnte dies daran liegen, dass bereits in L-TERT weniger PAX6 exprimiert wird als in gesunden Primärzellen. Möglicherweise geht bei der Immortalisierung PAX6 in den Zelllinien anteilig verloren. Durch das hohe Alter der Passagen könnte dies noch verstärkt sein.

Diese Theorie erklärt sowohl die sehr ähnliche Genexpression in den Kontrollproben der Zelllinien als auch die Tatsache, dass die Zellen kaum auf Behandlung reagieren.

5.2.3. Differenzierungsstörungen von L-TERT

Postnatal reguliert PAX6 vor allem die Zelldifferenzierung von LEZ zu kornealen Epithelzellen. Bei Aniridie ist diese gestört und es tritt stattdessen eine vermehrte Zellproliferation auf [33].

Die Expression typischer kornealer Differenzierungsmarker wie ADH7, DSG1 und KRT12 ist in L-TERT und L-W nicht signifikant unterschiedlich. DSG1 wird kaum und KRT12 gar nicht exprimiert. KRT12 wird in gesunden LEZ erst verstärkt exprimiert, wenn sich TAZ zu kornealen Epithelzellen differenzieren. Möglicherweise ist es L-TERT und L-W nicht möglich, über TAZ hinaus zu differenzieren. Dies könnte in L-W noch verstärkt sein, sodass sich L-TERT zumindest bis hin zu TAZ spontan differenziert, während L-W vor allem einen Stammzellcharakter hat.

Bei Differenzierungsversuchen an LEZ, bei denen die Differenzierung mit Kalzium getriggert wurde, zeigte sich, dass die Expression von PAX6-abhängigen Zielgenen wie dem Differenzierungsmarker

DSG1 deutlich hochreguliert wird. Auch bei L-TERT sowie bei Primärzellen, die mit siRNA gegen PAX6 behandelt wurden war dies in dieser Studie der Fall. Die KRT12-Expression konnte allerdings weder im siRNA-Modell noch in L-TERT durch Differenzierung induziert werden, während sie in primären LEZ bereits basal vorhanden war [33]. Dies deutet darauf hin, dass Aniridie-LEZ grundsätzlich nicht in der Lage sind, sich zu regelhaft zu kornealem Epithel zu differenzieren. In L-TERT könnte dies einerseits an der zu geringen basalen PAX6-Expression liegen, andererseits könnte auch die Immortalisierung selbst ursächlich dafür sein. Bereits 1998 wurde davor gewarnt, dass Inaktivierung von Schaltstellen im Zellzyklus, die bei der Immortalisierung durchgeführt werden, den Differenzierungsprozess beeinflussen könnten [101].

Auch bei immortalisierten LEZ wurden bereits eine gestörte Differenzierung beobachtet. Während sich primäre Epithelzellen in einer Studie normal differenzierten, war dies bei den immortalisierten Zellen nicht der Fall. Selbst bei optimalen Bedingungen für die Zellen und in Anwesenheit von Differenzierung-stimulierenden Kofaktoren zeigte sich keine Differenzierung der Zellen, weshalb die Immortalisierung selbst als Ursache dafür vermutet wurde. Die schwache Differenzierung von L-TERT könnte zusätzlich durch Probleme beim Kultivieren verstärkt werden. Ein großer Vorteil von immortalisierten Zellen ist, dass sie einfacher zu kultivieren sind als Primärzellen. Sie proliferieren viel und produzieren viel homogenes Material [7][10]. Dies trifft auch auf die verwendeten Zelllinien zu. Sie waren nach spätestens drei Tagen in 25 cm² Kulturflaschen zu 90% konfluent und behalten dabei ihr gleichmäßiges Pflastersteinmuster bei. Beim Passagieren fiel allerdings auf, dass die Zellen sehr stark an den Kulturflaschen hafteten und nur schwer mit Trypsin zu lösen waren. Für L-W wurde dies auch von Roux et al. Berichtet [79].

Die Zellen sind demnach dem Trypsin für eine längere Zeit ausgesetzt, was auch mit mehr Zellstress einhergeht. Zudem wurde berichtet, dass Trypsin bei längerer Exposition die Zellen dazu veranlassen kann, sich in einen reversiblen, stammzellähnlichen Zustand zu entdifferenzieren [89]. Durch den erhöhten Stress und die vermehrte Adhäsion an den Kulturflaschen könnte es für die L-W und L-TERT-LEZ länger dauern, ihr Zellüberleben zu sichern, ihr Mikroklima zu erstellen und Homöostase zu erreichen, und sich somit erst später zu differenzieren.

5.3. Limitationen

Die Durchführung der Studie wurde durch verschiedene Faktoren erschwert.

Der PAX6-Gehalt in L-TERT scheint sich deutlich von dem PAX6-Gehalt von primären LEZ zu unterscheiden. Allerdings ist nicht offensichtlich, ob der Gehalt dabei so niedrig ist, dass er dem PAX6-Gehalt einer PAX6^{+/-}-LEZ entspricht. L-TERT-LEZ exprimieren signifikant mehr PAX6 als L-W. Demnach könnte L-TERT im Hinblick auf die PAX6-Expression auch eine Zwischenstufe zwischen gesunder LEZ und Aniridie-LEZ darstellen.

Zudem war die Zellpassage bei beiden Zelllinien relativ hoch. Eventuell wären jüngere Passagen besser geeignet, da sie der Ursprungszelle ähnlicher sein könnten. Allerdings sind die Zelllinien nicht kommerziell erhältlich und wurden uns von Roux et al. freundlicherweise zur Verfügung gestellt, weshalb es uns nicht möglich war, jüngere Passagen zu verwenden.

Auch scheinen sich die verwendeten Zelllinien beim Kultivieren anders zu verhalten als Primärzellen, da sie deutlich stärker an ihrer Umgebung haften und deshalb schwerer zu lösen sind. Möglicherweise bilden sich auch stärkere Zellkontakte aus, die mit einer vermehrten Kontakthemmung einhergehen könnten.

5.4. Ausblick

Aniridie ist eine sehr seltene Krankheit und primäres Zellmaterial ist sehr wenig verfügbar. Die Etablierung von geeigneteren Zelllinien wäre deshalb ein entscheidender Faktor um die Forschung an PAX6^{+/-}-LEZ deutlich zu vereinfachen. Da die hier verwendeten Zelllinien mit erheblichen Limitationen einhergehen, sollten deshalb weitere Studien zur Aufklärung der Missverhältnisse erfolgen.

Um zu überprüfen, ob die PAX6-Expression in L-TERT aufgrund der Immortalisierung verringert ist, sollten jüngere Passagen von L-TERT mit Primärzellen mittels qPCR verglichen werden. Dies würde auch verdeutlichen, ob der PAX6-Gehalt auch in Abhängigkeit vom Alter der Passage verändert ist.

Des Weiteren könnte annähernd ein Schwellenwert für die PAX6-Expression etabliert werden, ab dem PAX6 seine Zielgene nicht mehr regulieren kann. Abhängig davon, ob der PAX6-Gehalt in L-TERT oberhalb oder unterhalb dieses Schwellenwertes liegt, gäbe dies Auskunft darüber, ob die fehlende Regulation der Zielgene in L-TERT an dem verringerten PAX6-Gehalt im Vergleich zu primären LEZ oder vielmehr an strukturellen Veränderungen von PAX6 oder an Differenzierungsstörungen liegt.

Anhand von Western Blots könnten außerdem die Verteilung der Isoformen in primären LEZ sowie in L-TERT und PAX6^{+/-}-LEZ miteinander verglichen werden, um zu überprüfen, ob eine der Isoformen vermehrt/vermindert exprimiert wird. In Zusammenhang damit sollte auch näher untersucht werden, welche Isoform welche Zielgene reguliert.

Auch die Auswirkungen des Kultivierens auf die Zelllinien sind zu überprüfen. Wenn die Zellen in geringerer Anzahl eingesät würden, hätten sie mehr Zeit, bis sie konfluent wachsen und könnten so bereits weiter differenziert sein. Dadurch wären eventuell deutlichere Unterschiede zwischen den Zelllinien nachweisbar, soweit L-TERT generell in der Lage ist, sich weiter zu differenzieren.

Zuletzt sollte die Auswirkung der Differenzierung auf die Genexpression weiter untersucht werden. Dabei sollten sowohl gesunde als auch PAX6^{+/-}-LEZ vergleichend untersucht werden.

6. Schlussfolgerung

Die immortalisierten Zelllinien L-TERT und L-W eignen sich nicht, um als Modell einer gesunden und einer PAX6^{+/-}-LEZ vergleichend den Einfluss von Retinoiden auf LEZ zu untersuchen. Eine PAX6-abhängige Regulation des Retinolstoffwechsels oder dessen Signalwege wurde nicht deutlich.

Es werden kaum Unterschiede zwischen den Zellen deutlich, da sie eine ähnliche basale Genexpression der untersuchten Marker aufweisen und nur wenig auf Behandlung mit Retinoiden, bzw. RAR/RXR-Antagonisten, reagieren. Dies liegt möglicherweise an einem zu geringen basalen PAX6-Gehalt von L-TERT, Veränderungen im PAX6-Gen oder -Protein oder an unzureichender Differenzierung, die ebenfalls durch einen zu geringen PAX6-Gehalt oder durch den Vorgang der Immortalisierung bedingt sein könnte. Als immortalisierte LEZ in einer hohen Passage scheinen sich die Zelllinien stark von ihrer Ausgangszelle zu unterscheiden.

Zukünftig sollte untersucht werden, inwiefern L-TERT-LEZ in ihrer PAX6-Genexpression und Proteinexpression einer gesunden LEZ oder vielmehr einer PAX6^{+/-}-LEZ ähneln und inwiefern L-TERT-LEZ in der Lage sind zu differenzieren.

7. Literaturverzeichnis

1. Agostini M, Schoenmakers E, Beig J, Fairall L, Szatmari I, Rajanayagam O, Muskett FW, Adams C, Marais AD, O’Rahilly S, Semple RK, Nagy L, Majithia AR, Schwabe JWR, Blom DJ, Murphy R, Chatterjee K, Savage DB (2018) A pharmacogenetic approach to the treatment of patients with PPARG mutations. *Diabetes* 67:1086–1092
2. Audesirk GJ (2010) In Vitro Systems in Neurotoxicological Studies. *Comprehensive Toxicology*, Second Edition 13:415–432
3. Azouz NP, Ynga-Durand MA, Caldwell JM, Jain A, Rochman M, Fischesser DM, Ray LM, Bedard MC, Mingler MK, Forney C, Eilerman M, Kuhl JT, He H, Biagini Myers JM, Mukkada VA, Putnam PE, Khurana Hershey GK, Kottyan LC, Wen T, Martin LJ, Rothenberg ME (2018) The antiprotease SPINK7 serves as an inhibitory checkpoint for esophageal epithelial inflammatory responses. *Sci Transl Med* 10:
4. Baroi S, Czernik PJ, Chougule A, Griffin PR, Lecka-Czernik B (2021) PPARG in osteocytes controls sclerostin expression, bone mass, marrow adiposity and mediates TZD-induced bone loss. *Bone* 147:
5. Belete GT, Fenta AL, Hussen MS (2019) Xerophthalmia and Its Associated Factors among School-Age Children in Amba Giorgis Town, Northwest Ethiopia, 2018. *J Ophthalmol* 2019:
6. Brown RD, Grattan CEH (1989) Visual toxicity of synthetic retinoids. *British Journal of Ophthalmology* 73:
7. Carter M, Shieh J (2015) Cell Culture Techniques. *Guide to Research Techniques in Neuroscience* 295–310
8. Chaloin-Dufau C, Dhouailly D, Sun TT (1990) Appearance of the keratin pair K3/K12 during embryonic and adult corneal epithelial differentiation in the chick and in the rabbit. *Cell Differentiation and Development* 32:
9. Chen JJY, Tseng SCG (1991) Abnormal corneal epithelial wound healing in partial-thickness removal of limbal epithelium.
10. Cherbas L, Gong L (2014) Cell lines. *Methods* 68:74–81
11. Compton SJ, Jones CG (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* 151:
12. Cunha DL, Arno G, Corton M, Moosajee M (2019) The spectrum of PAX6 mutations and genotype-phenotype correlations in the eye. *Genes (Basel)* 10:
13. Davis J, Duncan MK, Robison WG, Piatigorsky J (2003) Requirement for Pax6 in corneal morphogenesis: A role in adhesion. *J Cell Sci* 116:
14. Delva E, Tucker DK, Kowalczyk AP (2009) The desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:
15. D’Souza SJA, Pajak A, Balazsi K, Dagnino L (2001) Ca²⁺ and BMP-6 Signaling Regulate E2F during Epidermal Keratinocyte Differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 276:
16. Ebrahimi M, Taghi-Abadi E, Baharvand H (2009) Limbal stem cells in review. *J Ophthalmic Vis Res* 4:40–58

17. Edén U, Fagerholm P, Danyali R, Lagali N (2012) Pathologic epithelial and anterior corneal nerve morphology in early-stage congenital aniridic keratopathy. *Ophthalmology* 119:
18. Enwright JF, Grainger RM (2000) Altered retinoid signaling in the heads of Small eye mouse embryos. *Dev Biol* 221:
19. Fonseca ESS, Hiromori Y, Kaite Y, Ruivo R, Franco JN, Nakanishi T, Santos MM, Castro LFC (2019) An orthologue of the retinoic acid receptor (RAR) is present in the ecdysozoa phylum priapulida. *Genes (Basel)* 10:
20. Gipson IK, Spurr-Michaud S, Argüeso P, Tisdale A, Ng TF, Russo CL (2003) Mucin gene expression in immortalized human corneal-limbal and conjunctival epithelial cell lines. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:
21. Goldberg MF, Bron AJ (1982) Limbal palisades of Vogt. *Trans Am Ophthalmol Soc Vol.* 80:155–171
22. Hammers CM, Stanley JR (2013) Desmoglein-1, differentiation, and disease. *Journal of Clinical Investigation* 123:1419–1422
23. Hammond LA, Krinks CHV, Durham J, Tomkins SE, Burnett RD, Jones EL, Chandraratna RAS, Brown G (2001) Antagonists of retinoic acid receptors (RARs) are potent growth inhibitors of prostate carcinoma cells. *Br J Cancer* 85:
24. Hanakawa Y, Amagai M, Shirakata Y, Yahata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K (2002) Differential effects of desmoglein 1 and desmoglein 3 on desmosome formation. *Journal of Investigative Dermatology* 119:1231–1236
25. Hiraki A, Shirasuna K, Ikari T, Shinohara M, Garrod DR (2002) Calcium induces differentiation of primary human salivary acinar cells. *J Cell Physiol* 193:
26. Hori Y, Spurr-Michaud S, Russo CL, Argüeso P, Gipson IK (2004) Differential Regulation of Membrane-Associated Mucins in the Human Ocular Surface Epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:114–122
27. Hori Y, Spurr-Michaud S, Russo CL, Argüeso P, Gipson IK (2004) Differential Regulation of Membrane-Associated Mucins in the Human Ocular Surface Epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:
28. Ihnatko R, Eden U, Fagerholm P, Lagali N (2016) Congenital Aniridia and the Ocular Surface. *Ocular Surface* 14:
29. Jairam S, Edenberg HJ (2014) An enhancer-blocking element regulates the cell-specific expression of alcohol dehydrogenase 7. *Gene* 547:
30. Joossen C, Baán A, Moreno-Cinos C, Joossens J, Cools N, Lanckacker E, Moons L, Lemmens K, Lambeir AM, Franssen E, Delputte P, Caljon G, van der Veken P, Maes L, de Meester I, Kiekens F, Augustyns K, Cos P (2020) A novel serine protease inhibitor as potential treatment for dry eye syndrome and ocular inflammation. *Sci Rep* 10:
31. Ju J, Wang N, Wang J, Wu F, Ge J, Chen F (2018) 4-Amino-2-trifluoromethyl-phenyl retinate inhibits proliferation, invasion, and migration of breast cancer cells by independently regulating CRABP2 and FABP5. *Drug Des Devel Ther* 12:
32. Käsman-Kellner B, Seitz B (2014) Aniridiesyndrom: Klinische Befunde, problematische Verläufe und Vorschlag zur Betreuungsoptimierung („Aniridielotse“). *Ophthalmologie* 111:

33. Katiyar P, Stachon T, Fries FN, Parow F, Ulrich M, Langenbacher A, Cayless A, Seitz B, Käsmann-Kellner B, Latta L, Szentmáry N (2022) Decreased FABP5 and DSG1 protein expression following PAX6 knockdown of differentiated human limbal epithelial cells. *Exp Eye Res* 215:
34. Kim BY, Riaz KM, Bakhtiari P, Chan CC, Welder JD, Holland EJ, Basti S, Djalilian AR (2014) Medically reversible limbal stem cell disease: Clinical features and management strategies. *Ophthalmology* 121:
35. Kim SW, Seo KY, Rhim T, Kim EK (2012) Effect of retinoic acid on epithelial differentiation and mucin expression in primary human corneal limbal epithelial cells. *Curr Eye Res* 37:
36. Kim SW, Seo KY, Rhim T, Kim EK (2012) Effect of retinoic acid on epithelial differentiation and mucin expression in primary human corneal limbal epithelial cells. *Curr Eye Res* 37:33–42
37. Kinoshita S, Kiorpes TC, Friend J, Thoft RA (1982) Limbal epithelium in ocular surface wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 23:
38. Kitazawa K, Hikichi T, Nakamura T, Sotozono C, Kinoshita S, Masui S (2017) PAX6 regulates human corneal epithelium cell identity. *Exp Eye Res* 154:30–38
39. Klann M, Seaver EC (2019) Functional role of pax6 during eye and nervous system development in the annelid *Capitella teleta*. *Dev Biol* 456:
40. Koizumi N, Fullwood NJ, Bairaktaris G, Inatomi T, Kinoshita S, Quantock AJ (2000) Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:
41. Králová J, Czerny T, Španielová H, Ratajová V, Kozmik Z (2002) Complex regulatory element within the γ E- and γ F-crystallin enhancers mediates Pax6 regulation and is required for induction by retinoic acid. *Gene* 286:
42. Krätzner R, Fröhlich F, Lepler K, Schröder M, Röher K, Dickel C, Tzvetkov M v., Quentin T, Oetjen E, Knepel W (2008) A peroxisome proliferator-activated receptor γ -retinoid X receptor heterodimer physically interacts with the transcriptional activator PAX6 to inhibit glucagon gene transcription. *Mol Pharmacol* 73:
43. Kruse FE (1994) Stem cells and corneal epithelial regeneration. *Eye (Basingstoke)* 8:
44. Lakowski J, Majumder A, Lauderdale JD (2007) Mechanisms controlling Pax6 isoform expression in the retina have been conserved between teleosts and mammals. *Dev Biol* 307:
45. Landsend ECS, Pedersen HR, Utheim ØA, Xiao J, Adil MY, Tashbayev B, Lagali N, Dartt DA, Baraas RC, Utheim TP (2019) Meibomian gland dysfunction and keratopathy are associated with dry eye disease in aniridia. *British Journal of Ophthalmology* 103:
46. Landsend ECS, Lagali N, Utheim TP (2021) Congenital aniridia – A comprehensive review of clinical features and therapeutic approaches. *Surv Ophthalmol* 66:1031–1050
47. Latta L, Viestenz A, Stachon T, Colanesi S, Szentmáry N, Seitz B, Käsmann-Kellner B (2018) Human aniridia limbal epithelial cells lack expression of keratins K3 and K12. *Exp Eye Res* 167:100–109
48. Latta L, Nordström K, Stachon T, Langenbacher A, Fries FN, Szentmáry N, Seitz B, Käsmann-Kellner B (2019) Expression of retinoic acid signaling components ADH7 and ALDH1A1 is reduced in aniridia limbal epithelial cells and a siRNA primary cell based aniridia model. *Exp Eye Res* 179:

49. Latta L, Knebel I, Bleil C, Stachon T, Katiyar P, Zussy C, Fries FN, Käsmann-Kellner B, Seitz B, Szentmáry N (2021) Similarities in DSG1 and KRT3 down regulation through retinoic acid treatment and PAX6 knockdown related expression profiles: Does PAX6 affect RA signaling in limbal epithelial cells? *Biomolecules* 11:
50. Latta L, Ludwig N, Krammes L, Stachon T, Fries FN, Mukwaya A, Szentmáry N, Seitz B, Wowra B, Kahraman M, Keller A, Meese E, Lagali N, Käsmann-Kellner B (2021) Abnormal neovascular and proliferative conjunctival phenotype in limbal stem cell deficiency is associated with altered microRNA and gene expression modulated by PAX6 mutational status in congenital aniridia. *Ocular Surface* 19:
51. Le Q, Xu J, Deng SX (2018) The diagnosis of limbal stem cell deficiency. *Ocular Surface* 16:58–69
52. Le Q, Chauhan T, Yung M, Tseng CH, Deng SX (2020) Outcomes of Limbal Stem Cell Transplant: A Meta-analysis. *JAMA Ophthalmol* 138:
53. Lee H, Khan R, O'keefe M (2008) Aniridia: Current pathology and management. *Acta Ophthalmol* 86:
54. Li W, Chen YT, Hayashida Y, Blanco G, Kheirkah A, He H, Chen SY, Liu CY, Tseng SCG (2008) Down-regulation of Pax6 is associated with abnormal differentiation of corneal epithelial cells in severe ocular surface diseases. *Journal of Pathology* 214:
55. López-García JS, García-Lozano I, Rivas L, Martínez-Garchitorena J (2006) Congenital aniridia keratopathy treatment. *Arch Soc Esp Oftalmol* 81:
56. Ma XL, Liu HQ (2011) Effect of calcium on the proliferation and differentiation of murine corneal epithelial cells in vitro. *Int J Ophthalmol* 4:
57. Maden M (2007) Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 8:
58. Matsumata M, Sakayori N, Maekawa M, Owada Y, Yoshikawa T, Osumi N (2012) The effects of Fabp7 and Fabp5 on postnatal hippocampal neurogenesis in the mouse. *Stem Cells* 30:
59. Michalik L, Wahli W (2007) Guiding Ligands to Nuclear Receptors. *Cell* 129:
60. Murillo-Rodríguez E, Millán-Aldaco D, Arankowsky-Sandoval G, Yamamoto T, Cid L, Monteiro D, Rocha NB, Telles-Correia D, Teixeira DS, Veras AB, Budde H, Machado S, Imperatori C, Torterolo P (2020) The retinoid X receptor: a nuclear receptor that modulates the sleep-wake cycle in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 237:
61. Naganuma T, Sato Y, Sassa T, Ohno Y, Kihara A (2011) Biochemical characterization of the very long-chain fatty acid elongase ELOVL7. *FEBS Lett* 585:3337–3341
62. Nahoum V, Pérez E, Germain P, Rodríguez-Barrios F, Manzo F, Kammerer S, Lemaire G, Hirsch O, Royer CA, Gronemeyer H, de Lera AR, Bourguet W (2007) Modulators of the structural dynamics of the retinoid X receptor to reveal receptor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:
63. Napoli JL (2017) Cellular retinoid binding-proteins, CRBP, CRABP, FABP5: Effects on retinoid metabolism, function and related diseases. *Pharmacol Ther* 173:19–33
64. Neuhaus C, Betz C, Bergmann C, Bolz HJ (2014) Genetik der kongenitalen Aniridie. *Ophthalmologie* 111:

65. Nicholas MP, Mysore N (2021) Corneal neovascularization. *Exp Eye Res* 202:
66. Ntzeros K, Stanier P, Mazis D, Kritikos N, Rozis M, Anesidis E, Antoniou C, Stamatakos M (2015) MKI67 (marker of proliferation Ki-67). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*
67. O'Sullivan SE, Kaczocha M (2020) FABP5 as a novel molecular target in prostate cancer. *Drug Discov Today* 25:2056–2061
68. Pennacchiotti G, Valdés-Gutiérrez F, González-Arriagada WA, Montes HF, Parra JMR, Guida VA, Gómez SE, Guerrero-Gimenez ME, Fernandez-Muñoz JM, Zoppino FCM, Carón RW, Ezquer ME, Fernández-Ramires R, Bruna FA (2021) SPINK7 expression changes accompanied by HER2, P53 and RB1 can be relevant in predicting oral squamous cell carcinoma at a molecular level. *Sci Rep* 11:
69. Penniston KL, Tanumihardjo SA (2006) The acute and chronic toxic effects of vitamin A. *American Journal of Clinical Nutrition* 83:191–201
70. Perusek L, Maeda T (2013) Vitamin a derivatives as treatment options for retinal degenerative diseases. *Nutrients* 5:
71. Pirie A (1977) Effects of locally applied retinoic acid on corneal xerophthalmia in the rat. *Exp Eye Res* 25:297–302
72. Posch A (2014) Sample preparation guidelines for two-dimensional electrophoresis.
73. Purton LE, Bernstein ID, Collins SJ (2000) All-trans retinoic acid enhances the long-term repopulating activity of cultured hematopoietic stem cells. *Blood* 95:
74. Qi X, Duan F, Li X, Zhang X, Li N, Liu M, Gao H (2019) Femtosecond Laser-Assisted Keratolimbic Allograft Transplantation for the Treatment of Total Limbal Stem Cell Deficiency. *Cornea* 38:
75. Rama P, Bonini S, Lambiase A, Golisano O, Paterna P, de Luca M, Pellegrini G (2001) Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation* 72:
76. Ramaesh T, Ramaesh K, Collinson JM, Chanas SA, Dhillon B, West JD (2005) Developmental and cellular factors underlying corneal epithelial dysgenesis in the Pax6^{+/-} mouse model of aniridia. *Exp Eye Res* 81:
77. Ramirez-Miranda A, Nakatsu MN, Zarei-Ghanavati S, Nguyen C v., Deng SX (2011) Keratin 13 is a more specific marker of conjunctival epithelium than keratin 19. *Mol Vis* 17:
78. Roux L, Concordet JP, Ferrigno O, Aberdam D (2017) In vitro modeling of aniridia-related PAX6 haploinsufficiency by the use of CRISPR/Cas9 on limbal epithelial cells. *Acta Ophthalmol* 95:
79. Roux LN, Petit I, Domart R, Concordet JP, Qu J, Zhou H, Joliot A, Ferrigno O, Aberdam D (2018) Modeling of Aniridia-Related Keratopathy by CRISPR/Cas9 Genome Editing of Human Limbal Epithelial Cells and Rescue by Recombinant PAX6 Protein. *Stem Cells* 36:
80. Rubelowski AK, Latta L, Katiyar P, Stachon T, Käsmann-Kellner B, Seitz B, Szentmáry N (2020) HCE-T cell line lacks cornea-specific differentiation markers compared to primary limbal epithelial cells and differentiated corneal epithelium. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 258:

81. Russell RM (2000) The vitamin A spectrum: From deficiency to toxicity. *American Journal of Clinical Nutrition* 71:878–884
82. Samarawickrama C, Chew S, Watson S (2015) Retinoic acid and the ocular surface. *Surv Ophthalmol* 60:
83. Sasamoto Y, Hayashi R, Park SJ, Saito-Adachi M, Suzuki Y, Kawasaki S, Quantock AJ, Nakai K, Tsujikawa M, Nishida K (2016) PAX6 Isoforms, along with Reprogramming Factors, Differentially Regulate the Induction of Cornea-specific Genes. *Sci Rep* 6:
84. Schünke M, Schulte E, Schumacher U (2018) *Prometeus*. 5th edition. Thieme (Verlag), Stuttgart
85. See AWM, Clagett-Dame M (2009) The temporal requirement for vitamin A in the developing eye: Mechanism of action in optic fissure closure and new roles for the vitamin in regulating cell proliferation and adhesion in the embryonic retina. *Dev Biol* 325:
86. Seitz B, Das S, Sauer R, Hofmann-Rummelt C, Beckmann MW, Kruse FE (2011) Simultaneous amniotic membrane patch in high-risk keratoplasty. *Cornea* 30:
87. Seitz B, Käsmann-Kellner B, Viestenz A (2014) Stadiengerechte Therapie der kongenitalen Aniridie. *Der Ophthalmologe* 111:
88. Seridi N, Hamidouche M, Belmessabih N, el Kennani S, Gagnon J, Martinez G, Coutton C, Marchal T, Chebloune Y (2021) immortalization of primary sheep embryo kidney cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 57:
89. Sharma M, Kumar R, Sharma S, Thomas B, Kapatia G, Singh G, Bal A, Ram J, Bhasin M, Guptasarma P, Luthra-Guptasarma M (2019) Sustained exposure to trypsin causes cells to transition into a state of reversible stemness that is amenable to transdifferentiation. *bioRxiv*
90. Shi H, Wang L, Luo J, Liu J, Loo JJ, Liu H (2019) Fatty acid elongase 7 (Elovl7) plays a role in the synthesis of long-chain unsaturated fatty acids in goat mammary epithelial cells. *Animals* 9:
91. Sisodiya SM, Free SL, Williamson KA, Mitchell TN, Willis C, Stevens JM, Kendall BE, Shorvon SD, Hanson IM, Moore AT, van Heyningen V (2001) PAX6 haploinsufficiency causes cerebral malformation and olfactory dysfunction in humans. *Nat Genet* 28:214–216
92. Soprano DR, Gambone CJ, Sheikh SN, Gabriel JL, Chandraratna RAS, Soprano KJ, Kochhar DM (2001) The synthetic retinoid AGN 193109 but not retinoic acid elevates CYP1A1 levels in mouse embryos and Hepa-1c1c7 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 174:153–159
93. Sridhar MS (2018) Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian J Ophthalmol* 66:
94. Standeven AM, Johnson AT, Escobar M, Chandraratna RAS (1996) Specific antagonist of retinoid toxicity in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 138:
95. Tseng SCG (1989) Concept and application of limbal stem cells. *Eye (Basingstoke)* 3:
96. Varga Z, Lebeau A, Bu H, Hartmann A, Penault-Llorca F, Guerini-Rocco E, Schraml P, Symmans F, Stoehr R, Teng X, Turzynski A, von Wasielewski R, Gürtler C, Laible M, Schlombs K, Joensuu H, Keller T, Sinn P, Sahin U, Bartlett J, Viale G (2017) An international reproducibility study validating quantitative determination of ERBB2, ESR1, PGR, and MKI67 mRNA in breast cancer using MammaTyper®. *Breast Cancer Research* 19:

97. Vicente A, Byström B, Lindström M, Stenevi U, Domellöf FP (2018) Aniridia-related keratopathy: Structural changes in naïve and transplanted corneal buttons. *PLoS One* 13:
98. Watanabe M, Kakuta H (2018) Retinoid X receptor antagonists. *Int J Mol Sci* 19:
99. Wawrocka A, Krawczynski MR (2018) The genetics of aniridia — simple things become complicated. *J Appl Genet* 59:
100. Weber C, Fischer J, Redelfs L, Rademacher F, Harder J, Weidinger S, Wu Z, Meyer-Hoffert U (2017) The serine protease inhibitor of Kazal-type 7 (SPINK7) is expressed in human skin. *Arch Dermatol Res* 309:767–771
101. Weinberg RA (1998) Bumps on the road to immortality. *Nature* 396:
102. Xiong DD, Zeng CM, Jiang L, Luo DZ, Chen G (2019) Ki-67/MKI67 as a predictive biomarker for clinical outcome in gastric cancer patients: An Updated Meta-analysis and Systematic Review involving 53 Studies and 7078 Patients. *J Cancer* 10:5339–5354
103. Yang C, Su H, Liao X, Han C, Yu T, Zhu G, Wang X, Winkler CA, O'Brien SJ, Peng T (2018) Marker of proliferation Ki-67 expression is associated with transforming growth factor beta 1 and can predict the prognosis of patients with hepatic B virus-related hepatocellular carcinoma. *Cancer Manag Res* 10:679–696
104. Yang Z -N, Davis GJ, Hurley TD, Stone CL, Li T -K, Bosron WF (1994) Catalytic Efficiency of Human Alcohol Dehydrogenases for Retinol Oxidation and Retinal Reduction. *Alcohol Clin Exp Res* 18:
105. Zhang S, Gu H, Hu N (2015) Role of peroxisome proliferator-activated receptor γ in ocular diseases. *J Ophthalmol* 2015:

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Bulbus oculi und des histologischen Aufbau der Kornea.	8
Abbildung 2: Lokalisation der Vogt'schen Palisaden.	8
Abbildung 3: Anatomie des Limbus mit Differenzierung der Limbusepithelstammzelle bis hin zur differenzierten Epithelzelle.	9
Abbildung 4: Manifestation und Komplikationen der kongenitalen Aniridie.	12
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Retinolstoffwechsel sowie seine Wirkung im Nucleus der Zielzelle.	16
Abbildung 6: Korrelationsanalyse von Aniridie-relevanten Genen.	20
Abbildung 7: Regulation von bei Aniridie verändert exprimierten Genen durch PAX6 direkt.	21
Abbildung 8: Regulation von Aniridie-relevanten Markergenen durch PAX6 über Gene des Retinolstoffwechsels (a) oder Retinoidrezeptoren (b).	22
Abbildung 9: Morphologie der limbalen Zelllinien.	34
Abbildung 10: qPCR-Profil der QuantStudio™ Design & Analysis-Software.	38
Abbildung 11: Beispiel der Berechnung des Fold Changes einer Behandlungsprobe.	39
Abbildung 12: Densitometrische Auswertung der PAX6-Proteinmenge mittels iBright™ Analysis-Software.	42
Abbildung 13: PAX6-Genexpression.	43
Abbildung 14: PAX6-Proteinexpression.	44
Abbildung 15: ADH7-Genexpression.	45
Abbildung 16: SPINK7-Genexpression.	46
Abbildung 17: DSG1-Genexpression.	47
Abbildung 18: KRT3-Genexpression.	48
Abbildung 19: KRT19-Genexpression.	49
Abbildung 20: FABP5-Genexpression.	50
Abbildung 21: FABP5-Proteinexpression.	51
Abbildung 22: PPARG-Genexpression.	52
Abbildung 23: ELOVL7-Genexpression.	53
Abbildung 24: MKI67-Genexpression.	54
Abbildung 25: Vergleich der PAX6-Genexpression in L-TERT und primären LEZ.	63

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation von Aniridie-assoziiierter Keratopathie (AAK) in fünf Stadien[28].	14
Tabelle 2: Übersicht über die Herunter-/Hochregulierung von Aniridie-relevanten Markergenen bei PAX6-abhängiger Aniridie in PAX6 ^{+/-} -LEZ.	19
Tabelle 3: Verwendete Geräte und Hersteller.	29
Tabelle 4: Verwendete Labormaterialien und Hersteller.	30
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien/Kits und Hersteller.	31
Tabelle 6: Verwendete Primer und Hersteller.	32
Tabelle 7: Verwendete Antikörper und Hersteller.	32
Tabelle 8: Behandlungsschema für L-TERT und L-W mit Behandlungssubstanzen und Endkonzentrationen.	35
Tabelle 9: Reaktionsmixe für die cDNA-Synthese.	36
Tabelle 10: Primer- und Templatemix für die qPCR.	37
Tabelle 11: Probenmix für die Proteinaufbereitung für die Elektrophorese.	40
Tabelle 12: Tabellarische Zusammenfassung der veränderten Genexpression in Abhängigkeit von der Zelllinie.	55
Tabelle 13: Tabellarische Zusammenfassung der veränderten Genexpression in Abhängigkeit von der Behandlung.	55
Tabelle 14: Tabellarische Zusammenfassung der veränderten Proteinexpression in Abhängigkeit von der Zelllinie sowie in Abhängigkeit von der Behandlung.	55
Tabelle 15: Veränderte basale Genexpression von Aniridie-relevanten Markern in PAX6 ^{+/-} -LEZ.	57
Tabelle 16: Veränderte Genexpression Aniridie-relevanter Marker bei Behandlung mit Ret/at-RA, bzw. RAR/RXR Antagonisten.	60

10. Danksagung

Im Folgenden möchte ich meinen herzlichen Dank den nachstehenden Personen aussprechen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit außerordentlich unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Nóra Szentmáry, Institutsleiterin der Dr. Rolf M. Schwiete Zentrum für Limbusstammzellforschung und kongenitale Aniridie, für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation über dieses interessante Thema zu schreiben. Vielen Dank, dass ich mich auf diese Art und mit Ihrer Unterstützung in die Forschung einbringen und mein Interesse für die Augenheilkunde noch erweitern durfte. Für Ihre Geduld und Ihre freundliche Unterstützung danke ich Ihnen sehr.

Für die herausragende Betreuung möchte ich mich bei Frau Dr. Tanja Stachon bedanken, die mir in ihrer freundlichen Art stets meine Fragen beantwortet hat. Danke für die fachliche Beratung, die zahlreichen Denkanstöße, statistischen Hilfestellungen und die hilfreichen Korrekturen. Auch für die Einweisung in die Laborarbeit und die ausführlichen Anleitungen beim Experimentieren möchte ich mich bedanken.

Auch Herrn Dr. Lorenz Latta möchte ich für die exzellente Betreuung danken. Mit seinem großzügigen Engagement und Hilfsbereitschaft hat er mir viel weitergeholfen und mich zum Schreiben und Experimentieren motiviert. Die unterhaltsamen Gespräche haben die Zusammenarbeit im Labor stets kurzweilig und interessant gemacht.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Berthold Seitz, Klinikdirektor der Klinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes, für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Gerätschaften im biologischen Labor seiner Klinik.

Letztlich möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen des Dr. Rolf M. Schwiete Zentrums für Limbusstammzellforschung und kongenitale Aniridie bedanken, die mich so herzlich in ihrem Labor willkommen geheißen haben. Vielen Dank für die vielen schönen gemeinsamen Stunden, die lieben Weihnachts- und Feiertagsgrüße und ausgezeichnete Gesellschaft beim Experimentieren.

11. Publikation

Katiyar P, Stachon T, Fries FN, Parow F, Ulrich M, Langenbucher A, Cayless A, Seitz B, Käsmann-Kellner B, Latta L, Szentmáry N. Decreased FABP5 and DSG1 protein expression following PAX6 knockdown of differentiated human limbal epithelial cells. *Exp Eye Res* 2022 Feb; 215: 108904.

12. Lebenslauf

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