

**Aus dem Dr. Rolf M. Schwiete Zentrum
für Limbusstammzellforschung und kongenitale Aniridie
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Institutsleiter: Prof. Dr. Nóra Szentmáry**

**Validierung von potenziell durch PAX6 regulierten
Transkripten mithilfe eines siRNA basierten Aniridie-
Zellmodells**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2021**

vorgelegt von
Claire Sophie Céline ZUSSY
geb. am 07.04.1998 in GUEBWILLER

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	8
1.1 Summary	10
2. Einleitung	12
2.1 Anatomie	12
2.1.1 Auge	12
2.1.2 Konjunktiva und Kornea	12
2.1.3 Limbus und Limbusepithelzellen	13
2.2 Stammzellinsuffizienz und kongenitale Aniridie	14
2.2.1 Stammzellinsuffizienz	14
2.2.2 Definition der kongenitalen Aniridie.....	14
2.2.3 Genetik der kongenitalen Aniridie	15
2.2.4 Aniridie-assoziierte Keratopathie (AAK).....	15
2.3 Funktion und Zusammenhang der untersuchten Gene/Transkripte im Zusammenhang mit Aniridie.....	17
2.3.1 Stammzell- und Differenzierungsmarker	17
2.3.2 Strukturproteine.....	18
2.3.3 Andere Marker.....	20
2.4 Die Bedeutung von Ca ²⁺ im Rahmen der Zelldifferenzierung	21
2.5 Zielsetzung der Arbeit	22
3. Material und Methoden	23
3.1 Material	23
3.1.1 Materialien die für die Zellkultur verwendet wurden.....	23
3.1.2 Materialien die für die Zellbehandlung verwendet wurden.....	25
3.1.3 Materialien die zur RNA- und Protein-Isolierung verwendet wurden	27
3.1.4 Materialien die zur cDNA Herstellung verwendet wurden	28
3.1.5 Materialien die zur quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) verwendet wurden....	29
3.1.6 Materialien die für die Western Blot Analyse verwendet wurden	31
3.2 Methoden.....	33

3.2.1 Zellkultur	33
3.2.2 Zellbehandlung.....	35
3.2.3 RNA- und Protein-Isolierung	35
3.2.4 cDNA-Herstellung.....	36
3.2.5 Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR).....	36
3.2.6 Western Blot.....	37
4. Ergebnisse	40
4.1 Western-Blot Analyse	40
4.1.1 Erfolgreiche siRNA Behandlung gegen <i>PAX6</i> und <i>PAX6</i> Reduktion unter allen Bedingungen.....	40
4.2 Vergleich der Genexpression der Kontrollproben in Hinblick auf Ca^{2+} Supplementierung	41
4.2.1 Erhöhte Expression.....	41
4.3 Genexpressionsergebnisse nach siRNA Behandlung gegen <i>PAX6</i>	41
4.3.1 Erniedrigte <i>TGFBI</i> , <i>CRYAB</i> und <i>TMEM47</i> Expression nach siRNA Behandlung gegen <i>PAX6</i> in An- und Abwesenheit von Ca^{2+}	42
4.3.2 Erniedrigte <i>EGFL6</i> , <i>MITF</i> , <i>PAPLN</i> und <i>ATF3</i> Expression nach siRNA Behandlung gegen <i>PAX6</i> , nur in Abwesenheit von Ca^{2+}	43
4.3.3 Erniedrigte <i>NTNG1</i> Expression nach siRNA Behandlung gegen <i>PAX6</i> , nur in Anwesenheit von Ca^{2+}	44
4.3.4 Erhöhte <i>CCK</i> und <i>LRRNI</i> Expression nach siRNA Behandlung gegen <i>PAX6</i> , nur in Abwesenheit von Ca^{2+}	45
4.3.5 Keine signifikante <i>SLITRK4</i> -, <i>ABI3BP</i> - und <i>PXDN</i> -Expressionsänderung nach siRNA Behandlung gegen <i>PAX6</i> in Ab- und Anwesenheit von Ca^{2+}	46
5. Diskussion	47
5.1 Interpretation des Einflusses von Ca^{2+} bei den Kontrollproben.....	47
5.2 Interpretation der Ca^{2+} abhängigen Genexpressionsänderungen.....	47
5.2.1 Genexpressionen die in Anwesenheit von Ca^{2+} eine signifikante Änderung erwiesen	47
5.2.2 Genexpressionen die in Abwesenheit von Ca^{2+} eine signifikante Änderung erwiesen	48
5.2.3 Interpretation der Genexpressionsänderungen die in Abwesenheit von Ca^{2+} eine signifikante Hochregulierung erwiesen.....	50
5.3 Interpretation der Ca^{2+} unabhängigen Genexpressionsänderungen.....	52

5.3.1 Interpretation der signifikanten Genexpressionsänderungen.....	52
5.3.2 Interpretation der unveränderten Genexpressionen	53
5.4 Zusammenfassung nach der Systematik der Gene bzw. dessen Transkripte.....	55
5.5 Vergleich unserer Ergebnisse zu den Daten der Patientenbindehautzellen.....	58
5.6 Schlussfolgerung	60
5.6.1 Hinblick auf weitere Studien	61
6. Literatur	62
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis:.....	68
Publikation	70
Danksagung	71
Lebenslauf	72

Abkürzungsverzeichnis

<u>Abkürzung</u>	<u>Erläuterung</u>
Abb.	Abbildung
AAK	Aniridie-assoziierte Keratopathie
ABI3BP	ABI Family Member 3 Binding Protein
ACTB	β-Actin
ATF3	Activating Transcription Factor 3
BPE	Bovine Pituitary Extract
Bzw.	Beziehungsweise
Ca ²⁺	Calcium
cDNA	Komplementäre DNA
CCK	Cholecystokinin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRYAB	Crystallin Alpha B
Ctrl	Kontrolle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dpt	Dioptrie
EGF	Epithel Growth Factor
EGFL6	Epidermal Growth Factor-Like Protein 6
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
kDa	Kilodalton
KFSM	Keratinocyten Serumfreies Medium

l	Liter
LEZ	Limbusepithelzellen
LRRN1	Leucine Rich Repeat Neuronal 1
M	mol/l
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minute
mm	Millimeter
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MITF	Melanocyte Inducing Transcription Factor
nm	Nanometer
NTNG1	Netrin G1
NTRK	Neutrophic Receptor Tyrosin Kinase
PAPLN	Papilin
PAX6	Paired Box 6
PBS	Phosphate Buffered Saline
PXDN	Peroxidasin
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate
SLIT	Slit Guidance Ligand
SLITRK4	SLIT and NTRK Like Family Member 4
TBP	TATA-Box Binding Protein
TGFBI	Transforming Growth Factor Beta Induced
TMEM47	Transmembrane Protein 47
UV	Ultraviolett

VIS	Visible
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
°C	Grad Celsius
%	Prozent

1. Zusammenfassung

Ziel:

Es konnte in Vorarbeiten [39,40] gezeigt werden, dass verschiedenste Gene bei Aniridie-Patienten sowohl in den Bindehaut- als auch in den Limbusepithelzellen vermindert exprimiert werden. Eine Regulierung der Transkripte dieser Gene durch *PAX6* wird vermutet.

In dieser Arbeit wurde überprüft, ob sich die Transkripte der Gene in einem Aniridie-Zellmodell auf Basis eines reinen *PAX6*-mRNA-Knockdowns in gleicher Weise verändern wie bei den Aniridie-erkrankten Patienten. Ziel war es herauszufinden, ob die beobachtete mRNA-Expression dieser Gene durch *PAX6* reguliert wird oder ob ihre Expression anderen externen Faktoren unterliegt.

Methoden:

Durch die Entnahme von gesunden Limbusepithelzellen von Spender-Hornhäuten und die Behandlung dieser durch siRNA gegen *PAX6*, wurden die Bedingungen der *PAX6*-assoziierte Aniridie nachgeahmt. Zusätzlich wurde ein Teil der Kulturen mit Ca^{2+} behandelt, um die Ergebnisse bei verschiedenen Differenzierungsgraden zu vergleichen. Mittels SYBR-green qPCR wurde geprüft, inwieweit die mRNA-Expression der Gene *TGFBI*, *TMEM47*, *CRYAB*, *NTNG1*, *EGFL6*, *PAPLN*, *ABI3BP*, *SLITRK4*, *CCK*, *LRRN1*, *ATF3*, *MITF*, *PXDN* in den Zellmodellen, in Abhängigkeit zu *PAX6*, betroffen werden. Die relative Protein-Expression von *PAX6* nach Behandlung mit siRNA wurde mithilfe eines Western Blots untersucht.

Ergebnisse:

Die mRNA-Expression von *TGFBI* und *TMEM47*, sowie *CRYAB* wiesen eine höchst signifikante Herunterregulierung nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* und mit Ca^{2+} Supplementierung auf. *NTNG1* zeigte nur nach Ca^{2+} Supplementierung eine signifikante Herunterregulierung im Gegensatz zu *ATF3*, *EGFL6*, *MITF* und *PAPLN*, die nur ohne Ca^{2+} -Supplementierung, nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* eine signifikante Herunterregulierung aufwiesen. *ABI3BP*, *PXDN* sowie *SLITRK4* waren in diesem Versuch nicht signifikant verändert. *CCK* und *LRRN1* wurden signifikant in Abwesenheit von Ca^{2+} nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* hochreguliert.

Schlussfolgerung:

Nicht alle Transkripte des Zellmodells haben sich entsprechend der Patientendaten in unserem Versuch verhalten. Bei Transkripten wie *TMEM47*, das zur Zell-Junctions/ -Adhensionen dient, spielt der Differenzierungsgrad keine Rolle. Bei *TGFBI*, das einen Einfluss auf den Aufbau der Zellmatrix hat, scheint der Einfluss von *PAX6* bei einem niedrigeren Differenzierungsgrad stärker zu sein. Bei *TGFBI*, *TMEM47*, *CRYAB*, und *NTNG1*, die sich entsprechend den Patientendaten in unserem Versuch verhalten haben, ist die Wahrscheinlichkeit einer Regulierung durch *PAX6* hoch. Bei allen anderen Genen, die ein abweichendes Verhalten zeigen, ist die alleinige Regulierung durch *PAX6* unwahrscheinlich.

1.1 Summary

Purpose:

It could be shown in preliminary works [39,40] that the expression of a wide variety of genes was reduced in aniridia patients, both in conjunctival epithelial cells and limbal epithelial cells. A regulation of these genes' transcripts by *PAX6* is suspected.

This work attempts to determine, whether the mRNA expression of these genes act similarly in an aniridia cell model, based on pure *PAX6* mRNA down-regulation, as in aniridia patients. The aim is to clarify, whether the observed mRNA expression of these genes is regulated by *PAX6* or depends on other external factors.

Methods:

By harvesting healthy limbal epithelial cells from donor corneas and treating them with siRNA targeting *PAX6* in cell culture, the conditions of *PAX6*-associated aniridia were mimicked. In addition, some cultures were also treated with Ca^{2+} , in order to compare gene expression at different degrees of epithelial cell differentiation. SYBR-green qPCR was used in order to test, to which extent the mRNA expression of the genes *TGFBI*, *TMEM47*, *CRYAB*, *NTNG1*, *EGFL6*, *PAPLN*, *ABI3BP*, *SLITRK4*, *CCK*, *LRRN1*, *ATF3*, *MITF*, *PXDN* is affected in the cell models, depending on *PAX6* knockdown status. Following siRNA treatment, *PAX6* protein levels were determined using Western blot.

Results:

TGFBI, *TMEM47* and *CRYAB* mRNA expression, showed a highly significant downregulation after siRNA treatment against *PAX6* and Ca^{2+} supplementation. *NTNG1* showed significant downregulation only after Ca^{2+} supplementation, in contrast to *ATF3*, *EGFL6*, *MITF*, and *PAPLN*, which showed significant downregulation only without Ca^{2+} supplementation after siRNA treatment against *PAX6*. *ABI3BP*, *PXDN*, and *SLITRK4* mRNA expression did not change significantly in this experiment. *CCK* and *LRRN1* were significantly upregulated in the absence of Ca^{2+} after siRNA treatment against *PAX6*.

Conclusions:

Not all transcripts have shown the same behavior in our experiments as experienced earlier in patients. In *TMEM47* expression, which is involved in cell junctions/ adhesion, the grade of epithelial cell differentiation does not seem to play a role. Concerning *TGFBI*, which is related to cell matrix structure, *PAX6* seems to play a role in less differentiated status of the cells. *TGFBI*, *TMEM47*, *CRYAB*, and *NTNG1* expression was similar in our experiments, as in previous studies of aniridia patients, therefore, these genes are most probably regulated by *PAX6*. All other genes, with an expression other than in patients, are most probably not regulated by *PAX6* only.

2. Einleitung

2.1 Anatomie

2.1.1 Auge

Das Auge ist das Sehorgan des Menschen, es setzt sich zusammen aus dem Bulbus oculi, sowie dem Hilfsapparat. Zu dem Hilfsapparat gehören die Lider und Tränenorgane, die hauptsächlich zum Schutz des Auges dienen, sowie die Augenmuskeln, die eine Bewegung des Augapfels ermöglichen. Das Auge befindet sich in der Orbita, eine nahezu trichterförmige knöcherne Höhle im Schädel. Darin enthalten sind Auge mit Augenmuskeln umhüllt von Fettgewebe, Nerven und versorgenden Blutgefäßen sowie ein Teil des Sehnervs [38].

Die Funktion des Auges ist es, das Sehen zu ermöglichen. Die Hornhaut, das Kammerwasser, die Linse und der Glaskörper bilden zusammen den optischen Apparat, der das sichtbare Licht auf die Netzhaut projiziert. Die gesamte Brechkraft, die durch den optischen Apparat erzeugt wird, beträgt ca. 63 Dpt, davon werden zwei Drittel allein durch die Kornea gebildet. Die elektromagnetische Strahlung im Bereich von 350-750 nm, die auf die Netzhaut eintrifft, wird durch die Sinneszellen des Auges weiter in dem Sehnerv als elektrische Impulse umgewandelt, geleitet, und in der Sehrinde verarbeitet, um als Farbe oder helle bzw. dunkle Erscheinungen wahrgenommen zu werden [38].

2.1.2 Konjunktiva und Kornea

Die Hornhaut (Kornea) bildet zusammen mit der Bindehaut (Konjunktiva) die äußere Begrenzung des Augapfels. Die Hornhaut ist eine vollständig transparente uhrglasförmige Struktur, die sich am Limbus corneae (Hornhautrand) in die Sklera einfügt. Am Limbus entspringt die dünne, gefäßhaltige Conjunctiva bulbi (Bindehaut des Augapfels), die auf der Sklera leicht verschiebbar ist. Weiter in der Fornix geht sie über in die Conjunctiva fornicis, und abschließend am Tarsus, in die Conjunctiva tarsalis. Die Bindehaut dient zur Beweglichkeit des Augapfels, fundiert als Gleitschicht zusammen mit der Tränenflüssigkeit und bildet eine Schutzfunktion gegen Erreger durch die Präsenz von reichlichen Lymphozyten und Plasmazellen in den Umschlagfalten.

Histologisch besteht die Hornhaut von außen nach innen aus 5 Schichten: unverhorntes Plattenepithel, Bowman-Lamelle, Stroma, Descemet-Membran und Endothel, die zusammen ca. 520 µm dick sind und physiologisch einen Durchmesser von 10-13 mm aufweisen.

Die zwei Hauptfunktionen der Hornhaut sind zum einem: Schutz gegen äußere Einflüsse zu gewährleisten und zum anderen: die Brechung des einfallenden Lichts durch die 43 Dpt Brechkraft.

Das Hornhautgewebe ist zellarm, strukturlos und beinhaltet keine Gefäße, darum beruht die Ernährung auf drei externe Quellen: dem Randschlingennetz (Gefäßnetz) der Bindehaut, dem Kammerwasser und dem Tränenfilm. Der Tränenfilm dient hierbei nicht nur als Nahrungsquelle, sondern ebenfalls als Schutzschicht vor Infektionen, durch dem darin enthaltenden bakteriziden Ferment Lysozym, und am wichtigsten sichert es eine glatte Oberfläche der Hornhaut und somit das scharfe Sehen [38].

2.1.3 Limbus und Limbusepithelzellen

Der Limbus corneae bezeichnet die Zone, wo die Hornhaut in die Sklera übergeht. Dieser Übergang bildet eine Furche, an welche die Bindehaut ansetzt [38]. Innerhalb des stark vaskularisierten und innervierten [66] Limbus befinden sich die Vogt'schen Palisaden, in dessen Basalzellschicht die Limbusstammzellen lokalisiert sind [61]. Die Limbusstammzellen sind aufgrund ihrer Natur dazu fähig Reparaturprozesse des kornealen Epithels zu gewährleisten, somit wird die Transparenz, aber auch die Barrierefunktion aufrechterhalten [66]. Darüber hinaus weisen die Limbusstammzellen eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Barriere zwischen dem vaskularisierten Bindehautgewebe und der avaskulären Hornhaut auf [41].

Die Limbusstammzellen stellen zwar den Ausgangspunkt für weitere Proliferation dar, sind aber in geringerer Menge vorhanden als die weiteren Differenzierungsstufen wie die transient amplifizierenden Zellen (TACs), die aus sich teilenden Stammzellen entstehen. Die TACs teilen sich schneller und haben einen schnelleren Zellzyklus als Stammzellen und übernehmen die Hauptrolle im Rahmen der Regenerationsfähigkeit des Hornhautepithels. Die so erreichte Amplifikation jeder Stammzellteilung führt zu einer Schonung der Stammzellen und somit zum geringeren Gebrauch der Stammzellproliferation. Es ermöglicht eine Reduktion der DNA-Replikationsfehler in den Stammzellen selbst und durch deren hohen Anteil im Limbus ist gewährleistet, dass eine größere Menge an nahezu terminal differenzierten Zellen schneller ihrer Funktion nachkommen können [16].

Nachdem die Stammzellen zu TACs differenziert sind, differenzieren sich diese im peripheren kornealen Gewebe in korneale suprabasale post-mitotische Zellen (PMCs). Die PMCs differenzieren letztendlich, wie oben angesprochen, in terminal differenzierte Zellen (TDCs), welche teilungsunfähig sind und in die zentrale Kornea migrieren um dort ihre Funktion auszuüben [16].

2.2 Stammzellinsuffizienz und kongenitale Aniridie

2.2.1 Stammzellinsuffizienz

Als Stammzellinsuffizienz wird eine partiell oder komplett beeinträchtigte Funktion oder Schädigung der Limbusstammzellen bezeichnet. Für den Patienten bedeutet es eine beeinträchtigte Wundheilung sowie wiederkehrende schmerzhafte Hornhauterosionen. Darüber hinaus können die Vogt'schen Palisaden abflachen bis hin zum kompletten Schwund dieser und alle sich darin befindlichen Zellen. Die Bindehautzellen können auf Grund der Stammzellinsuffizienz über den Limbus hinaus auf die Kornea migrieren, in den schlimmsten Fällen bis hin zum kompletten Ersatz des Hornhautepithels. Dies geht einher mit einer verminderten Transparenz sowie einer Vaskularisierung des Epithels. In schweren Fällen, durch den Verlust des angiogenischen Gleichgewichts, kann eine Neovaskularisierung des Hornhautstromas stattfinden und somit zum Visusverlust bis zur Erblindung führen [41].

Eine Stammzellinsuffizienz kann verschiedene Ursachen haben, generell wird diese primär durch eine pathologische Veränderung des umgebenden Gewebes verursacht. Dies kann durch Defekte in der Stammzellnische und den Stammzellen selbst ausgelöst werden. Beispiele für solche sind kongenitale Augenerkrankungen (z.B. Aniridie), externe Einflüsse wie Infektionen, mechanische Reize durch Kontaktlinsen, chemische und thermische Verletzungen sowie andere nicht primäre ophthalmologische Erkrankungen (z.B. Stevens-Johnson Syndrom) [16].

2.2.2 Definition der kongenitalen Aniridie

Als Aniridie bezeichnet man eine seltene panokuläre Erkrankung (1:60 000 bis 1:90 000 Geburten) [31], dessen Hauptmerkmal die Hypoplasie oder das vollständige Fehlen der Iris ist. Sie betrifft weiterhin auch in den meisten Fällen die Retina, in Form einer foveale Hypoplasie, den Sehnerv, die Linse und die Hornhaut, was bei den erkrankten Patienten zu einer erheblichen Sehbeeinträchtigung führt und in extremen Fällen sogar zur Erblindung. Die Krankheit manifestiert sich bereits in der frühen Kindheit, die betroffene Patienten leiden oft an einem Nystagmus (ausgelöst durch die foveale Hypoplasie), Photophobie und verminderter Sehschärfe. Im Verlauf kann es zu Komplikationen wie Katarakt oder einem Glaukom kommen [26].

Die Erkrankung kann sporadisch auftreten, tritt aber in den meisten Fällen als *PAX6*-assoziierte Aniridie auf, welche auch häufiger mit schwerwiegenderen Komplikationen einhergeht. Die *PAX6*-assoziierte Form

der Erkrankung kann sich auch systemisch abspielen und hat somit pathologische Konsequenzen auf das Nervensystem, den Gastrointestinaltrakt und den Metabolismus. Aufgrund der systemischen Komponente wird der Begriff *PAX6*-Syndrom gleich mit dem Aniridiesyndrom verwendet [31].

Bei jedem Patienten kann sich die Erkrankung anders manifestieren, die genetische Diagnostik ist hierbei von Bedeutung, um ein (WAGR)-Syndrom (Wilms-Tumor, Aniridie, Anomalien des Urogenitalsystem und geistige Retardierung) zu identifizieren und somit frühzeitig eine Wilms-Tumor Gefährdung abzuklären [26][63].

2.2.3 Genetik der kongenitalen Aniridie

Die Aniridie weist einen autosomal-dominanten Erbgang auf, sie wird bei zwei Drittel der Erkrankten, auf diese Weise, geschlechtsunabhängig, vererbt. Beim restlichen Drittel entsteht die Erkrankung durch De novo Mutationen im *PAX6* Gen [63] und wird dann weiter an deren Kinder autosomal-dominant vererbt [26]. An diesen Punkt kann man erwähnen, dass *PAX6*-unabhängige Aniridie-Formen auftreten können, diese aber mit geringeren Beeinträchtigungen bei den Betroffenen einhergehen [59]. Bei der *PAX6*-assoziierte Aniridie handelt es sich in den meisten Fällen um heterozygote Formen [22].

PAX6 liegt auf dem Chromosom 11p13, und spielt eine Schlüsselrolle in der embryonalen Entwicklung des Auges, multiplen Hirnregionen, des Bulbus olfactorius (Riechkolben), des Neuralrohr, des Pankreas und des Intestinal Trakts [62][55].

Auf dem Chromosom 11p13 liegt ebenfalls das *WT1* Gen, das bei Veränderungen zu Wilms-Tumoren prädisponiert. Liegt eine kontinuierliche Deletion der beiden Gene vor, spricht man vom oben beschriebenen WAGR-Syndrom. Die betroffenen Patienten haben ein 50-70%iges Risiko an Wilms-Tumoren zu erkranken [63]. 30% der Patienten mit sporadischer Aniridie können ebenfalls an diesem Syndrom leiden [19].

2.2.4 Aniridie-assoziierte Keratopathie (AAK)

Die Aniridie-assoziierte Keratopathie ist eine im Verlauf erscheinende Komplikation der Aniridie, die in 4 Schweregrade eingeteilt werden kann [32]. Etwa 90% der Aniridie-erkrankten Patienten weisen eine pathologische Veränderung der Augenoberfläche auf (AAK Grade 1-2) und bei 20% tritt das Vollbild der AAK auf (AAK Grade 3-4) [8]. Sie tritt als Folge der Aniridie-bedingten Abflachung der Vogt'schen Palisaden mit anschließender Stammzellinsuffizienz auf [26][40]. Dabei gilt: je ausgeprägter

das klinische Bild der AAK, desto weniger nachweisbar sind die Vogt'schen Palisaden und hochgradiger die Stammzellinsuffizienz [37].

Gekennzeichnet ist es durch den progressiven Ersatz der Hornhautzellen durch Bindehautzellen, [28] was eine progressive Gefäßeinsprossung mit sich zieht, die entweder bei einer milden Ausprägung peripher bleiben, oder bei schwerwiegenderen Fällen panokulär wird [26]. Eine Keratinisierung [43][60], sowie eine Zunahme der Hornhautdicke [26] [43] wird ebenfalls beobachtet. Dies alles führt zu einer Eintrübung der Hornhaut, was wiederum zum Visusverlust führt. Bindehautzellen aber auch Becherzellen und Entzündungszellen können in das Hornhautepithel einwandern und dort ein chronisch entzündlichen Zustand hervorrufen, was letztendlich zu einer Pannusbildung (bindegewebige Wucherung) führen kann [47]. Diese Pannusbildung ist für die vorhin beschriebene Zunahme der Hornhautdicke verantwortlich.

Klinisch bedeutet es für den Patienten, wie oben schon beschrieben, rezidivierende Hornhaut-Erosionen mit einhergehender Tränenfilminstabilität, Wundheilungsstörungen, Entzündungen, erhebliche Beeinträchtigung des Visus bis hin zur praktischen Erblindung bei zunehmenden Schweregraden [32].

Zu den Therapieversuchen der AAK zählen autologe Serumaugentropfen und chirurgische Amnionmembrantransplantation, phototherapeutische Keratektomie sowie lamelläre und perforierende Keratoplastik. Diese können jedoch wegen der Stammzellinsuffizienz keine dauerhafte Klarheit der Hornhaut garantieren. Bei wiederholten chirurgischen Therapieversuchen muss man zusätzlich die progressive Vorderabschnittsfibrose als Komplikation in Betracht ziehen und in dessen Hinsicht eine gründliche Nutzen-Risiko Abwägung anfertigen [32].

2.3 Funktion und Zusammenhang der untersuchten Gene/Transkripte im Zusammenhang mit Aniridie

2.3.1 Stammzell- und Differenzierungsmarker

Sämtliche hier beschriebenen Gene waren in Patientenproben auf mRNA-Ebene dereguliert [40][39]. Ihre Funktion und der genaue Zusammenhang zur Aniridie-assoziierten Keratopathie ist zurzeit noch nicht vollständig geklärt.

EGFL6: Epidermal Growth Factor-Like Protein 6

EGFL6 ist involviert in die Regulation des Zellzyklus, -proliferation und -entwicklung. Laut der universalen Protein Datenbank (uniprot database) (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q8IUX8>) kodiert es für ein sekretorisches Protein, das eine Ca^{2+} -Bindende Sequenz aufweist und eine Rolle bei der Zell-Adhäsion spielt. Viele Studien haben die Rolle des *EGFL6* beim Wachstum von Tumoren durch die Proliferation von Gefäßen untersucht. Darunter wurde in einer Studie ein Zusammenhang zwischen *EGFL6*-Knockdown und *PAX6* in Evidenz gebracht, mit der Schlussfolgerung, dass *PAX6* die Angiogenese anstößt und zugleich die *EGFL6*-Expression reguliert [58].

MITF: Melanocyte Inducing Transcription Factor

Auch unter den Namen „Microphthalmia- associated transcription Factor“ bekannt, *MITF* kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der in der Entwicklung verschiedenster Zellen eingreift und unter anderem am Pigmentepithel der Netzhaut und da an der Melanogenese seine Rolle ausübt [2]. Es wurde bewiesen, dass Mutationen in beiden Allelen des *MITF* unter anderem ein Kolobom sowie eine Mikrophtalmie hervorrufen können [21]. *MITF* könnte darüber hinaus in einen Regelkreis, der die Entwicklung des Pigmentepithels der Netzhaut reguliert, zusammen mit *PAX6* beteiligt sein [7].

PAX6: Paired Box Protein Pax-6

PAX6 nimmt eine zentrale Rolle in der embryonalen Entwicklung verschieden Gewebe [48] ein, es fungiert als gewebsspezifischer Transkriptionsfaktor [10], und erfüllt die Aufgabe viele weitere Gene zu regulieren. Besonders in der embryonalen Augenentwicklung ist *PAX6* von Bedeutung, wo es die Hauptrolle der Regulierung weitere Gene spielt [10].

PAX6 ist unter anderem verantwortlich für die Differenzierung pluripotenter Vorläuferzellen der Netzhaut, und dessen Migration [48]. Weiterhin spielt es eine Rolle bei der Entwicklung des olfaktorischen Systems sowie des Pankreas [67]. *PAX6* ist ein sensitives Gen, das leicht durch verschiedene Einflüsse in seiner Expression schwanken kann [10].

Obwohl es bei der embryonalen Entwicklung von äußerster Bedeutung ist, wird *PAX6* auch bei Erwachsenen in den Hornhautzellen und Bindehautzellen exprimiert [40] und trägt bei der vollständigen Entwicklung der Augenlinse [48], sowie die Erhaltung der schon entwickelten Hornhaut bei [27].

2.3.2 Strukturproteine

ABI3BP: ABI Family Member 3 Binding Protein

Auch Target of Nesh-SH3 genannt, kodiert *ABI3BP* für ein sekretiertes Protein, das funktionelle Domänen wie Fibronectine Typ III, SH3 Bindungsmotive und nukleare Targeting Sequenzen enthält [65]. Der *ABI3BP* Genlocus wurde in Meta-Analysen [57] mit Iriskolobomen, dem Fehlen von okulären Strukturen durch eine abnormale Morphogenese des Sehnervenkopfes und der Verschmelzung der Fissura optica in Verbindung gebracht. Die isolierten Iriskolobome werden dabei auch von pathologisch kleinen Augäpfeln (Mikrophtalmie), sowie einer kleinen Kornea (Mikrokornea) begleitet [49]. *ABI3BP* wird im Nervus opticus, im trabekulären Maschenwerk, sowie in der Kornea exprimiert [57]. Durch den Zusammenhang mit dem Iriskolobom und der Expression in der Kornea stellt es somit ein interessantes Gen dar, dessen eventuelle Rolle bei der Aniridie-Entstehung möglicherweise von *PAX6* abhängen kann.

CRYAB: Crystallin Alpha B

CRYAB kodiert für das Alpha-crystallin B chain Protein, das zur Transparenz und Refraktion der Linse beiträgt. Durch dessen Chaperon-Funktion schützt es vor Aggregation verschiedener Proteine unter Zellstress. Mutationen im *CRYAB* Gen wurden bei Katarakt sowie bei der Desmin-assoziierten Myopathie nachgewiesen [6].

LRRN1: Leucine rich repeat neuronal protein 1

LRRN1 ist ein Gen, das ein Protein kodiert und bei Defekten zu kornealen Dystrophien führen kann. Das Gen wird spezifisch von ex-vivo kultivierten humanen kornealen Endothelzellen exprimiert [20]

und spielt auch eine Rolle bei der Organisation neuronaler Strukturen, einschließlich des Sehnervs im Auge [3]. Eine Variation im *LRRNI* Gen könnte eventuell im Zusammenhang mit Keratokonus stehen [50].

NTNG1: Netrin G1

Dieses Gen kodiert für ein Protein, das bei der Ausbreitung der Axone in der neuronalen Entwicklung eine Rolle spielt. Es reguliert die Gestaltung der Axone und Dendriten auf mehreren Ebenen (laminär, zellulär, subzellulär und synaptisch). [54]. Es wird in der Limbusregion exprimiert [13] und spielt ebenfalls eine Rolle bei der Zell-Zell Adhesion [56]. *NTNG1* Mutationen können ebenfalls als Ursache des Rett-Syndroms in Betracht gezogen werden [4].

PAPLN: Papilin

Dieses Gen auch als „Proteoglycan Like Sulfated Glycoprotein“ genannt, kodiert für ein sekretorisches Protein, das bei der Organisation der extrazellulären Matrix eine Rolle spielt [16]. Es übt seine Funktion als Protease-Inhibitor aus und wird, laut dem IMPC (International Mouse Phenotyping Consortium)

<https://www.mousephenotype.org/data/genes/MGI:2386139?dataSearch=eye&dataLifeStage=early>), in den Augen von Mäusen exprimiert, und spielt bei der kornealen Vaskularisierung eine Rolle.

PXDN: Peroxidasin

PXDN kodiert für ein Protein, das eine Rolle bei dem Aufbau der extrazellulären Matrix spielt. Es steigert die Stabilität des Kollagens IV durch Bildung von sulfiliminen Crosslinks [35]. Es wurde nachgewiesen, dass Mutationen in diesem Gen mit einer Vielzahl von pathologischen Veränderungen am Auge, wie z.B. kongenitaler Katarakt, Glaukome und kornealer Eintrübung verbunden sind [64]. Weiterhin konnte eine Beteiligung des Gens bei ASD (Anterior Segment Dysgenesis), die mit einer pathologischen Veränderung des vorderen Augenabschnittes (Kornea, Augenlinse, Iris, Vorderkammer), nachgewiesen werden. [35].

SLITRK4: SLIT und NTRK-like Protein 4

Dieses Gen kodiert für ein membrangebundenes Protein, das eine Rolle in der Synaptogenese spielt. Die Proteine enthalten Leucine-Rich-Repeat Domänen [29], die Rolle des Gens überschneidet also die des

LRRNI. Mutationen in diesem Gen führen demnach zur Aufhebung des Aufbaus der Neuriten (zumindest durch *SLITRK4*) [45].

TGFBI: Transforming Growth Factor β - Induced

Die von diesem Gen erzeugten Proteine können Kollagen I, II und IV binden und somit bei dem Aufbau der extrazellulären Zellmatrix dienen. *TGFBI* wird von vielen Zellen exprimiert, wobei Mutationen dieses Gens eine Spezifität für die 5q13-assoziierte korneale Dystrophie aufweisen [33]. Diese Erkrankung wird durch Ablagerungen in der Hornhaut charakterisiert [34]. Immunhistologische Studien haben ergeben, dass eine große Menge mutierter *TGFBI* Proteine in diesen Ablagerungen nachweisbar ist, während die Wild-Typ Proteine hauptsächlich im Extrazellulärraum der Hornhautepithelzellen nachweisbar sind. [17].

2.3.3 Andere Marker

ATF3: Activating Transcription Factor 3

Der Cyclic AMP-dependent transcription factor (*ATF3*) kodiert für Proteine, die ihre Funktion im Zellkern wahrnehmen. Die Expression dieses Gens wird durch verschiedene Pathomechanismen reguliert. Die Hauptaufgabe des Gens besteht in der Repression der Transkription verschiedenster Promotoren, die eine ATF-Bindungsdomäne beinhalten, es übt also die Aufgabe eines Genregulators aus [24]. Es wurde nachgewiesen, dass *ATF3* in den Ziliarnerven, die die Hornhaut innervieren, bei Mäusen mit trockenen Augen überexprimiert wird. [18]. In einer weiteren Studie [51] wurde beschrieben, dass *ATF3* eine Rolle bei der Regeneration des Sehnervs spielen könnte. *ATF3* reguliert die Limbusepithelzellproliferation in Mäusen, wobei die Proliferation negativ durch das *ATF3* reguliert wird [30].

CCK: Cholecystinin

CCK wird von Neuronen exprimiert, besonders auch im Nervus Trigemini, der die Hornhaut innerviert. Eine Studie von Gonzalez-Coto AF, Alonso-Ron C, Alcalde I, et al beschrieb, dass die beobachtete Anwesenheit von *CCK* und dessen Rezeptoren in den Epithelzellen der Hornhaut von Mäusen darauf hindeuten könnte, dass es eine Rolle im kornealen neurogenen Entzündungsprozess spielt und insbesondere bei der Gestaltung der Reparatur- bzw. Remodelingprozesse nach Hornhautverletzungen

eine Funktion ausüben könnte [23]. In einer anderen Studie wurde nachgewiesen, dass die *CCK+* Neurone von *PAX6* abhängig sind [11].

TMEM47: Transmembran protein 47

Das *TMEM47* spielt eine Schlüsselrolle bei der Zell-Zell-Verbindung, es nimmt Teil an der Transition von Adherens- zu Tight Junctions und reguliert die Lokalisierung von Proteinen, die zu Tight Junctions beitragen [14]. *TMEM47* wird von Limbusepithelzellen und von Hornhautepithelzellen die eine *PAX6*-Mutation aufweisen, exprimiert [40].

2.4 Die Bedeutung von Ca^{2+} im Rahmen der Zelldifferenzierung

Es wurde von vielen Studien gezeigt, dass Ca^{2+} eine Rolle bei der Differenzierung verschiedener Zellen spielt [5][44]. Darüber hinaus beeinflusst die Ca^{2+} -Konzentration die Proliferation und Differenzierung epidermaler Zellen [25], wie z.B. Keratinozyten, die Zell-Zell-Adhäsionen, die Migration, sowie die Homöostase der epidermalen Barriere [9].

Ca^{2+} ist in sehr vielen intrazellulären Signalwegen von Bedeutung und demnach auch in der Kornea an verschiedenen Regulierungsprozesse beteiligt. Einer dieser Prozesse ist die Wundheilung: initial durch Entzündungsreaktionen angestoßen kommt es zu einer Reorganisation, Zellwachstum und Migration im Hornhautepithel [36].

Wie schon oben erläutert, spielen die Limbusstammzellen eine Schlüsselrolle in der Wundheilung des Hornhautepithels. Es sind die ursprünglichen Zellen die sich über verschiedene Stufen in PMCs und TDCs, die Zellen, die das Hornhautepithel ausmachen, differenzieren [16]. Man kann also daraus rückschließen, dass Ca^{2+} über verschiedene Signalwege und intermediäre Stufen die Differenzierung der Limbusepithelzellen in der Hornhaut anregt.

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt der siRNA Behandlung gegen *PAX6* auf die Transkription der verschiedenen oben erläuterten Gene zu beobachten. Mittels RT-qPCR und anschließender statistischer Analyse der Genexpressionsergebnisse konnte eine mögliche Korrelation der *PAX6* Expression und der Genexpression der analysierten Zielgene in Abhängigkeit der Differenzierung (Anwesenheit von Ca^{2+} im Medium) untersucht werden.

Durch eine Überschneidung der in früheren Studien erhobenen Patientendaten und der in unseren Versuchen erhaltenen Ergebnisse, generierten wir Anhaltspunkte, welche Transkripte tatsächlich von *PAX6* reguliert sein könnten. Transkripte die sich nicht so verhalten wie vorhergesagt, werden wahrscheinlich durch andere Faktoren der Erkrankung, wie zum Beispiel Entzündung, Nährstoffmangel oder Langzeiteffekte verursacht.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Materialien die für die Zellkultur verwendet wurden

Geräte

Gerätname	Hersteller
Heraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Inkubator HERAcell 240i	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Megafuge Heraeus 16R	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Stereolupe OPMI1-FR	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Sterilwerkbank Safe 2020	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Thermocycler CFX Connect	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA

Tabelle 1 : Geräte, die für die Zellkultur verwendet wurden und deren Hersteller

Labormaterialien

Material	Hersteller
AcuPunch, Größe: 1,5 mm	Acuderm Inc., Florida, USA
AHN myTip® Low Retention Filter Tips 0,5 – 10 µl	AHN Biotechnologie GmbH, Nordhausen, Deutschland
AHN myTip® Low Retention Filter Tips 10 – 100 µl	AHN Biotechnologie GmbH, Nordhausen, Deutschland
AHN myTip® Low Retention Filter Tips 100 – 1000 µl	AHN Biotechnologie GmbH, Nordhausen, 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
Cell-Tricks	Sysmex Europe GmbH
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, Nümbrecht, Deutschland
epT.I.P.S. Standard Pipettenspitzen blau 50- 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Petrischalen	Greiner Bio One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
PIPETBOY acu 2	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
TC Platte 6 Well, Standard F	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
TC Platte 24 Well, Standard F	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 2 : Labormaterialien, die für die Zellkultur verwendet wurden und deren Hersteller

Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Collagenase A	Roche Pharma AG, Schweiz
Cryo-SFM	PromoCell GmbH, Heidelberg Deutschland
DMEM	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenheim, Deutschland
Dubeccos PBS	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenheim, Deutschland
KSFM	Gibco, Carlsbad, USA
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenheim, Deutschland

Tabelle 3 : Chemikalien, die für die Zellkultur verwendet wurden und deren Hersteller

Hergestellte Medien

Standardmedium:

- 500 ml KSFM
- 2,5 µg EGF
- 25 mg BPE
- 0,5 ml Penicillin /Streptomycin (Konzentration: 1/100)

3.1.2 Materialien die für die Zellbehandlung verwendet wurden

Geräte

Gerätname	Hersteller
Inkubator HERAcell 240i	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Sterilwerkbank Safe 2020	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA

Tabelle 4 : Geräte, die für die Zellbehandlung verwendet wurden und deren Hersteller

Labormaterialien

Material	Hersteller
AHN myTip® Low Retention Filter Tips 100 – 1000 µl	AHN Biotechnologie GmbH, Nordhausen, Deutschland
Eppendorf Reference Pipette 100 – 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf-Gefäße, Größe: 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
epT.I.P.S. Standard Pipettenspitzen blau 50-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kryotubes, Größe: 1,8 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
TC Platte 6 Well, Standard F	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
TC Platte 24 Well, Standard F	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 5 : Labormaterialien, die für die Zellbehandlung verwendet wurden und deren Hersteller

Chemikalien

Chemikalie/ Kits	Hersteller
KSFM	Gibco, Carlsbad, USA
Lipofectamine 2000 Transfection Reagent	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Opti-MEM	Gibco, Carlsbad, USA

Tabelle 6 : Chemikalien, die für die Zellbehandlung verwendet wurden und deren Hersteller

3.1.3 Materialien die zur RNA- und Protein-Isolierung verwendet wurden

Geräte

Gerätname	Hersteller
Heraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Sterilwerkbank Safe 2020	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Tabelle 7 : Geräte, die zur RNA- und Protein-Isolierung verwendet wurden und deren Hersteller

Labormaterialien

Material	Hersteller
AHN myTip® Low Retention Filter Tips 100 – 1000 µl	AHN Biotechnologie GmbH, Nordhausen, Deutschland
Cell Scraper, Größe: 28 cm	Greiner Bio One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Eppendorf Reference Pipette 100 – 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf-Gefäße, Größe: 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
epT.I.P.S. Standard Pipettenspitzen blau 50-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
TC Platte 6 Well, Standard F	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
TC Platte 24 Well, Standard F	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 8 : Labormaterialien, die zur RNA- und Protein-Isolierung verwendet wurden und deren Hersteller

Kit

Kit	Hersteller
RNA/DNA/Protein isolation Kit (Isolate II)	Norgen Biotek Corp., Thorold, ON, Canada

Tabelle 9 : Kit, das zur RNA- und Protein-Isolierung verwendet wurde und dessen Hersteller

3.1.4 Materialien die zur cDNA Herstellung verwendet wurden

Geräte

Gerätname	Hersteller
Heraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Sterilwerkbank Safe 2020	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Tabelle 10 : Geräte, die zur cDNA Herstellung verwendet wurden und deren Hersteller

Labormaterialien

Material	Hersteller
AHN myTip® Low Retention Filter Tips 0,5 – 10 µl	AHN Biotechnologie GmbH, Nordhausen, Deutschland
AHN myTip® Low Retention Filter Tips 10 – 100 µl	AHN Biotechnologie GmbH, Nordhausen, Deutschland
Eppendorf Reference Pipette 0,5 – 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Reference Pipette 10 – 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
epT.I.P.S. Standard Pipettenspitzen blau 50-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
PCR-Tubes 0,2 ml	Greiner Bio One International GmbH, Kremsmünster, Österreich

Tabelle 11 : Labormaterialien, die zur cDNA Herstellung verwendet wurden und deren Hersteller

Chemikalien und Kits

Chemikalie/ Kits	Hersteller
One Taq RT-PCR Kit	New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland
RNase freies Wasser	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
SYBR-Green	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Tabelle 12 : Chemikalien und Kits, die zur cDNA Herstellung verwendet wurden und deren Hersteller

3.1.5 Materialien die zur quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) verwendet wurden

Geräte

Gerätname	Hersteller
Heraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
QuantStudio 5 Real-Time-PCR	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Tabelle 13 : Geräte, die zur quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) verwendet wurden und deren Hersteller

Labormaterialien

Material	Hersteller
AHN myTip® Low Retention Filter Tips 0,5 – 10 µl	AHN Biotechnologie GmbH, Nordhausen, Deutschland
AHN myTip® Low Retention Filter Tips 10 – 100 µl	AHN Biotechnologie GmbH, Nordhausen, Deutschland
Eppendorf Reference Pipette 0,5 – 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Reference Pipette 10 – 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf-Gefäße, Größe: 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
epT.I.P.S. Standard Pipettenspitzen blau 50-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
PCR-Tubes 0,2 ml	Greiner Bio One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
PIPETBOY acu 2	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz

Tabelle 14 : Labormaterialien, die zur quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) verwendet wurden und deren Hersteller

Chemikalien und Kits

Chemikalie/ Kits	Hersteller
One Taq RT-PCR Kit	New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland
RNAse freies Wasser	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
SYBR-Green	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Tabelle 15 : Chemikalien und Kits, die zur quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) verwendet wurden und deren Hersteller

Primer (qPCR)

Primer	Katalognummer	Amplifikationsgröße	Hersteller
<i>ABI3BP</i>	QT01017926	86 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>ATF3</i>	QT00000273	110 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>CCK</i>	QT00073871	101bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>CRYAB</i>	QT00066913	100 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>EGFL6</i>	QT00004354	92 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>LRRN1</i>	QT00207970	78 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>MITF</i>	QT00037737	174 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>NTNG1</i>	QT00039424	101 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>PAPLN</i>	QT00493808	269 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>PAX6</i>	QT00071169	113 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>PXDN</i>	QT02322068	100 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>SLITRK4</i>	QT00212646	69 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

TBP x2	QT00000721	132 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>TGFBI</i>	QT00000728	108 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>TMEM47</i>	QT00003437	109 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

Tabelle 16 : Primer und Amplifikationsgrößen für die qPCR

3.1.6 Materialien die für die Western Blot Analyse verwendet wurden

Geräte

Gerätname	Hersteller
Heraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Primoverte – inverses Lichtmikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, 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

Tabelle 17 : Geräte, die für die Western Blot Analyse verwendet wurden und deren Hersteller

Labormaterialien

Material	Hersteller
AHN myTip® Low Retention Filter Tips 0,5 – 10 µl	AHN Biotechnologie GmbH, Nordhausen, Deutschland
AHN myTip® Low Retention Filter Tips 10 – 100 µl	AHN Biotechnologie GmbH, Nordhausen, Deutschland
Eppendorf Reference Pipette 0,5 – 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Reference Pipette 10 – 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Eppendorf-Gefäße, Größe: 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
epT.I.P.S. Standard Pipettenspitzen blau 50- 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Tabelle 18 : Labormaterialien, die für die Western Blot verwendet wurden und deren Hersteller

Chemikalien und Kits

Chemikalie/ Kits	Hersteller
4-12%iges NuPage Bis-Tris SDS Gel	ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA
Bradford Reagenz	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bromophenolblau	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dual-colour- Marker	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
MOPS-Puffer	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Western Froxx Antikörpermischung	BioFroxx GmbH, Einhausen, Deutschland
Western Froxx Solution B (anti-mouse HRP)	BioFroxx GmbH, Einhausen, Deutschland
Western FROxx Solution B (anti-rabbit HRP)	BioFroxx GmbH, Einhausen, Deutschland
Western Froxx Stripping Puffer 10x	BioFroxx GmbH, Einhausen, Deutschland
Western Froxx Waschlösung	BioFroxx GmbH, Einhausen, Deutschland
Western lightning chemo luminescence Plus ECL Reagenz	PerkinElmer Life Sciences, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenheim, Deutschland

Tabelle 19 : Chemikalien und Kits, die für die Western Blot Analyse verwendet wurden und deren Hersteller

Antikörper

Antikörper	Katalognummer	Hersteller	Verdünnung
PAX6-(anti-Mouse)	Sc-32766	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA	1:200

Tabelle 20 : Antikörper, der für die Western Blot Analyse verwendet wurde und dessen Verdünnung

3.2 Methoden

Die Verwendung und das Experimentieren mit Spenderzellen wurde von der Ethikkommission des Saarlandes (Ethiknummer 226/15) stattgegeben. Die Versuchszellen stammten von Hornhautspenden der LIONS Hornhautbank Saar-Lor-Lux. Die beschriebenen Methoden gelten jeweils für Zellen eines Spenders.

3.2.1 Zellkultur

Alle Zellkulturversuche wurden unter einer Sterilwerkbank mit vertikalem Luftabzug durchgeführt, um jegliches Kontaminationsrisiko zu vermeiden. Anschließend erfolgte die Kultivierung der Zellen in einem Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Atmosphäre.

Limbusstammzellen-Isolierung

Die Spenderhornhaut wurde vor der Biopsie zuerst vorsichtig mit auf Raumtemperatur erwärmtem PBS gewaschen, um mögliche Störfaktoren zu vermeiden. Um Limbusepithelzellen (LEZ) aus Spenderhornhäuten zu gewinnen, wurde mithilfe eines Mikroskops die Limbusregion identifiziert und daraus gezielt mithilfe einer 1,5 mm Biopsie-Stanze das Gewebe ausgestanzt. Das vorgestanzte Gewebe wurde mittels Pinzette und Schere von dem verbliebenen Bindegewebsstrang durchtrennt. Zuletzt wurden die Biopsate in ein Well einer 24-Well Platte in 500 µL auf Raumluft erwärmte Collagenase A Lösung gegeben und anschließend für 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Präparation der primären LEZ-Kultur

Die Gewebstücke wurden nach der Inkubation in Collagenase A mithilfe einer Pipette mehrmals durchgemischt, um die LEZ von der extrazellulären Matrix zu lösen. Um die LEZs von den Fibroblasten zu trennen, wurde die so gewonnene Zellsuspension auf Cell-Trics® Filter gegeben und mit 10 ml PBS gespült. Die so gewonnenen Fibroblasten wurden verworfen. Der Cell-Trics® Filter wurde nun umgedreht und die auf dem Filter verbliebenen Zellen mit 2,5 ml Trypsin in eine 6-Well-Platte ausgespült. Nach einer 5 minutigen Inkubation bei 37°C wurden die LEZs durch auf- und ab-pipettieren durchgemischt, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Nach weiteren 5 Minuten Inkubationszeit wurde die Reaktion mit DMEM+5% FCS gestoppt. Die Zellsuspension wurde bei 800 g für 5 min

zentrifugiert und der Überstand verworfen, das Zellpellet in 500 ml KSFM resuspendiert und in einem Well einer 24-Well Platte bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Das Wachstum wurde täglich kontrolliert und optimale Wachstumsbedingungen durch einen Mediumwechsel im 72 Stunden-Takt gewährleistet.

Zellpassagierung

Sobald die primäre LEZ-Kultur eine Konfluenz von etwa 90% aufwies, in der Regel nach etwa 4-8 Tagen, wurden die Zellen in ein Well einer 6-Well Platte passagiert.

Zum Splitten der Zellen wurde im ersten Schritt das Nährmedium KSFM entfernt und 500 µL Trypsin auf die Zellen pipettiert. Nach 2-Mal 5-minütiger Inkubation bei 37°C mit zwischenzeitiger Durchmischung mit einer Pipette, wurde die Wirkung des Trypsins mit 650 µL DMEM + 5% FCS gestoppt. Diese Zellsuspension wurde in ein Eppendorfgefäß umgefüllt und anschließend 5 Minuten bei 800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zell-Pellet in 1 ml PBS aufgenommen, resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach erneuter Zentrifugierung von einer Dauer von 5 Minuten, wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml KSFM aufgenommen, auf das Zell-Pellet gegeben und auf- und abpipettiert, um eine homogene Verteilung zu erreichen. Die Zellsuspension wurde anschließend mit weiteren 2 ml KSFM in ein Well einer 6-Well-Platte pipettiert und im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Dieser Vorgang wurde wiederholt, sobald die Zellen erneut eine Konfluenz von etwa 90% erreicht hatten. Die Passagierung erfolgte dann zunächst in 2 Wells einer 6-Well Platte, und danach in 4 Wells einer 6-Well Platte.

Kryokonservierung

Um eine Optimierung der zeitlichen Abläufe zu erzielen, konnten die Zellen nach Erreichen einer 90%igen Konfluenz kryokonserviert werden. Dies ermöglichte eine zeitgleiche Behandlung mehrere Kulturen sowie eine verkürzte Wartezeit zwischen den Versuchen.

Dafür wurden die Zellen mit Trypsin wie bereits oben beschrieben abgeerntet und das Zellpellet in 1 ml Kryomedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in einem Kryotube in einem Kryokontainer platziert, dass eine langsame Abkühlung bis -80°C über 24 Stunden gewährt hat. Nach 24-Stunden wurden die ausreichend gekühlten Kryotubes in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.2 Zellbehandlung

Sobald die Kulturen eine Konfluenz von 90% in jeweils 4 Wells einer 6-Well-Platte erreicht hatten, konnten diese für die Versuche verwendet werden. Zunächst wurde das KSFM verworfen und mit frischem KSFM ersetzt, wobei 2 von den 4 Wells mit KSFM mit 0,9 mM Ca²⁺-Konzentration versetzt wurden, die Zellen der beiden anderen Wells ohne Ca²⁺ dienten als Kontrollzellen. Es erfolgte eine 24-stündige Inkubation im Brutschrank.

Zur Behandlung mit der siRNA wurde zunächst das Medium hergestellt. Dafür wurden 2 gleiche Medien aus jeweils 150 µL OptiMEM und 5 µL Lipofectamin (Medium 1) hergestellt. Um eine homogene Verteilung zu erzielen, wurden die Medien mittels Vortex gründlich gemischt. Ein Medium aus 150 µL OptiMEM und 0,75 µL siRNA ctrl sowie ein weiteres aus 150 µL OptiMEM und 0,75 µL si-PAX6-RNA wurden ebenfalls erstellt und gemischt (Medium 2). Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden jeweils Medium 1 und Medium 2 gemischt und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde in je 2 Wells der 6-Well Platte das Medium mit si-PAX6-RNA (jeweils 1 Well der Ca²⁺-freien bzw. Ca²⁺-supplementierte Kultur) und in die anderen beiden Wells das Medium mit siRNA ctrl pipettiert (jeweils 1 Well der Ca²⁺-freien bzw. Ca²⁺-supplementierte Kultur). Anschließend wurden die Kulturen zur Inkubation bei 37°C für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

3.2.3 RNA- und Protein-Isolierung

Nach 48 Stunden Behandlung wurden die Zellkulturen weiterverarbeitet. Zur RNA- und Proteingewinnung wurden zunächst die Zellen lysiert. Dazu wurde zuerst das Medium entfernt und die Zellen vorsichtig mit 1 ml PBS gewaschen. Nach der Zugabe von 300 µL Lysepuffer (Buffer SKP) wurden mithilfe eines Zellschabers die Zellen vom Boden der Platte gelöst. Die so erhaltene Suspension wurde in Eppendorfgefäße pipettiert.

Die Isolierung der RNA und Proteine aus den Zelllysaten erfolgte über ein Silica-basiertes Säulensystem. Die Durchführung der Isolierung erfolgte nach Befolgen eines standardisierten Protokolls des RNA/DNA/Protein Purification Plus Kit von Norgen-Biotek.

Nach dem Isolierungsprozess wurden die Konzentration der erhaltenen RNA-Proben mittels Nano-Drop Spektralphotometer gemessen. Dafür wurde Ultraviolet/Visible (UV/VIS)-Spektroskopie benutzt und die Konzentration der RNA-Proben wurde mittels des modifizierten Lambert-Beerschen-Gesetz berechnet: $c = (A \cdot e) / b$

3.2.4 cDNA-Herstellung

Die cDNA-Synthese erfolgte nach einem standardisierten Protokoll des OneTaq RT-PCR Kits von New England BioLabs.

Die benötigte Volumenmenge aus den RNA-Proben wurde aus deren vorher bestimmten Konzentration bestimmt, um eine Gesamt-RNA-Menge von 500 ng pro Probe zu erzielen (**Tabelle 21**).

Reaktionsmix	Volumen (µL)
H ₂ O (Nuclease frei)	H ₂ O Volumen _{Gesamt} – (Volumen _{RNA} + Volumen _{Oligo d(T)23 Primer})
RNA	x
Oligo d(T)23 Primer	2
Gesamt	8
Inkubation bei 70°C	
+ M-MuLV Reaction Mix	10
+ M-MuLV Enzyme Mix	2
Inkubation bei 42°C für 1 Stunde Inaktivierung des Enzyms bei 80°C für 4 Minuten	
+ H ₂ O (Nuclease frei)	30

Tabelle 21 : Detaillierte Zusammenstellung der Reaktionsmische für die cDNA-Synthese (x nimmt dabei eine Zahl zwischen 0 und 6 ein)

3.2.5 Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Die quantitative Polymerasekettenreaktion ermöglicht den Nachweis und zugleich die relative Quantifizierung der Nukleinsäuren in den zu analysierenden Proben. Es dient somit der Beurteilung der Hoch- oder Runterregulierung der Genexpression in den behandelten Zellen, im Vergleich zur Genexpressionen der Kontroll-Zellen.

Es wurde eine 96-Well-Platte für die qPCR verwendet. In ein Well wurde jeweils 7,5 µL Primermix und 2,5 µL Templatmix pipettiert. Die genaue Zusammensetzung der Mixe erläutern die hier untenstehenden **Tabellen 22-23**. Die eingesetzten Primer waren *ABI3BP*, *ATF3*, *CCK*, *CRYAB*, *EGFL6*, *LRRN1*, *MITF*, *NTNG1*, *PAPLN*, *PAX6*, *PXDN*, *SLITRK4*, *TGFBI*, *TMEM47*, als Referenzgen wurde TATA binding Protein (TBP) verwendet.

Primermix	Pro Well (µL)
Primer	1,25
SYBR-Green	5
H ₂ O	1,25

Tabelle 22 : Detaillierte Zusammenstellung des Primermix

Templatemix	Pro Well (µL)
cDNA	0,5
H ₂ O	2

Tabelle 23 : Detaillierte Zusammenstellung des Templatemix

Die qPCR erfolgte in folgenden Schritten: als erstes die Denaturierung: die Proben werden auf 95°C für 5 min erhitzt und anschließend ein zweites Mal auf 95°C für 10 Sekunden. Als zweiter Schritt erfolgte die Primerhybridisierung bei 60°C für 30 Sekunden und zuletzt die Elongation bei 72°C. Diese Schritte wurden für 40 Zyklen wiederholt.

Die Ergebnisse wurden mit der QuantStudio Design & Analysis Software ausgewertet. Von den analysierten Ct-Werten konnten die Δ Ct-Werte berechnet werden, welche noch weiter für die Berechnung der $\Delta\Delta$ Ct-Werte, sowie der Fold-Changes von Nutzen waren.

3.2.6 Western Blot

Der Western Blot dient dem Nachweis der Proteinexpression bestimmte Gene. Hier wurde er verwendet, um den Erfolg der *PAX6* Runterregulierung zu überprüfen.

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford erfolgte nach einem standardisierten Protokoll von Sigma-Aldrich (Katalognummer B6916) mit definierten Konzentrationen von bovinem Serum Albumin als Standard. Die Absorption wurde bei 595 nm Wellenlänge durchgeführt und mithilfe der Standardkurve die Proteinkonzentrationen der Proben berechnet.

Probenvorbereitung und Elektrophorese

Pro Probe wurde jeweils 20 µg Protein für ein Westen Blot-Versuch verwendet. Die Probenzusammensetzung erläutert die untenstehende **Tabelle 24**, x steht dabei für die jeweilige Proteinkonzentration.

Probenbestandteile	Volumen (µL)
Protein	$20\mu\text{g} / x \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}}$
5-Fach Laemmlipuffer	10
H ₂ O	Volumen Gesamt – (Volumen Laemmlipuffer + Volumen Protein)
Gesamt	20

Tabelle 24 : Detaillierte Zusammenstellung der Proben für die Elektrophorese

Die Proben wurden zur Denaturierung für 5 min auf 95°C im Thermoblock aufgeheizt und anschließend direkt auf Eis zur Abkühlung gelegt. Im nächsten Schritt wurde das SDS-Gel in der Elektrophoresekammer fixiert. Die Kammer wurde mit 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS-) Puffer befüllt. Als Größenstandard diente der Precision Plus Protein™ Standard (Dual color) der Firma Bio Rad. Die Größenauftrennung der Proteine erfolgte nach ihrer Molekülmasse unter einer Spannung von 120 V für 5 min, gefolgt von 180V über 60 min.

Blotten und Antikörper-Inkubation

Nach Abschluss der Proteinauftrennung, wurden die Proteinbanden des Gels auf eine Nitrozellulosemembran im Semi-Dry-Blotter transferiert. Die Membran wurde anschließend drei Mal mit 10 ml WesternFroxx Waschlösung für jeweils 5 Minuten gewaschen. Nach erfolgtem Waschvorgang wurde die Membran mit einer Lösung, bestehend aus 50 µL PAX6-Primär Antikörper und 10 ml anti-rabbit-Western-FROXX-Lösung inkubiert- (1/200). Die Membran wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Detektion erfolgt mit ECL Western Blotting Substrat von Perlin Elmer.

Die Visualisierung erfolgte mit dem LAS 4000 Imaging System (Fuji-Film).

Nach der Bildaufnahme wurde die Membran gestrippt, um eine zweite Inkubation mit β-Aktin zu ermöglichen. Dazu wurde die Membran mit den WesternFroxx Stripping Puffer 30 Minuten inkubiert. 2 µL anti-β-Aktin wurden in 10 ml anti-rabbit-WesternFroxx Lösung (1/5000) verdünnt. Das β-Aktin dient hierbei als Ladekontrolle.

Die Visualisierung erfolgte mit dem LAS 4000 Imaging System.

Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Genexpressionsergebnisse der Versuche mit und ohne Ca²⁺ Supplementierung (Fold Change ($2^{\Delta\Delta Ct}$)) wurde mit GraphPad Prism 7.04 Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 Western-Blot Analyse

4.1.1 Erfolgreiche siRNA Behandlung gegen PAX6 und PAX6 Reduktion unter allen Bedingungen

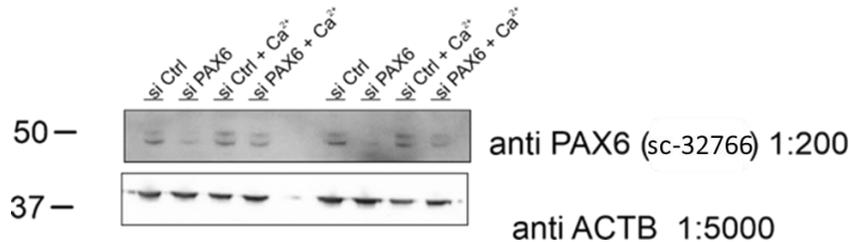


Abbildung 1: Western-Blot der Marker PAX6 und ACTB.

Representativer Western Blot von zwei primären LEZ Kulturen in Abwesenheit und Anwesenheit von Ca²⁺ bei paralleler Kontrolle und siRNA Behandlung gegen PAX6. Unter beiden Bedingungen kann die PAX6 Menge sichtbar reduziert werden. Als Ladekontrolle diente ein ACTB Antikörper.

Gezeigt ist das Ergebnis eines Western-Blots (**Abbildung 1**). Es zeigt die Detektion von PAX6 bei 46 und 48 kDA. Bei dem siPAX6-Knockdown der 2 Proben und 2 Bedingungen (ohne und mit Ca²⁺) kann ein vermindertes Signal beobachtet werden: Zeichen einer verminderten Proteinmenge.

Dieses Ergebnis dient der Verifizierung der tatsächlichen Verminderung der PAX6-Proteinmenge als Folge der siRNA Behandlung gegen PAX6. Unter der siRNA Behandlung sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Ca²⁺ ist die PAX6 Menge in den siRNAPAX6 Proben reduziert.

Der Western-Blot wurde mit 2 weiteren Proben mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. Exemplarisch ist jedoch nur 1 Blot mit 2 Proben gezeigt.

4.2 Vergleich der Genexpression der Kontrollproben in Hinblick auf Ca²⁺ Supplementierung

4.2.1 Erhöhte Expression

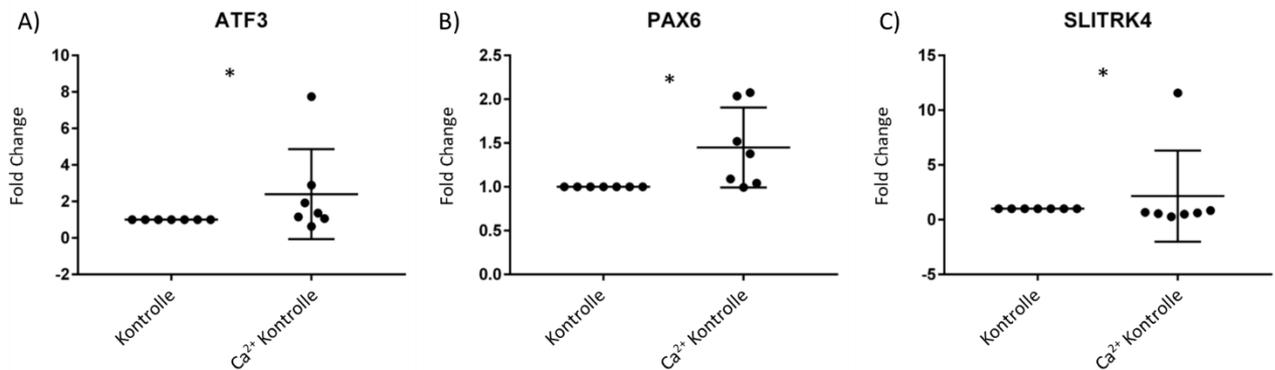


Abbildung 2: Genexpression der Marker *ATF3*, *PAX6* und *SLITRK4*. Die Diagramme zeigen die Fold Change Werte in Kontrollproben in Abwesenheit und in Anwesenheit von Ca²⁺. *: P-Wert=0,0169

Bei *ATF3*, *PAX6* und *SLITRK4* fand sich eine signifikant erhöhte Expression der Kontrollproben mit Ca²⁺-Supplementierung im Vergleich zur Kontrollproben ohne Ca²⁺-Supplementierung (P jeweils 0,0169). Die anderen Genexpressionen zeigten keine signifikanten Änderungen in Bezug auf An- und Abwesenheit von Ca²⁺ (**Abbildung 2**).

4.3 Genexpressionsergebnisse nach siRNA Behandlung gegen *PAX6*

Alle Diagramme wurden aus den Messungen von sieben verschiedenen primären Limbusepithelzellkulturen unter gleichen Bedingungen erstellt. Die Fold Change Werte der Kontrollproben in An- und Abwesenheit von Ca²⁺ „si Ctrl“ (=Kontrolle) und „Ca²⁺ si Ctrl“ (=Ca²⁺ Kontrolle) wurden in allen Diagrammen jeweils auf 1 gesetzt, die Fold Change Werte der Proben nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* wurden auf die jeweiligen Kontrollen (in An- und Abwesenheit von Ca²⁺) normiert.

4.3.1 Erniedrigte *TGFBI*, *CRYAB* und *TMEM47* Expression nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* in An- und Abwesenheit von Ca^{2+}

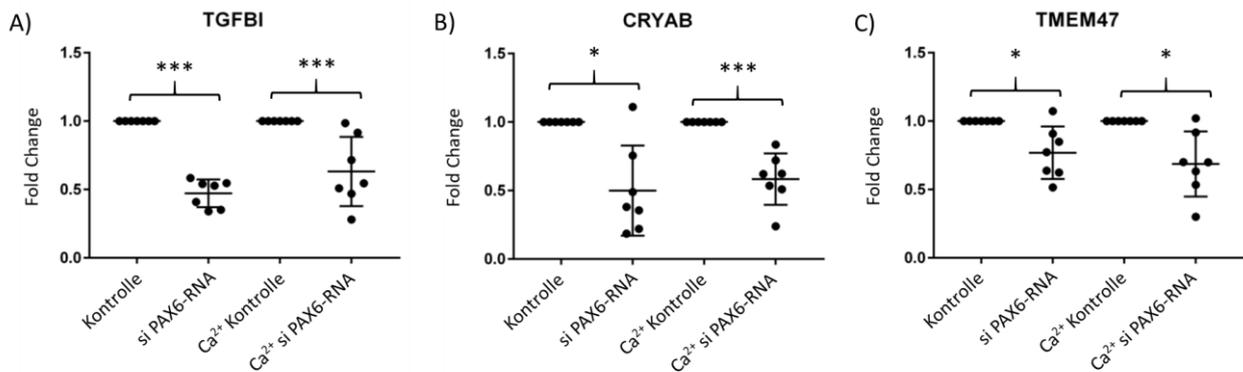


Abbildung 3: Genexpression nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} bei folgenden Markern A) *TGFBI*, B) *CRYAB*, C) *TMEM47*. Das Diagramm zeigt die Fold Change Werte nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* der Proben in Ab- und Anwesenheit von Ca^{2+} in Vergleich zu den Kontrollproben. ***: P-Wert=0,0006 *: P-Wert=0,0169

Nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* war die Genexpression von *TGFBI* in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} signifikant herunterreguliert (P jeweils 0,0006). Die relativen Expressionswerte unter Ca^{2+} -Supplementierung (FC=0,631) zeigten eine größere Streuung im Vergleich zum Versuch in Abwesenheit von Ca^{2+} , wo die mittlere Expressionänderung leicht niedriger (FC=0,472) war (**Abbildung 3**).

Bei *CRYAB* lag der Mittelwert der Genexpressionen leicht höher bei dem Versuch, mit Ca^{2+} im Vergleich zu den Proben ohne Ca^{2+} . Es konnte eine signifikante Herunterregulierung der Genexpression sowohl unter siRNA Behandlung gegen *PAX6* in Abwesenheit von Ca^{2+} (P= 0,0169, FC=0,499), als auch unter siRNA Behandlung gegen *PAX6* in Anwesenheit von Ca^{2+} (P =0,0006, FC =0,586) im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden, wobei die FC-Werte unter Ca^{2+} -Supplementierung weniger stark streuten (**Abbildung 3**).

Bei der siRNA Behandlung gegen *PAX6* zeigte sich für *TMEM47* unter beiden Bedingungen eine signifikante Runterregulierung der Genexpression (P jeweils 0,0169) im Vergleich zur Kontrolle. Dabei lag der Mittelwert in Abwesenheit von Ca^{2+} (FC=0,769) leicht über den Werten des Versuchs in Anwesenheit von Ca^{2+} (FC =0,686) (**Abbildung 3**).

4.3.2 Erniedrigte *EGFL6*, *MITF*, *PAPLN* und *ATF3* Expression nach siRNA Behandlung gegen *PAX6*, nur in Abwesenheit von Ca^{2+}

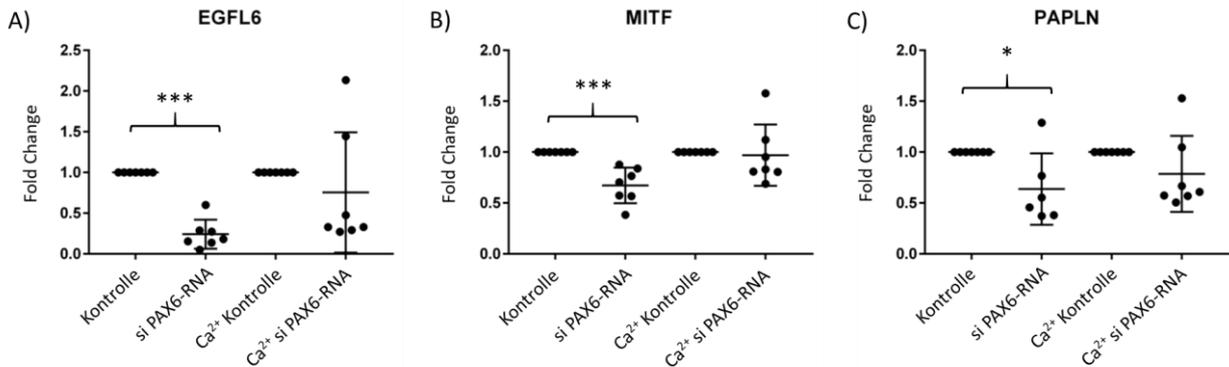


Abbildung 4: Genexpression nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} bei folgenden Markern A) *EGFL6*, B) *MITF*, C) *PAPLN*. Das Diagramm zeigt die Fold Change Werte nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* der Proben in Ab- und Anwesenheit von Ca^{2+} in Vergleich zu den Kontrollproben. ***: P-Wert=0,0006 *: P-Wert=0,0169

Bei *EGFL6* konnten wir eine klare signifikante Herunterregulierung der Genexpression nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* in Abwesenheit von Ca^{2+} im Vergleich zu den Kontrollproben erkennen (P =0,0006, FC=0,242). In Anwesenheit von Ca^{2+} nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* zeigte sich ein Trend zur Herunterregulierung (**Abbildung 4**).

Bei *MITF* nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* und in Abwesenheit von Ca^{2+} fand eine signifikante Herunterregulierung der Genexpression im Vergleich zu den Kontrollproben statt (P =0,0006, FC =0,673). In Anwesenheit von Ca^{2+} streuten die Werte vermehrt im Vergleich zu den Werten der Proben in Abwesenheit von Ca^{2+} . Es konnte kein Trend der Werte der Proben in Anwesenheit von Ca^{2+} nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* im Vergleich zu den Kontrollproben erkannt werden (**Abbildung 4**).

Bei dem *PAPLN* fand eine signifikante Herunterregulierung der Genexpression im Vergleich zu den Kontrollproben in Abwesenheit von Ca^{2+} statt (P =0,0169, FC =0,708). In Anwesenheit von Ca^{2+} konnte ein Trend zur Runterregulierung nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* erkannt werden (**Abbildung 4**).

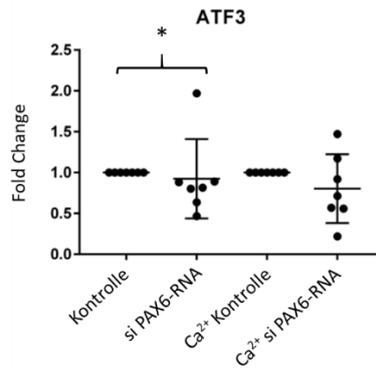


Abbildung 5: Genexpression des Markers ATF3. Das Diagramm zeigt die Fold Change Werte der Proben nach siRNA Behandlung gegen PAX6, in Ab- und Anwesenheit von Ca²⁺ in Vergleich zu den Kontrollproben.

*: P-Wert=0,0169

Bei ATF3 konnte eine signifikante Herunterregulierung der Genexpression im Vergleich zur Kontrolle in Abwesenheit von Ca²⁺ beobachtet werden (P =0,0169, FC =0,924). In Anwesenheit von Ca²⁺ nach siRNA Behandlung gegen PAX6 zeigte sich auch ein Trend zur Herunterregulierung (**Abbildung 5**).

4.3.3 Erniedrigte NTNG1 Expression nach siRNA Behandlung gegen PAX6, nur in Anwesenheit von Ca²⁺

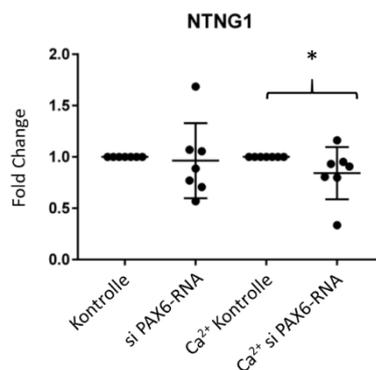


Abbildung 6: Genexpression des Markers NTNG1. Das Diagramm zeigt die Fold Change Werte der Proben nach siRNA Behandlung gegen PAX6, der Proben in Ab- und Anwesenheit von Ca²⁺ in Vergleich zu den Kontrollproben.

*: P-Wert=0,0169

Im Gegensatz zu den Versuchen in Abwesenheit von Ca²⁺ war die NTNG1-Expression in Anwesenheit von Ca²⁺ nach siRNA Behandlung gegen PAX6 signifikant herunterreguliert (P =0,0169, FC =0,842). Die Werte in Abwesenheit von Ca²⁺ nach siRNA Behandlung gegen PAX6 könnten ohne den höchsten

Wert im Vergleich zu den Kontrollproben einen leichten Trend zur Runterregulierung zeigen, jedoch ohne Signifikanz (**Abbildung 6**).

4.3.4 Erhöhte *CCK* und *LRRN1* Expression nach siRNA Behandlung gegen *PAX6*, nur in Abwesenheit von Ca^{2+}

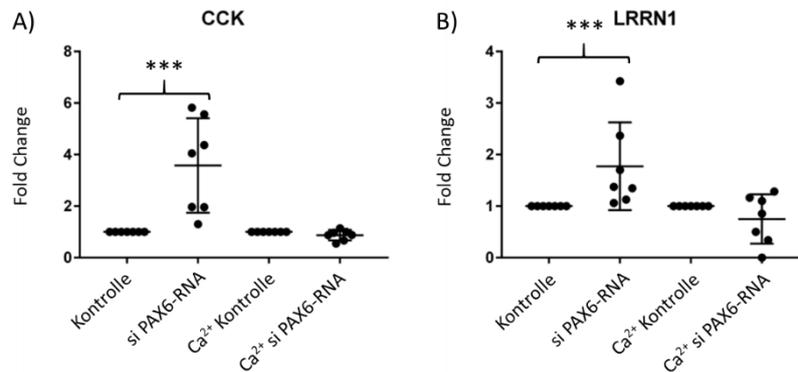


Abbildung 7: Genexpression nach siRNA Behandlung gegen PAX6 in Ab- und Anwesenheit von Ca^{2+} bei folgenden Markern A) CCK und B) LRRN1 Das Diagramm zeigt die Fold Change Werte nach siRNA Behandlung gegen PAX6, der Proben in Ab- und Anwesenheit von Ca^{2+} in Vergleich zu den Kontrollproben.
***: P-Wert=0,0006

Die *CCK*-Expression war signifikant erhöht nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* in Abwesenheit von Ca^{2+} ($P=0,0006$, $FC=3,577$). (**Abbildung 7**).

Bei der *LRRN1*-Expression war ebenfalls nur in Abwesenheit von Ca^{2+} eine signifikante Erhöhung nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* zu beobachten ($P=0,0006$, $FC=1,772$). Eine größere Streuung der Werte der *LRRN1*-Expression war wie bei *CCK* bei den Proben in Abwesenheit von Ca^{2+} nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* erkennbar. In Anwesenheit von Ca^{2+} konnte ein Trend zur Runterregulierung nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* im Vergleich zu den Kontrollproben beobachtet werden, der Unterschied war jedoch nicht signifikant (**Abbildung 7**).

4.3.5 Keine signifikante *SLITRK4*-, *ABI3BP*- und *PXDN*-Expressionsänderung nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* in Ab- und Anwesenheit von Ca^{2+}

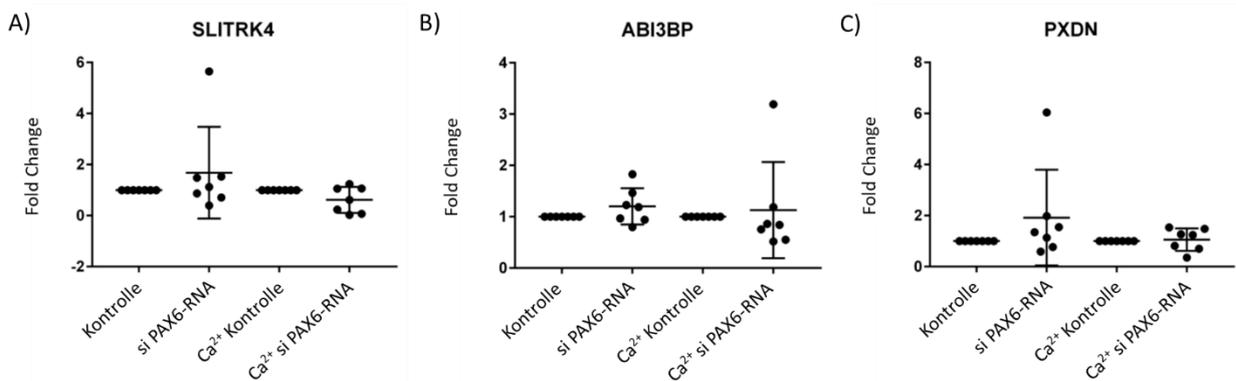


Abbildung 8: Genexpression nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* in Ab- und Anwesenheit von Ca^{2+} bei folgenden Markern A) *SLITRK4*, B) *ABI3BP* und C) *PXDN*. Das Diagramm zeigt die Fold Change Werte nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* der Proben in Ab- und Anwesenheit von Ca^{2+} in Vergleich zu den Kontrollproben.

Bei der *SLITRK4*-Expression konnte einen Trend zur Hochregulierung bei den Werten der Proben in Abwesenheit von Ca^{2+} nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* vermutet werden, wobei die Werte stark streuten. In Anwesenheit von Ca^{2+} nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* fand sich eine weniger starke Streuung und dieses Mal eher einen Trend zur Runterregulierung, aber ohne Signifikanz (**Abbildung 8**).

Bei der *ABI3BP*-Expression zeigten die Werte in Ab- und Anwesenheit von Ca^{2+} nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* einen Trend zur Hochregulierung. Die Streuung der Werte der Proben in Anwesenheit von Ca^{2+} war größer, wobei hier ein Ausreißer bei den Werten der Proben in Anwesenheit von Ca^{2+} den Trend vermutlich beeinflusste (**Abbildung 8**).

Bei der *PXDN*-Expression zeigten die Werte nach der siRNA Behandlung gegen *PAX6* in Abwesenheit von Ca^{2+} eine große Streuung und einen Trend zur Hochregulierung, jedoch ohne Signifikanz. Die Genexpression in den Zellen, die mit Ca^{2+} inkubiert wurden, zeigten nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* eine viel geringere Streuung. Ein Trend zur Hoch- oder Herunterregulierung war nicht erkennbar (**Abbildung 8**).

5. Diskussion

5.1 Interpretation des Einflusses von Ca^{2+} bei den Kontrollproben

Die Unterschiede zwischen Zellkulturen in Ab- und Anwesenheit von Ca^{2+} könnten darauf hindeuten, dass *PAX6* je nach Differenzierungsgrad der Zellen anders auf die Zielgene wirkt. Dies sind jedoch nur erste Anhaltspunkte, da die Genexpression isoliert betrachtet, aufgrund der komplexen Signalwege schwierig zu interpretieren ist. Es gibt aber auch Transkripte (mRNAs) die stabil unter allen Bedingungen beeinflusst werden, unabhängig vom Differenzierungsgrad, also vom Ca^{2+} -Einfluss (wie z.B. *TGFBI*).

5.2 Interpretation der Ca^{2+} abhängigen Genexpressionsänderungen

5.2.1 Genexpressionen die in Anwesenheit von Ca^{2+} eine signifikante Änderung erwiesen

NTNG1

Die mRNA-Expression von *NTNG1* wurde als einzige nur bei den differenzierteren Zellen (in Anwesenheit von Ca^{2+}) bei gleichzeitiger siRNA Behandlung gegen *PAX6* signifikant runterreguliert ($P = 0,0169$).

Die Expressionswerte streuten jeweils in Ab- und Anwesenheit von Ca^{2+} stark. Des Weiteren war der Fold Change mit 0,907 nicht besonders stark verändert. Insofern stellt sich die Frage, ob der Trend zur Herunterregulation der *NTNG1*-Expression nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* auch eine biologische Relevanz aufweist.

NTNG1 reguliert das Nervenzellwachstum, ist aber auch bei der Zell-Zell-Adhäsion von Bedeutung, da *NTG1* in der Zellmembran lokalisiert ist [56]. Da die Zell-Zell-Adhäsion in den Hornhautepithelzellen von Bedeutung ist, könnte eine Genexpression des *NTNG1* vermutlich in den differenzierten Zellen stärker sein als in den undifferenzierten, stammzellähnlichen Zellen. *NTNG1* ist bei den Patienten sowohl in den Limbusepithelzellen als auch in den Bindehautzellen herunterreguliert [39,40]. In Bezug auf das Nervenzellwachstum ist erwähnenswert, dass Aniridie Patienten auch weniger Nerven in der Hornhaut aufweisen [42]. *NTNG1* sollte vielleicht auch im Hinblick des Nervenphänotyps bei Aniridie-Patienten genauer untersucht werden.

5.2.2 Genexpressionen die in Abwesenheit von Ca^{2+} eine signifikante Änderung erwiesen

Bei *ATF3*, *EGFL6* und *MITF* streuen die Werte der Genexpressionen mehr unter siRNA Behandlung gegen *PAX6* bei den Zellkulturen in Anwesenheit von Ca^{2+} als in den Zellkulturen, die ohne Ca^{2+} kultiviert wurden. Bei *PAPLN* ist kein größerer Unterschied zwischen den Streuungen zu erkennen.

ATF3

Die *ATF3*-Expression wies in unseren Versuchen eine signifikante Herunterregulation in den Proben in Abwesenheit von Ca^{2+} auf. Bei den differenzierten Zellen (in Anwesenheit von Ca^{2+}) kann man einen ähnlichen Trend zur Herunterregulierung beobachten.

ATF3 spielt eine Rolle bei der Proliferation der Limbusepithelzellen und fungiert als Transkriptionsfaktor. Es ist darüber hinaus auch im sogenannten Ca^{2+} -CREB (cAMP-response element-binding) Signalweg involviert, dessen Rolle sich im Rahmen der Neuroprotektion abspielt [1]. Es ist gut möglich, dass *PAX6* eher in undifferenzierten Zellen (ohne Ca^{2+} Zugabe) einen Einfluss auf die *ATF3*-Expression hat und sich die *ATF3*-Expression in differenzierten Zellen später durch andere Einflüsse unabhängig von *PAX6* stabilisiert. Eine andere Möglichkeit der Unterschiede des *PAX6* Knockdowns zwischen den Zellen ohne Ca^{2+} und Zellen mit Ca^{2+} , ist der Einfluss von Ca^{2+} direkt auf *ATF3* im Rahmen des Ca^{2+} -CREB Signalwegs. Der Fold Change von 0,8 zeugt ebenfalls von einem sehr geringen Einfluss von *PAX6* auf die Genexpression der Versuchszellen. In den Patientenzellen war die *ATF3*-Expression zudem hochreguliert und nicht herunterreguliert. Eventuell sind die im Patienten beobachteten Effekte auf eine längerfristige Deregulation durch *PAX6* zurückzuführen, sodass sich die Regulation mit der Zeit umgekehrt verhält.

Eine veränderte *ATF3*-Expression könnte eine beeinträchtigte Funktion der Limbusstammzellen erklären, insbesondere bei der Wundheilung. Die Mechanismen zur Entwicklung der Aniridie-assoziierte Keratopathie im Rahmen einer *PAX6*-assoziierte Aniridie lassen sich durch den kurzfristigen *PAX6* siRNA Knockdown möglicherweise nur unzureichend erklären.

EGFL6

Bei *EGFL6* fand sich eine eindeutige signifikante Herunterregulation der Genexpression bei den undifferenzierten Zellen (in Abwesenheit von Ca^{2+}). In Anwesenheit von Ca^{2+} haben zwei der fünf Proben keine Herunterregulation gezeigt, sodass insgesamt keine Regulation für diese Bedingung zu beobachten war.

In der Literatur wird viel mehr die Rolle des *EGFL6* bei der Regulierung des Zellzyklus, -proliferation und -entwicklung beschrieben, als eine Rolle bei bereits differenzierten Zellen [56]. So liegt es nahe, dass es in den undifferenzierten Zellen eine größere Rolle als in differenzierten Zellen spielt. Das würde erklären, warum sich der *PAX6*-Effekt verstärkt und einheitlich auf die Zellkulturen in Abwesenheit von Ca^{2+} im Vergleich zu den Zellkulturen in Anwesenheit von Ca^{2+} auswirkt.

Andererseits beinhaltet das von *EGFL6* erzeugte Protein eine Ca^{2+} bindende Domäne. Ca^{2+} ist in zahlreichen Zellsignalwege involviert. Ein Zusammenhang zwischen *EGFL6* und Ca^{2+} wurde in der Literatur noch nicht beschrieben

MITF

Bei *MITF* zeigt sich unter *PAX6*-Knockdown bei den undifferenzierten Zellen ein signifikante Herunterregulation der Genexpression. Bei den differenzierten Zellen (in Anwesenheit von Ca^{2+}) erwies sich die Genexpression als nicht signifikant verändert, folgte aber dem gleichen Trend.

MITF weist eine Rolle bei der Melanogenese der Netzhaut aber auch der Iris nach, was den Zusammenhang zur Aniridie darstellt. Darüber hinaus spielen die Melanozyten eine Schlüsselrolle bei der Hilfe zur Kontrolle der Homöostase der Stammzellnische des Limbus [52]. Eine Studie besagt, dass unter anderen ein möglicher Einfluss von *PAX6* auf die Melanogenese als Ursache für eine pathologische Veränderung der Augenoberfläche in Frage kommen kann [53]. Eine Regulierung des *EGFL6* durch *PAX6* erscheint, dem Ergebnis nach, als wahrscheinlich. Durch ein *PAX6*-Knockdown erreicht man eine Unterexpression des *EGFL6*, was wiederum zu fehlender Melanogenese und Defekte in der Iris sowie der Augenoberfläche und des Pigmentepithel der Retina führt [53][7].

Ein Zusammenhang von Defekten des *MITF*-Gens und Mikroophthalmie wurde ebenfalls beschrieben. In einer Studie wurde besagt, dass die Mikroophthalmie auch mit Störungen der Homöostase des Hornhautepithels in Zusammenhang gebracht werden kann [15]. Das impliziert eine Störung der Funktion der Limbusstammzellen. Ein Zusammenhang zwischen *PAX6* und *MITF*, dass eine Rolle bei der Limbusstammzellfunktion spielt, sollte im Rahmen einer Aniridie-assoziierte Keratopathie in Betracht gezogen werden. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Funktion von *MITF* besser in undifferenzierteren Zellen untersucht werden sollte.

PAPLN

Die Ergebnisse ergaben beim *PAPLN* eine signifikante Herunterregulierung der Genexpression nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* in den undifferenzierten Zellen (in Abwesenheit von Ca^{2+}). Bei den differenzierten Zellen konnte man eine Tendenz zur Herunterregulation von *PAPLN* erkennen.

PAPLN kodiert für ein Protein, das beim Aufbau der extrazellulären Matrix seine Funktion ausübt. Sie bilden einen Teil der Proteoglykane die in der extrazellulären Matrix des Hornhautstromas zu finden sind. Die Proteoglykane sind in der Lage die Struktur und Funktionen der Kollagenfibrillen zu ändern [46]. Es ist demnach eine relativ gleiche *PAPLN*-Expression in den differenzierten als auch in den undifferenzierten Zellen ohne *PAX6*-Knockdown zu erwarten, da die Proteoglykane der Hornhaut überall in der extrazellulären Matrix vorkommen sollten, um deren Integrität zu gewährleisten. Diese Hypothese stellt somit einen Anhaltspunkt für weitere Studien dar.

Ein Merkmal der Keratopathien, die durch *PAX6*-assoziierte Aniridie hervorgerufen werden können, ist eine veränderte Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, durch die eine pathologisch veränderte Struktur der Hornhaut hervorgerufen werden könnte [43,60]. Es wäre sinnvoll, in weiteren Versuchen den *PAX6*-Einfluss auf *PAPLN* in Zellkulturen, die ohne zusätzliches Ca^{2+} kultiviert werden, zu bestätigen. Auch wenn der Einfluss von Ca^{2+} auf die limbalen Epithelzellen keinen signifikanten Effekt zeigte (FC =0,6), könnte in weiteren Experimenten mit einer größeren Anzahl untersucht werden, ob der Effekt eine biologische Relevanz haben könnte

5.2.3 Interpretation der Genexpressionsänderungen die in Abwesenheit von Ca^{2+} eine signifikante Hochregulierung erwiesen

Anders als von den Patientendaten zu erwarten war, wurden zwei Gene nicht herunterreguliert, sondern hochreguliert. Dies war jedoch nur bei den undifferenzierten Zellen der Fall. Anders als die oben analysierten Gene, zeigt sich bei *CCK* und *LRRNI*, bei den undifferenzierten Zellen (ohne Ca^{2+}), eine sehr hohe Streuung der Werte.

CCK

CCK zeigt in den Ergebnissen keine signifikante Änderung der Genexpression bei den differenzierten Zellen (mit Ca^{2+}) nach der siRNA Behandlung gegen *PAX6*, dafür aber eine signifikante Hochregulation bei den undifferenzierten Zellen (ohne Ca^{2+}). Der Mittelwert der FC-Werte ist nahezu vierfach höher als bei der Kontrolle.

In einer anderen Studie wurde bereits ein Zusammenhang von *PAX6* mit *CCK+* Nervenzellen hergestellt [13], allerdings ist der Mechanismus noch nicht ausreichend verstanden. In unseren Versuch wurden Gene getestet, dessen genauer Zusammenhang mit der *PAX6* assoziierten Aniridie noch unklar ist, allerdings konnten unsere Experimente ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen *PAX6* und *CCK*-Expression im Rahmen der *PAX6*-assoziierte Aniridie bestätigen.

LRRNI

LRRNI zeigte ein ähnliches Ergebnis wie *CCK*: keine signifikante Änderung der Genexpressionen zwischen den Kontrollzellen und den mit si*PAX6* RNA behandelten Zellen im differenzierten Zustand (mit Ca^{2+}). Bei den undifferenzierten Zellen (ohne Ca^{2+}) zeigten die Werte eine Hochregulation der *LRRNI*-Expression nach *PAX6*-Knockdown. Die Änderung war statistisch hochsignifikant ($P=0,0006$), bei einem Fold Change von 1,772 bei *LRRNI*, jedoch nicht so stark erhöht wie bei *CCK* ($\text{FC}=3,577$). Bei den differenzierten Zellen zeigte sich ein Trend zur Herunterregulierung.

Defekte im *LRRNI*-Gen wurden unter anderem bei kornealen Dystrophien und Keratokonus nachgewiesen. Da ein Defekt bei diesem Gen zu pathologischen Veränderungen der Hornhaut führen kann, wäre es möglich, dass die erhöhte Expression zu einer Veränderung der Hornhaut bei AAK führen könnte

Interessanterweise ist *LRRNI* nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* in Abwesenheit von Ca^{2+} signifikant hochreguliert während es in Anwesenheit von Ca^{2+} zu einer Herunterregulation tendiert. Ein möglicher *PAX6* Einfluss auf *LRRNI* scheint in den differenzierten Zellen geringer zu sein.

Im Anbetracht der Ergebnisse ist ein *PAX6* Einfluss auf *CCK* und *LRRNI* in den undifferenzierten Zellen wahrscheinlich. In den vorherigen Studien wurde eine Herunterregulierung von *CCK* und *LRRNI* in den Bindehautzellen und in den Limbusepithelzellen beobachtet [40]. Die Ergebnisse stehen also nicht zwingend im Widerspruch zu den Patientendaten. Die Ergebnisse müssen allerdings kritisch betrachtet werden, da in unseren Versuchen auch keine signifikante Änderung bei den differenzierten (hornhautähnlichen) Epithelzellen nachgewiesen wurden. Die Werte bei der *LRRNI*-Expression zeigten zwar einen Trend zur Runterregulierung, die Experimente allein stellten aber keinen ausreichenden Beweis für ein *PAX6*-Einfluss auf die Expression von *LRRNI* und *CCK* dar.

Möglicherweise werden *CCK* und *LRRNI* durch andere Einflüsse beim Patienten herunterreguliert. Diese Einflüsse können zum Beispiel unter anderen Langzeitfolgen des *PAX6* Knockdowns sein. In unseren Versuch waren die Zellkulturen nur 48 Stunden der Behandlung ausgesetzt, weitere dazwischen geschaltete Signalwege und Entzündungslangzeitfolgen konnten in diesen Experimenten nicht nachgebildet werden.

5.3 Interpretation der Ca²⁺ unabhängigen Genexpressionsänderungen

5.3.1 Interpretation der signifikanten Genexpressionsänderungen

CRYAB

In unseren Versuchen waren die Genexpressionsänderungen des *CRYAB* unabhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* signifikant herunterreguliert. Die Signifikanz war bei den differenzierten Zellen höher als bei den undifferenzierten, obwohl der Fold Change höher war.

Das *CRYAB* kodiert für ein Protein, das wichtig für die Transparenz und Refraktion der Augenlinse ist. Wir haben schon früher in der Arbeit erläutert, dass die Aniridie-assoziierte Keratopathie mit einer Hornhauttrübung einhergeht, der Bezug zu *CRYAB* wird hier deutlich. Darüber hinaus weist es eine Chaperon-Funktion auf, die wiederum zum Schutz von Aggregation verschiedene Proteine dient. *PAX6* könnte, unseren Ergebnissen nach, einen Einfluss auf *CRYAB* unabhängig vom Differenzierungsgrad haben, also sowohl in den limbalen Epithelzellen als auch bei beginnender Differenzierung in Anwesenheit von Ca²⁺, was funktionelle Studien erleichtern würde.

TGFBI

Die *TGFBI*-Expression wies in unseren Ergebnissen eine höchst signifikante Herunterregulation nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* auf, und zwar unter beiden Differenzierungsgraden (mit und ohne Ca²⁺). Zu beobachten war eine größere Streuung der Expressionswerte bei den Zellen, die einen höheren Differenzierungsgrad aufwiesen als in den Zellkulturen, die kein zusätzliches Ca²⁺ erhielten. Der mittlere FC-Wert war bei den undifferenzierten Zellen niedriger als bei den differenzierten, das heißt, dass die Genexpression in den undifferenzierten stammzellähnlichen Kulturen stärker auf dem *PAX6*-Knockdown reagiert haben.

Das *TGFBI* kodiert für ein Protein, das zur Querverbindung der Kollagene I, II und IV beiträgt. Die *TGFBI* kodierten Proteine befinden sich in dem Extrazellulärraum der Hornhautepithelzellen [17]. Wenn das *TGFBI*, wie unseren Ergebnissen es denken lassen, durch *PAX6* reguliert wird, würde eine Funktionsstörung oder Knockdown von *PAX6* über das *TGFBI* zu einem Defekt der Kollagenverbindung im Extrazellulärraum der Hornhautepithelzellen führen. Im Rahmen einer *PAX6*-Assoziierte Aniridie könnte es somit einen Beitrag zur Entstehung der Aniridie-assoziierten Keratopathie (AAK) leisten.

TMEM47

In beiden Zelldifferenzierungsgraden wies die *TMEM47*-Expression eine signifikante Herunterregulation nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* auf. Bei den undifferenzierten Zellen (ohne Ca^{2+}) war der FC-Wert etwas höher als in den differenzierten Zellen, was möglicherweise auf eine geringere Empfindlichkeit von *TMEM47* auf die siRNA Behandlung gegen *PAX6* in der Zellkultur hindeuten könnte.

TMEM47 spielt eine Schlüsselrolle im Rahmen der Zell-Zell-Verbindungen [14], diese sind in der Hornhaut von äußerster Bedeutung, um dessen Barrierefunktion aufrecht zu erhalten. In unseren Versuchen ließ sich auf einen möglichen Einfluss von *PAX6* auf *TMEM47* unabhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen rückschließen. Ein möglicher Zusammenhang mit der *PAX6*-Aniridie könnte so erklärt werden, dass es durch einen *PAX6*-Funktionsverlust zu einer Herunterregulierung des *TMEM47* kommt, was wiederum in einen Defekt der Transition von Zell-Adhärenz zu Tight-Junctions resultiert und so zu einem Funktionsverlust der Hornhautbarriere und zur Keratopathie führen könnte (in diesem Fall AAK). In einer Studie von Davis et al. wurde ebenfalls die Rolle von *PAX6* bei der Zell-Adhäsionen beschrieben: bei Verminderung dessen Genexpression, bewirkt es eine Abnahme der Adhäsionen, was wiederum negative Auswirkungen auf den Hornhautepithel hat [12].

5.3.2 Interpretation der unveränderten Genexpressionen

ABI3BP

Beim *ABI3BP* ergab sich in keinem der Versuche eine signifikante Genexpressionsänderungen, lediglich ein leichter Trend zur Hochregulierung konnte bei den undifferenzierten Zellen, nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* beobachtet werden. Daraus können wir schließen, dass *PAX6* wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Regulierung dieses Gens aufweist.

SLITRK4

Es gab keine signifikante *SLITRK4* Genexpressionsänderung in unseren Versuchen. Die meisten FC-Werte waren relativ stabil um den normalisierten Kontrollwerten der jeweiligen Differenzierungsgrade. Dazu muss man erwähnen, dass die Werte bei *PAX6*-Knockdown bei den differenzierten Zellen weniger streuten als bei den undifferenzierten Zellen. Rückschließend kann man sagen, dass die Regulierung dieses Gen durch *PAX6* eher auszuschließen ist. Die Ursache, die dazu führt, dass *SLITRK4* bei Aniridie-erkrankten Bindehautzellen runterreguliert war [40], ist möglicherweise eine indirekte Wirkung der *PAX6*-Haploinsuffizienz.

PXDN

Die Ergebnisse zeigten keine signifikante Hoch- oder Herunterregulation der *PXDN*-Expression. Zu erkennen war trotzdem eine starke Streuung der Werte bei den undifferenzierten Zellen (ohne Ca²⁺) nach *PAX6*-Knockdown. Es zeigte sich aber anders als erwartet ein Trend zur Hochregulierung mit einem FC von 1,918 der jedoch nicht statistisch signifikant war.

Bei den differenzierten Zellen (mit Ca²⁺) fand sich kein Trend zur Hoch- oder Herunterregulierung der Genexpression. *PXDN* kodiert für Peroxidasin, das eine Rolle bei dem Aufbau der extrazellulären Matrix spielt, Veränderungen in diesem Gen konnten bei ASD (Anterior Segment Dysgenesis) gefunden werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass eine Herunterregulierung der Genexpression des *PXDN* bei Aniridie zu einer pathologischen Veränderung der Hornhaut führt. Aufgrund der in unseren Versuchen erhobenen Daten hat *PAX6* wahrscheinlich keinen Einfluss auf dieses Gen. Die Herunterregulierung der Genexpression von *PXDN* muss also beim Aniridie-erkrankten Patienten durch andere Faktoren hervorgerufen werden, oder lassen sich mit den getesteten Kulturbedingungen nicht nachstellen.

5.4 Zusammenfassung nach der Systematik der Gene bzw. dessen Transkripte

Funktion der Gene	Marker	Fold Change		P Wert	
		Ohne Ca ²⁺	Mit Ca ²⁺	Ohne Ca ²⁺	Mit Ca ²⁺
Stammzell- und Differenzierungsmarker	<i>EGFL6</i>	0,242	0,754	0,0006	0,1801
	<i>MITF</i>	0,673	0,970	0,0006	0,1801
Strukturproteine	<i>TGFBI</i>	0,472	0,631	0,0006	0,0006
	<i>CRYAB</i>	0,499	0,586	0,0169	0,0006
	<i>NTNG1</i>	0,964	0,842	0,6900	0,0169
	<i>PAPLN</i>	0,708	0,786	0,0291	0,1801
	<i>LRRN1</i>	1,772	0,750	0,0006*	0,6900
	<i>PXDN</i>	1,918	1,058	0,1801	0,6900
	<i>ABI3BP</i>	1,203	1,130	0,6900	0,1801
	<i>SLITRK4</i>	1,679	0,615	0,6900	0,6900
Andere Funktion	<i>TMEM47</i>	0,769	0,686	0,0169	0,0169
	<i>ATF3</i>	0,924	0,804	0,0169	0,1801
	<i>CCK</i>	3,577	0,872	0,0006*	0,1801

Tabelle 25 : Untersuchte mRNA-Expression nach ihrer Funktion aufgeteilt. Für jeden Marker ist der P-Wert der Proben nach siRNA Behandlung gegen PAX6 im Vergleich zur Kontrolle in Ab- und Anwesenheit von Ca²⁺ aufgeführt. Mit einen „“ markierte P-Werte, kennzeichnen eine Hochregulierung im Gegensatz zu den nicht markierten.*

Dieser Tabelle (**Tabelle 25**) kann man entnehmen, dass das *EGFL6* und *MITF*, also Stammzell- und Differenzierungsmarker, eine hochsignifikante Herunterregulierung in den Zellen in Abwesenheit von Ca²⁺, den undifferenzierten Zellen aufwies. Wir haben somit ein Anhaltspunkt, dass *PAX6* möglicherweise nur einen Einfluss auf *MITF* und *EGFL6* hat, wenn diese in den Limbusstammzellen ihre Rolle ausüben. Das könnte in weiteren Studien eventuell auch mit anderen Stammzell- und Differenzierungsmarkern erforscht werden. Warum beim Patienten eine Herunterregulierung bei den höheren Differenzierungsgrad (hornhautähnlich) vorliegt, muss ebenfalls weiter untersucht werden.

Bei den Genen, die für Strukturproteine kodieren, kann *PAX6* einen Einfluss auf die einzelnen Transkripte, je nach Lokalisation der Strukturproteine (manche in der extrazellulären Matrix wie *TGFBI*, andere im Nervensystem wie *NTNG1*) haben. Demnach ist kein klarer Zusammenhang zu erkennen.

Spezifische Merkmale der Transkripte	Marker	Fold Change		P-Wert	
		Ohne Ca ²⁺	Mit Ca ²⁺	Ohne Ca ²⁺	Mit Ca ²⁺
Angiogenese	<i>EGFL6</i>	0,242	0,754	0,0006	0,1801
Melanogenese	<i>MITF</i>	0,673	0,970	0,0006	0,1801
Transparenz/Refraktion der Linse	<i>CRYAB</i>	0,499	0,586	0,0169	0,0006
Nervensystem assoziiert	<i>NTNG1</i>	0,964	0,842	0,6900	0,0169
	<i>ATF3</i>	0,924	0,804	0,0169	0,1801
	<i>CCK</i>	3,577	0,872	0,0006*	0,1801
	<i>LRRN1</i>	1,772	0,750	0,0006*	0,6900
	<i>ABI3BP</i>	1,203	1,130	0,6900	0,1801
	<i>SLITRK4</i>	1,679	0,615	0,6900	0,6900
Aufbau der extrazellulären Matrix	<i>TGFBI</i>	0,472	0,631	0,0006	0,0006
	<i>PAPLN</i>	0,708	0,786	0,0291	0,1801
	<i>PXDN</i>	1,918	1,058	0,1801	0,6900
Zell-Zell-Verbindung	<i>TMEM47</i>	0,769	0,686	0,0169	0,0169

Tabelle 26 : Untersuchte mRNA-Expression nach ihrer spezifischen Funktion aufgeteilt. Für jeden Marker wird den P-Wert der Proben nach siRNA Behandlung gegen PAX6 im Vergleich zur Kontrolle in Ab- und Anwesenheit von Ca²⁺ aufgeführt. Mit einen „“ markierte P-Werte, kennzeichnen eine Hochregulierung im Gegensatz zu den nicht markierten.*

Allein ein Zusammenhang der beiden hochregulierten, Nervensystem assoziierten, *LRRN1*- und *CCK*-Genexpressionen lässt sich anhand dieser Tabelle beobachten (**Tabelle 26**). Anders als in Patienten (Bindehautzellen?), sind die Genexpressionen in unseren *in vitro* Versuchen bei den Zellen mit einem niedrigeren Differenzierungsgrad, nach siRNA Behandlung gegen *PAX6*, hochreguliert. Es muss jedoch erwähnt werden, dass sich die beiden Gene anders als die übrigen Nervensystem-assoziierte Gene verhalten. Wie bei der vorherigen Aufteilung schon angedeutet, kann *PAX6* auf einzelne Transkripte unter Ca²⁺ Behandlung einen Einfluss haben, die beobachteten Transkripte unterscheiden sich aber weiter nicht nur nach Ihrer Funktion, sondern nach ihrer Lokalisation. Unter anderem üben *NTNG1* und *CCK* beide eine Funktion im Nervensystem aus, das Transkript von *NTNG1* übt seine Rolle als Strukturprotein aus, während das Transkript von *CCK* als sekretorisches Protein fungiert. Es lässt sich deswegen kein weiterer systematischer Zusammenhang im Anbetracht der alleinigen spezifischen Funktion der Gentranskripte rückschließen.

Lokalisierung der Transkripte	Marker	Fold Change		P Wert	
		Ohne Ca ²⁺	Mit Ca ²⁺	Ohne Ca ²⁺	Mit Ca ²⁺
Adhärenz-Junction	<i>TMEM47</i>	0,769	0,686	0,0169	0,0169
Basalmembran	<i>EGFL6</i>	0,242	0,754	0,0006	0,1801
Extrazelluläre Matrix	<i>PXDN</i>	1,918	1,058	0,1801	0,6900
Cytoplasma/Cytosol	<i>CRYAB</i>	0,499	0,586	0,0169	0,0006
	<i>MITF</i>	0,673	0,970	0,0006	0,1801
Nukleus	<i>ATF3</i>	0,924	0,804	0,0169	0,1801
	<i>CRYAB</i>	0,499	0,586	0,0169	0,0006
	<i>MITF</i>	0,673	0,970	0,0006	0,1801
Zellmembran	<i>LRRN1</i>	1,772	0,750	0,0006*	0,6900
	<i>NTNG1</i>	0,964	0,842	0,6900	0,0169
	<i>SLITRK4</i>	1,679	0,615	0,6900	0,6900
	<i>TMEM47</i>	0,769	0,686	0,0169	0,0169
Extrazellulär/sekretorisch	<i>ABI3BP</i>	1,203	1,130	0,6900	0,1801
	<i>CCK</i>	3,577	0,872	0,0006*	0,1801
	<i>CRYAB</i>	0,499	0,586	0,0169	0,0006
	<i>PAPLN</i>	0,708	0,786	0,0291	0,1801
	<i>TGFBI</i>	0,472	0,631	0,0006	0,0006

Tabelle 27 : Untersuchte mRNA-Expression nach der Lokalisierung dessen Transkripte aufgeteilt. Für jeden Marker wird den P-Wert der Proben nach siRNA Behandlung gegen PAX6 im Vergleich zur Kontrolle in Ab- und Anwesenheit von Ca²⁺ aufgeführt. Mit einen „“ markierte P-Werte, kennzeichnen eine Hochregulierung im Gegensatz zu den nicht markierten.*

Aus dieser Tabelle (**Tabelle 27**) kann man entnehmen, dass die Gene, dessen Transkripte sich im Nukleus befinden, also *ATF3*, *CRYAB* und *MITF*, in den Zellen, die einen niedrigeren Differenzierungsgrad haben, eine signifikante Herunterregulierung der Genexpression nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* aufweisen. In zukünftigen Versuchen könnten diese Gene unter denselben Konditionen weiter erforscht werden, eventuell auch zusammen mit anderen Genen, dessen Transkripte sich im Nukleus der Zellen befinden, um den Einfluss von *PAX6* auf diese bei undifferenzierten Zellen zu bestätigen. Die *CRYAB*-Expression ist im Gegensatz zu den anderen Genen auch in Zellen mit höherem Differenzierungsgrad signifikant unter siRNA Behandlung gegen *PAX6* herunterreguliert, seine Transkripte befinden sich aber nicht nur im Nukleus, sondern auch im Zytoplasma und extrazellulär. Weitere Versuche könnten dann auf das spezifische Transkript, das sich im Nukleus befindet, fokussieren und Aussagen darüber treffen, ob *PAX6* nur auf diese spezifischen Transkripte bei den undifferenzierten Zellen einen Einfluss hat, oder ob es doch auch in weiter differenzierten Zellen einen Einfluss zeigt.

5.5 Vergleich unserer Ergebnisse zu den Daten der Patientenbindehautzellen

Gene die beim Patienten eine verminderte mRNA-Expression aufwiesen	Verhalten der Genexpression <i>in vitro</i>	
	Ohne Ca ²⁺	Mit Ca ²⁺
<i>ABI3BP</i>	Keine Veränderung	Keine Veränderung
<i>CCK</i>	Signifikante Hochregulierung	Keine Veränderung
<i>CRYAB</i>	Signifikante Herunterregulierung	Signifikante Herunterregulierung
<i>EGFL6</i>	Signifikante Herunterregulierung	Keine Veränderung
<i>LRRN1</i>	Signifikante Hochregulierung	Keine Veränderung
<i>NTNG1</i>	Keine Veränderung	Signifikante Herunterregulierung
<i>PAPLN</i>	Signifikante Herunterregulierung	Keine Veränderung
<i>SLITRK4</i>	Keine Veränderung	Keine Veränderung
<i>TGFBI</i>	Signifikante Herunterregulierung	Signifikante Herunterregulierung
<i>TMEM47</i>	Signifikante Herunterregulierung	Signifikante Herunterregulierung

Tabelle 28 : Vergleich der Ergebnisse der mRNA-Expression der getesteten Gene, die beim Patienten in der Bindehaut und in der Limbusepithelzellen herunterreguliert waren. Ergebnisse der Experimente in Ab- und Anwesenheit von Ca²⁺ sind dargestellt. [40]

Gene die beim Patienten eine erhöhte Expression aufwiesen	Verhalten der Genexpression <i>in vitro</i>	
	Ohne Ca ²⁺	Mit Ca ²⁺
<i>ATF3</i>	Signifikante Herunterregulierung	Keine Veränderung
<i>MITF</i>	Signifikante Herunterregulierung	Keine Veränderung
<i>PXDN</i>	Keine Veränderung	Keine Veränderung

Tabelle 29 : Vergleich der Ergebnisse der mRNA-Expression der getesteten Gene, die beim Patienten, in der Bindehaut hochreguliert waren. [40]

Wie im Ergebnis-Teil bereits beschrieben, waren die Genexpressionen von *CRYAB*, *TGFBI* und *TMEM47* die einzigen, die sich in unseren *in vitro* Versuchen, in Ab- und Anwesenheit von Ca²⁺, nach siRNA Behandlung gegen *PAX6*, in derselben Weise wie in den Patientenzellen verhalten haben (Tabelle 28). Daraus lässt sich schließen, dass *PAX6* einen Einfluss auf die Genexpression dieser Gene zeigt, unabhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen.

Bei den Genen, die eine signifikante Änderung der mRNA-Expression entweder in Ab- oder Anwesenheit von Ca^{2+} gezeigt haben, ist ein *PAX6* Einfluss nicht zwingend auszuschließen. Die qPCR-Versuche wurden mit Proben von nur sieben unterschiedlichen Spendern durchgeführt. Obwohl bei manchen Genexpressionen eine Tendenz erkennbar war, zeigten die Werte eine hohe Streuung. Diese würde sich durch eine erhöhte Anzahl an Durchläufe in weiteren Arbeiten eventuell vermindern und eine signifikante Änderung aufzeigen. Diese Aussage ist aber rein hypothetisch und stellt nur einen Anhaltspunkt für weitere Arbeiten.

CCK, *ATF3*, *LRRN1* und *MITF* zeigen zwar eine signifikante Änderung der Genexpression nach siRNA Behandlung gegen *PAX6* in undifferenzierten limbalen Epithelzellen, diese ist jedoch in entgegengesetzter Ausrichtung als in den Patientenzellen (**Tabellen 28-29**) [40] Zitation. Diese Zellen sind nahe den Limbusstammzellen, nicht aber denen der Hornhaut-Epithelzellen und Bindehaut-Epithelzellen, die als Patientenproben entnommen wurden. Diese Ergebnisse stehen also nicht zwingend im Widerspruch zu den Patientendaten. Der Stammzellcharakter dieser Zellen kann eine Auswirkung auf die Genexpression haben, die in dieser Studie nicht untersucht wurden. Eine komplexe Verschaltung könnte dabei auftreten, die eine Adaptation beim Patienten, eine Langzeitfolge, oder Folge von Komplikationen der Erkrankung mit sich ziehen würde, und damit eine indirekte Wirkung einer *PAX6*-Haploinsuffizienz hätte.

Bei den Genen, die keine signifikante Änderung der mRNA-Expression gezeigt haben, gilt das gleiche wie bei den Genen, die bei nur in einer von den zwei Bedingungen eine Änderung der mRNA-Expression aufwiesen. Zwar erscheint nach den hier gewonnenen Ergebnissen ein *PAX6*-Einfluss als unwahrscheinlich, es ist aber nicht zwingend ausgeschlossen. Manche zeigten Tendenzen zur Hoch- oder Herunterregulierung, teilweise auch unterschiedliche Trends in beiden Bedingungen. Den genauen Zusammenhang diese Gene mit der Aniridie ist noch weitgehend unerforscht und es lohnt sich, auf die Anhaltspunkte, die in dieser Arbeit generiert wurden, in weiteren Experimenten weiter aufzubauen.

5.6 Schlussfolgerung

Unsere Ergebnisse zeigen, dass nicht alle mRNA-Expressionen der Gene sich so wie erwartet verhalten haben. Die genaue Beziehung der Gentranskripte zu Aniridie ist noch nicht bekannt und diese Arbeit stellt ein Versuch dar, diese Frage zu beantworten. Die analysierten limbalen Epithelzellen in verschiedenen Differenzierungsgraden sollten eine gewisse Ähnlichkeit zu Patientenzellen aufweisen. Es sind aber vereinfachte Versionen des tatsächlichen Aniridie-Zellmodells und es fehlen de facto auch verschiedene Faktoren, die Einfluss auf die analysierten mRNA-Expressionen der Gene aufweisen könnten.

In unseren Versuchen wurde Ca^{2+} verwendet, um den Differenzierungsgrad der Zellen in der Höhe zu treiben. Da die Beziehung der verschiedenen Gene mit Ca^{2+} nicht immer bekannt ist, war möglicherweise der Effekt der Ca^{2+} Behandlung stärker als der Effekt der siRNA Behandlung gegen *PAX6*. Das könnte man dem Unterschied der Streuung der Werte mit und ohne Ca^{2+} entnehmen, wobei der Ca^{2+} Einfluss nicht immer derselben war, manche Ergebnisse zeigten unter Ca^{2+} eine höhere Streuung und vice versa.

Die Gene, die eine Stammzell- und Differenzierungsfunktion einnehmen (*EGFL6*, *MITF*) und die Gene dessen Transkripte sich im Nukleus befinden (*ATF3*, *CRYAB*, *MITF*), tendieren in unseren Versuchen eher bei den undifferenzierten Zellen nach der siRNA Behandlung gegen *PAX6* zu einer Herunterregulation.

TMEM47 stellt das einzige Gen in unseren Versuch dar, das eine Rolle bei den Zell-Junctions ausübt. Es hat sich gezeigt, dass *PAX6* einen Einfluss auf die mRNA-Expression von *TMEM47* unabhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen hat. Ebenfalls signifikant herunterreguliert, unabhängig vom Differenzierungsgrad waren *CRYAB*, was zur Refraktion und Transparenz der Linse, und *TGFBI* was zum Aufbau der Extrazellulären Matrix beiträgt.

Bei den anderen Genen ist ein *PAX6*-Einfluss auf die mRNA-Expression nicht ausgeschlossen, jedoch variiert es je nach Differenzierungsgrad der Zellen und manchmal sogar auch im Vergleich zu Patientenzellen. Bei diesen Genen könnten andere Faktoren, entweder bei den undifferenzierteren Zellen oder differenzierten Zellen, zur Regulierung der Transkripte beitragen. Diese Faktoren können Langzeitfolgen der *PAX6* Herunterregulierung, Entzündungslangzeitfolgen und Folgen einer Komplikation sein.

Durch den komplexen intrazellulären Signalweg von *PAX6* und Ca^{2+} ist es schwierig, klare Aussagen und Affirmationen in diesem Zellmodell zu treffen.

5.6.1 Hinblick auf weitere Studien

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen viele Anhaltspunkte für weitere mögliche Versuche auf. Zum einen zeigte sich, unter welchen Bedingungen die Probabilität hoch ist, dass eine siRNA Behandlung gegen *PAX6* auch einen hohen Einfluss auf bestimmten Transkripten haben könnte. Es ergaben sich aus den mRNA-Expressionen der Gene, die nicht signifikant verändert waren, Trends, die in weiteren Versuchen weiter erforscht werden könnten.

Bei den mRNA-Expressionen der Gene, die sich nicht unter beiden Bedingungen gleich verhalten haben, könnte man den Einfluss von Ca^{2+} gezielter erforschen. Man könnte darüber hinaus auch weitere Einflussfaktoren, die bei Aniridie bekannt sind, untersuchen.

6. Literatur

1. Ahlgren H, Bas-Orth C, Freitag HE, Hellwig A, Ottersen OP, Bading H (2014) The Nuclear Calcium Signaling Target, Activating Transcription Factor 3 (ATF3), Protects against Dendrotoxicity and Facilitates the Recovery of Synaptic Transmission after an Excitotoxic Insult. *J Biol Chem* 289:9970–9982
2. Amae S, Fuse N, Yasumoto K, Sato S, Yajima I, Yamamoto H, Udono T, Durlu YK, Tamai M, Takahashi K, Shibahara S (1998) Identification of a Novel Isoform of Microphthalmia-Associated Transcription Factor That Is Enriched in Retinal Pigment Epithelium. *Biochem Biophys Res Commun* 247:710–715
3. Andrae LC, Peukert D, Lumsden A, Gilthorpe JD (2007) Analysis of *Lrrn1* expression and its relationship to neuromeric boundaries during chick neural development. *Neural Dev* 2:22
4. Archer HL, Evans JC, Millar DS, Thompson PW, Kerr AM, Leonard H, Christodoulou J, Ravine D, Lazarou L, Grove L, Verity C, Whatley SD, Pilz DT, Sampson JR, Clarke AJ (2006) *NTNG1* mutations are a rare cause of Rett syndrome. *Am J Med Genet Part A* 140A:
5. Attili D, McClintock SD, Rizvi AH, Pandya S, Rehman H, Nadeem DM, Richter A, Thomas D, Dame MK, Turgeon DK, Varani J, Aslam MN (2019) Calcium-induced differentiation in normal human colonoid cultures: Cell-cell / cell-matrix adhesion, barrier formation and tissue integrity. *PLoS One* 14: (4):e0215122.
6. Berry V, Francis P, Reddy MA, Collyer D, Vithana E, MacKay I, Dawson G, Carey AH, Moore A, Bhattacharya SS, Quinlan RA (2001) Alpha-B Crystallin Gene (CRYAB) Mutation Causes Dominant Congenital Posterior Polar Cataract in Humans. *Am J Hum Genet* 69:1141–1145
7. Bharti K, Gasper M, Ou J, Brucato M, Clore-Gronenborn K, Pickel J, Arnheiter H (2012) A Regulatory Loop Involving PAX6, MITF, and WNT Signaling Controls Retinal Pigment Epithelium Development. *PLoS Genet* 8:(7):e1002757
8. Calvão-Pires P, Santos-Silva R, Falcão-Reis F, Rocha-Sousa A (2014) Congenital Aniridia: Clinic, Genetics, Therapeutics, and Prognosis. *Int Sch Res Not* 2014:1–10
9. Celli A, Crumrine D, Meyer JM, Mauro TM (2016) Endoplasmic Reticulum Calcium Regulates Epidermal Barrier Response and Desmosomal Structure. *J Invest Dermatol* 136:1840–1847
10. Cunha DL, Arno G, Corton M, Moosajee M (2019) The spectrum of PAX6 mutations and genotype-phenotype correlations in the eye. *Genes (Basel)* 10:(12):1050

11. Curto GG, Nieto-Estévez V, Hurtado-Chong A, Valero J, Gómez C, Alonso JR, Weruaga E, Vicario-Abejón C (2014) Pax6 Is Essential for the Maintenance and Multi-Lineage Differentiation of Neural Stem Cells, and for Neuronal Incorporation into the Adult Olfactory Bulb. *Stem Cells Dev* 23:2813–2830
12. Davis J, Duncan MK, Robison WG, Piatigorsky J (2003) Requirement for Pax6 in corneal morphogenesis: a role in adhesion. *J Cell Sci* 116:2157–2167
13. Ding Z, Dong J, Liu J, Deng SX (2008) Preferential gene expression in the limbus of the vervet monkey. *Mol Vis* 14:2031–2041
14. Dong Y, Simske JS (2016) Vertebrate Claudin/PMP22/EMP22/MP20 family protein TMEM47 regulates epithelial cell junction maturation and morphogenesis. *Dev Dyn* 245:653–666
15. Douvaras P, Dorà NJ, Mort RL, Lodge EJ, Hill RE, West JD (2016) Abnormal corneal epithelial maintenance in mice heterozygous for the micropinna microphthalmia mutation Mp. *Exp Eye Res* 149:26–39
16. Ebrahimi M, Taghi-Abadi E, Baharvand H (2009) Limbal stem cells in review. *J Ophthalmic Vis Res* 4:40–58
17. Escribano J, Hernando N, Ghosh S, Coca-Prados M, Crabb J (1994) cDNA from human ocular ciliary epithelium homologous to β ig-h3 is preferentially expressed as an extracellular protein in the corneal epithelium. *J Cell Physiol* 160:511–521
18. Fakhri D, Zhao Z, Nicolle P, Reboussin E, Joubert F, Luzu J, Labbé A, Rostène W, Baudouin C, Mélik Parsadaniantz S, Réaux-Le Goazigo A (2019) Chronic dry eye induced corneal hypersensitivity, neuroinflammatory responses, and synaptic plasticity in the mouse trigeminal brainstem. *J Neuroinflammation* 16:(1):268.
19. Fischbach B V. (2005) WAGR Syndrome: A Clinical Review of 54 Cases. *Pediatrics* 116:984–988
20. Frausto RF, Le DJ, Aldave AJ (2016) Transcriptomic Analysis of Cultured Corneal Endothelial Cells as a Validation for Their Use in Cell Replacement Therapy. *Cell Transplant* 25:1159–1176
21. George A, Zand DJ, Hufnagel RB, Sharma R, Sergeev Y V., Legare JM, Rice GM, Scott Schwoerer JA, Rius M, Tetri L, Gamm DM, Bharti K, Brooks BP (2016) Biallelic Mutations in MITF Cause Coloboma, Osteopetrosis, Microphthalmia, Macrocephaly, Albinism, and Deafness. *Am J Hum Genet* 99:1388–1394
22. Glaser T, Jepeal L, Edwards JG, Young SR, Favor J, Maas RL (1994) PAX6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects.

23. Gonzalez-Coto AF, Alonso-Ron C, Alcalde I, Gallar J, Meana Á, Merayo-Llodes J, Belmonte C (2014) Expression of Cholecystinin, Gastrin, and Their Receptors in the Mouse Cornea. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 55:1965–1975
24. Hashimoto Y (2002) An alternatively spliced isoform of transcriptional repressor ATF3 and its induction by stress stimuli. *Nucleic Acids Res* 30:2398–2406
25. Hennings H, Michael D, Cheng C, Steinert P, Holbrook K, Yuspa SH (1980) Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* 19:245–254
26. Hingorani M, Hanson I, van Heyningen V (2012) Aniridia. *Eur J Hum Genet* 20:1011–1017
27. Hodgkinson CP, Naidoo V, Patti KG, Gomez JA, Schmeckpeper J, Zhang Z, Davis B, Pratt RE, Mirotsoy M, Dzau VJ (2013) Abi3bp is a multifunctional autocrine/paracrine factor that regulates mesenchymal stem cell biology. *Stem Cells* 31:1669–1682
28. Ihnatko R, Eden U, Fagerholm P, Lagali N (2016) Congenital Aniridia and the Ocular Surface. *Ocul Surf* 14:196–206
29. Kang H, Han KA, Won SY, Kim HM, Lee Y-H, Ko J, Um JW (2016) Slitrk Missense Mutations Associated with Neuropsychiatric Disorders Distinctively Impair Slitrk Trafficking and Synapse Formation. *Front Mol Neurosci* 9: 104.
30. Kaplan N, Wang J, Wray B, Patel P, Yang W, Peng H, Lavker RM (2019) Single-Cell RNA Transcriptome Helps Define the Limbal/Corneal Epithelial Stem/Early Transit Amplifying Cells and How Autophagy Affects This Population. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 60:3570–3583
31. Käsmann-Kellner B, Seitz B (2014) Kongenitale Aniridie oder PAX6-Syndrom? *Ophthalmologie* 111:1144
32. Käsmann-Kellner B, Fries FN, Latta L, Seitz B (2019) Aniridie bei PAX6-Syndrom: Eine potenziell zur Erblindung führende Erkrankung Etablierung eines Deutschen Aniridie-Registers. 12–18
33. Kim B-Y, Olzmann JA, Choi S, Ahn SY, Kim T, Cho H-S, Suh H, Kim EK (2009) Corneal Dystrophy-associated R124H Mutation Disrupts TGFBI Interaction with Periostin and Causes Mislocalization to the Lysosome. *J Biol Chem* 284:9580–19591
34. Kim EK, Kim S, Maeng YS (2019) Generation of TGFBI knockout ABCG2⁺/ ABCB5⁺ double-positive limbal epithelial stem cells by CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *PLoS One* 14: (2):e0211864

35. Kim HK, Ham KA, Lee SW, Choi HS, Kim HS, Kim HK, Shin HS, Seo KY, Cho Y, Nam KT, Kim IB, Joe YA (2019) Biallelic deletion of *pxdn* in mice leads to anophthalmia and severe eye malformation. *Int J Mol Sci* 20 (24): 6144
36. Kraus D, Kaiserman I, Frucht-Pery J, Rahamimoff R (2001) Calcium - An “all-round player” in the cornea. *Isr Med Assoc J* 3:269–274
37. Lagali N, Edén U, Utheim TP, Chen X, Riise R, Dellby A, Fagerholm P (2013) In vivo morphology of the limbal palisades of vogt correlates with progressive stem cell deficiency in aniridia-related keratopathy. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 54:5333–5342
38. Lang GK, Esser J, Gareis O, Lang GE, Recker D, Spraul CW, Wagner P (2019) *Augenheilkunde*. 6th edition. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
39. 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* 179:8–17
40. 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. *Ocul Surf* 19:115–127
41. Le Q, Xu J, Deng SX (2018) The diagnosis of limbal stem cell deficiency. *Ocul Surf* 16:58–69
42. Leiper LJ, Ou J, Walczysko P, Kucerova R, Lavery DN, West JD, Collinson JM (2009) Control of Patterns of Corneal Innervation by *Pax6*. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 50:1122–1128
43. Li W, Chen Y-T, Hayashida Y, Blanco G, Kheirkah A, He H, Chen S-Y, Liu C-Y, Tseng S (2008) Down-regulation of *Pax6* is associated with abnormal differentiation of corneal epithelial cells in severe ocular surface diseases. *J Pathol* 214:114–122
44. Malak M, Grantham J, Ericson MB (2020) Monitoring calcium-induced epidermal differentiation in vitro using multiphoton microscopy. *J Biomed Opt* 25 (7):1-11
45. Marteyn A, Maury Y, Gauthier MM, Lecuyer C, Vernet R, Denis JA, Pietu G, Peschanski M, Martinat C (2011) Mutant Human Embryonic Stem Cells Reveal Neurite and Synapse Formation Defects in Type 1 Myotonic Dystrophy. *Cell Stem Cell* 8:434–444
46. Michelacci YM (2003) Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. *Brazilian J Med Biol Res* 36:1037–1046

47. NISHIDA K, KINOSHITA S, OHASHI Y, KUWAYAMA Y, YAMAMOTO S (1995) Ocular Surface Abnormalities in Aniridia. *Am J Ophthalmol* 120:368–375
48. Parekh M., Poli B., Ferrari S., Teofili C., Ponzin D. (2015) *Aniridia*. Springer International Publishing, Cham
49. Rainger J, Williamson KA, Soares DC, Truch J, Kurian D, Gillessen-Kaesbach G, Seawright A, Prendergast J, Halachev M, Wheeler A, McTeir L, Gill AC, Heyningen V, Davey MG, FitzPatrick DR (2017) A recurrent de novo mutation in ACTG1 causes isolated ocular coloboma. *Hum Mutat* 38:942–946
50. Rong SS, Ma STU, Yu XT, Ma L, Chu WK, Chan TCY, Wang YM, Young AL, Pang CP, Jhanji V, Chen LJ (2017) Genetic associations for keratoconus: A systematic review and meta-Analysis. *Sci Rep* 7: (1):4620
51. Saul KE, Koke JR, García DM (2010) Activating transcription factor 3 (ATF3) expression in the neural retina and optic nerve of zebrafish during optic nerve regeneration. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* 155:172–182
52. Schlotzer-Schrehardt U, Poliseti N, Zenkel M, Naschberger E, Heger L, Dudziak D, Stuerzl M, Kruse FE (2018) Melanocytes as an emerging key player in niche regulation of limbal stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 59:3453
53. Schlötzer-Schrehardt U, Latta L, Gießl A, Zenkel M, Fries FN, Käsmann-Kellner B, Kruse FE, Seitz B (2021) Dysfunction of the limbal epithelial stem cell niche in aniridia-associated keratopathy. *Ocul Surf* 21:160–173
54. Seiradake E, Coles CH, Perestenko P V, Harlos K, McIlhinney RAJ, Aricescu AR, Jones EY (2011) Structural basis for cell surface patterning through NetrinG-NGL interactions. *EMBO J* 30:4479–4488
55. Simpson TI, Price DJ (2002) Pax6; A pleiotropic player in development. *BioEssays* 24:1041–1051
56. Song YS, Lee H-J, Prosser P, Itohara S, Kim E (2013) Trans-induced cis interaction in the tripartite NGL-1, netrin-G1, and LAR adhesion complex promotes excitatory synaptic development. *J Cell Sci* 4926–4938
57. Springelkamp H, Mishra A, Hysi PG, Gharahkhani P, Höhn R, Khor C-C, Cooke Bailey JN, Luo X, Ramdas WD, Vithana E, Koh V, Yazar S, Xu L, Forward H, Kearns LS, Amin N, Iglesias AI, Sim K-S, van Leeuwen EM, Demirkan A, van der Lee S, Loon S-C, Rivadeneira F, Nag A, Sanfilippo PG, Schillert A, de Jong PTVM, Oostra BA, Uitterlinden AG, Hofman A, Zhou T, Burdon KP, Spector TD, Lackner KJ, Saw S-M, Vingerling JR, Teo Y-Y, Pasquale LR, Wolfs

- RCW, Lemij HG, Tai E-S, Jonas JB, Cheng C-Y, Aung T, Jansonius NM, Klaver CCW, Craig JE, Young TL, Haines JL, MacGregor S, Mackey DA, Pfeiffer N, Wong T-Y, Wiggs JL, Hewitt AW, van Duijn CM, Hammond CJ (2015) Meta-analysis of Genome-Wide Association Studies Identifies Novel Loci Associated With Optic Disc Morphology. *Genet Epidemiol* 39:207–216
58. Tang CT, Zhang QW, Wu S, Tang MY, Liang Q, Lin XL, Gao YJ, Ge ZZ (2020) Thalidomide targets EGFL6 to inhibit EGFL6/PAX6 axis-driven angiogenesis in small bowel vascular malformation. *Cell Mol Life Sci* 77:5207–5221
59. Traboulsi EI, Ellison J, Sears J, Maumenee IH, Avallone J, Mohny BG (2008) Aniridia with Preserved Visual Function: A Report of Four Cases with No Mutations in PAX6. *Am J Ophthalmol* 145:760–764
60. Tseng SCG (1985) Staging of Conjunctival Squamous Metaplasia by Impression Cytology. *Ophthalmology* 92:728–733
61. Tseng SCG (1989) Concept and application of limbal stem cells. *Eye* 3:141–157
62. van Heyningen V (2002) PAX6 in sensory development. *Hum Mol Genet* 11:1161–1167
63. Wawrocka A, Krawczynski MR (2018) The genetics of aniridia — simple things become complicated. *J Appl Genet* 59:151–159
64. Yan X, Sabrautzki S, Horsch M, Fuchs H, Gailus-Durner V, Beckers J, Hrabě de Angelis M, Graw J (2014) Peroxidasin is essential for eye development in the mouse. *Hum Mol Genet* 23:5597–5614
65. Yang H, Chen W, Shi J, Huang D, Li J, Hu B, Zhang M, Wang Z, Fei J (2016) Knockout of Abi3bp in mice does not affect their olfactory function, mental state and NNK-induced lung tumorigenesis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 48:
66. Yazdanpanah G, Haq Z, Kang K, Jabbehdari S, Rosenblatt M I., Djalilian AR (2019) Strategies for reconstructing the limbal stem cell niche. *Ocul Surf* 17:230–240
67. Zhu J, Palliyil S, Ran C, Kumar JP (2017) Drosophila Pax6 promotes development of the entire eye-antennal disc, thereby ensuring proper adult head formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:5846–5853

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis:

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Western-Blot der Marker PAX6 und ACTB.	40
Abbildung 2: Genexpression der Marker ATF3, PAX6 und SLITRK4.....	41
Abbildung 3: Genexpression nach siRNA Behandlung gegen PAX6 in An- und Abwesenheit von Ca ²⁺ bei folgenden Markern A) TGFBI, B) CRYAB, C) TMEM47	42
Abbildung 4: Genexpression nach siRNA Behandlung gegen PAX6 in An- und Abwesenheit von Ca ²⁺ bei folgenden Markern A) EGFL6, B) MITF, C) PAPLN	43
Abbildung 5: Genexpression des Markers ATF3	44
Abbildung 6: Genexpression des Markers NTNG1	44
Abbildung 7: Genexpression nach siRNA Behandlung gegen PAX6 in Ab- und Anwesenheit von Ca ²⁺ bei folgenden Markern A) CCK und B) LRRN1	45
Abbildung 8: Genexpression nach siRNA Behandlung gegen PAX6 in Ab- und Anwesenheit von Ca ²⁺ bei folgenden Markern A) SLITRK4, B) ABI3BP und C) PXDN	46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 : Geräte, die für die Zellkultur verwendet wurden und deren Hersteller.....	23
Tabelle 2 : Labormaterialien, die für die Zellkultur verwendet wurden und deren Hersteller	24
Tabelle 3 : Chemikalien, die für die Zellkultur verwendet wurden und deren Hersteller	25
Tabelle 4 : Geräte, die für die Zellbehandlung verwendet wurden und deren Hersteller.....	25
Tabelle 5 : Labormaterialien, die für die Zellbehandlung verwendet wurden und deren Hersteller	26
Tabelle 6 : Chemikalien, die für die Zellbehandlung verwendet wurden und deren Hersteller	26
Tabelle 7 : Geräte, die zur RNA- und Protein-Isolierung verwendet wurden und deren Hersteller	27
Tabelle 8 : Labormaterialien, die zur RNA- und Protein-Isolierung verwendet wurden und deren Hersteller	27
Tabelle 9 : Kit, das zur RNA- und Protein-Isolierung verwendet wurde und dessen Hersteller.....	27
Tabelle 10 : Geräte, die zur cDNA Herstellung verwendet wurden und deren Hersteller	28
Tabelle 11 : Labormaterialien, die zur cDNA Herstellung verwendet wurden und deren Hersteller ...	28
Tabelle 12 : Chemikalien und Kits, die zur cDNA Herstellung verwendet wurden und deren Hersteller	28
Tabelle 13 : Geräte, die zur quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) verwendet wurden und deren Hersteller	29

Tabelle 14 : Labormaterialien, die zur quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) verwendet wurden und deren Hersteller	29
Tabelle 15 : Chemikalien und Kits, die zur quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) verwendet wurden und deren Hersteller	30
Tabelle 16 : Primer und Amplifikationsgrößen für die qPCR.....	31
Tabelle 17 : Geräte, die für die Western Blot Analyse verwendet wurden und deren Hersteller.....	31
Tabelle 18 : Labormaterialien, die für die Western Blot verwendet wurden und deren Hersteller	32
Tabelle 19 : Chemikalien und Kits, die für die Western Blot Analyse verwendet wurden und deren Hersteller	32
Tabelle 20 : Antikörper, der für die Western Blot Analyse verwendet wurde und dessen Verdünnung	32
Tabelle 21 : Detaillierte Zusammenstellung der Reaktionsmixe für die cDNA-Synthese	36
Tabelle 22 : Detaillierte Zusammenstellung des Primermix	37
Tabelle 23 : Detaillierte Zusammenstellung des Templatemix	37
Tabelle 24 : Detaillierte Zusammenstellung der Proben für die Elektrophorese.....	38
Tabelle 25 : Untersuchte mRNA-Expression nach ihrer Funktion aufgeteilt.....	55
Tabelle 26 : Untersuchte mRNA-Expression nach ihrer spezifischen Funktion aufgeteilt.....	56
Tabelle 27 : Untersuchte mRNA-Expression nach der Lokalisierung dessen Transkripte aufgeteilt... .	57
Tabelle 28 : Vergleich der Ergebnisse der mRNA-Expression der getesteten Gene, die beim Patienten in der Bindehaut und in der Limbusepithelzellen herunterreguliert waren.. ..	58
Tabelle 29 : Vergleich der Ergebnisse der mRNA-Expression der getesteten Gene, die beim Patienten, in der Bindehaut hochreguliert waren.	58

Publikation

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 downregulation through retinoic acid treatment and *PAX6* knockdown: Does *PAX6* affect RA signaling in limbal epithelial cells? *Biomolecules*. 2021 Nov 8; 11 (11): 1651.

Danksagung

An diese Stelle möchte ich mich herzlich bei mehreren Personen bedanken.

Zunächst bei Herrn Dr. Lorenz Latta, der mir als mein Betreuer die Laborarbeit und die wissenschaftliche, strukturierte Arbeitsweise nahegebracht hat. Darüber hinaus war er immer ermutigend und eine große Hilfe sowohl fachlich als auch emotional. Dank ihm hatte ich eine schöne Zeit während des experimentellen Teils meiner Arbeit.

Ein weiterer Dank geht an Frau Dr. Tanja Stachon, die die Betreuung übernommen hat und sich als sehr hilfsbereit und ermutigend gezeigt hat. Schon zuvor war sie eine freundliche und fachlich äußerst kompetente Ansprechpartnerin, bei der ich mich bei jeglichen Fragen zur Laborarbeit, Datenauswertung und -analyse wenden konnte. Ich bin ihr sehr dankbar für die Korrektur sowohl des sprachlichen, aber auch des fachlichen Teils meiner Dissertation.

Für Ihre erhebliche Unterstützung beim Schreiben der Dissertation, ihr Vertrauen in mich und den Ansporn die sie mir gegeben hat möchte ich auch meiner Doktormutter Frau Univ.-Prof. Dr. Nóra Szentmáry ganz herzlich danken.

Ein besonderer Dank geht auch an sämtliche Labormitarbeiter des Schwiete Zentrums, besonders Frau Priya Katiyar, die immer sehr freundlich und hilfsbereit waren. Ebenfalls möchte ich meiner Kommilitonin und ebenfalls Doktorandin Frau Constanze Bleil, danken, die mir noch vor Beginn meiner Arbeit die Laborarbeit gezeigt und erklärt hat und bei der ich mich immer melden konnte. Die Zusammenarbeit mit diesen Personen hat die Laborarbeit sehr angenehm gemacht.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meiner Familie, meinen Freunden und meinen Kommilitonen für die große emotionale Unterstützung herzlich bedanken.

Lebenslauf

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

Tag der Promotion: 03. April 2024

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

Berichterstatter: Prof. Dr. Norá Szentmáry

Prof. Dr. Frank Schmitz