

**Dr. Rolf M. Schwiete Zentrum
für Limbusstammzellforschung und kongenitale Aniridie
Leitung: Prof. Dr. N. Szentmáry
Universität des Saarlandes**

**Untersuchungen zum Einfluss von Retinolderivaten
auf die Differenzierung von kornealen
Limbusepithelzellen im Kontext der kongenitalen
Aniridie**

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

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2022

vorgelegt von

Igor Alexander Knebel

geb. am 17.04.1997 in Villingen

Tag der Promotion: 17. November 2022

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

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Nóra Szentmáry

Univ.-Prof. Dr. Frank Schmitz

Inhaltsverzeichnis	Seite
1 Zusammenfassung.....	1
1.1 Zusammenfassung (Deutsch).....	1
1.2 Summary	3
2 Einleitung.....	5
2.1 Anatomie	5
2.1.1 Kornea	5
2.1.2 Limbus und Limbusepithelzellen	5
2.2 Stammzellinsuffizienz und kongenitale Aniridie	6
2.2.1 Stammzellinsuffizienz	6
2.2.2 Definition der kongenitalen Aniridie.....	7
2.2.3 Genetik der kongenitalen Aniridie	7
2.2.4 Aniridie-assoziierte Keratopathie (AAK).....	7
2.2.5 Chirurgische Therapieversuche der Aniridie-assoziierten Keratopathie.....	8
2.3 Retinolstoffwechsel.....	9
2.3.1 Retinolstoffwechsel allgemein	9
2.3.2 Retinolstoffwechsel in der Augenoberfläche	10
2.3.3 Fehlfunktion der Augenoberfläche über Retinolstoffwechsel.....	11
2.4 Einfluss von Retinolderivaten auf primäre Limbusepithelzellen im Kontext von Aniridie-relevanten Markergenen	12
2.4.1 Stammzell- und Differenzierungsmarker	12
2.4.2 Strukturproteine	14
2.4.3 Andere Marker.....	15
2.5 Retinolstoffwechsel bei kongenitaler Aniridie und Zielsetzung der Arbeit.....	16

3	Material und Methoden	22
3.1	Material.....	22
3.2	Methoden.....	26
3.2.1	Zellkultur und Behandlung von Limbusepithelzellen mit Retinolderivaten	26
3.2.2	RNA/Protein-Isolation.....	28
3.2.3	cDNA-Synthese und quantitative Polymerasekettenreaktion	29
3.2.4	Western Blot.....	31
3.2.5	siRNA-Behandlung gegen ADH7	33
3.2.6	Statistische Auswertung	34
4	Ergebnisse	35
4.1	Genexpressionsergebnisse nach Behandlung von Limbusepithelzellen mit Retinolderivaten	35
4.1.1	Marker mit signifikant veränderter Genexpression.....	35
4.1.2	Marker mit Genexpression ohne signifikante Änderungen.....	41
4.1.3	Genexpressionsergebnisse durch die Behandlung mit Retinol und dem ABCG2-Blocker Ko143.....	42
4.2	Western Blot-Ergebnisse nach Behandlung von Limbusepithelzellen mit Retinolderivaten	44
4.3	Genexpressions- und Western-Blot-Ergebnisse nach siRNA-Behandlung gegen ADH7	48
4.3.1	Genexpressionsergebnisse nach Behandlung mit siRNA gegen ADH7 und GAPDH...48	
4.3.2	Western Blot-Ergebnis nach siRNA-Behandlung gegen ADH7 und GAPDH.....	49
4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	50
5	Diskussion	51
5.1	Vergleich zwischen Retinol- und Retinsäure-Behandlung und zwischen der Behandlung nach verschiedenen Behandlungszeiten.....	51
5.2	Interpretation der Genexpressionsergebnisse und Western-Blot-Ergebnisse.....	52
5.2.1	Ähnlichkeit der Expressionsergebnisse zur PAX6-Defizienz und mögliches Überangebot von Retinolderivaten in Limbusepithelzellen	52

Inhaltsverzeichnis

5.2.2	Diskussion des Einflusses von Retinolderivaten über einen PAX6-vermittelten Mechanismus auf Differenzierungsmarker	54
5.2.3	Ausnahmerolle von KRT12 und Zusammenhang mit KRT3 und DSG1	55
5.2.4	Interpretation von Ki67 im Hinblick auf ein potenzielles Überangebot an Retinolderivaten	55
5.2.5	Die mögliche Rolle von DSG1 und SPINK7 in der AAK	56
5.2.6	Interpretation von ABCG2, Keratine, ADH7 und ALDH1A1	56
5.2.7	Interpretation der Auswirkung des ABCG2-Blockers Ko143.....	59
5.2.8	Fazit aus der Interpretation der Gen- und Proteinexpressionsergebnisse.....	59
5.3	Interpretation der Ergebnisse der siRNA-Behandlung gegen ADH7	60
5.3.1	Interpretation ADH7, KRT3 und DSG1	60
5.3.2	Fazit aus der Interpretation der siRNA-Ergebnisse	60
5.4	Ausblick auf weitere Studien im Kontext der kongenitalen Aniridie	60
5.5	Schlussfolgerungen	61
6	Literatur	62
	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	73
	Publikationen.....	75
	Danksagung	76
	Lebenslauf.....	77

Abkürzungsverzeichnis

<u>Abkürzung</u>	<u>Erläuterung</u>
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
9cRA	9-cis-Retinoic acid
AAK	Aniridie-assoziierte Keratopathie
Abb	Abbildung
ABCG2	ATP-binding-cassette G2
ACTB	β-Actin
ADH	Alkoholdehydrogenase
ALDH	Aldehyddehydrogenase
ANOVA	Analysis of variance
APL	Akute Promyelozytenleukämie
ATRA	All-trans-Retinoic acid
BCRP	Breast Cancer Release Protein
BPE	Bovine pituitary extract
bzw	beziehungsweise
CCD-Kamera	Charge-coupled device-Kamera
cDNA	Complementary DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRABP	Cellular Retinoic acid binding protein
CRBP	Cellular Retinol binding protein
Ctrl	Control
CYP	Cytochrom P450
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpt	Dioptrie
DSG	Desmoglein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
FABP	Fatty acid-binding protein
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GUSB	β-Glucuronidase
HRP	Horseradish peroxidase
HSC	Hepatic-stellate-cells
kDa	Kilodalton
KLF	Kruppel-like factor
KRT	Keratin
KSFM	Keratinocyte Serum-Free Medium
l	Liter
LEZ	Limbusepithelzellen
LRAT	Lecithin-Retinol-Acyltransferase
M	mol/l

Abkürzungsverzeichnis

m	Milli (10^{-3})
min	Minuten
MMP9	Matrix Metalloproteinase 9
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
n	Nano (10^{-9})
OCT4	Octamer-binding transcription factor 4
PAX6	Paired-box Protein 6
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PMZ	Post-mitotische Zellen
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptors
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RA	Retinoic Acid
RAR	Retinoic-Acid-Receptors
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute
RT-PCR	Real-time Polymerase chain reaction
RXR	Retinoic-X-Receptors
s	Sekunde
SDS	Sodium dodecylsulfate
siRNA	Small interfering Ribonukleinsäure
SPINK	Serinprotease-Inhibitor vom Kazal-Typ
STRA6	Stimulated by Retinoic Acid 6
TAZ	Transient amplifizierende Zellen
TBP	TATA-binding protein
TDZ	Terminal differenzierte Zellen
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolet
VIS	Visible

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung (Deutsch)

Hintergrund und Ziele

Die kongenitale PAX6-Aniridie führt in 20% der Fälle zur Aniridie-assoziierten Keratopathie (AAK) und geht mit Differenzierungsstörungen von Limbusepithelzellen (LEZ) bzw. einer Limbusstammzellinsuffizienz einher. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass in LEZ von AAK-Patienten und im Aniridie-Zellmodell die Genexpression der am Retinolstoffwechsel beteiligten Enzyme ADH7 und ALDH1A1 sowie die Genexpression der Differenzierungsmarker DSG1 und KRT3 reduziert ist.

Ziel der Studie war es zu ermitteln, ob die Differenzierung der LEZ über die Behandlung mit Retinolderivaten gesteigert oder durch eine Herunterregulation von ADH7 mittels siRNA vermindert werden kann. Außerdem wurde untersucht, ob der ABC-Transporter ABCG2 am Retinoltransport aus der Zelle beteiligt sein könnte. Dazu wurden die Auswirkungen von Retinol in Anwesenheit eines ABCG2-Blockers analysiert.

Methoden

Aus gesunden Spenderhornhäuten wurden LEZ isoliert, kultiviert und mit Retinol und Retinsäure für jeweils 24 Stunden (0,5 μ M, 1,5 μ M) sowie 48 Stunden (1 μ M, 5 μ M) inkubiert. LEZ wurden zudem mit Retinol (100 nM) sowie einem ABCG2-Blocker (100 nM) für 48 Stunden inkubiert. Zusätzlich wurden die LEZ mit siRNA gegen ADH7 (5 nM) für 48 Stunden behandelt. Folgende Transkriptionslevel wurden mit qPCR analysiert: PAX6, ADH7, ALDH1A1, die Differenzierungsmarker KRT3, KRT12, KRT19 und DSG1, der potenzielle Stammzellmarker ABCG2, der Proteaseinhibitor SPINK7 und der Proliferationsmarker Ki67. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA und anschließendem Dunnett's- bzw. Tukey multiple comparisons test. Die Untersuchung der Proteinmengen von PAX6, ADH7 und KRT12 nach Behandlung mit Retinolderivaten für 48 Stunden erfolgte mittels Western Blot. Die densitometrische Analyse der Proteinbanden erfolgte mit ImageJ. Für die statistische Auswertung wurde ein one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's- bzw. Tukey multiple comparisons test durchgeführt.

Ergebnisse

Die Genexpression von PAX6 war unter Retinol-Behandlung erhöht ($p_{\max}=0,0025$) und unter Retinsäure-Behandlung vermindert ($p_{\max}=0,0448$). Die Genexpression von ABCG2 ($p=0,0024$), SPINK7 ($p_{\max}=0,0198$), DSG1 ($p_{\max}=0,0023$), Ki67 ($p_{\max}=0,0354$) und KRT3 ($p_{\max}=0,0103$) war nach

1 Zusammenfassung / Summary

Behandlung mit Retinolderivaten signifikant reduziert. Die Marker KRT12 ($p_{\max}=0,0341$) und KRT19 ($p=0,0394$) waren signifikant erhöht, die Marker ADH7 und ALDH1A1 waren unverändert.

Die Proteinexpression von PAX6 war durch die Behandlung mit Retinolderivaten nicht signifikant verändert ($p \geq 0,16$). Die Proteinexpression des Markers ADH7 war unter der Behandlung mit Retinsäure signifikant reduziert ($p=0,028$ für $5 \mu\text{M}$) und mit Retinol-Behandlung signifikant erhöht ($p=0,049$ für $1 \mu\text{M}$; $p=0,048$ für $5 \mu\text{M}$). Die Proteinexpression von KRT12 war durch die Behandlung mit Retinsäure signifikant hochreguliert ($p=0,038$ für $5 \mu\text{M}$).

Die Behandlung mit dem ABCG2-Blocker zeigte keine signifikanten Veränderungen der untersuchten Marker.

Im siRNA-Modell gegen ADH7 ließ sich eine stark herunterregulierte mRNA von ADH7 feststellen, die anderen Marker waren nicht signifikant verändert.

Schlussfolgerungen

Die Differenzierung von LEZ wird durch die Behandlung mit Retinolderivaten nicht gefördert. Die mittels siRNA induzierte Herunterregulation von ADH7 hat keinen Effekt auf die Differenzierung der LEZ. Der ABC-Transporter ABCG2 hat keinen Einfluss auf den Auswärtstransport von Retinol aus LEZ. Es gibt Hinweise auf ein mögliches Überangebot von Retinolderivaten in LEZ bei kongenitaler Aniridie.

1.2 Summary

Background and purpose

PAX6-aniridia leads to aniridia-associated keratopathy (AAK) in 20% of cases and is associated with differentiation disorder of limbal epithelial cells (LEC) or limbal stem cell insufficiency. In LEC of AAK patients and in the aniridia cell model, gene expression of the enzymes ADH7 and ALDH1A1 (involved in retinol metabolism) is reduced together with expression of the differentiation markers DSG1 and KRT3.

The purpose of the study was to determine whether the differentiation of LEC is increased by treatment with retinol derivatives or decreased by downregulation of ADH7 via siRNA. We also aimed to investigate whether the ABC transporter ABCG2 may be involved in retinol transport from the cell. For this purpose, the impact of the retinol effect in presence of an ABCG2 blocker was analyzed.

Methodology

LEC were isolated from healthy donor corneas, cultured and incubated with retinol and retinoic acid for 24 hours (0.5 μ M, 1.5 μ M) and 48 hours (1 μ M, 5 μ M), respectively. LEC were also incubated with retinol (100 nM) as well as an ABCG2 blocker (100 nM) for 48 hours. In addition, LEC were treated with siRNA against ADH7 (5 nM) for 48 hours. The following transcription levels were analyzed with qPCR: PAX6, ADH7, ALDH1A1, the differentiation markers KRT3, KRT12, KRT19, and DSG1, the potential stem cell marker ABCG2, the protease inhibitor SPINK7 and the proliferation marker Ki67. Statistical evaluation was performed by one-way ANOVA followed by Dunnett's or Tukey multiple comparisons test. The analysis of the protein amount of PAX6, ADH7, and KRT12 after treatment with retinol derivatives for 48 hours was performed by Western blot. The densitometric analysis of the protein bands was performed with ImageJ and the statistical evaluation by one-way ANOVA and the subsequent Dunnett's or Tukey multiple comparisons test.

Results

PAX6 mRNA expression was increased after treatment with retinol ($p_{\max}= 0.0025$) and decreased after treatment with retinoic acid ($p_{\max}= 0.0448$). ABCG2 ($p= 0.0024$), SPINK7 ($p_{\max}= 0.0198$), DSG1 ($p_{\max}= 0.0023$), Ki67 ($p_{\max}= 0.0354$) and KRT3 mRNA expression ($p_{\max}= 0.0103$) was significantly decreased after treatment with retinol derivatives. mRNA expression of the markers KRT12 ($p_{\max}= 0.0341$) and KRT19 was significantly increased ($p= 0.0394$), whereas ADH7 and ALDH1A1 mRNA expression remained unchanged.

1 Zusammenfassung / Summary

PAX6 protein expression remained unchanged following by treatment with retinol derivatives ($p \geq 0.16$). ADH7 protein expression was significantly reduced after retinoic acid treatment ($p = 0.028$ for $5 \mu\text{M}$) and increased significantly following retinol treatment ($p = 0.049$ for $1 \mu\text{M}$; $p = 0.048$ for $5 \mu\text{M}$). KRT12 protein expression was significantly upregulated through retinoic acid treatment ($p = 0.038$ for $5 \mu\text{M}$).

Treatment with the ABCG2 blocker showed no significant effect on expression of the investigated markers.

In the siRNA model against ADH7, a strongly downregulated ADH7 mRNA expression could be verified, however, expression of the other analyzed markers did not change significantly.

Conclusions

LEC differentiation is not stimulated by retinol derivate treatment. The siRNA induced downregulation of ADH7 does not influence LEC differentiation. ADH7 downregulation using siRNA has no effect on LEC differentiation. The ABC transporter ABCG2 has no influence on the outward transport of retinol from LEC. There is evidence for a possible oversupply of retinol derivatives in LEC, in congenital aniridia.

2 Einleitung

2.1 Anatomie

2.1.1 Kornea

Die Kornea stellt den äußersten Teil des Auges dar und hat zwei wichtige Funktionen: Zum einen ist sie eine mechanische Barriere gegen äußere Einflüsse. Zum anderen ist sie transparent und hat mit 43 dpt den größten Anteil an der Brechkraft. Eine Einschränkung dieser Funktionen hat einen Visusverlust sowie eine erhöhte Anfälligkeit für mechanisch-, chemisch- oder infektiös bedingte Schäden des Auges zur Folge.

Histologisch besteht die Kornea aus 5 Schichten: Von distal nach proximal ist die Kornea aus mehrschichtig unverhorntem Plattenepithel, der Bowman-Lamelle, dem Stroma, der Descemet-Membran und dem Endothel aufgebaut.

2.1.2 Limbus und Limbusepithelzellen

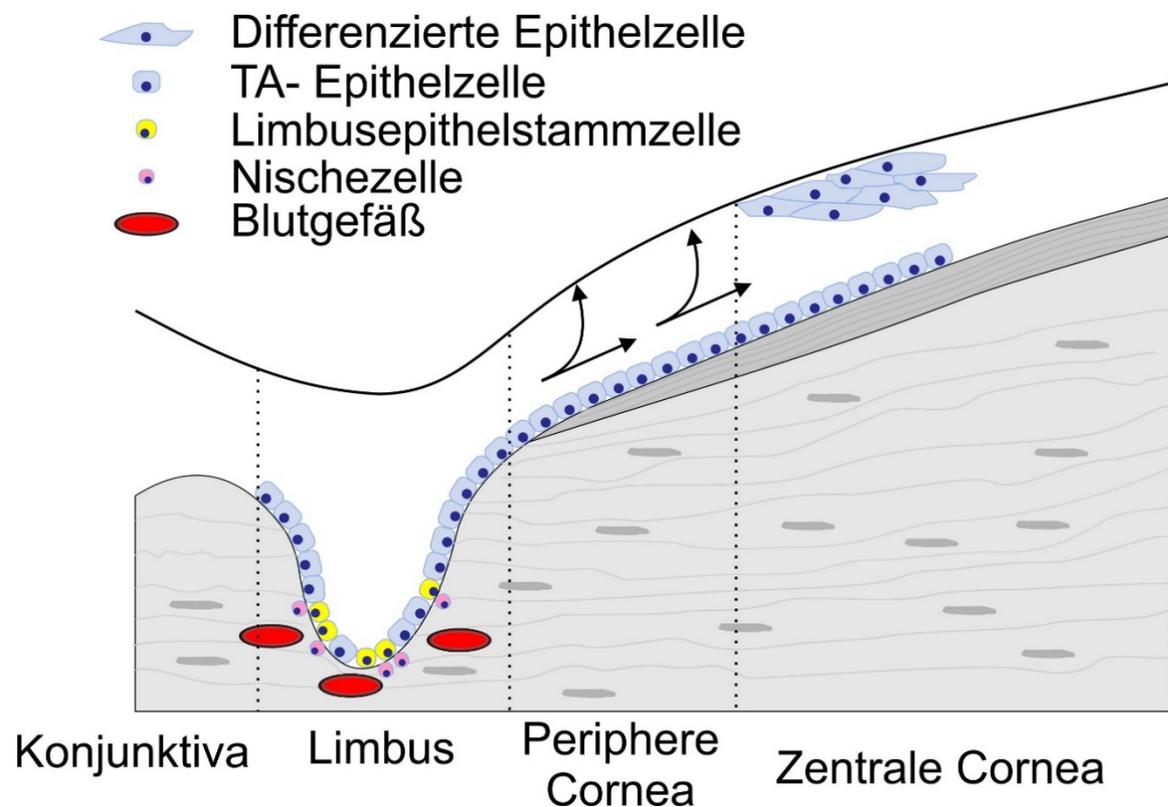


Abbildung 1. Anatomie des Limbus mit Differenzierungsschritten von Limbusepithelstammzellen. Die Abbildung zeigt die einzelnen Differenzierungsstadien einer Limbusepithelstammzelle aus der Vogt'schen Palisade bis zur differenzierten kornealen Epithelzelle. Quelle: Rubelowski, 2018, [87]

2 Einleitung

Der Limbus corneae stellt den Übergang der Kornea in die Sklera dar, die von der Konjunktiva überdeckt ist. In einer Stammzellnische, die sich innerhalb der Vogt'schen Palisaden befindet [19,109], sitzen die Limbusepithelzellen (LEZ) (siehe Abb. 1, S. 5). "LEZ" ist der Oberbegriff für die im Limbus sitzenden Epithelzellen, die aus verschiedenen Stadien von Limbusepithelstammzellen hervorgehen. Von LEZ geht aufgrund ihres Stammzellcharakters der Reparaturprozess abgestorbener kornealer Epithelzellen und epithelialer Defekte der Kornea aus [12,21,127]. Die Stammzellen selbst machen dabei nur einen geringen Anteil der LEZ aus.

Die erste Differenzierungsstufe der Stammzellen sind transient amplifizierende Zellen (TAZ), die in die Kornea migrieren. In der Kornea differenzieren TAZ in post-mitotische Zellen (PMZ), die wiederum in terminal differenzierte Zellen (TDZ) differenzieren. Die teilungsunfähigen TDZ nehmen bis zur Apoptose ihre mechanische Funktion im Korneaepithel ein [21,94].

2.2 Stammzellinsuffizienz und kongenitale Aniridie

2.2.1 Stammzellinsuffizienz

Wenn die Limbusstammzellen nicht mehr ihre Funktion ausüben können, spricht man von einer Limbusstammzellinsuffizienz. Diese Stammzellinsuffizienz bedingt verschiedene Erkrankungen der Augenoberfläche, unter anderem die Aniridie [21]. Bei Aniridiepatienten sind die Vogt'schen Palisaden nicht mehr nachweisbar bzw. degenerieren im Laufe der Zeit [50], was zusammen mit dem klinischen Erscheinungsbild der AAK für das Vorliegen einer Stammzellinsuffizienz spricht [73].

Es ist immer noch nicht ganz geklärt, ob und in welchem Umfang bei Patienten mit Aniridie die LEZ ihren Stammzellcharakter verlieren oder eine Differenzierungsstörung der LEZ die physiologische Ausreifung kornealer Epithelzellen verhindert.

Für die Hypothese der Differenzierungsstörung spricht, dass LEZ bei PAX6-Defizienz sich in Stammzellen mit epidermalem Charakter umwandeln. So ist die Genexpression der epidermalen Marker Keratin 1 (KRT1) und Keratin 10 (KRT10) im Aniridie-Zellmodell signifikant erhöht [56]. Zudem kann es bei Aniridie an der Kornea zur Ausbildung von Dermoiden kommen, die ebenfalls epidermale Marker aufweisen [56].

2 Einleitung

2.2.2 Definition der kongenitalen Aniridie

Die kongenitale Aniridie ist eine seltene panokuläre Erkrankung (Inzidenz 1:60.000 – 1:90.000), die sich durch das Fehlen oder eine hypoplastische Anlage der Iris beider Augen auszeichnet und wegen sekundär auftretender Komplikationen zur Erblindung führen kann [42,71].

Exemplarisch für diese Komplikationen können die Katarakt, das Glaukom, die Linsenektopie, der Strabismus oder die Hypoplasie des Nervus opticus genannt werden. Bei jedem Patienten kann der Verlauf der Erkrankung unterschiedlich sein. Dabei können die Komplikationen vom Kindes- bis hin zum Erwachsenenalter auftreten [42,71].

2.2.3 Genetik der kongenitalen Aniridie

Bei rund einem Drittel der Patienten mit Aniridie tritt die Erkrankung spontan auf, bei zwei Dritteln ist sie hereditär. Kongenitale Aniridien haben einen autosomal dominanten Erbgang [6,71,108].

Die meisten Aniridien werden durch die Haploinsuffizienz des Schlüsseligens PAX6 verursacht [26]. Es sind allerdings auch Aniridien bekannt, bei denen kein Defekt im PAX6-Gen feststellbar ist und deren Sehvermögen im Vergleich zu PAX6-Aniridien besser zu sein scheint [110].

Bei Patienten mit PAX6-Aniridie wurden auf dem Gen PAX6 bislang eine Vielzahl verschiedener Mutationen entdeckt, bei denen alle Genmutationsarten (Substitution, Insertion, Deletion und Duplikation) vorkommen und die in einem Funktionsausfall von PAX6 resultieren [6,13,25,26,41,60,62,63,108]. Mit einer homozygoten Mutation im PAX6-Gen ist der Mensch höchstwahrscheinlich nicht lebensfähig [32].

Die Aniridie kann mit verschiedenen Syndromen einhergehen, das wichtigste ist das WAGR-Syndrom. Das Akronym WAGR steht für Wilms-Tumor, Aniridie, Urogenitale Fehlbildungen und geistige Retardierung. Für diese weiteren Erkrankungen sind Mutationen bzw. der Verlust von Genen verantwortlich, die in der Region neben PAX6 auf dem Chromosom 11 liegen [5,22,55].

2.2.4 Aniridie-assoziierte Keratopathie (AAK)

Mit entscheidend für den Sehverlust bei Aniridie stellen Veränderungen der Kornea dar, die unter dem Begriff ARK (*Aniridia-related keratopathy*), bzw. AAK (*Aniridie-assoziierte Keratopathie*) zusammengefasst werden [81]. Das Vollbild der AAK tritt bei ca. 20% der Patienten mit Aniridie auf, wobei davon wiederum ca. 90% der Patienten eine pathologische Veränderung an der Augenoberfläche

2 Einleitung

besitzen [7]. Je ausgeprägter die AAK bei Patienten ist, desto weniger sind die Vogt'schen Palisaden nachweisbar und desto höher ist der Grad der Limbusstammzellinsuffizienz [50]. Die Pathogenese der AAK ist noch nicht geklärt, auch ist der genaue Zusammenhang zwischen der Limbusstammzellinsuffizienz und der AAK im Rahmen der PAX6-Defizienz noch nicht vollständig verstanden. Möglicherweise führt ein Defekt in der Differenzierung von LEZ im Rahmen der Limbusstammzellinsuffizienz zur AAK [52].

Das Hauptmerkmal der AAK ist die fortschreitende Eintrübung der Kornea, der einige Pathomechanismen zugrunde liegen: Aus der Konjunktiva kommt es zu Gefäßeinsprossungen in die periphere Kornea, die die gesamte Kornea einnehmen können. Konjunktivalzellen, Becherzellen und Entzündungszellen wandern in die Kornea ein und führen über eine chronische Entzündung zu einer bindegewebsartigen Wucherung (Pannusbildung) [20,71,73]. Die Epithelzellen im Pannusgewebe selbst weisen eine aktive Proliferation auf [58]. Die Kornea scheint aufgrund dieser pathologischen Prozesse verdickt zu sein [55]. Die durchschnittliche zentrale Dicke der Kornea betrug in einer Studie mit Aniridie-Patienten 631 μm , sie liegt folglich ca. 100 μm über dem Durchschnitt von Hornhäuten ohne Keratopathie [4,17].

Für die genaue Pathogenese der AAK könnten viele Faktoren eine Rolle spielen: Im Mausmodell mit PAX6-Defizienz war die physiologische Barrierefunktion der Kornea beeinträchtigt [76]. Die für die epitheliale Stabilität der Kornea wichtigen kornealen Strukturproteine DSG1, KRT12 und KRT3 sind bei Aniridie und im Mausmodell vermindert exprimiert [14,51,52], was zum Verlust der physiologischen epithelialen Barriere beitragen könnte. Im Mausmodell mit PAX6-Defizienz war zudem eine erhöhte Apoptose-Rate von Stromazellen feststellbar [83].

Entzündungsprozesse an der Kornea und Wundheilungsstörungen scheinen für den Pathomechanismus der AAK eine zentrale Rolle zu spielen: Im Mausmodell mit PAX6-Aniridie war die Kornea anfälliger für oxidativen Stress und die Wundheilung war deutlich verzögert [76]. In kornealen Epithelzellen wird die Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9) vermindert exprimiert [83]. Ein Mangel an MMP9 resultiert in Fibrineinlagerungen und in der Einwanderung von Entzündungszellen [66]. Des Weiteren führt der Defekt von Glykokonjugaten an der Kornea bei Aniridie ebenso zu Wundheilungsstörungen [48].

2.2.5 Chirurgische Therapieversuche der Aniridie-assoziierten Keratopathie

Die AAK ist sowohl konservativ als auch chirurgisch schwierig zu behandeln. Dennoch gibt es operative Verfahren, die für den Patienten eine Verbesserung des Visus ermöglichen können [1,34,98]:

2 Einleitung

Chirurgische Therapiemöglichkeiten stellen unter anderem die gleichzeitige Amnionmembrantransplantation mit perforierender Keratoplastik (Hornhauttransplantation) [98], die allogene Limbusstammzelltransplantation [34] sowie die Boston Keratoprothese Typ 1, eine künstliche Hornhaut [90], dar.

2.3 Retinolstoffwechsel

2.3.1 Retinolstoffwechsel allgemein

Retinol, ein anderer Begriff für das fettlösliche Vitamin A, spielt für den Körper eine enorm wichtige Rolle. Exemplarisch können folgende Funktionen genannt werden: Vitamin A fördert das Immunsystem [37] und wirkt anti-inflammatorisch [28]. Das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung von Epithelzellen und die Zellintegrität werden durch Vitamin A gefördert [86]. Gerade für die Sehfunktion der Stäbchen in der Retina ist das Retinal (11-cis-Retinal und all-trans-Retinal), die Aldehydform von Retinol, unerlässlich [118].

Retinol kann vom menschlichen Organismus nicht selbst hergestellt werden und muss über die Nahrung aufgenommen werden. Hierzu werden α -, γ - und vor allem β -Carotinoide aus Pflanzen und Retinylester aus tierischen Produkten gewonnen. Die Carotinoide werden in den Enterozyten über mehrere Schritte in Retinylester umgewandelt. Die Retinylester werden in Chylomikronen über die Lymphe zur Leber transportiert [3]. Der Großteil des Retinols (50-80%) im menschlichen Körper wird als Retinylester in den Sternzellen (engl. *Hepatic-stellate-cells*, *HSC*) der Leber gespeichert [99].

Um Retinol zu den Zielzellen zu transportieren, wird es im Blut an das Retinol-Bindeprotein RBP4 gebunden [68]. Der Komplex aus Retinol und dem RBP4 bindet an der Zielzelle an den Rezeptor STRA6 (*Stimulated by Retinoic Acid 6*) und Retinol gelangt ins Zellinnere [44]. Um Retinol in seine Speicherform (Retinylester) [75] und von der Speicherform zurück zu Retinol umzuwandeln, benötigt es das Enzym Lecithin-Retinol-Acyltransferase (LRAT) [89].

Im Zytoplasma bindet Retinol an ein zelluläres Retinol-Bindeprotein (CRBP). Um Retinol in die aktive Form Retinsäure umzuwandeln, benötigt es zwei Oxidationsschritte: Retinol wird durch eine Alkohol-Dehydrogenase (ADH) in Retinaldehyd und Retinaldehyd durch eine Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) in all-trans Retinsäure (ATRA) oxidiert [61]. ATRA, die an ein zelluläres Retinsäure-Bindeprotein (CRABP) bindet, kann nicht-enzymatisch in 9-cis-Retinsäure (9cRA), das Stereoisomer von ATRA, umgewandelt werden [102].

2 Einleitung

Retinsäure kann seine Wirkungen auf zwei verschiedenen Wegen vermitteln: Zum einen über Rezeptoren im Zellkern und zum anderen über Mechanismen, die nicht Rezeptor-vermittelt sind und bislang wenig erforscht sind [91].

Der Wirkmechanismus über den Rezeptor funktioniert folgendermaßen: Die Retinsäure wird an einem CRABP oder an einem *Fatty-acid-Binding-Protein* (FABP) [65] in den Zellkern transportiert und bindet an einen Rezeptor für Retinsäure. Es gibt mindestens drei Rezeptorgruppen für Retinsäure: *Retinoic-Acid-Receptors* (RAR), *Retinoic-X-Receptors* (RXR) und *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors* (PPAR). Diese heterodimeren Rezeptoren haben jeweils mindestens drei Isoformen (RAR_{α, β, γ}, RXR_{α, β, γ} und PPAR_{α, β/δ, γ}), wobei jede Subform verschiedene Prozesse steuert [16,61]. Dabei transportiert das CRABP2 die Retinsäure zum RAR. FABP5 transportiert die Retinsäure ausschließlich zu der PPAR-Subform PPARβ/δ [100]. Die Funktion des CRABP1 ist noch ungeklärt [70,128].

Während RAR eine hohe Affinität für all-trans Retinsäure (ATRA) haben, binden RXR mit hoher Affinität 9-cis-Retinsäure (9cRA) [45,61,64]. Dabei bilden RAR und RXR (RAR/RXR), sowie PPAR und RXR (PPAR/RXR) Heterodimere aus [27,64]. Der Komplex aus Retinsäure und einem heterodimeren Retinsäure-Rezeptor bindet an ein Hormon-responsives Element (HRE), einer Promotorregion in der DNA. Nach der Bindung an das HRE agiert der Komplex als Transkriptionsfaktor für mindestens 500 Gene oder hemmt die Expression anderer Gene [45,61,91].

Um die Konzentration von Retinolderivaten in einem physiologischen Bereich zu halten, werden Retinolderivate wieder abgebaut. Hierfür wird Retinsäure zunächst durch die Cytochrom P450 26 (CYP26)-Enzymfamilie, von der es die Unterformen CYP26A1, CYP26B1 und CYP26C1 gibt, in die Metabolite 4-hydroxy-Retinsäure, bzw. 4-oxo-Retinsäure oxidiert. Anschließend wird der Metabolit mit Glucuronsäure gekoppelt und kann ausgeschieden werden [85].

Die starke Förderung der Zelldifferenzierung durch all-trans Retinsäure (ATRA) macht man sich bei der Therapie der Akuten Promyelozytenleukämie (APL) zu Nutzen [23].

2.3.2 Retinolstoffwechsel in der Augenoberfläche

Vitamin A ist für die Augenentwicklung von Säugetieren eminent wichtig [9]. So führt bei Ratten ein schwerer maternaler Vitamin A-Mangel in der Filialgeneration zu schwerwiegenden Augenfehlbildungen, unter anderem auch zur Hypoplasie der Iris [39].

Retinol wird über Blutgefäße und den Tränenfilm zur Augenoberfläche transportiert [114] und in kornealen Epithelzellen weiter zu Retinsäure umgewandelt [72]. Das Vorhandensein von allen wichtigen Komponenten des Retinolstoffwechsels an der Augenoberfläche ist eine wichtige

2 Einleitung

Voraussetzung für Versuche mit Retinolderivaten an der Augenoberfläche. So finden sich in der Kornea und der Konjunktiva Retinol- und Retinsäure bindende Proteine (CRBP und CRABPs), Retinol verstoffwechselnde Enzyme (ADHs und RALDHs) sowie Retinsäure-Rezeptoren (RARs und RXRs) [72].

Retinolderivate haben für die Funktionalität der Augenoberfläche eine große Bedeutung: Membran-gebundene Muzine, die zur Aufrechterhaltung des Flüssigkeitsfilms an der Oberfläche beitragen, werden durch die Stimulation mit Retinsäure vermehrt exprimiert [35]. Weiterhin werden Wundheilungsprozesse in der Kornea durch Retinsäure gefördert [2]. Im Tierversuch war die Wundheilung kornealer Epitheldefekte von Kaninchen durch die topische Anwendung mit Retinsäure signifikant schneller als ohne Retinsäure [40]. Des Weiteren scheint Retinsäure für die korneale Epithelbarriere eine wichtige Rolle zu spielen [46]. Humane LEZ, die im Zellmodell ohne Retinolderivate eine verhornte Keratinschicht aufweisen, zeigen unter der Behandlung mit Retinsäure keine oder eine deutlich verminderte Verhornung [46].

Die Tatsache, dass Retinsäure die Differenzierung von LEZ zu transient amplifizierten Epithelzellen und damit die korneale Epithelialisierung fördert, wurde bereits mehrfach beschrieben und ist die zentrale Funktion im Hinblick auf diese Arbeit [91].

Retinsäure ist für das Ausbilden einer ausreichend breiten kornealen Stromadicke und für die normale Proliferation der kornealen Epithelzellen wichtig [49].

2.3.3 Fehlfunktion der Augenoberfläche über Retinolstoffwechsel

Für die Wirkung von Retinolderivaten an der Augenoberfläche ist die richtige Konzentration von hoher Bedeutung. Eine Abweichung nach unten oder nach oben hat negative Auswirkungen auf die Augenoberfläche zur Folge [91].

Am gesund entwickelten Auge führt ein Vitamin A-Mangel zum Krankheitsbild Xerophthalmie, der Austrocknung der Augenoberfläche und zur Keratopathie [104]. Aufgrund der fehlenden Differenzierung, die normalerweise durch Vitamin A gesteuert wird, findet an der Konjunktiva und an der Kornea eine Metaplasie statt. Es kommt sowohl an der Konjunktiva als auch an der Kornea zur Keratinisierung des Epithels sowie zum Mangel an Becherzellen in der Konjunktiva, die zum Austrocknen der Augen führen. Über Ulzerationen können gar Nekrosen entstehen [103].

Die Keratinisierung und das Austrocknen der Augen im Rahmen der Xerophthalmie ist nach lokaler Therapie mit Vitamin A reversibel [77]. Dabei hat die topische Anwendung von Retinsäure an einem Auge auch eine Therapiewirkung am anderen Auge, was auf eine systemische Wirkung hindeutet [30].

2 Einleitung

Dass der Retinolstoffwechsel auch über weitere Pathomechanismen an einer Keratopathie beteiligt sein kann, zeigt eine Studie mit Notch1-Knockout-Mäusen: Die Signaltransduktion über den Notch-Membranrezeptor führt über eine Signalkaskade zur Genexpression und reguliert damit wichtige Zellprozesse wie z.B. Differenzierung, Proliferation und Zelltod [47]. Notch1 ist an der Differenzierung von kornealen Epithelzellen beteiligt und ist über die Steuerung von CRBP1 direkt mit dem Retinolstoffwechsel verknüpft. Ein Notch1-Knockout führt in Mäusen zu einer Differenzierungsstörung, die mit einem verhornten Epidermis-ähnlichen Epithel einhergeht. Der Notch1-Knockout mündet in eine Keratopathie [116].

Eine zu hohe Konzentration von Retinolderivaten ruft in der Augenoberfläche toxische Effekte hervor. So heilt bei Patienten mit Xerophthalmie, die drei Mal täglich topisch mit 0,1% Retinsäure behandelt werden, das behandelte Auge komplikationslos aus. Die fünfmalige tägliche Therapie mit Retinsäure bewirkt jedoch laut A. Sommer eine Abheilung mit schwerwiegenden Nebenwirkungen: Es kommt zu vermehrter Narbenbildung, vermehrten Gefäßeinsprossungen sowie teilweise zu Ulzera, weswegen die Therapie mit dieser Dosierung abgebrochen werden musste [103].

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

2.4.1 Stammzell- und Differenzierungsmarker

PAX6

Das Paired-box Protein 6 liegt auf der Bande p13 des Chromosoms 11, hat zwei DNA-Bindedomänen, eine Paired-Domäne und eine Homeodomäne und agiert als Transkriptionsfaktor [6].

Das PAX6-Gen spielt in der Embryogenese der Augen eine zentrale Rolle. In der Augenentwicklung gilt PAX6 als Master-Kontrollgen. Es ist im Ektoderm und den daraus entstehenden Strukturen des Auges exprimiert [74]. Ebenso ist PAX6 im Zeitraum der Augenentwicklung exprimiert (Tag 8,5 – 15,5 post conceptionem), in dem die Linse, die Retina und die Kornea angelegt werden [29,119].

Die Wichtigkeit von PAX6 für die Augenentwicklung unterstreichen Tiermodelle mit PAX6-Fehlfunktion: Sowohl homozygote als auch heterozygote Mutationen im PAX6-Gen (*Small eye*) führen bei Mäusen zu schweren Fehlbildungen des Auges. Mäuse mit homozygoten Mutationen sind nicht lebensfähig [33,79].

2 Einleitung

Eine artifizielle ektoische Expression des PAX6-Gens führt bei *Drosophila* zur Bildung von Augenanlagen [29]. Das PAX6-Gen von *Drosophila* ist homolog zu dem PAX6-Gen von Mäusen und von Menschen [80]. Eine Fehlfunktion von PAX6 bei *Drosophila* und bei Mäusen und der daraus resultierende Phänotyp legen eine zentrale Funktion von PAX6 bei Menschen nahe. So war ein Fetus, dessen Eltern beide eine kongenitale Aniridie haben, mit einer vermuteten homozygoten PAX6-Mutation aufgrund schwerwiegender Fehlbildungen (kleines Gehirn, keine Nase und Augen, keine Nebenniere) nicht lebensfähig [32]. Einen ähnlichen Phänotyp zeigte ein ebenfalls nicht lebensfähiges Neugeborenes mit Compound-Heterozygotie von PAX6 [26].

PAX6 ist für die physiologische Ausbildung des kornealen Epithels essenziell [10], der Marker kommt in allen Gewebeteilen der Kornea, besonders im zentral-apikalen Teil, vor [92].

Von PAX6 gibt es zwei Isoformen, PAX6-a und PAX6-b, die beide in Epithelzellen von Kornea und Limbus vorkommen. Dabei korrelieren die Isoformen in der Zellkultur mit der Expression der Keratine 3 und 12. Die PAX6-a-Form fördert zusammen mit dem Transkriptionsfaktor *Kruppel-like factor 4* (KLF4) die Expression von KRT3. Die PAX6-b-Form fördert zusammen mit den Transkriptionsfaktoren *Octamer-binding transcription factor 4* (OCT4) und KLF4 die Expression von KRT12 [92].

ABCG2

Das Protein ABCG2 gehört zu der Familie der ABC (*ATP binding cassette*)-Transporter, die mit dem aktiven Stofftransport über die Zellmembran in die Zelle bzw. aus der Zelle eine enorm wichtige Aufgabe für den Organismus haben [31].

ABCG2 ist ein Effluxtransporter, der in vielen Organsystemen, wie z.B. der Leber oder in Blut-Gewebe-Schranken (z.B. Blut-Hirn-Schranke) vorkommt. Es wird diskutiert, inwieweit er am Auswärtstransport von Steroidhormonen, Vitaminen, Harnsäure, Medikamenten und potenziell toxischen Stoffen beteiligt ist [69,78,106,117].

Weil ABCG2 in LEZ stärker als in kornealen Epithelzellen exprimiert wird, gilt der Marker als potenzieller Stammzellmarker [15,121].

Ein anderer Begriff für ABCG2 ist BCRP (*Breast Cancer Release Protein*), da dieser Transporter für das Herauspumpen von Chemotherapeutika aus Krebszellen verantwortlich gemacht wird [18].

2 Einleitung

ADH7 und ALDH1A1

Die Alkohol-Dehydrogenase 7 (ADH7) gehört zur Familie der Alkohol-Dehydrogenasen, die sich durch die reversible Oxidation von Alkoholen auszeichnen [39]. ADH7 katalysiert unter anderem die reversible Oxidation von Retinol zu Retinaldehyd und ist damit unmittelbar am Retinolstoffwechsel beteiligt [126]. Die Aldehyd-Dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) gehört zur Familie der Aldehyd-Dehydrogenasen und katalysiert die irreversible Oxidation von Retinaldehyd zu Retinsäure [115].

ADH7 und ALDH1A1 sind auf Transkriptionsebene in der Kornea stärker exprimiert als in der Konjunktiva [112]. Die mRNA-Level von ADH7 und ALDH1A1 sind in LEZ von Patienten mit Aniridie und im Aniridie-Zellmodell herunterreguliert [52].

2.4.2 **Strukturproteine**

KRT3, KRT12

Keratine sind Marker für Epithelzellen. Sie sind als Proteine für die Bildung von Intermediärfilamenten notwendig und damit bedeutend für die Zellstruktur [67].

Die Marker KRT12 und KRT3 sind sehr wichtige Strukturproteine des Epithels der Kornea und gelten als korneale Marker, da sie fast nur im kornealen Epithel und nicht in der Konjunktiva nachweisbar sind [112]. Einerseits sind LEZ KRT12- und KRT3- negativ und andererseits sind korneale Epithelzellen KRT12- und KRT3- positiv, was auf deren Eigenschaft als Differenzierungsmarker hindeutet [94,95]. KRT3 als leicht basisches Protein und KRT12 als saures Protein kommen in der Regel paarig vor, sie werden oft zusammen exprimiert [8]. Fehlfunktionen dieser Proteine führen zu funktionellen Einschränkungen des Epithels: So haben Mutationen im KRT3- bzw. KRT12-Gen eine Hornhautdystrophie (*Meesmann's Corneal Dystrophy*) zur Folge [11,38].

Eine Studie mit humanen kornealen Epithelzellen zeigt, dass KRT3 und KRT12 häufiger im zentral-apikalen Teil und weniger in anderen Teilen der Kornea vorkommen [92].

Bezogen auf die Aniridie sind die Marker KRT12 und KRT3 in primären LEZ bei AAK-Patienten mit PAX6-Aniridie herunterreguliert [51]. KRT3 und KRT12 sind in kornealen Epithelzellen von Aniridie-Patienten auf Proteinebene herunterreguliert [111]. Ebenso ist KRT12 im Kornea-Epithel von Mäusen mit PAX6-Defizienz auf Proteinebene vermindert exprimiert [82].

2 Einleitung

Auch andere Erkrankungen der Augenoberfläche, wie das Pterygium conjunctivae, gehen mit einer Pannusbildung einher. Auch bei dieser Erkrankung ist die Expression von KRT12 im Korneaepithel bei Patienten vermindert [58]

KRT19

Der Marker KRT19 kann zwar überall auf der Augenoberfläche (Kornea, Limbus, Konjunktiva) nachgewiesen werden [84], kommt allerdings vermehrt in der Konjunktiva vor, sodass er als konjunktivaler Marker betrachtet werden kann [112]. Weil KRT19 in LEZ stärker als in kornealen Epithelzellen exprimiert ist, kann KRT19 als potenzieller Stammzellmarker angesehen werden [95]. In Keratozyten ist die Genexpression von KRT19 durch Retinsäure erhöht [36].

DSG1

DSG1 gehört zur Familie der Desmogleine, einer Untergruppe der Cadherine. Es ist ein wichtiger Baustein von Desmosomen und damit für die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten bedeutend. Dabei kommt DSG1 nur in bestimmten Organen, beispielsweise in der Epidermis, nicht aber in anderen Geweben, wie dem Myokard, vor [93,105]. In der Kornea nimmt DSG1 eine wichtige Rolle für die Stabilität der Kornea ein. Die Proteinexpression von DSG1 ist im Aniridie-Mausmodell stark vermindert, was im Elektronenmikroskop mit lückenhaften Zellverbindungen in kornealen Epithelzellen einhergeht [14]. Auch bei Patienten mit PAX6-Aniridie und zusätzlich im siRNA-basierten Aniridie-Zellmodell gegen PAX6 ist DSG1 herunterreguliert [52].

DSG1 agiert als potenzieller Differenzierungsmarker, da es im differenzierten epidermalen Gewebe stärker exprimiert wird als im undifferenzierten Gewebe [125]. Auch im Korneaepithel wird DSG1 auf Proteinebene stärker exprimiert als in undifferenzierten LEZ [88].

2.4.3 **Andere Marker**

SPINK7

SPINK7 ist ein Serinprotease-Inhibitor vom Kazal-Typ [120]. In stark differenzierten humanen epidermalen Keratinozyten ist SPINK7 vermehrt exprimiert [122], was auf eine potenzielle Rolle als Differenzierungsmarker hindeuten könnte.

2 Einleitung

Die mRNA von SPINK7 ist sowohl bei Aniridie-Patienten als auch im Aniridie-Zellmodell in Abhängigkeit zu PAX6 herunterreguliert [52].

Ki67

Ki67 ist ein Protein, das im Zellkern vorkommt und als Marker für Zellproliferationen dienen kann, da es vermehrt in den aktiven Zellphasen (G₁-, S-, G₂-, M-Phase) und weniger in der inaktiven Zellphase G₀ nachweisbar ist.

Diese Eigenschaft von Ki67 hat man sich in der Tumordiagnostik (z.B. beim Brustkrebs) zu Nutzen gemacht, denn oftmals korreliert eine erhöhte Expression von Ki67 mit einer erhöhten Zellproliferation und damit mit dem Schweregrad der Tumorerkrankung [57,96].

2.5 Retinolstoffwechsel bei kongenitaler Aniridie und Zielsetzung der Arbeit

Für den Pathomechanismus der AAK scheinen gestörte epitheliale Barrieren, eine chronische Entzündung und eine gestörte Wundheilungsstörung entscheidend zu sein [48,71,76]. Genau an diesen Mechanismen setzt laut Literatur die Wirkung von Retinolderivaten an: Retinolderivate fördern die epitheliale Stabilität, sie wirken anti-inflammatorisch und sie fördern Wundheilungsprozesse [2,28,49]. Daher ist die Erforschung des Einflusses von Retinolderivaten auf den Pathomechanismus der AAK insbesondere für eine mögliche Therapie, die am Retinolstoffwechsel ansetzt, von hoher Bedeutung.

2 Einleitung

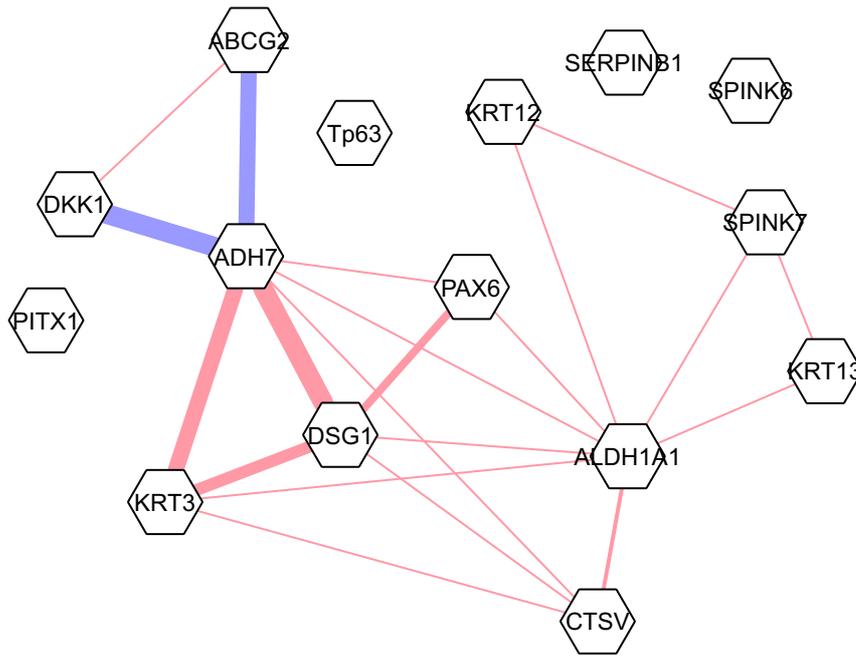


Abbildung 2. Korrelationsanalyse von Aniridie-relevanten Genen. Die Abbildung zeigt die Korrelation von Genen aus Limbusepithelzellen bei gesunden Patienten, die bei Aniridie relevant sind. In Rot sind die positiven Korrelationen dargestellt und in blau die negativen Korrelationen. Je dicker die Verbindungslinien sind, desto stärker ist die Korrelation zwischen den Genen ausgeprägt. Quelle: Latta et al., 2019, [52]

Zwischen den Genen PAX6, ADH7, KRT3 und DSG1 besteht eine starke Korrelation (siehe Abb. 2), die in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wird.

Mit dieser Korrelationsanalyse lässt sich jedoch keine Aussage darüber machen, wie sich die Gene gegenseitig regulieren.

2 Einleitung

Ausgangssituation über PAX6

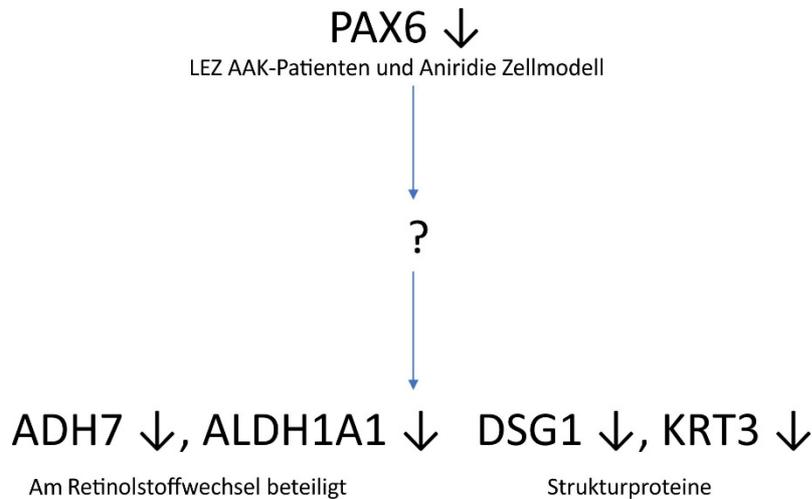


Abbildung 3. Modell für die Ausgangssituation wichtiger mit PAX6 korrelierender Marker: Die Herunterregulation von PAX6 bewirkt auf unbekannt Weise die Herunterregulation von am Retinolstoffwechsel beteiligten Enzymen (ADH7, ALDH1A1) und von Strukturproteinen (z.B. DSG1, KRT3).

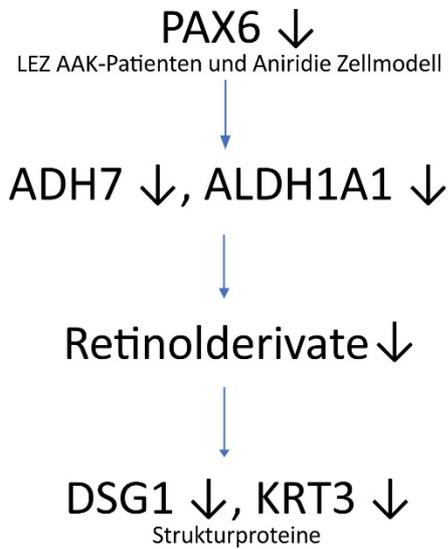
Die Genexpression von ADH7 und ALDH1A1 ist bei Patienten mit PAX6-Aniridie vermindert. Ebenso zeigte sich eine signifikant herabgesetzte Expression dieser Gene in einem siRNA-Zellmodell, in dem PAX6 stark herunterreguliert wurde (siehe Abb. 3) [52]. Dies zeigt, dass PAX6 einen unmittelbaren Einfluss auf Enzyme des Retinolstoffwechsels haben könnte und wegen der weniger vorhandenen Enzyme ADH7 und ALDH1A1 und der damit verbundenen geringeren Umsetzung von Retinol zu Retinsäure das Angebot des aktiven Metabolits Retinsäure in LEZ sinken könnte. Auch andere Marker wie DSG1 oder KRT3 sind bei PAX6-Aniridie vermindert exprimiert (siehe Abb. 3) [51].

Es gibt verschiedene Hypothesen, wie PAX6 die Regulation von Differenzierungsmarkern wie DSG1 und KRT3 steuern kann:

2 Einleitung

Hypothese 1

A



B

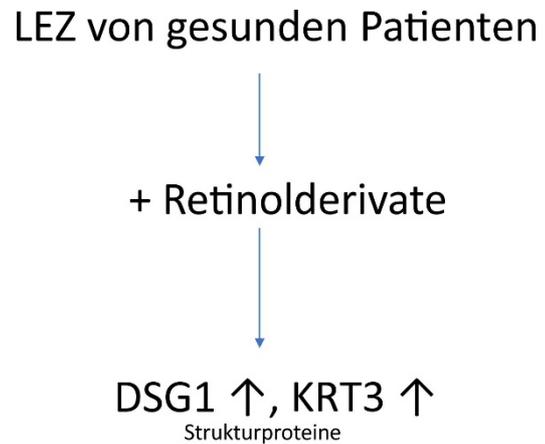
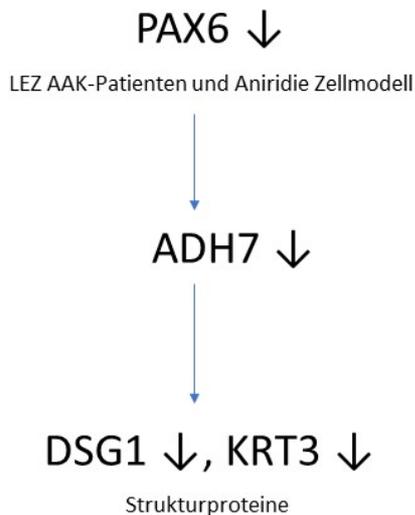


Abbildung 4. Mögliche Regulationsmechanismen von Markern über Retinolderivate. (A) Mögliche Regulation von PAX6 auf Differenzierungsmarker (DSG1 und KRT3) über verminderte Expression von ADH7 und ALDH1A1 und geringeres Angebot an Retinolderivaten. (B) Bei der korrekten Hypothese aus (A) müssten DSG1 und KRT3 durch Retinolderivate hochreguliert werden.

Das wirft die Arbeitshypothese auf, ob (1) PAX6 diese Marker (z.B. DSG1) über den Retinolstoffwechsel reguliert und die Differenzierungsmarker wegen der verminderten Menge an Retinolderivaten und der damit verbundenen möglichen geringeren Differenzierung herunterreguliert sind (siehe Abb. 4, A). Falls diese Hypothese zutrifft, müssten die Marker ADH7, DSG1 und KRT3 bei Zugabe von Retinolderivaten in gesunden LEZ ansteigen (siehe Abb. 4, B). Ein Anstieg der Differenzierungsmarker DSG1 und KRT3 würde demnach für eine durch Retinolderivate verstärkte Differenzierung von LEZ sprechen.

Hypothese 2

A



B

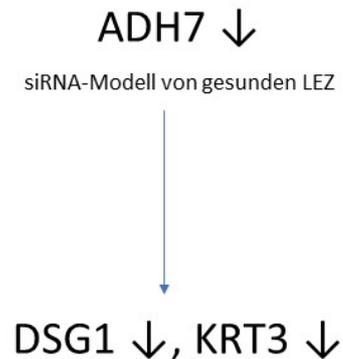


Abbildung 5. Mögliche Regulationsmechanismen von Markern über ADH7. (A) Mögliche Regulation von PAX6 auf DSG1 und KRT3 über die Herunterregulation von ADH7. (B) Der möglichen Hypothese aus (A) müsste im siRNA-Modell gegen ADH7 eine Herunterregulation von DSG1 und KRT3 folgen.

Die andere Hypothese (2) ist, dass die Marker anders und demnach nicht über Retinolderivate gesteuert werden. Möglicherweise könnten die Marker DSG1 und KRT3 über die durch PAX6- induzierte Herunterregulation von ADH7 direkt reguliert werden (siehe Abb. 5, A). Hierzu wurde ein siRNA-Experiment durchgeführt, bei dem LEZ mit einer siRNA gegen ADH7 behandelt wurden. Dieser Effekt auf die anderen Marker wurde auf Transkriptebene und Proteinebene untersucht. Wenn DSG1 und KRT3 direkt durch ADH7 herunterreguliert werden würden, müssten sie im siRNA-Modell ebenfalls herunterreguliert sein (siehe Abb. 5, B).

Potenzielle Rolle von ABCG2 im Retinolstoffwechsel

Tarapcsák et al. zeigen auf, dass bestimmte Retinolderivate in direkter Verbindung mit dem Effluxtransporter ABCG2 stehen. So können Retinolderivate das Herausbefördern von Mitoxantron, ein Substrat des Transporters, verhindern, sie besitzen demnach eine Bindestelle am aktiven oder allosterischen Zentrum [107].

2 Einleitung

Es stellt sich nun die Frage, ob Retinolderivate selbst Substrate von ABCG2 sind. ABCG2 könnte damit Retinolderivate aus der Zelle befördern und damit die Zelldifferenzierung, die durch Retinolderivate gefördert wird, stoppen. Um dies zu prüfen, wurden die LEZ sowohl mit Retinol als auch mit dem ABCG2-Blocker Ko143 behandelt. Es wurde beobachtet, ob die Genexpression sich im Vergleich mit der Kontrolle und mit der alleinigen Behandlung mit Retinol verändert.

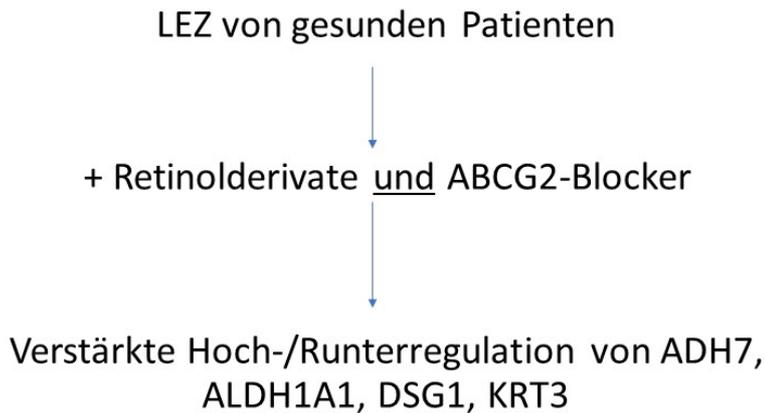


Abbildung 6. Modell für mögliche Wirkung des ABC-Transporters ABCG2 als Auswärtstransporter für Retinol: Durch den ABCG2-Blocker müsste die Regulation im Vergleich zur alleinigen Retinolwirkung signifikant verändert sein.

Um die Hypothese zu bestätigen, dass der ABC-Transporter ABCG2 am Auswärtstransport von Retinol beteiligt sein könnte, müsste eine Steigerung der Retinolwirkung aufgrund des ABCG2-Blockers Ko143 feststellbar sein (siehe Abb. 6). Die Regulation mit dem ABCG2-Blocker wäre im Vergleich zur Retinolwirkung signifikant verändert.

Zusammenfassung der Zielsetzungen:

Das Ziel dieser Arbeit bestand zum einen darin, herauszufinden, ob die Differenzierung der LEZ durch die Behandlung mit Retinolderivaten gefördert wird. Zum anderen wurde ermittelt, ob die Differenzierung der LEZ durch eine Herunterregulation gegen ADH7, die mittels siRNA induziert wurde, vermindert werden kann. Zusätzlich wurde untersucht, ob der ABC-Transporter ABCG2 am Auswärtstransport von Retinol beteiligt ist.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Geräte

Tabelle 1. Verwendete Geräte und Hersteller.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Heraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Imaging System LAS 4000	GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfon, UK
Inkubator HERAccl 240i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Megafuge Heraeus16R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Primovert - inverses Lichtmikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH; Jena, Deutschland
QuantStudio 5 Real-Time-PCR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Shaker Dos-10L	neoLab Migge GmbH; Heidelberg, Deutschland
Stereolupe OPM11-FR	Carl Zeiss Microscopy GmbH; Jena, Deutschland
Sterilwerkbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Thermoblock TB2	Biometra GmbH Analytik Jena, Jena, Deutschland
Thermocycler CFX Connect	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Trans Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., New York, USA

Labormaterialien

Tabelle 2. Verwendete Labormaterialien und Hersteller.

<u>Material</u>	<u>Hersteller</u>
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
Cell Scraper, 28 cm length	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 Serological Pipette 5 ml	Greiner Bio One International GmbH; Kremsmünster, Österreich
Cellstar Tubes 15 ml	Greiner Bio One International GmbH; Kremsmünster, Österreich

3 Material und Methoden

Cellstar Tubes 50 ml	Greiner Bio One International GmbH; Kremsmünster, Österreich
Cell-Tricks	System 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
Kryotubes, Größe 1,8 ml	Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht, Deutschland
PCR-Tubes 0,2 ml	Greiner Bio One International GmbH; Kremsmünster, Österreich
Petrischalen	Greiner Bio One International GmbH; Kremsmünster, Österreich
PIPETBOY acu 2	INTEGRA Biosciences AG; Zizers, Schweiz
TC Platte 24 Well, Standard F	Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht, Deutschland
TC Platte 6 Well, Standard F	Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht, Deutschland

Chemikalien und Kits

Tabelle 3. Verwendete Chemikalien/Kits und Hersteller.

<u>Chemikalie/Kit</u>	<u>Hersteller</u>
4-12%iges NuPage Bis-Tris SDS Gel	Invitrogen, Waltham, MA, USA
ABCG2-Blocker Ko143	Sigma-Aldrich GmbH Deisenheim, Deutschland
Bradford Reagenz	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
BSA	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Collagenase A	Roche Pharma AG, Schweiz
Cryo-SFM	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
DMEM	Sigma-Aldrich GmbH Deisenheim, Deutschland
dual-colour-Marker	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Dulbeccos PBS	Sigma-Aldrich GmbH Deisenheim, Deutschland
Glycerin	Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlandes
KSFM	Gibco, Carlsbad, USA
Lipofectamine 2000 Transfection Reagent	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
MOPS-Puffer	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
One Taq RT-PCR Kit	New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland
Opti-MEM	Gibco, Carlsbad, USA
Retinol	Sigma-Aldrich GmbH Deisenheim, Deutschland
All-trans-Retinsäure	Sigma-Aldrich GmbH Deisenheim, Deutschland
RNA/DNA/Protein isolation kit (Isolate II)	Bioline, London, UK

3 Material und Methoden

RNase freies Wasser	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
SYBR-Green	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
TRIS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich GmbH Deisenheim, Deutschland
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

Primer für die qPCR

Tabelle 4. Primer für die qPCR.

<u>Primer</u>	<u>Cat. No</u>	<u>Amplifikationsgröße (bp)</u>	<u>Hersteller</u>
ALDH1A1	QT00013286	97 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
ADH7	QT00000217	85 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
DSG1	QT00001617	96 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
KRT3	QT00050365	118 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
KRT12	QT00011949	104 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
ABCG2	QT00073206	114 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
PAX6	QT00071169	113 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
SPINK7	QT00039585	126 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Ki67	QT00014203	86 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
KRT19	QT00081137	117 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
TBP	QT00000721	132 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
GUSB	QT00046046	96 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

siRNA

Tabelle 5. Verwendete siRNAs.

<u>siRNA</u>	<u>Basensequenz</u>	<u>Hersteller</u>
Kontroll- siRNA	AGGUAGUGUAAUCGCCUUG	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland
ADH7- siRNA	(Proprietär)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
GAPDH- siRNA	AUCCAUGGCACCGUCAAG(UU)	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland

3 Material und Methoden

Antikörper

Tabelle 6. Verwendete Antikörper, Katalognummer, Hersteller und Verdünnung.

<u>Antikörper</u>	<u>Katalognummer</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Verdünnung</u>
PAX6 (anti-Maus)	Sc-32766	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA	1:200
KRT12 (anti-Maus)	sc-515882	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA	1:200
ADH7 (anti-Kaninchen)	PA5-26709	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	1:500
DSG1 (anti-Maus)	sc-59904	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA	1:200
<i>ACTB</i> (anti-Kaninchen)	A8227	Abcam, Cambridge, UK	1:5000

Hergestellte Medien und Puffer

Standardmedium:

- 500 ml KSFM
- 2,5 µg EGF
- 25 mg BPE

Laemmli-Puffer:

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

3.2 Methoden

Die Verwendung von Spenderzellen wurde von der Ethikkommission des Saarlandes (Ethiknummer 226/15) stattgegeben.

Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Versuchszellen stammen von Hornhautspenden der LIONS Hornhautbank Saar-Lor-Lux, Trier/Westpfalz.

3.2.1 Zellkultur und Behandlung von Limbusepithelzellen mit Retinolderivaten

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

LEZ-Isolation:

Das Ziel der Präparation von Spenderhornhäuten bestand darin, LEZ aus dem Spendermaterial zu isolieren. Hierfür wurde der Bereich des Limbus mithilfe eines Mikroskops identifiziert und mithilfe einer 1,5 mm Biopsie-Stanze ausgestanzt. Das vorgestanzte Gewebe wurde mit einer kleinen Schere herausgeschnitten und in eine 24-Well-Platte mit 500 µl Kollagenase A gelegt. Anschließend wurde das Gewebe für 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Isolation und Präparation der primären LEZ:

Die LEZ wurden nach 24 Stunden aus der Präparation herausgefiltert. Hierfür wurden die Zellen auf einen Zellfilter einpipettiert und 10 ml *Phosphate buffered Saline* (PBS) oben hinzu pipettiert. Die Zellen wurden durch 2,5 ml Trypsin aus dem Filter gelöst und 5 Minuten inkubiert, um eine Einzelzellsuspension zu generieren. Die Reaktion wurde mit 3 ml *Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12* (DMEM/F12), supplementiert mit 5% FCS, gestoppt. Anschließend wurden die Zellen bei 800 g für 5 Minuten zentrifugiert. Das Medium wurde entfernt und die Zellen in 500 µl *Keratinocyte serum-free medium* (KSFM) resuspendiert, in ein Well einer 24-Well-Platte eingesät und kultiviert. Zum Anwachsen der Kultur wurden die Zellen bei 37°C inkubiert.

Das Medium wurde alle drei Tage gewechselt, um optimale Wachstumsbedingungen herzustellen. Das Zellwachstum wurde jeden Tag mit dem Mikroskop kontrolliert.

3 Material und Methoden

Passagieren der Zellen in eine 6-Well-Platte:

Nachdem die LEZ in einem Well der 24-Well-Platte zu ca. 90% konfluent waren, wurden sie in eine 6-Well-Platte eingesät. Das KSFM wurde entfernt und 500 µl Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung dazugegeben, um die adhärenen Zellen vom Boden der Platte lösen. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C für fünf Minuten inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden 500 µl DMEM (mit 5% FCS) dazugegeben und in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Die Zellen wurden bei 800 g für fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, 1 ml PBS zum Zellpellet gegeben und die Zentrifugation für fünf Minuten mit 800 g wiederholt. Das PBS wurde verworfen, das Pellet in 1 ml KSFM gelöst und in ein Well einer 6-Well-Platte einpipettiert. Dazu wurden noch 2 ml KSFM dazugegeben. Es erfolgte die Kultivierung bei 37°C, bis die Zellen konfluent angewachsen waren.

Zellpassage in drei Wells einer 6-Well-Platte:

Als die LEZ im Well konfluent waren, konnten sie auf drei Wells einer 6-Well-Platte aufgeteilt werden. Hierzu wurden die LEZ wie oben beschrieben in ein Well einer 6-Well-Platte passagiert und diesmal auf drei Wells aufgeteilt.

Behandlung der Zellen mit Retinoiden und dem ABCG2-Blocker

Vor der Behandlung der Zellen wurden Stammlösungen der Retinolderivate und des ABCG2-Blockers angesetzt, welche die Einstellung der Endkonzentration des Mediums mit möglichst wenig Lösungsmittel (DMSO) ermöglichten.

Bei den drei verschiedenen Zellbehandlungen wurden folgende Substanzen in folgenden Konzentrationen und Behandlungszeiten eingesetzt (siehe Tab. 7 und 8, S. 27-28)

Tabelle 7. Behandlungssubstanzen und Endkonzentrationen der Retinolderivate bei der 24-stündigen Behandlung von LEZ.

<u>Behandlung Retinol</u>	<u>Behandlungssubstanz</u>	<u>Endkonzentration Retinolderivat [µM]</u>
1. Well	DMSO-Kontrolllösung	0
2. Well	Retinol	0,5
3. Well	Retinol	1,5

3 Material und Methoden

<u>Behandlung Retinsäure</u>	<u>Behandlungssubstanz</u>	<u>Endkonzentration Retinolderivat [μM]</u>
1. Well	DMSO-Kontrolllösung	0
2. Well	All-trans-Retinsäure	0,5
3. Well	All-trans-Retinsäure	1,5

Tabelle 8. Behandlungssubstanzen und Endkonzentrationen der Retinolderivate bei der 48-stündigen Behandlung von LEZ.

<u>Behandlung Retinol</u>	<u>Behandlungssubstanz</u>	<u>Endkonzentration Retinolderivat [μM]</u>
1. Well	DMSO-Kontrolllösung	0
2. Well	Retinol	1
3. Well	Retinol	5
<u>Behandlung Retinsäure</u>	<u>Behandlungssubstanz</u>	<u>Endkonzentration Retinolderivat [μM]</u>
1. Well	DMSO-Kontrolllösung	0
2. Well	All-trans-Retinsäure	1
3. Well	All-trans-Retinsäure	5
<u>Behandlung Retinol + ABCG2-Blocker</u>	<u>Behandlungssubstanz</u>	<u>Endkonzentration Retinolderivat und ABCG2-Blocker [nM]</u>
1. Well	DMSO-Kontrolllösung	0
2. Well	Retinol	100
3. Well	Retinol + ABCG2-Blocker	je 100

Als Kontrolle wurde Dimethylsulfoxid (DMSO), das im gleichen Volumen wie für die Behandlung mit Retinoiden und dem ABCG2-Blocker eingesetzt wurde, verwendet (max. 5 μl). Nachdem die LEZ behandelt wurden, wurden sie für 24 bzw. 48 Stunden bei 37°C inkubiert.

3.2.2 RNA/Protein-Isolation

Zur RNA- und Protein-Isolation wurde das Medium (KSFM + Behandlungssubstanz) von den Zellen entfernt, anschließend wurde jedes Well in 2 ml PBS gewaschen. Das PBS wurde wieder entfernt und in jedes Well 300 μl Lysepuffer pipettiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst und in ein Eppendorfgefäß pipettiert.

3 Material und Methoden

Aus den so gewonnenen Zelllysaten wurden die RNA und die Proteine über ein Silica-basiertes Säulensystem isoliert. Die Isolation wurde nach dem standardisierten Protokoll von Bioline (Katalognummer BIO-52085) durchgeführt.

Die RNA-Konzentration wurde mithilfe eines Nano-Drop Spektralphotometers gemessen. Dabei wurde mittels *Ultraviolet/Visible (UV/VIS)*-Spektroskopie und dem modifizierten Lambert-Beerschen Gesetz $c = (A \cdot e) / b$ die RNA-Konzentration (in ng/μl) berechnet. Hierzu wurde die gemessene Absorption des Lichts durch die RNA ($A =$ gemessene Absorptions-Unit [AU]), der Extinktionskoeffizient ($e = 40$ [ng*cm/μl]) und der festgelegte Abstand zwischen den Messsockeln ($b = 0,1$ [cm]) verwendet (*Thermo Fisher Scientific: NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8 User's Manual*, Seiten 5-1, 5-2, 7-1, 19-1, 19-2). Es wurden 500 ng RNA pro cDNA-Synthese eingesetzt und die dafür erforderliche RNA-Menge aus der RNA-Konzentration berechnet.

3.2.3 cDNA-Synthese und quantitative Polymerasekettenreaktion

cDNA-Synthese

Die Herstellung der cDNA erfolgte standardisiert nach dem Protokoll des OneTaq RT-PCR Kits von New England BioLabs. Der Reaktionsmix für eine Reaktion für die cDNA-Synthese setzte sich folgendermaßen zusammen (siehe Tab. 9).

Tabelle 9. Reaktionsmix für eine Reaktion für die cDNA-Synthese. Die erforderliche RNA-Menge für den Reaktionsmix 1 wurde aus der gemessenen RNA-Konzentration [ng/μl] so berechnet, dass 500 ng RNA pro cDNA-Synthese eingesetzt wurden. Weil im ersten Reaktionsmix ein Gesamtvolumen von 8 μl und das Volumen des Oligo d(T)23 Primers mit 2 μl vorgegeben ist, muss das RNA-Volumen zwischen 0 und 6 μl liegen. Aus dem Gesamtvolumen des ersten Reaktionsmix (8 μl), dem berechneten RNA-Volumen und dem Volumen des Oligo d(T)23 Primers (2 μl) wurde das Volumen von H₂O [μl] berechnet.

<u>Reaktionsmix</u>	<u>Volumen [μl]</u>
<u>Reaktionsmix 1</u>	
RNA (500 ng)	x (Die Variable x steht für eine beliebige Zahl zwischen 0 und 6)
Oligo d(T)23 Primer	2
H ₂ O (Nuclease-frei)	Volumen _{Gesamt Reaktionsmix 1} - (Volumen _{RNA} + Volumen _{Oligo d(T)23 Primer})
Gesamt	8

3 Material und Methoden

<u>Reaktionsmix 2</u>	
Reaktionsmix 1	8
+ M-MuLV Reaction Mix	10
+ M-MuLV Enzyme Mix	2
+ H ₂ O (Nuclease-frei)	30
Gesamt	50

Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Mit der qPCR ist es möglich, über die benötigten Amplifikationszyklen eines Gens bis zum Ct-Wert (kritischer Stellenwert) und mittels weiterer Normalisierung ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode) auf die relative cDNA- und damit mRNA-Menge zum Zeitpunkt der Zellyse zu schließen. Dies ermöglicht eine Aussage über die Hoch- bzw. Herunterregulation eines Gens im Vergleich zu der Kontrolle. Für die qPCR wurden Primer der Firma Qiagen und der SYBR Green-Mix genutzt und nach Herstellerangaben gearbeitet.

Von dem Ct-Wert des Zielgens wurde das arithmetische Mittel der Ct-Werte der Referenzgene beta-Glucuronidase (GUSB) und *TATA-binding-Protein* (TBP) subtrahiert (ΔCt). Anschließend wurden von den ΔCt -Werten der Kontrollprobe die ΔCt -Werte der Behandlungsprobe subtrahiert ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Der „fold change“, der eine hoch (>1), - oder herunterregulierte Genexpression (<1) des Zielgens im Vergleich zur Kontrolle (1.0) darstellt, errechnet sich aus $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$.

Für die qPCR wurde eine 96-Well-Platte benutzt. In ein Well wurden jeweils 20 μl Primermix und 5 μl Templatemix pipettiert. Diese Mixe, exemplarisch für ein Well, setzten sich folgendermaßen zusammen (siehe Tab. 10)

Tabelle 10. Ansatz von Primermix und Templatemix für ein Well einer 96-Well-Platte.

<u>Primermix</u>	<u>Volumen [μl]</u>		<u>Templatemix</u>	<u>Volumen [μl]</u>
Primer	2,5		cDNA	1
SYBR-Green	13		H ₂ O	4
H ₂ O	4,5		Gesamt	5
Gesamt	20			

3 Material und Methoden

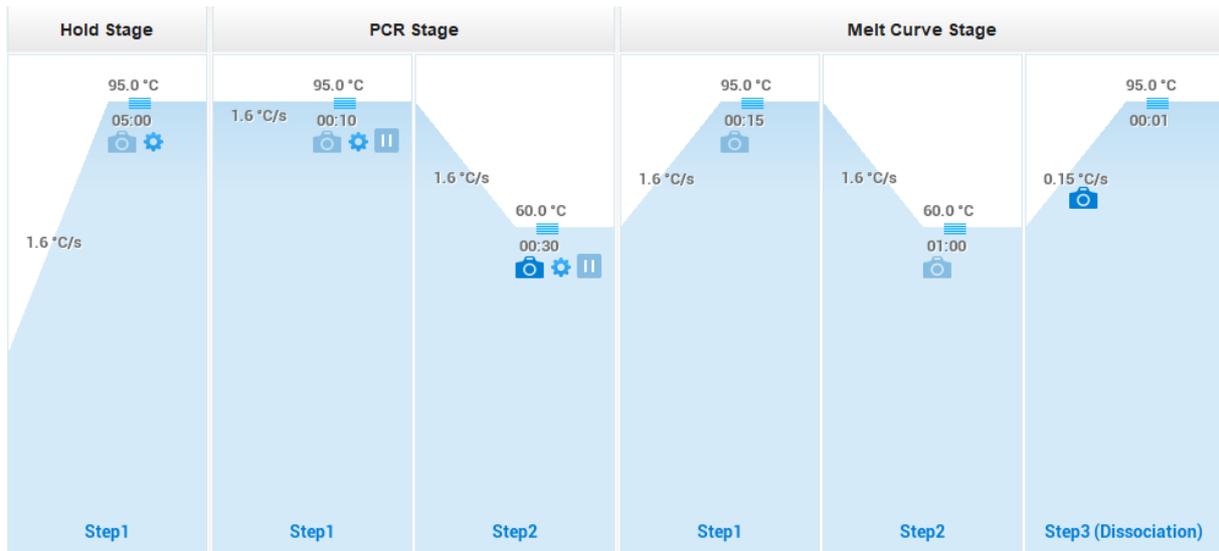


Abbildung 7. Thermocycler-Profil der Software QuantStudio™ Design & Analysis. Die Elongationsphase ist in diesem Programm nicht extra programmiert, da die Amplikons sehr kurz sind und die Stränge während des Hochheizens, wenn die 72°C kurzzeitig erreicht werden, repliziert werden können. Die Schritte der Schmelzkurvenanalyse waren folgende: 95°C für 15 s, 60°C für 1 min und anschließend kontinuierliche Erhöhung mit 0,15°C/s auf 95°C. Die Schmelzkurve diente neben einer vorherigen Primer-Validierung der zusätzlichen Qualitätskontrolle der qPCR. Hierbei wurde die Schmelztemperatur der Amplikons bestimmt, die für das Auftrennen der doppelsträngigen DNA erforderlich war. Der bis zu diesem Punkt kontinuierlich detektierte Fluoreszenzfarbstoff (SYBR-Green) wird dabei nach dem Auftrennen des DNA-Doppelstranges freigesetzt, was somit zu einem Abfall in der Fluoreszenzintensität führt. Die Schmelzkurve wird üblicherweise als Änderung der Fluoreszenzintensität angegeben. Dadurch ergibt sich ein Maximum am Schmelzpunkt des Amplikons (Auftrennen des DNA-Doppelstranges). Das Auftreten mehrerer Peaks würde für Nebenprodukte in der qPCR sprechen.

Die Schritte des PCR-Profiles waren folgende: Initiale Denaturierung auf 95°C über 5 min, Denaturierung bei 95°C für 10 s, Primerhybridisierung bei 60°C über 30 s und Elongation auf 72°C (siehe Abb. 7). Die Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation wurden für 40 Zyklen wiederholt.

Zur Auswertung wurde die Software QuantStudio™ Design & Analysis genutzt. Aus den von der Software berechneten Ct-Werten wurde jeweils der Δ Ct-Wert, der $\Delta\Delta$ Ct-Wert sowie der *Fold Change* berechnet.

3.2.4 Western Blot

Mit dem Western Blot ist es möglich, die von Retinolderivaten beeinflusste Proteinexpression der Marker von LEZ im Vergleich zur Kontrollprobe zu detektieren. Hierzu wurden folgende Schritte durchgeführt:

3 Material und Methoden

Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde der Bradford-Test nach dem standardisierten Protokoll von Sigma-Aldrich (Katalognummer B6916) durchgeführt (Messung bei 595 nm).

Probenvorbereitung und Elektrophorese

Pro Probe wurden 20 µg Protein für einen Western Blot verwendet. Exemplarisch für ein Tube wurden folgende Lösungen pipettiert (siehe Tab. 11):

Tabelle 11. Mix für die Herstellung eines Tubes für die Elektrophorese. Das Protein-Volumen wurde aus der Gesamtmenge eines Tubes (20 µg) und der Proteinkonzentration [µg/µl] aus dem Bradford-Test berechnet. Aus dem Gesamtvolumen eines Tubes (20 µl), dem Protein-Volumen [µl] und dem Volumen des Laemmlipuffers (4 µl) wurde das Volumen von H₂O [µl] berechnet.

<u>Mix für Elektrophorese</u>	<u>Volumen [µl]</u>
Protein	$20 \mu\text{g} / x \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}$ <i>(Die Variable x steht für das Ergebnis aus der Konzentrationsbestimmung des Bradford-Tests.)</i>
Laemmlipuffer (5-fach)	4
H ₂ O	$\text{Volumen}_{\text{Gesamt}} - (\text{Volumen}_{\text{Laemmlipuffer}} + \text{Volumen}_{\text{Protein}})$
Gesamt	20

Die Proteinproben wurden im Thermoblock für fünf Minuten auf 95°C aufgeheizt und auf Eis wieder heruntergekühlt. Das SDS-Gel mit dem Gelhalter wurde in die Elektrophoresekammer gesteckt und die Kammer mit 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)-Puffer aufgefüllt. Anschließend wurde das Gel mit den Proben und dem *dual-colour* Marker (Bio-Rad Laboratories) beladen und eine Spannung von 150 Volt für eine Stunde angelegt. Die Proteine wurden nach ihrer Molekülmasse (kDa) auf dem Gel getrennt.

Blotten und Antikörper-Inkubation

Die Proteinbanden auf dem Gel wurden mit dem *Semi-Dry-Blotter* auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran wurde drei Mal für fünf Minuten mit 10 ml Waschpuffer gewaschen. Der Primär-Antikörper wurde mit dem jeweiligen *anti-mouse/ anti-rabbit*-Sekundär-Antikörper verdünnt

3 Material und Methoden

(siehe Tab. 6, S. 25) und auf die Membranen gegeben. Die Membranen wurden für eine Stunde unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden drei Waschschriffe (3x5 Minuten 10 ml Waschpuffer) durchgeführt.

Zur Detektion der Proteine wurden die auf der Blotmembran gebundenen Peroxidase-gekoppelten Antikörper mit einem Chemilumineszenz-Reagenz inkubiert. Die Lichtreaktion wurde mit einer *Charge-coupled device*-Kamera (CCD-Kamera) (Imaging System LAS 4000) gemacht.

Um die Antikörper von den Membranen zu entfernen, wurden jeweils 10 ml Stripping-Puffer benutzt. Der Waschschriff (3x5 Minuten 10 ml Waschpuffer) wurde anschließend wiederholt.

Als Ladekontrolle wurde das Protein β -Actin (ACTB) genutzt, welches mit einem entsprechenden Antikörper nachgewiesen wurde. Mit dieser Ladekontrolle stellt man sicher, dass bei allen Proben dieselbe Gesamtmenge an Protein aufgetragen wurde.

3.2.5 siRNA-Behandlung gegen ADH7

Für die siRNA-Behandlung wurden ebenfalls LEZ verwendet. Die Isolation und das Passagieren der Zellen erfolgte in derselben Weise, wie es im Abschnitt 3.2.1 (siehe S. 26-27) bereits beschrieben wurde.

Sobald die LEZ zu etwa 90% Konfluenz angewachsen waren, wurden sie mit der siRNA gegen ADH7 und gegen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) behandelt. Die siRNA gegen GAPDH diente hierbei als Positiv-Kontrolle. Als negative Kontrolle wurde unspezifische siRNA eingesetzt.

Zur Herstellung der Behandlungssubstanz für das siRNA-Modell wurden in den ersten Mix 150 μ l Opti-MEM mit 5 μ l *Lipofectamine* pipettiert, die Substanzen gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In den zweiten Mix wurden 150 μ l Opti-MEM mit 0,75 μ l siRNA gegen ADH7 einpipettiert. Der erste und der zweite Mix wurden vermischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Mix gleichmäßig auf die Zellen verteilt und für 48 Stunden inkubiert.

Die LEZ wurden mit folgenden Behandlungssubstanzen und folgenden Endkonzentrationen der siRNA behandelt (siehe Tab. 12, S. 34):

3 Material und Methoden

Tabelle 12. Behandlungssubstanzen und Endkonzentrationen der siRNA bei der Behandlung von LEZ.

	<u>Behandlungssubstanz</u>	<u>Endkonzentration [nM]</u>
1. Well	siRNA-Kontrolle	5
2. Well	siRNA ADH7	5
3. Well	siRNA GAP-DH	5

3.2.6 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Genexpressionsergebnisse der Versuche mit Retinol-sowie Retinsäure-Behandlung (Fold Change ($2^{\Delta\Delta Ct}$)) wurde mit GraphPad Prism 7.04 eine einfache Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) mit anschließendem *Dunnett's multiple comparisons Test* durchgeführt. Zur statistischen Auswertung der Genexpressionsergebnisse der Versuche mit dem ABCG2-Blocker wurde eine einfache Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) mit anschließendem Tukey Test durchgeführt. Zur statistischen Auswertung der Western Blot-Ergebnisse wurde die Dichte der Blots quantitativ mit dem Programm ImageJ ausgewertet. Anschließend wurde mit GraphPad Prism 7.04 ein *one-way ANOVA*-Test, sowie der *Dunnett's multiple comparisons test* für die Ergebnisse der Versuche mit Retinol- sowie Retinsäure-Behandlung und der Tukey Test für die Ergebnisse der Versuche mit dem ABCG2-Blocker durchgeführt. Die P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Genexpressionsergebnisse nach Behandlung von Limbusepithelzellen mit Retinolderivaten

4.1.1 Marker mit signifikant veränderter Genexpression

PAX6

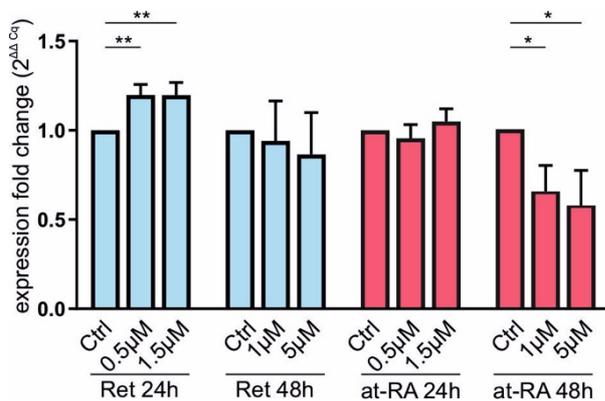


Abbildung 8. Genexpressionsdaten des signifikant regulierten Markers PAX6. Balkendiagramme zeigen den Fold Change der mit Retinol (Ret) für 24 Stunden (0,5 μM, 1,5 μM) und 48 Stunden (1 μM, 5 μM) sowie mit Retinsäure (at-RA) für 24 Stunden (0,5 μM, 1,5 μM) und 48 Stunden (1 μM, 5 μM) behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle (Ctrl). Die Genexpressions-Versuche wurden jeweils mit Zellkulturen, die aus verschiedenen Hornhautspenden gewonnen wurden, unter den gleichen Bedingungen drei Mal wiederholt (n=3). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. Quelle: Latta et al. 2021 [54]

Unter der 24-stündigen Behandlung mit 0,5 μM und 1,5 μM Retinol war die Genexpression von PAX6 im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht ($FC_{\text{mean}} = 1,198$; $p = 0,0024$ für 0,5 μM und $FC_{\text{mean}} = 1,196$; $p = 0,0025$ für 1,5 μM). Im Gegensatz dazu war die Genexpression durch die 48-stündige Behandlung mit 1 μM und 5 μM Retinsäure signifikant vermindert ($FC_{\text{mean}} = 0,6567$; $p = 0,0448$ für 1 μM und $FC_{\text{mean}} = 0,5777$; $p = 0,0195$ für 5 μM). Unter der 24-stündigen Behandlung mit Retinsäure war die Genexpression von PAX6 nicht signifikant verändert ($p \geq 0,6682$). Unter der 48-stündigen Behandlung mit Retinol zeigte sich die Genexpression von PAX6 nicht signifikant verändert ($p \geq 0,6944$) (siehe Abb. 8).

4 Ergebnisse

ABCG2

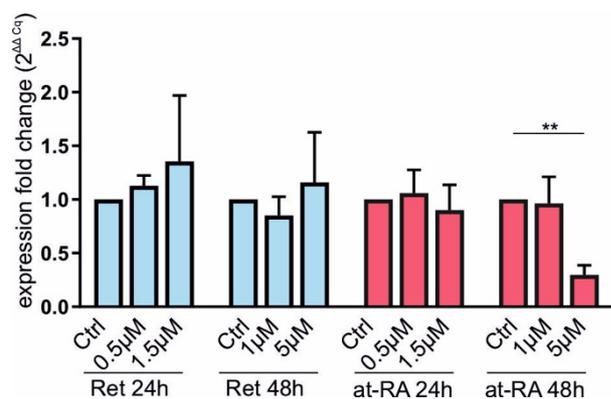


Abbildung 9. Genexpressionsdaten des signifikant herunterregulierten Markers ABCG2. Balkendiagramme zeigen den Fold Change der mit Retinol (Ret) für 24 Stunden (0,5 μM, 1,5 μM) und 48 Stunden (1 μM, 5 μM) sowie mit Retinsäure (at-RA) für 24 Stunden (0,5 μM, 1,5 μM) und 48 Stunden (1 μM, 5 μM) behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle (Ctrl). Die Genexpressions-Versuche wurden jeweils mit Zellkulturen, die aus verschiedenen Hornhautspenden gewonnen wurden, unter den gleichen Bedingungen drei Mal wiederholt (n=3). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. Quelle: Latta et al. 2021 [54]

Unter der 48-stündigen Behandlung mit 5 μM Retinsäure war die Genexpression von ABCG2 signifikant vermindert ($FC_{\text{mean}} = 0,2967$; $p = 0,0024$). Unter der Behandlung mit Retinol war die Genexpression nicht signifikant verändert ($p \geq 0,5088$). Unter der 24-stündigen Behandlung mit Retinsäure war die Genexpression ebenfalls nicht verändert ($p \geq 0,9206$) (siehe Abb. 9).

SPINK7

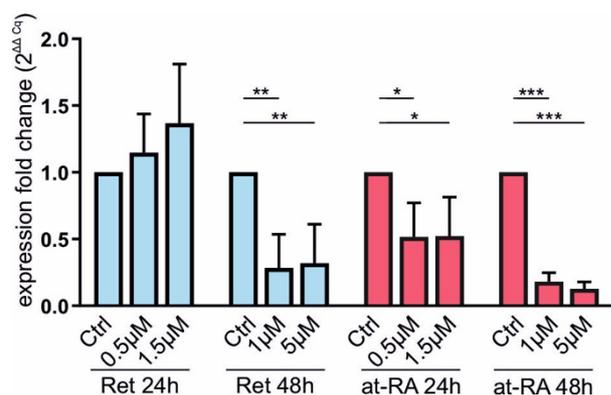


Abbildung 10. Genexpressionsdaten des signifikant herunterregulierten Markers SPINK7. Balkendiagramme zeigen den Fold Change der mit Retinol (Ret) für 24 Stunden (0,5 μM, 1,5 μM) und 48 Stunden (1 μM, 5 μM) sowie mit Retinsäure (at-RA) für 24 Stunden (0,5 μM, 1,5 μM) und 48 Stunden (1 μM, 5 μM) behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle (Ctrl). Die Genexpressions-Versuche wurden jeweils mit Zellkulturen, die aus verschiedenen Hornhautspenden gewonnen wurden, unter den gleichen Bedingungen drei Mal wiederholt (n=3). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Quelle: Latta et al. 2021 [54]

Die Genexpression von SPINK7 wurde durch die 48-stündige Behandlung mit 1 μM ($FC_{\text{mean}} = 0,2835$; $p = 0,0018$) und 5 μM ($FC_{\text{mean}} = 0,3193$; $p = 0,0026$) Retinol sowie durch die 24- und 48-stündige

4 Ergebnisse

Behandlung mit 0,5 μM ($\text{FC}_{\text{mean}}=0,5160$; $p=0,0183$) und 1,5 μM ($\text{FC}_{\text{mean}}=0,5223$; $p=0,0198$) respektive 1 μM ($\text{FC}_{\text{mean}}=0,1813$; $p<0,0001$) und 5 μM ($\text{FC}_{\text{mean}}=0,1277$; $p<0,0001$) Retinsäure signifikant herunterreguliert. Unter der 24-stündigen Behandlung mit 0,5 μM und 1,5 μM Retinol war die Genexpression von SPINK7 nicht signifikant verändert ($p\geq 0,3716$) (siehe Abb. 10, S. 36).

DSG1

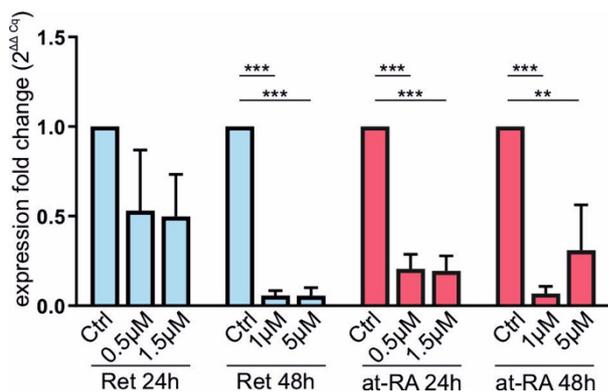


Abbildung 11. Genexpressionsdaten des signifikant herunterregulierten Markers DSG1. Balkendiagramme zeigen den Fold Change der mit Retinol (Ret) für 24 Stunden (0,5 μM , 1,5 μM) und 48 Stunden (1 μM , 5 μM) sowie mit Retinsäure (at-RA) für 24 Stunden (0,5 μM , 1,5 μM) und 48 Stunden (1 μM , 5 μM) behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle (Ctrl). Die Genexpressions-Versuche wurden jeweils mit Zellkulturen, die aus verschiedenen Hornhautspenden gewonnen wurden, unter den gleichen Bedingungen drei Mal wiederholt ($n=3$). * $p\leq 0,05$; ** $p\leq 0,01$; *** $p\leq 0,001$. Quelle: Latta et al. 2021 [54]

Die mRNA-Level von DSG1 waren durch die Behandlung mit Retinolderivaten stark vermindert exprimiert. Unter der 48-stündigen Behandlung mit 1 μM ($\text{FC}_{\text{mean}}=0,05625$; $p<0,0001$) und 5 μM ($\text{FC}_{\text{mean}}=0,05525$; $p<0,0001$) Retinol war die Genexpression von DSG1 signifikant herunterreguliert. Unter der 24- sowie 48-stündigen Behandlung mit 0,5 μM ($\text{FC}_{\text{mean}}=0,205$; $p<0,0001$) und 1,5 μM ($\text{FC}_{\text{mean}}=0,1945$; $p<0,0001$) sowie 1 μM ($\text{FC}_{\text{mean}}=0,068$; $p=0,0005$) und 5 μM ($\text{FC}_{\text{mean}}=0,309$; $p=0,0023$) Retinsäure war die Genexpression von DSG1 signifikant vermindert. Unter der 24-stündigen Behandlung mit 0,5 μM und 1,5 μM Retinol war die Genexpression von DSG1 nicht signifikant verändert ($p\geq 0,0886$) (siehe Abb. 11).

4 Ergebnisse

Ki67

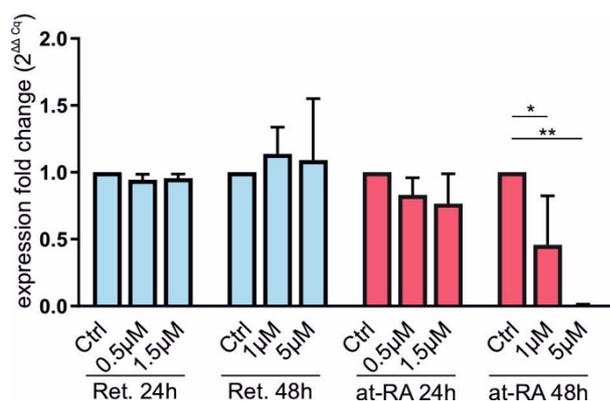


Abbildung 12. Genexpressionsdaten des signifikant herunterregulierten Markers Ki67. Balkendiagramme zeigen den Fold Change der mit Retinol (Ret) für 24 Stunden (0,5μM, 1,5μM) und 48 Stunden (1μM, 5μM) sowie mit Retinsäure (at-RA) für 24 Stunden (0,5μM, 1,5μM) und 48 Stunden (1μM, 5μM) behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle (Ctrl). Die Genexpressions-Versuche wurden jeweils mit Zellkulturen, die aus verschiedenen Hornhautspenden gewonnen wurden, unter den gleichen Bedingungen drei Mal wiederholt (n=3). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. Quelle: Latta et al. 2021 [54]

Die Genexpressionslevel des Proliferationsmarkers Ki67 waren unter der 48-stündigen Behandlung mit 1 μM ($FC_{\text{mean}} = 0,4583$; $p = 0,0354$) und 5 μM ($FC_{\text{mean}} = 0,0093$; $p = 0,0022$) Retinsäure signifikant herunterreguliert. Unter der 24- sowie 48-stündigen Behandlung mit Retinol war die Genexpression nicht verändert ($p \geq 0,2221$). Unter der 24-stündigen Behandlung mit Retinsäure ergab sich keine signifikante Veränderung des Expressionslevels ($p \geq 0,2162$) (siehe Abb. 12).

Exemplarisch für die verminderte Proliferation der LEZ durch Retinsäure stehen folgende Bilder, die im Mikroskop gemacht wurden (siehe Abb. 13).

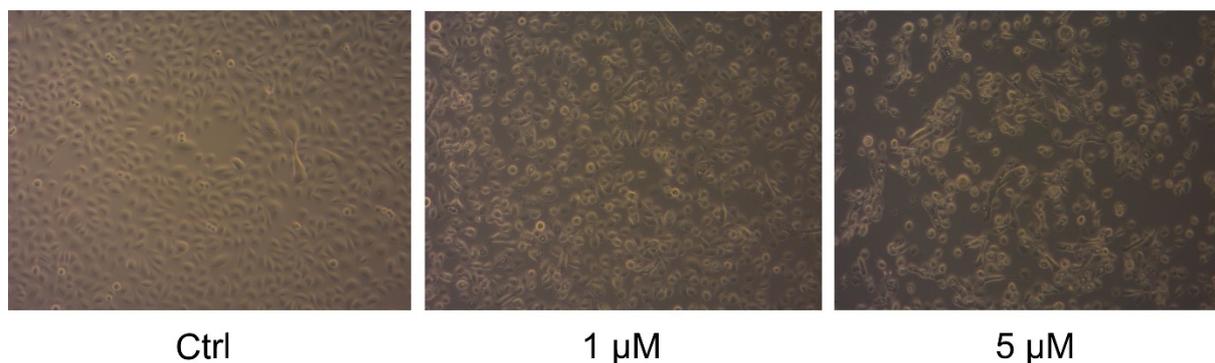


Abbildung 13. Mit Retinsäure behandelte LEZ im Blick durch das Mikroskop: Es zeigt eine Abnahme der Zellzahl bei 1 μM, die bei 5 μM zunimmt. Vergrößerung 10-fach.

4 Ergebnisse

KRT3

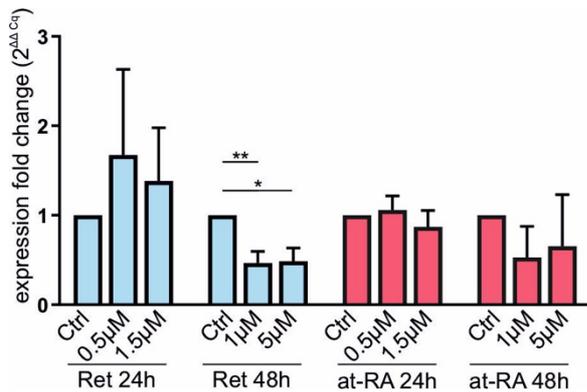


Abbildung 14. Genexpressionsdaten des signifikant herunterregulierten Markers KRT3. Balkendiagramme zeigen den Fold Change der mit Retinol (Ret) für 24 Stunden (0,5μM, 1,5μM) und 48 Stunden (1μM, 5μM) sowie mit Retinsäure (at-RA) für 24 Stunden (0,5μM, 1,5μM) und 48 Stunden (1μM, 5μM) behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle (Ctrl). Die Genexpressions-Versuche wurden jeweils mit Zellkulturen, die aus verschiedenen Hornhautspenden gewonnen wurden, unter den gleichen Bedingungen drei Mal wiederholt (n=3). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. Quelle: Latta et al. 2021 [54]

Unter der 48-stündigen Behandlung mit 1 μM ($FC_{\text{mean}} = 0,4658$; $p = 0,0081$) und 5 μM ($FC_{\text{mean}} = 0,486$; $p = 0,0103$) Retinol war die Genexpression von KRT3 signifikant vermindert. Die Genexpression war unter der 24-stündigen Behandlung mit Retinol ($p \geq 0,457$) sowie unter Retinsäure-Behandlung nicht signifikant verändert ($p \geq 0,3048$) (siehe Abb. 14).

KRT12

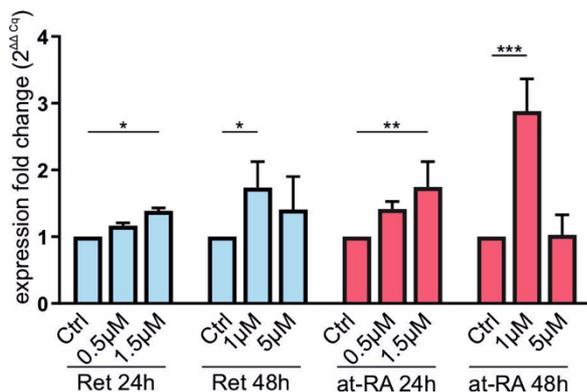


Abbildung 15. Genexpressionsdaten des signifikant hochregulierten Markers KRT12. Balkendiagramme zeigen den Fold Change der mit Retinol (Ret) für 24 Stunden (0,5μM, 1,5μM) und 48 Stunden (1μM, 5μM) sowie mit Retinsäure (at-RA) für 24 Stunden (0,5μM, 1,5μM) und 48 Stunden (1μM, 5μM) behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle (Ctrl). Die Genexpressions-Versuche wurden jeweils mit Zellkulturen, die aus verschiedenen Hornhautspenden gewonnen wurden, unter den gleichen Bedingungen drei Mal wiederholt (n=3). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. . Quelle: Latta et al. 2021 [54]

Die Genexpression von KRT12 wurde unter der 24-stündigen Behandlung mit 1,5 μM Retinol ($FC_{\text{mean}} = 1,389$; $p = 0,0221$) und unter der 48-stündigen 1 μM Retinol-Behandlung ($FC_{\text{mean}} = 1,734$;

4 Ergebnisse

$p=0,0341$) signifikant hochreguliert. Unter der 24- und 48-stündigen Behandlung mit $1,5 \mu\text{M}$ ($\text{FC}_{\text{mean}}=1,744$; $p=0,0013$) bzw. $1 \mu\text{M}$ ($\text{FC}_{\text{mean}}=2,883$; $p=0,0007$) Retinsäure wurde die Genexpression von KRT12 ebenfalls signifikant vermehrt exprimiert (siehe Abb. 15, S. 39).

KRT19

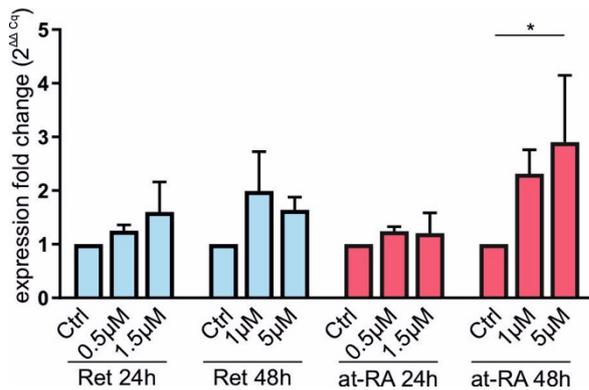


Abbildung 16. Genexpressionsdaten des signifikant hochregulierten Markers KRT19. Balkendiagramme zeigen den Fold Change der mit Retinol (Ret) für 24 Stunden ($0,5\mu\text{M}$, $1,5\mu\text{M}$) und 48 Stunden ($1\mu\text{M}$, $5\mu\text{M}$) sowie mit Retinsäure (at-RA) für 24 Stunden ($0,5\mu\text{M}$, $1,5\mu\text{M}$) und 48 Stunden ($1\mu\text{M}$, $5\mu\text{M}$) behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle (Ctrl). Die Genexpressions-Versuche wurden jeweils mit Zellkulturen, die aus verschiedenen Hornhautspenden gewonnen wurden, unter den gleichen Bedingungen drei Mal wiederholt ($n=3$). * $p \leq 0,05$. Quelle: Latta et al. 2021[54]

Unter der 48-stündigen Behandlung mit $5 \mu\text{M}$ Retinsäure war die Genexpression von KRT19 signifikant erhöht ($\text{FC}_{\text{mean}}=2,902$; $p=0,0394$). Unter der Behandlung mit Retinol war die Genexpression nicht signifikant verändert ($p \geq 0,0656$). Unter der 24-stündigen Behandlung mit Retinsäure zeigte sich keine Änderung der Genexpression ($p \geq 0,3861$) (siehe Abb. 16).

4 Ergebnisse

4.1.2 Marker mit Genexpression ohne signifikante Änderungen

ADH7

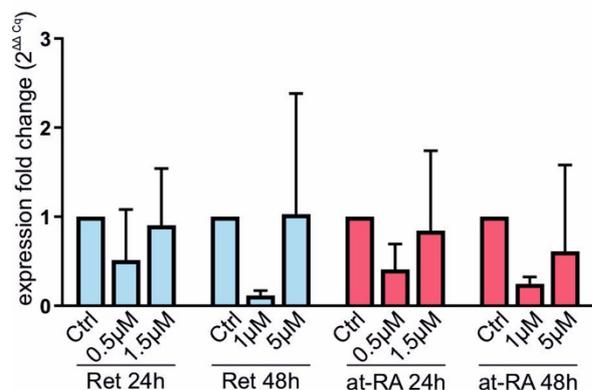


Abbildung 17. Genexpressionsdaten des nicht-signifikant regulierten Markers ADH7. Balkendiagramme zeigen den Fold Change der mit Retinol (Ret) für 24 Stunden (0,5µM, 1,5µM) und 48 Stunden (1µM, 5µM) sowie mit Retinsäure (at-RA) für 24 Stunden (0,5µM, 1,5µM) und 48 Stunden (1µM, 5µM) behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle (Ctrl). Die Genexpressions-Versuche wurden jeweils mit Zellkulturen, die aus verschiedenen Hornhautspenden gewonnen wurden, unter den gleichen Bedingungen drei Mal wiederholt (n=3). Quelle: Latta et al. 2021 [54]

Die Behandlung mit Retinolderivaten zeigte beim Marker ADH7 keinen signifikanten Effekt auf die Genexpression. Eine tendenzielle Herunterregulation zeigte sich unter der 48-stündigen Behandlung mit Retinol ($p \geq 0,0794$) sowie durch die 24-stündige Behandlung mit Retinsäure ($p \geq 0,0874$). Unter der 48-stündigen Behandlung mit Retinsäure war die Genexpression von ADH7 leicht vermindert ($p \geq 0,1329$) (siehe Abb. 17).

ALDH1A1

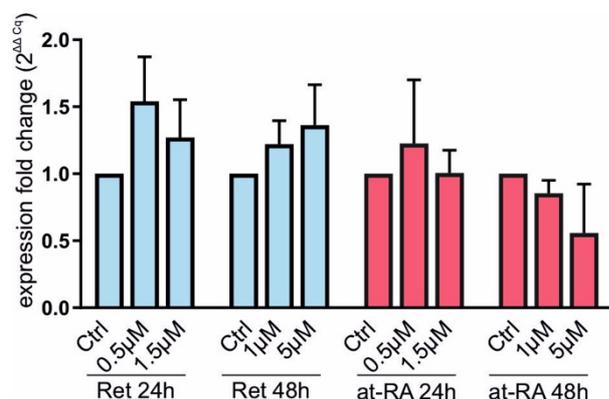
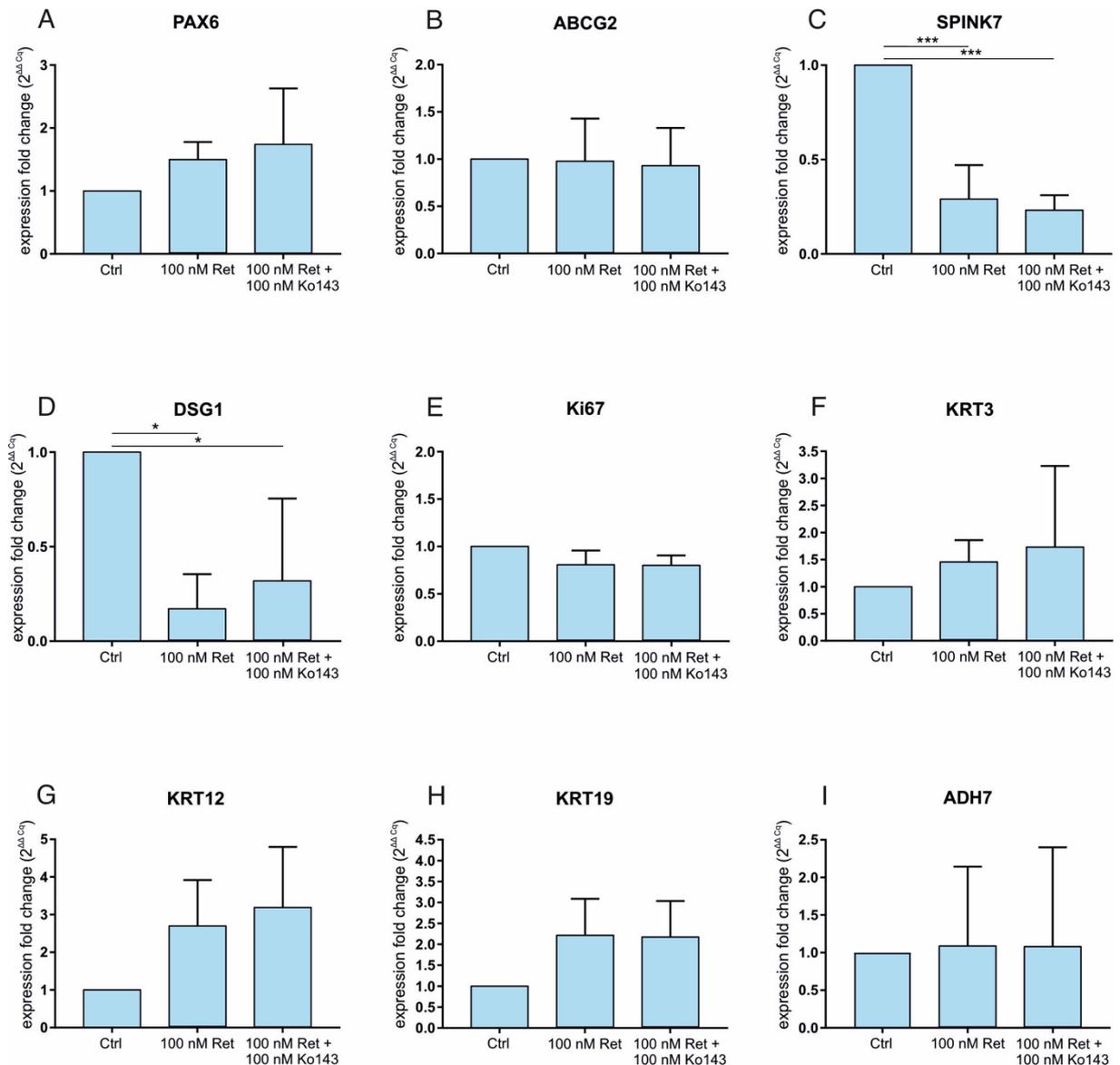


Abbildung 18. Genexpressionsdaten des nicht-signifikant regulierten Markers ALDH1A1. Balkendiagramme zeigen den Fold Change der mit Retinol (Ret) für 24 Stunden (0,5µM, 1,5µM) und 48 Stunden (1µM, 5µM) sowie mit Retinsäure (at-RA) für 24 Stunden (0,5µM, 1,5µM) und 48 Stunden (1µM, 5µM) behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle (Ctrl). Die Genexpressions-Versuche wurden jeweils mit Zellkulturen, die aus verschiedenen Hornhautspenden gewonnen wurden, unter den gleichen Bedingungen drei Mal wiederholt (n=3). Quelle: Latta et al. 2021 [54]

4 Ergebnisse

Durch die Behandlung mit Retinolderivaten war die Genexpression von ALDH1A1 weder unter der Behandlung mit Retinol ($p \geq 0,1111$) noch unter der Behandlung mit Retinsäure ($p \geq 0,0814$) signifikant verändert (siehe Abb. 18, S. 41).

4.1.3 Genexpressionsergebnisse durch die Behandlung mit Retinol und dem ABCG2-Blocker Ko143



4 Ergebnisse

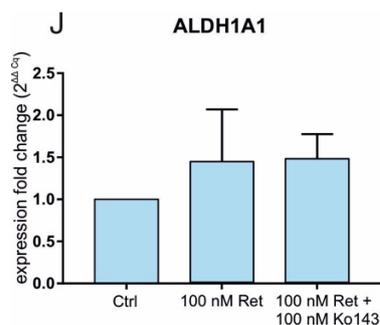


Abbildung 19. Genexpressionsdaten der Marker (A) PAX6, (B) ABCG2, (C) SPINK7, (D) DSG1, (E) Ki67, (F) KRT3, (G) KRT12, (H) KRT19, (I) ADH7 und (J) ALDH1A1 nach Behandlung mit Retinol und dem ABCG2-Blocker Ko143. Balkendiagramme zeigen den Fold Change der mit 100 nM Retinol (Ret) und 100 nM Retinol (Ret) + 100 nM ABCG2-Blocker Ko143 für 48 Stunden behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle (Ctrl). Die Genexpressions-Versuche wurden jeweils mit Zellkulturen, die aus verschiedenen Hornhautspenden gewonnen wurden, unter den gleichen Bedingungen drei Mal wiederholt (n=3). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Durch die 48-stündige Behandlung mit 100 nM Retinsäure war die Genexpression von SPINK7 signifikant herunterreguliert ($p=0,0006$). Auch durch die gemeinsame Behandlung mit 100 nM Retinsäure und 100 nM ABCG2-Blocker war die Genexpression von SPINK7 signifikant vermindert ($p=0,0004$). Die Behandlung mit 100 nM Retinsäure im Vergleich zur Behandlung mit Retinsäure + ABCG2-Blocker war untereinander nicht signifikant verändert ($p=0,7974$) (siehe (C), Abb. 19, S. 42).

Durch die Behandlung mit 100 nM Retinsäure waren die mRNA-Level von DSG1 signifikant vermindert exprimiert ($p=0,0226$). Unter der gleichzeitigen Behandlung mit Retinsäure und ABCG2-Blocker war die Genexpression von DSG1 ebenfalls signifikant herunterreguliert ($p=0,0493$). Die Behandlung durch Retinsäure und durch Retinsäure + ABCG2-Blocker ergab untereinander keine signifikante Veränderung ($p=0,7973$) (siehe (D), Abb. 19, S. 42).

Sowohl durch die Behandlung mit 100 nM Retinol als auch durch die Behandlung mit Retinol + ABCG2-Blocker war die Genexpression der Marker (A) PAX6, (B) ABCG2, (E) Ki67, (F) KRT3, (G) KRT12, (H) KRT19, (I) ADH7, (J) ALDH1A1 nicht signifikant verändert ($p > 0,118$) (siehe Abb. 19, S. 42-43).

4.2 Western Blot-Ergebnisse nach Behandlung von Limbusepithelzellen mit Retinolderivaten

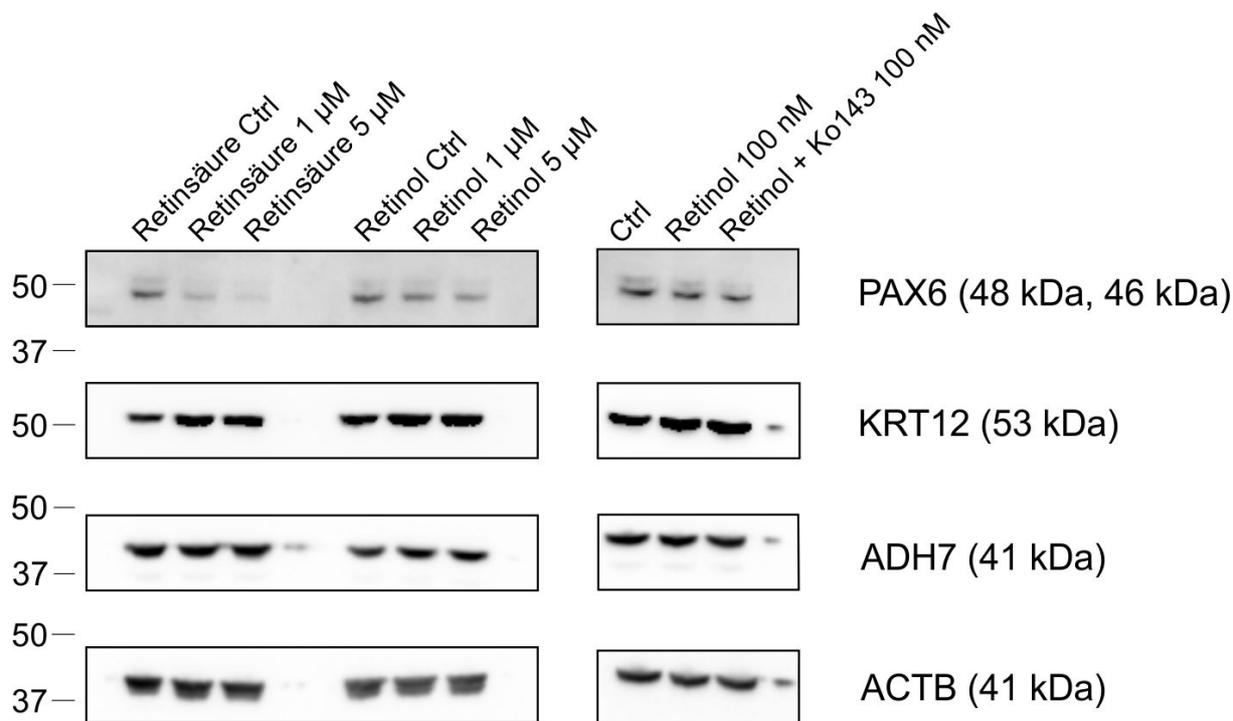


Abbildung 20. Western-Blots der Marker PAX6, KRT12, ADH7 und β -Actin (ACTB, Kontrollprobe). Behandlung jeweils mit Retinsäure (Ctrl, 1 μ M, 5 μ M), Retinol (Ctrl, 100 nM, 1 μ M, 5 μ M) und Retinol + ABCG2-Blocker Ko143 (Ctrl, 100 nM, 100 nM + Ko143). Die jeweilige Molekülmasse der Proteine ist in Kilodalton angegeben.

PAX6

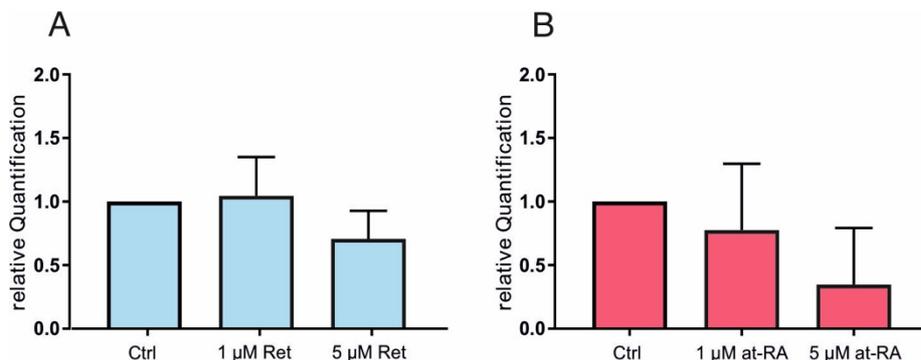


Abbildung 21. Densitometrische Auswertung der Proteinexpressionsdaten des nicht-signifikant regulierten Markers PAX6. Balkendiagramme mit relativer Quantifizierung des in Abb. 20 regulierten Markers PAX6 unter der Behandlung mit (A) Retinol (Ret) (Ctrl, 1 μ M, 5 μ M) und (B) Retinsäure (at-RA) (Ctrl, 1 μ M, 5 μ M). β -Actin (ACTB) diente hierbei als Referenz. Die Proteinexpression wurde auf β -Actin normalisiert. Die Western Blot-Versuche unter der Behandlung von LEZ mit Retinolderivaten wurden drei Mal durchgeführt (n=3).

4 Ergebnisse

Weil PAX6 zwei Isoformen (PAX6-a, PAX6-b) mit unterschiedlicher Proteingröße (48 kDa, 46 kDa) besitzt, waren im Blot Doppelbanden zu erkennen (siehe Abb. 20, S. 44). PAX6-b läuft auf ca. 48 kDa und PAX6-a auf der Membran weiter unten auf ca. 46 kDa. Dabei waren die Banden von der PAX6-a-Isoform stärker ausgeprägt (siehe Abb. 20, S. 44).

Die exemplarische Abbildung des Western-Blot-Versuchs mit Retinsäure (siehe Abb. 20, S. 44) zeigte für PAX6 eine tendenzielle Abnahme der Proteinmenge für 1 μM und 5 μM im Vergleich zur Kontrolle. Im Versuch unter der Behandlung mit Retinol war die Proteinmenge mit den Konzentrationen 1 μM und 5 μM nicht verändert.

Die quantitative Analyse der Western Blot-Ergebnisse ergab für PAX6 unter der Behandlung mit Retinsäure und Retinol keine signifikante Herunterregulation ($p \geq 0,1617$) (siehe Abb. 21, S. 44).

KRT12

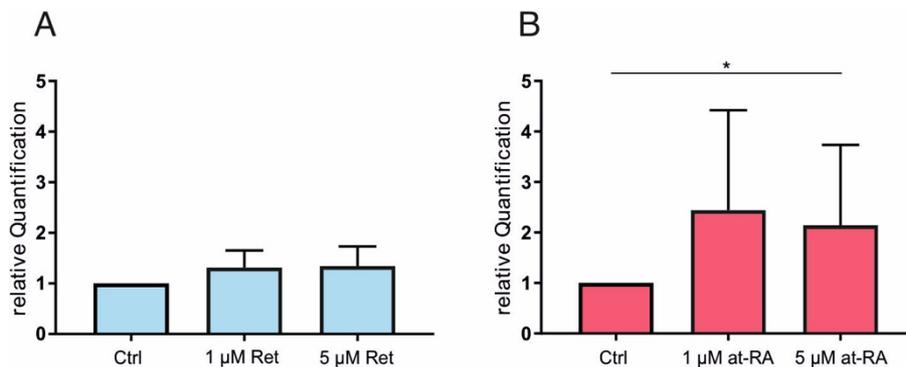


Abbildung 22. Densitometrische Auswertung der Proteinexpressionsdaten des signifikant regulierten Markers KRT12. Balkendiagramme mit relativer Quantifizierung des in Abb. 20 regulierten Markers KRT12 unter der Behandlung mit (A) Retinol (Ret) (Ctrl, 1 μM , 5 μM) und (B) Retinsäure (at-RA) (Ctrl, 1 μM , 5 μM). β -Actin (ACTB) diente hierbei als Referenz. Die Proteinexpression wurde auf β -Actin normalisiert. Die Western Blot-Versuche unter der Behandlung von LEZ mit Retinolderivaten wurden drei Mal durchgeführt ($n=3$). * $p \leq 0,05$

Die Proteinexpression von KRT12 nahm in der exemplarischen Abbildung unter der Behandlung mit Retinsäure sowohl für 1 μM als auch für 5 μM leicht zu (siehe Abb. 20, S. 44). Die quantitative Auswertung der Western Blot-Ergebnisse von KRT12 zeigte für die Retinsäure-Behandlung ebenfalls eine Hochregulation für 5 μM ($p=0,0384$). Bei 1 μM Retinsäure war die Proteinexpression nicht signifikant verändert ($p=0,1447$) (siehe Abb. 22).

4 Ergebnisse

ADH7

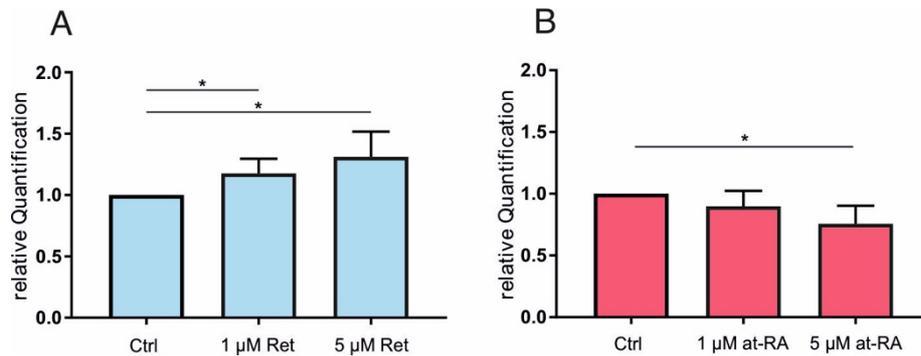


Abbildung 23. Densitometrische Auswertung der Proteinexpressionsdaten des signifikant regulierten Markers ADH7. Balkendiagramme mit relativer Quantifizierung des in Abb. 20 regulierten Markers ADH7 unter der Behandlung mit (A) Retinol (Ret) (Ctrl, 1µM, 5µM) und (B) Retinsäure (at-RA) (Ctrl, 1µM, 5µM) β -Actin (ACTB) diente hierbei als Referenz. Die Proteinexpression wurde auf β -Actin normalisiert. Die Western Blot-Versuche unter der Behandlung von LEZ mit Retinolderivaten wurden drei Mal durchgeführt ($n=3$). * $p \leq 0,05$

Die Proteinexpression von ADH7 war sowohl unter der Behandlung mit Retinsäure als auch mit Retinol in der exemplarischen Abbildung im Vergleich zur Kontrollprobe nicht stark verändert (siehe Abb. 20, S. 44). Die Behandlung mit Retinol induzierte in der quantitativen Analyse sowohl für 1 µM ($p= 0,0499$) als auch für 5 µM ($p= 0,048$) eine signifikante Hochregulation der Proteinexpression (siehe Abb. 23, A).

ADH7 war dagegen unter der Behandlung mit Retinsäure (5 µM) signifikant herunterreguliert ($p= 0,0284$). Mit 1 µM Retinsäure war die Proteinexpression nicht signifikant verändert ($p= 0,1962$; siehe Abb. 23, B).

4 Ergebnisse

PAX6, KRT12, ADH7

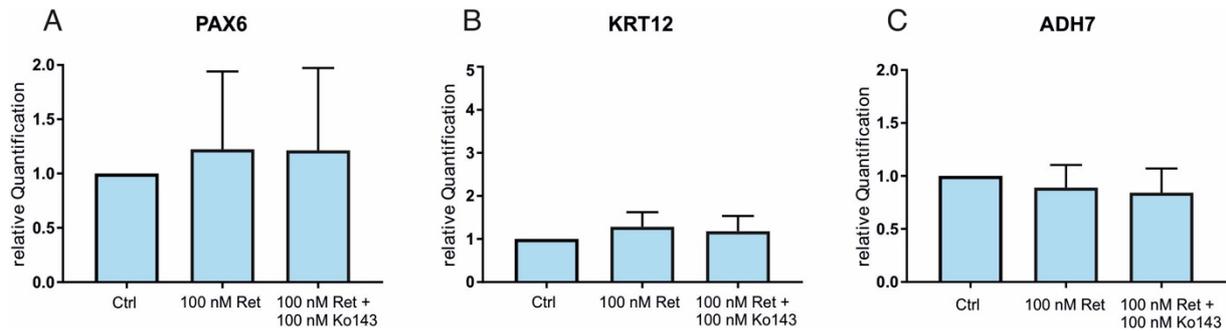


Abbildung 24. Proteinexpressionsdaten von Markern nach Behandlung mit Retinol und dem ABCG2-Blocker Ko143. Balkendiagramme mit relativer Quantifizierung der in Abb. 20 regulierten Marker (A) PAX6, (B) KRT12 und (C) ADH7 unter der Behandlung mit 100 nM Retinol (Ret) sowie 100 nM Retinol (Ret) + 100 nM ABCG2-Blocker Ko143 im Vergleich zur Kontrolle (Ctrl). β -Actin (ACTB) diente hierbei als Referenz. Die Proteinexpression wurde auf β -Actin normalisiert. Die Western Blot-Versuche unter der Behandlung von LEZ mit Retinol und dem ABCG2-Blocker wurden drei Mal durchgeführt ($n=3$).

In der quantitativen Analyse der Proteinexpression von (A) PAX6, (B) KRT12 und (C) ADH7 zeigte sich durch die Behandlung mit Retinol sowie Retinol + ABCG2-Blocker Ko143 keine signifikante Veränderung ($p \geq 0,1055$) (siehe Abb. 24).

4 Ergebnisse

4.3 Genexpressions- und Western-Blot-Ergebnisse nach siRNA-Behandlung gegen ADH7

4.3.1 Genexpressionsergebnisse nach Behandlung mit siRNA gegen ADH7 und GAPDH

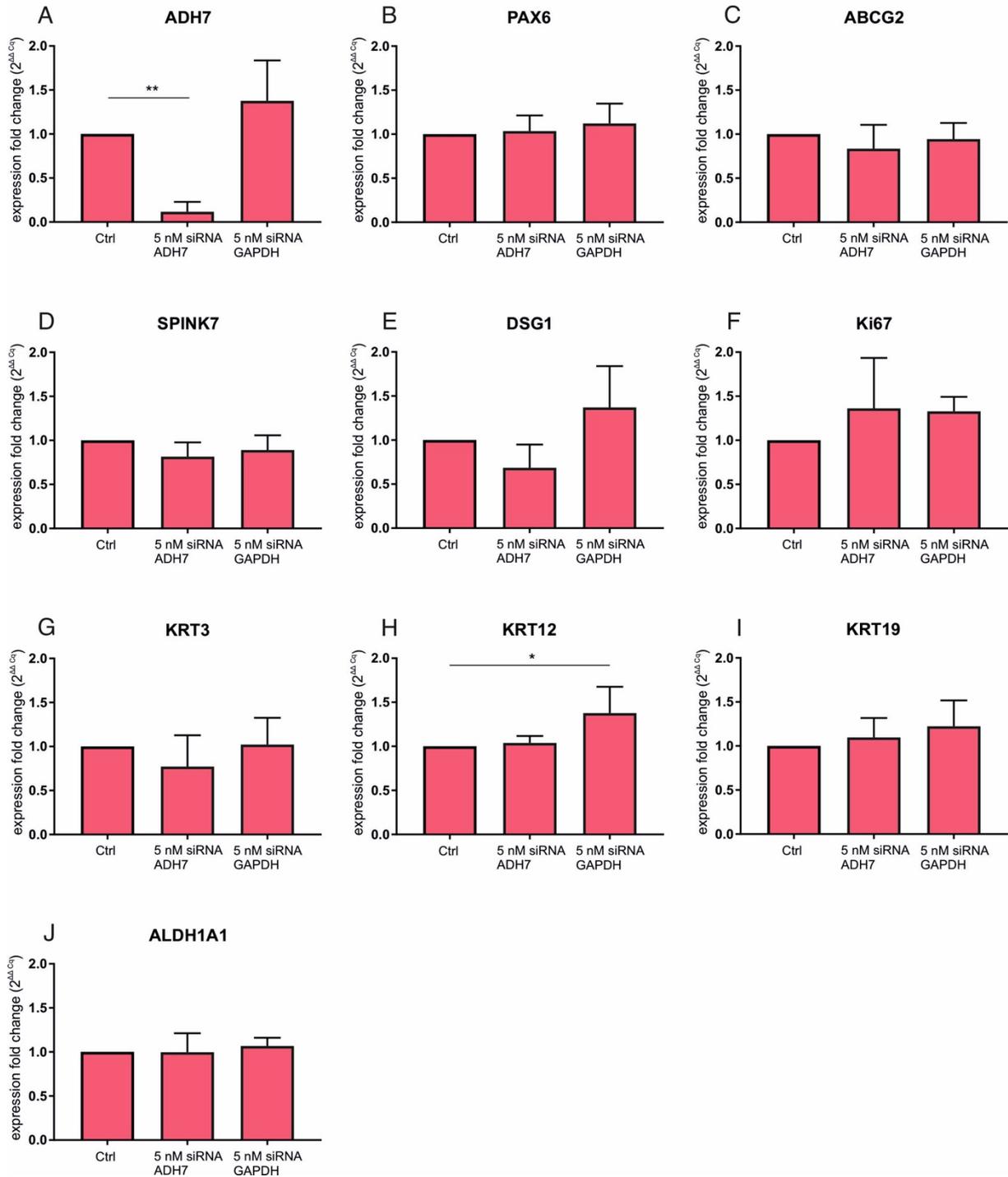


Abbildung 25 Genexpressionsdaten der Marker (A) ADH7, (B) PAX6, (C) ABCG2, (D) SPINK7, (E) DSG1, (F) Ki67, (G) KRT3, (H) KRT12, (I) KRT19 und (J) ALDH1A1 im siRNA-Modell gegen ADH7. Balkendiagramme zeigen den Fold Change der mit 5 nM siRNA gegen ADH7 und 5 nM siRNA gegen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, Kontrollprobe) behandelten Proben. Die Genexpressions-Versuche des siRNA-Modells gegen ADH7 wurden vier Mal durchgeführt ($n=4$). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

4 Ergebnisse

Die Genexpression von (A) ADH7 war aufgrund der siRNA-Behandlung gegen ADH7 signifikant herunterreguliert ($p=0,0025$).

Nach siRNA-Behandlung gegen GAPDH war die Genexpression von (H) KRT12 signifikant erhöht ($p=0,0269$).

Die Genexpression von (B) PAX6, (C) ABCG2, (D) SPINK7, (E) DSG1, (F) Ki67, (G) KRT3, (I) KRT19 und (J) ALDH1A1 war unter der siRNA-Behandlung gegen ADH7 ($p \geq 0,1444$ für SPINK7) und gegen GAPDH ($p \geq 0,1403$ für ADH7) nicht signifikant verändert (siehe Abb. 25, S. 48).

4.3.2 Western Blot-Ergebnis nach siRNA-Behandlung gegen ADH7 und GAPDH

Der Western Blot-Versuch des siRNA-Modells gegen ADH7 wurde zwei Mal durchgeführt ($n=2$).

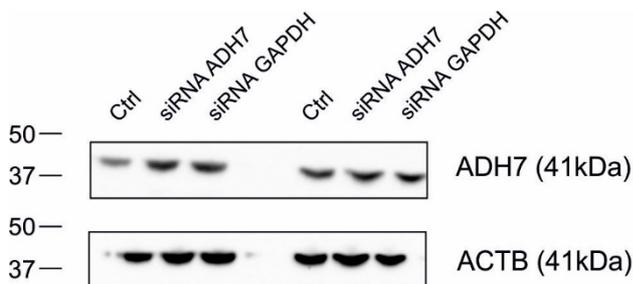


Abbildung 26. Western-Blots der Marker ADH7 und ACTB (Kontrollprobe). Behandlung jeweils mit siRNA gegen ADH7 und siRNA gegen GAPDH (Kontrollprobe).

Im Western Blot des siRNA-Versuchs ergab sich im Gegensatz zu den Transkriptionsdaten (siehe Abb. 25, S. 48) keine Herunterregulation von ADH7.

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Signifikante Genexpressions- und Proteinexpressionsergebnisse nach Behandlung von Limbusepithelzellen mit Retinolderivaten

A

LEZ von gesunden Patienten



+ Retinolderivate



PAX6 ↑ (Retinol),
PAX6 ↓ (Retinsäure), ABCG2 ↓,
SPINK7 ↓, DSG1 ↓, Ki67 ↓,
KRT3 ↓, KRT12 ↑, KRT19 ↑

B

LEZ von gesunden Patienten



+ Retinolderivate



ADH7 ↑ (Retinol),
ADH7 ↓ (Retinsäure), KRT12 ↑

Abbildung 27. Zusammenfassung der signifikanten Genexpressions- (A) und Proteinexpressionsergebnisse (B) unter der Behandlung mit Retinolderivaten

5 Diskussion

5.1 Vergleich zwischen Retinol- und Retinsäure-Behandlung und zwischen der Behandlung nach verschiedenen Behandlungszeiten

Die Behandlung mit Retinol und Retinsäure bewirkt bei den meisten Markern ähnliche Expressionsergebnisse. So ist sowohl bei den herunterregulierten Markern DSG1 und SPINK7 als auch bei den hochregulierten Markern KRT12 und KRT19 die Genexpression bei Retinol und Retinsäure gleichermaßen vermindert oder erhöht (siehe Abb. 10, S. 36; Abb. 11, S. 37; Abb. 15, S. 39 und Abb. 16, S. 40). Eine Ausnahme hinsichtlich ähnlicher Genexpressionsergebnisse nach Retinsäure- und Retinol-Behandlung stellt PAX6 dar: Hierbei ist die Genexpression unter der 24-stündigen Behandlung mit Retinol erhöht und unter der 48-stündigen Behandlung mit Retinsäure vermindert (siehe Abb. 8, S. 35).

Unter der 24-stündigen Behandlung mit Retinol zeigt sich auf Transkriptebene tendenziell eine schwächere Regulation als unter der 48-stündigen Behandlung mit Retinol. Dies zeigt sich beispielsweise bei den Markern DSG1, SPINK7 und KRT3. Bei diesen Markern ist nur unter der 48-stündigen Retinol-Behandlung eine signifikante Genexpression vorhanden, unter der 24-stündigen Behandlung dagegen nicht (siehe Abb. 10, S. 36; Abb. 11, S. 37 und Abb. 14, S. 39). Eine Erklärung hierfür könnte darin liegen, dass Retinol erst in den aktiven Metaboliten Retinsäure umgewandelt werden muss. Nach 48 Stunden kann demnach mehr Retinol in Retinsäure umgewandelt werden.

Die Expressionsergebnisse von Ki67, ABCG2 und KRT19 (siehe Abb. 9, S. 36; Abb. 12, S. 38 und Abb. 16, S. 40) zeigen, dass die Retinsäure-Behandlung auf die Marker im Vergleich zur Kontrollprobe stärkere Effekte als die Retinol-Behandlung ausübt. Dies zeigt sich insbesondere in der Herunterregulation des Proliferationsmarkers Ki67 unter der Behandlung mit Retinsäure, während unter Retinol-Behandlung Ki67 nahezu unverändert im Vergleich zur Kontrolle bleibt (siehe Abb. 12, S. 38). Weil der Proliferationsmarker Ki67 deutlich vermindert exprimiert wird und auch im Mikroskop weniger Zellen im Well erkennbar waren, kann von einer stärkeren Wirkung von Retinsäure auf eine mögliche Differenzierung bzw. auf die Proliferation der LEZ im Vergleich zu Retinol ausgegangen werden. Auch im Western-Blot waren die Expressionsdaten von KRT12 unter der Behandlung mit Retinsäure deutlich stärker ausgeprägt als mit Retinol (siehe Abb. 22, S. 45).

In der Literatur wird Retinsäure in seiner Wirksamkeit ebenfalls als das potentere Retinolderivat dargestellt: Beispielsweise beschreiben Ubels et al. eine Heilung von Epitheldefekten einzig unter der Behandlung mit Retinsäure, während Retinol diesen Effekt nicht zeigt [113]. Retinsäure ruft zudem bei Kaninchen, die aufgrund eines Vitamin-A-Entzugs aus der Nahrung eine Xerophthalmie entwickelten, an dem nicht-behandelten Auge eine ähnliche heilende Wirkung hervor wie an dem behandelten Auge.

Diese Beobachtung legt somit eine systemische Wirkung nahe. Unter der Behandlung mit Retinol ist dieser Effekt an dem nicht-behandelten Auge nicht zu beobachten [30].

Die Annahme einer potenteren Wirkung von Retinsäure erscheint naheliegend, da Retinsäure direkt an den Retinsäure-Rezeptoren wirken kann und Retinol zunächst in die aktive Form Retinsäure umgewandelt werden muss [61].

Auf der anderen Seite weisen Studien auf Wirkungen von Retinol hin, die nicht auf der Wirkung der aktiven Form Retinsäure beruhen und damit von Retinsäure unabhängig sind. Allerdings ist der genaue alleinige Wirkungsmechanismus von Retinol noch nicht genau geklärt [45]. In einer Studie von See et al. wird die Hypothese einer alleinigen Wirkung von Retinol ohne Retinsäure belegt: Bei trächtigen Ratten wurde durch die Gabe von Vitamin-A-armer Nahrung für 10,5 Tage ein Vitamin-A-Mangel induziert und anschließend Retinol bzw. Retinsäure substituiert. Diejenigen Ratten in der Filialgeneration, die die Retinol-Substitution erhielten, erlitten keine oder weniger Fehlbildungen als die Ratten, die mit Retinsäure behandelt wurden. Demnach lässt sich auf eine Wirkung von Retinol schließen, die nicht über Retinsäure vermittelt wird [97].

5.2 Interpretation der Genexpressionsergebnisse und Western-Blot-Ergebnisse

5.2.1 Ähnlichkeit der Expressionsergebnisse zur PAX6-Defizienz und mögliches Überangebot von Retinolderivaten in Limbusepithelzellen

Da in der Arbeitshypothese eine Förderung der Differenzierung von LEZ durch Retinolderivate angenommen wurde, stehen die Expressionsergebnisse dieser Arbeit überraschend im Widerspruch zur ursprünglichen Arbeitshypothese. Der Differenzierungsmarker DSG1 sowie der Proteaseinhibitor SPINK7 sind vergleichbar mit der bei Aniridie zugrunde liegenden PAX6-Defizienz signifikant und der Marker ADH7 tendenziell herunterreguliert. Bei der PAX6-Defizienz kommt es zu Differenzierungsstörungen im Limbus [56]. DSG1 als kornealer Differenzierungsmarker [125] und SPINK7 als potenzieller kornealer Differenzierungsmarker [122] werden durch die Behandlung mit Retinolderivaten unter den Versuchsbedingungen in dieser Arbeit herunterreguliert (siehe Abb. 10, S. 36 und Abb. 11, S. 37). Es ist daher anzunehmen, dass die Differenzierung von LEZ durch Retinolderivate nicht gefördert wird. Die Herunterregulation der Differenzierungsmarker deutet darauf hin, dass eine Differenzierungsstörung, wie sie bei PAX6-Defizienz vorliegt, sogar durch einen Überschuss an Retinolderivaten induziert werden könnte. Folglich besteht eine neue These, die im Gegensatz zu der

Ausgangshypothese steht: Möglicherweise liegt den LEZ bei Aniridie kein Mangel an Retinolderivaten zugrunde, sondern ein Überangebot von Retinolderivaten könnte zu dem Phänotyp der AAK beitragen.

Es gibt verschiedene Hinweise, die die These eines möglichen Überangebots von Retinolderivaten in LEZ bei Aniridie stützen:

Die toxische Wirkung einer zu hohen Konzentration von Retinolderivaten ist aus der Literatur bekannt [103]. Speziell in LEZ führt laut Kim et al. eine zu hohe Konzentration von Retinsäure (ab 1 μM) zu einer Fehldifferenzierung von LEZ, die sich morphologisch stark von physiologisch differenzierten LEZ unterscheiden [46]. Auch bei der AAK ist die Ausbildung eines physiologisch differenzierten Korneagewebes gestört [52], was einen potenziellen Zusammenhang eines Überangebots an Retinsäure mit der Pathophysiologie der AAK unterstreicht. Die Konzentration der 48-stündigen Retinsäure-Behandlung in der vorliegenden Arbeit beläuft sich auf 1 μM bzw. 5 μM und geht damit über den Bereich der Konzentration von Retinsäure hinaus, der von Kim et al. zur Behandlung von LEZ gewählt wurde.

Wie bereits zuvor beschrieben, ähneln die Transkriptions- und Proteinexpressionsdaten der untersuchten Gene unter der Behandlung mit Retinolderivaten den Expressionsdaten von Aniridie-Patienten. Durch Retinolderivate wird keine Hochregulation der Differenzierungsmarker DSG1 und SPINK7, also keine Differenzierungsförderung beobachtet. Eine verstärkte Expression der Differenzierungsmarker hätte auf einen Mangel an Retinolderivaten in LEZ bei Aniridie-Patienten hinweisen können. Denn bei diesen sind Retinol-verstoffwechselnde Enzyme vermindert exprimiert [52]. Retinolderivate werden in Studien als Förderer der Differenzierung von LEZ beschrieben [91]. Stattdessen können aufgrund der Ähnlichkeit der Expressionsdaten von Markern in LEZ unter der Behandlung mit Retinolderivaten (z.B. DSG1, ADH7, SPINK7) zu Expressionsdaten von Aniridie-Patienten ähnliche Regulationsmechanismen vermutet werden.

Dass die Gabe von Retinolderivaten mit der Regulation von Differenzierungsmarkern korreliert, könnte ein Hinweis auf einen potenziellen Pathomechanismus bei der AAK sein. Dieser könnte durch Veränderungen im Retinolstoffwechsel, z.B. durch eine zu hohe Konzentration an Retinolderivaten auf Zellebene gefördert werden.

Das am Retinsäure-Abbau beteiligte Enzym CYP26A1 ist bei Aniridie-Patienten signifikant herunterreguliert [53], was ebenfalls die Verfügbarkeit und Konzentrationen von Retinolderivaten in der Zelle beeinflussen kann. Inwieweit CYP26A1 am Retinolstoffwechsel in LEZ beteiligt ist, müssen weitere Versuche zeigen.

5.2.2 Diskussion des Einflusses von Retinolderivaten über einen PAX6-vermittelten Mechanismus auf Differenzierungsmarker

Durch die Behandlung mit Retinolderivaten ergeben sich bei PAX6 Veränderungen in der Gen- und Proteinexpression (siehe Abb. 8, S. 35 und Abb. 21, S. 44). Die Ergebnisse auf Transkriptebene sind bei PAX6 in dieser Arbeit gegensätzlich: Während durch die 24-stündige Retinol-Behandlung PAX6 auf Transkriptebene signifikant erhöht wird, ist die Genexpression durch die 48-stündige Retinsäure-Behandlung vermindert. Da die PAX6-Proteinmenge durch die Behandlung sowohl mit Retinol als auch mit Retinsäure tendenziell abnimmt, könnte die durch Retinol hervorgerufene Hochregulation auf Transkriptebene nur ein kurzfristiger Effekt sein. Bereits nach 48 Stunden zeigt sich nach Retinol-Behandlung eine tendenzielle Abnahme der Genexpression. In der Literatur zeigt sich nach Retinsäure-Behandlung bei PAX6 eine Tendenz, die sich zu dem Genexpressionsergebnis in dieser Arbeit gegensätzlich verhält: Unter der In-vitro-Behandlung von embryonalen Stammzellen mit Retinsäure wird PAX6 vermehrt exprimiert [24]. In einer weiteren Untersuchung wird PAX6 in Neuronen durch die Behandlung mit Retinsäure ebenfalls vermehrt exprimiert [124].

Die Genexpression der Differenzierungsmarker DSG1, SPINK7 sowie des Markers KRT3 wird in dieser Studie durch Retinolderivate herunterreguliert (siehe Abb. 10, S. 36; Abb. 11, S. 37 und Abb. 14, S. 39). Die herunterregulierte Genexpression dieser Marker wird im Aniridie-Zellmodell (PAX6-Defizienz) bzw. im siRNA-Versuch gegen PAX6 ebenfalls beobachtet [51,52]. Möglicherweise geschieht die Herunterregulation der Differenzierungsmarker über den hemmenden Einfluss von Retinolderivaten auf die PAX6-Proteinmenge. Unter der Behandlung mit Retinolderivaten wird zwar nicht signifikant weniger PAX6-Protein exprimiert (siehe Abb. 20, S. 44 und Abb. 21, S. 44), allerdings könnten selbst minimale Änderungen der Proteinmenge von PAX6 starke Änderungen auf Transkriptionsebene zur Folge haben. Um eine mögliche, über Retinolderivate vermittelte Herunterregulation von PAX6 auf Proteinebene zu untersuchen, bedarf es mehr Wiederholungen von Western Blots von PAX6 nach der Behandlung von LEZ mit Retinolderivaten. Da ein Defekt von PAX6 zentral in der Entstehung der Aniridie ist [26], könnte eine Störung im Retinolstoffwechsel mit dem Pathomechanismus über PAX6 verknüpft sein.

Gegen die These einer Regulation von Markern, die durch Retinolderivate über PAX6-vermittelt wird, spricht, dass durch die Behandlung von LEZ mit einem Retinsäure-Rezeptor-Blocker DSG1 auf Transkriptebene hochreguliert wird [54]. Das bedeutet, dass ohne Retinsäure-Einfluss vermehrt DSG1 exprimiert wird und zeigt damit einen direkten Zusammenhang mit Retinolderivaten an. Daraus folgt, dass Retinsäure einen direkten – vermutlich nicht über PAX6 vermittelten - Einfluss auf die Expression von DSG1 hat.

5.2.3 Ausnahmerolle von KRT12 und Zusammenhang mit KRT3 und DSG1

Der korneale Differenzierungsmarker KRT12 wird sowohl auf Transkriptions- als auch auf Proteinebene stark hochreguliert (siehe Abb. 15, S. 39 und Abb. 22, S. 45), was zunächst eine Förderung der Differenzierung der LEZ durch Retinolderivate suggeriert. Von einer Förderung der Differenzierung ist jedoch nicht auszugehen, da andere Differenzierungsmarker, wie z.B. DSG1 oder KRT3 stark herunterreguliert werden. Da die Behandlung der LEZ in der Zellkultur mit einer Inkubationszeit von 24 bzw. 48 Stunden kurz war, könnte die Hochregulation von KRT12 nur ein kurzfristiger Effekt sein. Möglicherweise wird KRT12 zu einem späteren Zeitpunkt ebenfalls herunterreguliert werden.

Die Hochregulation von KRT12 liegt in dieser Studie einem unbekanntem, über Retinolderivate vermittelten Effekt zugrunde, der weiterer Analysen bedarf. PAX6 kann hierbei eine wichtige Rolle spielen, denn laut Liu et al. soll PAX6 generell die KRT12-Expression fördern [59]. PAX6 wird in dieser Studie durch die Behandlung mit Retinol vermehrt und mit Retinsäure vermindert exprimiert. Neben PAX6 bewirken wohl auch andere Marker eine Förderung der KRT12-Expression. So wird laut Sasamoto et al. die Expression von KRT12 neben den Transkriptionsfaktoren PAX6-b und OCT4 auch durch den Transkriptionsfaktor *Kruppel-like factor 4* (KLF4) gefördert [92]. Die Expression von KLF4 wird wiederum durch Retinsäure, über den RAR α vermittelt, gefördert [101]. Dies könnte auf eine indirekte Förderung der KRT12-Expression durch Retinsäure hindeuten. Inwieweit KLF4 einen direkten Einfluss auf die Expression von KRT12 in LEZ haben könnte, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

DSG1 und KRT12 sind korneale Differenzierungsmarker, die vermutlich unterschiedliche Regulationsmechanismen haben: In dieser Studie ist KRT12 auf Transkriptions- und Proteinebene signifikant vermehrt exprimiert (siehe Abb. 15, S. 39 und Abb. 22, S. 45) und DSG1 auf Transkriptebene herunterreguliert (siehe Abb. 11, S. 37). Diese gegenläufigen Regulationsmechanismen zeigen auf, dass die bei Aniridie beide herunterregulierten Differenzierungsmarker [51,52] wohl nicht über gleiche Mechanismen reguliert werden.

5.2.4 Interpretation von Ki67 im Hinblick auf ein potenzielles Überangebot an Retinolderivaten

Die stark verminderte Genexpression von Ki67 durch Retinsäure weist auf eine stark verminderte Zellproliferation hin, was auch im Mikroskop ersichtlich war (siehe Abb. 13, S. 38). Laut Literatur fördert Retinsäure die Differenzierung von LEZ [91]. Folglich hätte man von einer Differenzierung der LEZ in Vorläufer kornealer Epithelzellen und der daraus resultierenden Reduktion der Zellzahl ausgehen können. Die vorliegenden Ergebnisse deuten allerdings nicht auf eine Differenzierung der LEZ in Vorläufer kornealer Epithelzellen hin, sondern es kann möglicherweise von einer verminderten

Differenzierung ausgegangen werden. Trotzdem wird bei hohen Retinsäure-Konzentrationen die Proliferation der Zellen eingeschränkt, ohne einen starken Einfluss auf die Differenzierung zu haben.

Die Konzentration der Retinsäure scheint für den Zellzyklus entscheidend zu sein, da Retinsäure auch eine fördernde Wirkung auf die Zellproliferation besitzt: So kann Retinsäure im Zellkern an PPAR β/δ binden und dieser Komplex wirkt positiv auf das Zellwachstum und die Zellproliferation [123].

5.2.5 Die mögliche Rolle von DSG1 und SPINK7 in der AAK

Davis et al. zeigen, dass bei Haploinsuffizienz von PAX6 der potenzielle Differenzierungsmarker DSG1 in kornealen Epithelzellen auf Proteinebene signifikant herunterreguliert ist [14]. DSG1 ist über die Ausbildung von Desmosomen für die Zellstabilität enorm wichtig und könnte im Pathomechanismus der AAK eine Rolle spielen [7]. Unter der Behandlung mit Retinolderivaten ist DSG1 auf Transkriptionsebene ebenfalls signifikant vermindert exprimiert (siehe Abb. 11, S. 37).

Der Serinprotease-Inhibitor SPINK7 wird im siRNA-Modell gegen PAX6 und im Aniridie-Zellmodell auf Transkriptionsebene signifikant herunterreguliert und könnte über eine erhöhte Protease-Aktivität einen Einfluss auf die Ausprägung der AAK haben [52]. Unter der Behandlung mit Retinolderivaten wird SPINK7 auf Transkriptionsebene ebenfalls signifikant vermindert exprimiert (siehe Abb. 10, S. 36).

5.2.6 Interpretation von ABCG2, Keratine, ADH7 und ALDH1A1

Interpretation ABCG2

In vielen Studien zeigt sich eine Förderung der Differenzierung von LEZ durch Retinolderivate. Dabei war eine Herunterregulation des potenziellen Stammzellmarkers ABCG2 zu erwarten. ABCG2 ist unter der 48-stündigen Behandlung mit Retinsäure signifikant vermindert exprimiert (siehe Abb. 9, S. 36), was darauf hindeutet, dass die Differenzierung der behandelten LEZ gefördert werden könnte. Diese Herunterregulation des Stammzellmarkers könnte einen Verlust des Stammzellcharakters der behandelten LEZ bedeuten und für eine Differenzierung der LEZ sprechen. Diese These kann aufgrund der Herunterregulation der Differenzierungsmarker SPINK7, DSG1 und KRT3 nicht bestätigt werden.

Interpretation Keratine

Die Marker KRT12 und KRT3 sind aus der Literatur als Differenzierungsmarker bekannt [95]. Weil Retinolderivate die Differenzierung von LEZ fördern [91], bestand die Vermutung, dass KRT12 und KRT3 hochreguliert werden. Weil KRT12 hochreguliert wird und KRT3 herunterreguliert wird (siehe Abb. 14, S. 39 und Abb. 15, S. 39), ist davon auszugehen, dass die beiden Marker unterschiedlich reguliert werden, obwohl sie vor allem paarig vorkommen [8]. Für die These einer unterschiedlichen Regulation von KRT3 und KRT12 sprechen auch die Ergebnisse einer Untersuchung von Hornhäuten von Hühnchen und Kaninchen während der Embryonalentwicklung. Dabei werden KRT3 und KRT12 sowohl bei Hühnchen als auch bei Kaninchen an unterschiedlichen Zeitpunkten der Embryonalzeit exprimiert. In ausgewachsenen Kaninchen kommt KRT3 im Limbus ohne den gleichzeitigen Nachweis von KRT12 vor [8].

Die Keratine 12 und 19 werden unter der Behandlung mit Retinolderivaten auf Transkriptionsebene vermehrt exprimiert (Abb. 15, S. 39 und Abb. 16, S. 40).

Die Hochregulation von KRT19 als Stammzell- [95] und konjunktivaler Marker [112] unter der Behandlung mit Retinolderivaten (siehe Abb. 16, S. 40) ist ein weiteres Argument für die These einer durch Retinolderivate induzierten Differenzierungsstörung: Denn da laut Literatur die Differenzierung von LEZ durch Retinolderivate gefördert wird [91], müsste demnach der potenzielle Stammzellmarker KRT19 herunterreguliert werden. Die mRNA von KRT19 wird wohl direkt durch Retinsäure hochreguliert, wobei die genauen Mechanismen noch nicht geklärt sind. Die Expression des mRNA-Levels von KRT19 korreliert mit dem des RAR β [36].

Die Genexpression des Differenzierungsmarkers KRT3 ist unter Retinol-Behandlung signifikant reduziert (siehe Abb. 14, S. 39), was die These einer durch Retinolderivate verursachten verringerten Differenzierung von LEZ stützt. Die Proteinexpression von KRT3 ist in einer Studie von Kim et al. ebenfalls vermindert. Dabei zeigt sich die Proteinexpression unter Retinsäure-Behandlung abhängig von der Konzentration. So ist laut Kim et al. die Expression von KRT3 bei 10^{-8} M am höchsten und sinkt bis zur Konzentration von 10^{-6} M ab [46]. In dieser Arbeit wird ebenfalls die Konzentration von $1 \mu\text{M}$ gewählt, bei welcher KRT3 bei Kim et al. unter Retinsäure-Behandlung am wenigsten exprimiert wird. Eine Änderung der Genexpression bei verschiedenen Konzentrationen zeigt sich in dieser Arbeit nicht. KRT3 ist sowohl unter $1 \mu\text{M}$ als auch unter $5 \mu\text{M}$ Retinol-Behandlung signifikant vermindert (siehe Abb. 14, S. 39). Bei Kim et al. zeigt sich die Genexpressionsänderung bei verschiedenen Konzentrationen allerdings unter einer deutlich größeren Konzentrationsspanne (10^{-8} M- 10^{-6} M). Möglicherweise könnte sich unter Versuchsbedingungen dieser Arbeit mit größeren Konzentrationsunterschieden zwischen den Retinolderivaten ebenfalls eine Änderung der Genexpression ergeben.

Der Marker KRT12 ist bei Kim et al. in der Proteinexpression unter Retinsäure-Behandlung bei 10^{-8} M und 10^{-7} M signifikant hochreguliert. Bei einer Konzentration von 10^{-6} M ist KRT12 zwar leicht, allerdings nicht signifikant vermehrt exprimiert. Es zeigt sich, dass, je niedriger die Retinsäure-Konzentration, desto weniger stark KRT12 hochreguliert ist [46]. Auch in der vorliegenden Arbeit wird die Proteinmenge von KRT12 signifikant vermehrt exprimiert (siehe Abb. 22, S. 45), jedoch sinkt das Ausmaß der Expression nicht mit steigender Konzentration, wie bei Kim et al. beschrieben. Für $1 \mu\text{M}$ und $5 \mu\text{M}$ ist die Expression fast genauso hoch und nur bei $5 \mu\text{M}$ signifikant (siehe Abb. 22, S. 45).

Im Western-Blot werden die Isoformen von PAX6 (PAX6-a und PAX6-b) unterschiedlich stark exprimiert. So ist die PAX6-a-Form stärker ausgeprägt als die PAX6-b-Form (siehe Abb. 20, S. 44). Aus der Literatur ist bekannt, dass die Expression von KRT3 eher durch die PAX6-a-Form und die Expression von KRT12 eher durch die PAX6-b-Form gefördert wird [92]. Eine Förderung der Genexpression von KRT3 durch PAX6-a lässt sich nicht beobachten, da KRT3 herunterreguliert wird (siehe Abb. 14, S. 39). Auch die Stärke der Expression der PAX6-b-Form korreliert nicht mit der starken Hochregulation von KRT12 auf Proteinebene (siehe Abb. 22, S. 45).

Interpretation ADH7, ALDH1A1

Die Genexpression von ALDH1A1 ist unter Retinol-Behandlung leicht erhöht (siehe Abb. 18, S. 41). Da das Enzym für die Retinsäure-Synthese benötigt wird, könnte es vermehrt exprimiert werden. Im Gegensatz dazu wird ALDH1A1 unter Retinsäure-Behandlung tendenziell herunterreguliert (siehe Abb. 18, S. 41). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass Retinsäure in diesem Fall bereits genügend vorhanden ist. Das Enzym für die Synthese von Retinsäure würde demnach nicht mehr in diesem Maße benötigt werden und ALDH1A1 könnte über einen negativen Feedbackmechanismus leicht herunterreguliert werden. Über die Regulation von ADH7 und ALDH1A1 ist in der Literatur jedoch nichts bekannt. Ähnlich wird ADH7 unter Retinsäure-Behandlung tendenziell herunterreguliert (siehe Abb. 17, S. 41), was wie bei ALDH1A1 auf einen negativen Feedbackmechanismus hindeuten könnte, da ADH7 für die Retinsäure-Synthese nicht benötigt wird. Gegen diese Argumentation könnte die Tatsache sprechen, dass ADH7 auch unter Retinol-Behandlung tendenziell herunterreguliert wird und ADH7 unter Retinol-Behandlung noch für die Umsetzung von Retinol in Retinaldehyd benötigt wird.

Möglicherweise führt ein negativer Feedback-Mechanismus von der hochregulierten Proteinbildung durch Retinol zur tendenziellen Herunterregulation der mRNA-Expression von ADH7. Während sich allerdings bei Retinol die Expression auf Transkriptions- und Proteinebene gegensätzlich verhält, ist die Expression bei Retinsäure in der qPCR tendenziell und im Western Blot signifikant vermindert

(siehe Abb. 17, S. 41 und Abb. 23, S. 46). Ein negativer Feedback-Mechanismus scheint somit unter der Behandlung mit Retinsäure in diesem Zeitraum nicht stattzufinden.

5.2.7 Interpretation der Auswirkung des ABCG2-Blockers Ko143

Der ABC-Transporter ABCG2 hat unter der Einwirkung des ABCG2-Blockers Ko143 unter der Konzentration von 100 nM keinen Einfluss auf den Auswärtstransport von Retinol aus der LEZ. Bei keinem einzigen Marker ist eine Steigerung bzw. eine Veränderung der Genexpression im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit 100 nM Retinol feststellbar ($p \geq 0,7974$) (siehe Abb. 19, S. 42-43). Einzig bei SPINK7 und DSG1 ist die Genexpression mit der Behandlung des ABCG2-Blockers signifikant vermindert. Allerdings sind diese Marker nach alleiniger Behandlung mit Retinol (100 nM) ebenfalls signifikant vermindert (siehe (C) und (D), Abb. 19, S. 42), sodass hierbei keine signifikante Veränderung der Genexpression durch den ABCG2-Blocker im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Retinol vorliegt.

Möglicherweise war die Konzentration des ABCG2-Blockers nicht hoch genug gewählt, sodass der mögliche Hemmeffekt am ABC-Transporter noch nicht ausgebildet werden konnte. Insofern wäre es von Interesse herauszufinden, welchen Einfluss höhere Konzentrationen des ABCG2-Blockers auf die Retinol-Wirkung hätten. Ein Argument dafür, dass sich auch mit höherer Konzentration des ABCG2-Blockers kein Effekt auf die Retinol-Wirkung ergibt, ist, dass sich die Expressionsdaten der Marker zwischen den Behandlungen mit Retinol und Retinol + ABCG2-Blocker fast nicht unterscheiden. Somit erscheint es fragwürdig, ob durch höhere Konzentrationen des ABCG2-Blockers ein Unterschied zwischen den Behandlungen mit Retinol und Retinol + ABCG2-Blocker hervorgerufen werden kann.

5.2.8 Fazit aus der Interpretation der Gen- und Proteinexpressionsergebnisse

Die erste Arbeitshypothese bestand darin, dass ein Mangel an Retinolderivaten in LEZ zu einer Differenzierungsstörung führt und damit zum Pathomechanismus der AAK beiträgt. Dieser Ansicht zu Folge hätte eine Zufuhr von Retinolderivaten an LEZ zu einer erhöhten Expression von Differenzierungsmarkern führen müssen. Da dieser Effekt nicht beobachtbar war, trifft diese Hypothese nicht zu.

In der Zielsetzung wurde die Hypothese einer möglichen Beteiligung des ABC-Transporters ABCG2 am Auswärtstransport von Retinol aus LEZ aufgestellt. Diese Hypothese trifft nicht zu.

5.3 Interpretation der Ergebnisse der siRNA-Behandlung gegen ADH7

5.3.1 Interpretation ADH7, KRT3 und DSG1

Falls die Hypothese zutreffen würde, dass die Differenzierungsmarker KRT3 und DSG1 durch ADH7 herunterreguliert werden, würde man im siRNA-Versuch gegen ADH7 eine Herunterregulation von KRT3 und DSG1 beobachten (siehe Abb. 5, S. 20). Aufgrund der Tatsache, dass die mRNA-Expression von ADH7 stark vermindert ist ($p=0,0025$), kann ein erfolgreicher induzierter Knockout von ADH7 durch die siRNA angenommen werden (siehe Abb. 25, S. 48). In vier Versuchen lässt sich keine signifikant veränderte Regulation ($p \geq 0,3029$) der Differenzierungsmarker KRT3 und DSG1 feststellen (siehe Abb. 25, S. 48). Somit wird die unter PAX6-Defizienz beobachtbare Herunterregulation von KRT3 und DSG1 vermutlich nicht über ADH7 reguliert.

Im Western-Blot-Versuch des siRNA-Modells gegen ADH7 ist ADH7 auf Proteinebene nicht herunterreguliert (siehe Abb. 26, S. 49), obwohl die Genexpression von ADH7 stark herunterreguliert ist (siehe Abb. 25, S. 48). Eine Erklärung hierfür liefert die im Vergleich zur Inkubationszeit (48 Stunden) der siRNA-Versuche vermutlich deutlich längere Halbwertszeit des ADH7-Proteins. Trotz der Reduktion der Expression von ADH7 auf mRNA-Ebene war wohl noch kein Effekt auf Proteinebene nachweisbar.

5.3.2 Fazit aus der Interpretation der siRNA-Ergebnisse

Der zweite Teil der Arbeitshypothese bestand in einer potenziellen direkten Regulation der Differenzierungsmarker KRT3 und DSG1 über ADH7. Weil im siRNA-Modell gegen ADH7 auf Genexpressionsebene ADH7 stark herunterreguliert wird und die Differenzierungsmarker nicht mitreguliert werden, wird der Effekt von PAX6 auf KRT3 und DSG1 nicht über ADH7 vermittelt. Diese Arbeitshypothese trifft demnach nicht zu.

5.4 Ausblick auf weitere Studien im Kontext der kongenitalen Aniridie

Um ein Überangebot von Retinolderivaten in LEZ zu beweisen, wäre eine Konzentrationsmessung von Retinol und Retinsäure in LEZ von Aniridie-Patienten im Vergleich zu gesunden LEZ indiziert. Zur Untersuchung einer möglichen Abweichung zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wäre die Behandlung von LEZ mit Retinolderivaten mit anderen Untersuchungsbedingungen von Nöten: Hierfür könnte die Behandlungszeit von 48 Stunden auf vier, sechs oder acht Tage verlängert werden. Die Konzentration der Retinolderivate könnte vermindert, bzw. erhöht werden (z.B. 100 nM Retinsäure,

10 μ M Retinol). Somit könnte erforscht werden, in welcher Konzentrationsspanne Retinolderivate kaum, bzw. besonders starke Effekte auf die Gen- bzw. Proteinexpression von Markern von LEZ bewirken.

Kalzium scheint in der Differenzierung von LEZ eine wichtige Rolle zu spielen. In Experimenten mit LEZ unter der alleinigen Behandlung mit Kalzium werden Marker wie DSG1 und ADH7 hochreguliert [43]. Somit ist es von Interesse, den Zusammenhang zwischen der Auswirkung von Retinolderivaten und dem Kalzium-Stoffwechsel im Kontext der AAK zu erforschen.

Es gilt, das Schlüsselgen der Aniridie, PAX6, weiter kennen lernen: Es wäre wichtig herauszufinden, ob PAX6 vermehrt in LEZ bzw. Zellen mit Stammzellcharakter oder in differenzierten kornealen Epithelzellen exprimiert wird, um weitere Aussagen auf die Differenzierung und Regulationsmechanismen treffen zu können.

5.5 Schlussfolgerungen

Die Behandlung mit Retinolderivaten fördert die Differenzierung von LEZ nicht. Überraschenderweise wird die Expression von DSG1, SPINK7 und KRT3 ähnlich stark wie unter der PAX6-Defizienz beeinflusst. Möglicherweise liegt in den LEZ bei Aniridie kein Mangel an Retinolderivaten, sondern ein Überangebot an Retinolderivaten vor.

Der ABC-Transporter ABCG2 zeigt keinen Einfluss am Auswärtstransport von Retinol aus LEZ.

Korneale Differenzierungsmarker wie KRT12 (auf Transkriptionsebene vermehrt exprimiert) und DSG1 (auf Transkriptionsebene vermindert exprimiert) werden wohl über unterschiedliche Mechanismen reguliert.

6 Literatur

1. Akpek EK, Harissi-Dagher M, Petrarca R, Butrus SI, Pineda R, Aquavella J V, Dohlman CH (2007) Outcomes of Boston Keratoprosthesis in aniridia: A retrospective multicenter study. *Am J Ophthalmol* 144:227-231.e1
2. Ashkar S, Mesentsev A, Zhang W-X, Mastuyugin V, Dunn MW, Laniado-Schwartzman M (2004) Retinoic acid induces corneal epithelial CYP4B1 gene expression and stimulates the synthesis of inflammatory 12-hydroxyeicosanoids. *J Ocul Pharmacol Ther* 20:65–74
3. Blomhoff R, Green MH, Green JB, Berg T, Norum KR (1991) Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport, and storage. *Physiol Rev* 71:951–990
4. Brandt JD, Casuso LA, Budenz DL (2004) Markedly increased central corneal thickness: an unrecognized finding in congenital aniridia. *Am J Ophthalmol* 137:348–350
5. Brusa P, Torricelli C (1953) Wilms' nephroblastoma and congenital renal diseases in the case reports of the Istituto Provinciale di Protezione ed Assistenza dell'Infanzia di Milano. *Minerva Pediatr* 5:457–463
6. Callaerts P, Halder G, Gehring WJ (1997) PAX-6 in development and evolution. *Annu Rev Neurosci* 20:483–532
7. Calvão-Pires P, Santos-Silva R, Falcão-Reis F, Rocha-Sousa A (2014) Congenital aniridia: Clinic, genetics, therapeutics, and prognosis. *Int Sch Res Not* 2014:305350
8. Chaloin-Dufau C, Dhouailly D, Sun T-T (1990) Appearance of the keratin pair K3/K12 during embryonic and adult corneal epithelial differentiation in the chick and in the rabbit. *Cell Differ Dev* 32:97–108
9. Clagett-Dame M, Knutson D (2011) Vitamin A in Reproduction and Development. *Nutr* 3: 385–428
10. Collinson JM, Quinn JC, Hill RE, West JD (2003) The roles of Pax6 in the cornea, retina, and olfactory epithelium of the developing mouse embryo. *Dev Biol* 255:303–312
11. Corden LD, Swensson O, Swensson B, Rochels R, Wannke B, Thiel HJ, McLean WH (2000) A novel keratin 12 mutation in a German kindred with Meesmann's corneal dystrophy. *Br J Ophthalmol* 84:527–530
12. Cotsarelis G, Cheng S-Z, Dong G, Sun T-T, Lavker RM (1989) Existence of slow-cycling limbal

6 Literatur

- epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: Implications on epithelial stem cells. *Cell* 57:201–209
13. Davis A, K.Cowell J (1993) Mutations in the PAX6 gene in patients with hereditary aniridia. *Hum Mol Genet* 2:2093–2097
 14. 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
 15. de Paiva CS, Chen Z, Corrales RM, Pflugfelder SC, Li D-Q (2005) ABCG2 transporter identifies a population of clonogenic human limbal epithelial cells. *Stem Cells* 23:63–73
 16. Desvergne B, Wahli W (1999) Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20:649–688
 17. Doughty MJ, Zaman ML (2000) Human corneal thickness and its impact on intraocular pressure measures: A review and meta-analysis approach. *Surv Ophthalmol* 44:367–408
 18. Doyle LA, Yang W, Abruzzo L V, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15665–15670
 19. Dua HS, Shanmuganathan VA, Powell-Richards AO, Tighe PJ, Joseph A (2005) Limbal epithelial crypts: a novel anatomical structure and a putative limbal stem cell niche. *Br J Ophthalmol* 89:529– 532
 20. E Margo C (1983) Congenital aniridia: A histopathologic study of the anterior segment in children. *J of Pediatric Ophthalmol and Strabism*, 20(5):192-198
 21. Ebrahimi M, Taghi-Abadi E, Baharvand H (2009) Limbal stem cells in review. *J Ophthalmic Vis Res* 4:40–58
 22. Fantes JA, Bickmore WA, Fletcher JM, Ballesta F, Hanson IM, van Heyningen V (1992) Submicroscopic deletions at the WAGR locus, revealed by nonradioactive in situ hybridization. *Am J Hum Genet* 51:1286–1294
 23. Fenaux P, Z Wang Z, Degos L (2007) Treatment of acute promyelocytic leukemia by retinoids. *Curr Top Microbiol Immunol* 313:101–128
 24. Gajović S, St-Onge L, Yokota Y, Gruss P (1998) Retinoic acid mediates Pax6 expression during in vitro differentiation of embryonic stem cells. *Differentiation* 62:187–192

6 Literatur

25. Glaser T, Walton DS, Maas RL (1992) Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human PAX6 gene. *Nat Genet* 2:232–239
26. 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. *Nat Genet* 7:463–471
27. Glass CK, Rosenfeld MG (2000) The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14:121–141
28. Green HN, Mellanby E (1928) Vitamin A as an anti-infective agent. *Br Med J* 2:691–696
29. Halder G, Callaerts P, Gehring WJ (1995) Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science* (80-) 267:1788 – 1792
30. Hatchell DL, Faculjak M, Kubicek D (1984) Treatment of xerophthalmia with retinol, tretinoin, and etretinate. *JAMA Ophthalmol* 102:926–927
31. Higgins CF (2001) ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. *Res Microbiol* 152:205–210
32. Hodgson S V, Saunders KE (1980) A probable case of the homozygous condition of the aniridia gene. *J Med Genet* 17:478–480
33. Hogan BLM, Horsburgh G, Cohen J, Hetherington CM, Fisher G, Lyon MF (1986) Small eyes (Sey): a homozygous lethal mutation on chromosome 2 which affects the differentiation of both lens and nasal placodes in the mouse. *J Embryol Exp Morphol* 97:95 – 110
34. Holland EJ, Djalilian AR, Schwartz GS (2003) Management of aniridic keratopathy with keratolimbal allograft: a limbal stem cell transplantation technique. *Ophthalmology* 110:125–130
35. Hori Y, Spurr-Michaud S, Russo CL, Argüeso P, Gipson IK (2004) Differential regulation of membrane-associated mucins in the human ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:114–122
36. Hu L, Crowe DL, Rheinwald JG, Chambon P, Gudas LJ (1991) Abnormal expression of retinoic acid receptors and Keratin 19 by human oral and epidermal squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Res* 51:3972 – 3981
37. Huang Z, Liu Y, Qi G, Brand D, Zheng SG (2018) Role of Vitamin A in the immune system. *J*

6 Literatur

Clin Med 7:258

38. Irvine AD, Corden LD, Swensson O, Swensson B, Moore JE, Frazer DG, Smith FJD, Knowlton RG, Christophers E, Rochels R, Uitto J, McLean WHI (1997) Mutations in cornea-specific keratin K3 or K12 genes cause Meesmann's corneal dystrophy. *Nat Genet* 16:184–187
39. Jairam S, Edenberg HJ (2014) An enhancer-blocking element regulates the cell-specific expression of alcohol dehydrogenase 7. *Gene* 547:239–244
40. Johansen S, Heegaard S, Prause JU, Rask-Pedersen E (1998) The healing effect of all-trans retinoic acid on epithelial corneal abrasions in rabbits. *Acta Ophthalmol Scand* 76:401–404
41. Jordan T, Hanson I, Zaletayev D, Hodgson S, Prosser J, Seawright A, Hastie N, van Heyningen V (1992) The human PAX6 gene is mutated in two patients with aniridia. *Nat Genet* 1:328–332
42. Käsmann-Kellner B, Seitz B (2014) Kongenitale Aniridie oder PAX6-Syndrom? *Der Ophthalmol* 111:1144
43. Katiyar P, Stachon T, Fries FN, Parow F, Ulrich M, Langenbacher A, Cayless A, Seitz B, Käsmann-Kellner B, Latta L, Szentmáry N (2022) Decreased FABP5 and DSG1 protein expression following PAX6 knockdown of differentiated human limbal epithelial cells. *Exp Eye Res* 215:108904
44. Kawaguchi R, Yu J, Honda J, Hu J, Whitelegge J, Ping P, Wiita P, Bok D, Sun H (2007) A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of Vitamin A. *Science* (80-) 315:820–825
45. Khillan JS (2014) Vitamin A/retinol and maintenance of pluripotency of stem cells. *Nutrients* 6:1209–1222
46. Kim SW, Seo KY, Rhim T, Kim EK (2012) Effect of retinoic acid on epithelial differentiation and mucin expression in primary human corneal limbal epithelial cells. *Curr Eye Res* 37:33–42
47. Kopan R Notch signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a011213
48. Kucerova R, Ou J, Lawson D, Leiper LJ, Collinson JM (2006) Cell Surface Glycoconjugate abnormalities and corneal epithelial wound healing in the Pax6 ^{+/–} mouse model of aniridia-related keratopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:5276–5282
49. Kumar S, Dollé P, Ghyselincq NB, Duyster G (2017) Endogenous retinoic acid signaling is required for maintenance and regeneration of cornea. *Exp Eye Res* 154:190–195

6 Literatur

50. 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. Limbal palisades of Vogt morphology in ARK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54:5333–5342
51. Latta L, Viestenz A, Stachon T, Colanesi S, Szentmáry N, Seitz B, Käsmann-Kellner B (2018) Human aniridia limbal epithelial cells lack expression of keratins K3 and K12. *Exp Eye Res* 167:100–109
52. 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
53. 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
54. 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 related expression profiles: Does PAX6 affect RA signaling in limbal epithelial cells? *Biomol* 11:1651
55. Lee H, Khan R, O’Keefe M (2008) Aniridia: current pathology and management. *Acta Ophthalmol* 86:708–715
56. Li G, Xu F, Zhu J, Krawczyk M, Zhang Y, Yuan J, Patel S, Wang Y, Lin Y, Zhang M, Cai H, Chen D, Zhang M, Cao G, Yeh E, Lin D, Su Q, Li W, Sen GL, Afshari N, Chen S, Maas RL, Fu X-D, Zhang K, Liu Y, Ouyang H (2015) Transcription factor PAX6 (Paired Box 6) controls limbal stem cell lineage in development and disease. *J Biol Chem* 290:20448–20454
57. Li LTAO, Jiang G, Chen Q, Zheng JUNN (2015) Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review). 1566–1572
58. Li W, Chen Y-T, Hayashida Y, Blanco G, Kheirkah A, He H, Chen S-Y, Liu C-Y, Tseng SCG (2008) Down-regulation of Pax6 is associated with abnormal differentiation of corneal epithelial cells in severe ocular surface diseases. *J Pathol* 214:114–122

6 Literatur

59. Liu JJ, Kao WW-Y, Wilson SE (1999) Corneal epithelium-specific mouse keratin K12 promoter. *Exp Eye Res* 68:295–301
60. M.Hanson I, Seawright A, Hardman K, Hodgson S, Zaletayev D, Fekete G, Heyningen V van (1993) PAX6 mutations in aniridia. *Hum Mol Genet* 2:915–920
61. Mangelsdorf DJ (1994) Vitamin A receptors. *Nutr Rev* 52:S32–S44
62. Martha A, Ferrell RE, Mintz-Hittner H, Lyons LA, Saunders GF (1994) Paired box mutations in familial and sporadic aniridia predicts truncated aniridia proteins. *Am J Hum Genet* 54:801–811
63. Martha AD, Ferrell RE, Saunders GF (1994) Nonsense mutation in the homeobox region of the aniridia gene. *Hum Mutat* 3:297–300
64. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, Grimaldi PA, Kadowaki T, Lazar MA, O’Rahilly S, Palmer CNA, Plutzky J, Reddy JK, Spiegelman BM, Staels B, Wahli W (2006) International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev* 58:726– 741
65. Michalik L, Wahli W (2007) Guiding ligands to nuclear receptors. *Cell* 129:649–651
66. Mohan R, Chintala SK, Jung JC, Villar WVL, McCabe F, Russo LA, Lee Y, McCarthy BE, Wollenberg KR, Jester J V, Wang M, Welgus HG, Shipley JM, Senior RM, Fini ME (2002) Matrix Metalloproteinase Gelatinase B (MMP-9) coordinates and effects epithelial regeneration. *J Biol Chem* 277:2065–2072
67. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R (1982) The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31:11–24
68. Mongan NP, Gudas LJ (2007) Diverse actions of retinoid receptors in cancer prevention and treatment. *Differentiation* 75:853–870
69. Nakayama A, Matsuo H, Takada T, Ichida K, Nakamura T, Ikebuchi Y, Ito K, Hosoya T, Kanai Y, Suzuki H, Shinomiya N (2011) ABCG2 is a high-capacity urate transporter and its genetic impairment increases serum uric acid levels in humans. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 30:1091–1097
70. Napoli JL (2017) Cellular retinoid binding-proteins, CRBP, CRABP, FABP5: Effects on retinoid metabolism, function and related diseases. *Pharmacol Ther* 173:19–33

6 Literatur

71. Nelson LB, Spaeth GL, Nowinski TS, Margo CE, Jackson L (1984) Aniridia. A review. *Surv Ophthalmol* 28:621–642
72. Nezzar H, Chiambaretta F, Marceau G, Blanchon L, Faye B, Dechelotte P, Rigal D, Sapin V (2007) Molecular and metabolic retinoid pathways in the human ocular surface. *Mol Vis* 13:1641–1650
73. Nishida K, Kinoshita S, Ohashi Y, Kuwayama Y, Yamamoto S (1995) Ocular surface abnormalities in aniridia. *Am J Ophthalmol* 120:368–375
74. Nishina S, Kohsaka S, Yamaguchi Y, Handa H, Kawakami A, Fujisawa H, Azuma N (1999) PAX6 expression in the developing human eye. *Br J Ophthalmol* 83:723–727
75. Ottonello S, Petrucco S, Maraini G (1987) Vitamin A uptake from retinol-binding protein in a cell-free system from pigment epithelial cells of bovine retina. Retinol transfer from plasma retinol-binding protein to cytoplasmic retinol-binding protein with retinyl-ester formation as the intermediat. *J Biol Chem* 262:3975–3981
76. Ou J, Walczysko P, Kucerova R, Rajnicek AM, McCaig CD, Zhao M, Collinson JM (2008) Chronic wound state exacerbated by oxidative stress in Pax6^{+/-} aniridia-related keratopathy. *J Pathol* 215:421–430
77. Pirie A (1977) Effects of locally applied retinoic acid on corneal xerophthalmia in the rat. *Exp Eye Res* 25:297–302
78. Polgár O, Robey RW, Bates SE (2008) ABCG2: structure, function and role in drug response. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4:1–15
79. Quinn JC, West JD, Hill RE (1996) Multiple functions for Pax6 in mouse eye and nasal development. *Genes Dev* 10:435–446
80. Quiring R, Walldorf U, Kloter U, Gehring WJ (1994) Homology of the eyeless gene of drosophila to the small eye gene in mice and aniridia in humans. *Science* (80-) 265:785–789
81. Ramaesh K, Ramaesh T, Dutton GN, Dhillon B (2005) Evolving concepts on the pathogenic mechanisms of aniridia related keratopathy. *Int J Biochem Cell Biol* 37:547–557
82. Ramaesh T, Ramaesh K, Martin Collinson J, Chanas SA, Dhillon B, West JD (2005) Developmental and cellular factors underlying corneal epithelial dysgenesis in the Pax6^{+/-} mouse model of aniridia. *Exp Eye Res* 81:224–235

6 Literatur

83. Ramaesh T, Ramaesh K, Leask R, Springbett A, Riley SC, Dhillon B, West JD (2006) Increased apoptosis and abnormal wound-healing responses in the heterozygous Pax6 +/- mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:1911–1917
84. Ramirez-Miranda A, Nakatsu MN, Zarei-Ghanavati S, Nguyen C V, Deng SX (2011) Keratin 13 is a more specific marker of conjunctival epithelium than keratin 19. *Mol Vis* 17:1652–1661
85. Ross AC, Zolfaghari R (2011) Cytochrome P450s in the regulation of cellular retinoic acid metabolism. *Annu Rev Nutr* 31:65–87
86. Ross SA, McCaffery PJ, Drager UC, De Luca LM (2000) Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev* 80:1021–1054
87. Rubelowski A-K (2018) Charakterisierung der Epithelzelllinie HCE-T (RCB 2280) im Vergleich zu primären Limbusepithelzellkulturen sowie primären Korneaepithelzellen. Diss. med. Universität des Saarlandes (S. 11)
88. Rubelowski A-K, Latta L, Katiyar P, Stachon T, Käsmann-Kellner B, Seitz B, Szentmáry N (2020) HCE-T cell line lacks cornea-specific differentiation markers compared to primary limbal epithelial cells and differentiated corneal epithelium. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 258: 565–575
89. Ruiz A, Winston A, Lim Y-H, Gilbert BA, Rando RR, Bok D (1999) Molecular and biochemical characterization of lecithin retinol acyltransferase. *J Biol Chem* 274:3834–3841
90. Salvador-Culla B, Kolovou PE (2016) Keratoprosthesis: A review of recent advances in the field. *J Funct Biomater* 7:13
91. Samarawickrama C, Chew S, Watson S (2015) Retinoic acid and the ocular surface. *Surv Ophthalmol* 60:183–195
92. Sasamoto Y, Hayashi R, Park S-J, Saito-Adachi M, Suzuki Y, Kawasaki S, Quantock AJ, Nakai K, Tsujikawa M, Nishida K (2016) PAX6 isoforms, along with reprogramming factors, differentially regulate the induction of cornea-specific genes. *Sci Rep* 6:20807
93. Schäfer S, Koch PJ, Franke WW (1994) Identification of the ubiquitous human desmoglein, DSG2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins. *Exp Cell Res* 211:391–399
94. Schermer A, Galvin S, Sun TT (1986) Differentiation-related expression of a major 64K corneal

6 Literatur

- keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 103:49–62
95. Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE (2005) Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res* 81:247–264
96. Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182:311–322
97. See AW-M, Kaiser ME, White JC, Clagett-Dame M (2008) A nutritional model of late embryonic vitamin A deficiency produces defects in organogenesis at a high penetrance and reveals new roles for the vitamin in skeletal development. *Dev Biol* 316:171–190
98. Seitz B, Das S, Sauer R, Hofmann-Rummelt C, Beckmann MW, Kruse FE (2011) Simultaneous amniotic membrane patch in high-risk keratoplasty. *Cornea* 30:269–272
99. Senoo H, Mezaki Y, Fujiwara M (2017) The stellate cell system (vitamin A-storing cell system). *Anat Sci Int* 92:387–455
100. Shaw N, Elholm M, Noy N (2003) Retinoic acid is a high affinity selective ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor β/δ . *J Biol Chem* 278:41589–41592
101. Shi J, Zheng B, Chen S, Ma G, Wen J (2012) Retinoic acid receptor α mediates all-trans-retinoic acid-induced Klf4 gene expression by regulating Klf4 promoter activity in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 287:10799–10811
102. Shih T-W, Lin T-H, Shealy YF, Hill DL (1997) Nonenzymatic isomerization of 9-cis-retinoic acid catalyzed by sulfhydryl compounds. *Drug Metab Dispos* 25:27 LP – 32
103. Sommer A (1983) Effects of Vitamin A deficiency on the ocular surface. *Ophthalmology* 90:592–600
104. Sommer A (1990) Xerophthalmia, keratomalacia and nutritional blindness. *Int Ophthalmol* 14:195–199
105. Steinberg MS, Shida H, Giudice GJ, Shida M, Patel NH, Blaschuk OW (1987) On the molecular organization, diversity and functions of desmosomal proteins. *Ciba Found Symp* 125 - Junctional Complexes Epithel Cells 1987;125:3-25
106. Suzuki M, Suzuki H, Sugimoto Y, Sugiyama Y (2003) ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J Biol Chem* 278:22644–22649

6 Literatur

107. Tarapcsák S, Szalóki G, Telbisz Á, Gyöngy Z, Matúz K, Csósz É, Nagy P, Holb IJ, Rühl R, Nagy L, Szabó G, Goda K (2017) Interactions of retinoids with the ABC transporters P-glycoprotein and breast cancer resistance protein. *Sci Rep* 7:41376
108. Ton CCT, Hirvonen H, Miwa H, Weil MM, Monaghan P, Jordan T, van Heyningen V, Hastie ND, Meijers-Heijboer H, Drechsler M, Royer-Pokora B, Collins F, Swaroop A, Strong LC, Saunders GF (1991) Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell* 67:1059–1074
109. Townsend WM (1991) The limbal palisades of Vogt. *Trans Am Ophthalmol Soc* 89:721–756
110. 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
111. Tseng SCG, Li D-Q (1996) Comparison of protein kinase C subtype expression between normal and aniridic human ocular surfaces: Implications for limbal stem cell dysfunction in aniridia. *Cornea* 15: 168-178
112. Turner HC, Budak MT, Akinci MAM, Wolosin JM (2007) Comparative analysis of human conjunctival and corneal epithelial gene expression with oligonucleotide microarrays. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:2050–2061
113. Ubels JL, Edelhauser HF, Austin KH (1983) Healing of experimental corneal wounds treated with topically applied retinoids. *Am J Ophthalmol* 95:353–358
114. Ubels JL, Foley KM, Rismondo V (1986) Retinol secretion by the lacrimal gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27:1261–1268
115. Vasiliou V, Nebert DW (2005) Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. *Hum Genomics* 2:138–143
116. Vauclair S, Majo F, Durham AD, Ghyselinck NB, Barrandon Y, Radtke F (2007) Corneal epithelial cell fate is maintained during repair by Notch1 signaling via the regulation of vitamin A metabolism. *Dev Cell* 13:242–253
117. Vlaming MLH, Lagas JS, Schinkel AH (2009) Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): Recent findings in ABCG2 knockout mice. *Adv Drug Deliv Rev* 61:14–25
118. Wald G (1968) Molecular basis of visual excitation. *Science* (80-) 162:230 – 239

6 Literatuur

119. Walther C, Gruss P (1991) Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113:1435–1449
120. Wapenaar MC, Monsuur AJ, Poell J, van 't Slot R, Meijer JWR, Meijer GA, Mulder CJ, Mearin ML, Wijmenga C (2007) The SPINK gene family and celiac disease susceptibility. *Immunogenetics* 59:349–357
121. Watanabe K, Nishida K, Yamato M, Umemoto T, Sumide T, Yamamoto K, Maeda N, Watanabe H, Okano T, Tano Y (2004) Human limbal epithelium contains side population cells expressing the ATP-binding cassette transporter ABCG2. *FEBS Lett* 565:6–10
122. Weber C, Fischer J, Redelfs L, Rademacher F, Harder J, Weidinger S, Wu Z, Meyer-Hoffert U (2017) The serine protease inhibitor of Kazal-type 7 (SPINK7) is expressed in human skin. *Arch Dermatol Res* 309:767–771
123. Wolf G (2008) Retinoic acid as cause of cell proliferation or cell growth inhibition depending on activation of one of two different nuclear receptors. *Nutr Rev* 66:55–59
124. Wu C-Y, Persaud SD, Wei L-N (2016) Retinoic acid induces ubiquitination-resistant RIP140/LSD1 complex to fine-tune Pax6 gene in neuronal differentiation. *Stem Cells* 34:114–123
125. Wu H, Stanley JR, Cotsarelis G (2003) Desmoglein isotype expression in the hair follicle and its cysts correlates with type of keratinization and degree of differentiation. *J Invest Dermatol* 120:1052–1057
126. Yang Z-N, Davis GJ, Hurley TD, Stone CL, Li T-K, Bosron WF (1994) Catalytic efficiency of human alcohol dehydrogenases for retinol oxidation and retinal reduction. *Alcohol Clin Exp Res* 18:587–591
127. Yazdanpanah G, Jabbehdari S, Djalilian AR (2017) Limbal and corneal epithelial homeostasis. *Curr Opin Ophthalmol* 28:348–354
128. Yu S, Levi L, Siegel R, Noy N (2012) Retinoic acid induces neurogenesis by activating both retinoic acid receptors (RARs) and peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (PPAR β/δ). *J Biol Chem* 287:42195–42205

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<u>Abbildungsverzeichnis</u>	Seite
Abbildung 1. Anatomie des Limbus mit Differenzierungsschritten von Limbusepithelstammzellen....	5
Abbildung 2. Korrelationsanalyse von Aniridie-relevanten Genen.	17
Abbildung 3. Modell für die Ausgangssituation wichtiger mit PAX6 korrelierender Marker	18
Abbildung 4. Mögliche Regulationsmechanismen von Markern über Retinolderivate.	19
Abbildung 5. Mögliche Regulationsmechanismen von Markern über ADH7.	20
Abbildung 6. Modell für mögliche Wirkung des ABC-Transporters ABCG2 als Auswärts- transporter für Retinol	21
Abbildung 7. Thermocycler-Profil der Software QuantStudio™ Design & Analysis.....	31
Abbildung 8. Genexpressionsdaten des signifikant regulierten Markers PAX6.....	35
Abbildung 9. Genexpressionsdaten des signifikant herunterregulierten Markers ABCG2.	36
Abbildung 10. Genexpressionsdaten des signifikant herunterregulierten Markers SPINK7.....	36
Abbildung 11. Genexpressionsdaten des signifikant herunterregulierten Markers DSG1.	37
Abbildung 12. Genexpressionsdaten des signifikant herunterregulierten Markers Ki67.	38
Abbildung 13. Mit Retinsäure behandelte LEZ im Blick durch das Mikroskop	38
Abbildung 14. Genexpressionsdaten des signifikant herunterregulierten Markers KRT3.	39
Abbildung 15. Genexpressionsdaten des signifikant hochregulierten Markers KRT12.....	39
Abbildung 16. Genexpressionsdaten des signifikant hochregulierten Markers KRT19.....	40
Abbildung 17. Genexpressionsdaten des nicht-signifikant regulierten Markers ADH7.....	41
Abbildung 18. Genexpressionsdaten des nicht-signifikant regulierten Markers ALDH1A1.	41
Abbildung 19. Genexpressionsdaten von Markern nach Behandlung mit Retinol und dem ABCG2-Blocker Ko143.	42-43
Abbildung 20. Western-Blots der Marker PAX6, KRT12, ADH7 und ACTB (Kontrollprobe).	44
Abbildung 21. Densitometrische Auswertung der Proteinexpressionsdaten des nicht-signifikant regulierten Markers PAX6.....	44

Abbildung 22. Densitometrische Auswertung der Proteinexpressionsdaten des signifikant regulierten Markers KRT12.....	45
Abbildung 23. Densitometrische Auswertung der Proteinexpressionsdaten des signifikant regulierten Markers ADH7.....	46
Abbildung 24. Proteinexpressionsdaten von Markern nach Behandlung mit Retinol und dem ABCG2-Blocker Ko143.	47
Abbildung 25. Genexpressionsdaten der Marker (A) ADH7, (B) PAX6, (C) ABCG2, (D) SPINK7, (E) DSG1, (F) Ki67, (G) KRT3, (H) KRT12, (I) KRT19 und (J) ALDH1A1 im siRNA-Modell gegen ADH7.	48
Abbildung 26. Western-Blots der Marker ADH7 und ACTB (Kontrollprobe).	49
Abbildung 27. Zusammenfassung der signifikanten Genexpressions- (A) und Proteinexpressionsergebnisse (B) unter der Behandlung mit Retinolderivaten	50

<u>Tabellenverzeichnis</u>	Seite
Tabelle 1. Verwendete Geräte und Hersteller.	22
Tabelle 2. Verwendete Labormaterialien und Hersteller.	22
Tabelle 3. Verwendete Chemikalien/Kits und Hersteller.	23
Tabelle 4. Primer für die qPCR.	24
Tabelle 5. Verwendete siRNAs.	24
Tabelle 6. Verwendete Antikörper, Katalognummer, Hersteller und Verdünnung.	25
Tabelle 7. Behandlungssubstanzen und Endkonzentrationen der Retinolderivate bei der 24-stündigen Behandlung von LEZ.	27-28
Tabelle 8. Behandlungssubstanzen und Endkonzentrationen der Retinolderivate bei der 48-stündigen Behandlung von LEZ.	28
Tabelle 9. Reaktionsmix für eine Reaktion für die cDNA-Synthese.	29-30
Tabelle 10. Ansatz von Primermix und Templatmix für ein Well einer 96-Well-Platte.	30
Tabelle 11. Mix für die Herstellung eines Tubes für die Elektrophorese.	32
Tabelle 12. Behandlungssubstanzen und Endkonzentrationen der siRNA bei der Behandlung von LEZ.	34

Publikationen

Publikation

Latta L, Knebel I, Bleil C, Stachon T, Katiyar P, Zussy C, Fries FN, Käsmann-Kellner B, Seitz B, Szentmáry N. Similarities in DSG1 and KRT3 Downregulation through Retinoic Acid Treatment and PAX6 Knockdown Related Expression Profiles: Does PAX6 Affect RA Signaling in Limbal Epithelial Cells? *Biomolecules*. 2021; 11: 1651.

Poster:

Knebel I, Latta L, Stachon T, Seitz B, Käsmann-Kellner B, Szentmáry N. Einfluss von Retinolderivaten auf Differenzierungsmarker im Kontext der kongenitalen Aniridie. Präsentiert am „117. Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG), 26.-29. September 2019, Berlin.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich herzlich Frau Prof. Dr. Nóra Szentmáry, Oberärztin der Klinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes und seit Juni 2020 Leiterin des Dr. Rolf M. Schwiete Zentrums für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit, für eine Doktorarbeit zu forschen, danken. Vielen Dank für das große Engagement, die Geduld und für die wertvollen Tipps und Ratschläge.

Ganz herzlich danke ich Herrn Dr. Lorenz Latta für die hervorragende Betreuung, sein großzügiges Engagement und für die Zeit, die er in mich investiert hat. Seine außergewöhnliche Unterstützung und seine stetige Hilfsbereitschaft haben einen wichtigen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet. Wegen seiner freundlichen und offenen Art hat mir die Arbeit im Labor viel Freude bereitet. Danke für die schöne und lehrreiche Zusammenarbeit!

Bei Frau Dr. Tanja Stachon möchte ich mich herzlich für die besonders hilfreiche Unterstützung bei den Experimenten im Labor und bei der statistischen Auswertung im Labor bedanken. Durch ihre fachliche Kompetenz und ihre freundliche Art stand sie mir bei Fragen stets zur Seite und konnte mir darüber hinaus viele wichtige Anregungen und Ratschläge liefern.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Berthold Seitz, Klinikdirektor der Klinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes, für die Möglichkeit, die Doktorarbeit in den Laboratorien der Universitätsaugenklinik erstellen zu können. Vielen Dank auch für die einzigartige Gelegenheit, meine Doktorarbeit beim Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft 2019 in Berlin im Rahmen einer Posterpräsentation vorgestellt haben zu dürfen.

Ein großer Dank gilt den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, die durch die Bereitstellung von Gerätschaften die Durchführung vieler Experimente ermöglichten.

Zuletzt danke ich von Herzen meiner Familie und meiner Freundin für ihre liebevolle, unnachgiebige und selbstlose Unterstützung.

Lebenslauf

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