

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

**Retinoid induzierte Transkriptionsänderungen in primären
Limbusepithelzellen im Kontext von Aniridie-relevanten Transkripten**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

vorgelegt von: Constanze Gabriele Bleil

geb. am 28.12.1994 in Greiz

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1 Zusammenfassung	7
1.1 Zusammenfassung - Deutsch.....	7
1.2 Summary	9
2 Einleitung	11
2.1 Anatomie	11
2.1.1 Auge	11
2.1.2 Kornea	11
2.1.3 Limbus und Limbusepithelzellen	11
2.1.4 Limbusstammzellinsuffizienz.....	12
2.2 Kongenitale Aniridie	12
2.2.1 Definition der kongenitalen Aniridie.....	12
2.2.2 Genetik der kongenitalen Aniridie	13
2.2.3 Aniridie-assoziierte Keratopathie (AAK).....	14
2.3 Retinoidrezeptorantagonisten	15
2.3.1 RXR und RAR.....	15
2.3.2 UVI 3003	16
2.3.3 AGN 193109	17
2.4 Aniridie-relevante Transkripte (mRNAs) im Kontext zum Retinoid-Metabolismus	17
2.4.1 Stammzell- und Differenzierungsmarker	17
2.4.2 Strukturproteine.....	18
2.4.3 Andere Marker.....	20
2.5 Zielsetzung der Arbeit	23
3 Material und Methoden	24
3.1 Material	24
3.1.1 Geräte	24
3.1.2 Labormaterialien.....	24
3.1.3 Chemikalien und Kits	25
3.1.4 Retinoidrezeptorantagonisten	26
3.1.5 Primer für die qPCR	26
3.1.6 Verwendete Antikörper	28
3.1.7 Verwendete Medien und Puffer.....	28
3.2 Methoden.....	28
3.2.1 Zellkultur	28
3.2.2 Behandlung mit Retinoidrezeptorantagonisten UVI 3003 und AGN 193109	30

3.2.3	Toxizitätstestung unter der Behandlung mit AGN 193109 und UVI 3003 mittels eines XXT Assays	31
3.2.4	RNA-/Protein- Isolation	31
3.2.5	Quantitative Polymerasekettenreaktion	32
3.2.6	Western Blot	33
4	Ergebnisse	35
4.1	Toxizitätstestung der Proben unter Behandlung mit AGN 193109 und UVI 3003	35
4.2	Genexpressionsergebnisse nach Behandlung von Limbusepithelzellen mit Retinoidrezeptorantagonisten UVI 3003 und AGN 193109	36
4.2.1	Der Stammzellmarker ABCG2 und der Proliferationsmarker Ki67	36
4.2.2	mRNA Expression von PAX6 in primären LEZs	37
4.2.3	qPCR-Analyse von ADH7, ALDH1A1, DSG1 und SPINK7 in LEZs unter der Behandlung von AGN 193109 und UVI 3003	38
4.2.4	KRT3, KRT12 und KRT19 in LEZs	41
4.2.5	Marker des Retinsäureweges und der Bindehaut von Aniridiepatienten	43
5	Diskussion	51
5.1	Unterschiedliche Antworten der Genexpression unter Behandlung mit RAR-/ RXR-Rezeptorantagonisten	51
5.2	Interpretation der Genexpressionsergebnisse der RAR-abhängigen Transkripte	51
5.2.1	DSG1	51
5.2.2	KRT3, KRT12, KRT19	52
5.3	Interpretation der Genexpressionsergebnisse der RXR- und RAR-abhängigen Marker	55
5.3.1	ADH7 und ALDH1A1	55
5.3.2	ABCG2	56
5.3.3	ELOVL7, FABP5, PPARG, CRABP2	57
5.3.4	RDH10	58
5.3.5	SPINK7	58
5.4	Interpretation der Genexpressionsergebnisse der RXR- und RAR-unabhängigen Marker	59
5.4.1	PAX6	59
5.5	Schlussfolgerung	60
6	Literaturverzeichnis	63
	Tabellenverzeichnis	67
	Abbildungsverzeichnis	68
	Danksagung	70
	Publikationen	71
	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen	Erläuterungen
Abb.	Abbildung
ABCG2	Humanes ATP-binding cassette subfamily G member 2
ADH	Alkoholdehydrogenase
AEA	Endocannabinoid anandamide
AAK	Aniridie-assoziierte Keratopathie
ALDH1A1	Humane Aldehyddehydrogenase 1 Familienmitglied A1
BCRP1	breast cancer resistant protein 1
BPE	Bovine Pituitary Extract
bzw.	beziehungsweise
cDNA	Komplementäre DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRABP	Cellular Retinoic acid binding protein
CRISPR	Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats
Ctrl.	Kontrolle
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DANN	Desoxyribonukleinsäure
Dpt	Dioptrie
DSG	Desmoglein
EGF	Epithelial growth factor
ELOVL7	Fatty acid elongase 7
FABP	Fatty acid-binding protein
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gewichtsgramm oder Gramm
GUSB	B-Glucuronidase
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HRP	Horseradish peroxidase
KRT	Keratin

KSFM	Keratinocyten Serumfreies Medium
L	Liter
LEZ	Limbusepithelzellen
M	mol/l
MCD	Meesmann Hornhautdystrophie
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minuten
mm	Millimeter
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
nm	Nanometer
PAX6	Paired-box Protein 6
PBS	Phosphate buffered saline
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
RA	Retinoic Acid (Retinsäure)
RALDH	Retinaldehyddehydrogenase
RAR	Retinoic-Acid-Receptors (Retinsäurerezeptor)
RBP1	Retinol-bindendes-Protein 1
RDH	Retinoldehydrogenase
RNA	Ribonukleinsäure
RXR	Retinoic-X-Receptors
RXRA	Retinoic-X-Receptor Alpha
s	Sekunde
SDS	Sodium-dodecyl-sulfate
SPINK	Serinprotease-Inhibitor vom Kazal-Typ
STRA6	Stimulated by Retinoic Acid 6
Tab.	Tabelle
TAC	Transient amplifizierende Zellen
TBP	Tata binding protein
TXX	Zytotoxizitäts Assay
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIS	Visible
µg	Mikrogramm

μ	Mikroliter
μm	Mikrometer
°C	Grad Celsius
%	Prozent

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung - Deutsch

Ziel: Die Retinsäure (RA), ein aktiver Metabolit von Vitamin A, kann über zwei verschiedene Klassen von Retinoidrezeptoren reguliert werden. Dabei handelt es sich um die Retinoid-X-Rezeptoren (RXR) und die Retinsäure-Rezeptoren (RAR). Somit kann die Genregulation auch über diese verschiedenen Rezeptoren erfolgen. RAR und RXR können durch die Bildung von Heterodimeren untereinander wechselwirken. Ein Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob die durch Retinol regulierten Gene direkt über die Retinolrezeptoren (RAR/RXR) gesteuert werden. Hierfür wurden Limbusepithelzellen mit Pan-Rezeptorantagonisten gegen RAR und RXR mit unterschiedlichen Konzentrationen und Inkubationszeiträumen behandelt. Somit konnte beurteilt werden, ob die gemessenen Transkriptänderungen durch die RARs oder die RXRs vermittelt werden. Zur besseren Bewertung sollten die Ergebnisse mit denen der Retinol- und Retinsäurebehandlung verglichen werden, da die gegensätzliche Regulation der Transkripte durch Rezeptorantagonisten im Vergleich zur Retinoidbehandlung zusätzlich für eine Regulation der veränderten Transkripte durch RAR/ RXR spricht.

Methoden: Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden an Limbusepithelzellen (LEZ) durchgeführt. Diese Versuchszellen stammen von Hornhautspenden der LIONS Hornhautbank Saar-Lor-Lux Trier/ Westpfalz. Die Gewinnung und Isolation von LEZ aus dem Gewebe erfolgte mittels einer 1,5 mm Biopsie Stanze. Das gewonnene Präparat wurde in Keratinozyten Serumfreiem Medium (KSFM), supplementiert mit EGF und BPE, kultiviert. Nach ausreichender Konfluenz und mehrfacher Teilung der Probe wurden vier Schälchen des gleichen Spenders mit Pan-Retinoidrezeptorantagonisten (UVI 3003, AGN 193109) in unterschiedlichen Konzentrationen (0,5 μ M, 1,0 μ M, 1,5 μ M) und Inkubationszeiträumen (24 h, 48 h) behandelt. Anschließend konnte mittels der quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) die mRNA-Expression der folgenden Transkripte gemessen werden: die Stammzell- und Differenzierungsmarker PAX6, ADH7, ALDHA1A1 und ABCG2, die Strukturproteine KRT3, KRT12, KRT19 und DSG1, Transkripte, die den Fettstoffwechsel beeinflussen FABP5, ELOVL7 und PPARG, der Proliferationsmarker KI67, Transkripte, die bei der Angiogenese eine Rolle spielen, VEGFA und andere Marker wie CRABP2, RBP1, RDH10, SPINK7 und STRA6. Durch die qPCR konnten Aussagen über die Hoch- bzw. Herunterregulation eines Gens oder einer mRNA im Vergleich zu der Kontrolle getroffen werden. Als Referenzgene wurden das TATA binding Protein (TBP) und die B-Glucuronidase (GUSB) eingesetzt.

Ergebnisse: Anhand der mRNA-Expression konnte für einige Transkripte eine RAR- bzw. RXR-Abhängigkeit nachgewiesen werden. Die Transkripte DSG1, KRT3, KRT12 und KRT19 erwiesen sich hierbei als RAR-abhängig. Diese Gene könnten somit statt direkt über PAX6 auch über einen veränderten Retinolstoffwechsel beeinflusst sein. Bei den anderen untersuchten Transkripten war die

Regulation durch die Retinoide weniger eindeutig. Diese konnten keiner spezifischen Rezeptorgruppe zugeordnet werden. Die Transkripte DSG1, KRT3, KRT12, KRT19, CRABP2, ADH7 und SPINK7 zeigten signifikante gegenteilige Regulationen in Bezug auf die Behandlung mit Retinolderivaten und Pan-Retinoidrezeptorantagonisten auf.

Schlussfolgerung: Anhand der Expressionsdaten konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es für Teile der untersuchten Transkripte eine definierte Abhängigkeit von RAR oder RXR gibt. Allerdings konnten nicht alle einer spezifischen Rezeptorgruppe zugeordnet werden. Es konnten Belege gesammelt werden, dass DSG1 und die Keratine statt direkt über PAX6 auch über einen veränderten Retinolstoffwechsel beeinflusst werden könnten. Dies lässt die Spekulation zu, dass einige der im Patienten beobachteten Transkriptänderungen nicht direkt durch PAX6 reguliert werden. Es kann vermutet werden, dass die PAX6 Haploinsuffizienz Auswirkungen auf den Retinsäurestoffwechsel hat. Dies sollte in der Zukunft genauer untersucht werden. Im Vergleich mit vorherigen Versuchen zeigte sich für einige weitere Transkripte eine jeweils umgekehrte Genregulation bezüglich der Behandlung mit Retinolderivaten und Retinoidrezeptorantagonisten. Diese werden höchstwahrscheinlich über den Retinolstoffwechsel reguliert.

1.2 Summary

Purpose: Retinoic acid (RA), an active metabolite of vitamin A, can be regulated by two different classes of retinoid receptors. These are the retinoid X receptors (RXR) and the retinoic acid receptors (RAR). Thus, gene regulation may also occur through these different receptors. RAR and RXR can interact with each other and form heterodimers. One aim of this dissertation was to find out whether retinol-regulated genes are directly controlled by retinoid receptors (RAR/RXR). For this purpose, limbal epithelial cells were treated with pan-receptor antagonists against RAR and RXR with different concentrations and incubation periods. Thus, it could be assessed whether the measured transcript changes were mediated by the RARs or the RXRs. For a better evaluation, the results were compared with those of retinol and retinoic acid treatment, because the opposite regulation of the transcripts by receptor antagonists compared with retinoid treatment additionally argues for a regulation of the altered transcripts by RAR/ RXR.

Methods: The experiments performed in this dissertation were performed on limbal epithelial cells (LEC). These experimental cells were obtained from corneal donations of the LIONS Cornea Bank Saar-Lor-Lux Trier/ Westpfalz. LEC were isolated from the tissue using a 1.5 mm biospie punch. The obtained preparation was cultured in keratinocyte serum-free medium (KSFM) supplemented with EGF and BPE. After sufficient confluence and multiple divisions of the sample, 4 dishes from the same donor were treated with pan retinoid receptor antagonists (UVI 3003, AGN 193109) at different concentrations (0.5 μ M, 1.0 μ M, 1.5 μ M) and incubation periods (24 h, 48 h). Subsequently, quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used to measure the mRNA expression of the following transcripts: Stem cell and differentiation markers PAX6, ADH7, ALDHA1A1 and ABCG2, structural proteins KRT3, KRT12, KRT19 and DSG1, transcripts affecting lipid metabolism FABP5, ELOVL7 and PPARG, proliferation marker KI67, transcripts involved in angiogenesis VEGFA and other markers such as CRABP2, RBP1, RDH10, SPINK7 and STRA6. By qPCR, upregulation or downregulation of a gene or mRNA compared to the controls could be analysed. TATA binding protein (TBP) and B-glucuronidase (GUSB) were used as reference genes.

Results: Based on mRNA expression, RAR or RXR dependency could be detected for some transcripts. The transcripts DSG1, KRT3, KRT12 and KRT19 were found to be RAR-dependent. Thus, these genes could be affected by altered retinol metabolism instead of a direct effect via PAX6. In the other transcripts examined, regulation by retinoids was less clear. These could not be assigned to a specific receptor group. The transcripts DSG1, KRT3, KRT12, KRT19, CRABP2, ADH7, and SPINK7 showed significant opposite regulation in relation to treatment with retinol derivatives and pan-retinoid receptor antagonists.

Conclusion: Based on our data, it could be shown that there is a defined dependence on RAR or RXR for some of the studied transcripts. However, not all could be assigned to a specific receptor group. We

could collect evidence that DSG1 and the keratins could also be influenced by altered retinol metabolism, instead of a direct effect via PAX6. Therefore some of the transcript changes, observed in patients are not directly regulated by PAX6. It can be speculated that PAX6 haploinsufficiency has effects on retinoic acid metabolism, which should be investigated in more detail in the future. In comparison with previous experiments, some additional transcripts showed a respective reverse gene regulation with respect to treatment with retinol derivatives and retinoid receptor antagonists. These are most likely regulated via retinol metabolism.

2 Einleitung

2.1 Anatomie

2.1.1 Auge

Das Auge ist das Sehorgan des Menschen und setzt sich zusammen aus dem optischen Apparat, dem Bulbus oculi, der ein reelles Bild auf die Netzhaut projiziert und aus dem Hilfsapparat, der Schutzfunktionen hat und der Ausrichtung der Augen dient. Der Hilfsapparat setzt sich zusammen aus den Augenlidern, den Augenmuskeln und dem Tränenorgan. Das Auge befindet sich in der Orbita, einem etwa kegelförmig knöchernen begrenzten Raum im Schädel. Die Gesamtbrechkraft des Auges beträgt 60 dpt und wird zu zweidrittel aus der Brechkraft der Cornea gebildet. Die Elektromagnetische Strahlung, mit einer Wellenlänge von ca. 350-750 nm, generiert in den Sinneszellen des Auges elektrische Impulse, welche im Gehirn verarbeitet werden und somit bewusst als Hell- Dunkel oder Farberscheinungen wahrgenommen werden können [3].

2.1.2 Kornea

Als Kornea (Hornhaut) bezeichnet man den äußeren, transparenten Teil des Auges, der histologisch von distal nach proximal aus fünf Schichten besteht: mehrschichtig unverhorntes Plattenepithel, Bowman-Lamelle, Stroma, Descemet-Membran und Endothel.

Die Hornhaut stellt die vorderste Begrenzung des Augapfels dar und hat zwei wichtige Aufgaben. Zum einen dient sie als mechanische Barriere gegen äußere Einflüsse und zum anderen hat sie mit 43 dpt den größten Anteil an der Gesamtbrechkraft des Auges. Sie hat einen Durchmesser von 12 mm und eine Dicke von 520 µm. Das Korneagewebe ist zellarm, strukturlos und avaskulär. Die Ernährung erfolgt durch das Kammerwasser, die Randschlingennetze der Bindehautgefäße und der Tränenflüssigkeit, die als Tränenfilm die Epitheloberfläche der Kornea überzieht und somit als glatt spiegelnder Anteil das scharfe Sehen ermöglicht. Des Weiteren schützt der Tränenfilm das Auge vor Infektionen, bedingt durch das Enzym Lysozym, und dient außerdem als Schutz vor Austrocknung. Die Form der Kornea ähnelt der eines Uhrglases und besitzt eine vordere konvexe und eine hintere konkave Fläche [2].

Bindehaut, Limbus, Hornhaut, Tränenfilm und Nervensystem bilden die komplexe funktionelle Einheit der Augenoberfläche (ocular surface). Die einzelnen Komponenten dieses Systems sorgen zusammen für die Aufrechterhaltung der Hornhauttransparenz [35].

2.1.3 Limbus und Limbusepithelzellen

Als Limbus Corneae bezeichnet man die Übergangszone zwischen der transparenten Kornea und der lichtundurchlässigen Sklera (Lederhaut). In der Basalzellschicht, der epithelialen Papillen der Vogt'schen Pallisaden im Limbus, sind die Limbusstammzellen (LEZ) lokalisiert. Das Limbusepithel besteht aus etwa zehn Zellschichten, das Bindehautepithel aus etwa vier bis fünf Schichten und das Hornhautepithel aus fünf bis sechs Schichten. Somit ist das Limbusepithel das dickste unter den drei

Schichten [50]. Der Limbus ist stark vaskularisiert, innerviert und durch Melaninpigmentierung vor möglichen Schäden durch UV-Licht geschützt [42]. Die Aufgabe der LEZ besteht in der Regeneration des Korneaepithels durch Proliferation, Migration und Differenzierung [50]. Die Limbusstammzellen erhalten die korneale Homöostase, die Wundheilung des Hornhautepithels, die Integrität der Hornhautoberfläche und die Transparenz der Hornhaut aufrecht [29].

Die Basalzellschicht im Limbus besteht nicht nur aus Stammzellen, sondern auch aus transient amplifizierenden Zellen (TAC), die sich in der Basalschicht des Limbus und des peripheren Hornhautepithels befinden. Sie machen den größten Teil der proliferativen Zellpopulation im Hornhaut- bzw. Limbusepithel aus. Die TACs weisen ähnliche Merkmale wie Stammzellen auf: eine lange Lebensdauer, langsamer Zyklus mit mitotischer Aktivität und eine geringe Differenzierung [13]. Durch das Vorhandensein der TACs im Limbus und der Hornhaut entstehen folgende Vorteile: Es kommt zu einer Verstärkung der Stammzellteilung und zu einer Minimierung des Bedarfs an Stammzellproliferation. Die Einführung von replikativen DNA-Fehlern in die Stammzellpopulation wird minimiert. An einem Punkt stoppen die TACs die Mitose und differenzieren sich zu supra-basalen postmitotischen Hornhautzellen und weiter zu terminal differenzierten Zellen (TDCs) [13].

Die Limbusepithel- und die Limbusstammzellen bilden eine Barriere und verhindern somit das Eindringen von Bindehautepithelzellen in die Kornea.

2.1.4 Limbusstammzellinsuffizienz

Die Schädigung oder Funktionsstörung der limbalen Stammzellpopulation kann zu einem teilweisen oder vollständigen Mangel an Limbusstammzellen führen. Dies kann schwerwiegende Folgen für die Wundheilung der Hornhaut und die Integrität der Augenoberfläche haben. Ein Mangel an Limbusstammzellen ist charakterisiert durch chronische Entzündungen, wiederkehrende Erosionen, die Zerstörung der Basalmembran und das Einwachsen von fibrösem Gewebe. Daraus ergeben sich schwere Funktionsstörungen [42]. Die Barrierefunktion des Limbus wird stark beeinträchtigt und somit wird das Hornhautepithel durch Bindehautepithelzellen ersetzt. Eine Neovaskularisation innerhalb des Hornhautgewebes führt zu einer Trübung der Hornhaut. Diese wird undurchsichtig und es kommt zum Sehverlust und Erblindung. Im Bereich der Palisaden von Vogt kann es im frühen oder milden Stadium der Stammzellinsuffizienz zu einer Abflachung oder auch zum Verlust von Palisaden kommen [29]. Zur Regeneration der Hornhautoberfläche und zur Wiederherstellung der Sehfunktion ist eine autologe oder homologe Transplantation von limbalem Gewebe möglich.

2.2 Kongenitale Aniridie

2.2.1 Definition der kongenitalen Aniridie

Die kongenitale Aniridie ist eine seltene angeborene panokulare Erkrankung mit Makulahypoplasie und Papillenhypoplasie, die die meisten Augenstrukturen, wie Hornhaut, Augenlinse, Sehnerv und Netzhaut, betrifft und somit auch erhebliche Auswirkungen auf das Sehvermögen haben kann. Das

Charakteristikum dieser Krankheit ist das partielle oder vollständige Fehlen der Iris (Hypoplasie der Iris) und kongenitale Manifestationen in den hinteren Augenabschnitten [20]. Die Patienten leiden bereits sehr frühzeitig unter dem Auftreten von Nystagmus, Photophobie, Amblyopie und verminderter Sehschärfe [30]. Die angeborene Hypoplasie der Iris kann von der milden Form bis zur vollständigen Aplasie variieren. Die Fovea der Netzhaut, die das scharfe und detaillierte Sehen ermöglicht, und der Sehnerv sind bei der kongenitalen Aniridie häufig nicht vollständig entwickelt (Hypoplasie/ Dysplasie) [35].

Bei der kongenitalen Aniridie unterscheidet man zwischen der PAX6-assoziierten Aniridie und den PAX6-unabhängigen Aniridieformen. Allerdings treten die PAX6-assoziierten Formen deutlich häufiger auf und zeigen auch schwerere Fehlbildungen aller Augenabschnitte auf. Diese können mit endokrinologischen, metabolischen und zentralnervösen Pathologien einhergehen und betreffen damit das Zentralnervensystem, die Bauchspeicheldrüse, die Hörfunktion, das Urogenitalsystem, das endokrine System und den Stoffwechsel. Das an PAX6 gebundene Krankheitsbild wird unter diesen Umständen oftmals auch als Aniridiesyndrom oder PAX6-Syndrom bezeichnet [21]. Bei der Aniridie ohne Bezug zum PAX6-Gen können viele andere Gene beteiligt sein, deren Alteration mit einer inkompletten oder kompletten Aniridie verbunden sein kann. Die für Aniridie typischen Komplikationen, wie Pannusbildung und Vaskularisation der Hornhaut durch die Insuffizienz der Limbusstammzellen, treten bei der Aniridie ohne PAX6-Assoziation deutlich seltener auf [21].

Weitreichende Komplikationen der Aniridie können der Katarakt, das Glaukom, der Strabismus, die Hypoplasie des Nervus opticus oder auch die Linsenektopie sein und vom Kindes- bis zum Erwachsenenalter hin auftreten. Der Verlauf der Krankheit kann sich von Patient zu Patient unterscheiden.

Aufgrund der möglichen Komplikationen und dem Fortschreiten der Aniridie sollten die Betroffenen sich einer lebenslangen ophthalmologischen Behandlung unterziehen. Die genetische Diagnostik ist außerdem sehr wichtig, um Personen mit hohem Risiko für einen Wilms-Tumor zu identifizieren [30].

2.2.2 Genetik der kongenitalen Aniridie

Aniridie wird zu 70 % autosomal-dominant vererbt und tritt in 30 % der Fälle sporadisch auf. Die Erkrankung betrifft Männer und Frauen in gleichen Maßen. Bei der Mehrheit der Patienten wird diese Krankheit durch heterozygote Mutationen im PAX6-Gen verursacht, welches sich auf Chromosom 11p befindet und eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung, der Embryonalentwicklung und der Morphologie des Auges, des Riechkolbens, des Neuralrohrs und des Gehirns spielt [35].

Da Aniridie in den meisten Fällen autosomal-dominant vererbt wird, übertragen die betroffenen Personen die Mutation im Durchschnitt auf 50 % ihrer Kinder, unabhängig vom Geschlecht. Somit haben die meisten Aniridieerkrankten einen Elternteil, der ebenfalls von der Krankheit betroffen ist.

Dies wird auch als familiäre Aniridie bezeichnet [35]. Die sporadischen Fälle resultieren aus einer De-novo-Genmutation, welche von den zukünftigen Nachkommen autosomal-dominant vererbt wird [30].

Bei dem sogenannten WAGR-Syndrom handelt es sich um eine Mikrodeletion (eine genomische Deletion), die mehrere benachbarte Gene auf 11p13 umfasst, die sowohl das PAX6-Gen als auch die benachbarte WT1-Region betrifft. Die Betroffenen leiden hierbei unter einem Nephroblastom (Wilms-Tumor), genitourethralen Anomalien, Aniridie und geistiger Retardierung. Bei dieser Mikrodeletion umfasst das betroffene DNA-Segment mehrere benachbarte Gene. Somit kommt es zu einem Phänotyp mit Beteiligung mehrerer Systeme. Das Nephroblastom (Wilms-Tumor) tritt zu 80 % in den ersten fünf Lebensjahren auf. [21]

2.2.3 Aniridie-assoziierte Keratopathie (AAK)

Eine durch den PAX6-Defekt verursachte Limbusstammzellinsuffizienz kann bei 70 % der PAX6-Aniridie-Erkrankten der Grund für eine Aniridie-assoziierte Keratopathie (AAK) sein. Kennzeichnend für die AAK, bei angeborener Aniridie mit Mutation in PAX6, ist ein zeitabhängiger Verlust der limbalen Stammzellnische und Stammzellfunktion in der Hornhaut [28]. Die Folgen dieser mit dem Alter zunehmenden Krankheit sind eine dauerhafte Tränenfilminstabilität, rezidivierende, äußerst schmerzhaft Hornhaut-Erosionen und ein progredient fortschreitender Visusverlust durch vaskularisierte Narbenbildung [20]. Die volle Ausprägung der AAK tritt nur bei 20 % der Aniridiepatienten auf, obwohl 90 % dieser eine pathologische Veränderung der Augenoberfläche aufweisen [30].

Die klinischen Anzeichen der AAK sind Beeinträchtigung der Wundheilung, Schmerzen, Entzündung, Vaskularisierung, Verringerung der Sehschärfe und Infiltration von konjunktivalen Becherzellen [20]. Häufige Symptome wie Rötung, Trockenheit, Reizung, verschwommenes Sehen und Photophobie können chronisch werden. Die AAK ist eines der visuell bedrohlichsten Merkmale des PAX6-Aniridie-Syndroms [30].

Die AAK zeigt einen mehrstufigen Verlauf auf: Die ersten Symptome der Keratopathie treten im frühen Jugendalter mit Verdickung des peripheren Hornhautepithels ohne funktionelle Manifestation auf. Im zweiten Lebensjahrzehnt leiden die Patienten häufig unter Schmerzen, Photophobie und kornealen epithelialen Erosionen aufgrund von chronischen Irritationen und einer dünnen oberflächlichen Vaskularisation in die periphere Hornhaut, welche langsam in die zentrale Hornhaut übergeht. Wenn die gesamte Hornhaut betroffen ist und sich eine Zunahme der zentralen Hornhautdicke mit Pannusbildung und vaskularisierten Narben zeigt, befindet sich die Krankheit schon in einem fortgeschrittenem Stadium [20].

2.3 Retinoidrezeptorantagonisten

2.3.1 RXR und RAR

Die Retinsäure (RA), ein aktiver Metabolit von Vitamin A, reguliert eine Vielzahl biologischer Prozesse: Dazu gehören die Zelldifferenzierung, die Embryonalentwicklung, die Entwicklung des zentralen Nervensystems, die Organbildung und das Sehvermögen [14,19]. Die Retinsäure wirkt über zwei verschiedene Klassen von Retinoidrezeptoren: Zum einen über die Retinoid-X-Rezeptoren (RXRs) und zum anderen über die Retinsäure-Rezeptoren (RARs). Diese Rezeptoren gehören der Superfamilie der nukleären Rezeptoren an und sind ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren und somit an der Modulation der ligandenabhängigen Genexpression durch die Wechselwirkung als RXR/ RAR-Heterodimer oder als RXR-Homodimer auf spezifischen Zielgenen der DNA-Sequenzen beteiligt [14,15,60]. Die Retinoide, aktive Metabolite von Vitamin A, die all-trans-Retinsäure, die 9-cis-Retinsäure und die 13-cis-Retinsäure binden und modulieren RAR und RXR [14]. RXR und RAR gehören jedoch unterschiedlichen Gruppen der Superfamilie der nukleären Rezeptoren an, was somit auch die unterschiedlichen Funktionen dieser erklärt [15].

Wie bereits oben erwähnt, kann Vitamin A durch bestimmte Rezeptoren verschiedene Entwicklungsprozesse beeinflussen. Retinol muss hierzu zunächst mittels von Enzymen in aktive Formen überführt werden. Diese Enzyme ermöglichen die Umwandlung von Retinol (Alkoholform von Vitamin A) zu Retinaldehyd (Aldehydform von Vitamin A) und später zu Retinsäure (Carbonsäure) [12]. Das Vitamin A ist sehr wichtig und entscheidend für die Augenentwicklung. Interessanterweise befinden sich auch in der Kornea und in der Konjunktiva Retinol- und Retinsäure bindende Proteine (CRBP und CRABPs), Retinsäure-Rezeptoren (RARs und RXRs) und Retinoide verstoffwechselnde Enzyme (ADHs und RALDHs) [33]. Retinol ist im Zytosol an CRABPs und CRBPs gebunden und kann in zwei Oxidationsschritten zu Retinsäure umgewandelt werden. Die Oxidation von Retinol zu Retinaldehyd, der erste Schritt der RA-Synthese, wird durch ADHs und RDHs katalysiert. Drei Retinaldehyddehydrogenasen (RALDH1, RALDH2 und RALDH3) katalysieren die Oxidation von Retinaldehyd zu RA, den zweiten Schritt der RA-Synthese [12,40].

Retinsäure kann an unterschiedliche Rezeptoren binden und somit in unterschiedliche Signalwege des Retinolstoffwechsels eingreifen: Retinoid-X-Rezeptor (RXR), Retinsäure-Rezeptoren (RARs) und Peroxisom-Proliferationsfaktoren (PPARs). In den vorliegenden Experimenten wurden zwei verschiedene Antagonisten eingesetzt, um die Haupteffektoren abzudecken. Diese werden im folgenden Abschnitt weiter erläutert.

Um experimentell zu erforschen, ob die Transkription von verschiedenen Transkripten retinoidabhängig oder über RAR- oder RXR reguliert werden könnte, sollten beide Signalwege unabhängig voneinander gehemmt werden.

RXR

Es existieren drei verschiedene RXR-Subtypen, die von drei verschiedenen menschlichen Genen, $RXR\alpha$, $RXR\beta$ und $RXR\gamma$, kodiert werden. Für jeden dieser Subtypen gibt es mehrere Isoformen. Diese unterscheiden sich in ihrer N-terminalen A/B-Domäne voneinander [15]. Eine Aktivierung von RXR führt zu einer Verstärkung der Retinoid-abhängigen Genexpression, welche wiederum durch die Liganden von RAR induziert werden kann [59]. Die RXRs spielen zusätzlich zu der Retinoid-Signalübertragung auch als heterodimere Partner der nukleären Rezeptoren für Vitamin D (VDR), die Schilddrüsenhormone (TRs) und die Peroxisom-Proliferator-aktivierte-Rezeptoren (PPARs) eine Rolle [57,60]. Somit wurde durch Studien bekannt, dass RXR mit sich selbst homodimerisiert oder mit einem anderen nukleären Rezeptor heterodimerisiert [57]. Die heterodimeren Rezeptoren weisen zwei unterschiedliche Ligandenbindungsstellen auf, an die sich Chemikalien (exogen oder endogen) binden können und somit die Rezeptorfunktion modifizieren. Eine Vielzahl von künstlich gewonnenen Chemikalien, aber auch natürliche Substanzen haben agonistische oder auch antagonistische Aktivitäten mit den RXRs [59].

Der RXR ist ein bedeutendes Mitglied der nukleären Rezeptoren. Als Transkriptionsfaktor bindet er an die Promotorregionen von Genen und einem Dimer mit sich selbst oder einem anderen nukleären Rezeptor und nimmt eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung, der Zelldifferenzierung, dem Metabolismus und dem Zelltod ein [15,57,59]. RXR gilt als guter Angriffspunkt für Medikamente, die zur Behandlung des metabolischen Syndroms und von Krebs eingesetzt werden können [57].

RAR

Es existieren ebenfalls drei verschiedene RAR-Subtypen: $RAR\alpha$, $RAR\beta$ und $RAR\gamma$. Der Unterschied zwischen RAR und RXR liegt darin, dass RAR sowohl die all-trans-RA als auch die 9-cis-RA binden kann und RXR bevorzugt die 9-cis RA-bindet [19].

RAR heterodimerisiert mit RXR und erkennt somit in der regulatorischen Region des Zielgens spezifische RA-responsive Elemente [14].

2.3.2 UVI 3003

Bei UVI 3003 handelt es sich um einen hochaffinen, selektiven Pan-Retinoid-X-Rezeptor (RXR)-Antagonist. UVI 3003 wurde in vielen Studien verwendet, um den Beitrag von RXR zur Transaktivierung durch ein bestimmtes RXR-Heterodimer zu testen. Dafür wurde dieser Antagonist z.B. in Zebrafischembryonen angewendet [60,62].

RXR-Antagonisten hemmen die Bindung von RA an RXR und stören somit die Funktionswege des Rezeptors [57,58].

In einer Studie wurden UVI 3003 in unterschiedlichen Expositionszeiträumen getestet. Es wurde herausgefunden, dass UVI 3003 vor allem teratogen in den Embryonen von Amphibien wirkt. Der Galaktosestoffwechsel war der am stärksten veränderte Weg [59].

2.3.3 AGN 193109

AGN 193109, ein synthetisches Retinoid, ist ein potenter Pan-Retinsäure-Rezeptor (RAR)-Antagonist [45]. Es zielt auf alle drei RAR-Subtypen mit höherer Affinität als *all-trans*-Retinsäure ab [63].

Eine Studie hat gezeigt, dass die Behandlung von schwangeren Mäusen mit einer oralen Dosis von 1mg/kg mit dem Antagonisten AGN 193109 über einen Zeitraum von acht Tagen bei allen Exponierten zu schweren Augenfehlbildungen und kraniofazialen Fehlbildungen bei Feten geführt hat [45].

2.4 Aniridie-relevante Transkripte (mRNAs) im Kontext zum Retinoid-Metabolismus

Die von uns verwendeten Transkripte wurden aus der im Anhang angegebenen Literatur und einigen Vorversuchen zusammengestellt. Sie bilden vornehmlich mRNAs ab, die selektiv während der Korneaepitheldifferenzierung exprimiert werden und welche zusätzlich bei kongenitaler Aniridie dereguliert zu sein scheinen. Diese werden im Folgenden vorgestellt [27,28].

2.4.1 Stammzell- und Differenzierungsmarker

Paired Box Gene 6 (PAX6)

Das PAX6-Gen gehört zu der Familie der gewebespezifischen PAX-Transkriptionsfaktoren [10]. Dieses Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 lokalisiert, 22,4 kb lang, besteht aus 14 Exons (die ersten drei sind nicht kodierend) und kodiert für den PAX6-Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle bei der Augenentwicklung spielt [31,35]. Es wird über das Hornhautepithel und die Bindehaut exprimiert [28]. PAX6 besteht aus zwei DNA-bindenden Domänen, der Homeodomäne (HD) und der Pairedomäne (PD). Die Pairedomäne besteht aus einer N-terminalen und einer C-terminalen Subdomäne, an die sich die jeweiligen DNA-Sequenzen binden. PAX6 ist ein empfindliches Gen und wird durch verschiedene Elemente stark reguliert [10].

Während der 6. bis zur 12. Woche der Embryogenese ist PAX6 an der Augenentwicklung beteiligt [27]. PAX6 wird während der Embryonalentwicklung in verschiedenen Geweben und im adulten Organismus exprimiert [35]. Eine Studie zeigt, dass PAX6 nicht nur in der Embryonalentwicklung, sondern auch in der postnatalen Entwicklung und in der Erhaltung der adulten Hornhaut eine Bedeutung hat [11]. Es spielt eine wichtige Rolle bei der vollständigen Entwicklung der Augenlinse und bei der Transkriptionsaktivierung der Strukturgene der Linse. Außerdem ist PAX6 mitverantwortlich für die Differenzierung pluripotenter Vorläuferzellen der Netzhaut und der Aufrechterhaltung ihrer

gewebespezifischen Expression [35]. Die Bindehaut- und Hornhautphänotypen werden von der PAX6-Expression beeinflusst [27].

Bei Wirbeltieren ist PAX6 nicht nur für die Entwicklung der Netzhaut, sondern auch für die Ausbildung des ZNS, des Riechsystems und der Bauchspeicheldrüse verantwortlich [61]. Im Nervensystem steuert PAX6 die Migration und Differenzierung spezifischer neuronaler Vorläuferzellen [35].

Eine überschüssige Expression von PAX6 führt zu einer Reihe von Augenpathophysiologien, von denen einige direkt mit der Proteinmenge in Verbindung stehen. Eine Vielzahl von Hornhautanomalien, die mit PAX6-Mutationen verbunden sind, treten schon während der Entwicklung in Erscheinung. Andere resultieren erst aus der unzureichenden Gewebeerhaltung [31].

Alkoholdehydrogenase 7 (ADH7)

ADH7 ist der Familie der Alkoholdehydrogenasen zuzuordnen und metabolisiert Substrate des Ethanol- bzw. Retinolstoffwechsels. Es gehört zur Klasse IV der ADH-Gene und wurde 1994 charakterisiert. Die Klasse IV ADHs haben eine dreidimensionale Gesamtstruktur und ähneln damit auch anderen Klassen von ADH. ADH7 ist eine Retinoldehydrogenase und ist somit sehr aktiv am Retinolstoffwechsel, der reversiblen Oxidation von Retinol zu Retinaldehyd, beteiligt [27,41].

Humane Aldehyddehydrogenase 1 Familienmitglied A1 (ALDH1A1)

ALDH1A1 gehört zur Familie der Aldehyddehydrogenasen (ALDH) und ist zusammen mit ALDH1A3 an der RA Biosynthese beteiligt. Retinol wird zuerst in einer reversiblen Reaktion durch die Alkoholdehydrogenase (ADH) zu Retinaldehyd oxidiert. Anschließend wird diese durch ALDH1A1 in einer irreversiblen Reaktion zu RA oxidiert [51].

Humanes ATP-binding cassette subfamily G member 2 (ABCG2)

ABCG2 gehört zur Familie der ATP- bindenden ABC-Transporter und befindet sich in den basalen und suprabasalen Schichten des Limbusepithels, jedoch nicht im Hornhautepithel. Aus diesem Grund wird ABCG2 zu den Stammzellmarkern der Limbuszellen gezählt [13].

ABCG2 ist auch als breast cancer resistant protein 1 (BCRP1) bekannt und verursacht als solches Resistenzen gegen bestimmte Chemotherapeutika [13].

2.4.2 Strukturproteine

Keratin 3 (KRT3) und Keratin 12 (KRT12)

Keratinproteine sind sehr wichtige strukturelle Zwischenfilamente und kommen in allen Epithelgeweben vor [34]. Es erfolgt eine Aufteilung in zwei Unterfamilien: Eine saure (Typ I) und eine neutrale bis basische (Typ II) Unterfamilie [4,13]. Die Expression der einzelnen Typen ist gewebespezifisch, hängt aber auch vom Differenzierungsstadium des Epithels ab [34]. Jedes basische

Keratin hat die Neigung sich mit einem bestimmten sauren Keratin zusammenzuschließen und zu coexprimieren. Somit werden sogenannte Keratinpaare gebildet [4,13].

Das normale Hornhautepithel ist durch zwei Keratine gekennzeichnet: das basische KRT3 und das saure KRT12 [4]. Diese beiden hornhautspezifischen Keratine sind sehr wichtig für die Stabilität der Epitheloberfläche [27]. KRT12 ist ein intermediäres Filamentprotein und wird im Hornhautepithel exprimiert. Das Keratin Gen setzt sich aus sieben Introns und acht einzelnen Exons zusammen [34].

Eine Studie zeigt, dass KRT3 und KRT12 als Marker für ein fortgeschrittenes Stadium der Hornhautdifferenzierung angesehen werden können. Außerdem wird gezeigt, dass die Basalzellen der Hornhaut in einem differenzierteren Zustand sind, als die Basalzellen im Limbus. Auf den peripheren limbalen Zellen befinden sich mehr KRT12 positive Zellen als KRT3 positive Zellen [4]. Eine weitere Studie hat sich mit der Herunterregulation von PAX6 beschäftigt und in diesem Zusammenhang eine starke Reduktion von KRT3 und KRT12 in den Hornhautepithelzellen festgestellt [27].

Eine Mutation der hornhautspezifischen Keratin-Gene KRT3 und KRT12 verursacht die Meesmann Hornhautdystrophie (MCD). Dies ist eine autosomal-dominante Störung des Hornhautepithels und manifestiert sich meist schon in der Kindheit [8]. Die MCD wird auch als „juvenile hereditäre Epitheldystrophie“ bezeichnet. Es handelt sich dabei um eine seltene, bilaterale und symmetrische Dystrophie des Hornhautepithels [34]. Das klinische Bild dieser Erkrankung ist gekennzeichnet durch intraepitheliale Mikrozysten und variable, strukturierte und punktförmige Hornhauttrübungen. Zur Diagnostik dient eine Spaltlampenuntersuchung innerhalb des Ersten Lebensjahres [8,34].

Keratin 19 (KRT19)

KRT19 ist kein bindehautspezifischer Marker, da er ebenfalls vom Hornhaut- und Limbusepithel exprimiert wird. Stattdessen ist KRT13 wesentlich spezifischer für Bindehautzellen als KRT19 und könnte deshalb als Marker für die Identifikation von Bindehautzellen bei limbalem Stammzellmangel angesehen werden. Bei der Immunfärbung im Rahmen einer Studie zeigten sich KRT12 positive Zellen im Hornhautepithel, KRT13 positive Zellen in der Bindehaut und KRT 19 positive Zellen im Hornhaut- und Bindehautbereich [37].

Desmoglein 1 (DSG1)

DSG1 ist ein Adhäsionsmolekül, aus dem der Transmembrankern von Desmosomen gebildet wird und gehört zur Familie der Desmogleinproteine. Es ist zuständig für die Zell-Zell-Kontakte. Desmogleine sind hauptsächlich in den Desmosomen lokalisiert und werden auch als Cadherin-ähnliche-Transmembranglykoproteine bezeichnet. [11].

In einer Studie wurde gezeigt, dass es nach einem PAX6-Knockdown zu einer signifikanten Reduktion von DSG1 kommt [27]. Ebenso im Mausmodell [11].

2.4.3 Andere Marker

Cellular retinoic acid-binding protein 2 (CRABP2)

CRABP1 und CRABP2 gehören der Gruppe der intrazellulären RA-Bindungsproteine an [16]. CRABP2 werden zwei wesentliche Funktionen zugeschrieben: Zum einen bindet es RA direkt an den entsprechenden RA-Rezeptor (RAR), der dadurch die Expression mehrerer antiproliferativer Gene induzieren kann.

Fatty Acid-Binding Protein 5 (FABP5)

FABP5, auch als intrazelluläres lipidbindendes Protein 3 (iLBP) bezeichnet, wird während der Neurogenese in den meisten Bereichen im Gehirn exprimiert. FABP5 ist maßgeblich an der Regulierung von Lernen und Gedächtnis beteiligt und ist für die Aktivierung von PPAR β/δ im Gehirn erforderlich. Es transportiert Liganden zu dem Kernrezeptor PPAR β/δ und führt somit zu einer Verstärkung des Abbaus vom Endocannabinoid Anandamid (AEA).

Als intrazellulär bindendes Protein hat FABP5, im Gegensatz zu CRABP2, nur eine geringe Affinität zu RA und liefert diese an PPAR β/δ [52].

Fatty acid elongase 7 (ELOVL7)

Die Fatty acid elongase lässt sich in sieben Subtypen unterteilen: ELOVL1-7. Längere Fettsäuren werden im menschlichen Körper durch eine oder mehrere der sieben Elongasen gebildet [36]. ELOVL7 spielt eine sehr wichtige Rolle bei der Herstellung von langkettigen gesättigten Fettsäuren [43]. Die Expression dieser Elongasen wird durch Transkriptionsfaktoren gesteuert. Sie können jedoch auch eine wichtige Rolle bei Krankheitsprozessen spielen. ELOVL7 kann am Wachstum von Prostatatumorzellen beteiligt sein. [36].

Proliferation marker protein KI67 (MKI67/ KI67)

KI67 ist ein Protein, dessen Expression mit der Zellproliferation korreliert und somit als prognostischer Marker verschiedener Krebsarten (z.B. Brustkrebs) und Proliferationsmarker verwendet werden kann [7]. Es wird vermehrt in G₁-, S-, G₂-, M-Phase, den aktiven Zellphasen, und weniger in G₀-Phase, der inaktiven Zellphase, nachgewiesen [44].

KI67 besteht aus einer N-terminalen Gabelkopf-assoziierten Domäne, einer Proteinphosphatase 1-bindenden Domäne und einer C-terminalen (Leukin)/ Arginin-Chromatin-Bindungsdomäne [46].

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG)

PPARG gehört zur PPAR-Unterfamilie und besteht aus zwei Isoformen: G1 (Y1) und G2 (Y2) [17,53]. Es setzt sich strukturell aus sechs Proteindomänen (Domäne A-F) zusammen: Die N-terminale A/B-Domäne enthält Transaktivierungsfunktion (ligandenunabhängig), die C-Domäne fungiert als DNA-

Bindungsdomäne (DBD), die D-Domäne ist eine flexible Gelenkregion und die E-Domäne ist ligandenunabhängig [53].

PPARG spielt eine große Rolle im Lipid- und Glukosestoffwechsel und dient somit als Hauptregulator der Adipozytendifferenzierung. Innerhalb der DBD können vorkommende Mutationen von PPARG das Transkriptionspotenzial von PPARG hemmen und führen somit bei Patienten mit solch einer Mutation zu einer schweren Insulinresistenz und einem erhöhten Risiko für Diabetes mellitus [53].

PPARG kann auch zur Entstehung von Blasenkrebs beitragen. Das PPARG-Gen wird dabei entweder direkt durch Genamplifikation oder Mutation, oder indirekt durch eine Mutation des RXRA-Gens aktiviert [17].

Retinol-bindendes Protein 1 (RBP1)

Das im Plasma zirkulierende Retinol wird vom Trägerprotein RBP1 gebunden. Dieses bildet unter physiologischen Bedingungen einen Komplex mit Thyroxin-bindendem Präalbumin. Auf der Oberfläche von Dünndarmzellen und retinalen Pigmentzellen befindet sich ein Rezeptor für RBP. Das gebundene Retinolprotein wird an den Rezeptor abgegeben und somit wird eine unspezifische Wechselwirkung des Vitamins mit Zellmembranen verhindert. Das RBP-Molekül löst sich nach der Freisetzung des Retinols vom Präalbumin und wird über die Niere ausgeschieden. [38].

Retinol-Dehydrogenase 10 (RDH10)

RDH10 gehört zusammen mit RDH5 und RDH11 zur Familie der Retinol Dehydrogenasen [39]. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Oxidation von Retinol (11-cis-Retinol) zu Retinal (11-cis-Retinal) und bildet somit den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Retinsäuresynthese. Die Retinsäure ist das metabolische Nebenprodukt von Vitamin A (Retinol) [26,39].

RDH10 ist ein essentieller Bestandteil der Retinsäuresynthese, da in Tierexperimenten gezeigt wurde, dass Mäuse, die eine Mutation im RDH10-Gen aufweisen, eine frühe embryonale Letalität haben. Es kodiert ein Protein aus 341 Aminosäuren mit zwei hydrophoben Domänen, wobei sich eine am N-Terminus und die andere am C-Terminus befindet [39].

RDH10 spielt zusammen mit Retinoidsignalen zusätzlich noch eine wichtige Rolle bei der oronasalen- und frühen kraniofaszialen Entwicklung. Durch eine übermäßige Aufnahme von Vitamin A durch die Mutter kann es beim Fetus während der Embryogenese zu einer signifikanten Erhöhung der Retinoidsignale und somit zu kraniofazialen Defekten wie beispielsweise Gesichtsspalten kommen [26].

Serinprotease-Inhibitor Kazal Typ 7 (SPINK7)

Bei dem Marker SPINK7 handelt es sich um ein Serinprotease-Inhibitor vom Kazal-Typ [55]. SPINK7 ist Teil eines Clusters von SPINK-Genen, lokalisiert auf Chromosom 5q32 [54]. In einer Studie wurden SPINK5, SPINK6 und SPINK7 als AAK-regulierte Gene in der RNA-Sequenz von Limbusepithelzellen

bei Aniridie erkannt. Die SPINK7-Regulation konnte in der Studie anhand eines siRNA-basierten Zellmodells als PAX6-abhängig nachgewiesen werden [27]. Der SPINK6-Proteaseinhibitor hemmt die Kalikrein-Proteasen. SPINK7, als Verwandter dieses Inhibitors, könnte ähnliche Funktionen in der Korneaepithel-Homöostase erfüllen. In Abhängigkeit zu PAX6 ist die mRNA von SPINK7 bei Aniridie-Patienten, aber auch im Aniridie-Zellmodell herunterreguliert [27].

Stimulated by retinoic acid 6 (STRA6)

STRA6 gilt als Retinol-bindender-Protein Rezeptor (RBP-Rezeptor) und wurde 2007 erstmals kloniert. Er ist weit verbreitet und kommt besonders häufig im Auge, wo er sich überwiegend in der basolateralen Membran des retinalen Pigmentepithels befindet, in den weiblichen Fortpflanzungsorganen und in der Plazenta vor. STRA6 ist ein integraler Membranrezeptor, der die zelluläre Aufnahme von Vitamin A durch das Erkennen von RBP-Retinol vermittelt und somit die Freisetzung und Internalisierung von Retinol auslöst [5].

STRA6 codiert für ein integrales Membranprotein, das in embryonalen und adulten Geweben exprimiert wird. Laut Studien fungiert STRA6 als Retinoidkanal und ermöglicht somit den bidirektionalen Fluss von Vitamin A zwischen extrazellulären und intrazellulären Kompartimenten. Die Epithelien des retinalen Pigmentepithels der Augen, der Ependymzellen des Plexus choroideus und der Sertoli-Zellen des Hodens exprimieren besonders hohe Spiegel von STRA6, da diese Blutgewebebarrieren bilden [1].

Das Protein STRA6 ist ein Dimer und besteht aus 18 Transmembran-Helices (neun pro Promotor) und zwei langen horizontalen Intramembran-Helices (einer pro Promotor). Jeder Promotor hat auf der zytoplasmatischen Seite ein Calmodulin-Molekül gebunden [5].

Eine Mutation im STRA6-Gen ist mit dem Matthew-Wood-Syndrom (MWS) assoziiert [5]. Das MWS ist durch eine bilaterale Mikroophthalmie und zahlreichen weiteren Entwicklungsstörungen wie Lungendysplasie, Herzfehler und Zwerchfellhernien gekennzeichnet [1].

Vascular endothelial growth factor A (VEGFA)

VEGFA, ein proangiogener Faktor, ist einer der fünf Faktoren der VEGF-Familie und ist für die Steuerung der Angiogenese, Vaskulogenese und Aufrechterhaltung der Gefäßstabilität verantwortlich [6,56]. Der Faktor führt zur Veränderung der Endothelzellnische und fördert somit die Bildung neuer Gefäße [18]. Das Fehlen von VEGFA in Geweben führt zur Unterbrechung des Blutflusses und zur endothelialen Apoptose mit anschließender Endothelregression [56].

VEGFA stimuliert bei vielen Krebsarten nicht nur die Angiogenese, sondern zusätzlich das Tumorwachstum, die Metastasierung und das Überleben der Tumorzellen. Somit wird der angiogene Faktor als Angriffspunkt für die Therapie von verschiedenen Krebserkrankungen, beispielsweise Eierstockkrebs und HCC, verwendet [18].

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, an einem ausgewählten Satz an Transkripten zu untersuchen, ob diese statt durch PAX6 direkt, indirekt über Retinoide reguliert werden.

PAX6 könnte den Retinolstoffwechsel in Limbusepithelzellen beeinflussen. Ein Überangebot von Retinol und Retinsäure führte zu vergleichbaren Transkriptionsänderungen wie bei PAX6 Reduktion. Es kommt zu einer Herunterregulation bei *DSG1*, *ADH7* und *SPINK7*.

Aus diesen oben genannten Überlegungen und Feststellungen ergab sich die Frage, ob die durch Retinol regulierten Gene direkt über die Retinolrezeptoren ($RAR_{\alpha,\beta,\gamma}$ / $RXR_{\alpha,\beta,\gamma}$) gesteuert werden. Bei der Behandlung von Limbusepithelzellen mit Pan-Rezeptorantagonisten gegen RAR und RXR könnte ersichtlich werden, ob die gemessenen Transkriptänderungen tatsächlich durch die RARs oder RXRs vermittelt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

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

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Hersteller

3.1.2 Labormaterialien

Material	Hersteller
AcuPunch, Größe 1,5 mm	Acuderm Inc.; Florida, USA
AHN myTip® Low Retention Filter Tips 0,5 – 10 µl	AHN Biotechnologie GmbH; Nordhausen, Deutschland
AHN myTip® Low Retention Filter Tips 10 – 100 µl	AHN Biotechnologie GmbH; Nordhausen, Deutschland
AHN myTip® Low Retention Filter Tips 100 – 1000 µl	AHN Biotechnologie GmbH; Nordhausen, Deutschland
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
Cellstar Tubes 50 ml	Greiner Bio One International GmbH; Kremsmünster, Österreich
Cell-Tricks	Sysmex Europe GmbH
Eppendorf Reference Pipette 0,5 – 10 µl	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
Eppendorf Reference Pipette 10 – 100 µl	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
Eppendorf Reference Pipette 100 – 1000 µl	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
Eppendorf Reference Pipette 1000 - 5000 µl	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
Eppendorf-Gefäße, Größe 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht, Deutschland
epT.I.P.S. Standard Pipettenspitzen blau 50-1000 µl	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
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

Tabelle 2: Verwendete Labormaterialien und Hersteller

3.1.3 Chemikalien und Kits

Chemikalie/Kit	Hersteller
Collagenase A	Roche Pharma AG, Grenzach- Wyhlen, Deutschland
Cryo-SFM	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
DMEM	Sigma-Aldrich GmbH Deisenheim, Deutschland
Dulbeccos PBS	Sigma-Aldrich GmbH Deisenheim, Deutschland

KSFM	Gibco, Carlsbad, USA
One Taq RT-PCR Kit	New England BioLabs, Frankfurt a.M., Deutschland
RNA/DNA/Protein isolation kit	Norgen
RNase freies Wasser	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
SYBR-Green	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Western Froxx Antikörpermischung	BioFroxx GmbH, Einhausen, Deutschland
Western Froxx Solution B (anti-mouse HRP)	BioFroxx GmbH, Einhausen, Deutschland
Western Froxx Solution B (anti-rabbit HRP)	BioFroxx GmbH, Einhausen, Deutschland
Western Froxx Stripping Puffer 10x	BioFroxx GmbH, Einhausen, Deutschland
Western Froxx Waschlösung	BioFroxx GmbH, Einhausen, Deutschland
Western lightning chemo luminescence Plus ECL Reagenz	PerkinElmer Life Sciences, Deutschland
B-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH Deisenheim, Deutschland

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien/Kits und Hersteller

3.1.4 Retinoidrezeptorantagonisten

UVI 3003	$10^{-5}M$
SML 1950-5MG	20 mg/ml
>98 (HPLC)	m = 5 mg
	436,58 g/mol

Tabelle 4: UVI 3003 Angaben vom Hersteller

AGN 193109	$10^{-5}M$
SML 2034-5MG	2 mg/ml
>98% (HPLC)	m = 5 mg
	392,49 g/mol

Tabelle 5: AGN 193109 Angaben vom Hersteller

3.1.5 Primer für die qPCR

Primer	Cat. No	Amplifikationsgröße (bp)	Hersteller
ABCG2	QT00073206	114 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
ADH7	QT00000217	85 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

ADLHA1A	QT00013286	97 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
CRABP2	QT00063434	140 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
DSG1	QT00001617	96 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
ELOVL7	QT01025976	89 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
FABP5	QT00225561	97 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
GUSB	QT00046046	96 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
KRT3	QT00050365	118 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
KRT12	QT00011949	104 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
KRT19	QT00081137	117 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
MKI67	QT00014203	86 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
PAX6	QT00071169	113 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
PPARG	QT00029841	113 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RBP1	QT01850296	126 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RDH10	QT00029176	107 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
SPINK7	QT00039585	126 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
STRA6	QT00006748	74 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
TBP	QT00000721	132 bp	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
VEGFA	QT01010184	150, 204, 222, 273	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

Tabelle 6: Primer für die qPCR

3.1.6 Verwendete Antikörper

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

Tabelle 7: Verwendete Antikörper

3.1.7 Verwendete Medien und Puffer

Das Standardmedium setzt sich aus 500 ml KSFM, 2,5 µg EGF und 25 mg BPE (Bovine Pituitary Extract) zusammen. Dies wird im folgenden Text als „Standard KSFM“ bezeichnet.

3.2 Methoden

Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Ethikkommission des Saarlandes hat die Durchführung der Versuche an Spenderzellen bewilligt (Ethiknummer 226/15). Die Versuchszellen stammten von Hornhautspenden der LIONS Hornhautbank Saar-Lor-Lux, Trier/ Westpfalz.

3.2.1 Zellkultur

Um die Kontamination der Proben zu vermeiden, erfolgten alle Zellkulturversuche unter einer Sterilwerkbank mit einem vertikalen Luftstrom. Die anschließende Kultivierung der Zellkulturen wurde in einem Brutschrank bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Atmosphäre durchgeführt.

Limbusstammzellisolation

Das primäre Ziel der Präparation der Spenderhornhäute war die Gewinnung und Isolation von Limbusepithelzellen aus dem Gewebe. Die hierfür wichtige Gewebsregion wurde mit Hilfe einer Stereolupe mit 40facher Vergrößerung aufgesucht. Danach wurden die Zellen des Limbusbereiches mit einer 1,5 mm Biopsie-Stanze ausgestanzt und anschließend mittels einer kleinen Schere und einer kleinen Pinzette ausgeschnitten und in eine vorher vorbereitete 24-Well-Platte mit 500 µl Kollagenase A hineingegeben. Im Anschluss an die Präparation wurde das Gewebe für 24 h bei 37 °C inkubiert.

Präparation der primären LEZ

Nach 24 h wurde die Inkubation der Gewebestücke in Kollagenase beendet. Die Biopsien wurden mittels auf- und abpipettieren durchgemischt und die LEZ samt Nischenzellen aus der verdauten extrazellulären Matrix herausgelöst und vereinzelt. Um diese anschließend von den Fibroblasten zu trennen, wurden die Zellen auf einen Cell-Trics® Filter gegeben und mit 10 ml Phosphate buffered Saline (PBS) gespült. In den folgenden Schritten erfolgte die Vereinzelung der Zellen. Diese wurden aus dem Filter mittels

2,5 ml Trypsin gespült. Die Zellen wurden in einer 6 Well-Platte aufgefangen und für 5 min bei 37 °C inkubiert und danach nochmals mit einer Pipette durchmischt und anschließend für weitere 5 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit 3 ml Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium/ F12 (DMEM/ F12), mit 5% FCS, gestoppt. Es folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 800 g. Nach dieser wurde das überschüssige Medium entfernt und die Zellen in 500 µl Keratinocyte serum-free medium (KSFM), supplementiert mit EGF und BPE („Standard KSFM“), resuspendiert und zur Kultivierung in eine 24-Well-Platte eingesät. Anschließend wurde die so angelegte Zellkultur wieder bei 37 °C inkubiert. Um ein erfolgreiches Wachstum zu gewährleisten, wurde alle drei Tage das Medium („Standard KSFM“) gewechselt.

Passagieren/ Splitten der Zellen in ein Well einer 6-Well-Platte

Die Inkubation erfolgte mehrere Tage, bis die LEZ in einem Well einer 24-Well-Platte eine Konfluenz von 90 % erreichten. Wenn diese Dichte erreicht war, wurden sie in ein Well einer 6-Well-Platte eingesät. Dafür wurde im ersten Schritt das Medium „Standard KSFM“ entfernt, die Kultur mit 500 µl Trypsin versetzt und anschließend 5 min bei 37 °C inkubiert. Diese beiden Schritte dienten der Lösung der adhärennten Zellen vom Boden der Platte. Nach erfolgter Inkubation wurde die Reaktion mittels 600 µl DMEM (mit 5% FCS) gestoppt, die Zelllösung in ein Eppendorfgefäß pipettiert und anschließend bei 800 g für eine Dauer von 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 750 µl PBS hinzugefügt. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 800 g für 5 min. Der Überstand wurde erneut entfernt und die Zellen mit 1 ml „Standard KSFM“ versetzt. Danach wurden die Zellen in ein Well einer 6-Well-Platte gegeben und mit weiteren 2 ml „Standard KSFM“ aufgefüllt, sodass sich 3 ml Medium im Well befanden. Als letzte Schritte der Passage Null erfolgte die Inkubation der Zellen bei 37 °C für mehrere Stunden bzw. Tage.

Passagieren/ Splitten der Zellen in zwei Wells einer 6-Well-Platte

Als die Zellen wieder eine Konfluenz von 90 % erreicht hatten, konnten sie auf zwei Wells einer 6-Well-Platte aufgesplittet werden. Das Passagieren der Zellen erfolgte nach den oben genannten Schritten. Anschließend wurden die Zellen allerdings nicht auf ein, sondern auf zwei Wells einer Platte aufgeteilt. Hierbei handelte es sich um Passage Eins.

Passagieren/ Splitten der Zellen in vier Wells einer 6-Well-Platte

Bei einer erneuten Konfluenz von 90 % wurden die Zellen ein letztes Mal passagiert und diesmal auf vier Wells einer 6-Well-Platte aufgeteilt.

Bei Erreichen dieser zweiten Passage konnten die Zellkulturen mit Retinoidrezeptorantagonisten, UVI 3003 und AGN 193109, behandelt werden.

Kryokonservierung

Zum besseren Arbeiten und der Möglichkeit der Kultivierung mehrerer Proben und Versuchsdurchführungen gab es in jedem konfluenten Stadium die Möglichkeit, die Kulturen zu kryokonservieren. Diese Vorgehensweise war identisch zum Passagieren. Nur im letzten Schritt wurde anstatt des „Standard KFSM-Mediums“ 500 µl Kryomedium hinzugefügt. Die Zellkultur wurde in einem Kryocontainer langsam auf -80 °C abgekühlt und nach ca. 24 h wieder aus dem Container entnommen und im Stickstoffbehälter bis zur weiteren Behandlung aufbewahrt.

3.2.2 Behandlung mit Retinoidrezeptorantagonisten UVI 3003 und AGN 193109

Die Berechnung der angewendeten Konzentrationen der beiden Antagonisten und die Dauer der Inkubationszeit (24 h und 48 h) basieren auf aus der Literatur üblichen Konzentrationen [45,59]. Im ersten Schritt wurde von beiden Retinoidrezeptorantagonisten jeweils eine 10 mM, eine 5 mM und eine 2,5 mM Stocklösung angesetzt.

Die Behandlung wurde jeweils mit drei verschiedenen Konzentrationen und einer Kontrolle (Tabelle 8 und 9) einer Kultur durchgeführt. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von etwa 60 % mit den unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Die Kontrolle erfolgte mit dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO). Zur Vorbereitung der Behandlung gehörte das langsame Auftauen der bereits fertig angesetzten Stocklösungen und der Mediumwechsel (3 ml „Standard KFSM“ pro Well).

Bevor die Kulturen mit den Retinoidrezeptorantagonisten versetzt wurden, mussten die Stocklösungen gründlich gemischt werden. Die Behandlung der einzelnen Wells erfolgte nach dem Schema der beiden nachfolgend angefügten Tabellen (Tabelle 8 und Tabelle 9). Um die gleichmäßige Verteilung der Antagonisten in jedem einzelnen Well zu gewährleisten, wurde die Platte am Ende der Behandlung vorsichtig gemischt. Zum Abschluss des Prozesses erfolgte die Inkubation bei 37 °C über 24 h und 48 h.

UVI 3003

Well	Substanzmenge [µl]	Konzentration der Stocklösung [mM]	Endkonzentration der Retinolblocker [µM]
1. Well	0,9 DMSO	0	0
2. Well	0,6	2,5	0,5
3. Well	0,6	5	1
4. Well	0,9	5	1,5

Tabelle 8: Behandlung mit UVI 3003

AGN 193109

Well	Substanzmenge [μ l]	Konzentration der Stocklösung [mM]	Endkonzentration der Retinolblocker [μ M]
1. Well	0,9 DMSO	0	0
2. Well	0,6	2,5	0,5
3. Well	0,6	5	1
4. Well	0,9	5	1,5

Tabelle 9: Behandlung mit AGN 193109

3.2.3 Toxizitätstestung unter der Behandlung mit AGN 193109 und UVI 3003 mittels eines XXT Assays

Nach Anzucht der Kulturen wurden die Zellen in eine 96 Wellplatte ausgesät und mit den unterschiedlichen Konzentrationen von AGN und UVI über 24 h und 48 h behandelt. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Kulturen mit dem XTT Reagenz versetzt und für 30 min bis 1 h inkubiert. Bei aktiven Zellen (mit Aktivität der mitochondrialen Enzyme) bildet sich in dieser Zeit ein orangener Farbstoff in der 96 Wellplatte aus. Die Farbstoffintensität kann anschließend mit einem Spektralphotometer (TECAN infinite F50, Schweiz) gemessen werden. Die ermittelte Intensität des Farbumschlags wurde auf die Kontrolle normalisiert.

3.2.4 RNA-/Protein- Isolation

Nach 24 h oder 48 h wurde die Inkubation der mit Retinoidrezeptorantagonisten behandelten Kulturen beendet. Als Nächstes folgte die Lyse der Zellen. Dazu wurde zuerst das Medium „Standard KSFM“ aus allen behandelten Wells mittels einer Pipette entfernt und gründlich mit 2 ml PBS gespült. Nach der Entfernung des PBS wurden in die Wells jeweils 300 μ l Lysepuffer gegeben und mittels eines Zellschabers die Zellmasse vom Boden der Platte gelöst und in ein Eppendorfgefäß pipettiert.

Die Isolation der RNA und Proteine erfolgte aus den gewonnenen Zelllysaten durch ein Silica-basiertes Säulensystem. Der Prozess wurde anhand eines standardisierten Protokolls von Norgen und dem RNA/DNA/Protein Purification Plus Kit durchgeführt.

Nach der RNA-Isolation wurde mithilfe eines Nano-Drop Spektralphotometers die RNA-Konzentration aus den gewonnenen Proben gemessen. Die Berechnung der RNA-Konzentration [$\text{ng}/\mu\text{l}$] erfolgte mittels Ultraviolet/ Visible (UV/VIS)-Spektrometrie (Nano-Drop 1000, peqlab, Deutschland) und des modifizierten Lambert-Beerschen Gesetzes $c=(A+e)/b$.

cDNA- Synthese

Pro cDNA-Synthese wurden 500 ng Gesamt-RNA verwendet und die dafür erforderliche RNA-Menge aus der vorher bestimmten RNA-Konzentration berechnet.

Die Synthese der cDNA erfolgte nach einem standartisierten Protokoll des OneTaq Rt-PCR Kit von New England BioLabs (Tabelle 10).

Reaktionsmix	Volumen [μ l]
H ₂ O (Nuclease-frei)	Volumen _{Gesamt} – (Volumen _{RNA} + Volumen _{Oligo} d(T)23 Primer)
RNA (500 ng)	x
Oligo d(T)23 Primer	2
Gesamt	8
+ M-MuLV Reaction Mix	10
+ M-MuLV Enzyme Mix	2
+ H ₂ O (Nuclease-frei)	30

Tabelle 10: Reaktionsmix für eine Reaktion für die cDNA-Synthese. (Die Variable x steht für eine beliebige Zahl zwischen 0 und 6)

3.2.5 Quantitative Polymerasekettenreaktion

Die quantitative Polymerasekettenreaktion dient dem Nachweis und gleichzeitig der Quantifizierung von Nukleinsäuren (DNA oder RNA). Mithilfe dieser Methode kann man Aussagen über die Hoch- bzw. Herunterregulation eines Gens oder einer mRNA im Vergleich zu der Kontrolle treffen.

Für diesen Versuch wurde eine 96-Well-Platte benutzt. Der Primermix und der Templatemix wurden gemäß den folgenden Tabellen angesetzt und nach einem vorher festgelegten Pipettierschema in die 96-Well-Platte pipettiert (Tabelle 11 und Tabelle 12). Als Referenzgen diente das TATA binding Protein (TBP) und die B-Glucuronidase (GUSB). Die eingesetzten Primer waren: ABCG2, ADH7, ADLHA1A, CRABP2, DSG1, ELOVL7, FABP5, KRT3, KRT12, KRT19, MKI67, PAX6, PPARG, RBP1, RDH10, SPINK7, STRA6, VEGFA, TBP, GUSB

Primermix	Volumen [μ l]
Primer	1,25
SYBR- Green	5,0
H ₂ O	1,25
Gesamt	7,5

Tabelle 11: Ansatz von Primermix (für ein Well einer 96-Well-Platte)

Templatemix	Volumen [μ l]
cDNA	0,5
H ₂ O	2,0
Gesamt	2,5

Tabelle 12: Ansatz von Templatemix (für ein Well einer 96-Well-Platte)

Die qPCR erfolgte in vier Schritten: Initiale Denaturierung auf 95 °C über 5 min, Denaturierung bei 95 °C für 10 s, Primerhybridisierung bei 60 °C für 30 s und die Elongation auf 72 °C. Die Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation wurden für 40 Zyklen wiederholt.

Die Auswertung der Ergebnisse wurde mit der Software QuantStudio Design & Analysis durchgeführt. Diese berechnete die Ct-Werte und daraus konnte man auf den jeweiligen Δ Ct-Wert, den $\Delta\Delta$ Ct-Wert und den Fold Change schließen.

3.2.6 Western Blot

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte durch den sogenannten Bradford-Test nach einem standardisierten Protokoll von Sigma-Aldrich (Katalognummer B6916). Die Messung wurde bei 595° nm durchgeführt.

Probenvorbereitung und Elektrophorese

Anhand der Proteinkonzentrationen wurden die einzelnen Proteinmengen berechnet. Es wurden für den Western Blot 20 μ g pro Probe verwendet. Die Proben wurden hierzu in Lämmelinpuffer aufgenommen.

Zur Denaturierung erfolgte eine Inkubation der Proben für 5 min bei 95 °C im Thermoblock und eine anschließende Abkühlung der Proben auf Eis. Im nächsten Schritt wurde die Elektrophoresekammer vorbereitet. Das Sodium-dodecyl-sulfat-Gel (SDS-Gel) wurde mit dem Gelhalter in die Elektrophoresekammer montiert, mit den Proben und dem dual-colour-Marker beladen und mit 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)-Puffer bis zur Markierung aufgefüllt. Die Größenauftrennung der Proteine in der Elektrophoresekammer erfolgte unter einer Spannung von ca. 180 V für eine Stunde.

Blotten und Antikörper-Inkubation

Nach erfolgter Auftrennung des Proteins wurde das Gel aus der Kammer entfernt und auf eine Nitrocellulosemembran mit Hilfe der Semi-Dry-Blotkammer transferiert. Als nächstes erfolgte der Waschvorgang (3x für je 5 min mit je 10 ml Waschlösung) mit der WesternFroxx Waschlösung. Anschließend wurde die Membran für die Immundetektion mit dem Primär-Antikörper, bestehend aus dem anti-mouse/- anti-rabbit-Sekundär-Antikörper, für vier Stunden bei 4 °C unter Schütteln inkubiert.

Nach der Inkubation erfolgte wieder ein dreimaliger Waschgang für jeweils 5 min mit je 10 ml WesternFroxx Waschlösung. Anschließend wurde die Waschlösung entfernt und die Membran in einer Folie mit Western Plus Lösung für 1 min. behandelt und in einem Western Blot Imager entwickelt.

Es erfolgte wieder ein dreimaliger Waschgang für jeweils 5 min mit je 10 ml WesternFroxx Waschlösung.

Um sicherzustellen, dass bei allen Proben die gleiche Gesamtmenge an Protein eingesetzt wurde, dient das Protein β -Aktin als Ladekontrolle. Die Membran wurde für 15 min mit β -Aktin bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran wieder dreimal gewaschen und danach in einer Folie mit 1000 μ l Oxidizing Reagent Plus und 1000 μ l Enhanced Luminol reagent plus inkubiert und anschließend entwickelt.

4 Ergebnisse

Alle Signifikanzen dieser Arbeit sind im Format der GraphPad prism Software ausgewertet. Somit ergibt sich für die Signifikanz: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4.1 Toxizitätstestung der Proben unter Behandlung mit AGN 193109 und UVI 3003

Mittels eines XTT Assays wurde analysiert, ob die eingesetzten Konzentrationen von AGN, UVI, RA und Retinol einen toxischen Effekt auf die behandelten Zellkulturen haben. Nach 24 h war die Viabilität bei der Behandlung mit RA sogar signifikant erhöht. Eine signifikante Erniedrigung der Zellviabilität war nur bei den Konzentrationen von 5 μM zu beobachten (Abbildung 1).

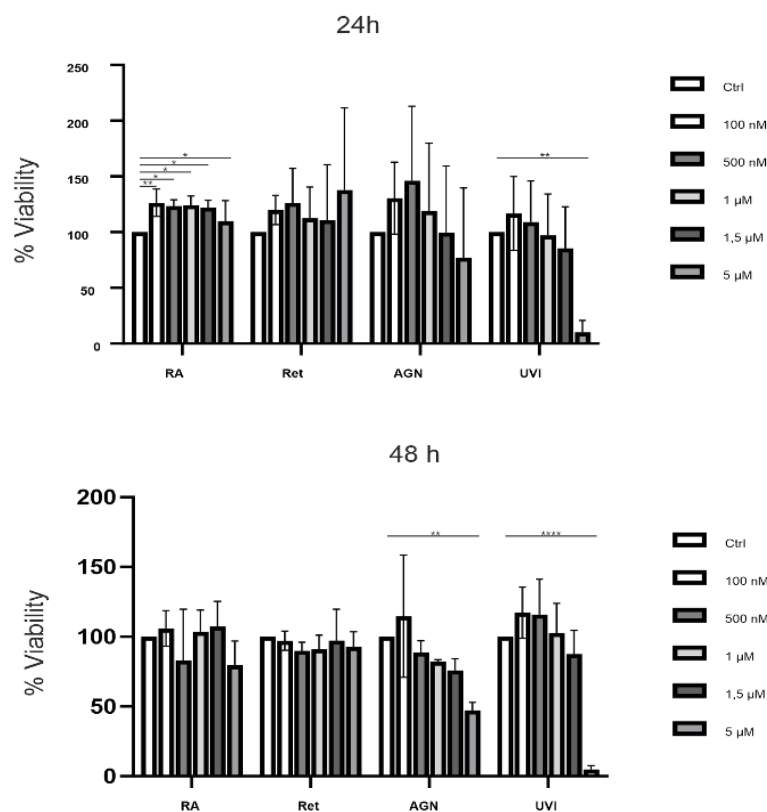


Abbildung 1: Zytotoxizitäts Assay (XTT) unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI, AGN, RA und Retinol. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

4.2 Genexpressionsergebnisse nach Behandlung von Limbusepithelzellen mit Retinoidrezeptorantagonisten UVI 3003 und AGN 193109

4.2.1 Der Stammzellmarker ABCG2 und der Proliferationsmarker Ki67

ABCG2

Wie in Abbildung 2 dargestellt, zeigte ABCG2 unter der Behandlung von AGN in den verschiedenen Inkubationszeiträumen verschiedene Regulationen. Nach 24 h AGN Behandlung zeigten sich keine signifikanten Änderungen der Transkriptmenge. Nach 48 h ergab sich eine Tendenz zur Hochregulation von ABCG2 bei zwei der drei Konzentrationen ($p \leq 0,2709$). Eine signifikante Regulation von ABCG2 war nur bei der Konzentration 1,5 μM ($p = 0,0091$) zu verzeichnen.

Unter der Behandlung mit UVI zeigten sich ebenfalls unterschiedliche Regulationen. Nach 24 stündiger Behandlung ergab sich in allen drei Konzentrationen eine signifikante Herunterregulation der ABCG2-Expression ($p \leq 0,0119$). Nach 48 h ließ sich keine signifikante Herunterregulation mehr feststellen ($p \leq 0,9999$). Bei den Konzentrationen 0,5 μM ($p = 0,9659$) und 1,0 μM ($p = 0,3301$) tendierte die Expression zur Hochregulation. Bei 1,5 μM ($p = 0,9999$) konnte keine Regulationsänderung mehr erkannt werden.

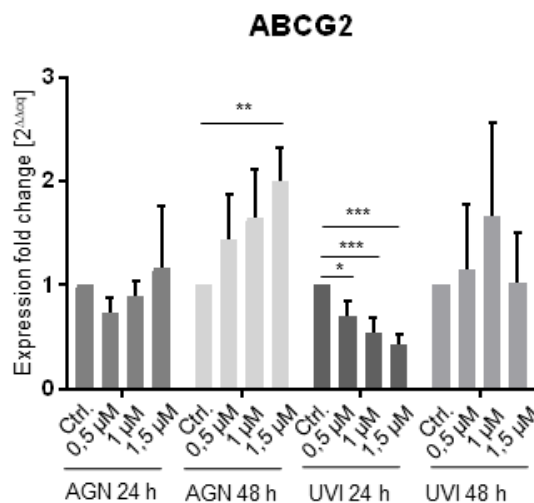


Abbildung 2: Genexpression des Markers ABCG2 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

MKI67

Abbildung 3 zeigt, dass die Genexpression von MKI67 nach 24 h AGN-Behandlung bei allen drei Konzentrationen signifikant herunterreguliert war ($p < 0,0001$). Nach 48 h war die Herunterregulation unter AGN-Behandlung nur bei den Konzentrationen 1,0 μM und 1,5 μM signifikant ($p < 0,0001$), nicht bei 0,5 μM ($\text{FC} = 0,7 - 0,1$).

Unter der Behandlung mit UVI zeigte sich in beiden Zeitgruppen in allen drei Konzentrationen eine tendenzielle Herunterregulation ($p \leq 0,3177$). Diese war lediglich nach 24 h bei 1,0 μM und 1,5 μM signifikant ($\text{FC} = 0,5 - 0,2$).

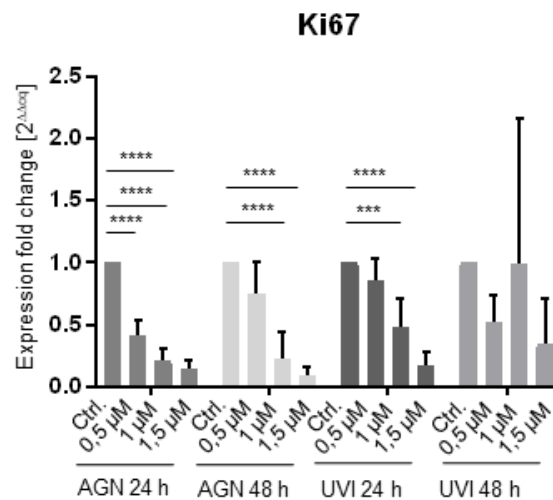


Abbildung 3: Genexpression des Markers Ki67 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

4.2.2 mRNA Expression von PAX6 in primären LEZs

PAX6

Für PAX6 war weder unter der Behandlung von AGN noch unter der Behandlung von UVI bei allen drei Konzentrationen (0,5 μM , 1 μM und 1,5 μM) eine Änderung der Transkription zu beobachten (Abbildung 4). Nach 48 h Inkubation mit UVI zeigten einige Proben (bei 0,5 μM und 1,5 μM) eine Hochregulation, jedoch nicht alle, weswegen diese nicht als signifikant zu werten sind ($p \leq 0,9925$).

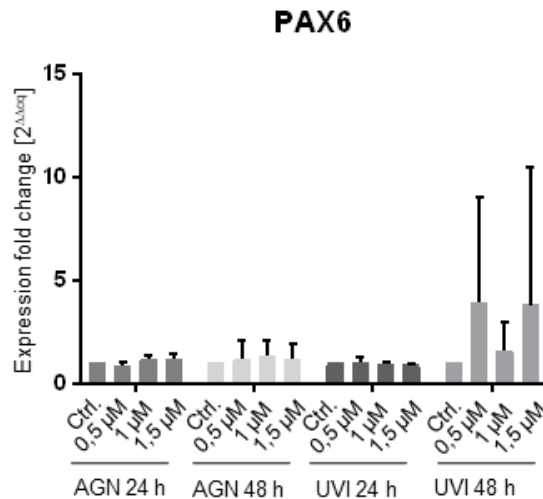


Abbildung 4: Genexpression des Markers PAX6 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

4.2.3 qPCR-Analyse von ADH7, ALDH1A1, DSG1 und SPINK7 in LEZs unter der Behandlung von AGN 193109 und UVI 3003

ADH7

Nach 24 stündiger AGN-Behandlung zeigte sich bei allen drei Konzentrationen ein Trend zur Hochregulation. Wie in Abbildung 5 ersichtlich, war dies allerdings nur bei den Konzentrationen 1,0 μM ($p = 0,0051$) und 1,5 μM ($p = 0,0004$) signifikant. Dies ist in Abbildung 5 ersichtlich. Nach 48 h war kein eindeutiger Trend mehr zu erkennen. Bei Konzentrationen von 0,5 μM und 1,5 μM zeigte sich jeweils ein Trend zur Hochregulation und bei 1,0 μM ein Trend zur Herunterregulation. Die Genexpression bei ADH7 zeigte nach 24 h UVI-Behandlung für alle drei Konzentrationen einen Trend zur Hochregulation, der bei 1,0 μM ($p = 0,0002$) und 1,5 μM ($p < 0,0001$) signifikant, bei 0,5 μM ($p = 0,7542$) jedoch nicht signifikant war. Nach 48 h ergab sich keine signifikante Transkription mehr ($p \leq 0,9996$).

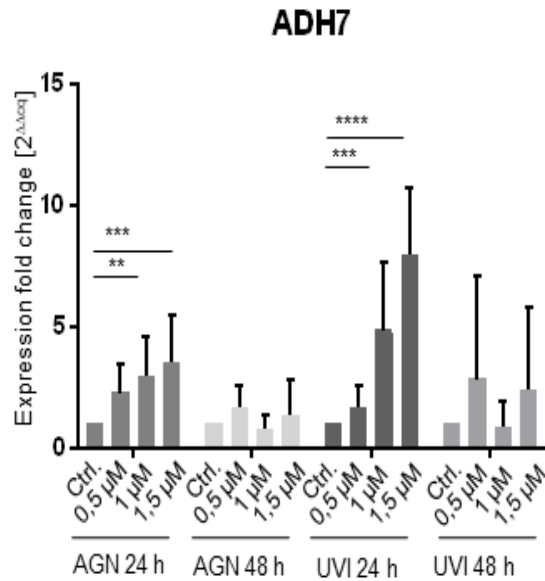


Abbildung 5: Genexpression des Markers ADH7 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

ALDH1A1

Die Genexpression von ALDH1A1 in Abbildung 6 wurde unter der 24-, und 48-stündigen Behandlung mit UVI oder AGN nicht signifikant reguliert ($p \leq 0,9318$).

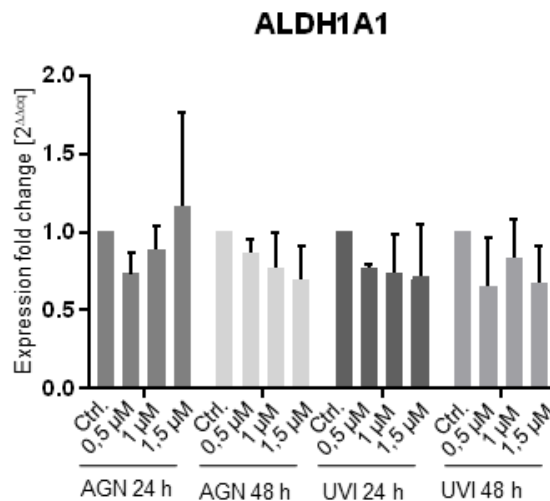


Abbildung 6: Genexpression des Markers ALDH1A1 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

DSG1

Die Genexpression von DSG1 in Abbildung 6 war unter AGN-Behandlung (24 h und 48 h) in allen drei Konzentrationen tendenziell hochreguliert. In der 24 h Behandlungsgruppe war eine signifikante Transkriptänderung bei den Konzentrationen 0,5 μ M, 1,0 μ M und 1,5 μ M (FC = 2,1 – 3,2) ($p \leq 0,0005$) zu beobachten. Während der 48-stündigen Behandlung mit AGN war die Hochregulation von DSG1 (FC = 10,9 – 5,4) bei keiner der drei Konzentrationen signifikant ($p \leq 0,3599$). Bei der Behandlung mit UVI ergab sich zwar bei beiden Inkubationszeiträumen und bei allen drei Konzentrationen ein leichter Trend zur Herunterregulation (Ausnahme: 48 h bei 0,5 μ M keine Regulation), aber keine dieser sehr leichten Änderungen (FC 24 h: 0,6 – 0,7; FC 48 h: 1,1 – 0,3) war signifikant ($p \leq 0,9705$).

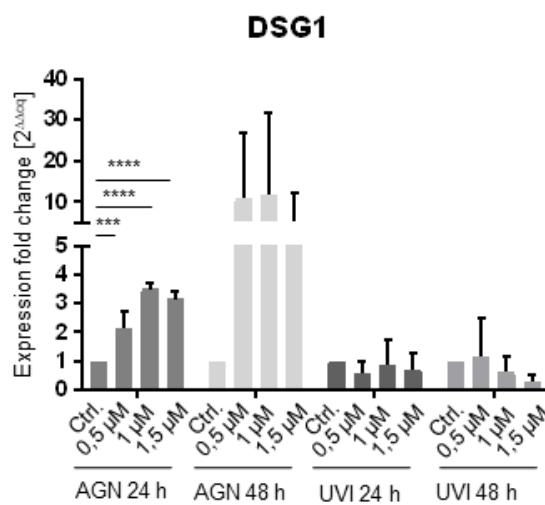


Abbildung 7: Genexpression des Markers DSG1 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

SPINK7

Die Behandlung mit AGN und UVI ergab bei SPINK7 nach 48 h einen Trend zur Hochregulation (FC AGN 48 h: 1,2 – 1,1; FC UVI 48 h: 3,2 – 3,9). Diese war allerdings nicht signifikant (Abbildung 8) ($p \leq 0,9936$).

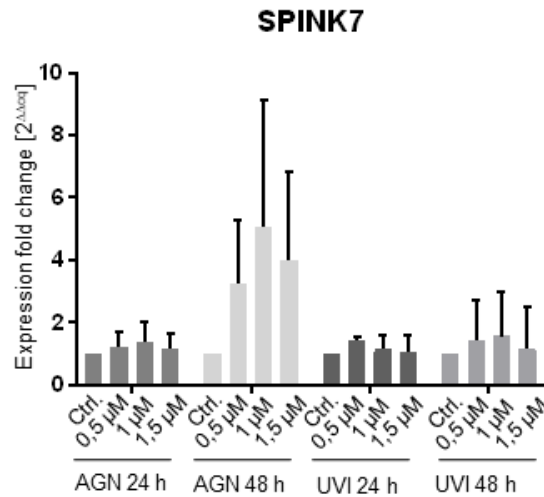


Abbildung 8: Genexpression des Markers SPINK7 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

4.2.4 KRT3, KRT12 und KRT19 in LEZs

KRT3

Die 24 h Behandlung mit AGN ergab für die Konzentrationen 0,5 µM ($p = 0,1603$) und 1,0 µM (0,0277) einen leichten Trend zur Hochregulation (Abbildung 9). Diese war lediglich bei 1,0 µM ($p = 0,0277$) signifikant. Bei 1,5 µM ($p = 0,8364$) ließ sich keine signifikante Transkriptionssänderung erkennen. Bei der 48-stündigen Behandlung der Kulturen mit AGN zeigte sich bei allen drei Konzentrationen keine signifikante Änderung ($p \leq 0,9912$). Die Genexpression war bei der Behandlung von UVI in beiden Zeitgruppen nicht signifikant (24 h: $p \leq 0,9514$; 48 h: $p \leq 0,8811$).

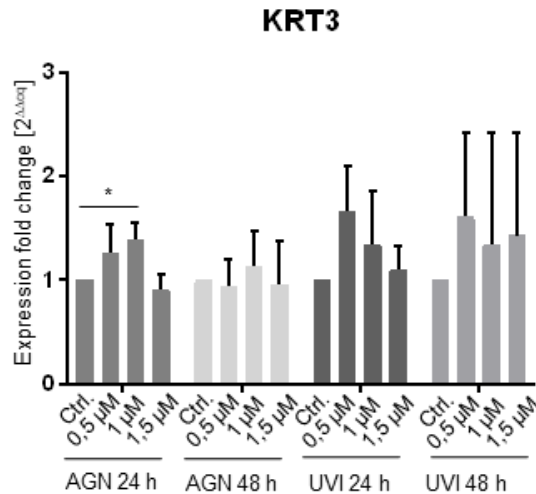


Abbildung 9: Genexpression des Markers KRT3 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

KRT12

Wie in Abbildung 10 dargestellt, ergab die Behandlung mit AGN, sowohl bei 24 h ($p \leq 0,0058$) als auch bei 48 h ($p \leq 0,0115$), in beiden Gruppen für alle drei Konzentrationen eine signifikante Herunterregulation bei moderaten Transkriptionsänderungen (FC 24 h: 0,7 – 0,5; FC 48 h: 0,7 – 0,4).

Für die Behandlung mit UVI zeigte sich für beide Zeitgruppen keine signifikante Änderung der KRT12-Expression (24 h: $p \leq 0,5669$; 48 h: $p \leq 0,9417$). Während bei 0,5 μM ($p = 0,4486$) eine sehr leichte Tendenz zur Hochregulation zu sehen war, war dieser Trend bei der Behandlung mit 1 μM ($p = 0,9417$) und 1,5 μM ($p = 0,5480$) UVI umgekehrt.

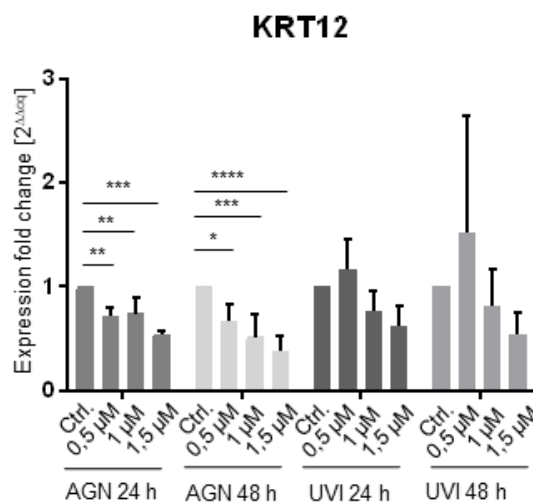


Abbildung 10: Genexpression des Markers KRT12 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

KRT19

Die Genexpression von KRT19 in Abbildung 11 war bei der Behandlung mit AGN bei allen Konzentrationen und Inkubationszeiträumen herunterreguliert. Nach 24 h war diese Herunterregulation der Expression signifikant ($p \leq 0,0466$), nach 48 h ($p \leq 0,9966$) jedoch nicht mehr. Die Änderungen waren zudem sehr schwach ausgeprägt (FC 24 h: 0,6- 0,8; FC 48 h: 0,7 – 0,9).

Bei der Behandlung mit UVI war die Genexpression von KRT19 weder hoch-, noch herunterreguliert und auch nicht signifikant ($p > 0,9999$).

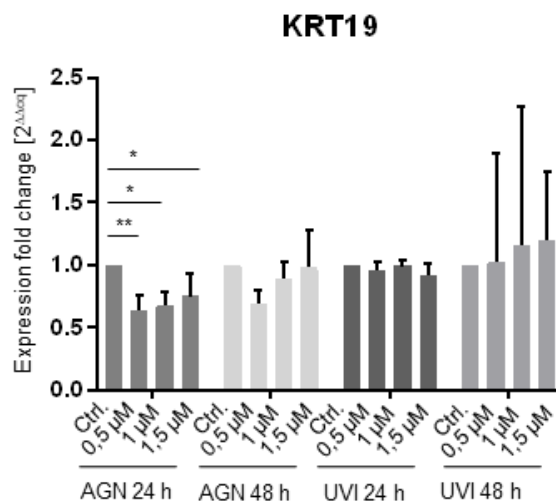


Abbildung 11: Genexpression des Markers KRT19 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

4.2.5 Marker des Retinsäureweges und der Bindehaut von Aniridiepatienten

CRABP2

Die Genexpression von CRABP2 war bei 24 h und 48 h AGN-Behandlung teilweise hochreguliert (Abbildung 12). Bei der 24 h AGN-Behandlung war CRABP2 bei Stimulation mit 1 µM ($p = 0,0002$) AGN signifikant erhöht. Nach 48-stündiger Behandlung mit AGN war CRABP2 bei 0,5 µM ($p = 0,0384$) signifikant erhöht.

Für CRABP2 zeigte sich bei 24-stündiger Behandlung mit UVI ein leichter Trend zur Herunterregulation bei allen drei Konzentrationen ($p \leq 0,1311$). Bei 1,5 µM ($p = 0,0160$) war die Herunterregulation signifikant.

Eine durchgehende signifikante Herunterregulation konnte man bei allen drei Konzentrationen nach 48 h UVI-Behandlung erkennen ($p \leq 0,0018$).

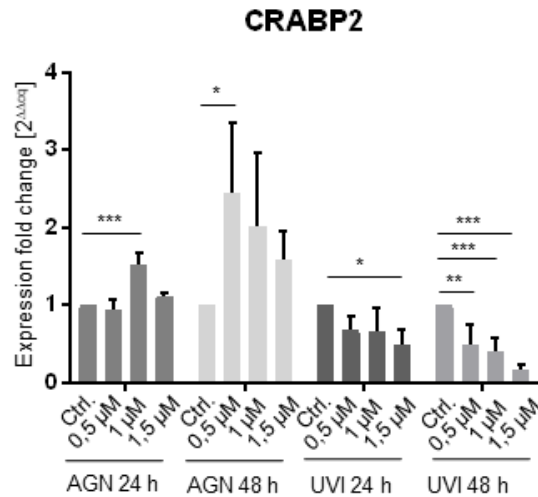


Abbildung 12: Genexpression des Markers CRABP2 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

ELOVL7

Unter der 24 h Behandlung mit AGN ergab sich, wie in Abbildung 13 dargestellt, für ELOVL7 eine tendenzielle Hochregulation bei allen drei Konzentrationen ($p \leq 0,9465$), allerdings war die Expression nur bei 1,5 μM ($p = 0,0016$) signifikant erhöht (FC 24h 1,5 μM : 7,4). Nach 48 stündiger Behandlung mit AGN konnte ebenfalls ein Trend zur Hochregulation beobachtet werden ($p \leq 0,8161$). Hierbei waren die Expressionen bei 1,0 μM ($p = 0,0026$) und bei 1,5 μM ($p < 0,0001$) AGN signifikant erhöht (FC 48 h 1,0 μM : 3,7; FC 48h 1,5 μM : 6,5).

Bei der Behandlung mit UVI konnte man bei 24-, und 48-stündiger Behandlung einen Trend zur Hochregulation beobachten ($p \leq 0,9195$), jedoch war hierbei nur die Expression bei der Konzentration von 1,5 μM ($p = 0,0063$) nach 24 h Behandlung signifikant erhöht (FC 4,9).

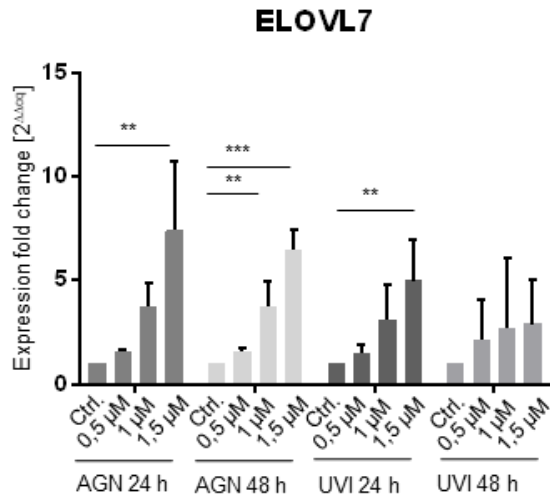


Abbildung 13: Genexpression des Markers ELOVL7 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

FABP5

Wie in Abbildung 14 ersichtlich ist, ergab sich für FABP5 unter der 24-stündigen Behandlung mit AGN eine signifikante Hochregulation bei 1,0 μM ($p < 0,0001$) und 1,5 μM ($p < 0,0001$). Bei 0,5 μM ($p = 0,8871$) zeigte sich keine signifikante Änderung. Nach 48 h unter AGN konnte man nur einen leichten Trend zur Hochregulation vernehmen ($p \leq 0,5218$).

Die Behandlung mit UVI zeigte in beiden Zeiträumen keine signifikanten Regulationen. Nach 24 h ergab sich mit allen drei Konzentrationen ein Trend zur Hochregulation ($p \leq 0,6270$), jedoch mit starken individuellen Schwankungen in den einzelnen Proben, was sich in der hohen SD widerspiegelt.

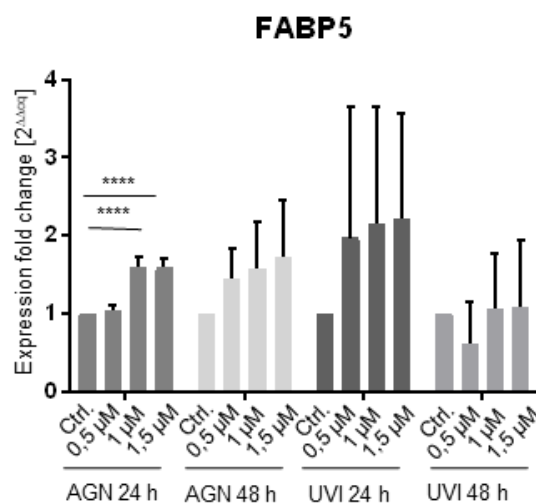


Abbildung 14: Genexpression des Markers FABP5 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

PPARG

Bei der Behandlung mit AGN war bei beiden Zeitintervallen (24 h und 48 h) eine deutliche Hochregulation ersichtlich (Abbildung 15) ($p \leq 0,7384$). Nach 24 h war bei den Konzentrationen 1,0 μM ($p = 0,0099$) und 1,5 μM ($p < 0,0001$) eine signifikante Hochregulation zu beobachten. Nach 48 h war die Expression bei 1,5 μM ($p = 0,0022$) signifikant erhöht.

Bei der Behandlung mit UVI war sowohl bei 24 h als auch bei 48 h keine signifikante Regulation zu beobachten ($p > 0,9999$).

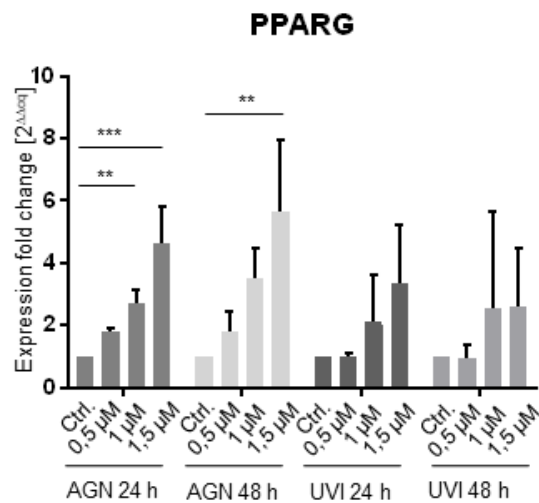


Abbildung 15: Genexpression des Markers PPARG unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

RBP1

Bei der Genexpression von RBP1 in Abbildung 16 ergab sich unter Behandlung mit AGN und UVI keine signifikante Regulation ($p \leq 0,9785$).

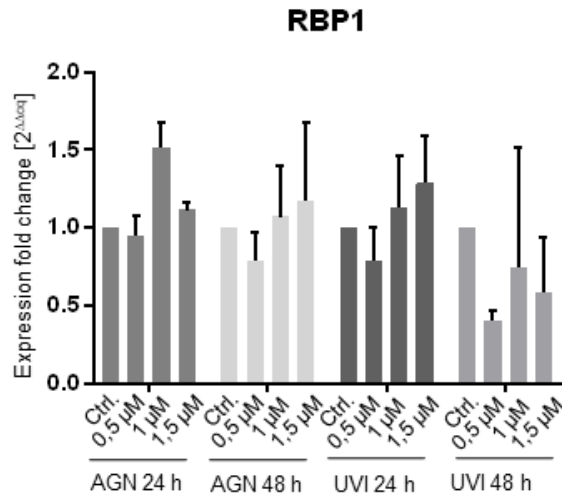


Abbildung 16: Genexpression des Markers RBP1 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

RDH10

Bei allen Behandlungen ergab sich ein Trend zur Hochregulation (Abbildung 17) ($p \leq 0,9933$).

Nach der 24 h und 48 h Behandlung mit AGN ergab sich für die Konzentration 1,5 μM (24 h: $p = 0,0086$; 48 h: $p = 0,0030$) eine signifikante Hochregulation. Die anderen beiden geringeren Konzentrationen (0,5 μM und 1,0 μM) zeigten einen ähnlichen Trend. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant ($p \leq 0,9439$).

Die Behandlung mit UVI zeigte bei beiden Inkubationszeiträumen in allen Konzentrationen keine Regulation ($p \leq 0,9933$).

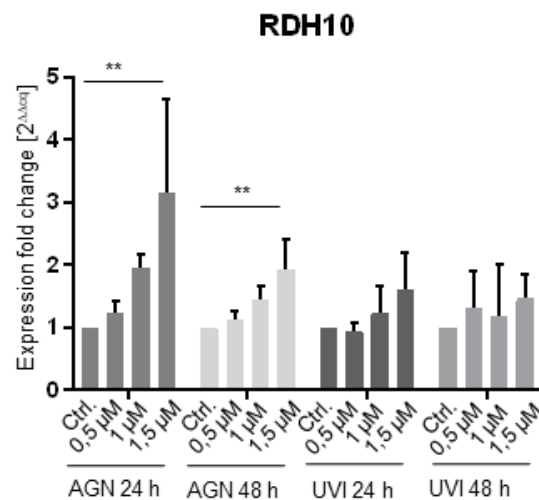


Abbildung 17: Genexpression des Markers RDH10 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

STRA6

Bei STRA6 konnte man in Abbildung 18 bei der Behandlung mit AGN, sowohl bei 24 h als auch bei 48 h Inkubation, eine Herunterregulation der Genexpression erkennen ($p \leq 0,1580$). Diese war nach 24 h bei 0,5 μM ($p = 0,0063$) und 1,0 μM ($p = 0,0236$) signifikant, nicht aber bei 1,5 μM ($p = 0,1580$). Bei 48 h war die Expression bei allen drei Konzentrationen signifikant ($p \leq 0,0049$). Die Herunterregulation schien bei den niedrigen Konzentrationen stärker zu sein als bei den höheren Konzentrationen (FC = 0,3 bei 0,5 und FC = 0,5 bei 1,5 μM).

Nach 24-stündiger Behandlung mit UVI war STRA6 bei allen drei Konzentrationen signifikant hochreguliert (FC = 1,7) ($p \leq 0,0170$). Nach 48 h UVI-Behandlung konnte man wieder in allen drei Konzentrationen einen Trend zur Hochregulation erkennen (FC = 16,3 – 6,9). Diese Regulation war jedoch nicht signifikant ($p \leq 0,9841$).

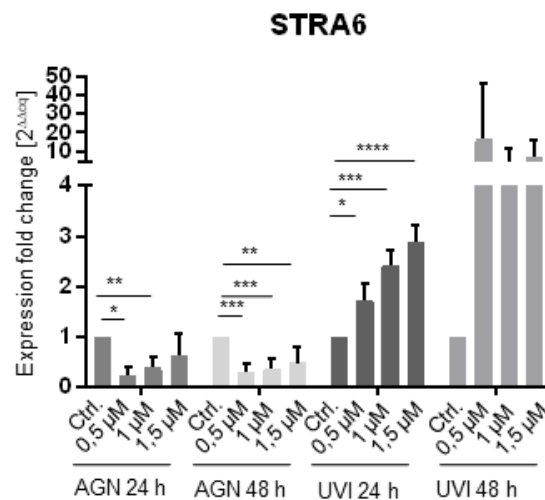


Abbildung 18: Genexpression des Markers STRA6 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

In Tabelle 13 sind alle relevanten p-Werte dieser Arbeit aufgelistet. Die Signifikanzwerte sind hierbei fettgedruckt dargestellt. Da die Signifikanzen mittels der GraphPad prism Software ausgewertet wurden, ergibt sich Folgendes: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

AGN	p- Wert 24 h	p- Wert 48 h	UVI	p- Wert 24h	p- Wert 48h
ABCG2					
0,5 μM	0,5413	0,2709	0,5 μM	0,0119	0,9659
1,0 μM	0,9318	0,0813	1,0 μM	0,0007	0,3301
1,5 μM	0,8190	0,0091	1,5 μM	0,0001	0,9999
MIK67					
0,5 μM	<0,0001	0,0748	0,5 μM	0,3177	0,4619

1,0 µM	<0,0001	<0,0001	1,0 µM	0,0006	>0,9999
1,5 µM	<0,0001	<0,0001	1,5 µM	<0,0001	0,2298
PAX6					
0,5 µM	0,6665	0,9282	0,5 µM	0,6281	0,6267
1,0 µM	0,2858	0,7277	1,0 µM	0,9902	0,9925
1,5 µM	0,3573	0,9379	1,5 µM	0,7620	0,6511
ADH7					
0,5 µM	0,0814	0,1912	0,5 µM	0,7542	0,2469
1,0 µM	0,0051	0,9272	1,0 µM	0,0002	0,9996
1,5 µM	0,0004	0,6921	1,5 µM	<0,0001	0,4721
ALDH1A1					
0,5 µM	0,5413	0,5676	0,5 µM	0,3509	0,1352
1,0 µM	0,9318	0,1992	1,0 µM	0,2670	0,6280
1,5 µM	0,8190	0,0692	1,5 µM	0,2101	0,1553
DSG1					
0,5 µM	0,0005	0,4335	0,5 µM	0,4476	0,9705
1,0 µM	<0,0001	0,3599	1,0 µM	0,9658	0,7429
1,5 µM	<0,0001	0,8869	1,5 µM	0,7153	0,2601
SPINK7					
0,5 µM	0,8542	0,4902	0,5 µM	0,2955	0,8998
1,0 µM	0,5537	0,0963	1,0 µM	0,8820	0,8296
1,5 µM	0,9223	0,2684	1,5 µM	0,9838	0,9936
KRT3					
0,5 µM	0,1603	0,9888	0,5 µM	0,0694	0,5986
1,0 µM	0,0277	0,8566	1,0 µM	0,4287	0,8811
1,5 µM	0,8364	0,9912	1,5 µM	0,9514	0,7975
KRT12					
0,5 µM	0,0037	0,0115	0,5 µM	0,5669	0,4486
1,0 µM	0,0058	0,0005	1,0 µM	0,2825	0,9417
1,5 µM	0,0001	<0,0001	1,5 µM	0,0679	0,5480
KRT19					
0,5 µM	0,0066	0,0832	0,5 µM	0,7576	>0,9999
1,0 µM	0,0132	0,7120	1,0 µM	0,9980	0,9828
1,5 µM	0,0466	0,9966	1,5 µM	0,2151	0,9673
CRABP2					
0,5 µM	0,8176	0,0384	0,5 µM	0,1311	0,0018

1,0 µM	0,0002	0,1503	1,0 µM	0,1049	0,0005
1,5 µM	0,3465	0,5078	1,5 µM	0,0160	<0,0001
ELOVL7					
0,5 µM	0,9465	0,5956	0,5 µM	0,9195	0,8161
1,0 µM	0,1324	0,0026	1,0 µM	0,1317	0,5834
1,5 µM	0,0016	<0,0001	1,5 µM	0,0063	0,5039
FABP5					
0,5 µM	0,8871	0,5218	0,5 µM	0,6270	0,7196
1,0 µM	<0,0001	0,3406	1,0 µM	0,5148	0,9973
1,5 µM	<0,0001	0,1862	1,5 µM	0,4659	0,9965
PPARG					
0,5 µM	0,2516	0,7384	0,5 µM	>0,9999	>0,9999
1,0 µM	0,0099	0,0652	1,0 µM	0,4858	0,5072
1,5 µM	<0,0001	0,0022	1,5 µM	0,0574	0,4795
RBP1					
0,5 µM	0,5188	0,6705	0,5 µM	0,5188	0,1613
1,0 µM	0,8027	0,9785	1,0 µM	0,8027	0,7415
1,5 µM	0,3040	0,7772	1,5 µM	0,3040	0,4058
RDH10					
0,5 µM	0,9439	0,8528	0,5 µM	0,9933	0,7543
1,0 µM	0,2587	0,1260	1,0 µM	0,7017	0,9267
1,5 µM	0,0086	0,0030	1,5 µM	0,1130	0,4899
STRA6					
0,5 µM	0,0063	0,0003	0,5 µM	0,0170	0,4097
1,0 µM	0,0236	0,0008	1,0 µM	0,0002	0,9841
1,5 µM	0,1580	0,0049	1,5 µM	<0,0001	0,9125

Tabelle 13: p-Werte der 24 h und 48 h Behandlung der LEZ mit UVI 3003 und AGN 193109.

5 Diskussion

Mithilfe der durchgeführten Experimente konnten weitere Anhaltspunkte dafür gefunden werden, dass ausgewählte Gene, welche auch bei Aniridie dereguliert sind, unter anderem über RAR- oder RXR-Rezeptoren gesteuert werden können. Dies wird auch von vorherigen Untersuchungen unterstützt, bei denen dieselben Gene durch Retinoide in umgekehrte Richtung reguliert wurden. Im Folgenden wird erläutert, dass diese Beobachtung für einige, jedoch nicht für alle Gene, der Fall war.

Die Strukturproteine DSG1, KRT3, KRT12 und KRT19 zeigten eine vernehmbare Hoch- oder Herunterregulation durch die Behandlung mit dem Retinoidrezeptorantagonisten AGN 193109, einem potenten Pan-Retinsäure-Rezeptor (RAR)-Antagonisten. Die Differenzierungsmarker ADH7, ADLHA1A und ABCG2, die Transkripte, die den Fettstoffwechsel beeinflussen ELOVL7, FABP5 und PPARG und die weiteren Gene CRABP2, RDH10 und SPINK7 ergaben sowohl bei der Behandlung mit UVI 3003, einem hochaffinen Pan-Retinsäure-Rezeptor (RAR)-Antagonist, als auch mit AGN 193109 eine Hoch-bzw. Herunterregulation. Bei dem Stammzell- und Differenzierungsmarker PAX6 ergab sich unter keiner der beiden Retinoidrezeptorantagonisten eine signifikante Regulationsänderung. Die Auswirkungen auf die untersuchten Transkripte sind systematisch weiter unten aufgeführt.

5.1 Unterschiedliche Antworten der Genexpression unter Behandlung mit RAR-/ RXR-Rezeptorantagonisten

Die Behandlung mit AGN und UVI zeigte bei keiner der in den Folgeversuchen eingesetzten Konzentrationen von AGN und UVI eine Verminderung der Variabilität im XTT Assay. Nach 48 h Behandlung waren weniger Ergebnisse signifikant, obwohl der Trend der Regulation oftmals gleich war. Dies könnte daran gelegen haben, dass in einigen Reaktionen nach 48 h die Transkriptmenge der Referenzgene der mit AGN und UVI behandelten Proben in einigen Fällen fluktuierte. Es war jedoch kein systematischer Einfluss auf die Expression der Referenzgene feststellbar. Dies stellt aber einen kritischen Punkt für die Interpretation der Daten dar. Generell sollte eine Behandlung keinerlei Einfluss auf die Referenzgene zeigen. Dies führte zu einer höheren Varianz der Expressionswerte bei 48 h.

5.2 Interpretation der Genexpressionsergebnisse der RAR-abhängigen Transkripte

5.2.1 DSG1

Die Behandlung mit einem RAR-Rezeptorantagonisten (AGN 193109) führte zu einer Erhöhung der mRNA-Expression von DSG1. Keine Expressionserhöhung dieses Gens erfolgte durch die Zugabe von UVI 3003, der zu einer Hemmung des RXR-Retinoid-Rezeptors führt. Da zuvor bei Retinolgabe und auch bei Retinsäuregabe die Expression von DSG1 gehemmt werden konnte, kann man also annehmen,

dass durch die Blockierung der RAR-Retinsäurerezeptoren die Differenzierung der LEZ gefördert wird und DSG1 durchaus retinolabhängig gesteuert wird. Dies deckt sich auch mit Studien, die eine Abhängigkeit der DSG1 Expression von Retinol bereits nahelegen konnten [22].

DSG1 ist ein kornealer Differenzierungsmarker und ist bei Aniridiepatienten sowohl in der Konjunktiva als auch in den LEZ herunterreguliert. DSG1 ist ebenfalls bei Mäusen mit PAX6 Haploinsuffizienz herunterreguliert [24]. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass es nach einem PAX6-Knockdown zu einer signifikanten Reduktion von DSG1 kommt [27].

Diese Arbeit liefert weitere Evidenz für unsere Hypothese zur PAX6/ retinolabhängigen Genregulationen von DSG1 in LEZ. Wie bereits erwähnt ist DSG1 bei Aniridie herunterreguliert. In vitro wurde die DSG1 Expression bei Retinolüberschuss herunterreguliert. Durch die Zugabe von Retinoidrezeptorantagonisten stieg im Einklang zur Hypothese die Expression an. Somit können die in Aniridie beobachteten Transkriptänderungen indirekt über Störung des Retinoidstoffwechsels mit PAX6 zusammenhängen.

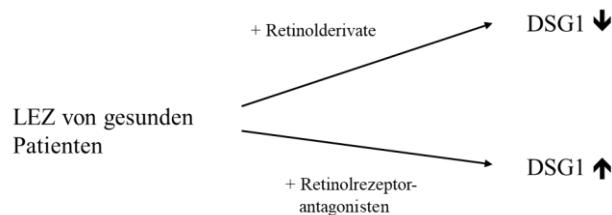


Abbildung 19: Signifikante Genexpression von DSG1 unter der Behandlung mit Retinolderivaten [25] und Retinoidrezeptorantagonisten

5.2.2 KRT3, KRT12, KRT19

Das Vitamin A und die Retinoide (Vitamin A-Metabolite) beeinflussen unter anderem die Differenzierung der menschlichen Haut als Marker differenzierten Gewebes. Die Keratine befinden sich in der Epidermis der Haut [49]. Die Keratinproteine kommen in allen Epithelgeweben (z.B. Hornhautepithel, Haut usw.) vor und sind somit sehr wichtige strukturelle Zwischenfilamente [34].

KRT3 und KRT12

Durch die Behandlung mit RA zeigte sich bei KRT3 (Herunterregulation) und KRT12 (Hochregulation) eine genau gegensätzliche Regulation. Auch nach der Behandlung mit Retinoidrezeptorantagonisten ist die Regulation von KRT3 (Hochregulation) und KRT12 (Herunterregulation) gegensätzlich. Die hornhautspezifischen Keratine werden aufgrund der unterschiedlichen Reaktion auf Retinolderivate und Retinoidrezeptorantagonisten durch unterschiedliche Mechanismen reguliert.

Aus bereits publizierten Daten wissen wir, dass die Retinoide die Genexpression der Keratine auf komplexe Art beeinflussen, aber es ist auch bekannt, dass die RAR-/ RXR-Rezeptoren nicht an der

Regulation aller Keratine beteiligt sind, da sich die Retinoid-Response-Elemente (RAREs) nicht in den Keratin-Promotorregionen aller Keratine befinden [49]. Kim et al haben in einer Studie gezeigt, dass unter der Behandlung der Transkripte mit 10^{-8} bzw. 10^{-6} M RA die Genexpression von KRT12 (10^{-8} M RA) erhöht und von KRT3 (10^{-6} M RA) herunterreguliert ist [23].

Da nur unter der Behandlung mit AGN signifikante Änderungen festgestellt werden konnten, ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Gene über RARs reguliert werden. Auch hierbei wurden die klareren Ergebnisse im 24-stündigen Zeitraum erzielt. Nach 48 h waren die Ergebnisse wegen der stärker werdenden Schwankungen der Expression zwischen den einzelnen biologischen Replikaten nicht mehr signifikant, folgten aber dem Trend der 24 h-Werte.

Zusammenfassend lässt sich aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit erarbeiteten Ergebnisse sagen, dass die mRNA-Expression von KRT3 und KRT12 unter Behandlung von Retinolderivaten und Pan-Retinsäure-Rezeptor (RAR)-Antagonisten genau gegensätzlich reguliert sein könnten. Die Expression der beiden korneaspezifischen Keratine KRT3 und KRT12 wird höchstwahrscheinlich über die Retinoide beeinflusst.

Die Arbeit unterstützt vorherige Befunde, dass KRT3 und KRT12 zwar beide Differenzierungsmarker sind, jedoch unterschiedlich auf die Behandlung mit Retinolderivaten (KRT3: Herunterregulation; KRT12: Hochregulation) und Retinoidrezeptorantagonisten (KRT3: Hochregulation; KRT12: Herunterregulation) reagieren. Daraus kann abgeleitet werden, dass beide zwar über die Retinoide reguliert werden, jedoch aber über unterschiedliche Mechanismen und eventuell auch über verschiedene Konzentrationsbereiche [4].

Sowohl DSG1 als auch KRT12 gehören zu den kornealen Differenzierungsmarkern. Beide sind bei Aniridie herunterreguliert. Jedoch weisen sie in der Behandlung mit Retinolderivaten (KRT12: Hochregulation; DSG1: Herunterregulation) und Retinoidrezeptorantagonisten (KRT12: Herunterregulation; DSG1: Hochregulation) keine gleichen Regulationen, sondern gegenteilige Effekte auf. Aus den in der Arbeit erzielten Ergebnissen lässt sich somit ableiten, dass beide bei Aniridie herunterregulierten Differenzierungsmarker vermutlich unterschiedliche Regulationsmechanismen besitzen [26]. Der vollständige Verlust von der KRT12-Expression in Patienten lässt sich durch die Daten nicht erklären. Es handelt sich hierbei evtl. um langfristige Veränderungen auf epigenetischer Ebene.

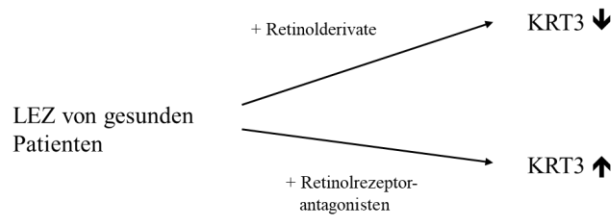


Abbildung 20: Signifikante Genexpression von KRT3 unter der Behandlung mit Retinolderivaten [25] und Retinoidrezeptorantagonisten

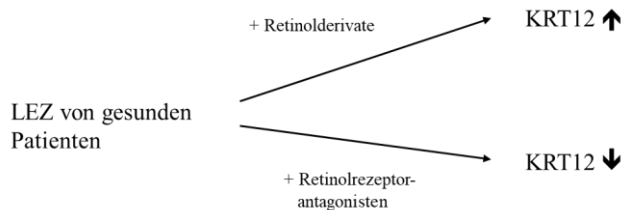


Abbildung 21: Signifikante Genexpression von KRT12 unter der Behandlung mit Retinolderivaten [25] und Retinoidrezeptorantagonisten

KRT19

KRT19 wird sowohl in Hornhaut- als auch in Limbusepithelzellen exprimiert. Es ist ein konjunktivaspezifischer Marker [37].

In vorherigen Versuchen kam es durch die Behandlung mit Retinolderivaten (Retinol und Retinsäure) zu einer merklichen Hochregulation des Markers [9]. Bei der Behandlung mit Retinoidrezeptorantagonisten zeigte sich in dieser Studie die gegenteilige Regulation, eine signifikante Herunterregulation bei der 24-stündigen Behandlung mit AGN. Bei Aniridie ist die Expression von KRT19 nicht verändert [27,28]. Die RA-Konzentration hat starken Einfluss auf das Expressionsniveau der Keratine. Bei hohen RA-Konzentrationen ist beispielsweise die Expression von KRT19 erhöht. Laut Doran et. al. sind diese Ergebnisse mit der Veränderung der mRNA- und Proteinspiegel und der Geschwindigkeit der Gentranskription verbunden [9]. Aufgrund einer Studie wurde gezeigt, dass die Erhöhung der KRT19- mRNA durch RA nicht durch die erhöhte mRNA-Transkription entsteht, sondern auf RA-vermittelten Mechanismen beruht, die die KRT19 Transkripte stabilisieren [9]. Die gegenteilige Regulationsantwort bezüglich der Behandlung mit Retinolderivaten und Retinoidrezeptorantagonisten ist ein Hinweis darauf, dass das Gen KRT19 tatsächlich mit hoher Wahrscheinlichkeit über RARs reguliert wird. Die Expression von KRT19 folgt nach der Behandlung demselben Trend wie KRT12 und ist gegenteilig zur Expressionsänderung von KRT3.

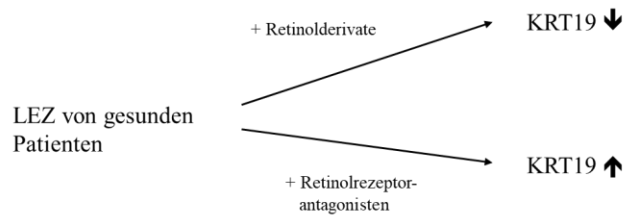


Abbildung 22: Signifikante Genexpression von *KRT19* unter der Behandlung mit Retinolderivaten [25] und Retinoidrezeptorantagonisten

5.3 Interpretation der Genexpressionsergebnisse der RXR- und RAR-abhängigen Marker

5.3.1 ADH7 und ALDH1A1

ADH7

Die Retinoldehydrogenase ADH7 katalysiert die reversible Oxidation von Retinol zu Retinaldehyd. Diese beteiligt sich somit entscheidend am Retinolstoffwechsel [41].

Durch die Behandlung mit Retinoidrezeptorantagonisten (AGN und UVI) wurde die Genexpression von ADH7 hochreguliert. Diese Hochregulation war sowohl bei AGN als auch bei UVI signifikant. Im Gegensatz dazu ergab sich unter der Gabe von Retinolderivaten die gegenteilige Regulation, eine Herunterregulation. Diese gegenteilige Reaktionskette war anhand der in dieser Arbeit aufgestellten Arbeitshypothese auch zu erwarten. Bei Aniridie ist die Expression von ADH7 sowohl in den LEZ als auch in der der Konjunktiva erniedrigt [27]. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass sowohl die RAR- als auch die RXR-Rezeptoren an der ADH7 Regulation beteiligt sein können. Die Regulation von ADH7 kann keiner spezifischen Rezeptorgruppe zugeordnet werden. Die Regulation durch Retinoide ist hier weniger eindeutig, als bei anderen untersuchten Transkripten (z.B. DSG1, KRT3, KRT12, KRT19). Dies konnte damit erklärt werden, dass die RARs und RXRs nicht nur Homodimere mit sich selbst, sondern auch Heterodimere untereinander bilden können. Somit sind die erzielten Ergebnisse mit reinen RAR- bzw. RXR- Antagonisten nicht immer eindeutig interpretierbar.

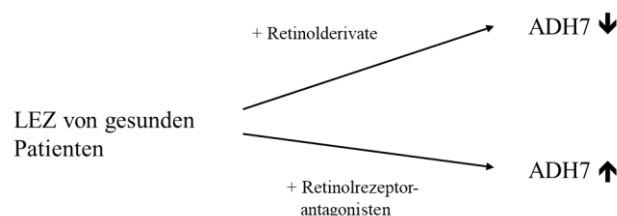


Abbildung 23: Signifikante Genexpression von *ADH7* unter der Behandlung mit Retinolderivaten [25] und Retinoidrezeptorantagonisten

ALDH1A1

Retinaldehyd wird in einer weiteren irreversiblen Reaktion weiter zu RA oxidiert [51].

Die Retinoidrezeptorantagonisten des RAR- und RXR-Signalweges führten zu keinerlei Regulationsänderungen. Durch die Behandlung mit Retinolderivaten ergab sich eine Herunterregulation. Bei Aniridie ist ALDH1A1 nur in den LEZ herunterreguliert [27]. Vermutlich wird dieses Gen über andere Mechanismen als über RAR- oder RXR-Signalwege gesteuert.

Zusammenhänge zwischen den einzelnen Markern

Eine Studie zeigte, dass ADH7 und ALDH1A1 bei Herabsetzung von PAX6 in einem siRNA-basierten Aniridie-Zellmodell signifikant herunterreguliert waren [27]. Der mRNA-Spiegel von ADH7 war in den Limbusepithelzellen von Aniridiepatienten ebenfalls reduziert [27]. Des Weiteren wurde in dieser Studie gezeigt, dass ABCG2 negativ mit ADH7 korreliert und ebenfalls die Hochregulierung von ABCG2 nach einem PAX6-Knockdown mit einer Herunterregulierung von ADH7 verbunden ist [27]. Aus den beschriebenen Oxidationsschritten bei der RA-Synthese könnte man spekulieren, dass die beobachteten Expressionsänderungen zu einem mangelhaften RA-Metabolismus führen. Dies scheint aber nicht direkt der Fall zu sein. Die in vitro Daten deuten auf ein Überangebot an RA oder eine Veränderung der RAR/ RXR-Signalkaskaden hin. Dies lässt sich allerdings aus den Expressionswerten von Patienten allein nicht abschließend klären.

5.3.2 ABCG2

Die Regulation der ABCG2-Transkription lässt sich nicht eindeutig einem Antagonisten zuordnen, sodass nicht klar wird, durch welche Rezeptoren ABCG2 reguliert wird. Es kommt sowohl unter AGN als auch unter UVI innerhalb von 24 h zu einer Herunterregulation von ABCG2. Diese ist nur bei UVI 24 h signifikant. Nach 48 h kommt es durch beide Retinoidrezeptorantagonisten zur Umkehrung der Reaktion, zur Hochregulation. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit kann nicht eindeutig definiert werden, ob ABCG2 durch Retinoide oder direkt über PAX6 reguliert wird. Es ergibt sich sowohl bei UVI, als auch unter AGN-Behandlung eine Veränderung der Genexpression. Da RARs und RXRs untereinander Heterodimere bilden können, sind die Ergebnisse nicht immer eindeutig interpretierbar und die Regulation von ABCG2 kann keiner spezifischen Rezeptorgruppe zugeordnet werden.

Eine Studie belegt, dass ABCG2 durch die Aktivierung eines Nuklearhormonrezeptors PPAR γ exprimiert wird [47]. Es wurde eine Enhancer Region des menschlichen ABCG2-Gens identifiziert, an die das PPAR γ -RXR-Heterodimer bindet und die Transkription von ABCG2 direkt reguliert [47]. Mit diesem Mechanismus kann eine Hochregulierung der ABCG2-Expression durch die exogene oder endogene Aktivierung von PPAR γ erreicht werden. ABCG2 kann durch ein PPAR γ - und RXR-abhängiges Enhancer Element im ABCG2 Gen aktiviert werden [47]. Durch den RXR-Antagonisten kommt es, wie diese Arbeit zeigt, zu einer signifikanten Herunterregulation von ABCG2.

5.3.3 ELOVL7, FABP5, PPARG, CRABP2

Die enzymatische Aktivität von ADH7 erstreckt sich sowohl auf Retinoide als auch auf mittelkettige Fettsäuren. Daher wurden im Rahmen einer Studie die deregulierten Transkripte im Fettstoffwechsel überprüft. Teilweise sind diese auch mit der RA-Signalisierung verbunden [32,48]. FABP5 und PPARG können beide die RA- und die Fettsäuresignalisierung beeinflussen. Der PPARG-Ligand fördert die Expression von Genen, die an der Präsentation von Lipidantigenen und am Lipidstoffwechsel maßgeblich beteiligt sind. ELOVL7 wirkt ebenfalls an der Regulation des Fettstoffwechsels mit [32,48].

ELOVL7

ELOVL7 ist an der Herstellung von langkettigen gesättigten Fettsäuren beteiligt. Die Expression dieser Elongase wird durch Transkriptionsfaktoren gesteuert [36,43]. Bei der Behandlung mit Retinolderivaten und Retinoidrezeptorantagonisten war die mRNA-Expression von ELOVL7 hochreguliert. Bei Aniridiepatienten ist ELOVL7 sowohl in den LEZ, als auch in der Konjunktiva ebenfalls erhöht [27,28].

Aufgrund der durchgeführten Experimente ist anzunehmen, dass ELOVL7 RAR- und RXR-abhängig reguliert werden kann. Es ergibt sich sowohl für AGN als auch für UVI eine Expressionsänderung. Somit besteht die Möglichkeit, dass dieses Gen über Heterodimere reguliert wird. Es kann daher sein, dass die im Patienten beobachteten Veränderungen von ELOVL7 durch Veränderungen im Retinoidstoffwechsel oder Retinoidsignalkaskaden hervorgerufen werden.

FABP5

Das intrazelluläre lipidbindende Protein FABP5 ist an der Aktivierung von PPAR β/δ beteiligt. Es hat nur eine geringe Affinität zu RA und liefert diese somit an PPAR β/δ [52]. Durch die Behandlung mit Retinoidrezeptorantagonisten AGN und UVI konnte man eine Hochregulation von FABP5 erkennen. Die Retinolderivate führten keinerlei Expressionsänderungen von FABP5 herbei. Bei Aniridie ist die FABP5-Expression sowohl in den LEZ als auch in der Konjunktiva erniedrigt [27,28]. Die Reaktionsänderung bei beiden Retinoidrezeptorantagonisten gibt Hinweise darauf, dass die Expression von FABP5 sowohl RAR- als auch RXR-abhängig reguliert wird. Hierbei besteht die Möglichkeit, dass sich Heterodimere aus RXR und RARs bilden und die Ergebnisse deshalb nicht eindeutig interpretierbar sind. Allerdings könnten auch unspezifische Effekte zugrunde liegen, da die Antagonisten prinzipiell weitreichend den Zellstoffwechsel beeinflussen könnten.

PPARG

Bei der Behandlung der LEZ mit dem Retinsäure-Rezeptorantagonisten AGN ließ sich eine signifikante Hochregulation erkennen. Der Retinoid-X-Rezeptorantagonist UVI bewirkte einen leichten Trend zur Herunterregulation, die nicht signifikant war. Bei Aniridie ist PPARG in den LEZ und der Konjunktiva hochreguliert [27,28]. Durch die RA-Behandlung konnte kein Einfluss auf eine potenzielle Regulation abgeleitet werden. Aus den gesammelten Erkenntnissen lässt sich schließen, dass PPARG ein RAR- und

RXR-abhängiger Marker ist und unterschiedlich auf die beiden Rezeptoren anspricht. Zhu et al. haben in einer Studie herausgefunden, dass UVI bei einer Konzentration von 1 μM den PPARG-Rezeptor (NR1C3) aktiviert [60]. Wie oben bereits gezeigt, könnte man daraus schließen, dass eine solche Aktivierung zur einer Herunterregulation der mRNA-Expression von PPARG führt [60].

CRABP2

Durch die Behandlung mit den Retinoid- oder Retinoid-X-Rezeptorantagonisten AGN und UVI kam es zu einer vermehrten mRNA-Expression des Gens CRABP2. Durch die Zugabe von Retinolderivaten ergab sich jedoch ein gegenteiliger Effekt, eine Herunterregulation. Bei Aniridiepatienten ist die CRABP2 mRNA-Expression in den LEZ erniedrigt und in der Konjunktiva erhöht [27,28]. Das beschriebene Expressionsmuster ist dem von KRT3 und DSG1 in den LEZ von Aniridiepatienten und im siRNA-basierten Aniridiezellmodell ähnlich [27,28].

Da ADH7, FABP5 und PPARG Retinoide und Fettsäuren binden können, kann es bei einer gestörten Verbindung dieser zu einer gegenseitigen Beeinflussung kommen [28]. Die Regulation von ELOVL7, FABP5 und PPARG, in Abhängigkeit von RA und Retinoidrezeptorantagonisten, erfolgt wahrscheinlich durch uns noch unbekannte Mechanismen. Diese Transkriptionsänderungen können nicht auf einfache Änderungen des RA-Metabolismus zurückgeführt werden, sondern hängen mit komplexeren Änderungen in den Zellsignalwegen zusammen.

5.3.4 RDH10

RDH10 ist ein entscheidender Bestandteil der Retinsäuresynthese. Es ist an der Oxidation von Retinol zu Retinal beteiligt und bildet somit den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Synthese [26,39].

Unter der Behandlung von RDH10 mit Retinoidrezeptorantagonisten erfolgte eine Hochregulation der RDH10 mRNA. Anhand der aufgestellten Arbeitshypothese würde man bei der Zugabe von Retinolderivaten eine gegenteilige Reaktion erwarten. Jedoch wird RDH10 auch unter der Retinol- und RA-Behandlung vermehrt exprimiert. Bei Aniridie ist RDH10 in der Konjunktiva hochreguliert [28], in den LEZ von Aniridiepatienten ergibt sich keine Änderung der Genexpression [27]. Aus den Reaktionen wird ersichtlich, dass es sich bei RDH10 um ein sowohl RAR- als auch RXR-abhängiges Gen handeln könnte. Es kommt bei der Behandlung mit AGN und bei UVI in beiden Zeiträumen zu einem Trend in der Hochregulation. Diese ist aber nur bei AGN signifikant, nicht bei UVI. Daraus könnte man spekulieren, dass die Regulation mehr durch AGN als durch UVI beeinflusst wird und daher eher RAR-abhängig geschieht. Allerdings gibt es für die nicht gegenteilige Regulation noch keine genauen Erklärungen, da die Ergebnisse sich keiner derzeit sinnvollen Arbeitshypothese zuordnen lassen.

5.3.5 SPINK7

Durch die Gabe von Retinoidrezeptorantagonisten ergab sich sowohl für AGN als auch für UVI in beiden gewählten Zeiträumen (24 h und 48 h) ein nicht signifikanter Trend zur Hochregulation. Bei der

Behandlung mit Retinolderivaten (Retinol und Retinsäure) stellte sich in vorherigen Versuchen eine Herunterregulation ein [25].

Der Serinprotease-Inhibitor SPINK7 könnte laut einer Studie PAX6-abhängig reguliert sein, da sie bei Aniridiepatienten in LEZ herunterreguliert ist [27].

Da die Ergebnisse für SPINK7 nicht signifikant sind, bleibt weiterhin unklar, wie SPINK7 durch die Behandlung mit Retinol und RA beeinflusst wird. Die Regulation von SPINK7 durch RAR ließ sich nicht eindeutig nachweisen. Ein Zusammenhang einer Beeinflussung durch Retinoide kann aber auch nicht ausgeschlossen werden.

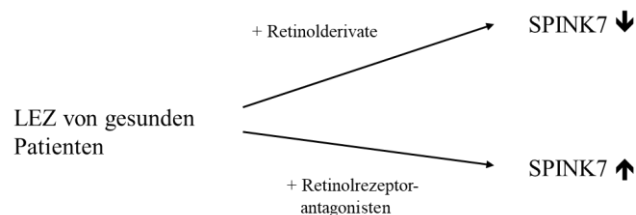


Abbildung 24: Signifikante Genexpression von SPINK7 unter der Behandlung mit Retinolderivaten [25] und Retinoidrezeptorantagonisten

5.4 Interpretation der Genexpressionsergebnisse der RXR- und RAR-unabhängigen Marker

5.4.1 PAX6

PAX6 spielt eine entscheidende Rolle bei der Augenentwicklung und ist an einer Reihe von Augenpathophysiologien beteiligt [27,31]. Auf mRNA-Ebene war kein signifikanter Einfluss von AGN- oder UVI-Behandlung auf die PAX6-mRNA-Expression zu erkennen.

Durch RA wurde die PAX6-mRNA signifikant herunterreguliert. Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich schließen, dass PAX6 nicht retinolabhängig ist, sondern auf eine andere Art und Weise reguliert wird. Zukünftig sollte der Einfluss von AGN und UVI auf Proteinebene untersucht werden, um eine eventuelle Beeinflussung gänzlich ausschließen zu können.

5.5 Schlussfolgerung

Die Arbeitshypothese, dass bei der Behandlung von LEZ mit Pan-Rezeptorantagonisten gegen RAR, sowie RXR ersichtlich werden könnte, ob die gemessenen Transkriptänderungen tatsächlich durch RARs, oder RXRs vermittelt werden, kann aufgrund der erzielten Ergebnisse nicht vollständig bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass DSG1 und die Keratine auch über den veränderten Retinolstoffwechsel, statt direkt über PAX6, beeinflusst werden können. Es wäre folglich also möglich, dass PAX6 nur indirekt für die Veränderungen auf Zellebene verantwortlich ist.

Die Interpretation der Ergebnisse gestaltet sich teilweise schwierig, da die behandelten LEZ eine unterschiedliche Regulation als Antwort auf die UVI- oder AGN-Behandlung aufweisen. Es besteht auch die Möglichkeit, dass sich die Hoch- bzw. Herunterregulation der einzelnen Gene nur auf die Signalwege von UVI oder AGN beschränkt, da es sich bei manchen Transkripten um RAR- oder RXR-abhängige Marker handelt. Nicht bei allen Genen ist solch eine eindeutige Einteilung nach RAR- und RXR-Abhängigkeit bzw. der Zuordnung zu einer spezifischen Rezeptorgruppe möglich, da auch Transkripte existieren, die durch beide Signalwege reguliert werden könnten (z.B. ADH7, SPINK7, usw.). Die RARs und RXRs sind in der Lage untereinander Heterodimere zu bilden, wodurch die Interpretation der Ergebnisse nicht immer eindeutig möglich ist. Es konnte ebenfalls festgestellt werden, dass es aus den untersuchten Transkripten keines gibt, was ausschließlich RXR-abhängig ist. RXR bildet mit RAR Heterodimere, allerdings keine Homodimere mit sich selbst.

Transkript	Behandlung mit Retinol und Retinsäure [25]	Behandlung mit Retinoidrezeptorantagonisten (RXR-/RAR-Antagonisten)	Aniridie (PAX6) LEZ/ Konjunktiva [25]
DSG1	↓	↑	↓
KRT3	↓	↑	↓
KRT12	↑	↓	↓
KRT19	↑	↓	
ADH7	↓	↑	↓
SPINK7	↓	↑	↓
CRABP2	↓	↑	↑↓

Tabelle 14: Zusammenfassung der signifikanten Genexpressionen unter der Behandlung mit Retinolderivaten und Retinoidrezeptorantagonisten

Grenzen und Limitationen der Experimente und Methoden

Im Nachhinein wurden einige Grenzen bzw. Limitationen der durchgeführten Experimente sichtbar. Wie oben bereits erwähnt, kam es bei der 48-stündigen Behandlung zu einer hohen Varianz. Toxische Effekte können dabei ausgeschlossen werden, da die Toxizität im Rahmen der durchgeführten Experimente untersucht wurde.

Für alle Experimente wurden GUSB und TBP als Referenzgene eingesetzt. Diese sollten bei den Behandlungen keine Expressionsänderungen zeigen, da sie zur Normalisierung jedes Zielgens

verwendet wurden. Allerdings ergaben sich bei der 48-stündigen Behandlung sowohl bei AGN als auch bei UVI unvorhergesehene Schwankungen in der Expression von GUSB und TBP. Somit finden diese Ergebnisse nur eine eingeschränkte Verwendung, da die Referenzgene durch die Behandlung nicht beeinflusst werden sollten. Die Varianz in der Expression von GUSB und TBP führte zusätzlich zu einer breiteren Streuung aller Ergebnisse, sodass diese aufgrund der hohen Varianzen kaum noch signifikante Änderungen zeigten. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Behandlung mit UVI und AGN mit zwei unterschiedlichen Inkubationszeiträumen durchgeführt. Dafür wurde noch ein nachträglich kürzerer Beobachtungszeitraum (24 h) durchgeführt. Dies ermöglichte eine zusätzliche Datengrundlage zur Interpretation der Ergebnisse. Bei der 48 h Inkubation war die Interpretation eingeschränkt, da die zufällige Streuung der Expressionswerte die Effekte der Antagonisten eventuell überlagerte und somit weniger signifikante Ergebnisse erzielt wurden, obwohl der Trend der Regulation meist erhalten blieb.

Eine weitere Limitation ergab sich in der Anzahl der getesteten Konzentrationen und Zeiträume. Es wäre wünschenswert, noch mehr Zeitspannen und Konzentrationen in engeren Abständen zu testen. Somit könnten genauere Zusammenhänge und Abhängigkeiten erkannt werden und dadurch zu einer besseren und genaueren Interpretation führen.

Die Experimente wurden mit Zellkulturen von Primärzellen (LEZ) aus Hornhautspenden der LIONS Hornhautbank durchgeführt. Die Anzahl der LEZ stellte hierbei einen weiteren Limitationspunkt dar.

Ausblick auf zukünftige Projekte/ offene Fragestellungen

Die durchgeführten Experimente und die daraus resultierenden Ergebnisse haben weitere Fragestellungen für zukünftige Projekte und auch Verbesserungspotenzial offengelegt. Zum einem könnte man weiter erforschen, ob die Retinoidrezeptorantagonisten AGN 193109 und UVI 3003 teils die Effekte der siRNA-Behandlung von PAX6 aufheben können. Desweiteren könnte man zusätzlich zu den Retinoidrezeptorantagonisten weitere Verfahren testen, um die Aktivität von RAR und RXR zu untersuchen und diese Ergebnisse miteinander vergleichen. Hierbei wären, sofern sich diese in Primärzellen einbringen lassen, Reporter Assays geeignet.

Aufgrund der oben genannten limitierenden Faktoren wurden nur zwei Inkubationszeiträume und auch nur zwei unterschiedliche Konzentrationen der Retinoidrezeptorantagonisten untersucht. Es wäre allerdings wünschenswert, dies noch weiter auszubauen. Somit könnte man testen, welche Konzentrationen und Inkubationszeiträume schwache bzw. starke Effekte auf die Genexpression der Transkripte von LEZ bewirken. Des Weiteren wäre es auch möglich mit den daraus erzeugten Proben Western Blot Experimente durchzuführen, um nicht nur die Genexpression, sondern auch die Proteinexpression der Transkripte zu vergleichen. Wenn man mehr Zeitintervalle und Western Blot Experimente von PAX6 durchführt, könnte das eventuell auch sicherstellen, dass der Einfluss der Behandlung auf das Proteinlevel von PAX6 nicht gegeben ist, wie es sich in ersten Experimenten abzuzeichnen schien.

In Zukunft müsste auch genauer untersucht werden, ob die Behandlung mit RAR-Rezeptorantagonisten nicht einen Einfluss auf die PAX6 Protein Dosis oder Lokalisation hat. Allerdings wurde in der Arbeit auch durch die oben genannten Ergebnisse gezeigt, dass diese signifikante Hochregulation hauptsächlich nur für die 24-stündige Behandlung mit AGN anzunehmen ist. Nach 48 h Inkubation waren die Werte tendenziell hochreguliert, allerdings nicht mehr signifikant. Die Regulation könnte folglich auch in einem kurzen Zeitfenster erfolgen und könnte dichteabhängig und nicht mehr in allen Kulturen beobachtbar sein.

6 Literaturverzeichnis

1. Amengual J, Zhang N, Kemerer M, Maeda T, Palczewski K, Von Lintig J (2014) STRA6 is critical for cellular vitamin A uptake and homeostasis. *Hum Mol Genet* 23:5402–5417
2. Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J MG (2003) *Kornea (Hornhaut)*. Georg Thieme Verlag:100-102
3. Aumüller G, Aust G, Conrad A, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spanel-Borowski K, Wennemuth G, Wolff W, Wurzinger LJ, Zilch H-G (2020) *Duale Reihe Anatomie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart:100-102
4. Chaloin-Dufau C, Dhouailly D, Sun TT (1990) Appearance of the keratin pair K3/K12 during embryonic and adult corneal epithelial differentiation in the chick and in the rabbit. *Cell Differ Dev* 32:97–108
5. Chen Y, Clarke OB, Kim J, Stowe S, Kim YK, Assur Z, Cavalier M, Godoy-Ruiz R, Von Alpen DC, Manzini C, Blaner WS, Frank J, Quadro L, Weber DJ, Shapiro L, Hendrickson WA, Mancina F (2016) Structure of the STRA6 receptor for retinol uptake. *Science* (80-) 353:887–900
6. Chesnokov MS, Khesina PA, Shavochkina DA, Kustova IF, Dyakov LM, Morozova O V., Mugue NS, Kudashkin NE, Moroz EA, Patyutko YI, Lazarevich NL (2018) Shift in VEGFA isoform balance towards more angiogenic variants is associated with tumor stage and differentiation of human hepatocellular carcinoma. *PeerJ* 2018:1–17
7. Cidado J, Wong HY, Marc Rosen D, Cimino-Mathews A, Garay JP, Fessler AG, Rasheed ZA, Hicks J, Cochran RL, Croessmann S, Zabransky DJ, Mohseni M, Beaver JA, Chu D, Cravero K, Christenson ES, Medford A, Mattox A, De Marzo AM, Argani P, Chawla A, Hurley PJ, Lauring J, Park BH (2016) Ki-67 is required for maintenance of cancer stem cells but not cell proliferation. *Oncotarget* 7:6281–6293
8. Corden LD, Swensson O, Swensson B, Smith FJD, Rochels R, Uitto J, McLean WHI (2000) Molecular genetics of Meesmann’s corneal dystrophy: Ancestral and novel mutations in keratin 12 (K12) and complete sequence of the human KRT12 gene. *Exp Eye Res* 70:41–49
9. Crowe DL (1993) Retinoic acid mediates post-transcriptional regulation of keratin 19 mRNA levels. *J Cell Sci* 106:183–188
10. Cunha DL, Arno G, Corton M, Moosajee M (2019) The spectrum of PAX6 mutations and genotype-phenotype correlations in the eye. *Genes (Basel)* 10:1–22
11. Davis J, Duncan MK, Robison WG, Piatigorsky J (2003) Requirement for Pax6 in corneal morphogenesis: A role in adhesion. *J Cell Sci* 116:2157
12. Duester G (2008) Retinoic Acid Synthesis and Signaling during Early Organogenesis. *Cell* 134:921–931
13. Ebrahimi M, Taghi-Abadi E, Baharvand H (2009) Limbal stem cells in review. *J Ophthalmic Vis Res* 4:40–58
14. Fonseca ESS, Hiromori Y, Kaite Y, Ruivo R, Franco JN, Nakanishi T, Santos MM, Castro LFC (2019) An orthologue of the retinoic acid receptor (RAR) is present in the ecdysozoa phylum priapulida. *Genes (Basel)* 10:1–15
15. Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, De Lera AR, Lotan R, Mangelsdorf DJ, Gronemeyer H (2006) International union of pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacol Rev* 58:760–772

16. Ghaffari H, Petzold LR (2018) Identification of influential proteins in the classical retinoic acid signaling pathway. *Theor Biol Med Model* 15:16
17. Goldstein JT, Berger AC, Shih J, Duke FF, Furst L, Kwiatkowski DJ, Cherniack AD, Meyerson M, Strathdee CA (2017) Genomic activation of PPAR γ reveals a candidate therapeutic axis in bladder cancer. *Cancer Res* 77:6987–6998
18. Jang K, Kim M, Gilbert CA, Simpkins F, Ince TA, Slingerland JM (2017) VEGFA activates an epigenetic pathway upregulating ovarian cancer-initiating cells. *EMBO Mol Med* 9:304–318
19. Johnson A, de Hoog E, Tolentino M, Nasser T, Spencer GE (2019) Pharmacological evidence for the role of RAR in axon guidance and embryonic development of a protostome species. *Genesis* 57:1–14
20. Käsmann-kellner B, Fries FN, Latta L, Seitz B (2019) Aniridie bei PAX6-Syndrom: Eine potenziell zur Erblindung führende Erkrankung Etablierung eines Deutschen Aniridie-Registers. 12–18
21. Käsmann-Kellner B, Seitz B (2014) Kongenitale Aniridie oder PAX6-Syndrom? *Ophthalmologie* 111:1144
22. Kim MY, Lee SE, Chang JY, Kim SC (2011) Retinoid induces the degradation of corneodesmosomes and downregulation of corneodesmosomal cadherins: Implications on the mechanism of retinoid-induced desquamation. *Ann Dermatol* 23:439–447
23. 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
24. Kitazawa K, Hikichi T, Nakamura T, Sotozono C, Kinoshita S, Masui S (2017) PAX6 regulates human corneal epithelium cell identity. *Exp Eye Res* 154:30–38
25. Knebel I, Stachon T, Latta L, Seitz B, Käsmann-Kellner B SN (2019) Einfluss von Retinolderivaten auf Differenzierungsmarker im Kontext der kongenitalen Aniridie. *Kongress der Dtsch Ophthalmol Gesellschaft* 116:136
26. Kurosaka H, Wang Q, Sandell L, Yamashiro T, Trainor PA (2017) Rdh10 loss-of-function and perturbed retinoid signaling underlies the etiology of choanal atresia. *Hum Mol Genet* 26:1268–1279
27. Latta L, Nordström K, Stachon T, Langenbucher 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
28. Latta L, Ludwig N, Krammes L, Stachon T, Fries FNN, Mukwaya A, Szentmáry N, Seitz B, Wowra B, Kahraman M, Keller A, Meese E, Lagali N, Käsmann-Kellner B (2020) 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
29. Le Q, Xu J, Deng SX (2018) The diagnosis of limbal stem cell deficiency. *Ocul Surf* 16:58–69
30. Lim HT, Kim DH, Kim H (2017) PAX6 aniridia syndrome: Clinics, genetics, and therapeutics. *Curr Opin Ophthalmol* 28:436–447
31. Mort RL, Bentley AJ, Martin FL, Collinson JM, Douvaras P, Hill RE, Morley SD, Fullwood NJ, West JD (2011) Effects of aberrant Pax6 gene dosage on mouse corneal pathophysiology and corneal epithelial homeostasis. *PLoS One* 6:1–11
32. Napoli JL (2017) Cellular retinoid binding-proteins, CRBP, CRABP, FABP5: Effects on

- retinoid metabolism, function and related diseases. *Pharmacol Ther* 173:19–33
33. 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
 34. Nishida K, Honma Y, Dota A, Kawasaki S, Adachi W, Nakamura T, Quantock AJ, Hosotani H, Yamamoto S, Okada M, Shimomura Y, Kinoshita S (1997) Isolation and chromosomal localization of a cornea-specific human keratin 12 gene and detection of four mutations in meesmann corneal epithelial dystrophy. *Am J Hum Genet* 61:1268–1275
 35. Parekh M, Poli B, Ferrari S, Ponzin D (2015) *Aniridia*. Springer Verlag:1-192
 36. Purdy JG, Shenk T, Rabinowitz JD (2015) Fatty acid elongase 7 catalyzes lipidome remodeling essential for human cytomegalovirus replication. *Cell Rep* 10:1375–1385
 37. 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
 38. Rask L, Geijer C, Bill A, Peterson PA (1980) Vitamin A supply of the cornea. *Exp Eye Res* 31:201–211
 39. Sahu B, Sun W, Perusek L, Parmar V, Le YZ, Griswold MD, Palczewski K, Maeda A (2015) Conditional ablation of retinol dehydrogenase 10 in the retinal pigmented epithelium causes delayed dark adaptation in mice. *J Biol Chem* 290:27239–27247
 40. Samarawickrama C, Chew S, Watson S (2015) Retinoic acid and the ocular surface. *Surv Ophthalmol* 60:183–195
 41. Satre MA, Žgombić-Knight M, Duyster G (1994) The complete structure of human class IV alcohol dehydrogenase (retinol dehydrogenase) determined from the ADH7 gene. *J Biol Chem* 269:15606–15612
 42. Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE (2005) Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res* 81:247–264
 43. Shi H, Wang L, Luo J, Liu J, Looor JJ, Liu H (2019) Fatty acid elongase 7 (Elovl7) plays a role in the synthesis of long-chain unsaturated fatty acids in goat mammary epithelial cells. *Animals* 9:1–10
 44. Sobecki M, Mrouj K, Camasses A, Parisis N, Nicolas E, Llères D, Gerbe F, Prieto S, Krasinska L, David A, Eguren M, Birling MC, Urbach S, Hem S, Déjardin J, Malumbres M, Jay P, Dulic V, Lafontaine DLJ, Feil R, Fisher D (2016) The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin. *Elife* 5:
 45. Soprano DR, Gambone CJ, Sheikh SN, Gabriel JL, Chandraratna RAS, Soprano KJ, Kochhar DM (2001) The synthetic retinoid AGN 193109 but not retinoic acid elevates CYP1A1 levels in mouse embryos and Hepa-1c1c7 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 174:153–159
 46. Sun X, Kaufman PD (2018) Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma* 127:175–186
 47. Szatmári I, Vámosi G, Brazda P, Bálint BL, Benkő S, Széles L, Jeney V, Özvegy-Laczka C, Szántó A, Barta E, Balla J, Sarkadi B, Nagy L (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor γ -regulated ABCG2 expression confers cytoprotection to human dendritic cells. *J Biol Chem* 281:23812–23823
 48. Szatmári I, Pap A, Rühl R, Ma JX, Illarionov PA, Besra GS, Rajnavölgyi E, Dezső B, Nagy L (2006) PPAR γ controls CD1d expression by turning on retinoic acid synthesis in developing human dendritic cells. *J Exp Med* 203:2351–2362
 49. Torma H (2011) Regulation of keratin expression by retinoids. *Dermatoendocrinol* 3:136–140

50. Tseng SCG (1989) Concept and application of limbal stem cells. *Eye* 3:141–157
51. Vassalli G (2019) Aldehyde dehydrogenases: Not just markers, but functional regulators of stem cells. *Stem Cells Int* 2019:1–15
52. Vreeland AC, Levi L, Zhang W, Berry DC, Noy N (2014) Cellular retinoic acid-binding protein 2 inhibits tumor growth by two distinct mechanisms. *J Biol Chem* 289:34065–34073
53. Wafer R, Tandon P, Minchin JEN (2017) The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG) in adipogenesis: Applying knowledge from the fish aquaculture industry to biomedical research. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8:22
54. 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
55. 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
56. Zhao W, Cao L, Ying H, Zhang W, Li D, Zhu X, Xue W, Wu S, Cao M, Fu C, Qi H, Hao Y, Tang YC, Qin J, Zhong TP, Lin X, Yu L, Li X, Li L, Wu D, Pan W (2019) Endothelial CDS2 deficiency causes VEGFA-mediated vascular regression and tumor inhibition. *Cell Res* 29:895–910
57. Zheng L, Yu J, Shi H, Xia L, Xin Q, Zhang Q, Zhao H, Luo J, Jin W, Li D, Zhou J (2015) Quantitative toxicoproteomic analysis of zebrafish embryos exposed to a retinoid X receptor antagonist UVI3003. *J Appl Toxicol* 35:1049–1057
58. Zheng L, Xu T, Li D, Zhou J (2015) A representative retinoid X receptor antagonist UVI3003 induced teratogenesis in zebrafish embryos. *J Appl Toxicol* 35:280–286
59. Zhu J, Shi H, Zhu P, Hu L, Wu L, Yang Y, Rotchell JM (2014) Effects of antagonist of retinoid X receptor (UVI3003) on morphology and gene profile of *Xenopus tropicalis* embryos. *Environ Toxicol Pharmacol* 38:153–162
60. Zhu J, Janesick A, Wu L, Hu L, Tang W, Blumberg B, Shi H (2017) The unexpected teratogenicity of RXR antagonist UVI3003 via activation of PPAR γ in *Xenopus tropicalis*. *Toxicol Appl Pharmacol* 314:91–97
61. Zhu J, Palliyil S, Ran C, Kumar JP (2017) *Drosophila* Pax6 promotes development of the entire eye-antennal disc, thereby ensuring proper adult head formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:5846–5853
62. UVI3003 \geq 98% (HPLC) | Sigma-Aldrich. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sml1950?lang=de®ion=DE>
63. AGN 193109 \geq 98% (HPLC) | AGN193109 | Sigma-Aldrich. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sml2034?lang=de®ion=DE>

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Hersteller	24
Tabelle 2: Verwendete Labormaterialien und Hersteller	25
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien/Kits und Hersteller	26
Tabelle 4: UVI 3003 Angaben vom Hersteller.....	26
Tabelle 5: AGN 193109 Angaben vom Hersteller	26
Tabelle 6: Primer für die qPCR.....	27
Tabelle 7: Verwendete Antikörper	28
Tabelle 8: Behandlung mit UVI 3003	30
Tabelle 9: Behandlung mit AGN 193109.....	31
Tabelle 10: Reaktionsmix für eine Reaktion für die cDNA-Synthese. (Die Variable x steht für eine beliebige Zahl zwischen 0 und 6).....	32
Tabelle 11: Ansatz von Primermix (für ein Well einer 96-Well-Platte)	32
Tabelle 12: Ansatz von Templatemix (für ein Well einer 96-Well-Platte)	33
Tabelle 13: p-Werte der 24 h und 48 h Behandlung der LEZ mit UVI 3003 und AGN 193109.	50
Tabelle 14: Zusammenfassung der signifikanten Genexpressionen unter der Behandlung mit Retinolderivaten und Retinoidrezeptorantagonisten	60

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zytotoxizitäts Assay (XTT) unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI, AGN, RA und Retinol. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001)	35
Abbildung 2: Genexpression des Markers ABCG2 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).....	36
Abbildung 3: Genexpression des Markers Ki67 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).....	37
Abbildung 4: Genexpression des Markers PAX6 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).....	38
Abbildung 5: Genexpression des Markers ADH7 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).....	39
Abbildung 6: Genexpression des Markers ALDH1A1 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).....	39
Abbildung 7: Genexpression des Markers DSG1 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).....	40
Abbildung 8: Genexpression des Markers SPINK7 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).....	41
Abbildung 9: Genexpression des Markers KRT3 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).....	42
Abbildung 10: Genexpression des Markers KRT12 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).....	42
Abbildung 11: Genexpression des Markers KRT19 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).....	43
Abbildung 12: Genexpression des Markers CRABP2 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).....	44

Abbildung 13: Genexpression des Markers ELOVL7 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).....	45
Abbildung 14: Genexpression des Markers FABP5 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).....	45
Abbildung 15: Genexpression des Markers PPARG unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).....	46
Abbildung 16: Genexpression des Markers RBP1 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).....	47
Abbildung 17: Genexpression des Markers RDH10 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).....	47
Abbildung 18: Genexpression des Markers STRA6 unter 24 h und 48 h Behandlung mit UVI 3003 und AGN 193109. Dargestellt sind die Expression Fold changes normalisiert auf die jeweilige Kontrollprobe (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).....	48
Abbildung 19: Signifikante Genexpression von DSG1 unter der Behandlung mit Retinolderivaten [25] und Retinoidrezeptorantagonisten	52
Abbildung 20: Signifikante Genexpression von KRT3 unter der Behandlung mit Retinolderivaten [25] und Retinoidrezeptorantagonisten	54
Abbildung 21: Signifikante Genexpression von KRT12 unter der Behandlung mit Retinolderivaten [25] und Retinoidrezeptorantagonisten	54
Abbildung 22: Signifikante Genexpression von KRT19 unter der Behandlung mit Retinolderivaten [25] und Retinoidrezeptorantagonisten	55
Abbildung 23: Signifikante Genexpression von ADH7 unter der Behandlung mit Retinolderivaten [25] und Retinoidrezeptorantagonisten	55
Abbildung 24: Signifikante Genexpression von SPINK7 unter der Behandlung mit Retinolderivaten [25] und Retinoidrezeptorantagonisten	59

Danksagung

Zu aller erst möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Nóra Szentmáry, der Leiterin des Dr. Rolf M. Schwiete Zentrums, bedanken. Unter ihrer Leitung war es mir möglich, meine Doktorarbeit an dem Institut durchzuführen. Weiterhin möchte ich mich bei ihr für die Überlassung des interessanten Themas bedanken. Vielen Dank für die wertvolle Unterstützung und die vielen Ratschläge.

Ein weiteres herzliches Dankeschön geht an Herrn Dr. Lorenz Latta für seine ausgesprochen gute und hilfreiche Betreuung meiner Arbeit. Er stand mir jederzeit unterstützend zur Seite und hat mit viel Geduld und Engagement die Betreuung meiner Arbeit übernommen. Mir hat die Arbeit im Labor unter seiner Leitung große Freude bereitet. Vielen Dank für die tolle und lehrreiche Zeit der Zusammenarbeit.

An dieser Stelle bedanke ich mich auch bei Frau Priya Katiyar und Frau Dr. Tanja Stachon für die Einarbeitung in die Laborarbeit und die Abläufe der Zellkulturgewinnung.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Berthold Seitz, dem Klinikdirektor der Klinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes Homburg/ Saar, für die Möglichkeit der Nutzung der Räumlichkeiten und Geräte im biologischen Labor der Klinik.

Ich möchte mich auch bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie bedanken. Es wurde mir ermöglicht, einen Teil der Gerätschaften des Institutes für die Durchführung meiner Experimente zu nutzen.

Ein herzlicher Dank geht auch an meine Familie für ihre begleitende Unterstützung.

Publikationen

Latta L, Knebel I, Bleil C, Stachon T, Katiyar P, Zussy C, Fries FN, Käsmann-Kellner B, Seitz B, Szentmáry N (2021) Similarities in DSG1 and KRT3 downregulation through retinoic acid treatment and PAX6 knockdown: Does PAX6 affect RA signaling in limbal epithelial cells? *Biomolecules*: zur Publikation angenommen

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

Tag der Promotion: 31.08.2022
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Nóra Szentmáry
Univ.-Prof. Dr. med. Frank Schmitz