

Dr. Rolf M. Schwiete Zentrum
für Limbusstammzellforschung und kongenitale Aniridie
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Institutsleitung: Univ. Prof. Dr. med. Nóra Szentmáry

**Analyse der Gen- und Proteinexpression von Limbusfibroblasten
in einer indirekten Kokultur mit Limbusepithelzellen
im Kontext der kongenitalen Aniridie**

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

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2025

vorgelegt von: Maximilian Ralf Berger
geboren am: 22.06.1998 in Ludwigsburg

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Zusammenfassung	3
2.1	Deutsche Zusammenfassung	3
2.2	Summary	5
3	Einleitung	7
3.1	Kornea	7
3.1.1	Allgemein	7
3.1.2	Anatomie der Kornea	7
3.1.3	Nährstoffversorgung, Immunstatus und Innervation	8
3.2	Limbus corneae	9
3.2.1	Definition	9
3.2.2	Limbale Stammzellnische - Anatomie und Physiologie	9
3.2.3	Limbale Stammzellinsuffizienz	11
3.3	Kongenitale Aniridie	12
3.4	Aniridie-assoziierte Keratopathie	13
3.5	Zielsetzung und Versuchskonzept	15
4	Material und Methoden	16
4.1	Genehmigung der Ethikkommission und Zellherkunft	16
4.2	Material	16
4.3	Methoden	20
4.3.1	Zellkultur - Allgemein	20
4.3.2	Isolierung und Zellkultur der limbalen Fibroblasten	20
4.3.3	Isolierung und Zellkultur der limbalen Epithelzellen	21
4.3.4	Zellkultur der Epithelzelllinie	21
4.3.5	Sammlung und Pooling des konditionierten Mediums	22
4.3.6	Behandlung und Zellernte der limbalen Fibroblasten	23
4.3.7	Isolation und Konzentrationsbestimmung der Ribonukleinsäure	24
4.3.8	Synthese der komplementären Desoxyribonukleinsäure	24
4.3.9	Quantitative Polymerasekettenreaktion	24
4.3.10	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	26
4.3.11	Western Blot	27
4.3.11.1	Proteinextraktion und quantitative Proteinbestimmung	27
4.3.11.2	Gelelektrophorese	27
4.3.11.3	Proteintransfer und Antikörper-Inkubation	28
4.3.12	Statistische Auswertung	29

5 Ergebnisse.....	30
5.1 Paired Box Protein 6.....	30
5.2 Kollagen Typ I alpha 1.....	31
5.3 Kollagen Typ IV alpha 1.....	31
5.4 Hyaluronsäure-Synthase 2.....	32
5.5 Matrix-Metalloproteinase 2.....	33
5.6 Matrix-Metalloproteinase 9.....	34
5.7 Gewebsinhibitor der Metalloproteinase 1.....	35
5.8 Hepatozyten-Wachstumsfaktor.....	36
5.9 Transformierender Wachstumsfaktor beta 1.....	37
5.10 Aktin alpha 2 und Glattmuskuläres alpha Aktin.....	38
5.11 Nukleärer Faktor kappa B.....	39
5.12 Interleukin 6.....	40
5.13 C-C motif Chemokin Ligand 2.....	41
5.14 Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A.....	42
6 Diskussion.....	43
6.1 Interpretation der Gen- und Proteinexpressionsergebnisse von Paired Box Protein 6.....	43
6.2 Interpretation der Gen- und Proteinexpressionsergebnisse von Kollagen Typ I alpha 1, Kollagen Typ IV alpha 1 und Hyaluronsäure-Synthase 2.....	45
6.3 Interpretation der Gen- und Proteinexpressionsergebnisse von Matrix-Metalloproteinase 2, Matrix-Metalloproteinase 9 und Gewebsinhibitor der Metalloproteinase 1.....	47
6.4 Interpretation der Gen- und Proteinexpressionsergebnisse von Hepatozyten-Wachstumsfaktor, Transformierender Wachstumsfaktor beta 1 und Glattmuskuläres alpha Aktin.....	49
6.5 Interpretation der Gen- und Proteinexpressionsergebnisse von Nukleärer Faktor kappa B, Interleukin 6, C-C motif Chemokin Ligand 2 und Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A.....	52
6.6 Schlussfolgerungen und Ausblick.....	56
7 Literaturverzeichnis.....	57
8 Abbildungsverzeichnis.....	65
9 Tabellenverzeichnis.....	67
10 Publikation.....	68
11 Danksagung.....	69
12 Lebenslauf.....	70

1 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AAK	Aniridie-assoziierte Keratopathie
Abb.	Abbildung
ABCG2	ATP-binding cassette subfamily G member 2
ACTA2	Aktin alpha 2
AN-LFC	Aniridie-Fibroblasten der Limbusregion
ANOVA	Varianzanalyse
α -SMA	Glattmuskuläres alpha Aktin
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BPE	Rinderhypophysenextrakt
BSA	Rinderserumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCL2	C-C motif Chemokin Ligand 2
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm ²	Quadratcentimeter
CM	Konditioniertes Medium
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COL1A1	Kollagen Typ I alpha 1
COL4A1	Kollagen Typ IV alpha 1
Ctrl-M	Kontrollmedium
Ct-Wert	Schwellenwertzyklus
Cu	Kupfer
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EZM	Extrazelluläre Matrix
FC	Fold change
FCS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (1g \approx 9,81 m/s ²)
GUSB	Beta-Glucuronidase
HA	Hyaluronsäure
HAS2	Hyaluronsäure-Synthase 2
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor
HRP	Meerrettichperoxidase
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
KSFM	Serumfreies Keratinozyten-Medium
l	Liter
LESC	Limbusepithelstammzellen
LFC	Gesunde Fibroblasten der Limbusregion
LSCD	Limbale Stammzellinsuffizienz
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloproteinase

MOPS-Puffer	3-Morpholino-propansulfonsäure-Puffer
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
mut-LSC-CM	Konditioniertes Medium der Aniridie-Epithelzelllinie
NFκB	Nukleärer Faktor kappa B
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
p63α	Tumor protein p63 alpha
PAX6	Paired Box Protein 6
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pg	Pikogramm
pLEC-CM	Konditioniertes Medium der primären Limbusepithelzellen
P/S	Penicillin-Streptomycin
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
RD	Reagent Diluent (PBS + 1% BSA)
RIPA-Puffer	Radioimmunpräzipitationspuffer
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
sVEGFR1	Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1
Tab.	Tabelle
TBP	TATA-Box bindendes Protein
TGF-β1	Transformierender Wachstumsfaktor beta 1
TIMP1	Gewebshemmer der Metalloproteinase 1
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
V	Volt
VEGFA	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
°C	Grad Celsius
%	Prozent

2 Zusammenfassung

2.1 Deutsche Zusammenfassung

Zielsetzung: Bei der kongenitalen Aniridie, die mehrheitlich auf einer Mutation in einer PAX6-Genkopie beruht, kommt es mit fortschreitendem Lebensalter zur Konjunktivalisierung der transparenten Hornhaut. Die pathophysiologischen Mechanismen hinter der PAX6-Haploinsuffizienz bei der Entwicklung der Aniridie-assoziierten Keratopathie (AAK) sind gegenwärtig noch unzureichend verstanden. Es wird angenommen, dass der Limbusstammzellinsuffizienz, die aus einem kombinierten Mangel an epithelialen Vorläuferzellen und der Zerstörung der limbalen Nischenstruktur resultiert, eine zentrale Bedeutung zukommt. Das Überleben, die Proliferation und Differenzierung der limbalen Epithelstammzellen wird in einer dynamischen Mikroumgebung unter anderem durch Interaktion mit spezialisierten Nischenzellen, wie sie im limbalen Hornhautstroma vorzufinden sind, gewährleistet. Ziel der Arbeit war die Untersuchung einer differenziellen Gen- und Proteinexpression von limbalen Fibroblasten in einer indirekten Kokultur mit Epithelzellen der Limbusregion im Kontext der kongenitalen Aniridie, um dysregulierte Komponenten in der Interaktion dieser Zelltypen zu identifizieren.

Methoden: Limbusfibroblasten von sechs gesunden Hornhautspendern (LFC) und von fünf Patienten mit AAK (AN-LFC) wurden isoliert und für 48 Stunden *in vitro* in einer indirekten Kokultur mit konditioniertem Medium von primären Limbusepithelzellen (pLEC-CM) oder von einer Aniridie-Epithelzelllinie (mut-LSC-CM) inkubiert. Die Genexpressionsanalyse erfolgte mittels qPCR von dem Transkriptionsfaktor PAX6, von Enzymen und Strukturproteinen der extrazellulären Matrix (COL1A1, COL4A1, HAS2, MMP2, MMP9, TIMP1), von Wachstumsfaktoren (HGF, TGF- β 1), vom Differenzierungsmarker ACTA2/ α -SMA und von inflammatorischen Markern (NF κ B, IL6, CCL2, VEGFA). Die Proteinexpression der Biomarker MMP9, HGF, IL6 und VEGFA wurde mittels ELISA und die Proteinexpression von MMP9, α -SMA und NF κ B wurde mittels Western Blot untersucht. Die statistische Auswertung wurde unter Verwendung einer Two-way ANOVA mit nachfolgendem Dunnett's Test und bei Vergleich zwischen LFC und AN-LFC mithilfe eines Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

Ergebnisse: Limbusfibroblasten exprimieren kaum nachweisbare Mengen an PAX6 (LFC: $C_{t_{mean}}=31,58$ / AN-LFC: $C_{t_{mean}}=32,85$) und die Behandlung mit konditioniertem Medium führte zu keiner signifikanten Erhöhung der Genexpression von PAX6. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression von COL1A1, COL4A1, HAS2, MMP2, MMP9, TIMP1, HGF, TGF- β 1 und NF κ B zwischen den LFC- und AN-LFC-Populationen festgestellt werden. Die Inkubation mit pLEC-CM führte bei den AN-LFC zu einer signifikanten Hochregulierung der Genexpression von COL4A1 ($p=0,008$) und von MMP2 ($p=0,01$). Vor

dem Kontakt mit den Limbusfibroblasten war die Proteinkonzentration von MMP9 im pLEC-CM mit 1120 pg/ml deutlich höher als im mut-LSC-CM mit 162 pg/ml. Im Vergleich zur zugehörigen LFC-Kontrollgruppe konnte bei den AN-LFC mit pLEC-CM eine verminderte Genexpression von ACTA2 ($p=0,03$) gemessen werden. Die Inkubation mit pLEC-CM führte in der LFC-Gruppe zu einer signifikanten Hochregulierung der Gen- ($p=0,002$) und Proteinexpression ($p<0,0001$) von IL6. In der AN-LFC-Gruppe ergab sich hingegen mit dem mut-LSC-CM keine Veränderung der Gen- oder Proteinexpression von IL6. Analog hierzu zeigte sich bei den LFC mit pLEC-CM eine signifikante Zunahme der CCL2-Genexpression ($p=0,001$), in der AN-LFC-Gruppe mit mut-LSC-CM jedoch keine Veränderung. Die Proteinexpression von VEGFA war in der AN-LFC-Population mit pLEC-CM verglichen mit der zugehörigen LFC-Kontrollgruppe signifikant vermindert ($p=0,02$).

Schlussfolgerung: Im Rahmen der kongenitalen Aniridie führt die PAX6-Haploinsuffizienz trotz eines ohnehin niedrigen PAX6-Expressionsniveaus zu Veränderungen in der Zellphysiologie der Limbusfibroblasten, insbesondere bei der Expression von IL6, ACTA2 und VEGFA. Die AN-LFC zeigen mit dem Kontrollmedium keine Dysregulation der untersuchten Biomarker der extrazellulären Matrix (COL1A1, COL4A1, HAS2, MMP2, MMP9, TIMP1, HGF und TGF- β 1) auf transkriptioneller Ebene nach 48 Stunden, sodass die histopathologischen Veränderungen der AAK die Folge eines metabolisch angeregten Zustands wie beispielsweise bei einem anhaltenden entzündlichen Prozess darstellen könnten. Die verminderte Genexpression von ACTA2 könnte auf eine schnellere Metabolisierungsrate profibrotischer Moleküle durch die AN-LFC hinweisen. Weiterhin ist ein unterschiedliches Reaktionsverhalten der Limbusfibroblasten auf ihr zugehöriges konditioniertes Medium (LFC mit pLEC-CM und AN-LFC mit mut-LSC-CM) nach 48 Stunden evident, welches eine gestörte Interaktion zwischen den Epithelzellen und ihren Nischenzellen anzeigen könnte.

2.2 Summary

Purpose: With increasing age, individuals with congenital aniridia, which is mainly due to a mutation in one PAX6 gene copy, typically exhibit conjunctivalization of the transparent cornea. The pathophysiological mechanisms following the PAX6 haploinsufficiency in the development of aniridia-associated keratopathy (AAK) are currently not sufficiently elucidated. Limbal stem cell deficiency, resulting from a combined lack of epithelial progenitor cells and destruction of the limbal niche structure, is believed to play a central role. The survival, proliferation, and differentiation of limbal epithelial stem cells is ensured in a dynamic microenvironment by interaction with specialized niche cells, such as those found in the limbal stroma. The aim of this study was to investigate the differential gene and protein expression of limbal fibroblasts in an indirect coculture with epithelial cells of the limbal region in the context of congenital aniridia, in order to identify dysregulated components in the interaction of these cell types.

Methods: Limbal fibroblasts from six healthy corneal donors (LFC) and from five patients with AAK (AN-LFC) were isolated and incubated for 48 hours *in vitro* in an indirect coculture with conditioned medium from primary limbal epithelial cells (pLEC-CM) or from an aniridia epithelial cell line (mut-LSC-CM). Gene expression analysis was conducted by qPCR of the transcription factor PAX6, of enzymes and structural proteins of the extracellular matrix (COL1A1, COL4A1, HAS2, MMP2, MMP9, TIMP1), of growth factors (HGF, TGF- β 1), of the differentiation marker ACTA2/ α -SMA and of inflammatory markers (NF κ B, IL6, CCL2, VEGFA). The protein expression of the biomarkers MMP9, HGF, IL6 and VEGFA was assessed by ELISA and the protein expression of MMP9, α -SMA and NF κ B was assessed by western blot. Statistical analysis was performed using a Two-way ANOVA followed by Dunnett's test and a Mann-Whitney U test for the comparison between LFC and AN-LFC.

Results: Limbal fibroblasts express barely detectable amounts of PAX6 (LFC: Ct_{mean}=31.58 / AN-LFC: Ct_{mean}=32.85) and treatment with conditioned medium did not lead to a significant increase in PAX6 gene expression. No significant differences in gene expression of COL1A1, COL4A1, HAS2, MMP2, MMP9, TIMP1, HGF, TGF- β 1 and NF κ B were found between the LFC and AN-LFC populations. Incubation with pLEC-CM led to a significant upregulation of gene expression of COL4A1 (p=0.008) and MMP2 (p=0.01) in AN-LFC. Prior to contact with the limbal fibroblasts, the protein concentration of MMP9 was considerably higher in the pLEC-CM (1120 pg/ml) than in the mut-LSC-CM (162 pg/ml). Compared to the corresponding LFC group, a reduced gene expression of ACTA2 (p=0.03) was measured in the AN-LFC with pLEC-CM. Incubation with pLEC-CM led to a significant upregulation of gene (p=0.002) and protein expression (p<0.0001) of IL6 in the LFC group. In contrast, the AN-LFC with mut-LSC-CM showed no significant change in gene or protein expression of IL6. Similarly, there was a significant increase in CCL2 gene expression in the LFC group with pLEC-CM (p=0.001), but

no change in the AN-LFC group with mut-LSC-CM. The protein expression of VEGFA was significantly reduced in the AN-LFC population with pLEC-CM compared to the corresponding LFC group ($p=0.02$).

Conclusion: In the context of congenital aniridia, PAX6 haploinsufficiency has an impact on the cell physiology of limbal fibroblasts despite the already low levels of PAX6 expression, which were particularly noticeable in the expression of IL6, ACTA2 and VEGFA. With control medium, the AN-LFC did not exhibit a dysregulation of the investigated biomarkers of the extracellular matrix (COL1A1, COL4A1, HAS2, MMP2, MMP9, TIMP1, HGF and TGF- β 1) at the transcriptional level after 48 hours, so that the histopathological changes in the AAK could be the result of a metabolically stimulated state, such as in a persistent inflammatory environment. The reduced gene expression of ACTA2 could indicate a faster metabolization rate of profibrotic molecules by the AN-LFC. Furthermore, a different response of the limbal fibroblasts to their associated conditioned medium (LFC with pLEC-CM and AN-LFC with mut-LSC-CM) after 48 hours is evident, which may indicate a disturbed interaction between the epithelial cells and their niche cells.

3 Einleitung

3.1 Kornea

3.1.1 Allgemein

Die Hornhaut (Kornea) ist ein gefäßfreies, transparentes Gewebe und formt gemeinsam mit der Lederhaut (Sklera), in die sie sich wie ein Uhrglas einbettet, die äußere Augenhaut. Die horizontale Ausdehnung der Kornea ist beim Erwachsenen mit durchschnittlich 12,0 mm etwa 1,0 mm größer als der vertikale Durchmesser [41]. Die zentrale Hornhautdicke beträgt circa 538 µm und nimmt zur Peripherie hin auf 672 µm zu, was auf eine erhöhte Kollagenmenge im peripheren Stroma zurückzuführen ist [19,81]. Die Hornhaut übernimmt zwei Drittel der Gesamtbrechkraft des optischen Systems und schützt als mechanische Barriere die inneren Strukturen des Auges vor Umwelteinflüssen [18].

3.1.2 Anatomie der Kornea

Ein komplexer Aufbau aus fünf Schichten (Epithel, Bowman-Lamelle, Stroma, Descemet-Membran, Endothel) bewahrt die Transparenz sowie die Integrität der Hornhaut und stellt eine stabile Sehfunktion sicher [18].

Das Hornhautepithel besteht aus vier bis sechs Zelllagen eines mehrschichtigen, unverhornten Plattenepithels und verhindert über enge Zellkontakte, sogenannte Tight Junctions, das Eindringen von Flüssigkeiten und Keimen in die Interzellularräume und damit in tiefere Schichten der Kornea [23]. Das Epithel unterliegt einem natürlichen und geordneten Regenerationsprozess, bei dem die Epithelzellen durch Apoptose und Abschuppung umgesetzt werden. Die feste Verankerung der Epithelzellen mit ihrer Basalmembran und dem darunterliegenden Stroma wird über hemidesmosomale Komplexe vermittelt [26]. Die Basalmembran unterbindet zudem selektiv den direkten Stoffaustausch zwischen dem Epithel und Stroma, moduliert die lokalen Konzentrationen biologisch aktiver Moleküle und besitzt das Potential, die Proliferation, Differenzierung sowie Migration der umliegenden Zellen zu beeinflussen [83].

Bei der Bowman-Lamelle handelt es sich nicht um eine echte Membran, sondern um eine zellfreie Verdichtung des anterioren Hornhautstromas. Die Kollagenfibrillen sind hier nur halb so dick wie in den tieferliegenden stromalen Schichten und bestehen hauptsächlich aus Kollagen Typ I, III und IV [36,41]. Das Stroma nimmt ungefähr 85% der gesamten Hornhautdicke ein und zeichnet sich im Vergleich zu anderen kollagenhaltigen Bindegeweben durch eine Transparenz aus, welche das Resultat eines hochorganisierten Kollagenfasengerüsts ist. Die stromalen Kollagenfibrillen, welche sich überwiegend aus strukturellen Einheiten von Typ I- und Typ V-Kollagenfasern zusammensetzen, sind parallel in Lamellen angeordnet, die wiederum zu benachbarten Lamellenschichten rechtwinklig

verlaufen [18]. Die Transparenz der Hornhaut hängt insbesondere vom Durchmesser der Typ I-Kollagenfasern und von ihren regelmäßigen Abständen zueinander ab, die durch Interaktion mit Typ V-Kollagenfasern und anderen Molekülen der extrazellulären Matrix (EZM) wie Proteoglykanen (unter anderem Lumican, Keratocan) erzielt werden [56]. Keratozyten sind die vorherrschende Zellpopulation des Hornhautstromas, die wesentlich zur Aufrechterhaltung der EZM beitragen, indem sie strukturgebende Moleküle wie Kollagene sezernieren, aber auch Matrix-Metalloproteinasen (MMP) freisetzen, die dessen Umbau ermöglichen [18].

Die Descemet-Membran ist die Basalmembran der Endothelzellen und wird von diesen kontinuierlich sezerniert [23]. Die Endothelzellschicht setzt sich aus einer Lage polygonaler Zellen zusammen und kleidet die Innenfläche der Hornhaut aus. Das Endothel reguliert den Hydratationszustand der Kornea, indem es dem Stroma Wasser entlang eines aufgebauten, osmotischen Gradienten entzieht. Die Endothelzellen sind begrenzt regenerationsfähig und kompensieren die fortschreitende, altersbedingte Abnahme der Endothelzellichte über Veränderungen ihrer Zellmorphologie [85].

3.1.3 Nährstoffversorgung, Immunstatus und Innervation

Als avaskuläres Gewebe wird die Hornhaut hauptsächlich über Diffusion aus dem Vorderkammerwasser, über die Tränenflüssigkeit und zusätzlich peripher über das Randschlingennetz der limbalen Bindehaut ernährt [81]. Unter physiologischen Bedingungen weist das Hornhautgewebe einen immunprivilegierten Status auf, wodurch Entzündungszustände verhindert werden sollen. Dies ist unter anderem auf die Abwesenheit von Blut- und Lymphgefäßen, das Vorhandensein entzündungshemmender Moleküle und die verminderte Expression von Proteinen des Haupthistokompatibilitätskomplex zurückzuführen [16]. Der Nervus nasociliaris, der aus dem ersten Ast des Nervus trigeminus entspringt, versorgt die Kornea über ein dichtes Nervengeflecht, das sich am Limbus corneae bildet [44].

3.2 Limbus corneae

3.2.1 Definition

Der Limbus corneae bezeichnet die ringförmige Übergangszone zwischen der transparenten Hornhaut und der angrenzenden Bindehaut (Konjunktiva) und erstreckt sich vom peripheren Ende der Bowman-Lamelle bis zum äußeren Rand der Vogt'schen Palisaden [86]. Bei den Vogt'schen Palisaden handelt es sich um radiär ausgerichtete, fibrovaskuläre Erhebungen, die mit dazwischenliegenden Epithelzellkrypten verflochten sind und entlang der superioren und inferioren Limbusregion gehäuft vorkommen [28].

3.2.2 Limbale Stammzellnische - Anatomie und Physiologie

Die Epithelzellkrypten innerhalb der Limbusregion konnten von Shortt et al. als Nische der Limbusepithelstammzellen (LESC) identifiziert werden [77]. Angesichts des Mangels an eindeutigen Stammzellmarkern kann die genaue räumliche Anordnung der LESC nicht mit Sicherheit erfasst werden. Es gibt jedoch einen allgemeinen Konsens darüber, dass die LESC in direktem Kontakt zur Basalmembran stehen und in Clustern verstreut in den basalen Epithelschichten der limbalen Krypten organisiert sind [73]. Die kontinuierliche Erneuerung des reifen Hornhautepithels wird durch die LESC bedingt. Die transient amplifizierenden Zellen, direkte Nachkommen der LESC, wandern zentripetal entlang der basalen Epithelzellschicht in Richtung des Hornhautzentrums und dringen in anteriore Schichten unter terminaler Differenzierung vor. Eine spezialisierte Nischenstruktur (Abb. 1) gewährleistet die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters der LESC und stellt homöostatische Bedingungen innerhalb der Kornea durch ein Gleichgewicht zwischen Überleben, Proliferation und Differenzierung der LESC sicher [76]. Die limbale Stammzellnische besteht aus einer dynamischen Mikroumgebung, die durch einen einzigartigen anatomischen Aufbau, spezialisierte Nischenzellen sowie eine spezifische EZM gekennzeichnet ist [21]. Die Anordnung der limbalen Epithelpapillen zwischen den fibrovaskulären Vogt'schen Palisaden schützt die Stammzellnische vor schädlichen Umwelteinflüssen und die angrenzenden Blutgefäße versorgen die Epithelzellen mit Nährstoffen und Signalmolekülen [9]. Aufgrund ihrer räumlichen Nähe zu den LESC werden Melanozyten als Nischenzellen betrachtet. Sie bewahren den Stammzellphänotypen, indem sie Melanin auf die LESC zum Schutz vor Ultraviolettstrahlung übertragen [21]. Das limbale Stroma, einschließlich seiner Zellen, steht in enger Beziehung zu den LESC und kommuniziert mit ihnen über lösliche Signalmoleküle wie Zytokine und Wachstumsfaktoren, Komponenten der EZM und der Basalmembran sowie über Zell-Zell-Kontakte. Die genauen Wirkmechanismen zur Steuerung der Stammzeleigenschaften sind jedoch noch nicht vollständig verstanden [67]. Dziasko et al. konnten mittels Elektronenmikroskopie feine Ausläufer limbaler Stromazellen identifizieren, die sich durch lokale Unterbrechungen der Basalmembran auf Epithelzellen mit morphologischen

Stammzellmerkmalen innerhalb der limbalen Krypten projizieren, was eine direkte Wechselwirkung ermöglicht [20].

In mehreren experimentellen Studien konnte der Stellenwert der Limbusfibroblasten für das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung der LESC untermauert werden. Notara et al. konnten immunzytochemisch eine erhöhte Expression von Stammzellmarkern wie Tumor protein p63 alpha (p63 α) und ATP-binding cassette subfamily G member 2 (ABCG2) in humanen Limbusepithelzellen in einem 3:1-Kokultursystem mit Limbusfibroblasten nachweisen [63]. An einem Mausmodell stellten Amirjamshidi et al. dar, dass Hornhäute nach einer Abrasio von Limbus zu Limbus mit anschließender Behandlung mit konditioniertem Medium (CM) von Limbusfibroblasten eine signifikant höhere Proliferation von kornealen Epithelzellen und weniger Bindehautepithel mit Becherzellen aufwies [2]. Espana et al. konnten im Tiermodell zeigen, dass das limbale Stroma den undifferenzierten Zustand der LESC fördert und dass die Differenzierung der Epithelzellen nach Verlassen der Limbusstammzellnische unter anderem durch das Hornhautstroma induziert wird [24]. Die Bedeutung der EZM, insbesondere der Basalmembran, für die Differenzierungsstadien der Epithelzellen wird durch die unterschiedliche Zusammensetzung des limbalen und des kornealen Kompartiments verdeutlicht. Ein Beispiel hierfür ist die immunhistochemische Markierung der kornealen Basalmembran mit Kollagen Typ IV alpha 3, während sich die limbale Basalmembran nicht oder nur schwach anfärben lässt [74].

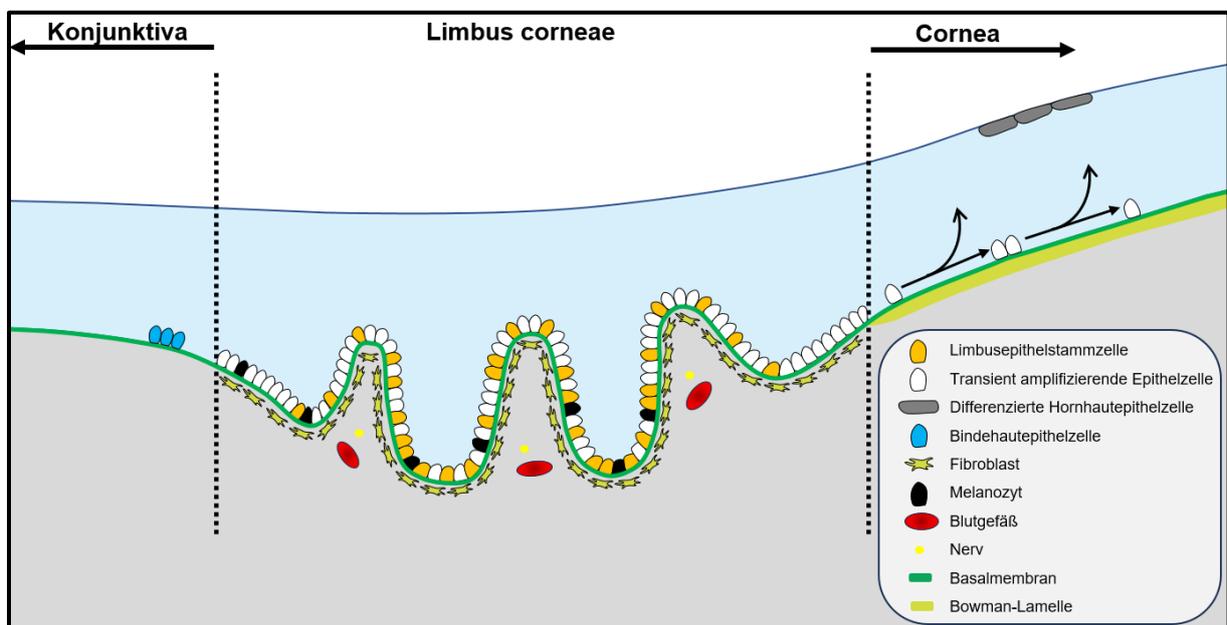


Abbildung 1: Schematische Darstellung der limbalen Epithelstammzellnische - Die Limbusepithelstammzellen (LESC) befinden sich in den basalen Epithelschichten innerhalb des Limbus corneae und erneuern kontinuierlich das reife Hornhautepithel. Eine hochspezialisierte Mikroumgebung gewährleistet das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung der LESC. Die Zellen des limbalen Stromas interagieren als Nischenzellen über lokale Unterbrechungen der Basalmembran und tragen zum Erhalt des Stammzellphänotyps bei (modifiziert nach Li et al.) [52].

3.2.3 Limbale Stammzellinsuffizienz

Der kombinierte Mangel an LESC und die Destruktion der limbalen Stammzellnische resultieren in einer limbalen Stammzellinsuffizienz (LSCD), die sich klinisch abhängig der Genese entweder als lokalisierte oder generalisierte Einschränkung der Hornhautepithelintegrität manifestiert. Durch den Verlust der Barrierefunktion des Limbus kommt es zum Überwachsen der Hornhaut mit Bindehautepithelzellen sowie der Ausbildung eines vaskularisierten, undurchsichtigen Pannusgewebes und im Rahmen einer defizienten Wundheilung und eines überschießenden Entzündungszustandes zu wiederkehrenden Epitheldefekten [65]. Die LSCD ist meist auf eine erworbene Ursache zurückzuführen, wie beispielsweise nach einer chemischen oder thermischen Verletzung, Kontaktlinsen-assoziiertes Keratopathie oder als Folge eines medizinischen Eingriffs. Sie kann aber auch im Zusammenhang mit einer kongenitalen Aniridie in Erscheinung treten [64].

3.3 Kongenitale Aniridie

Die kongenitale Aniridie ist eine seltene, bilaterale, panokulare Erkrankung mit einer geschätzten Inzidenz zwischen 1:50.000 bis 1:100.000 Lebendgeburten [7]. Sie wird in 90% der Fälle durch eine Mutation im Paired Box Protein 6 (PAX6)-Gen auf dem kleinen Arm des Chromosoms 11 (11p13) verursacht, die sich auf nahezu alle Augenstrukturen, sowohl des vorderen, als auch des hinteren Augenabschnitts, beeinträchtigend auswirkt. Das Hauptmerkmal ist das Vorhandensein einer Irishypoplasie, die in unterschiedlichem Ausmaß auftritt und von einem partiellen Verlust bis zum vollständigen Fehlen der Iris reichen kann [48]. Die PAX6-Mutation wird autosomal-dominant vererbt (2/3 der Fälle) oder tritt sporadisch auf (1/3 der Fälle) und zeichnet sich durch eine hohe Penetranz bei variabler Expressivität aus. Es resultiert ein Funktionsverlust in einer PAX6-Genkopie mit unzureichender Expression des PAX6-Proteins (sogenannte Haploinsuffizienz). Eine homozygote Mutation im PAX6-Gen gilt als nicht mit dem Leben vereinbar [82]. PAX6 ist ein Transkriptionsfaktor, der für die physiologische Augenentwicklung sowie für die lebenslange Funktionsfähigkeit verschiedener Augenkompimente von grundlegender Bedeutung ist. Die Expressionsprofile variieren zwischen diversen Zelltypen, wobei Epithelzellen eine deutlich höhere PAX6-Expression im Vergleich zu mesenchymalen Zellen aufweisen [49]. Eine kongenitale Aniridie kann auch im Kontext eines WAGRO-Syndroms (Wilms-Tumor, Aniridie, urogenitale Anomalien, mentale Retardierung, Adipositas) auftreten, welches durch eine kombinierte Mutation im PAX6-Genlocus und im benachbarten WT1-Gen verursacht wird [11]. Die Visusbeeinträchtigung ist nicht durch die Irishypoplasie bedingt, sondern Folge einer ebenfalls angeborenen Foveahypoplasie, Pathologie des Sehnervenkopfes, der Entwicklung eines Sekundärglaukoms, einer Aniridie-assoziierten Keratopathie (AAK) und einer juvenilen Katarakt [82]. Neben der Augenbeteiligung wurden auch systemische Manifestationen beschrieben, darunter Gehirnanomalien, Schlafstörungen und hormonelle Veränderungen wie Diabetes mellitus [48]. Die Therapie bei der kongenitalen Aniridie sollte möglichst minimalinvasiv sein, da operative Eingriffe aufgrund der LSCD und einer unbefriedigenden Wundheilungstendenz häufig zu Rezidiven oder zur einer Verschlechterung der visusgefährdenden AAK führen [35].

3.4 Aniridie-assoziierte Keratopathie

Die AAK ist eine schmerzhafte, hochgradig visusbedrohende Hornhauterkrankung, die bei 80-100% der Patienten mit kongenitaler Aniridie auftritt und sie zeichnet sich durch eine fortschreitende LSCD mit progressivem Verlust der epithelialen Hornhautintegrität aus [87]. Die Schweregradeinteilung der AAK basiert auf dem spaltlampenbiomikroskopischen Befund und orientiert sich vor allem am Ausmaß der Hornhautinfiltration mit Bindehaut- und Pannusgewebe sowie der damit verbundenen Vaskularisation und Hornhauttrübung (Abb. 2). Lagali et al. unterscheiden insgesamt sechs Stadien, wobei die Stadien 0 bis 2 durch eine Aussparung der optischen Achse gekennzeichnet sind, während bei den Stadien 3 bis 5 eine manifeste Sehbehinderung vorliegt [45]. Der Hornhautphänotyp hängt stark vom Mutationsstatus und vom Lebensalter ab. Bei Aniridieformen ohne nachweisbare Mutation im PAX6-Gen, wie beispielsweise bei einer Mutation im Elongator Acetyltransferase Complex Subunit 4- oder im Doublecortin Domain Containing 1-Gen, verläuft die Ausprägung und das Fortschreiten der AAK milder [46]. Bei der Geburt sind in den meisten Fällen keine makroskopischen Veränderungen an der Hornhaut zu erkennen [49]. Dennoch konnte bereits bei Patienten mit einer AAK Stadium 0 eine reduzierte subbasale Nervenfaserdichte mit verminderter Berührungsempfindlichkeit, eine erhöhte zentrale Hornhautdicke und die vermehrte Präsenz von Antigen-präsentierenden Zellen festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass trotz eines unauffälligen klinischen Hornhautbefunds bereits in jungen Jahren eine Entwicklungsstörung und eine Beeinträchtigung des immunprivilegierten Hornhautstatus vorliegen könnte [46]. Neben den visuseinschränkenden Hornhauttrübungen geht eine AAK mit einer chronisch-entzündlichen Augenreizung einher, die sich unter anderem durch einen instabilen Tränenfilm, Epiphora und Lichtempfindlichkeit äußert [35]. Histopathologische Untersuchungen an Hornhäuten mit einem AAK-Phänotyp zeigten erhebliche strukturelle Veränderungen mit manifester Beeinträchtigung der limbalen Stammzellnische auf [75,88]. Vicente et al. stellten an 5 Hornhautexplantaten nach einer perforierenden Keratoplastik ein unregelmäßiges, ausgedünntes Epithel sowie eine fragmentierte epitheliale Basalmembran fest. Ein subepitheliales, fibrovaskuläres Pannusgewebe verdrängte weitestgehend die Bowman-Lamelle und das Pannusgewebe konnte immunhistochemisch nicht oder nur schwach für Kollagen Typ I markiert werden. Hingegen zeigte sich eine zusätzliche Markierung für Kollagen Typ IV und Glattmuskuläres alpha Aktin (α -SMA), welches auf die Präsenz von Myofibroblasten hindeutet. Das übrige Stroma posterior des Pannusgewebes sowie die Endothelzellschicht mit ihrer Descemet-Membran wiesen eine beinahe normale Morphologie auf [88]. Schlötzer-Schrehardt et al. bestätigten diese Befunde hinsichtlich der zentralen Hornhautmerkmale anhand eines menschlichen, enukleierten Auges mit einer AAK Stadium II-III. Darüber hinaus stellten sie fest, dass bei fortgeschrittener AAK die Vogt'schen Palisaden fehlen und die Zellschichtung der limbalen Krypten verringert ist. Das Limbusepithel war mit

Cluster of Differentiation (CD) 18-positiven Immunzellen, die aus dem Stroma stammen, und mit Melanozyten, die in Kontrollgeweben als Nischenzellen fest mit der Basalmembran verankert sind, durchsetzt. Die Basalepithelzellen exprimierten als kompensatorische Reaktion auf eine ausgedünnte epitheliale Basalmembran vermehrt Adhäsionsmoleküle wie Integrin $\alpha 6$ [75]. Die genauen Mechanismen, durch die sich die PAX6-Haploinsuffizienz auf die Entstehung der AAK auswirkt, sind noch nicht abschließend verstanden. Es ist davon auszugehen, dass durch den Stellenwert von PAX6 als Transkriptionsfaktor, der die Transkription von hunderten von nachgeschalteten Genen in verschiedenen Zelltypen sowie in unterschiedlichen Organsystemen wie dem Immun-, Nervensystem und dem Stoffwechsel reguliert, die Annahme eines Mangel an LESC als primäre Ursache für die Entstehung einer AAK nicht gerechtfertigt wird [49]. Nach aktuellem Kenntnisstand ist von einem Zusammenspiel verschiedenster Faktoren auszugehen, wie eine gestörte Proliferation, Migration und Differenzierung der Epithelzellen mit fortschreitendem Verlust funktionsfähiger LESC, das Vorhandensein eines chronisch-entzündlichen Wundheilungszustands, eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress und eine fundamentale Disruption der Mikroumgebung der limbalen Nische [75].

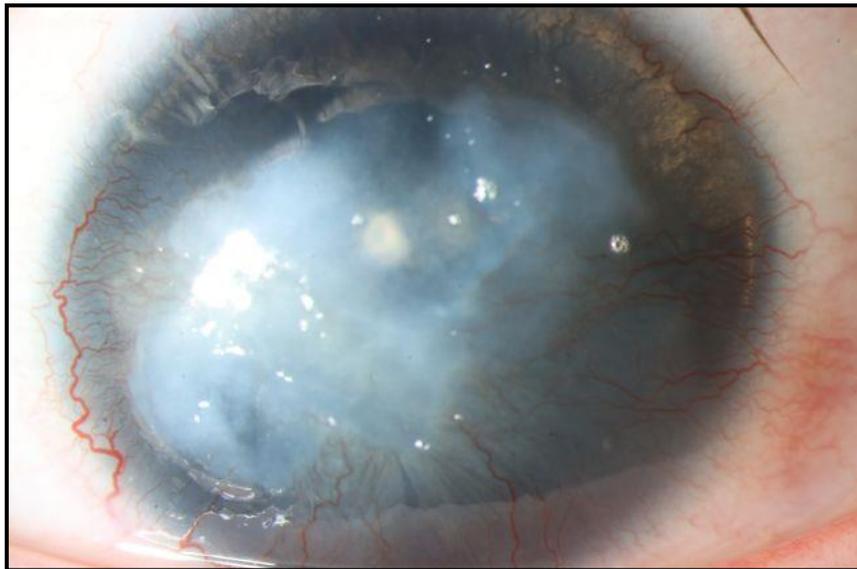


Abbildung 2: Aniridie-assoziierte Keratopathie Stadium IV bei einem 19-jährigen Mann. Klinisch zeigt sich eine flächige, durchgreifende Hornhautnarbe mit zirkulärer, fibrovaskulärer Pannusbildung auf der Hornhaut.

3.5 Zielsetzung und Versuchskonzept

Die Stammzeleigenschaften der LESC werden innerhalb einer geschützten Mikroumgebung im Limbus corneae in Interaktion mit ihren Nischenzellen, die erforderliche Signale in Form von Wachstumsfaktoren und Zytokinen freisetzen, aufrechterhalten. Eine Schädigung der LESC und ihrer Nischenstruktur hat die Entwicklung einer LSCD mit Veränderung der Hornhautepithelwundheilung zur Folge. Ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen der Interaktion zwischen Epithel und Stroma könnte zur Entwicklung therapeutischer Optionen für die LSCD beitragen [70].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung einer differenziellen Gen- und Proteinexpression von gesunden Fibroblasten (LFC) und Aniridie-Fibroblasten (AN-LFC) der Limbusregion in einer indirekten Kokultur unter Verwendung des CM von gesunden primären Epithelzellen (pLEC) und einer PAX6-defizienten Epithelzelllinie (mut-LSC) als repräsentatives Modell für Aniridie-Epithelzellen [71]. Die Analyse wird eine Vielzahl von Biomarkern umfassen, die sich in unterschiedliche funktionelle Gruppen einteilen lassen, darunter der Transkriptionsfaktor PAX6, Enzyme und Strukturproteine der EZM (COL1A1, COL4A1, HAS2, MMP2, MMP9, TIMP1), Wachstumsfaktoren (HGF, TGF- β 1), der Differenzierungsmarker ACTA2/ α -SMA und inflammatorische Mediatoren (NF κ B, IL6, CCL2, VEGFA).

4 Material und Methoden

4.1 Genehmigung der Ethikkommission und Zellherkunft

Die Arbeit mit Spenderzellen wurde durch die Ethikkommission des Saarlandes (Ethiknummer 178/22) gestattet. Die pLEC und LFC wurden aus Hornhautspenden der LIONS-Hornhautbank Saar-Lor-Lux, Trier/Westpfalz isoliert. Die Aniridie-Epithelzelllinie wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Daniel Aberdam (French Institute for Health and Medical Research, Paris, Frankreich) zur Verfügung gestellt [71]. Die AN-LFC stammen von Aniridie-Patienten, bei denen im Rahmen einer Operation Limbusanteile entnommen wurden, die ansonsten verworfen worden wären.

Alle Spender haben der Verwendung ihrer Zellen zu Forschungszwecken schriftlich zugestimmt.

4.2 Material

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Hersteller

Produkt	Hersteller
Acura 825 Mikropipette 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Socorex Isba SA, Ecublens, Schweiz
Acura 835 Makropipette 1-10 ml	Socorex Isba SA, Ecublens, Schweiz
Aqualine AL 18 Wasserbad	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
AXYGEN Plattenzentrifuge	Corning Inc., Corning, NY, USA
Biometra Eco-Mini Elektrophorese-Kammer	Analytik Jena GmbH & Co. KG, Jena, Deutschland
Biometra Standard Power Pack P25T Netzteil	Analytik Jena GmbH & Co. KG, Jena, Deutschland
Biometra TB2 Thermoblock	Analytik Jena GmbH & Co. KG, Jena, Deutschland
Fresco 21 Mikrozentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heracell 240i CO ₂ -Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
iBright CL1500 Imaging System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Infinite F50 Absorptions-Mikroplatten-Reader	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Megafuge 16R Universalzentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MiniAmp Thermocycler	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Multi-Pipette 30-300 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
neoLab Revolver-Rotator	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim v.d.Rhön, Deutschland
PIPETBOY acu 2	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Präzisionswaage PLS	KERN & SOHN GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
Primovert inverses Lichtmikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
QuantStudio 5 Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Safe 2020 Klasse 2 Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

ScanDrop 100 Spektralphotometer	Analytik Jena GmbH & Co. KG, Jena, Deutschland
Stemi 508 Stereomikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Hersteller

Produkt	Hersteller
Biosphere SafeSeal Reagiergefäß 0,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
CELLSTAR Serological Pipette 5, 10, 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
CELLSTAR Tube 15, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
CellTrics 20 µm Zellseparator	Sysmex Partec GmbH, Görlitz, Deutschland
Einmal-Biopsiestanze Ø 1,5 mm	KAI Europe GmbH, Solingen, Deutschland
ELISA-Platte 96-Well High Binding	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
ELISA Plate Sealers	R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA
epT.I.P.S. Standard Pipettenspitzen 2-200 µl, 50-1000 µl, 0,5-10 ml	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Filtropur S 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Finntip 300	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Flowmi 40 µm Zellsieb	Bel-Art, Wayne, NJ, USA
GELoader 0,5-20 µl	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Injekt Einmalspritze 20 ml	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
Low Retention Filterspitzen 10, 100, 1000 µl	Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern, Deutschland
MicroAmp optische 96-Well-Reaktionsplatte	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MicroAmp optische Klebefolie	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mikrotestplatte 96-Well	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
NuPAGE 4-12% Bis-Tris-Gel	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PCR-Reaktionsgefäß 0,2 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Reagiergefäß 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
TC-Zellkulturplatte 24-, 12-, 6-Well	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
TC-Zellkulturflasche 75 cm ²	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Trans-Blot Turbo 0,2 µm Nitrocellulose Transfer Pack	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

Tabelle 3: Verwendete Lösungen, Medien, Puffer und Hersteller

Produkt	Hersteller
2-Mercaptoethanol BioReagent 99%	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
1-Step Ultra TMB-ELISA Substratlösung	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
AceQ qPCR SYBR Green Master Mix	Vazyme Biotech Co., Ltd., Nanjing, China
Bovine Serum Albumin >98%	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Collagenase A	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Fetales Kälberserum	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gibco DMEM/F-12 (1:1) + L-Glutamine + 15 mmol/l HEPES	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gibco Keratinozyten-SFM (1X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gibco Supplemente – 25 mg BPE, 2,5 µg EGF	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Laemmli Sample Buffer (4X)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
No-Stain Protein Labeling Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Nuklease-freies Wasser	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
NuPAGE MOPS SDS Laufpuffer (20X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Precision Plus Protein Dual Color Standards	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
RIPA-Puffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Schwefelsäure (1N)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau-Lösung 0,4%	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin-EDTA-Lösung (1X)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween 20 Detergens	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Wasser steril, pyrogenfrei, hypotonisch	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Western Lightning Plus-ECL	PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA
WesternFroxx Solution B anti-rabbit-HRP	neoFroxx GmbH, Einhausen, Deutschland
WesternFroxx Stripping Puffer	neoFroxx GmbH, Einhausen, Deutschland
WesternFroxx Waschlösung (10X)	neoFroxx GmbH, Einhausen, Deutschland

Tabelle 4: Verwendete Kits und Hersteller

Produkt	Hersteller
DuoSet ELISA (HGF, IL6, MMP9, VEGFA)	R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA
OneTaq RT-PCR Kit	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Total RNA Purification Plus Micro Kit	Norgen Biotek Corp. Thorold, ON, Kanada

Tabelle 5: Verwendete qPCR-Primer mit Amplifikationsgröße in Basenpaaren (bp) und Hersteller

Primer	Amplifikationsgröße	Katalog-Nr.	Hersteller
ACTA2	83 bp	QT00088102	QIAGEN N.V., Venlo, Niederlande
CCL2	60 bp	QT00212730	QIAGEN N.V., Venlo, Niederlande
COL1A1	118 bp	QT00037793	QIAGEN N.V., Venlo, Niederlande
COL4A1	119 bp	QT00005250	QIAGEN N.V., Venlo, Niederlande
GUSB	96 bp	QT00046046	QIAGEN N.V., Venlo, Niederlande
HAS2	127 bp	QT00027510	QIAGEN N.V., Venlo, Niederlande
HGF	92 bp	QT00065695	QIAGEN N.V., Venlo, Niederlande
IL6	107 bp	QT00083720	QIAGEN N.V., Venlo, Niederlande
MMP2	96 bp	QT02395778	QIAGEN N.V., Venlo, Niederlande
MMP9	115 bp	QT00040040	QIAGEN N.V., Venlo, Niederlande
NFkB	136 bp	QT02324308	QIAGEN N.V., Venlo, Niederlande
PAX6	113 bp	QT00071169	QIAGEN N.V., Venlo, Niederlande
TBP	132 bp	QT00000721	QIAGEN N.V., Venlo, Niederlande
TIMP1	115 bp	QT00084168	QIAGEN N.V., Venlo, Niederlande
TGF- β 1	108 bp	QT00000728	QIAGEN N.V., Venlo, Niederlande
VEGFA	150, 204, 222, 273 bp	QT01010184	QIAGEN N.V., Venlo, Niederlande

Tabelle 6: Verwendete Antikörper mit Wirtsspezies, Molekulargewicht, Verdünnung und Hersteller

Antikörper	Wirtsspezies	Molekulargewicht	Verdünnung	Artikelnummer	Hersteller
α -SMA	Kaninchen	42 kDa	1:1000	19245	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
MMP9	Kaninchen	84, 92 kDa	1:1000	3852	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
NFkB	Kaninchen	65 kDa	1:1000	8242	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
PAX6	Kaninchen	46, 48 kDa	1:500	AB2237	EMD Millipore Corp., Temecula, CA, USA

4.3 Methoden

4.3.1 Zellkultur - Allgemein

Zur Kontaminationsvermeidung mit Bakterien und Pilzen wurde die Zellkultivierung stets unter einer sterilen Werkbank der Klasse II und unter Beachtung aseptischer Techniken durchgeführt. Die verwendeten Kulturmedien wurden zusätzlich mit einem Volumenprozent Penicillin-Streptomycin (P/S) ergänzt. Die Morphologie und Konfluenz der Zellkultur wurde täglich lichtmikroskopisch beurteilt. Die Zellen wurden bei 37 °C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% Kohlenstoffdioxid-Atmosphäre in einem Inkubator kultiviert. Vor Verwendung der Kulturmedien erfolgte eine Erwärmung im Wasserbad. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, sofern nicht anders angegeben.

4.3.2 Isolierung und Zellkultur der limbalen Fibroblasten

Die Limbusfibroblasten wurden aus Biopsien vor einer Hornhautentnahme von sechs gesunden Spendern und aus intraoperativen Limbus-Biopsien von fünf Patienten mit kongenitaler Aniridie isoliert. Die Gewebestücke wurden über Nacht bei 37 °C in einem 1,5 ml Reagiergefäß in einer Mischung aus 100 µl Collagenase A (4 mg/ml) und 700 µl serumfreies Keratinozyten-Medium (KSFM) + 0,05 mg/ml Rinderhypophysenextrakt (BPE) + 0,005 µg/ml epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) + 1% P/S inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Zellsuspension mit einer Mikropipette durchmischt, für weitere 5 min inkubiert und durch ein mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) angefeuchtetes Flowmi-Zellsieb mit 40 µm Porengröße in einen 12-Well filtriert und mit 500 µl PBS nachgespült. Das Zellgemisch wurde anschließend zur Sedimentation der Fibroblasten und Entfernung der Kollagenase für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert, das Zellpellet in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + 5% fetales Kälberserum (FCS) + 1% P/S aufgenommen und in einen 6-Well mit einem Gesamtvolumen von 2,5 ml DMEM + 5% FCS + 1% P/S ausgesät.

Nach Erreichen einer Konfluenz erfolgte die Subkultivierung zunächst in eine 75 cm² Kulturflasche mit 10 ml DMEM + 5% FCS + 1% P/S und nachfolgend in sechs 75 cm² Kulturflaschen, die für die Versuche jedes Spenders erforderlich waren. Hierfür wurde zunächst das Zellkulturmedium verworfen, die serumhaltigen Rückstände mit PBS einmalig ausgewaschen und eine Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung zum enzymatischen Verdau der Adhäsionsmoleküle beigegeben (0,5 ml Trypsin je 24-Well, 1,0 ml Trypsin je 12-Well, 1,5 ml Trypsin je 6-Well und 4 ml Trypsin je 75 cm² Kulturflasche). Nach 7-minütiger Inkubation im Brutschrank wurde die Trypsinaktivität durch Zugabe eines äquivalenten Volumens des serumhaltigen DMEM neutralisiert. Die abgelösten Zellen wurden wie zuvor beschrieben zentrifugiert, resuspendiert und in ein neues Kulturgefäß ausgesät. Das Kulturmedium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt.

4.3.3 Isolierung und Zellkultur der limbalen Epithelzellen

Die limbalen Epithelzellen wurden aus korneoskleralen Scheiben von 15 gesunden Spendern isoliert. Das Spendergewebe wurde in einer Petrischale einmalig mit PBS gespült, die Limbusregion unter Verwendung eines Stereomikroskops mit 40-facher Vergrößerung identifiziert und zirkulär mit einer 1,5 mm Einmal-Biopsiestanze präpariert. Die runden Gewebestücke wurden mit einer chirurgischen Mikroschere vom darunterliegenden Gewebe abgetrennt und zum enzymatischen Verdau über Nacht in einen 24-Well mit 100 µl Collagenase A (4 mg/ml) und 700 µl KSFM + 0,05 mg/ml BPE + 0,005 µg/ml EGF + 1% P/S gegeben. Am nächsten Tag wurde das Zellgemisch mit einer Mikropipette wiederholt auf- und abpipettiert, weitere 5 min inkubiert und anschließend in einen CellTrics-Zellseparator mit einer Porengröße von 20 µm, der einem 15 ml Zentrifugenröhrchen aufsaß, überführt. Durch langsame Zugabe von 10 ml PBS konnten die vereinzelt Fibroblasten ausgewaschen werden, wohingegen die in Clustern verdichteten Epithelzellen im Filter verblieben. Der Filter wurde über einem 6-Well gedreht und mit 2,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung ausgewaschen. Es folgten zur Vereinzelung der Epithelzellen zwei Inkubationsschritte über 5 min bei 37 °C im Brutschrank, wobei zwischendurch mit einer Mikropipette homogenisiert wurde. Die Wirkung von Trypsin wurde durch Zugabe von 2,5 ml DMEM + 5% FCS beendet und das Zellpellet in einem 15 ml Tube bei 200 g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in 500 µl KSFM + 0,05 mg/ml BPE + 0,005 µg/ml EGF + 1% P/S resuspendiert und in einen unbeschichteten 24-Well transferiert. Bei Erreichen einer Konfluenz von 80% wurden die Zellen nach obigem Schema passagiert, zunächst in zwei 12-Wells mit je 1,5 ml Kulturmedium, dann in vier 12-Wells und zuletzt in vier 6-Wells mit je 2,5 ml KSFM + 0,05 mg/ml BPE + 0,005 µg/ml EGF + 1% P/S. Das Kulturmedium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt.

4.3.4 Zellkultur der Epithelzelllinie

Aufgrund des Mangels an limbalen Epithelzellproben von Spendern mit kongenitaler Aniridie wurde eine immortalisierte, PAX6-defiziente Epithelzelllinie als Modell verwendet. Die Immortalisierung der Epithelzellen wurde durch die Reaktivierung der Telomerase erzielt. In einem weiteren Schritt wurde mittels der CRISPR/Cas9-Technologie eine heterozygote Nonsense-Mutation, die ein vorzeitiges Stoppcodon bedingt, in das PAX6-Gen eingeführt, was eine reduzierte Expression von PAX6 zur Folge hat [71]. Für die Kultivierung der Zelllinie wurde das Kulturmedium der primären limbalen Epithelzellen, bestehend aus KSFM + 0,05 mg/ml BPE + 0,005 µg/ml EGF + 1% P/S, mit zusätzlich 0,4 mmol/l Calciumchlorid (CaCl₂) und 2 mmol/l Glutamin, entsprechend des Protokolls von Roux et al., supplementiert [71]. Die Zugabe von CaCl₂ und Glutamin fördert die Lebensfähigkeit und das Wachstum von sich schnell teilenden Zellen. Vor der Passage in einen 6-Well wurde die Zellzahl mittels Neubauer-

Zählkammer bestimmt und die Zellen zu einer Dichte von 4.200 Zellen pro cm^2 ausgesät. Das schnellere Wachstumsverhalten der Zelllinie wurde berücksichtigt, um ein Überschreiten der angestrebten Konfluenz bis zur Sammlung des CM zu vermeiden. Zur Ermittlung der Zellzahl wurde das abzentrifugierte Zellpellet nach der Zellernte in 1 ml KSFM + 0,05 mg/ml BPE + 0,005 $\mu\text{g/ml}$ EGF + 1% P/S resuspendiert und 20 μl der Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:5 mit 80 μl Trypanblau verdünnt. Ein Teil der Lösung wurde in die Zählkammer eingegeben und unter dem Lichtmikroskop wurden stets 4 Quadranten ausgezählt. Die übrige Zellkultivierung erfolgte analog zu den pLEC.

4.3.5 Sammlung und Pooling des konditionierten Mediums

Der Zellkulturüberstand der Epithelzellen wurde nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden und bei einer Zielkonfluenz von 60-80% ausschließlich von 6-Wellns gesammelt (Abb. 3). Während der Konditionierung wurde auf die zusätzliche Supplementierung der Epithelzelllinie mit CaCl_2 und Glutamin verzichtet. Zur Entfernung der Zelldebris wurde das CM bei 3000 g über 5 min zentrifugiert und der Überstand in einem neuen 15 ml Zentrifugenröhrchen bis zum Pooling bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ zwischengelagert. Das CM wurde überwiegend von Zellen der Passagen 2 bis 3 bei den primären Epithelzellen und von Zellen der Passagen 71 bis 76 bei der Epithelzelllinie gesammelt. Die einzeln aliquotierten Epithelzellüberstände wurden langsam bei Raumtemperatur aufgetaut und in einer 75 cm^2 Kulturflasche gepoolt. Nachfolgend wurde das CM durch einen $0,22\text{ }\mu\text{m}$ Spritzenvorsatzfilter in eine weitere 75 cm^2 Kulturflasche steril filtriert. Die Proteinkonzentration des CM der primären Epithelzellen und der Epithelzelllinie wurde mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Assay, entsprechend den Anweisungen des Herstellers, in einer 96-Well-Mikrotiterplatte bestimmt. Die Proteinkonzentration des konditionierten Mediums der PAX6-defizienten Epithelzelllinie (mut-LSC-CM) wurde durch eine geringgradige Verdünnung mit KSFM + 0,05 mg/ml BPE + 0,005 $\mu\text{g/ml}$ EGF + 1% P/S angeglichen. Die Epithelzellüberstände wurden in geeigneten Volumina in mehreren 50 ml Falcon-Tubes aliquotiert und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ zwischengelagert. Das Medium wurde innerhalb von drei Monaten verbraucht.

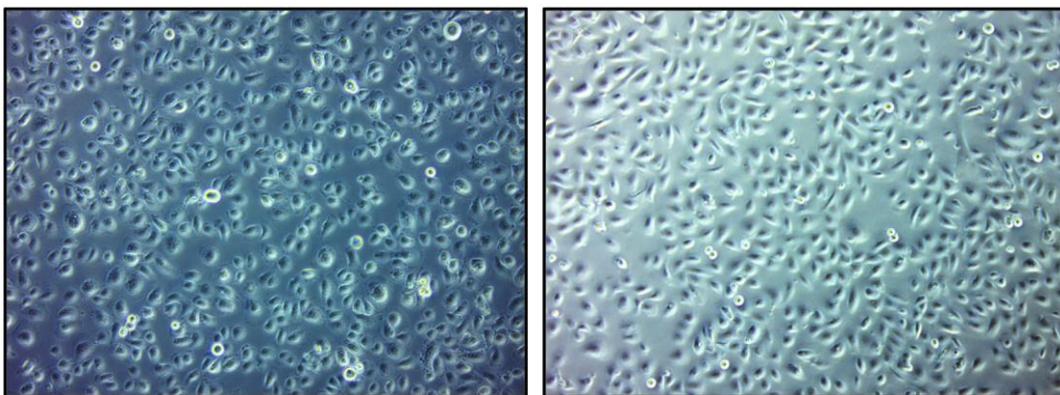


Abbildung 3: Zellkultur von primären limbalen Epithelzellen (pLEC, links) und der Epithelzelllinie (mut-LSC, rechts) bei einer Konfluenz von 80%.

4.3.6 Behandlung und Zellernte der limbalen Fibroblasten

Nach Erreichen einer Konfluenz von 90% in den Fibroblastenkulturen wurde das CM langsam bei Raumtemperatur aufgetaut. Das Kontrollmedium (Ctrl-M), bestehend aus KSFM + 0,05 mg/ml BPE + 0,005 µg/ml EGF + 1% P/S sowie das konditionierte Medium der primären Epithelzellen (pLEC-CM) und das mut-LSC-CM wurden in einem Volumenverhältnis von 1:1 mit DMEM + 1% P/S ohne FCS verdünnt. Der Überstand der Fibroblastenkulturen wurde verworfen und die 75 cm² Kulturflaschen wurden einmalig mit 10 ml PBS ausgewaschen, um serumhaltige Rückstände zu entfernen. Es wurden entweder 10 ml des verdünnten Ctrl-M oder des verdünnten CM auf eine Kulturflasche verteilt und anschließend über 48 Stunden im Inkubator bebrütet (Abb. 4). Die behandelten Fibroblasten wiesen eine Passagennummer zwischen 5 bis 7 auf. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Zellüberstand der Fibroblasten in ein 15 ml Falcon-Tube überführt, bei 3000 g für 5 min zur Entfernung der Zelldebris zentrifugiert und in 2 ml Tubes bei -80 °C zwischengelagert. Die Zellernte erfolgte analog zum Schema der Subkultivierung durch Zugabe von 4 ml Trypsin-EDTA-Lösung in eine 75 cm² Kulturflasche über 7 min. Das Ablösen der Fibroblasten wurde durch leichtes Beklopfen der Kulturflasche mechanisch unterstützt und die Trypsinreaktion nach Kontrolle der Adhärenz unter dem Lichtmikroskop mit 4 ml DMEM + 5% FCS + 1% P/S beendet. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen übertragen, die 75 cm² Kulturflasche einmalig mit 4 ml PBS ausgespült und anschließend bei 1500 rpm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert und in einem 1,5 ml Reagiergefäß bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

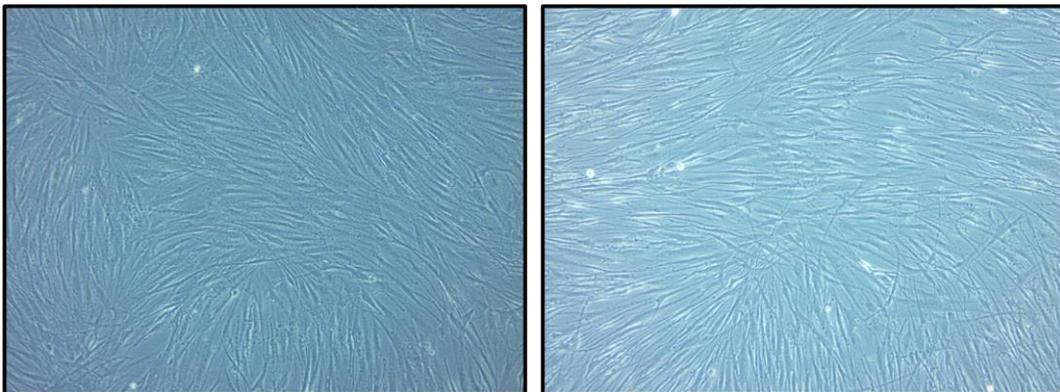


Abbildung 4: Gesunde, limbale Fibroblasten vor (links) und nach Behandlung über 48 Stunden mit konditioniertem Medium der primären limbalen Epithelzellen (rechts).

4.3.7 Isolation und Konzentrationsbestimmung der Ribonukleinsäure

Die Isolation der Ribonukleinsäuren (RNA) erfolgte zeitnah nach Zellernte mit dem Total RNA Purification Plus Micro Kit, welches auf dem Prinzip der Spin-Säulenchromatographie basiert. Alle Arbeitsschritte zur Vorbereitung der quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) wurden zur Vermeidung einer Kontamination mit Filterspitzen ausgeführt. Als optionaler Schritt wurde dem Lysepuffer 3,5 µl β-Mercaptoethanol beigegeben, um einer Degradierung der RNA durch Ribonukleasen vorzubeugen. Die RNA wurde nach Anweisungen des Herstellers isoliert, mit absolutiertem Ethanol ausgefällt und mit der beigefügten Wash Solution A gewaschen. Die aufgereinigte RNA wurde mit 30 µl der Elution Solution A eluiert. Die RNA-Konzentration wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem ScanDrop 100 Spektralphotometer von Analytik Jena in einer 1:10 Verdünnung mit Nuklease-freiem Wasser bestimmt. Als Blindwert dienten 50 µl Nuklease-freies Wasser. Die isolierte RNA wurde mittels der Quotienten aus A260/A230 und A260/A280 auf Reinheit überprüft und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C zwischengelagert.

4.3.8 Synthese der komplementären Desoxyribonukleinsäure

Die komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA), welche als Template für die qPCR erforderlich ist, wurde unter Verwendung des OneTaq RT-PCR Kits synthetisiert. Für die cDNA-Synthese wurde jeweils 1 µg RNA in ein 0,2 ml PCR-Tube pipettiert, wobei das hierfür benötigte Volumen entsprechend der zuvor spektralphotometrisch bestimmten Konzentration berechnet wurde. Zunächst wurden RNA und Oligo-dT-Primer, die eine selektive Amplifikation der Messenger-Ribonukleinsäuren (mRNA) gewährleisten, für 5 min bei 70 °C im MiniAmp Thermocycler inkubiert, um eine Denaturierung der RNA mit Anlagerung der Primer zu ermöglichen. Im Anschluss wurden dem RNA-Ansatz die bereitgestellten Komponenten M-MuLV Enzyme Mix und M-MuLV Reaction Mix zugegeben und für eine Stunde bei 42 °C inkubiert. Die Reverse Transkriptase wurde durch 5-minütiges Erhitzen auf 80 °C inaktiviert, die synthetisierte cDNA mit 30 µl Nuklease-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 50 µl verdünnt und bei -20 °C aufbewahrt.

4.3.9 Quantitative Polymerasekettenreaktion

Bei der qPCR handelt es sich um ein molekularbiologisches Verfahren zur Amplifikation von Primer-spezifischen Nukleinsäuren mit anschließender Messung der entstehenden Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Menge. Den PCR-Schritten wurde eine initiale Denaturierung bei 95 °C für 5 min vorgeschaltet. Während der qPCR wurden insgesamt 40 Zyklen mit den drei Phasen Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation durchlaufen (Abb. 5). Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleinsäuren der doppelsträngigen DNA wurden bei 95 °C für 10 s aufgehoben, sodass das Template als Einzelstrang vorliegt und sich

die Primer bei 60 °C für 30 s an die jeweilige Zielsequenz anlagern können. Die Taq-Polymerase kann nun entlang des Einzelstrangs den komplementären DNA-Strang synthetisieren. Aufgrund der Kürze der replizierten DNA-Sequenzen konnte die Elongation bei vorliegendem PCR-Profil während des Hochheizens auf 95 °C realisiert werden, ohne dass eine separate Elongationsphase programmiert werden musste. Das emittierte Signal des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR-Green, der interkalierend an die doppelsträngige DNA bindet, wurde am Ende jedes Zyklus gemessen. Die Signalintensität ist somit proportional zur Menge der amplifizierten DNA und wird als Schwellenwertzyklus (Ct) erfasst, sobald sie die Hintergrundfluoreszenz überschreitet. Nach Abschluss der Amplifikationsphase wurde eine Schmelzkurvenanalyse ausgeführt, um Sequenzabweichungen und Verunreinigungen zu detektieren. Zur Bestimmung der Schmelztemperatur, bei der die Hälfte der PCR-Produkte als Einzelstrang vorliegt, wurde das Fluoreszenzsignal während des Temperaturanstiegs auf 95 °C kontinuierlich gemessen. Um eine gleichmäßige Verteilung des Reaktionsvolumens mit Enzym, Primern, freien Nukleotiden und SYBR-Green innerhalb der 96-Well-Platte sicherzustellen, wurde zunächst ein Reaktionsmix pro Einzelreaktion aus 1 µl Primer, 5 µl AceQ SYBR Green Master Mix und 3 µl Nuklease-freiem Wasser angesetzt. Das Reaktionsvolumen von insgesamt 9 µl wurde je Well vorgelegt und um 1 µl cDNA erweitert. Für die Genexpressionsanalyse von PAX6, welches in limbalen Stromazellen nur gering exprimiert ist, wurde ein abweichendes, empirisches PCR-Profil mit 5 µl Primer, 5 µl AceQ SYBR Green Master Mix, 3 µl Nuklease-freiem Wasser und 10 µl cDNA pro Well verwendet, um stabilere Schmelzkurven zu erhalten und mögliche Expressionsunterschiede erfassen zu können. Jede Patientenprobe wurde stets doppelt pipettiert. Die PCR-Platte wurde mit einer hitzebeständigen Folie versiegelt und für 15 s in eine Plattenzentrifuge eingegeben. Die qPCR-Reaktionen und die quantitativen Messungen wurden mithilfe des QuantStudio 5 Real-Time PCR Systems durchgeführt. Die von der QuantStudio Design & Analysis Software ermittelten Ct-Werte wurden nach Kontrolle der Schmelzkurven sowie der Genauigkeit der Doppelwertbestimmung in eine Excel-Datei überführt und gemäß der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ausgewertet. Zur Normalisierung wurden die Ct-Werte der Zielgene auf das arithmetische Mittel der Ct-Werte der Referenzgene TATA-Box bindendes Protein (TBP) und β -Glucuronidase (GUSB) bezogen. Die LFC mit Ctrl-M dienten als Bezugsgruppe für die Berechnung der Fold changes (FC).

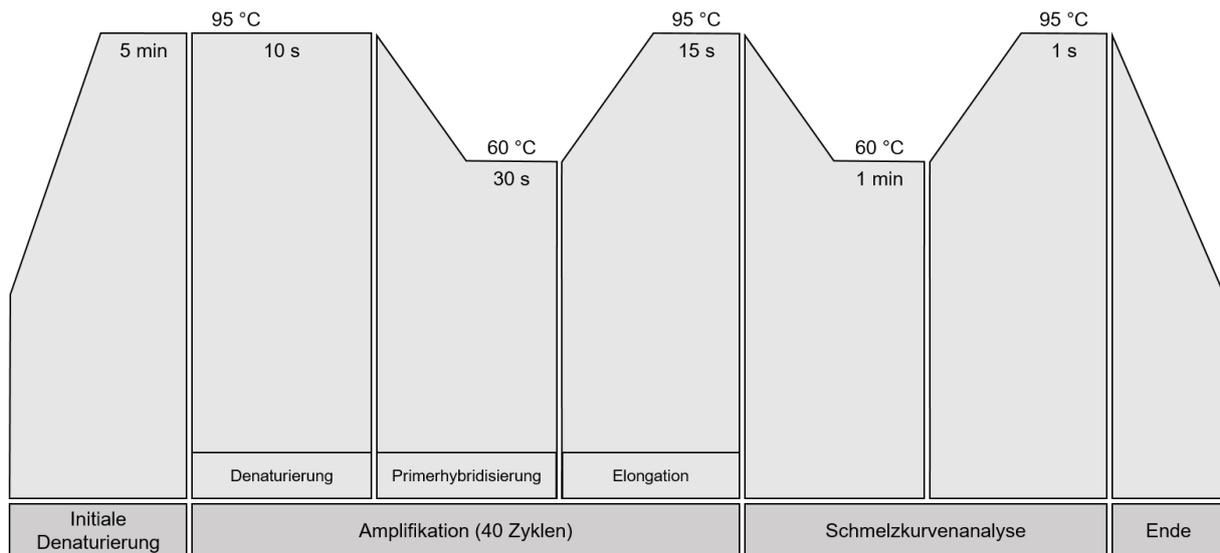


Abbildung 5: Verwendetes PCR-Profil - Initiale Denaturierung (95 °C für 5 min), PCR-Stage (40 Zyklen) mit Denaturierung (95 °C für 10 s), Primerhybridisierung (60 °C für 30 s) und Elongation sowie anschließender Schmelzkurvenanalyse (Eigene Darstellung).

4.3.10 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Proteine können mittels eines Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) aus Zellkulturüberständen oder Zelllysaten nachgewiesen und quantifiziert werden. Bei der vorliegenden Arbeit wurden DuoSet ELISA-Kits, die auf dem Prinzip des Sandwich-ELISA basieren, verwendet. Es wurden die Proteinkonzentrationen von Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF), Interleukin 6 (IL6), MMP9 und vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A (VEGFA) aus den Zellkulturüberständen gemessen. Die Proteinexpressionsanalyse wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und sämtliche Proben wurden in Doppelwerten untersucht. Der Capture-Antikörper wurde zunächst mit PBS auf die erforderliche Arbeitskonzentration verdünnt, unmittelbar auf eine 96-Well-Platte mit hoher Bindungskapazität zu 100 µl je Well verteilt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Während den Inkubationsschritten war die ELISA-Platte stets mit einer Folie abgedichtet. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift mit 400 µl Wash Solution (PBS + 0,05% TWEEN 20), der sich fortlaufend über die Durchführung des ELISA wiederholte, mit anschließender Auftragung von 300 µl Reagent Diluent (RD; PBS + 1% Rinderserumalbumin (BSA)) je Well bei Raumtemperatur für mindestens eine Stunde, um unspezifische Bindungen nachfolgender ELISA-Reagenzien zu verhindern. Der Blockpuffer wurde ausgewaschen und 100 µl des Proteinstandards mit bekannter Konzentration unverdünnt sowie in einer kaskadenartigen Verdünnungsreihe in 100 µl RD zugegeben. Zusätzlich wurden je 100 µl Probe und zur Blindwertkorrektur 100 µl Kulturmedium (DMEM (+ 1% P/S) + KSFM (+ 0,05 mg/ml BPE + 0,005 µg/ml EGF + 1% P/S) im Verhältnis 1:1) über 2 Stunden aufgetragen. Nach einem weiteren Waschschrift wurde der an Biotin gekoppelte Detection-Antikörper in RD auf die Arbeitskonzentration verdünnt und für 2 Stunden auf der Platte zur Bildung des Antikörper-

Antigen-Antikörper-Komplex belassen. Die Platte wurde erneut gewaschen und mit je 100 µl Streptavidin-Meerrettichperoxidase (HRP), welches eine starke Bindungsaffinität zu Biotin aufweist, verdünnt in RD für 20 min inkubiert. Eine direkte Lichteinwirkung wurde in dieser Zeit vermieden. Nach einem letzten Waschschrift wurden 100 µl Substrat, bestehend aus einer Lösung aus Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Tetramethylbenzidin im Mischungsverhältnis 1:1 für 20 min bei Raumtemperatur zugegeben und die durch HRP-katalysierte Reaktion wurde mit 50 µl Schwefelsäure (H₂SO₄) beendet. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm mit dem Infinite F50 Absorptions-Mikroplatten-Reader von Tecan gemessen. Die Proteinkonzentrationen aus dem Überstand wurden auf den Proteingehalt der zugehörigen Zellpellets bezogen (pg Antigen / mg Protein) und an den LFC mit Ctrl-M normalisiert. Die erhaltenen relativen Unterschiede wurden für die graphische Darstellung und statistische Auswertung genutzt.

4.3.11 Western Blot

Für die Proteinexpressionsmessungen mittels Western Blot wurden Zellpellets von jeweils 3 gesunden Spendern und 3 Aniridie-Spendern verwendet.

4.3.11.1 Proteinextraktion und quantitative Proteinbestimmung

Die Lyse der Zellpellets aus den 75 cm² Kulturflaschen erfolgte auf Eis mit 50 µl Radioimmunpräzipitationspuffer (RIPA-Puffer) über einen Zeitraum von 15 min. Eine ausreichende Homogenisierung wurde mit einem Vortexmischer erzielt. Die Zelldebris wurde bei 14.000 g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert und der Proteinüberstand in ein neues Reagiergefäß überführt. Zur quantitativen Proteinbestimmung wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit gemäß den Anweisungen des Herstellers genutzt. Das Messverfahren beruht auf der Reduktion von Kupfer (Cu)²⁺-Ionen zu Cu¹⁺-Ionen in Gegenwart von Proteinen in einer alkalischen Umgebung. Die Komplexbildung der Cu¹⁺-Ionen mit der BCA führt zu einem Farbumschlag, dessen Intensität photometrisch mit einem Absorptions-Mikroplatten-Reader bei einer Wellenlänge von 562 nm erfasst werden konnte. Jede Probe wurde in doppelter Ausführung auf einer 96-Mikrotiterplatte gemessen und BSA wurde in absteigender Konzentration zur Erstellung der Standardkurve pipettiert. Die Proteinüberstände wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C zwischengelagert.

4.3.11.2 Gelelektrophorese

Das Proteingemisch wurde auf Grundlage der Molekülmasse mit einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Entsprechend der zuvor bestimmten Proteinkonzentration des Zelllysats wurden 20 µg Protein mit 5 µl Laemmli-Probenpuffer (4X) mit einem Zusatz von 10% β-Mercaptoethanol in ein Reagiergefäß pipettiert. Der Probenpuffer wird zur Vorbereitung von Proteinproben eingesetzt und enthält unter anderem das anionische Detergens

Natriumdodecylsulfat (SDS), welches denaturierend wirkt und die Eigenladung des Proteins überlagert, wodurch eine Separierung nach Molekülmasse ermöglicht wird. Das β -Mercaptoethanol reduziert Disulfidbindungen in der Tertiärstruktur von Proteinen und trägt somit zum entfalteten Zustand bei. Das Proteingemisch wurde im Anschluss bei 95 °C für 5 min im Thermoblock erhitzt und direkt auf Eis zur Erhaltung der entfalteten Proteinstruktur abgekühlt. Die Elektrophorese erfolgte in einer vertikalen, mit 3-Morpholinopropansulfonsäure-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer unter Verwendung eines vorgefertigten Polyacrylamidgels, welches einen 4- bis 12-prozentigen Konzentrationsgradienten aufwies. Das gesamte Probenvolumen wurde in die Gelvertiefungen übertragen und 1,5 μ l Proteinstandard, der Proteine bekannter Größe enthält, wurde als Referenz in eine separate Gelvertiefung gegeben. Die negativ geladenen Proteine wurden bei einer konstanten Spannung von 100 V aufgetrennt bis die Bromphenolblau-gefärbte Farbstofffront das Ende des Gels erreichte.

4.3.11.3 Proteintransfer und Antikörper-Inkubation

Die Proteine des Polyacrylamidgels wurden mithilfe des Trans-Blot Turbo Transfer Systems und den zugehörigen Transfer Packs, basierend auf der Semi-Dry Blot-Methode, auf die Nitrocellulosemembran übertragen. Der Proteintransfer wurde nach dem Herstellerprotokoll unter Anlage eines konstanten Stroms von 1,3 A und 25 V über 10 min durchgeführt. Anschließend wurde die Membran dreimalig mit 10 ml Waschpuffer für jeweils 5 min gewaschen. Es erfolgte eine Markierung des Gesamtproteins mit dem No-Stain Protein Labeling Reagent, um eine Normalisierung der Zielproteine auf den Gesamtproteingehalt zu ermöglichen. Nach einem weiteren Waschschrift wurde der gewünschte Primärantikörper in einem Verhältnis von 1:1000 (Ausnahme 1:500 bei PAX6) mit der anti-rabbit WesternFroxx-Lösung, die sich aus einem an HRP-konjugierten Sekundärantikörper und einem Blocking-Reagenz zusammensetzt, verdünnt und mit der Membran über Nacht bei 4 °C unter sanfter Agitation inkubiert. Die Antikörperlösung wurde dreimal ausgewaschen, das Luminol-haltige Enhanced Chemiluminescence-Substrat für 1 min auf die Membran aufgetragen und das Signal der Chemilumineszenz-Reaktion mit dem iBright CL1500-Geldokumentationssystem registriert. Vor der Inkubation mit einem weiteren Antikörper wurde die Membran dreimal gewaschen und die vorherige Antikörperbindung durch Zugabe von 5 ml WesternFroxx Stripping-Puffer für 30 min bei Raumtemperatur gelöst, insofern eine Interferenz der Proteinbanden zu erwarten war. Die Proteinbanden wurden mit der iBright Analysis Software ausgewertet. Die hintergrundbereinigten Signalstärken wurden auf den Gesamtproteingehalt normalisiert und als relative Proteinexpressionswerte auf die LFC mit Ctrl-M bezogen.

4.3.12 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (Two-way ANOVA) mit nachfolgendem Dunnett's-Test für paarweise Vergleiche mit dem Ctrl-M als Referenz durchgeführt. Des Weiteren erfolgte die statistische Analyse bei Vergleich der LFC und AN-LFC mithilfe eines Mann-Whitney-U-Tests. P-Werte $\leq 0,05$ wurden hierbei als statistisch signifikant gewertet. Die graphische Darstellung und Datenanalyse wurde unter Verwendung der Statistiksoftware GraphPad Prism 10.1.2 realisiert und bei den erstellten Abbildungen wurden der geometrische Mittelwert und die Standardabweichung angegeben.

5 Ergebnisse

5.1 Paired Box Protein 6

Trotz eines angepassten PCR-Profiles für niedrig exprimierte Gene unter Verwendung der 10-fachen cDNA-Menge wiesen die LFC- ($Ct_{\text{mean}}=31,58$) und AN-LFC-Kontrollgruppen ($Ct_{\text{mean}}=32,85$) sehr hohe Ct-Werte auf.

Es zeigte sich auf Genexpressionsebene keine signifikante Herunterregulierung von PAX6 in den AN-LFC-Gruppen im Vergleich zu den LFC-Gruppen. Es konnte keine signifikante Veränderung der mRNA-Expression von PAX6 unter Behandlung mit dem CM beobachtet werden (Abb. 6).

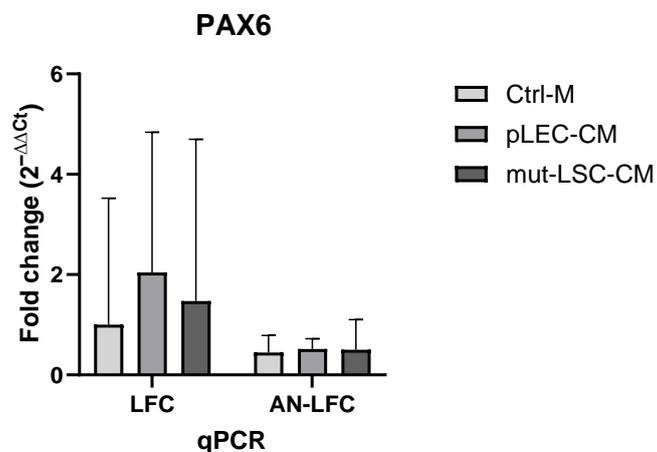


Abbildung 6: Graphische Darstellung der Genexpressionsdaten (Fold changes) von PAX6 bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (LFC n=6 / AN-LFC n=5).

Die Proteinexpressionsmessung von PAX6 erfolgte mittels Western Blot aus den Zelllysaten der Fibroblastenpopulationen (n=3) unter Verwendung einer 1:500 Verdünnung des Primärantikörpers. Trotz einer 30-minütigen Belichtungsdauer unter selektiver Auswahl des PAX6-Bereichs auf der Membran konnten keine Proteinbanden von PAX6 visualisiert werden.

5.2 Kollagen Typ I alpha 1

Die mRNA-Expression von Kollagen Typ I alpha 1 (COL1A1) hat sich weder in der LFC-Gruppe, noch in der AN-LFC-Gruppe signifikant verändert. Auch im Vergleich zwischen den Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede (Abb. 7).

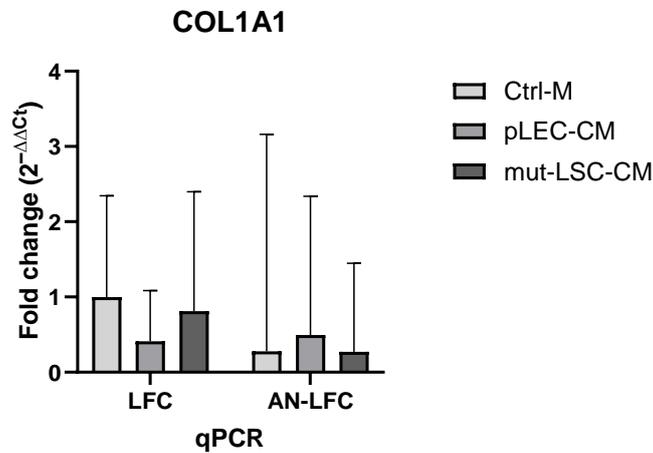


Abbildung 7: Graphische Darstellung der Genexpressionsdaten (Fold changes) von COL1A1 bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (LFC n=6 / AN-LFC n=5).

5.3 Kollagen Typ IV alpha 1

In der AN-LFC-Gruppe zeigte sich die Genexpression von Kollagen Typ IV alpha 1 (COL4A1) unter Behandlung mit dem pLEC-CM signifikant hochreguliert ($FC_{\text{mean}}=2,92$ - $p=0,008$). In der LFC-Gruppe mit pLEC-CM war hingegen kein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression von COL4A1 zu beobachten (Abb. 8).

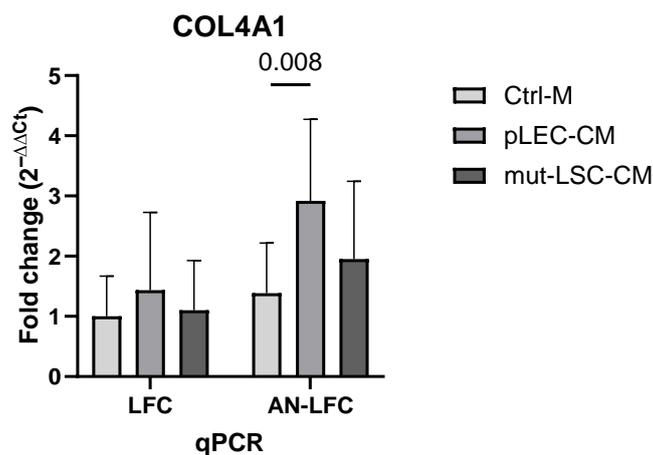


Abbildung 8: Graphische Darstellung der Genexpressionsdaten (Fold changes) von COL4A1 bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (LFC n=6 / AN-LFC n=5).

5.4 Hyaluronsäure-Synthase 2

Es konnte kein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression von Hyaluronsäure-Synthase 2 (HAS2) zwischen den LFC- und AN-LFC-Gruppen sowie nach Behandlung mit CM detektiert werden (Abb. 9).

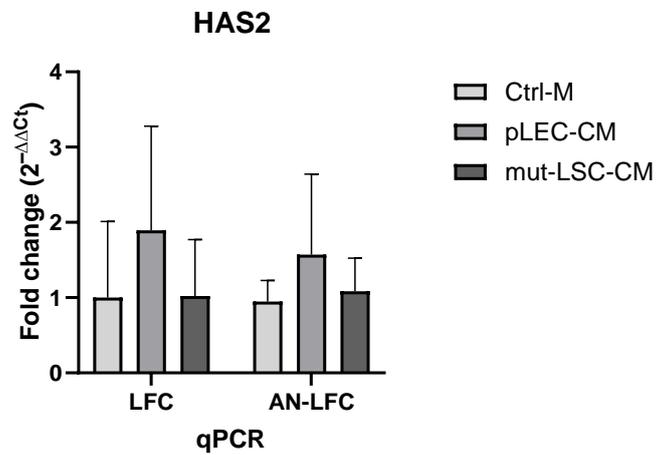


Abbildung 9: Graphische Darstellung der Genexpressionsdaten (Fold changes) von HAS2 bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (LFC n=6 / AN-LFC n=5).

5.5 Matrix-Metalloproteinase 2

Die Behandlung der AN-LFC mit pLEC-CM führte zu einer signifikanten Zunahme der Genexpression von MMP2 ($FC_{\text{mean}}=1,65$ - $p=0,01$) (Abb. 10). Es konnte kein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression von MMP2 zwischen den LFC- und AN-LFC-Gruppen festgestellt werden.

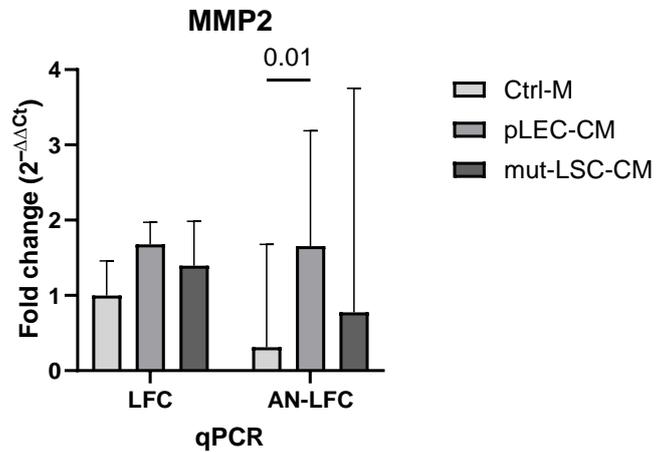


Abbildung 10: Graphische Darstellung der Genexpressionsdaten (Fold changes) von MMP2 bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (LFC n=6 / AN-LFC n=5).

5.6 Matrix-Metalloproteinase 9

Auf molekularer Ebene wird die MMP9 in der LFC- ($C_{t_{\text{mean}}}=31,69$) und AN-LFC-Kontrollgruppe ($C_{t_{\text{mean}}}=31,49$) kaum exprimiert. Es konnten keine statistisch signifikanten Veränderungen der MMP9-mRNA-Expression innerhalb oder zwischen den LFC- und AN-LFC-Gruppen ermittelt werden (Abb. 11).

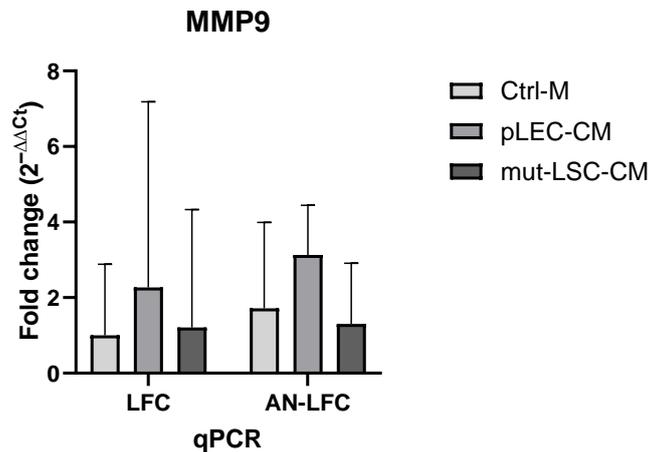


Abbildung 11: Graphische Darstellung der Genexpressionsdaten (Fold changes) von MMP9 bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (LFC n=6 / AN-LFC n=5).

Die Proteinkonzentration von MMP9 in den Zellkulturüberständen wurde mittels eines Sandwich-ELISA bestimmt. Im pLEC-CM (1120 pg MMP9/ml) konnte im Vergleich zum mut-LSC-CM (162 pg MMP9/ml) eine deutlich höhere MMP9-Proteinkonzentration gemessen werden. Durch die hohe Ausgangskonzentration von MMP9 im CM ist eine „Blank-Korrektur“ nicht möglich und somit die statistische Auswertung der ermittelten MMP9-Konzentrationen nach Behandlung der Fibroblasten stark limitiert. Aus diesem Grund erfolgte für MMP9 keine Normalisierung der Proteinkonzentrationen im Zellkulturüberstand auf den Proteingehalt der zugehörigen Zellpellets der Limbusfibroblasten (Abb. 12).

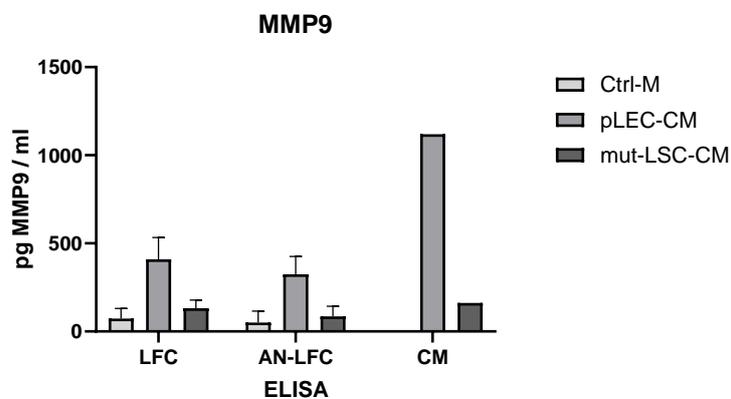


Abbildung 12: Graphische Darstellung der ELISA-Proteinexpressionsdaten von MMP9 (LFC n=6 / AN-LFC n=5).

MMP9 konnte in den Zelllysaten der Fibroblasten mittels Western Blot bei einer Verdünnung des Primärantikörpers von 1:1000 nicht nachgewiesen werden.

5.7 Gewebsinhibitor der Metalloproteinase 1

Die mRNA-Expression von Gewebsinhibitor der Metalloproteinase 1 (TIMP1) ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den LFC- und den AN-LFC-Gruppen sowie keine signifikanten Veränderungen als Reaktion auf das CM (Abb. 13).

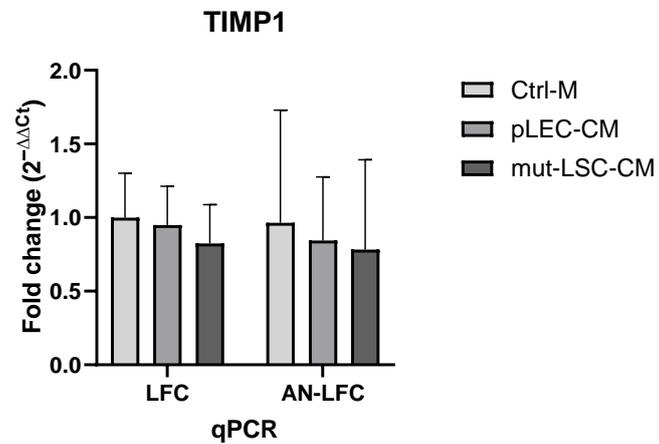


Abbildung 13: Graphische Darstellung der Genexpressionsdaten (Fold changes) von TIMP1 bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (LFC n=6 / AN-LFC n=5).

5.8 Hepatozyten-Wachstumsfaktor

Die 48-stündige Behandlung der LFC oder AN-LFC mit pLEC-CM oder mut-LSC-CM führte zu keiner signifikanten Abnahme der mRNA-Expression von HGF. Es zeigten sich zudem keine signifikanten Unterschiede der Expressionsniveaus zwischen den LFC- und AN-LFC-Gruppen (Abb. 14).

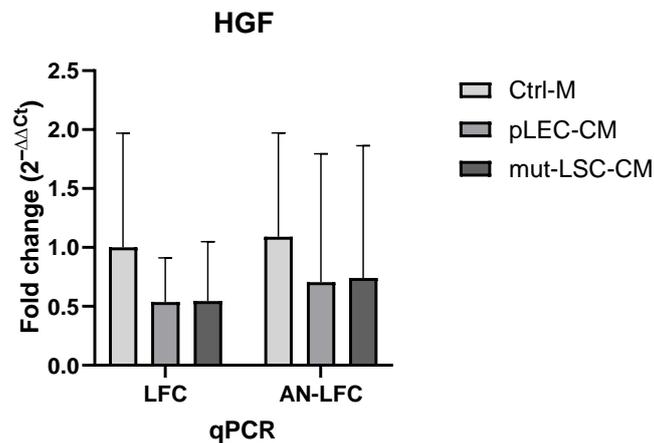


Abbildung 14: Graphische Darstellung der Genexpressionsdaten (Fold changes) von HGF bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (LFC n=6 / AN-LFC n=5).

Die Messwerte eines Spenders aus der LFC-Gruppe konnten aufgrund zu hoher HGF-Konzentrationen im ELISA nicht berechnet und somit nicht in die Auswertung einbezogen werden. Auch auf Proteinebene konnte mittels ELISA keine signifikante Abnahme der HGF-Expression gemessen werden (Abb. 15).

Die HGF-Konzentration im CM vor dem Kontakt mit den Fibroblasten lag unterhalb der Nachweisgrenze.

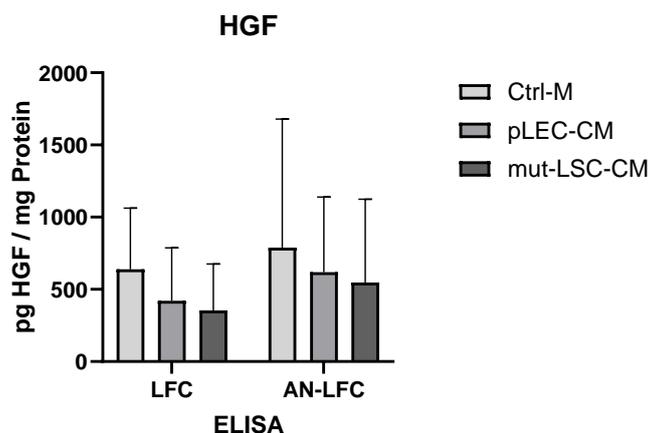


Abbildung 15: Graphische Darstellung der ELISA-Proteinexpressionsdaten von HGF (LFC n=5 / AN-LFC n=5).

5.9 Transformierender Wachstumsfaktor beta 1

Die Inkubation der limbalen Fibroblasten mit CM ging mit keiner signifikanten Veränderung der Genexpression von Transformierender Wachstumsfaktor beta 1 (TGF- β 1) einher. Es konnte kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen den LFC- und AN-LFC-Gruppen festgestellt werden (Abb. 16).

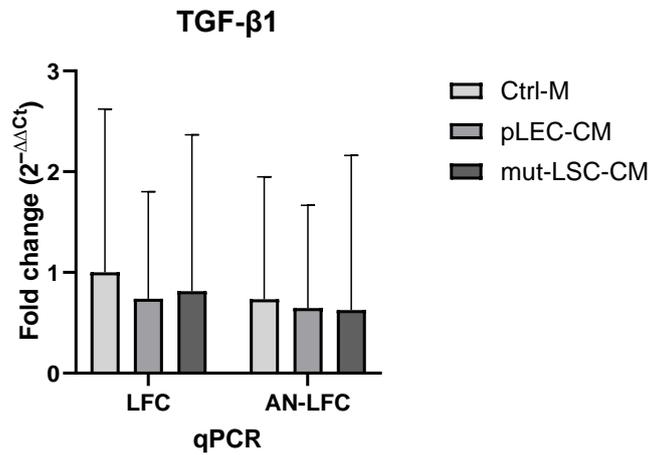


Abbildung 16: Graphische Darstellung der Genexpressionsdaten (Fold changes) von TGF- β 1 bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (LFC n=6 / AN-LFC n=5).

5.10 Aktin alpha 2 und Glattmuskuläres alpha Aktin

Die Genexpression von Aktin alpha 2 (ACTA2) stieg in der LFC-Gruppe mit mut-LSC-CM signifikant an ($FC_{\text{mean}}=3,79$ - $p=0,01$). In der AN-LFC-Gruppe konnte unter Inkubation mit dem pLEC-CM im Vergleich zur zugehörigen Versuchsgruppe ein signifikant vermindertes Expressionslevel ($p=0,03$) erfasst werden (Abb. 17).

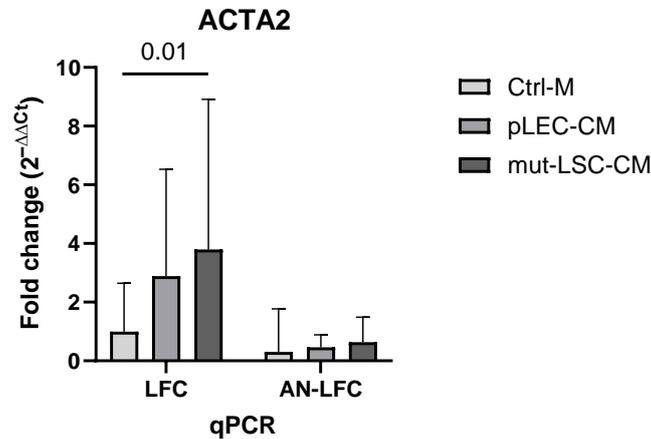


Abbildung 17: Graphische Darstellung der Genexpressionsdaten (Fold changes) von ACTA2 bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (LFC n=6 / AN-LFC n=5).

Die densitometrische Analyse der Western Blot-Banden zeigte keine signifikanten Unterschiede der α -SMA-Expression in der AN-LFC-Gruppe im Vergleich zur LFC-Gruppe an. Ebenfalls war keine signifikante Veränderung der Proteinexpression als Reaktion auf die Inkubation mit CM innerhalb der Gruppen zu beobachten (Abb. 18).

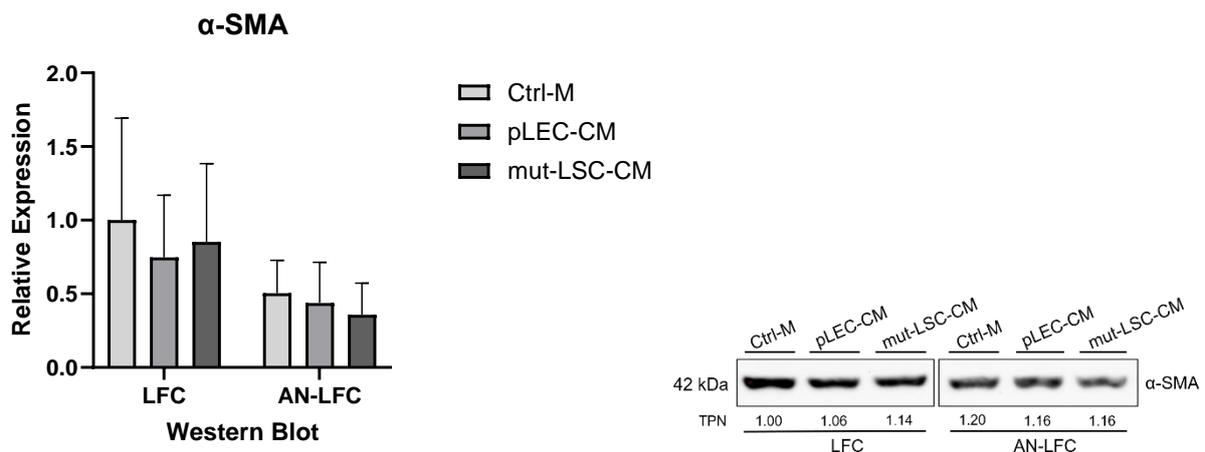


Abbildung 18: Graphische Darstellung der Western Blot-Proteinexpressionsdaten von α -SMA bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (n=3) und repräsentative Western Blot-Banden von α -SMA (42 kDa).

5.11 Nukleärer Faktor kappa B

Die Genexpressionsanalyse von Nukleärer Faktor kappa B (NFκB) zeigte keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den Fibroblastenpopulationen und keine signifikanten Veränderungen bei Behandlung mit CM (Abb. 19).

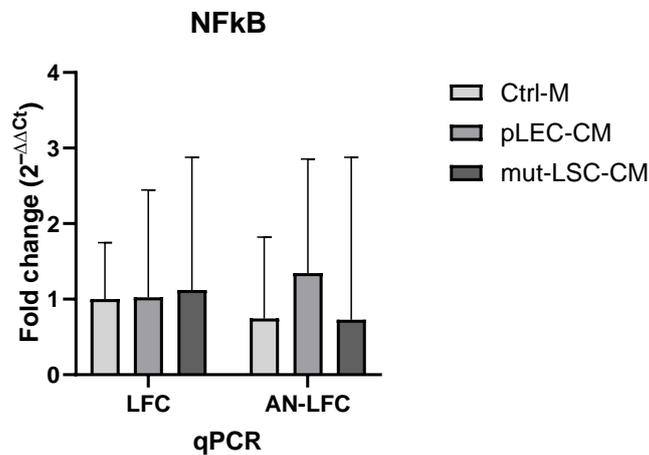


Abbildung 19: Graphische Darstellung der Genexpressionsdaten (Fold changes) von NFκB bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (LFC n=6 / AN-LFC n=5).

Analog zu den mRNA-Expressionsdaten war kein signifikanter Unterschied in der Proteinexpression als Reaktion auf das CM oder zwischen den Fibroblastenpopulationen zu registrieren (Abb. 20).

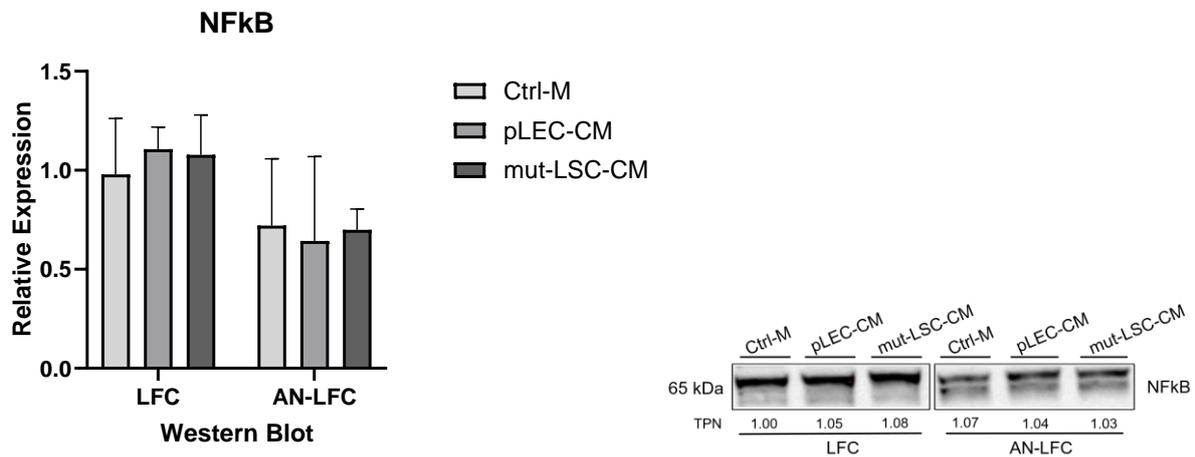


Abbildung 20: Graphische Darstellung der Western Blot-Proteinexpressionsdaten von NFκB bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (n=3) und repräsentative Western Blot-Banden von NFκB (65 kDa).

5.12 Interleukin 6

Die Genexpression von IL6 wurde in der LFC-Gruppe ($FC_{\text{mean}}=5,31$ - $p=0,002$) und der AN-LFC-Gruppe ($FC_{\text{mean}}=8,21$ - $p<0,0001$) durch die Behandlung mit pLEC-CM signifikant hochreguliert. Die Inkubation mit mut-LSC-CM führte weder in der LFC-Gruppe, noch in der AN-LFC-Gruppe zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Expression von IL6. Beim Vergleich der Fibroblastenpopulationen (LFC und AN-LFC) konnte kein signifikanter Unterschied in den Expressionsleveln festgestellt werden (Abb. 21).

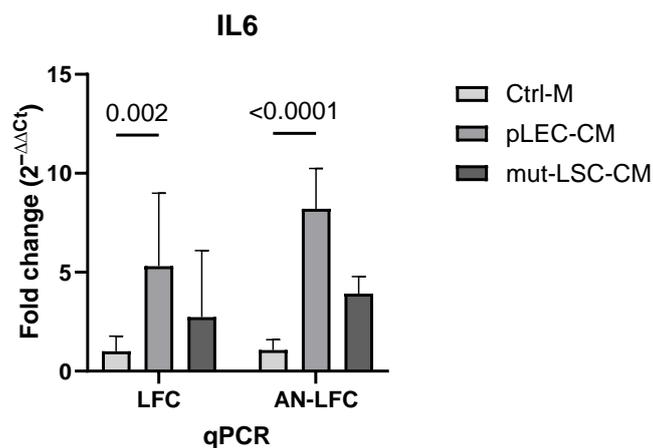


Abbildung 21: Graphische Darstellung der Genexpressionsdaten (Fold changes) von IL6 bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (LFC n=6 / AN-LFC n=5).

Analog zu der Genexpressionsmessung führte die Behandlung mit pLEC-CM zu einem hochsignifikanten Anstieg der IL6-Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand in der LFC- ($FC_{\text{mean}}=4,35$ - $p<0,0001$) und AN-LFC-Gruppe ($FC_{\text{mean}}=3,81$ - $p<0,0001$). Die Inkubation mit mut-LSC-CM bewirkte hingegen nur in der LFC-Gruppe eine signifikante Zunahme der Proteinexpression von IL6 ($FC_{\text{mean}}=2,65$ - $p=0,008$) und nicht in der AN-LFC-Gruppe (Abb. 22). Die Proteinkonzentration im CM vor Kontakt mit den Fibroblasten war unterhalb der Nachweisgrenze.

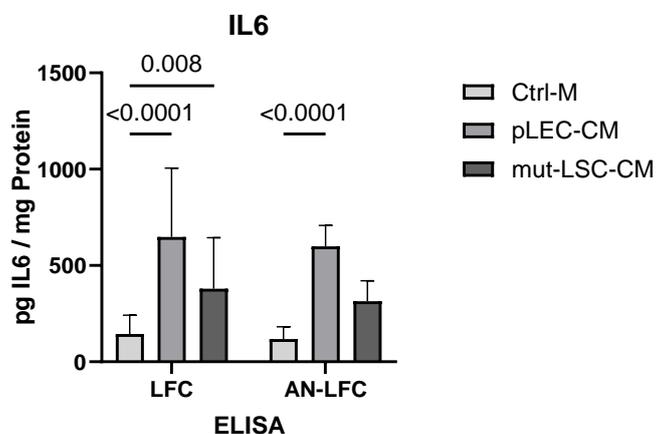


Abbildung 22: Graphische Darstellung der ELISA-Proteinexpressionsdaten von IL6 (LFC n=6 / AN-LFC n=5).

5.13 C-C motif Chemokin Ligand 2

Die mRNA-Expression von C-C motif Chemokin Ligand 2 (CCL2) wurde durch die Behandlung mit pLEC-CM, sowohl in der LFC-Gruppe ($FC_{\text{mean}}=2,39$ - $p=0,001$), als auch in der AN-LFC-Gruppe ($FC_{\text{mean}}=2,13$ - $p=0,004$) signifikant hochreguliert. Es konnte kein relevanter Unterschied in den Expressionsleveln oder im Verhalten bei Gegenüberstellung der zugehörigen Fibroblastenpopulationen festgestellt werden (Abb. 23).

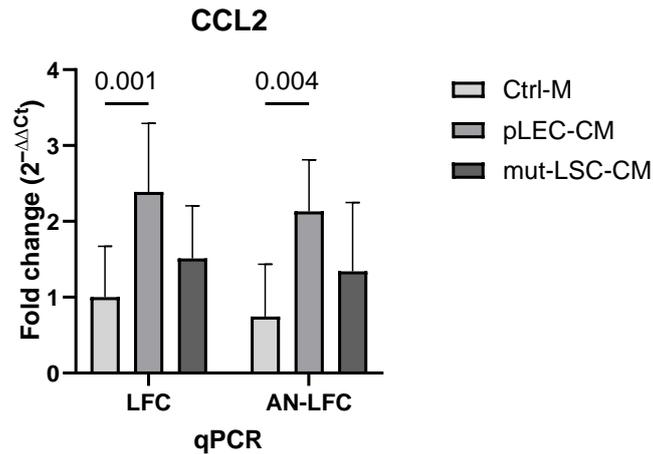


Abbildung 23: Graphische Darstellung der Genexpressionsdaten (Fold changes) von CCL2 bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (LFC n=6 / AN-LFC n=5).

5.14 Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A

Unter der Inkubation mit dem pLEC-CM konnte in der AN-LFC-Gruppe eine signifikante Hochregulierung ($FC_{\text{mean}}=1,43$ - $p=0,0011$) der Genexpression von VEGFA beobachtet werden. Bei Vergleich der Kontrollgruppen zeigte sich kein signifikant vermindertes Expressionsniveau von VEGFA-mRNA in der AN-LFC-Gruppe (Abb. 24).

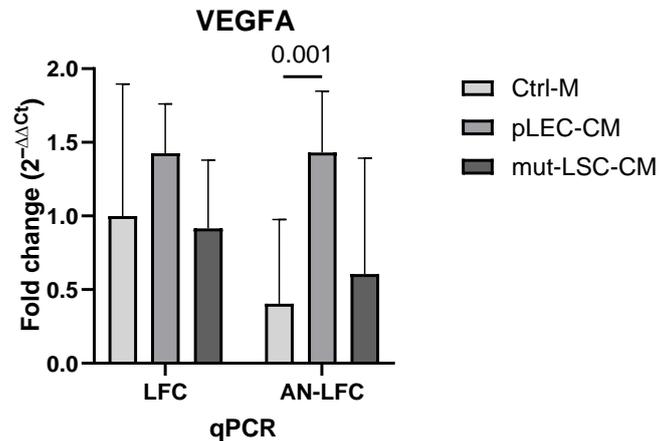


Abbildung 24: Graphische Darstellung der Genexpressionsdaten (Fold changes) von VEGFA bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (LFC n=6 / AN-LFC n=5).

Die signifikante Hochregulierung der VEGFA-mRNA-Expression in der AN-LFC-Gruppe mit pLEC-CM übersetzte sich nicht in eine Steigerung der VEGFA-Proteinexpression in den Zellkulturüberständen. Hingegen konnte ein signifikant vermindertes Proteinexpressionslevel in der AN-LFC-Population mit pLEC-CM im Vergleich zur LFC-Gruppe mit pLEC-CM festgestellt werden ($p=0,02$) (Abb. 25). Die Proteinkonzentration in den CM vor dem Kontakt mit den Fibroblasten betrug für das pLEC-CM 42,8 pg/ml und für das mut-LSC-CM 43,5 pg/ml.

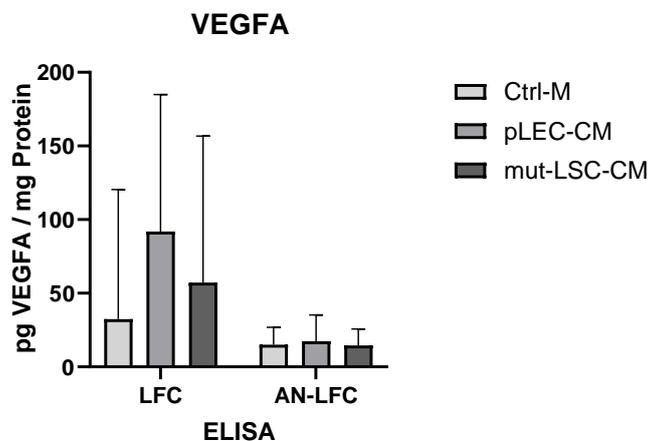


Abbildung 25: Graphische Darstellung der ELISA-Proteinexpressionsdaten von VEGFA (LFC n=6 / AN-LFC n=5).

6 Diskussion

6.1 Interpretation der Gen- und Proteinexpressionsergebnisse von Paired Box Protein 6

Der Transkriptionsfaktor PAX6 ist der Hauptregulator der Augenentwicklung bei Wirbeltieren und wird während des gesamten Lebens in verschiedenen Augengeweben exprimiert, insbesondere im Hornhaut- und Linsenepithel, welche sich beide aus dem Oberflächenektoderm ableiten [53]. PAX6 reguliert hunderte nachgeschaltete Gene und erhält die Homöostase der Hornhaut aufrecht, indem es unter anderem die Identität der limbalen Epithelzellen durch die Expression von hornhautspezifischen Keratinen wie dem Keratin 3 oder Keratin 12 bewahrt [15,51]. Es gibt zwei wesentliche Isoformen von PAX6, das klassische PAX6 mit einem Molekulargewicht von 46 kDa und das durch alternatives Spleißen gebildete PAX6(5a) mit einem Molekulargewicht von 48 kDa, deren Zielgene und Regulierung noch nicht vollständig ergründet sind [53].

Es wird allgemein angenommen, dass adulte Hornhautzellen, die aus dem Mesenchym hervorgehen, kaum PAX6 exprimieren. Poliseti et al. konnten dementsprechend weder immunhistochemisch, noch mittels Western Blot das PAX6-Protein in Zellen des Hornhautstromas nachweisen [68]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich der PAX6-Expression stimmen mit dem vorherrschenden Konsens überein und bestätigen auf der Grundlage sehr hoher Ct-Werte zwischen 30 und 32 trotz eines angepassten PCR-Profiles (5-fache Menge an PAX6-Primer und 10-fache Menge an cDNA), dass limbale Fibroblasten kaum PAX6-mRNA exprimieren. Darüber hinaus zeigte sich beim Vergleich der entsprechenden LFC- und AN-LFC-Gruppen ein nicht signifikanter Unterschied von durchschnittlich einem Ct-Wert der PAX6-Genexpressionslevel, was mit dem Verlust einer funktionellen PAX6-Genkopie bei der kongenitalen Aniridie korrelieren könnte. Analog zu den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse war im Zelllysat der Limbusfibroblasten mittels Western Blot kein PAX6-Protein nachweisbar.

Betrachtet man die limbalen Fibroblasten als eine gesonderte Zellgruppe, so stellt sich die Frage, inwieweit sich eine PAX6-Haploinsuffizienz bei der kongenitalen Aniridie auf die Zellphysiologie dieser Stromazellen bei ohnehin niedrigen Expressionsleveln von PAX6 beeinträchtigend auswirkt. Schedl et al. konnten an genetisch modifizierten Mäusen aufzeigen, dass der nukleäre Transkriptionsfaktor PAX6 einen dosisabhängigen Einfluss auf die Augenentwicklung hat, wobei sowohl zu niedrige, als auch zu hohe Expressionslevel zu einem vergleichbaren Phänotyp mit okulären Missbildungen führen [72]. Im Tiermodell stellten Ramaesh et al. fest, dass PAX6-defiziente Keratozyten nach einer Abrasio corneae eine gesteigerte Apoptoserate aufwiesen und werteten dies als eine potentiell erhöhte Empfindlichkeit der Aniridie-Stromazellen gegenüber proapoptotischen Signalen [69]. Die Annahme, dass die PAX6-Haploinsuffizienz ohne relevante zellphysiologische Veränderungen

im stromalen Kompartiment einhergeht, ist angesichts der Komplexität des dosisabhängigen Transkriptionsprofils, bei dem je nach Menge des PAX6-Proteins ein unterschiedliches Spektrum von Zielgenen exprimiert wird, als Trugschluss einzustufen [72].

Obwohl PAX6-mutationsbedingte Veränderungen auch in Stromazellen festgestellt werden können, gibt es Hinweise darauf, dass sie zumindest in der Anfangsphase der AAK eine untergeordnete Rolle als eigenständige Zellpopulation spielen könnten. In einer Studie von Vicente et al. waren die typischen histopathologischen Veränderungen der AAK hauptsächlich auf Ebene des Epithels und des anterioren Stromas zu beobachten, wohingegen das posteriore Stroma und das Endothel morphologisch unauffällig erschienen [88]. Ebenfalls konnte die Forschungsgruppe um Bausili et al. an 13 Aniridie-Hornhäuten nach einer perforierenden Keratoplastik in annähernd 80% der Fälle eine regelmäßige und unbeschädigte Descemet-Membran mit einer normalen Endothelzellzahl feststellen [6]. Falls PAX6-defiziente Stromazellen ursächlich für die Entwicklung der AAK sind, wären begleitende morphologische Veränderungen im hinteren Stroma und eine Destruktion der Descemet-Membran, die sich analog zur Basalmembran der Epithelzellen zum größten Teil aus Kollagen Typ IV zusammensetzt, zu erwarten [74,80].

Es ist bereits bekannt, dass die Stromazellen unter anderem durch parakrine Interaktion zur Bewahrung des Stammzellphänotyps der LESC beitragen und somit für die Aufrechterhaltung der Hornhauthomöostase von entscheidender Bedeutung sind [8]. Es handelt sich jedoch nicht nur um eine unidirektionale Kommunikation, die zugrundeliegenden Stromazellen können auch durch Epithelzellen beeinflusst werden. Unter Umständen könnte sogar das von den Epithelzellen produzierte PAX6 sezerniert werden und in einer nicht-zellautonomen Weise zur stromalen Homöostase beitragen, indem es von den Stromazellen internalisiert wird [49]. Die Studie von Lesaffre et al. bestätigte zumindest, dass PAX6 *in vitro* interzellulär transferiert werden kann [50]. In der vorliegenden Arbeit führte die Behandlung der LFC oder AN-LFC mit dem pLEC-CM zu keiner Zunahme der intrazellulären PAX6-Proteinmenge und somit konnte diese Hypothese nicht bestätigt werden.

6.2 Interpretation der Gen- und Proteinexpressionsergebnisse von Kollagen Typ I alpha 1, Kollagen Typ IV alpha 1 und Hyaluronsäure-Synthase 2

Die Stammzellnische im Limbus corneae ist durch eine hochspezialisierte EZM charakterisiert, die über Zell-Matrix-Interaktionen und deren Biomechanik den Stammzellphänotyp unterstützt und die Differenzierung der limbalen Epithelzellen steuert [76]. Die Korrelation zwischen den Differenzierungsstadien der limbalen Epithelzellen und den biomechanischen Eigenschaften des darunterliegenden Stromas konnte in einer Studie von Gouveia et al. belegt werden. So führte eine höhere Substratnachgiebigkeit, die das Limbusstroma charakterisiert, zu einer signifikanten Zunahme von Epithelzellen mit einem hohen Kern/Zytoplasma-Verhältnis sowie zu einer signifikant erhöhten Gen- und Proteinexpression von mutmaßlichen Stammzellmarkern wie ABCG2 und p63 α . Bei der Kultivierung von limbalen Epithelzellen auf einem festeren Trägermaterial wie dem zentralen Hornhautstroma, wurde dagegen eine signifikant erhöhte Expression von Markern des differenzierten Hornhautepithels wie Keratin 3 beobachtet [29]. Die AAK ist mit der Bildung eines fibrovaskulären, subepithelialen Pannusgewebes assoziiert, welches eine verminderte immunhistochemische Reaktivität für Kollagen Typ I und eine erhöhte Reaktivität für Kollagen Typ IV aufweist und unter anderem hierdurch zu einer pathologischen Zunahme der Hornhautsteifigkeit beiträgt [49,88].

Kollagene sind zentrale Strukturproteine der Hornhaut und bestehen aus einem heterotrimeren Verbund von subtypspezifischen α -Polypeptidketten. Man unterscheidet zwei Arten von α -Polypeptidketten für das Kollagen Typ I und insgesamt sechs Arten von α -Polypeptidketten für das Kollagen Typ IV, die sich zu 3 Isoformen organisieren können [80]. Das korneale Stroma zeichnet sich vorrangig durch Kollagen Typ I-Fibrillen aus, deren konstanter Durchmesser und gleichmäßige Verteilung einen entscheidenden Beitrag zur Hornhauttransparenz leisten [56]. In dieser Arbeit wurde weder in der LFC- noch in der AN-LFC-Gruppe die Genexpression von COL1A1 durch das CM signifikant verändert. Es zeigten sich auch keine wesentlichen Gruppenunterschiede, die auf eine Dysregulation hinweisen könnten.

Das Kollagen Typ IV ist ein essentieller strukturbildender Bestandteil von allen epithelialen Basalmembranen der Augenoberfläche und weist deutliche regionale kettenspezifische Unterschiede auf. So sind die Basalmembranen der Bindehaut und des Limbus corneae für die α 1- und α 2-Polypeptidketten immunhistochemisch stark anfärbbar, während die Basalmembran der zentralen Hornhaut für die α 5- und α 6-Polypeptidketten eine ausgeprägte Immunreaktivität besitzt [74]. In der vorliegenden Arbeit konnten keine signifikant erhöhten Genexpressionsniveaus von COL4A1 in den AN-LFC-Gruppen im Vergleich zu den LFC festgestellt werden. Allerdings zeigte sich nach Inkubation mit dem pLEC-CM in der AN-LFC-Gruppe eine signifikant gesteigerte COL4A1-mRNA-Expression ($FC_{\text{mean}}=2,92$ - $p=0,008$). Dieses Ergebnis könnte darauf hinweisen, dass AN-LFC empfindlicher auf bestimmte aus dem

Epithel stammende Faktoren reagieren und eine ständige Stimulation zur Bildung von COL4A1-Ablagerungen im fibrovaskulären Pannusgewebe beitragen könnte [88].

Ein weiterer ubiquitärer Bestandteil der EZM ist das hochmolekulare Glykosaminoglykan Hyaluronsäure (HA), welches sich aus wiederholenden Disaccharid-Einheiten zusammensetzt. Die Synthese der HA erfolgt durch drei Isoformen von HA-Synthasen (HAS1-3), die sich in ihrer Aktivität und der Länge der synthetisierten HA-Moleküle, welche die physiologischen Eigenschaften determiniert, unterscheiden [42]. Tseng et al. identifizierten den HC-HA/PTX3-Komplex, der aus hochmolekularem HA und Pentraxin-3 besteht, als maßgeblichen Faktor für die entzündungs- und vernarbungshemmenden Eigenschaften der Amnionmembran, die häufig zur Behandlung persistierender Hornhautepitheldefekte eingesetzt wird [84,89]. Im Tiermodell konnten Gesteira et al. darstellen, dass HA vor allem in der EZM des Limbus corneae und nicht in der zentralen Hornhaut vorzufinden ist, weshalb eine potentielle Rolle bei der Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters durch die Bildung einer spezialisierten EZM angenommen wird [25]. Die Analyse der HAS2-Genexpression ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen LFC und AN-LFC sowie keine signifikanten Veränderungen als Reaktion auf das CM. In der Studie von Gesteira et al. konnte weiterhin immunhistochemisch eine stärkere Reaktivität von HA auf dem Epithelniveau gezeigt werden, so dass bei einer Beeinflussung des HAS2-Metabolismus durch eine PAX6-Haploinsuffizienz demnach eher eine Wirkung in den Epithelzellen zu erwarten wäre [25].

6.3 Interpretation der Gen- und Proteinexpressionsergebnisse von Matrix-Metalloproteinase 2, Matrix-Metalloproteinase 9 und Gewebsinhibitor der Metalloproteinase 1

MMP sind zinkabhängige Endopeptidasen und zentral an den Umbauprozessen der EZM beteiligt, da sie den Abbau beinahe aller proteinbasierten Komponenten wie Kollagene oder Proteoglykane katalysieren [10]. Die Genexpression der MMP wird auf verschiedenen Ebenen reguliert, unter anderem durch Wachstumsfaktoren und Zytokine sowie durch die Interaktion mit der EZM und angrenzenden Zellen. Meist werden sie als Proenzyme sezerniert und im Rahmen einer proteolytischen Spaltung durch Serinproteasen oder andere MMP aktiviert [40]. Die Aktivierung des MMP2-Propeptids erfolgt in einem Komplex mit TIMP2 durch die membrangebundene MMP14. Die aktive Form von MMP2 kann denaturiertes Kollagen (Gelatine), Kollagen Typ I, IV, V sowie Elastin spalten [31]. Die abbaubaren Substrate überschneiden sich demnach mit dem Spektrum von MMP9, allerdings ist dieses nicht in der Lage, Kollagen Typ I zu degradieren [12]. MMP2 unterstützt die Zellmigration, indem es Basalmembranen abbaut und so das Eindringen von Leukozyten wie beispielsweise von neutrophilen Granulozyten ermöglicht. Zusätzlich kann es ein entzündliches Milieu durch die Freisetzung von proinflammatorischen Botenstoffen fördern [40].

In der vorliegenden Arbeit konnten keine erhöhten Genexpressionsniveaus von MMP2 innerhalb der AN-LFC-Gruppen im Vergleich zu den LFC festgestellt werden, jedoch zeigte sich eine signifikante Hochregulierung der MMP2-mRNA-Expression bei den AN-LFC als Reaktion auf das pLEC-CM ($FC_{\text{mean}}=1,65$ - $p=0,01$). Während MMP2 sowohl in Epithel-, als auch in Stromazellen exprimiert wird, beschränkte sich die MMP9-Expression in einer *in vivo* Studie von Ye et al. auf migrierende Basalepithelzellen nach einer Verletzung [90].

Ebenso konnte in dieser Arbeit unter Kontrollbedingungen weder auf Ebene der Genexpression (LFC $Ct_{\text{mean}}=31,69$ / AN-LFC $Ct_{\text{mean}}=31,49$), noch im Western Blot ein bedeutender Nachweis von MMP9 bei den Limbusfibroblasten erzielt werden. Die gemessenen MMP9-Konzentrationen in den Überständen der Fibroblastenkulturen nach der Behandlung mit dem pLEC-CM leiten sich daher höchstwahrscheinlich von den pLEC ab und sind nicht auf eine Fibroblasten-eigene MMP9-Sekretion zurückzuführen.

Des Weiteren ist eine wesentlich höhere MMP9-Konzentration im pLEC-CM im Vergleich zum mut-LSC-CM feststellbar. Sivak et al. konnten an transgenen Mäusen demonstrieren, dass PAX6 direkt mit der MMP9-Promotorregion interagiert, weshalb die beobachteten erniedrigten MMP9-Konzentrationen im mut-LSC-CM im Vergleich zum pLEC-CM plausibel erscheinen [79].

Im Ruhezustand unterliegt die EZM einem kontinuierlichen, langsamen Umbauprozess, der sich während der Wundheilung beschleunigt und sich durch eine erhöhte Expression von MMP auszeichnet. Das koordinierte Zusammenspiel der MMP sowie deren engmaschige Regulation

sind von zentraler Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Hornhauttransparenz [39]. MMP2 und MMP9 können neben dem EZM-Remodeling auch die Bildung neuer Blutgefäße fördern, indem sie Makromoleküle der vaskulären Basalmembranen proteolytisch spalten und den Wachstumsfaktor VEGFA freisetzen. Beide Moleküle besitzen zudem immunmodulatorische Eigenschaften. Sie bedingen einerseits durch die Degradierung von Basalmembranen die Infiltration mit Entzündungszellen wie Lymphozyten und steuern andererseits die Wirkung von Zytokinen [40]. Die Aktivität der MMP wird im Gefäßsystem durch das Plasmaprotein α 2-Makroglobulin und im Gewebe durch die Familie der TIMP, die alle bisher bekannten MMP inhibieren können, reguliert [59]. Je nach TIMP werden verschiedene MMP mit variabler Wirksamkeit gehemmt, so kann TIMP1 einen Großteil der MMP inhibieren, weist jedoch eine besonders starke Bindungsaffinität für MMP9 auf [10].

Diese Arbeit zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Expression des TIMP1-Gens zwischen den Fibroblastenpopulationen auf. Ein gestörtes Gleichgewicht der engmaschigen Wechselwirkung zwischen MMP und TIMP ist bei einer Vielzahl von Pathologien wie entzündlichen Prozessen, Fibrose, dysregulierter Angiogenese und Autoimmunerkrankungen zu beobachten [10]. Bei der AAK sind erhebliche Veränderungen der EZM der limbalen Stammzellnische auffällig. Dies äußert sich zum einen durch eine reduzierte Expression von klassischen Basalmembranekomponenten wie COL4 und zum anderen durch die Entwicklung eines fibrovaskulären Pannusgewebes, welches eine minimale immunhistochemische Markierung für COL1 aufweist [75,88]. Der aus der PAX6-Haploinsuffizienz resultierende Mangel an MMP9 könnte zu einer übermäßigen Ablagerung von Fibrin und damit zu einer Beeinträchtigung des EZM-Stoffwechsels mit einer Hornhauttrübung beitragen [69]. Die zielgerichtete Migration der Epithelzellen wird durch einen biomechanischen Gradienten vom Gewebe der Limbusregion mit höherer Compliance zur zentralen Hornhaut mit geringerer Compliance unterstützt und eine pathologische Zusammensetzung der Kollagenmatrix mit erhöhter Steifigkeit innerhalb des Limbus, wie sie bei der AAK beschrieben ist, könnte zu einem verminderten gewebebasierten Antrieb der Limbusepithelzellen führen [29,49].

Ungeachtet der Tatsache, dass PAX6 eine Vielzahl von Genen des EZM-Metabolismus steuert, könnten die histopathologischen Veränderungen der AAK auch primär die Folge einer proteolytischen Spaltung oder einer Überstimulation der Fibroblasten im Rahmen eines anhaltenden Entzündungszustands darstellen [17,75]. Unter Kontrollbedingungen zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beim Vergleich von LFC mit AN-LFC bezüglich der Genexpression von Biomarkern der EZM wie COL1A1, COL4A1, HAS2, MMP2, MMP9 und TIMP1 keine manifeste Dysregulation auf und würden somit diese Hypothese bestärken.

6.4 Interpretation der Gen- und Proteinexpressionsergebnisse von Hepatozyten-Wachstumsfaktor, Transformierender Wachstumsfaktor beta 1 und Glattmuskuläres alpha Aktin

HGF ist ein Heparin-bindendes Glykoprotein und reguliert als Mitogen die Gewebeerneuerung in einer Vielzahl von Organen wie der Leber, aber auch der Kornea [57,60]. Im Rahmen einer Hornhautverletzung wird HGF überwiegend von mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten oder Makrophagen sezerniert. Es wirkt über die Bindung an den spezifischen c-Met-Rezeptor auf der Plasmamembran von Epithel-, Stroma- und Endothelzellen und aktiviert nachfolgende Mitogen-activated protein kinase-Signalwege [57]. Bei der biologisch aktiven Form von HGF handelt es sich um ein heterodimeres Molekül, welches aus einer 69 kDa großen α -Untereinheit und einer 34 kDa großen β -Untereinheit besteht, und in einem einstufigen proteolytischen Spaltungsprozess gebildet wird [60]. Gegenwärtig sind die Proteasen, die an der Aktivierung in nicht vaskularisierten Geweben wie der Hornhaut beteiligt sind, nur unzureichend bekannt [57]. Bei einer Hornhautschädigung unterstützt HGF effektiv den Epithelschluss, indem es die Proliferation der Epithelzellen fördert und eine entzündliche Augenoberfläche abschwächt [66].

HGF weist darüber hinaus vielschichtige immunmodulatorische Wirkungen auf, es reguliert Adhäsionsmoleküle auf der Endothelzelloberfläche herab und unterbindet so die Gewebeeinfiltration von Leukozyten, es hemmt die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL6, CCL2 und Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) und fördert die Expression von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL10 [14,43,60]. HGF hemmt die nachgeschaltete Signalübertragung von TGF- β durch Smad7-Aktivierung und übernimmt somit als dessen Antagonist eine zentrale antifibrotische Rolle [57]. Miyagi et al. konnten *in vitro* bestätigen, dass sich die Gen- und Proteinexpression von α -SMA in Myofibroblasten der Hornhaut unter Behandlung mit HGF signifikant verringerte und HGF folglich das Potential besitzt, Myofibroblasten in einen Fibroblasten-Phänotyp umzuwandeln [58]. Weiterhin kann HGF über die Hochregulierung von MMP mit konsekutivem Abbau von EZM-Komponenten, die die Funktion und Stabilität der Myofibroblasten im Gewebeverbund vermitteln, die Apoptose von Myofibroblasten induzieren [57]. In dieser Arbeit konnte eine konsistente Herunterregulierung der HGF-Expression der Fibroblasten sowohl auf Gen-, als auch auf Proteinebene nach Behandlung mit CM beobachtet werden (Abb. 16 und 17). Die hohe Variabilität zwischen den Spendern könnte dazu geführt haben, dass die Unterschiede nach Behandlung statistisch als nicht signifikant zu werten waren. In diesem Zusammenhang ist hervorzuheben, dass im ELISA unter Kontrollbedingungen der Spender mit der höchsten HGF-Proteinkonzentration bei den LFC 1505 pg HGF/mg Protein und bei den AN-LFC 2151 pg HGF/mg Protein aufwies, während der Spender mit der geringsten HGF-Proteinkonzentration bei den LFC 416 pg HGF/mg Protein und bei den AN-LFC 322 pg HGF/mg Protein zeigte.

Die Expression von HGF wird als Reaktion auf proinflammatorische Zytokine wie IL1, IL6 und TNF α gesteigert und kann als ein positiver Rückkopplungsmechanismus interpretiert werden, da HGF als antiinflammatorisches Molekül eine überschießende Immunantwort der entzündungsfördernden Zytokine dämpft [14,93]. Angesichts der signifikant erhöhten Genexpression der proinflammatorischen Zytokine wie IL6 und CCL2 nach Behandlung mit dem CM scheinen diese Beobachtungen im Widerspruch zu stehen. Es wäre von Bedeutung zu klären, ob ein HGF-Mangel, der mutmaßlich durch Epithelzelloktoren provoziert werden kann, einen Beitrag zur Pathophysiologie der AAK leisten könnte. Das CM könnte die Fibroblasten zu einem erhöhten Eigenverbrauch des sezernierten HGF stimulieren. Die simultane Verringerung der HGF-Genexpression deutet jedoch eher auf einen Rückgang der intrinsischen HGF-Produktion hin. Eine derartige Abnahme der Eigensynthese könnte auch Ausdruck einer Transformation von HGF-produzierenden Fibroblasten zu Myofibroblasten widerspiegeln, die durch TGF- β oder andere profibrotische Moleküle ausgelöst wird [60].

Die Umwandlung der Hornhautfibroblasten in kontraktile Myofibroblasten wird in erster Linie durch TGF- β -vermittelte Signalwege erzielt und stellt eine entscheidende Determinante im Wundheilungsprozess dar. Unter physiologischen Bedingungen ist die Sekretion von TGF- β auf die Hornhautepithelzellen beschränkt und die Freisetzung in das korneale Stroma erfolgt fast ausschließlich im Zusammenhang mit einer gestörten Barrierefunktion der Basalmembran. Neben den Epithelzellen als eine der Hauptquellen für TGF- β wird die Sekretion bei Hornhautverletzungen ebenfalls durch infiltrierende Immunzellen wie Makrophagen und durch Myofibroblasten übernommen, die hierdurch ihren Phänotyp selbstständig aufrechterhalten können [37]. Es werden drei Isoformen von TGF- β unterschieden, die allesamt als inaktive Vorstufen sezerniert werden und eine stimulierende Wirkung auf die Migration von Epithelzellen haben. Darüber hinaus fördern TGF- β 1 und TGF- β 2 die Proliferation von stromalen Fibroblasten, wohingegen TGF- β 3 antifibrotische Eigenschaften besitzt und die durch TGF- β 1- und TGF- β 2-induzierte Narbenbildung abschwächt [54].

In der vorliegenden Arbeit konnte bei der Genexpression von TGF- β 1 weder ein Unterschied zwischen den LFC- und AN-LFC-Gruppen, noch eine signifikante Veränderung als Reaktion auf das CM gezeigt werden. Diese Ergebnisse sind mit der Abwesenheit von Myofibroblasten unter Berücksichtigung einer erhöhten intrinsischen TGF- β -Produktion im Vergleich zu Fibroblasten vereinbar. Die Präsenz von Myofibroblasten ist durch die Expression des Proteins α -SMA charakterisiert, welches die kontraktile Kapazität der kornealen Stromazellen erheblich erhöht [32]. Ebenfalls konnte unter Behandlung mit CM keine Erhöhung der Proteinexpression von α -SMA mittels Western Blot erzielt werden. Myofibroblasten sind zur Sicherung ihres Überlebens auf eine kontinuierliche Stimulation durch TGF- β 1 sowie andere profibrotische Faktoren angewiesen und eine reduzierte Verfügbarkeit dieser Moleküle führt zu ihrer

Apoptose [54]. Die Quantität an profibrotischen Molekülen im CM, welche von den Epithelzellen stammt, ist limitiert, daher scheint es nachvollziehbar, dass eine nachhaltige Bildung und Erhaltung von Myofibroblasten in der Zellkultur über einen Zeitraum von 48 Stunden ausbleibt.

Das anhaltende Vorkommen von Myofibroblasten ist mit einer überhöhten Produktion von Bestandteilen der EZM und einer Transparenzminderung der Hornhaut vergesellschaftet [37]. In der histopathologischen Studie von Vicente et al. konnte das Vorhandensein von Myofibroblasten im subepithelialen Pannusgewebe der AAK bewiesen werden, wohingegen das Stroma der Kontrollhornhäute keinen Nachweis von Myofibroblasten erbrachte [88].

In der vorliegenden Arbeit konnte in der mit pLEC-CM behandelten AN-LFC-Gruppe im Vergleich zu der entsprechenden LFC-Gruppe eine Verminderung der Genexpression von ACTA2, das für das Protein α -SMA kodiert, gemessen werden. Eine Steigerung der ACTA2-mRNA-Expression in den AN-LFC-Gruppen blieb nach Inkubation mit CM aus. Möglicherweise spiegeln diese Ergebnisse eine schnellere Metabolisierungsrate profibrotischer Faktoren durch die AN-LFC wider, weshalb zum Zeitpunkt der Zellernte bereits ein erniedrigtes Expressionsniveau von ACTA2 in der AN-LFC-Gruppe gemessen werden konnte. Basierend auf diesen Ergebnissen wäre es sinnvoll, die ACTA2-Genexpression im zeitlichen Verlauf sowie unter kontinuierlicher fibrotischer Stimulation zu untersuchen, um eine potentiell gesteigerte Verstoffwechselung profibrotischer Faktoren durch Stromazellen bei der kongenitalen Aniridie aufzudecken.

6.5 Interpretation der Gen- und Proteinexpressionsergebnisse von Nukleärer Faktor kappa B, Interleukin 6, C-C motif Chemokin Ligand 2 und Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A

Die Erhaltung der Hornhauttransparenz ist für die Funktionsfähigkeit des optischen Systems von grundlegender Bedeutung und beruht auf einem immunologischen Sonderstatus, der überschießende Reaktionen auf lokale Entzündungsreize verhindert. Dieses Immunprivileg wird unter anderem durch das Fehlen von Blut- und Lymphgefäßen sowie von reifen Leukozyten, durch die Barrierefunktion des Epithels gegen das Eindringen immunogener Moleküle und durch die immunmodulatorische Funktion des dichten Nervenplexus erzielt [13]. Die kongenitale Aniridie ist durch erhebliche entzündliche Veränderungen der Augenoberfläche gekennzeichnet. Dazu gehören beispielsweise eine ausgeprägte Infiltration des limbalen Epithels mit CD18-positiven Immunzellen aus dem Hornhautstroma, eine Immuneinfiltration der zentralen Hornhaut mit reifen dendritischen Zellen oder ein deutlicher Anstieg verschiedener proinflammatorischer Zytokine wie IL1 β , IL9 oder Macrophage inflammatory protein 1 alpha in der Tränenflüssigkeit [46,47,75]. Bereits in jungen Lebensjahren ist eine subklinische Beeinträchtigung des immunprivilegierten Hornhautstatus zu beobachten, weshalb die Annahme besteht, dass die Entzündung der Zerstörung der limbalen Stammzellnische mit Entwicklung einer AAK vorausgeht und sich die Entzündungssituation parallel zur Progression der AAK im Sinne eines Circulus vitiosus verschlimmert [46,49].

Der Transkriptionsfaktor NF κ B setzt sich aus Dimeren von Rel-Protein-Untereinheiten (RelA, RelB, c-Rel, p50, p52) zusammen und ist für verschiedenste Funktionen des angeborenen und erworbenen Immunsystems essentiell, indem er unter anderem Entzündungsreaktionen initiiert und die Apoptose steuert. Die Signaltransduktion von NF κ B wird durch multiple Stimuli wie proinflammatorische Zytokine oder bakterielle und virale Antigene aktiviert. Die Untereinheiten von NF κ B sind in den meisten ruhenden Zellen latent vorhanden und werden im Zytosol an Inhibitorproteine gebunden, wodurch eine Translokation in den Zellkern verhindert wird [5]. In dieser Arbeit wurde die Gen- und Proteinexpression der RelA-Untereinheit in limbalen Fibroblasten untersucht und es konnte weder eine signifikante Veränderung der Expressionslevel bei der kongenitalen Aniridie, noch eine signifikante Reaktion auf die Behandlung mit CM erfasst werden.

IL6 ist ein multifunktionales Zytokin, das sowohl entzündungsfördernde als auch -hemmende Funktionen aufweist und an multiplen physiologischen Prozessen wie der Regeneration von Leberzellen oder dem Knochenstoffwechsel beteiligt ist [38]. Es spielt bei vielen entzündlichen Augenerkrankungen eine zentrale Rolle als proinflammatorisches Zytokin und ist in der Tränenflüssigkeit bei der Keratokonjunktivitis sicca oder dem Sjögren-Syndrom in erhöhten Konzentrationen mit Korrelation zum Schweregrad messbar [27]. Durch die Bindung an den

membranständigen oder an den löslichen IL6-Rezeptor initiiert IL6 die Bildung eines hexameren Komplexes mit dem Glykoprotein 130, was zur Aktivierung der Januskinase mit nachfolgender Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) führt. Die biologische Aktivität von IL6 ist vom jeweiligen Rezeptor- und Zelltyp abhängig, wobei die Bindung an den löslichen IL6-Rezeptor im Allgemeinen eine entzündungsfördernde Wirkung hat [38]. In der Hornhaut sind verschiedene Zelltypen wie Makrophagen, Fibroblasten und Epithelzellen zur Expression von IL6 in der Lage [92]. Neben den chemotaktischen Eigenschaften stimuliert IL6 Hornhautfibroblasten zur Produktion von VEGF, CCL2 und anderen Zytokinen und ist an deren Transdifferenzierung zu Myofibroblasten beteiligt [22,92]. Wiederum konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine unterstützende Wirkung von IL6 auf die Migration und Proliferation von kornealen Epithelzellen gezeigt werden, was dessen potentielle wundheilungsfördernde Komponente unterstreicht [4,62]. Des Weiteren stellten Notara et al. in einem 3:1-Kokultursystem mit Epithelzellen und Fibroblasten der Limbusregion nach Hemmung von IL6 oder STAT3 eine signifikante Reduktion der Koloniebildungsrate der Epithelzellen, ein Surrogatparameter für die Anzahl der Stammzellen in der Zellkultur, fest. Somit konnte eine STAT3-vermittelte Wirkung von IL6 auf den Erhalt des Stammzellcharakters von Limbusepithelzellen postuliert werden [63]. Die Gen- und Proteinexpression von IL6 wurde in der LFC-Gruppe mit dem pLEC-CM signifikant hochreguliert, während ein signifikanter Anstieg in der AN-LFC-Gruppe unter Behandlung mit dem zugehörigen mut-LSC-CM ausblieb. Im Gegensatz hierzu führte die Inkubation mit dem pLEC-CM bei den AN-LFC zu einer signifikanten Erhöhung der IL6-Proteinexpression, was gegen eine Unfähigkeit der AN-LFC zur Bildung von IL6 spricht. Es ist zu vermuten, dass das mut-LSC-CM geringere Konzentrationen an Faktoren enthält, die zu einem suffizienten Anstieg der IL6-Proteinexpression bei der Interaktion der Zelltypen führen. In Anbetracht der vielfältigen Funktionen von IL6 ist die Annahme naheliegend, dass die Aufrechterhaltung der Hornhauthomöostase ein bedarfsgerechtes Angebot an IL6 erfordert. Eine Dysregulation des IL6-Stoffwechsels kann ein entzündliches Milieu mit unerwünschter Neovaskularisation innerhalb der Kornea begünstigen und die Erhaltung des Stammzellcharakters der LESC beeinträchtigen, was zur Pathophysiologie der AAK beitragen könnte [27,63].

CCL2, auch als Monocyte chemoattractant protein 1 bekannt, fördert als chemotaktisches Zytokin die Infiltration von Leukozyten zu Entzündungsherden und vermittelt seine biologische Aktivität hauptsächlich über die Bindung an den C-C motif Chemokin Rezeptor 2 auf der Oberfläche von Monozyten/Makrophagen und T-Lymphozyten [78]. In einer Studie von Hong et al. konnte gezeigt werden, dass die Proteinexpression von CCL2 in Keratozyten nach einer Abrasio corneae und ebenfalls *in vitro* in Fibroblasten nach Stimulation mit IL1 und TNF α hochreguliert wird [33]. Eine erhöhte CCL2-Expression bedingt die Rekrutierung von Makrophagen, die eine entscheidende Rolle bei der Aggravation einer bestehenden

Immunreaktion und einer VEGF-vermittelten Neubildung von Blut- und Lymphgefäßen einnehmen [65]. In Hornhäuten mit einem AAK-Phänotyp konnten Makrophagen immunhistochemisch vereinzelt im Epithel und in stärkerer Ausprägung im subepithelialen Pannusgewebe nachgewiesen werden, wohingegen keine CD68-Markierung in Kontrollhornhäuten festzustellen war [88]. In dieser Arbeit wurde ein ähnliches Verhalten der LFC und der AN-LFC beobachtet. Die Anwendung von pLEC-CM führte zu einer signifikanten Erhöhung der CCL2-Genexpression, während dies bei dem mut-LSC-CM nicht der Fall war. Diese Diskrepanz könnte darauf hindeuten, dass pLEC spezifische Faktoren freisetzen, die die CCL2-Expression gezielter modulieren und so eine effektivere immunologische Reaktion hervorrufen. Weiterhin lässt die signifikant erhöhte Expression von IL6 und CCL2 nach Behandlung mit CM und die fehlende Reaktion der NFκB-Expression möglicherweise auf eine NFκB-unabhängige Regulation schließen.

Der Limbus corneae fungiert als Schranke zwischen der gefäßreichen Bindehaut und der avaskulären, transparenten Hornhaut und verhindert die Infiltration von Blut- und Lymphgefäßen unter anderem durch potente antiangiogene Moleküle wie dem löslichen VEGFA-Rezeptor 1 (sVEGFR1), TIMP3 oder Endostatin, das sich aus dem Kollagen Typ XVIII der epithelialen Basalmembran ableitet [65]. Die Gefäßneubildung der Hornhaut, wie sie beispielsweise bei der LSCD vorkommt, ist in erster Linie das Ergebnis eines entzündungsbedingten Ungleichgewichts von pro- und antiangiogenen Faktoren und führt zur Beeinträchtigung des relativen Immunprivilegs mit Begünstigung eines Rückkopplungskreislaufs von Entzündung und Neovaskularisation [61].

VEGFA stellt einen zentralen Faktor bei der Regulation der Gefäßneubildung dar, indem es vaskuläre Endothelzellen zur Mitose und Erhöhung der Permeabilität, hauptsächlich über Bindung an den VEGF-Rezeptor 2, anregt [3]. Zusätzlich hat es eine chemotaktische Wirkung auf Makrophagen, stimuliert das Nervenwachstum und wird von verschiedenen Zelltypen, darunter Epithel-, Stroma- und Endothelzellen der Hornhaut, Gefäßendothelzellen sowie Leukozyten, insbesondere T-Lymphozyten und Makrophagen, sezerniert [61,91]. In einer direkten Kokultur von Epithelzellen oder Fibroblasten der Kornea mit humanen Nabelschnur-Endothelzellen konnten Ma et al. zeigen, dass Limbusfibroblasten die Bildung eines kapillarähnlichen Netzwerks induzierten, die Limbusepithelzellen hingegen eher eine antiangiogene Aktivität ausübten, da sie keine oder nur eine geringfügige stimulierende Wirkung auf die Röhrenbildung der Endothelzellen hatten [55].

Hornhautepithelzellen tragen zur Aufrechterhaltung einer gefäßfreien Hornhaut bei, indem sie potentiell proangiogene Signale durch die Freisetzung neutralisierender Moleküle wie sVEGFR1 unterdrücken [65]. In dieser Arbeit konnte eine vergleichbare Proteinkonzentration von VEGFA im pLEC-CM (42,8 pg VEGFA/ml) und im mut-LSC-CM (43,5 pg VEGFA/ml) bestimmt werden, was darauf hindeutet, dass Limbusepithelzellen möglicherweise auch bei

der kongenitalen Aniridie, eine konstante basale Sekretionsrate von VEGFA aufweisen. In der *in vitro* Studie von Ma et al. konnte weiterhin festgestellt werden, dass konjunktivale Epithelzellen im Vergleich zu Limbusepithelzellen eine signifikant stärkere angiogene Wirkung haben [55]. Der Verlust funktionsfähiger Limbusepithelzellen mit Konjunktivalisierung der Hornhaut bei der kongenitalen Aniridie trägt vermutlich stärker zur Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung der Neovaskularisation bei, als eine allgemeine Störung der VEGFA-Synthese der Limbusepithelzellen [1].

Makrophagen sind entscheidend an der kornealen Neovaskularisation beteiligt, wie ihre Nachweisbarkeit im fibrovaskulären Pannusgewebe bei der AAK verdeutlicht. Sie gelten als eine Hauptquelle von VEGFA und tragen zusätzlich durch Sekretion von VEGFC und VEGFD zur Bildung von Lymphgefäßen bei [30,88]. In der Tränenflüssigkeit von Patienten mit kongenitaler Aniridie ist ebenfalls ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiangiogenen Faktoren evident, so konnten Ilnatko et al. erhöhte Konzentrationen von VEGFC detektieren [34].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression von VEGFA in der AN-LFC-Gruppe mit pLEC-CM signifikant hochreguliert ($FC_{\text{mean}}=1,43$ - $p=0,001$), was sich auf Proteinebene jedoch nicht in einen Anstieg übersetzte. Insgesamt waren die Proteinexpressionslevel der AN-LFC niedriger, wobei eine signifikant verminderte Proteinexpression von VEGFA bei den AN-LFC mit pLEC-CM im Vergleich zur korrespondierenden LFC-Gruppe ($p=0,02$) erfasst wurde. Die beobachtete verminderte Proteinexpression in der AN-LFC-Gruppe deutet gegebenenfalls auf einen zellautonomen Verbrauch von VEGFA hin, wobei die AN-LFC möglicherweise eine pathologisch erhöhte Fähigkeit zur Aufnahme oder Verarbeitung von VEGFA besitzen. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die posttranskriptionelle Regulation und den zellulären Metabolismus von VEGFA in den AN-LFC zu ergründen.

6.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass sich die PAX6-Haploinsuffizienz bei der kongenitalen Aniridie trotz der bereits niedrigen PAX6-Expressionsniveaus von mesenchymalen Zellen auf die Zellphysiologie der Limbusfibroblasten auswirken könnte, dies ist insbesondere bei der Expression von ACTA2 und VEGFA auffällig.

Auf transkriptioneller Ebene zeigen die untersuchten Biomarker der EZM (COL1A1, COL4A1, HAS2, MMP2, MMP9, TIMP1, HGF und TGF- β 1) in den AN-LFC keine offensichtliche Dysregulation auf. Dies könnte darauf hindeuten, dass die histopathologischen Veränderungen der AAK im Rahmen eines metabolisch angeregten Zustands in der Hornhaut wie bei einem persistierenden entzündlichen Prozess auftreten.

Das erniedrigte Expressionsniveau von ACTA2 in den AN-LFC mit pLEC-CM im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe könnte eine schnellere Metabolisierungsrate profibrotischer Moleküle durch die AN-LFC anzeigen. Zur Überprüfung dieser Hypothese ist die Untersuchung der ACTA2-Genexpression im zeitlichen Verlauf sinnvoll.

Zudem konnte ein unterschiedliches Reaktionsverhalten der Limbusfibroblasten auf das zugehörige CM (LFC mit pLEC-CM und AN-LFC mit mut-LSC-CM) festgestellt werden, was auf eine gestörte Interaktion, unter anderem im IL6-Signalweg, zwischen den Epithelzellen und den Limbusfibroblasten hindeutet.

Bei einer indirekten Kokultur handelt es sich um ein unidirektionales Modell, zur Verifizierung der Ergebnisse wäre die Darstellung in einem direkten Kokultursystem oder in einem *in vivo* Modell angemessen, um die regulatorischen Komponenten der Nischenstruktur weiter zu vertiefen.

7 Literaturverzeichnis

1. Ahmad S (2012) Concise Review: Limbal Stem Cell Deficiency, Dysfunction, and Distress. *Stem Cells Transl Med* 1:110–115
2. Amirjamshidi H, Milani BY, Sagha HM, Movahedan A, Shafiq MA, Lavker RM, Yue BYT, Djalilian AR (2011) Limbal fibroblast conditioned media: a non-invasive treatment for limbal stem cell deficiency. *Mol Vis* 17:658–66
3. Apte RS, Chen DS, Ferrara N (2019) VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell* 176:1248–1264
4. Arranz-Valsero I, Soriano-Romaní L, García-Posadas L, López-García A, Diebold Y (2014) IL-6 as a corneal wound healing mediator in an in vitro scratch assay. *Exp Eye Res* 125:183–192
5. Barnabei L, Laplantine E, Mbongo W, Rieux-Laucat F, Weil R (2021) NF- κ B: At the Borders of Autoimmunity and Inflammation. *Front Immunol* 12:1–27
6. Bausili MM, Alvarez de Toledo J, Barraquer RI, Michael R, Tresserra F, de la Paz MF (2016) Histopathology Findings of Corneal Buttons in Congenital Aniridia Patients. *Ophthalmic Res* 56:202–206
7. Blanco-Kelly F, Tarilonte M, Villamar M, Damián A, Tamayo A, Moreno-Pelayo MA, Ayuso C, Cortón M (2021) Genetics and epidemiology of aniridia: Updated guidelines for genetic study. *Arch Soc Esp Oftalmol* 96 Suppl 1:4–14
8. Bonnet C, González S, Roberts JS, Robertson SYT, Ruiz M, Zheng J, Deng SX (2021) Human limbal epithelial stem cell regulation, bioengineering and function. *Prog Retin Eye Res* 85:100956
9. Boulton M, Albon J (2004) Stem cells in the eye. *Int J Biochem Cell Biol* 36:643–657
10. Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Castruita-De la Rosa C, Ramirez-Acuña JM, Perez-Romero BA, Guerrero-Rodriguez JF, Martinez-Avila N, Martinez-Fierro ML (2020) The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *Int J Mol Sci* 21:9739
11. Calvão-Pires P, Santos-Silva R, Falcão-Reis F, Rocha-Sousa A (2014) Congenital Aniridia: Clinic, Genetics, Therapeutics, and Prognosis. *Int Sch Res Not* 2014:305350
12. Chakrabarti S, Patel KD (2005) Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp Lung Res* 31:599–621
13. Chen Y, Wang S, Alemi H, Dohlman T, Dana R (2022) Immune regulation of the

ocular surface. *Exp Eye Res* 218:109007

14. Coudriet GM, He J, Trucco M, Mars WM, Piganelli JD (2010) Hepatocyte Growth Factor Modulates Interleukin-6 Production in Bone Marrow Derived Macrophages: Implications for Inflammatory Mediated Diseases. *PLoS One* 5:e15384
15. Coutinho P, Pavlou S, Bhatia S, Chalmers KJ, Kleinjan DA, van Heyningen V (2011) Discovery and assessment of conserved Pax6 target genes and enhancers. *Genome Res* 21:1349–1359
16. Cursiefen C (2007) Immune privilege and angiogenic privilege of the cornea. *Chem Immunol Allergy* 92:50–57
17. Cvekl A, Callaerts P (2017) PAX6: 25th anniversary and more to learn. *Exp Eye Res* 156:10–21
18. DelMonte DW, Kim T (2011) Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg* 37:588–598
19. Doughty MJ, Zaman ML (2000) Human Corneal Thickness and Its Impact on Intraocular Pressure Measures. *Surv Ophthalmol* 44:367–408
20. Dziasko MA, Armer HE, Levis HJ, Shortt AJ, Tuft S, Daniels JT (2014) Localisation of Epithelial Cells Capable of Holoclone Formation In Vitro and Direct Interaction with Stromal Cells in the Native Human Limbal Crypt. *PLoS One* 9:e94283
21. Dziasko MA, Daniels JT (2016) Anatomical Features and Cell-Cell Interactions in the Human Limbal Epithelial Stem Cell Niche. *Ocul Surf* 14:322–330
22. Ebihara N, Matsuda A, Nakamura S, Matsuda H, Murakami A (2011) Role of the IL-6 classic- and trans-signaling pathways in corneal sterile inflammation and wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:8549–57
23. Eghrari AO, Riazuddin SA, Gottsch JD (2015) Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development. *Prog Mol Biol Transl Sci* 134:7–23
24. Espana EM, Kawakita T, Romano A, Di Pascuale M, Smiddy R, Liu C, Tseng SCG (2003) Stromal niche controls the plasticity of limbal and corneal epithelial differentiation in a rabbit model of recombined tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:5130–5
25. Gesteira TF, Sun M, Coulson-Thomas YM, Yamaguchi Y, Yeh L-K, Hascall V, Coulson-Thomas VJ (2017) Hyaluronan Rich Microenvironment in the Limbal Stem Cell Niche Regulates Limbal Stem Cell Differentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*

58:4407–4421

26. Ghafar NA, Jalil NAA, Kamarudin TA (2021) Wound healing of the corneal epithelium: a review. *Asian Biomed* 15:199–212
27. Ghasemi H (2018) Roles of IL-6 in Ocular Inflammation: A Review. *Ocul Immunol Inflamm* 26:37–50
28. Goldberg MF, Bron AJ (1982) Limbal palisades of Vogt. *Trans Am Ophthalmol Soc* 80:155–71
29. Gouveia RM, Lepert G, Gupta S, Mohan RR, Paterson C, Connon CJ (2019) Assessment of corneal substrate biomechanics and its effect on epithelial stem cell maintenance and differentiation. *Nat Commun* 10:1496
30. Hadrian K, Willenborg S, Bock F, Cursiefen C, Eming SA, Hos D (2021) Macrophage-Mediated Tissue Vascularization: Similarities and Differences Between Cornea and Skin. *Front Immunol* 12:667830
31. Henriët P, Emonard H (2019) Matrix metalloproteinase-2: Not (just) a “hero” of the past. *Biochimie* 166:223–232
32. Hinz B (2016) Myofibroblasts. *Exp Eye Res* 142:56–70
33. Hong JW, Liu JJ, Lee JS, Mohan RR, Mohan RR, Woods DJ, He YG, Wilson SE (2001) Proinflammatory chemokine induction in keratocytes and inflammatory cell infiltration into the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:2795–803
34. Ihnatko R, Edén U, Lagali N, Dellby A, Fagerholm P (2013) Analysis of protein composition and protein expression in the tear fluid of patients with congenital aniridia. *J Proteomics* 94:78–88
35. Ihnatko R, Eden U, Fagerholm P, Lagali N (2016) Congenital Aniridia and the Ocular Surface. *Ocul Surf* 14:196–206
36. Jacobsen IE, Jensen OA, Prause JU (1984) Structure and composition of Bowman’s membrane. *Acta Ophthalmol* 62:39–53
37. Kamil S, Mohan RR (2021) Corneal stromal wound healing: Major regulators and therapeutic targets. *Ocul Surf* 19:290–306
38. Kaur S, Bansal Y, Kumar R, Bansal G (2020) A panoramic review of IL-6: Structure, pathophysiological roles and inhibitors. *Bioorg Med Chem* 28:115327
39. Kaya SG, Inanc-Surer S, Cakan-Akdogan G, Oktay G, Utine CA, Kalyoncu S (2021)

- Roles of matrix metalloproteinases in the cornea: A special focus on macular corneal dystrophy. *Med Drug Discov* 11:100095
40. Klein T, Bischoff R (2011) Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids* 41:271–290
 41. Knupp C, Pinali C, Lewis PN, Parfitt GJ, Young RD, Meek KM, Quantock AJ (2009) The architecture of the cornea and structural basis of its transparency. *Adv Protein Chem Struct Biol* 78:25–49
 42. Kobayashi T, Chanmee T, Itano N (2020) Hyaluronan: Metabolism and Function. *Biomolecules* 10:1525
 43. Kusunoki H, Taniyama Y, Otsu R, Rakugi H, Morishita R (2014) Anti-inflammatory effects of hepatocyte growth factor on the vicious cycle of macrophages and adipocytes. *Hypertens Res* 37:500–506
 44. Labetoulle M, Baudouin C, Calonge M, Merayo-Llives J, Boboridis KG, Akova YA, Aragona P, Geerling G, Messmer EM, Benítez-del-Castillo J (2019) Role of corneal nerves in ocular surface homeostasis and disease. *Acta Ophthalmol* 97:137–145
 45. Lagali N, Wowra B, Dobrowolski D, Utheim TP, Fagerholm P, Wylegala E (2018) Stage-related central corneal epithelial transformation in congenital aniridia-associated keratopathy. *Ocul Surf* 16:163–172
 46. Lagali N, Wowra B, Fries FN, Latta L, Moslemani K, Utheim TP, Wylegala E, Seitz B, Käsmann-Kellner B (2020) Early phenotypic features of aniridia-associated keratopathy and association with PAX6 coding mutations. *Ocul Surf* 18:130–140
 47. Landsend ECS, Utheim ØA, Pedersen HR, Aass HCD, Lagali N, Dartt DA, Baraas RC, Utheim TP (2018) The Level of Inflammatory Tear Cytokines is Elevated in Congenital Aniridia and Associated with Meibomian Gland Dysfunction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 59:2197–2204
 48. Landsend ECS, Lagali N, Utheim TP (2021) Congenital aniridia – A comprehensive review of clinical features and therapeutic approaches. *Surv Ophthalmol* 66:1031–1050
 49. Latta L, Figueiredo FC, Ashery-Padan R, Collinson JM, Daniels J, Ferrari S, Szentmáry N, Solá S, Shalom-Feuerstein R, Lako M, Xapelli S, Aberdam D, Lagali N (2021) Pathophysiology of aniridia-associated keratopathy: Developmental aspects and unanswered questions. *Ocul Surf* 22:245–266

50. Lesaffre B, Joliot A, Prochiantz A, Volovitch M (2007) Direct non-cell autonomous Pax6 activity regulates eye development in the zebrafish. *Neural Dev* 2:2
51. Li G, Xu F, Zhu J, Krawczyk M, Zhang Y, Yuan J, Patel S, Wang Y, Lin Y, Zhang M, Cai H, Chen D, Zhang M, Cao G, Yeh E, Lin D, Su Q, Li W, Sen GL, Afshari N, Chen S, Maas RL, Fu X-D, Zhang K, Liu Y, Ouyang H (2015) Transcription Factor PAX6 (Paired Box 6) Controls Limbal Stem Cell Lineage in Development and Disease. *J Biol Chem* 290:20448–20454
52. Li W, Hayashida Y, Chen Y-T, Tseng SC (2007) Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell Res* 17:26–36
53. Lima Cunha D, Arno G, Corton M, Moosajee M (2019) The Spectrum of PAX6 Mutations and Genotype-Phenotype Correlations in the Eye. *Genes (Basel)* 10:1050
54. Ljubimov A V, Saghizadeh M (2015) Progress in corneal wound healing. *Prog Retin Eye Res* 49:17–45
55. Ma DH, Tsai RJ, Chu WK, Kao CH, Chen JK (1999) Inhibition of vascular endothelial cell morphogenesis in cultures by limbal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:1822–8
56. Massoudi D, Malecaze F, Galiacy SD (2016) Collagens and proteoglycans of the cornea: importance in transparency and visual disorders. *Cell Tissue Res* 363:337–349
57. Miyagi H, Thomasy SM, Russell P, Murphy CJ (2018) The role of hepatocyte growth factor in corneal wound healing. *Exp Eye Res* 166:49–55
58. Miyagi H, Jalilian I, Murphy CJ, Thomasy SM (2018) Modulation of human corneal stromal cell differentiation by hepatocyte growth factor and substratum compliance. *Exp Eye Res* 176:235–242
59. Nagase H, Visse R, Murphy G (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69:562–573
60. Nakamura T, Mizuno S (2010) The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86:588–610
61. Nicholas MP, Mysore N (2021) Corneal neovascularization. *Exp Eye Res* 202:108363
62. Nishida T (1992) Interleukin 6 Facilitates Corneal Epithelial Wound Closure In Vivo. *Arch Ophthalmol* 110:1292

63. Notara M, Shortt AJ, Galatowicz G, Calder V, Daniels JT (2010) IL6 and the human limbal stem cell niche: A mediator of epithelial–stromal interaction. *Stem Cell Res* 5:188–200
64. Notara M, Alatza A, Gilfillan J, Harris AR, Levis HJ, Schrader S, Vernon A, Daniels JT (2010) In sickness and in health: Corneal epithelial stem cell biology, pathology and therapy. *Exp Eye Res* 90:188–195
65. Notara M, Lentzsch A, Coroneo M, Cursiefen C (2018) The Role of Limbal Epithelial Stem Cells in Regulating Corneal (Lymph)angiogenic Privilege and the Micromilieu of the Limbal Niche following UV Exposure. *Stem Cells Int* 2018:1–15
66. Omoto M, Suri K, Amouzegar A, Li M, Katikireddy KR, Mittal SK, Chauhan SK (2017) Hepatocyte Growth Factor Suppresses Inflammation and Promotes Epithelium Repair in Corneal Injury. *Mol Ther* 25:1881–1888
67. Ordonez P, Di Girolamo N (2012) Limbal Epithelial Stem Cells: Role of the Niche Microenvironment. *Stem Cells* 30:100–107
68. Poliseti N, Schlunck G, Reinhard T (2023) PAX6 Expression Patterns in the Adult Human Limbal Stem Cell Niche. *Cells* 12:400
69. Ramaesh T, Ramaesh K, Leask R, Springbett A, Riley SC, Dhillon B, West JD (2006) Increased apoptosis and abnormal wound-healing responses in the heterozygous Pax6^{+/-} mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:1911–7
70. Robertson SYT, Roberts JS, Deng SX (2021) Regulation of Limbal Epithelial Stem Cells: Importance of the Niche. *Int J Mol Sci* 22:11975
71. Roux LN, Petit I, Domart R, Concordet J-P, Qu J, Zhou H, Joliot A, Ferrigno O, Aberdam D (2018) Modeling of Aniridia-Related Keratopathy by CRISPR/Cas9 Genome Editing of Human Limbal Epithelial Cells and Rescue by Recombinant PAX6 Protein. *Stem Cells* 36:1421–1429
72. Schedl A, Ross A, Lee M, Engelkamp D, Rashbass P, van Heyningen V, Hastie ND (1996) Influence of PAX6 Gene Dosage on Development: Overexpression Causes Severe Eye Abnormalities. *Cell* 86:71–82
73. Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE (2005) Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res* 81:247–264
74. Schlötzer-Schrehardt U, Dietrich T, Saito K, Sorokin L, Sasaki T, Paulsson M, Kruse FE (2007) Characterization of extracellular matrix components in the limbal epithelial stem cell compartment. *Exp Eye Res* 85:845–860

75. Schlötzer-Schrehardt U, Latta L, Gießl A, Zenkel M, Fries FN, Käsmann-Kellner B, Kruse FE, Seitz B (2021) Dysfunction of the limbal epithelial stem cell niche in aniridia-associated keratopathy. *Ocul Surf* 21:160–173
76. Seyed-Safi AG, Daniels JT (2020) The limbus: Structure and function. *Exp Eye Res* 197:108074
77. Shortt AJ, Secker GA, Munro PM, Khaw PT, Tuft SJ, Daniels JT (2007) Characterization of the Limbal Epithelial Stem Cell Niche: Novel Imaging Techniques Permit In Vivo Observation and Targeted Biopsy of Limbal Epithelial Stem Cells. *Stem Cells* 25:1402–1409
78. Singh S, Anshita D, Ravichandiran V (2021) MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *Int Immunopharmacol* 101:107598
79. Sivak JM, Mohan R, Rinehart WB, Xu P-X, Maas RL, Fini ME (2000) Pax-6 expression and activity are induced in the reepithelializing cornea and control activity of the transcriptional promoter for matrix metalloproteinase gelatinase B. *Dev Biol* 222:41–54
80. Song Y, Overmass M, Fan J, Hodge C, Sutton G, Lovicu FJ, You J (2021) Application of Collagen I and IV in Bioengineering Transparent Ocular Tissues. *Front Surg* 8:1–16
81. Sridhar M (2018) Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian J Ophthalmol* 66:190
82. Tibrewal S, Ratna R, Gour A, Agarkar S, Dubey S, Ganesh S, Kekunnaya R, Sangwan V, Liu Y, Vanita V (2022) Clinical and molecular aspects of congenital aniridia – A review of current concepts. *Indian J Ophthalmol* 70:2280
83. Torricelli AAM, Singh V, Santhiago MR, Wilson SE (2013) The corneal epithelial basement membrane: structure, function, and disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54:6390–400
84. Tseng SCG (2016) HC-HA/PTX3 Purified From Amniotic Membrane as Novel Regenerative Matrix: Insight Into Relationship Between Inflammation and Regeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57:ORSFh1-8
85. Vaiciulienė R, Rylskytė N, Baguzytė G, Jasinskis V (2021) Risk factors for fluctuations in corneal endothelial cell density (Review). *Exp Ther Med* 23:129
86. Van Buskirk EM (1989) The anatomy of the limbus. *Eye* 3:101–108
87. Van Velthoven AJH, Utheim TP, Notara M, Bremond-Gignac D, Figueiredo FC, Skottman H, Aberdam D, Daniels JT, Ferrari G, Grupcheva C, Koppen C, Parekh M, Ritter T, Romano V, Ferrari S, Cursiefen C, Lagali N, LaPointe VLS, Dickman MM

- (2023) Future directions in managing aniridia-associated keratopathy. *Surv Ophthalmol* 68:940–956
88. Vicente A, Byström B, Lindström M, Stenevi U, Pedrosa Domellöf F (2018) Aniridia-related keratopathy: Structural changes in naïve and transplanted corneal buttons. *PLoS One* 13:e0198822
 89. Walkden A (2020) Amniotic Membrane Transplantation in Ophthalmology: An Updated Perspective. *Clin Ophthalmol Volume* 14:2057–2072
 90. Ye HQ, Azar DT (1998) Expression of gelatinases A and B, and TIMPs 1 and 2 during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:913–21
 91. Yu CQ, Zhang M, Matis KI, Kim C, Rosenblatt MI (2008) Vascular endothelial growth factor mediates corneal nerve repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:3870–8
 92. Zahir-Jouzani F, Atyabi F, Mojtavani N (2017) Interleukin-6 participation in pathology of ocular diseases. *Pathophysiol Off J Int Soc Pathophysiol* 24:123–131
 93. Zarnegar R, Michalopoulos GK (1995) The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J Cell Biol* 129:1177–1180

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der limbalen Epithelstammzellnische.	10
Abbildung 2: Aniridie-assoziierte Keratopathie Stadium IV bei einem 19-jährigen Mann.....	14
Abbildung 3: Zellkultur von primären limbalen Epithelzellen (pLEC, links) und der Epithelzelllinie (mut-LSC, rechts) bei einer Konfluenz von 80%.....	22
Abbildung 4: Gesunde, limbale Fibroblasten vor (links) und nach Behandlung über 48 Stunden mit konditioniertem Medium der primären limbalen Epithelzellen (rechts).....	23
Abbildung 5: Verwendetes PCR-Profil.	26
Abbildung 6: Graphische Darstellung der Genexpressionsdaten (Fold changes) von PAX6 bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (LFC n=6 / AN-LFC n=5).	30
Abbildung 7: Graphische Darstellung der Genexpressionsdaten (Fold changes) von COL1A1 bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (LFC n=6 / AN-LFC n=5).	31
Abbildung 8: Graphische Darstellung der Genexpressionsdaten (Fold changes) von COL4A1 bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (LFC n=6 / AN-LFC n=5).	31
Abbildung 9: Graphische Darstellung der Genexpressionsdaten (Fold changes) von HAS2 bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (LFC n=6 / AN-LFC n=5).	32
Abbildung 10: Graphische Darstellung der Genexpressionsdaten (Fold changes) von MMP2 bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (LFC n=6 / AN-LFC n=5).	33
Abbildung 11: Graphische Darstellung der Genexpressionsdaten (Fold changes) von MMP9 bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (LFC n=6 / AN-LFC n=5).	34
Abbildung 12: Graphische Darstellung der ELISA-Proteinexpressionsdaten von MMP9 (LFC n=6 / AN-LFC n=5).	34
Abbildung 13: Graphische Darstellung der Genexpressionsdaten (Fold changes) von TIMP1 bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (LFC n=6 / AN-LFC n=5).	35
Abbildung 14: Graphische Darstellung der Genexpressionsdaten (Fold changes) von HGF bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (LFC n=6 / AN-LFC n=5).	36
Abbildung 15: Graphische Darstellung der ELISA-Proteinexpressionsdaten von HGF (LFC n=5 / AN-LFC n=5).	36
Abbildung 16: Graphische Darstellung der Genexpressionsdaten (Fold changes) von TGF- β 1 bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (LFC n=6 / AN-LFC n=5).	37
Abbildung 17: Graphische Darstellung der Genexpressionsdaten (Fold changes) von ACTA2 bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (LFC n=6 / AN-LFC n=5).	38
Abbildung 18: Graphische Darstellung der Western Blot-Proteinexpressionsdaten von α -SMA bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (n=3) und repräsentative Western Blot-Banden von α -SMA (42 kDa).	38
Abbildung 19: Graphische Darstellung der Genexpressionsdaten (Fold changes) von NF κ B bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (LFC n=6 / AN-LFC n=5).	39

Abbildung 20: Graphische Darstellung der Western Blot-Proteinexpressionsdaten von NFκB bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (n=3) und repräsentative Western Blot-Banden von NFκB (65 kDa).....	39
Abbildung 21: Graphische Darstellung der Genexpressionsdaten (Fold changes) von IL6 bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (LFC n=6 / AN-LFC n=5).	40
Abbildung 22: Graphische Darstellung der ELISA-Proteinexpressionsdaten von IL6 (LFC n=6 / AN-LFC n=5).	40
Abbildung 23: Graphische Darstellung der Genexpressionsdaten (Fold changes) von CCL2 bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (LFC n=6 / AN-LFC n=5).	41
Abbildung 24: Graphische Darstellung der Genexpressionsdaten (Fold changes) von VEGFA bezogen auf die LFC-Kontrollgruppe (LFC n=6 / AN-LFC n=5).	42
Abbildung 25: Graphische Darstellung der ELISA-Proteinexpressionsdaten von VEGFA (LFC n=6 / AN-LFC n=5).	42

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Hersteller	16
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Hersteller.....	17
Tabelle 3: Verwendete Lösungen, Medien, Puffer und Hersteller	17
Tabelle 4: Verwendete Kits und Hersteller	18
Tabelle 5: Verwendete qPCR-Primer mit Amplifikationsgröße in Basenpaaren (bp) und Hersteller.....	19
Tabelle 6: Verwendete Antikörper mit Wirtsspezies, Molekulargewicht, Verdünnung und Hersteller.....	19

10 Publikation

Aus dieser Dissertationsschrift sind folgende Publikationen entstanden:

Li Z, Stachon T, Zimmermann J, Trusen S, Fries FN, Berger M, Suiwal S, Chai N, Seitz B, Shi L, Amini M, Szentmáry N:

Expression of PAX6 and Keratocyte-Characteristic Markers in Human Limbal Stromal Cells of Congenital Aniridia and Healthy Subjects, In Vitro

Curr Eye Res. 2025 Jan 10:1-11. doi: 10.1080/02713683.2025.2449915

Berger M, Szentmáry N, Berger T, Zimmermann J, Trusen S, Seitz B, Fries FN, Suiwal S, Amini M, Stachon T:

Reciprocal effects of conditioned medium on gene and protein expression of limbal epithelial cells and limbal fibroblasts in congenital aniridia

Ergebnisse dieser Dissertation wurden bei PLOS ONE zur Publikation eingereicht (12.01.2025).

Poster-Präsentation:

Berger M, Fries FN, Berger T, Seitz B, Suiwal S, Amini M, Szentmáry N, Stachon T:

Kongenitale Aniridie – Gen- und Proteinexpression von Limbusfibroblasten in einer indirekten Kokultur mit limbalen Epithelzellen

Ergebnisse dieser Dissertation wurden im Rahmen eines Kongresses der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG) präsentiert (10.10. bis 13.10.2024, Berlin).

11 Danksagung

Den folgenden Personen, die durch ihre Hilfsbereitschaft und ihr Engagement die Entstehung dieser Dissertation begleitet und gefördert haben, möchte ich an dieser Stelle meinen herzlichen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Nóra Szentmáry, Institutsleiterin des Dr. Rolf M. Schwiete Zentrums für Limbusstammzellforschung und kongenitale Aniridie und Frau Dr. Tanja Stachon für die Überlassung dieses Dissertationsthemas, die fachliche Expertise und die exzellente Betreuung, die in jeder Hinsicht vorbildlich war.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Berthold Seitz, Direktor der Universitätsaugenklinik in Homburg (Saar), der mir die Möglichkeit zur Promotion eröffnet hat.

Die Anfertigung dieser Dissertation ermöglichte mir Einblicke in die aktuelle Forschung und das wissenschaftliche Arbeiten zu erhalten, wofür ich mich herzlich bedanken möchte.

Abschließend gilt mein tiefster Dank meiner Familie für die uneingeschränkte Unterstützung, insbesondere ohne den Rückhalt meines Bruders Dr. Tim Berger wäre dieser Weg für mich nicht möglich gewesen.

12 Lebenslauf

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

Tag der Promotion: 06. Juni 2025

Dekan: Univ. Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Berichterstatter: Univ. Prof. Dr. med. Nóra Szentmáry

Jun. Prof. Sandra Rother