

Aus der Klinik für Augenheilkunde Campus Virchow  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Kindliche Katarakt: Genexpressionsanalyse in humanen  
Linsenepithelzellen sowie HLE-B3 Zellen und der Einfluss von  
Transforming Growth Factor Beta-2

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Laura Wernecke

aus Stendal

Datum der Promotion: 18.09.2020

*„Wenn Sie die Art und Weise ändern, wie Sie die Dinge betrachten, ändern sich die Dinge, die Sie betrachten.“*

Max Planck (1858-1947)

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Kurzzusammenfassung</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>V</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Anatomie und Funktion der Linse .....	1
1.2 Besonderheiten der kindlichen Katarakt und der Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition bei der Nachstarentstehung.....	1
1.3 Ziele und Fragestellungen der Arbeit .....	6
<b>2. Methoden und Material</b> .....	<b>7</b>
2.1 Richtlinien.....	7
2.2 Patientendaten .....	7
2.3 Zellkultur.....	8
2.3.1 Zellkultur kindlicher Linsenepithelzellen (pLEC).....	8
2.3.2 Zellkultur der Linsenzelllinie HLE-B3.....	8
2.4 Quantitative Expressionsanalyse .....	9
2.4.1 RNA-Isolierung .....	9
2.4.1.1 RNA-Isolierung mittels TRI Reagent.....	9
2.4.1.2 RNA-Isolierung mittels RNeasy Kit .....	10
2.4.2 Reverse Transkription .....	10
2.4.3 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion .....	11
2.5 Gelelektrophorese .....	12
2.6 Immunzytochemie .....	13
2.7 Statistische Auswertung .....	13
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>14</b>
3.1 Klinische Patientenmerkmale .....	14
3.2 Kindliche Linsenepithelzellen .....	14
3.2.1 Einfluss klinischer Faktoren auf das Wachstum kindlicher Linsenepithelzellen <i>in vitro</i> .....	14

---

3.2.2	Zellmorphologie kindlicher Linsenepithelzellen .....	15
3.2.3	Genexpression kindlicher Linsenepithelzellen und der Einfluss von TGF $\beta$ -2 .....	15
3.3	Linsenzelllinie HLE-B3 .....	16
3.3.1	Genexpression und immunzytochemische Untersuchung von Zellen der Linsenzelllinie HLE-B3 und der Einfluss von TGF $\beta$ -2.....	16
3.3.2	Genexpressionsunterschiede zwischen kindlichen Linsenepithelzellen und Zellen der Linsenzelllinie HLE-B3.....	16
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>17</b>
4.1	Klinische und molekularbiologische Charakterisierung von kindlichen Linsenepithelzellen und der Linsenzelllinie HLE-B3 .....	17
4.2	Limitationen.....	20
4.3	Ausblick.....	21
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>23</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>30</b>
	<b>Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation.....</b>	<b>31</b>
	<b>Auszug aus der Journal Summary List.....</b>	<b>32</b>
	<b>Druckexemplar der ausgewählten Publikation.....</b>	<b>33</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>43</b>
	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>44</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>45</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

**Abbildung 1.** Beidseitige kongenitale Katarakt eines Säuglings. .... 2

## TABELLENVERZEICHNIS

**Tabelle 1.** Reaktionsansatz für cDNA Synthese ..... 11

**Tabelle 2.** Reaktionsansatz für qRT-PCR..... 11

**Tabelle 3.** Primersequenzen ..... 12

## KURZZUSAMMENFASSUNG

### Einleitung

Der Nachstar ist, insbesondere bei Kindern, eine häufige Komplikation der Kataraktoperation. Dabei kann eine durch den Transforming Growth Factor Beta (TGF $\beta$ ) induzierte epithelial-mesenchymale Transition (EMT) zur Nachstarentstehung beitragen. Jedoch sind die zugrundeliegenden Prozesse des Nachstars im Kindesalter weitgehend unerforscht. Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen sollen zu einem verbesserten Verständnis dieser Erkrankung beitragen und somit eine Grundlage für zukünftige therapeutische Ansätze schaffen.

### Methoden

Klinische Merkmale von 40 Kindern mit Katarakt wurden mit dem Wachstumsverhalten von kindlichen Linsenepithelzellen (pLEC) *in vitro* korreliert. Vorderkapseln mit pLEC konnten während Kataraktoperationen an Kindern gewonnen und kultiviert werden. Die Genexpressionen von  $\alpha$ B-Crystallin (CRYAB) und Connexin-43 (Cx43) als epitheliale Marker und  $\alpha$ <sub>v</sub>-Integrin (ITGAV),  $\alpha$ -smooth muscle actin (aSMA), Kollagen-1 $\alpha$ 2 (COL1A2) sowie Fibronectin-1 (FN1) als mesenchymale Marker wurden vor und nach Stimulation der Zellen mit TGF $\beta$ -2 quantifiziert. Anschließend folgten Kontrollexperimente an der Linsenzelllinie (HLE-B3).

### Ergebnisse

54 Vorderkapseln von 40 Kindern im Alter von 1 bis zu 180 Monaten wurden entnommen. In 44 % der Kapseln von Patienten bis zu 12 Monaten und in 33 % von Kindern im Alter von 13 bis zu 60 Monaten konnte ein Zellauswuchs beobachtet werden, während lediglich 6 % der Kapseln von Kindern über 60 Lebensmonate ein Zellauswuchs zeigten. Die mRNA-Expression von CRYAB (in HLE-B3 Zellen), ITGAV (in HLE-B3 Zellen), COL1A2 und FN1 (in pLEC und HLE-B3 Zellen) erhöhte sich durch die Stimulation mit TGF $\beta$ -2 signifikant.

### Schlussfolgerung

Patientenmerkmale, insbesondere das Alter zum Zeitpunkt der Kataraktoperation, beeinflussen das Proliferationsverhalten von pLEC *in vitro*. Die Genexpressionsprofile von pLEC und HLE-B3 deuten darauf hin, dass ITGAV, COL1A2 und FN1 an der EMT beteiligt sind.

## ABSTRACT

**Der nachfolgende Text sowie die deutsche Kurzzusammenfassung entsprechen dem Abstrakt der folgenden Arbeit:**

Wernecke L, Keckeis S, Reichhart N, Strauß O, Salchow DJ. Epithelial-Mesenchymal Transdifferentiation in Pediatric Lens Epithelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018;59(15):5785-94. (1) doi:<https://doi.org/10.1167/iovs.18-23789>; lizenziert unter CC-BY 4.0; <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

### “Purpose

Posterior capsule opacification (PCO) is a complication after cataract surgery, particularly in children. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) of lens epithelial cells, mediated by transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ), contributes to PCO. However, its pathogenesis in children is poorly understood. We correlated cell growth in culture with patient characteristics, studied gene expression of pediatric lens epithelial cells (pLEC), and examined the effects of TGF $\beta$ -2 on these cells *in vitro*.

### Methods

Clinical characteristics of children with cataracts correlated with growth behavior of pLEC *in vitro*. mRNA expression of epithelial ( $\alpha$ B-crystallin, connexin-43) and mesenchymal ( $\alpha$ <sub>v</sub>-integrin,  $\alpha$ -smooth muscle actin, collagen-1 $\alpha$ 2, fibronectin-1) markers was quantified in pLEC and in cell line HLE-B3 in the presence and absence of TGF $\beta$ -2.

### Results

Fifty-four anterior lens capsules from 40 children aged 1 to 180 months were obtained. Cell outgrowth occurred in 44% of the capsules from patients  $\leq$  12 months and in 33% of capsules from children aged 13 to 60 months, but in only 6% of capsules from children over 60 months. TGF $\beta$ -2 significantly upregulated expression of  $\alpha$ B-crystallin (HLE-B3),  $\alpha$ <sub>v</sub>-integrin (HLE-B3), collagen-1 $\alpha$ 2, and fibronectin-1 (in pLEC and HLE-B3 cells).

### Conclusion

Patient characteristics correlated with growth behavior of pLEC *in vitro*, paralleling a higher clinical incidence of PCO in younger children. Gene expression profiles of pLEC and HLE-B3 suggest that upregulation of  $\alpha$ <sub>v</sub>-integrin, collagen-1 $\alpha$ 2, and fibronectin-1 are involved in EMT.”

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Anatomie und Funktion der Linse

Die Linse stellt den Bestandteil des dioptrischen (lichtbrechenden) Apparates des Auges dar, der die Funktion der Akkommodation vollzieht (2). Durch Änderung ihrer Krümmung kann die Brechkraft angepasst werden, sodass Gegenstände in verschiedenen Entfernungen fokussiert werden können (2).

Die Linse entsteht aus dem Ektoderm und beinhaltet zwei verschiedene Zelltypen: Linsenepithelzellen sowie Linsenfaserzellen (2-4). Umschlossen ist die Linse von einer Kapsel (2, 3). Das vordere einschichtige Epithel besteht aus einem Verband von polar angeordneten Zellen (3). Unterhalb des Linsenepithels erstreckt sich ein dichtes System aus Linsenfaserzellen, welche durch einen dünnen länglichen Zellkörper gekennzeichnet sind (3).

Im ausdifferenzierten Zustand besitzen Linsenfaserzellen weder Zellkern noch Zellorganellen (3). Linsenepithelzellen können nach Abschluss der Embryonalphase im Bereich des Linsenäquators zu Linsenfaserzellen differenzieren (3, 4). Sie verlieren dabei ihren Kern sowie weitere Zellorganellen und lagern sich schalenförmig um die bereits bestehenden embryonalen Linsenfaserzellen herum an (2, 3). Die auf diese Weise lebenslang neu entstehenden Linsenfaserzellen führen dazu, dass das Gewicht der Linse mit fortschreitendem Alter zunimmt (2). Zugleich findet kein Austausch von Zellen statt (3). Somit unterliegt die Linse einem stetigen physiologischen Alterungsprozess (2).

Eine Trübung der Linse wird als „Grauer Star“ oder „Katarakt“ bezeichnet (2). Sie führt zu einer Sehverschlechterung, die bis hin zur Erblindung reichen kann.

### 1.2 Besonderheiten der kindlichen Katarakt und der Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition bei der Nachstarentstehung

Obwohl die Katarakt eine typische Erkrankung des höheren Lebensalters ist, kann sie auch Kinder betreffen. Tritt sie bereits bei der Geburt oder im Kindesalter auf, bezeichnet man diese als kongenitale bzw. infantile Katarakt (Abbildung 1). Weltweit sind nur etwa 4,24 von 10 000 Kindern betroffen (5). Dennoch hat die kindliche Katarakt einen recht großen Anteil an den therapierbaren Erblindungen bei Kleinkindern (6, 7).

Ursachen einer kindlichen Katarakt können intrauterine Infektionen wie beispielsweise Toxoplasmose, Rötelnvirus, Zytomegalievirus, Herpes-Simplex-Virus, Epstein-Barr-Virus oder Syphilis sein (8-10). Darüber hinaus entstehen kindliche Katarakte im Rahmen von

Stoffwechselstörungen wie z. B. der Galaktosämie (8, 9, 11). Zudem sind Assoziationen verschiedener okulärer Fehlbildungen (Mikrophthalmus, Aniridie, persistierender hyperplastischer primärer Glaskörper usw.) mit einer Linsentrübung beschrieben (10).

Ein beträchtlicher Anteil der kindlichen Katarakte wird vererbt oder tritt im Rahmen von genetischen Anomalien (Zellweger-Syndrom, Lowe-Syndrom, Trisomie, Turner-Syndrom usw.) auf (8, 10, 11). Sekundär sind u. a. intraokulare Entzündungen (z. B. Uveitis), Strahlenexpositionen (z. B. Röntgen) oder Traumata für die Kataraktentstehung von Bedeutung. Zudem scheinen Kinder mit einem niedrigen Geburtsgewicht gehäuft an einer bilateralen kongenitalen Katarakt zu erkranken (12).

Die klinische Symptomatik ist variabel und abhängig von der Dichte der Trübung sowie dem Zeitpunkt ihres Auftretens. Oft wird die Katarakt im Rahmen einer Routineuntersuchung beim Kinderarzt entdeckt, oder sie tritt u. a. durch Strabismus, Leukorie beziehungsweise eine verzögerte kindliche Entwicklung in Erscheinung.



**Abbildung 1.** *Beidseitige kongenitale Katarakt eines Säuglings.*

Bildquelle: Mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. med. Daniel J. Salchow (Berlin).

Vor allem die ersten Lebensmonate sind als sensitive Phase der Entwicklung der Sehfähigkeit essentiell (2). In dieser Phase können Linsentrübungen eine irreversible Schwachsichtigkeit (Amblyopie) des Auges verursachen (2). Um der amblyogenen Wirkung der Katarakt vorzubeugen, ist ein frühzeitiges operatives Vorgehen innerhalb der ersten Lebenswochen unverzichtbar (13). Goldstandard ist die Katarakt-Operation, wobei die Vorderkapsel mittels Vitrektom oder Pinzette eröffnet (Kapsulorhexis) und das Linsenmaterial durch ein Saug-Spül-System entfernt wird. Ergänzend dazu eröffnet man bei Kindern die Hinterkapsel und führt eine vordere Glaskörperentfernung (anteriore

Vitrektomie) durch (13-15). Diese zusätzlichen Interventionen sind notwendig, weil jüngere Kinder ein deutlich erhöhtes Risiko für eine Nachstarentwicklung aufweisen (16). Der Nachstar, eine Trübung der hinteren Linsenkapsel nach einer Kataraktoperation, ist vor allem bei Kindern eine gefürchtete häufige Komplikation. Bei Belassen der Hinterkapsel entsteht bei vielen Kindern postoperativ ein Nachstar (16-18). Kinder unter sechs Jahren entwickeln signifikant häufiger einen Nachstar als ältere Kinder (16).

Bei erwachsenen Patienten ist eine vollständige Entfernung aller Linsenepithelzellen intraoperativ kaum machbar, sodass im Kapselsack verbleibende Linsenepithelzellen proliferieren und zur visuellen Achse migrieren können (17, 19). Dies ist bei Kindern stärker ausgeprägt und häufiger zu beobachten als bei Erwachsenen. Gleichzeitig durchleben einige dieser Zellen unter dem Einfluss des Wachstumsfaktors Transforming Growth Factor Beta (TGF $\beta$ ) eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) zu mesenchymalen Zellen (4, 20-22).

Während die Eröffnung der hinteren Kapsel mittels Neodym (Nd):YAG-Laser bei Erwachsenen eine mögliche Therapieoption des Nachstars darstellt, ist dies aufgrund mangelnder Fixation und Compliance bei jüngeren Kindern oft nicht möglich (14). Da die Sehentwicklung im Kindesalter sehr vulnerabel ist (2), sind beim Auftreten eines Nachstars im Kleinkindalter oft weitere chirurgische Eingriffe notwendig, um eine klare visuelle Achse zu schaffen und eine Amblyopie zu verhindern (14, 16).

Trotz des klinischen Bedarfs war die Pathophysiologie des Nachstars bei Kindern bisher nur selten Gegenstand der Forschung und wird daher nur unzureichend verstanden.

Da die Katarakt im Kindesalter eine seltene Erkrankung darstellt, basieren die derzeitigen Hypothesen vor allem auf der Erforschung des Nachstars mittels adulter humaner Zellen oder tierexperimenteller Modelle (23-29). Die genauen zugrundeliegenden Prozesse und beteiligten Wachstumsfaktoren sind bislang nicht vollständig verstanden.

Unter physiologischen Bedingungen weisen Epithelzellen eine polare Struktur auf und sind durch Zellkontakte miteinander verbunden (3, 4, 30). Im Zuge einer epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) verlieren die Epithelzellen Polarität und Zell-Zellkontakte (30). Neben dem Verlust der epithelialen Eigenschaften differenzieren die Zellen zu einem migratorischen mesenchymalen Phänotyp (30). Experimente an adultem menschlichen (24) und tierischem (23, 25, 26) Material sowie an Zelllinien (24, 31) verdeutlichten, dass der Wachstumsfaktor TGF $\beta$  bei der EMT in Linsenzellen eine entscheidende Rolle spielt (4, 20, 29).

Das vor allem aus der Tumorforschung bekannte Zytokin ist für seine dichotome Wirkung bekannt. Dabei verhindert es in frühen Tumorstadien durch einen Zellzyklusarrest einerseits ein unkontrolliertes Wachstum und induziert andererseits in späteren Stadien die Tumorprogression, Metastasierung und Dedifferenzierung beteiligter Zellen (32, 33). In Linsenzellen bewirkt der Wachstumsfaktor eine vermehrte Produktion von Proteinen, die als mesenchymale Marker gelten, sowie eine morphologische Transformation in einen spindelförmigen Zellkörper (23, 26, 34). Dabei wird  $\alpha$ -smooth muscle actin (aSMA), ein charakteristisches Merkmal für EMT, in den spindelförmigen Zellen nachgewiesen (27, 34). Zunächst wurde vermutet, dass aSMA mit der Matrixkontraktion assoziiert ist (35), jedoch zeigen neuere Untersuchungen, dass ein Gen-Knockdown von aSMA die durch TGF $\beta$  hervorgerufene Kontraktion nicht hemmen kann (21, 24).

Zugleich kommt es bei dem Prozess der EMT zu einer vermehrten Produktion von Kollagen (25, 27), Fibronectin (24, 25, 34) und weiteren Proteinen der Extrazellulärmatrix, die als mesenchymale Marker gelten (20). Fibronectin kann verschiedenste Prozesse induzieren, die die Migration (36) oder Differenzierung von Zellen steuern (37).

Zudem werden  $\alpha$ -Integrin Untereinheiten (ITGAV) unter Einfluss von TGF $\beta$  verstärkt exprimiert (38) und können in Nachstarmodellen postoperativ vermehrt nachgewiesen werden (39, 40). Ein Fehlen von ITGAV in Knock-out Mäusen führt postoperativ zu einer verminderten Expression mesenchymaler Marker und beeinflusst den TGF $\beta$ -Signalweg (40), sodass diese Membranrezeptoren eine Rolle bei der TGF $\beta$  Aktivierung im Rahmen der Nachstarentstehung spielen könnten (41). Demgegenüber wird die Expression epithelialer Marker wie Connexin-43 (Cx43) durch den Wachstumsfaktor reduziert (34).

Des Weiteren ist  $\alpha$ B-Crystallin (CRYAB) reichlich in Linsenepithelzellen vorhanden (42) und kann durch eine Chaperon-ähnliche Aktivität vor stressinduzierter Apoptose sowie Proteinaggregation schützen (43, 44). Neben den zahlreich beschriebenen Mutationen im  $\alpha$ <sub>A</sub>-Crystallin-Gen können auch Mutationen im  $\alpha$ <sub>B</sub>-Crystallin-Gen ursächlich für autosomal-dominante kongenitale Katarakte sein (43, 45, 46).

TGF $\beta$  wird als inaktives Vorläuferprotein sezerniert (20, 32). Beim Menschen sind drei verschiedene TGF $\beta$  Isoformen bekannt, wobei das im Auge dominierende TGF $\beta$ -2 (22, 47) als potente Isoform hinsichtlich der Induktion einer EMT angesehen wird (26). Nach Bindung von TGF $\beta$  an den TGF $\beta$  Rezeptor II (T $\beta$ RII) bildet dieser mit dem TGF $\beta$  Rezeptor I (T $\beta$ RI) einen Komplex (32, 48, 49).

Da die Rezeptoren der Klasse der Serin/Threoninkinasen angehören, kann T $\beta$ RII den T $\beta$ RI durch Phosphorylierung in einen aktiven Zustand versetzen (49). Die induzierte Konformationsänderung erlaubt eine Interaktion mit den rezeptorregulierten Smads 2 und 3. Diese werden durch den T $\beta$ RI an ihrem C-terminalen Ende phosphoryliert und damit aktiviert (32, 48, 49). Nach Ablösung vom Rezeptorkomplex translozieren sie zusammen mit Smad 4 in den Nukleus, wo sie die Transkription verschiedener Zielgene steuern (32, 48, 49). Demgegenüber agiert Smad 7 als Inhibitor, indem er u. a. mit Smad 2 und 3 um die Bindungsstelle am T $\beta$ RI konkurriert und somit deren Aktivierung unterbindet (32, 48). Dawes et al. konnten in ihrer Arbeit die Notwendigkeit von Smad 4 für die Expression von  $\alpha$ SMA und Fibronektin nachweisen (50). Gleichzeitig hat ein Gen-Knockdown von Smad 4 keinen Einfluss auf die durch TGF $\beta$  hervorgerufene Matrixkontraktion (50). Zusammen mit der TGF $\beta$ -induzierten Aktivierung von Smad-unabhängigen Signalwegen wie ERK und p38 in Linsenepithelzellen scheint die Expression der mesenchymalen Marker  $\alpha$ SMA und FN sowie die Matrixkontraktion über unterschiedliche Signalwege vermittelt zu sein (50). Folglich kann die Wirkung von TGF $\beta$  im Rahmen der Nachstarentstehung auf verschiedene komplexe Signalkaskaden sowie Wechselwirkungen dieser zurückgeführt werden.

Aus der TGF $\beta$ -vermittelten Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) ergibt sich ein weiterer Smad-unabhängiger Signalweg, der im Rahmen der EMT eine Rolle spielt (49, 51). Vereinfacht beschrieben führt der dadurch induzierte Signalweg zu einer Phosphorylierung und Aktivierung der Akt-Kinase (49). Nach Aktivierung von mTOR phosphoryliert dieses die Protein-S6-Kinase 1 und induziert die Translation von Proteinen, die bei der EMT beteiligt sind (49). In Linsenepithelzellen scheint der PI3K-Akt-mTOR-Signalweg zur EMT beizutragen, was durch die Hemmung TGF $\beta$ -2-vermittelter EMT durch Inhibitoren der PI3K oder durch mTOR-Inhibitoren verdeutlicht wird (34, 52).

### 1.3 Ziele und Fragestellungen der Arbeit

Bei Kindern sind die zugrundeliegenden pathophysiologischen Prozesse des Nachstars, der Einfluss des Wachstumsfaktors TGF $\beta$ -2 sowie das gehäufte Auftreten bei jüngeren Kindern bisher unzureichend verstanden.

Das Anliegen dieser Dissertation ist es, die molekularen Grundlagen und den Pathomechanismus bei der Nachstarentstehung im Kindesalter zu ermitteln und genauer zu verstehen. In dieser Arbeit wurden sowohl von Spendern stammende kindliche Linsenepithelzellen als auch Zellen der Zelllinie HLE-B3 zur Untersuchung der möglichen Mechanismen einer Nachstarentstehung verwendet.

Im Einzelnen sollen die folgenden Fragestellungen beantwortet werden:

- Gibt es klinische Merkmale, die das Zellwachstum *in vitro* beeinflussen?
- Welches Genexpressionsmuster charakterisiert die kindlichen Linsenepithelzellen?
- Wie unterscheiden sich die kindlichen Linsenepithelzellen und die Zellen der Zelllinie HLE-B3 bezüglich der Genexpression?
- Welchen Effekt hat der Wachstumsfaktor TGF $\beta$ -2 auf die Genexpression kindlicher Linsenepithelzellen?

## 2. METHODEN UND MATERIAL

### **Anteile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:**

Wernecke L, Keckeis S, Reichhart N, Strauß O, Salchow DJ. Epithelial-Mesenchymal Transdifferentiation in Pediatric Lens Epithelial Cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2018;59(15):5785-94. (1) doi:<https://doi.org/10.1167/iovs.18-23789>; lizenziert unter CC-BY 4.0; <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

### 2.1 Richtlinien

Zur Durchführung dieser Studie wurde eine Genehmigung der Ethikkommission der Universitätsklinik Charité eingeholt. Die Eltern der Patienten stimmten der Entnahme von kindlichen Vorderkapseln sowie deren Einsatz in der Forschung zu. Die „Grundsätze der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ wurden zu jedem Zeitpunkt dieser Arbeit gewahrt.

### 2.2 Patientendaten

40 Kinder mit ein- oder beidseitiger Katarakt im Alter zwischen ein und 180 Monaten, die sich in der Klinik für Augenheilkunde der Universitätsklinik Charité vorstellten, wurden in die Studie eingeschlossen.

Die klinischen Befunde der Patienten wurden retrospektiv aus der elektronischen Patientenakte (SAP Deutschland SE & Co. KG, Walldorf) entnommen. Als klinische Merkmale wurden Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation, Geschlecht sowie Lateralität der Katarakt erhoben. Zudem wurden Hinweise auf eine mögliche Ätiologie, wie beispielsweise eine positive Familienanamnese für kongenitale Katarakte oder das Vorhandensein von Erkrankungen, die mit einer Katarakt vergesellschaftet sein können (z. B. Trisomie 21, kraniofaziale Syndrome oder Galaktosämie), erfasst. Schließlich konnten die Katarakte hinsichtlich ihrer Morphologie klassifiziert und folgende Katarakttypen unterschieden werden: vorderer Polstar, hinterer Polstar, Cataracta totalis, Cataracta zonularis, Cataracta subcapsularis posterior, Katarakte bei persistierender fetaler Vaskularisation (PFV) und komplexe Katarakte. Existierten keine genauen Angaben zur Kataraktart, wurden diese als „nicht näher bezeichnet“ klassifiziert. Weiterhin wurden okuläre Begleiterkrankungen wie Strabismus oder Nystagmus notiert.

## 2.3 Zellkultur

### 2.3.1 Zellkultur kindlicher Linsenepithelzellen (pLEC)

Insgesamt konnten 54 vordere Linsenkapseln unter sterilen Bedingungen mittels manueller kurvilinearer Kapsulorhexis bei Kindern entnommen werden. Zur Kultivierung der primären Linsenepithelzellen wurde die Methode nach Ibaraki (53) weiterentwickelt. Zunächst wurden die Vorderkapseln mit anheftenden pLEC nach der Entnahme auf ein 35 mm großes Kulturgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt. Nach einer fünfminütigen Ruhephase wurden sie mit 60 µl Dulbecco's Modified Eagle Medium/F-12 (Sigma-Aldrich, Schnelldorf) bedeckt. Dieses enthielt 20 % fetales Kälberserum (FKS, PAA, Pasching, Österreich) sowie 1 % Penicillin-Streptomycin (Biochrom, Berlin). Anschließend erfolgte eine Befestigung der Vorderkapseln mittels Deckgläsern (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) am Boden der Petrischale, um einen Kontakt mit dieser sicherzustellen. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C im CO<sub>2</sub> begasten Brutschrank (Thermo Fisher Scientific). Nach 24 h konnte 1 ml Kulturmedium vorsichtig zur Petrischale hinzugefügt werden, ohne dabei das Probenmaterial zu berühren. Das Medium wurde jeden dritten Tag gewechselt. Dabei zeigten 16 Kapseln ein Zellwachstum. Sechs dieser Kapseln (Passage 0) konnten für weitere Experimente verwendet werden. Die Zellen der restlichen Kapseln wurden am Tag 13 passagiert, indem sie mit PBS (Biochrom) gewaschen, anschließend mit Accutase (PAA) abgelöst und nach erfolgter Zentrifugierung in ein neues Kulturgefäß überführt wurden. Nach etwa sechs Tagen wiesen die Zellen eine Konfluenz auf, wurden erneut passagiert und auf je zwei Wells (Falcon, Durham, USA) aufgeteilt. Nach Erreichen einer 70%igen Konfluenz wurden die Zellen der Passage 2 für 24 h in einem serumfreien Medium kultiviert, bevor sich eine 48-stündige Stimulation mit 10 ng/ml TGFβ-2 (Sigma-Aldrich) anschloss. Als Kontrolle dienten Zellen ohne Stimulation mit TGFβ-2. Während der Kultivierung erfolgte eine tägliche lichtmikroskopische Untersuchung (Zeiss, Jena; Leica, Wetzlar) der Linsenkapseln und der anheftenden Zellen.

### 2.3.2 Zellkultur der Linsenzelllinie HLE-B3

Zur Validierung der von den pLEC erhaltenen Daten diente die Zelllinie HLE-B3 (ATCC, Manassas, USA). Die Bereitstellung eines STR-Analysezertifikats durch die Firma ATCC ermöglichte eine Authentifizierung dieser Zellen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Eagle's Minimum Essential

Medium (ATCC), welches 20 % FKS enthielt. Nach Erreichen der Konfluenz der immortalisierten Zellen wurden sie unter Verwendung von 0,05 % Trypsin- 0,02 % EDTA (PAA) passagiert. Analog zu den kindlichen Linsenepithelzellen analysierte man die Expressionsprofile der HLE-B3 Zellen in An- und Abwesenheit von TGF $\beta$ -2.

## 2.4 Quantitative Expressionsanalyse

### 2.4.1 RNA-Isolierung

#### 2.4.1.1 RNA-Isolierung mittels TRI Reagent

Die Isolierung der Ribonukleinsäure (RNA) ermöglicht die Genexpressionsanalyse in Zellen und Geweben (54). Da die RNA sehr anfällig gegenüber Ribonukleasen (RNasen) ist (54), wurden RNase-freie Materialien verwendet. Bei Kontamination der RNA mit RNasen können diese Enzyme die RNA hydrolytisch spalten. Zur Eliminierung möglicher RNasen wurde das Reagenz „RNase AWAY“ (Thermo Fisher Scientific) genutzt.

Die RNA-Isolierung der kindlichen Linsenepithelzellen erfolgte mittels TRI Reagent (Sigma-Aldrich). Diese Substanz basiert auf der von Chomczynski und Sacchi beschriebenen „single-step“ RNA-Isolierung (54).

Hierbei erlaubt die Verwendung verschiedener Bestandteile wie Phenol, Guanidiniumthiocyanat oder Chloroform die Auftrennung der jeweiligen Probe in RNA, DNA und Proteinen (54). Es resultiert eine Separierung der Probe. Dabei enthält die obere wässrige Phase die RNA (54). Darauf folgen die Interphase, in welcher sich die DNA befindet, sowie die angrenzende Phenolphase (54). Die RNA-Isolierung mittels TRI Reagent wurde an das Herstellerprotokoll angelehnt durchgeführt.

Nachdem das Wachstumsmedium aus der Kulturflasche entfernt wurde, fügte man 1000  $\mu$ l TRI Reagent zum Kulturgefäß hinzu. Anschließend konnten die Zellen durch wiederholtes Aufziehen der Pipette (Eppendorf) lysiert werden. Nach Überführung der Lösung in ein neues Tube (Sarstedt, Nümbrecht) erfolgte eine Inkubation für 5 min bei Umgebungstemperatur. Nach Beimengung von 200  $\mu$ l Chloroform (Sigma-Aldrich) wurde das Röhrchen für 15 s geschwenkt und weitere 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch eine 15-minütige Zentrifugation der Probe bei 4 °C und 12.000 x g segmentierte sich die Lösung, sodass die obere wässrige Schicht in ein neues Tube überführt werden konnte. Zur besseren Visualisierung wurden anschließend 2  $\mu$ l „Pellet Paint“ (Novagen, San Diego, USA) sowie 100  $\mu$ l 3 M Natriumacetat (Novagen) unter vorsichtigem Vermischen hinzugefügt. Die Präzipitation erfolgte mit 500  $\mu$ l Isopropanol (100 %, Carl Roth, Karlsruhe). Danach schloss sich eine fünfminütige Inkubation der Probe bei -20 °C

an. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 12.000 x g konnte der Überstand entfernt und mit der Aufreinigung des resultierenden pinkfarbenen RNA-Pellets mittels 1000 µl Ethanol (75 %, Sigma-Aldrich) begonnen werden. Nun wurde die Zentrifugation für weitere 5 min wiederholt. Ein weiterer Waschschrift mit 100%igem Ethanol wurde durchgeführt. Schließlich konnte der Überstand verworfen und das RNA-Pellet für 5-10 min getrocknet werden. Nach dem Resuspendieren des RNA-Pellets in 20 µl RNase-freiem Wasser inkubierte man die Probe für 10 min bei 55 °C.

Unter Verwendung des Spektrophotometers „Nanodrop 2000“ (Thermo Fisher Scientific) konnten die Konzentration und Reinheit der extrahierten RNA ermittelt werden. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -80 °C.

#### 2.4.1.2 RNA-Isolierung mittels RNeasy Kit

Das RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden), dessen Einsatz entsprechend des Herstellerprotokolls erfolgte, diente als Isolierungsmethode für HLE-B3 Zellen. Dieses Kit ist speziell für die Verwendung geringer Zellmengen entwickelt worden. Für die Experimente verwendete man Zellen der Zelllinie HLE-B3 der Passagen fünf bis neun. Reinheit und Konzentration der RNA wurden mittels „Nanodrop 2000“ bestimmt. Die anschließende Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

#### 2.4.2 Reverse Transkription

Die Umschreibung der RNA in cDNA wird durch die reverse Transkriptase (RT) ermöglicht (54). Die Entdeckung der reversen Transkriptase geht auf die Nobelpreisträger Howard Temin und David Baltimore zurück (54).

Das hierfür genutzte „QuantiTect Reverse Transcription Kit“ (Qiagen) wurde analog des Herstellerprotokolls eingesetzt (Tabelle 1). Die Eliminierung etwaiger Verunreinigungen mit genomischer DNA erfolgte durch Gebrauch der Substanz „gDNA Wipeout Buffer, 7x“ (Qiagen) entsprechend des Anwenderprotokolls.

Zur Durchführung der reversen Transkription wurde der Thermocycler (MJ Research/Biozym, Hessisch Oldendorf) verwendet. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 42 °C und anschließender 3-minütiger Erhitzung auf 95 °C wurde die synthetisierte cDNA auf Eis gekühlt, danach bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

**Tabelle 1.** Reaktionsansatz für cDNA Synthese

Bestandteile	Volumen pro Reaktion
Reverse-Transkriptase Master-Mix, 20x	1 µl
Quantiscript RT-Puffer, 5x	4 µl
RT Primer-Mix, 20x	1 µl
Template-RNA (aus gDNA Eliminierungsreaktion)	14 µl
<b>Gesamtreaktionsvolumen</b>	<b>20 µl</b>

### 2.4.3 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) diente dazu, die mRNA-Expression der oben beschriebenen Zellen zu analysieren. Dabei ermöglicht der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green (Qiagen) die Detektion des entsprechenden Amplifikats. Zur Durchführung von Negativkontrollen wurde die entsprechende cDNA durch RNase-freies Wasser ersetzt (Tabelle 2).

**Tabelle 2.** Reaktionsansatz für qRT-PCR

Bestandteile	Volumen pro Reaktion
2x Rotor Gene SYBR Green PCR Master-Mix	12,5 µl
Vorwärtsprimer (1 µM)	2,5 µl
Rückwärtsprimer (1 µM)	2,5 µl
Template-cDNA (12,5 ng/µl)	1 µl
RNase-freies Wasser	6,5 µl
<b>Gesamtreaktionsvolumen</b>	<b>25 µl</b>

Die qRT-PCR erfolgte im „Rotor Gene Q“ (Qiagen). Nach einer initialen fünfminütigen Denaturierung bei 95 °C folgten 36 Zyklen, in denen die Proben jeweils auf Temperaturen von 95 °C für 15 s, 60 °C für 20 s und 72 °C für 20 s erhitzt wurden.

Ausgehend von 72 °C wurde die Temperatur schrittweise um 1 °C bis zum Erreichen von 95 °C erhöht, danach bei 25 °C gehalten.

Die hierbei verwendeten Primer (Tabelle 3, Eurofins Genomic, Ebersberg) für die Gene Connexin-43 (Cx43),  $\alpha_B$ -Crystallin (CRYAB),  $\alpha_V$ -Integrin (ITGAV),  $\alpha$ -smooth muscle actin (aSMA), Kollagen-1 $\alpha_2$  (COL1A2), Fibronectin-1 (FN1), Transforming Growth Factor Beta-2 (TGF $\beta$ -2) und Glyceraldehyde-3-phosphate-Dehydrogenase (GAPDH) wurden mit Hilfe des Programms „Primerblast“ generiert

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, aufgerufen am 03. März 2014). Durch ein spezielles Exon-Exon überspannendes Design soll eine Amplifikation von DNA-Verunreinigungen verhindert und gleichzeitig eine selektive Primerbindung an die cDNA ermöglicht werden. Die Daten wurden aus der Rotor-Gene-Software bezogen und die relative Expression mit Hilfe der  $C_T$ -Vergleichsmethode, welche auch als comparative  $C_T$ -method bekannt ist, ermittelt (55). Dabei wurde das Housekeeping-Gen GAPDH zur Normalisierung eingesetzt.

**Tabelle 3.** Primersequenzen

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
<b>Cx43</b>	CAAATCGAATGGGGCAGGC	GCTGGTCCACAATGGCTAGT
<b>CRYAB</b>	ACTCTCAGAGATGCGCCTGG	GCTGGGATCCGGTATTTTC
<b>aSMA</b>	AGCTTTCAGCTTCCCTGAACA	CACCATCACCCCCTGATGTCT
<b>ITGAV</b>	AGGCTGGAACCTCAACTCTTAGC	GCTCCCAGTTTGGAATCGGA
<b>COL1A2</b>	GGAGGTTTCGGCTAAGTTGGA	CGGCTGGGCCCTTTCTTACA
<b>FN1</b>	GAGCTGAGTGAGGAGGGAGA	GCATCAGGCGCTGTTGTTT
<b>GAPDH</b>	TCAACGACCACTTTGTCAAGCTCA	GCTGGTGGTCCAGGGGTCTTACT
<b>TGFβ-2</b>	GTGCTTTGGATGCGGCCTA	GGCATGCTCCAGCACAGAA

Cx43 = Connexin-43, CRYAB =  $\alpha_B$ -Crystallin, ITGAV =  $\alpha_V$ -Integrin, aSMA =  $\alpha$ -smooth muscle actin, COL1A2 = Kollagen-1 $\alpha$ 2, FN1 = Fibronectin-1, GAPDH = Glyceraldehyde-3-phosphate-Dehydrogenase, TGFβ-2 = Transforming Growth Factor Beta-2. Modifiziert nach Wernecke et. al (1).

## 2.5 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ermöglicht die Identifikation von PCR-Amplifikaten anhand ihrer Produktgröße (54). Nach angelegter Spannung von 95 V wandert die negativ geladene DNA im elektrischen Feld der Gelkammer (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) Richtung Anode (54). Die kürzesten Fragmente zeichnen sich hierbei durch die schnellste Wanderungsgeschwindigkeit aus (54). Die Grundlage der Gelelektrophorese bildeten ein 1x TAE Puffersystem (Thermo Fisher Scientific) sowie ein 2%iges Agarosegel (Sigma-Aldrich), welches mit 4  $\mu$ l (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich) versetzt wurde. Nach Hinzugabe des Ladepuffers „6x DNA Loading Dye“ (Thermo Fisher Scientific) zu den amplifizierten PCR-Produkten konnten diese in die Geltaschen des erhärteten Agarosegels pipettiert werden. Anschließend erfolgte eine Darstellung der aufgetrennten Banden mittels „Molecular Imager Chem Doc XRS“ (Bio-Rad, Hercules, USA).

## 2.6 Immunzytochemie

Zur Immunzytochemie wurden pLEC der Passage 0 sowie mit TGF $\beta$ -2 stimulierte und unstimulierte Zellen der Zelllinie HLE-B3 herangezogen. Die Immunzytochemie führte Dr. med. Nadine Reichhart durch.

Zunächst erfolgte die Kultivierung der Zellen auf 15 mm großen Deckgläsern (Thermo Fisher Scientific). Danach wurden die Zellen mit Tris-gepufferter Salzlösung (TBS, Sigma-Aldrich) gewaschen, für 10 Minuten mit 4%igem Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt) fixiert und anschließend für 10 Minuten mit 0,5%igem Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in TBS inkubiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation in einer „blocking solution“, bestehend aus 5%igem bovines Serumalbumin (BSA) und TBS-Puffer, erfolgte die Inkubation mit den primären monoklonalen Antikörpern anti-Actin,  $\alpha$ SMA-Cy3 (1 : 500, Sigma-Aldrich) und anti-Fibronectin (1 : 250, Sigma-Aldrich) über Nacht bei 4 °C. Zur Markierung der Zellkerne wurde 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Sigma-Aldrich) genutzt. Die Visualisierung von Fibronectin erfolgte durch einen weiteren 60-minütigen Inkubationsschritt mit dem sekundären Antikörper AF546 (1 : 5000, Thermo Fisher Scientific). In den Negativkontrollen wurde lediglich der sekundäre Antikörper verwendet. Nach Überführung der Deckgläser auf Objektträger konnten diese mittels Axio Imager 2 (Zeiss) beurteilt werden. Die Quantifizierung des Fluoreszenz-Signals erfolgte durch die Messung von Farbpixeln mittels Software ImageJ 2.0 (<https://imagej.nih.gov/ij/>, aufgerufen am 03. Juni 2018).

## 2.7 Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, USA). Mittels ROUT Methode konnten Ausreißer detektiert werden. Danach schloss sich eine Untersuchung auf Normalverteilung der Daten mittels Shapiro-Wilk-Test an.

Um festzustellen, ob sich die Vergleichsgruppen signifikant unterscheiden, wurde für normalverteilte Daten der Student's t-Test verwendet. Lag keine Normalverteilung der Daten vor, kam der Mann-Whitney U-Test zum Einsatz. Zur Untersuchung der Unabhängigkeit zweier Merkmale wurden der Exakte Fisher-Test oder der Qui-Quadrat Test genutzt.

Lag eine Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % ( $p < 0,05$ ) vor, galt ein Unterschied als statistisch signifikant.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Klinische Patientenmerkmale

Bei den eingeschlossenen Probanden handelte es sich um 40 Kinder, die in der Abteilung der Augenheilkunde des Charité Virchow Klinikums zur operativen Therapie einer kindlichen Katarakt vorstellig wurden. Unter den erfassten Patienten waren 37,5 % Mädchen und 62,5 % Jungen. Bei 67,5 % der Kinder trat die Katarakt bilateral auf. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug 41,4 Monate (1 bis 180 Monate). Das Alter der Kinder zum Zeitpunkt der Operation wurde in drei Altersklassen gruppiert. Dabei handelte es sich bei den meisten Patienten um Säuglinge bis zu 12 Lebensmonaten (47,5 %) oder Kinder über 60 Monate (32,5 %). Der Anteil der Altersgruppe zwischen dem 13. und 60. Lebensmonat betrug 20,0 %. In einem Viertel der Fälle (25 %) erkrankten Familienangehörige bereits im Kindesalter an einer Katarakt. Während Katarakt-assoziierte Erkrankungen bei 22,5 % der Kinder bekannt waren, ergab sich bei etwa der Hälfte der Patienten (52,5 %) kein ursächlicher Hinweis für das Auftreten einer Katarakt.

#### 3.2 Kindliche Linsenepithelzellen

##### 3.2.1 Einfluss klinischer Faktoren auf das Wachstum kindlicher Linsenepithelzellen

###### *in vitro*

Insgesamt konnte bei ungefähr einem Drittel der gewonnenen Kapseln (16 von 54) ein Zellwachstum beobachtet werden. Dabei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Geschlecht und dem Auswachsen von pLEC ( $p = 0,77$ ).

Betrachtete man das Alter der Patienten zum Operationszeitpunkt, so war bei Linsenkapseln, die von Säuglingen stammten, häufiger ein Zellauswuchs (44 % bis zum 12. Lebensmonat) zu beobachten als bei Kapseln älterer Kinder (33,3 % im Alter zwischen 13 und 60 Monaten, 5,9 % im Alter über 60 Monate). Dabei bestand eine statistische Signifikanz ( $\chi^2 = 7,153$ ;  $df = 2$ ;  $p = 0,03$ ).

Als Nächstes wurde geprüft, ob die Ätiologie mit dem Zellwachstum korreliert. Von den Vorderkapseln der Patienten mit einer positiven Familienanamnese für kindliche Katarakte konnten 42,9 % erfolgreich kultiviert werden. Waren bei den Kindern Erkrankungen bekannt, die mit einer kindlichen Katarakt assoziiert sind, wurde ein Zellauswuchs bei 36,4 % dieser Kapseln beobachtet. Bei unklarer Ätiologie proliferierten

die pLEC bei lediglich 20,7 % der entnommenen Vorderkapseln. Die Ergebnisse wiesen keine statistische Signifikanz auf ( $p = 0,28$ ).

Die Ergebnisse hinsichtlich des Typus der Katarakt deuteten auf eine Assoziation zwischen der Katarakt-Morphologie und dem Auswachsen von pLEC hin. Dabei proliferierten Zellen der Linsenkapseln, welche von einer Cataracta totalis (80,0 %), von Katarakten bei PFV (66,7 %) und von hinteren Polstaren (50,0 %) stammten häufiger als jene, deren Ursprung Linsenkapseln einer Cataracta zonularis (15,4 %), einer komplexen Katarakt (11,1 %) oder nicht näher bezeichneter Katarakte (22,2 %) waren ( $\chi^2 = 20,89$ ;  $df = 7$ ;  $p = 0,004$ ).

### 3.2.2 Zellmorphologie kindlicher Linsenepithelzellen

Ab dem dritten Tag in Kultur konnte lichtmikroskopisch das Auswachsen von Zellen der Vorderkapseln beobachtet werden. Dabei zeichneten sich in Nähe der Vorderkapsel befindliche Zellen durch eine polygonale bis rundliche Form aus. Demgegenüber wiesen peripher gelegene Zellen einen langgestreckten, fibroblastenartigen Zellkörper auf. Nach ungefähr 13 Tagen ergab sich ein annähernd konfluenter Zellrasen. Nach der ersten Subkultivierung der Zellen fanden sich lichtmikroskopisch keine Veränderungen hinsichtlich der Zellmorphologie.

### 3.2.3 Genexpression kindlicher Linsenepithelzellen und der Einfluss von TGF $\beta$ -2

Ziel war es, diese seltenen Zellen auf Genexpressionsebene mittels qRT-PCR zu analysieren. Dabei zeigten unstimulierte pLEC in Passage 2 sowohl Expressionen von CRYAB und Cx43 als auch von mesenchymalen Genen ( $\alpha$ SMA, ITGAV, COL1A2, FN1). Zur weiteren Charakterisierung erfolgte eine Stimulation der Zellen mit TGF $\beta$ -2. Verglichen mit anderen Markern wiesen pLEC eine starke Expression für CRYAB auf, wobei TGF $\beta$ -2 keine signifikante Steigerung hervorrief ( $p = 0,33$ ,  $n_{\text{Kontrolle}} = 9$ ,  $n_{\text{TGF}\beta-2} = 6$ ). Weiterhin zeigte sich in Anwesenheit von TGF $\beta$ -2 beim epithelialen Marker Cx43 ( $p = 0,08$ ,  $n_{\text{Kontrolle}} = 9$ ,  $n_{\text{TGF}\beta-2} = 6$ ) sowie bei dem mesenchymalen Marker  $\alpha$ SMA ( $p = 0,35$ ,  $n_{\text{Kontrolle}} = 8$ ,  $n_{\text{TGF}\beta-2} = 5$ ) kein signifikanter Effekt auf die mRNA-Expression. Bezüglich ITGAV ( $p = 0,09$ ,  $n_{\text{Kontrolle}} = 9$ ,  $n_{\text{TGF}\beta-2} = 6$ ) bewirkte die Stimulation mit TGF $\beta$ -2 einen geringen, jedoch nicht signifikanten Anstieg der mRNA-Level. Demgegenüber zeigte sich infolge TGF $\beta$ -2-Stimulation ein höheres Genexpressionsniveau von COL1A2 ( $p = 0,003$ ,  $n_{\text{Kontrolle}} = 9$ ,  $n_{\text{TGF}\beta-2} = 5$ ) und FN1 ( $p = 0,0009$ ,  $n_{\text{Kontrolle}} = 10$ ,  $n_{\text{TGF}\beta-2} = 6$ ) verglichen mit unstimulierten Zellen.

### 3.3 Linsenzelllinie HLE-B3

#### 3.3.1 Genexpression und immunzytochemische Untersuchung von Zellen der Linsenzelllinie HLE-B3 und der Einfluss von TGF $\beta$ -2

Um die von den pLEC erhaltenen Daten zu validieren, wurden gleichartige Experimente an der Linsenzelllinie durchgeführt.

Hierbei steigerte die Stimulation mit dem Wachstumsfaktor TGF $\beta$ -2 die mRNA-Expression von CRYAB ( $p = 0,0003$ ,  $n = 9$ ) sowie die der mesenchymalen Marker ITGAV ( $p = 0,01$ ,  $n = 9$ ), COL1A2 ( $p = 0,0002$ ,  $n = 9$ ) und FN1 ( $p < 0,0001$ ,  $n = 9$ ) in HLE-B3 Zellen. Demgegenüber unterschieden sich die Expressionsniveaus von Cx43 ( $p = 0,44$ ,  $n = 9$ ) und aSMA ( $p = 0,31$ ,  $n = 8$ ) in stimulierten Zellen nicht signifikant von denen unstimulierter Zellen. Exemplarisch wurden immunzytochemische Färbungen für FN und aSMA durchgeführt. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der qRT-PCR zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Fluoreszenzsignals in der immunzytochemischen Färbung gegen FN nach Stimulation mit TGF $\beta$ -2 ( $p = 0,009$ ,  $n = 13$ ), wohingegen der Wachstumsfaktor keinen wesentlichen Einfluss auf das Fluoreszenzsignal von aSMA hatte ( $p = 0,68$ ,  $n = 13$ ).

#### 3.3.2 Genexpressionsunterschiede zwischen kindlichen Linsenepithelzellen und Zellen der Linsenzelllinie HLE-B3

In einer Analyse der Expression des Wachstumsfaktors TGF $\beta$ -2 in beiden Zellpopulationen zeigten sich signifikant höhere mRNA-Expressionen von TGF $\beta$ -2 in pLEC (Passage 0) im Vergleich zur Zelllinie HLE-B3 ( $p = 0,0005$ ,  $n_{p0} = 5$ ,  $n_{HLE-B3} = 6$ ).

Einhergehend damit verdeutlicht die Gegenüberstellung von primären pLEC (Passage 0) und der Zelllinie HLE-B3 höhere basale mRNA-Expressionsniveaus in pLEC für die Mehrzahl der untersuchten Marker (COL1A2, CRYAB, aSMA, Cx43, ITGAV).

*Eine detaillierte Darstellung aller Ergebnisse kann der oben genannten Publikation unter „Results“, Seiten 5788-5789 entnommen werden (1).*

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Klinische und molekularbiologische Charakterisierung von kindlichen Linsenepithelzellen und der Linsenzelllinie HLE-B3

Die zugrundeliegenden Prozesse der Nachstarentstehung bei Kindern sind bisher kaum erforscht. Da der Wachstumsfaktor TGF $\beta$  ein zentraler Regulator bei der Katarakt- und Nachstarentstehung in adulten Linsenzellen darstellt (20, 21, 24), gehen wir von der Hypothese aus, dass dies auch für die kindliche Katarakt zutrifft.

Um die Pathophysiologie dieses Prozesses besser zu verstehen, führten wir eine Studie durch, in der wir einerseits Linsenepithelzellen in Kultur untersuchten, andererseits ihr Verhalten mit klinischen Parametern korrelierten (1).

Insgesamt wurden 40 Kinder in diese Studie eingeschlossen, wovon 37,5 % weiblich waren. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 41 Monate. In Übereinstimmung mit der Literatur wies die Mehrzahl der untersuchten Kinder eine bilaterale Katarakt auf (5, 8, 10) und die Ursache für die Katarakt blieb in über der Hälfte der Fälle ungeklärt (1, 5, 8).

Die Korrelation klinischer Faktoren mit dem Auswachsen der pLEC *in vitro* ergab interessante und neue Befunde. Auffällig ist, dass pLEC von Linsenkapseln jüngerer Kinder häufiger auswachsen als diejenigen älterer Kinder (1). Diese Beobachtung korreliert mit publizierten klinischen Ergebnissen, dass ein junges Patientenalter ein Risikofaktor für die Nachstarentwicklung infolge einer kindlichen Kataraktoperation darstellt (16). In dieser Arbeit konnte somit erstmals auch *in vitro* ein vermehrtes Auswachsen von Linsenzellen, die aus Linsenkapseln von Säuglingen stammten, gezeigt werden (1). Möglicherweise trägt eine erhöhte proliferative und migratorische Aktivität von pLEC zum gehäuftem Auftreten des Nachstars im Kleinkindalter bei. Aufgrund des bestehenden Amblyopierisikos in der sensiblen Phase stellen diese Kinder eine besondere Risikogruppe dar und sollten zeitnah therapiert werden (2).

Weiterhin scheint auch die Kataraktart das Proliferationsverhalten von Linsenepithelzellen *in vitro* zu beeinflussen. Frühere klinische Studien stellten ein gehäuftes Nachstaraufreten bei Augen mit hinterer subkapsulärer Katarakt fest, wobei die Ergebnisse statistisch nicht signifikant waren (16). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich hingegen ein häufigeres Auswachsen von Zellen aus Linsenkapseln, die von Linsen mit einer Cataracta totalis, mit Katarakten bei PFV und mit hinteren Polstaren stammten (1). Dies legt nahe, dass bestimmte Kataraktarten mit einer häufigeren

Nachstarbildung einhergehen. Jedoch waren die Fallzahlen der jeweiligen Gruppen sehr gering, weswegen die Aussagekraft begrenzt ist. Weitere prospektive Studien hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen Kataraktart und Auftreten eines Nachstars bei Kindern wären daher wünschenswert. Sollten sich diese Erkenntnisse bestätigen, wären präventive Maßnahmen, insbesondere bei diesen Patientengruppen, von besonderer Wichtigkeit.

In zahlreichen Nachstarmodellen bewirkt TGF $\beta$  eine EMT in Linsenzellen (20, 23-27, 29, 31). Die Auswirkungen dieses Zytokins auf pLEC blieben bisher unerforscht. In der vorliegenden Studie gelang es, die Genexpression mittels qRT-PCR in pLEC und HLE-B3 Zellen in An- und Abwesenheit vom Wachstumsfaktor TGF $\beta$ -2 zu analysieren.

In Anwesenheit von TGF $\beta$ -2 erhöhten sich in pLEC die Expressionslevel der mRNA für Proteine der extrazellulären Matrix. Im Detail induzierte die Stimulation mit TGF $\beta$ -2 eine signifikante Zunahme der Expression von FN1 und COL1A2 (1). Beide Marker sind für einen myofibroblastischen Differenzierungsgrad charakteristisch (20).

In früheren Untersuchungen akkumulierten die Proteine der extrazellulären Matrix Kollagen-I (27) und Fibronectin in TGF $\beta$ -induzierten vorderen subkapsulären Plaques (25). Bei Kaninchen führte Fibronectin konzentrationsabhängig zu einer verstärkten Migration von Linsenzellen (36). Möglicherweise fördert dieses Protein auch in pLEC die Migration und trägt so zur Nachstarentstehung bei.

Kollagen-I ist an zahlreichen TGF $\beta$ -vermittelten, fibrotischen Erkrankungen beteiligt (56-58). Beispielsweise bedingt TGF $\beta$  bei der Sklerodermie oder in retinalen Pigmentepithelzellen einen Anstieg der COL1A2 Expression (56, 57). Eine Inhibition der PI3K in diesen Zellen führt zu einer reduzierten Expression (57) und mRNA-Stabilität von COL1A2 (56). In dieser Studie konnte erstmals in pLEC ein TGF $\beta$ -2-induzierter mRNA-Expressionsanstieg von COL1A2 nachgewiesen werden, wobei die zugrundeliegenden Signalwege hierbei weiterhin ungeklärt bleiben.

Auffällig ist, dass die primären pLEC bereits ohne TGF $\beta$ -2-Stimulation vermehrt mesenchymale Marker exprimieren. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte die im Vergleich zur Zelllinie höhere TGF $\beta$ -2-Expression in pLEC sein (1). In Übereinstimmung damit wurde bereits in früheren Studien berichtet, dass TGF $\beta$  sowohl im Blut von Patienten mit kongenitaler Katarakt (59) als auch in kongenitalen vorderen subkapsulären Plaques vermehrt nachweisbar ist (60).

In Zellen der Zelllinie HLE-B3 konnte TGF $\beta$ -2 ebenfalls eine Erhöhung mesenchymaler Gene im Vergleich zu unstimulierten Zellen hervorrufen. Dabei führt die Stimulation mit TGF $\beta$ -2 sowohl in pLEC als auch in Zellen der Zelllinie HLE-B3 zu einer vermehrten mRNA-Expression von FN1 und COL1A2. Vergleicht man die Genexpressionslevel beider Zelltypen miteinander, so sind diese für COL1A2 in pLEC höher (1). Ob die vergleichsweise starke Expression von COL1A2 mit einer erhöhten Nachstarrate bei Kindern und dem vermehrten Auswachsen von Linsenzellen vergesellschaftet ist oder lediglich auf die Einschränkungen einer Zelllinie zurückgeführt werden muss, gilt es in weiteren Studien zu prüfen.

Während eine TGF $\beta$ -2-bedingte Erhöhung mesenchymaler Marker und Proteine der extrazellulären Matrix bereits häufig in der Literatur dargestellt wurde (20, 21, 24, 25, 34), konnte in dieser Arbeit auch eine TGF $\beta$ -2-induzierte Steigerung von CRYAB in HLE-B3 Zellen gezeigt werden (1).

Da das Chaperon Zellen vor stressbedingter Proteinaggregation schützt (44), kann diese Expressionssteigerung möglicherweise als fehlgeschlagener Schutzmechanismus angesehen werden (43).

Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen konnten Nahomi et al. in Zellen der humanen Linsenepithelzelllinie FHL124 sowie in murinen Linsenepithelzellen ebenfalls eine TGF $\beta$ -2-vermittelte mRNA-Steigerung von CRYAB zeigen (61). Ein CRYAB-Knockdown mittels siRNA war verglichen zur Kontrollgruppe mit verminderten TGF $\beta$ -induzierten mRNA-Expressionen von FN und  $\alpha$ SMA in Linsenzellen assoziiert (61). Folglich scheint CRYAB eine Rolle beim Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition in Linsenzellen zu spielen (61). In den primären pLEC zeigten sich ebenfalls hohe basale Expressionslevel von CRYAB, wobei TGF $\beta$ -2-abhängig zwar ein Anstieg mesenchymaler Marker, jedoch keine Steigerung des Chaperons CRYAB nachgewiesen werden konnte (1). Daher weisen diese Zellen möglicherweise eine andere TGF $\beta$ -abhängige Genregulation auf. Weitere Studien sind notwendig, um die Funktion des CRYABs während der EMT sowie die zugrundeliegende Genregulation in pLEC besser zu verstehen.

*Eine weiterführende Diskussion ist in der oben genannten Publikation unter „Discussion“, Seiten 5789- 5793 aufgeführt (1).*

## 4.2 Limitationen

Basis dieser Studie ist ein heterogenes Patientenkollektiv mit kleiner Fallzahl. Der Fokus der klinischen Einordnung der Patienten zur Korrelation mit zellbiologischen Parametern lag vor allem auf Patientenalter, Geschlecht, Ätiologie der Katarakt und Kataraktart. Weitere Faktoren, die ebenso das Proliferationsverhalten oder die Genexpression von Zellen beeinflussen können, wie beispielsweise Stoffwechselfparameter oder genetische Komponenten, blieben in der vorliegenden Arbeit unbeachtet.

Weiterhin handelt es sich bei dieser Studie um ein Modell für die Nachstarentstehung. Dabei können die *in vivo* Bedingungen wie Sauerstoffgehalt, Nährstoffzusammensetzung der okulären Medien, Umgebungsdruck und Wachstumsoberfläche von den Kulturbedingungen abweichen. Zudem können Zellen infolge der Kultivierung ihren initialen Zelltyp verlieren (29, 54), was bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden muss. Nicht selten kommt es bereits nach wenigen Subkultivierungen zur Seneszenz der Primärzellen, weswegen deren Lebensdauer limitiert ist (29, 54). Im Gegensatz zu primären Linsenzellen proliferieren die immortalisierten Zellen der Zelllinie HLE-B3 unbegrenzt. Durch den Prozess der Transfektion zur Immortalisierung verlieren die Zellen teilweise ihre physiologischen Eigenschaften (29, 54). Zudem können in Zellen höherer Passagen Veränderungen der Genexpression und ein Verlust epithelialer Marker auftreten (29, 62). Da diese Zellen aber widerstandsfähiger als primäre Linsenzellen sind, ermöglichen sie die Erprobung von experimentellen Methoden sowie in gewissem Grade die Validierung von Ergebnissen. Sie sind daher besonders in den frühen Phasen der experimentellen Erforschung des Nachstars von Bedeutung.

In dieser Studie wurde die Mehrheit der Daten mittels qRT-PCR erhoben. Diese Methode zeichnet sich durch eine äußerst hohe Sensitivität aus und ermöglicht es, geringste Kopienzahlen der Zielsequenz zu detektieren (63). Dadurch gelingt es, spezifische cDNA-Sequenzen innerhalb kürzester Zeit zu amplifizieren und nachzuweisen (63). Ein entscheidender Nachteil dieser Methode sind die hohen Kosten sowie der apparative Aufwand der qRT-PCR. Zugleich ist die PCR sehr anfällig gegenüber Inhibitoren (63). Nicht zuletzt ermittelt die qRT-PCR die Genexpression auf mRNA-Ebene, wohingegen Veränderungen auf Proteinebene nicht nachvollzogen werden können (63).

### 4.3 Ausblick

Im Zuge dieser Arbeit konnten pLEC hinsichtlich ihrer mRNA-Expression analysiert werden. Diese Erkenntnisse bilden eine Basis für die weitere Erforschung des Nachstars im Kindesalter. Weitere Studien sind nötig, um die genauen Prozesse und zugrundeliegenden Signalwege der Nachstarentwicklung bei Kindern besser erfassen zu können.

Aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit der pLEC sowie der geringen RNA-Ausbeute ist die Analyse dieser Zellen eine methodische und logistische Herausforderung.

Um weitere an der Nachstarentwicklung bei Kindern beteiligte Prozesse identifizieren zu können, ist die Durchführung einer RNA-Sequenzierung geplant. Mit Hilfe dieser innovativen Methode kann das Transkriptom der Zellen besser analysiert werden (64), und es könnten sich somit wertvolle Informationen zur Regulierung der Genexpression des Nachstars ergeben.

Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass TGF $\beta$ -2 die EMT von pLEC beeinflussen kann (1). Somit sollten Signalkaskaden des TGF $\beta$ s als ein potenzielles Target für die zukünftige Prophylaxe oder Therapie des Nachstars angesehen werden. Ziel ist es, zunächst Inhibitoren der TGF $\beta$ -Signalwege hinsichtlich ihrer Wirkung auf Genexpression und Zellproliferation in pLEC zu untersuchen. Neben den anti-proliferativen sowie anti-migratorischen Effekten müssen diese auch in Bezug auf eine mögliche Zytotoxizität genauer betrachtet werden.

Als Lösungsansatz postulierten Forscher die Regeneration von Linsen aus endogenen Stammzellen (65). In einer vielversprechenden, jedoch bisher nicht reproduzierten Studie aus China wurde berichtet, dass eine neue minimal-invasive Operationsmethode, welche die Integrität von Linsenkapsel und anhaftenden Linsenepithelzellen bewahrt, die Regeneration einer klaren Linse im Kleinkindalter ermöglichen kann (65). Jedoch stellt der beschriebene Zeitraum mit einhergehender visueller Deprivation von mehreren Monaten bis zur Regeneration der Linse ein signifikantes Amblyopierisiko dar (66). Aktuell existieren noch keine Langzeitstudien hinsichtlich der Transparenz der regenerierten Linse. In der vorliegenden Arbeit konnte eine gesteigerte mesenchymale Genexpression in primären pLEC nachgewiesen werden (1), weswegen das mögliche Risiko einer erneuten Trübung der regenerierten Linsen berücksichtigt werden sollte.

Das Management kindlicher Katarakte und die Prophylaxe eines postoperativen Nachstars stellen auch heute noch eine Herausforderung dar. Fortschritte in der pädiatrischen Kataraktchirurgie und der Nachstarprophylaxe sind weiter notwendig, um bei diesen Patienten den bestmöglichen Visus unter Minimierung komplikationsreicher Operationen zu erreichen.

Als Schritt in diese Richtung gelang es in dieser Studie, das Proliferationsverhalten von Linsenzellen pädiatrischer Kataraktpatienten mit klinischen Parametern zu korrelieren und erstmals diese seltenen Zellen *in vitro* auf Genexpressionsebene zu analysieren. Dadurch können Rückschlüsse auf die Nachstarentstehung bei Kindern gezogen werden, womit eine Basis für zukünftige therapeutische Ansätze geschaffen wird. Die vorliegende Arbeit soll Grundlage und Motivation für weitere Studien des herausfordernden Krankheitsbildes darstellen.

## 5. LITERATURVERZEICHNIS

1. Wernecke L, Keckeis S, Reichhart N, Strauß O, Salchow DJ. Epithelial-Mesenchymal Transdifferentiation in Pediatric Lens Epithelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018;59(15):5785-94.
2. Grehn F. *Augenheilkunde* 31., überarb. Aufl. ed. Berlin Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2012. XIV, 539 p.
3. Lüllmann-Rauch R. *Taschenbuch Histologie.* 5., vollst. überarb. Auflage ed. Stuttgart Georg Thieme Verlag; 2015. 726 Seiten p.
4. Martinez G, de longh RU. The lens epithelium in ocular health and disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(12):1945-63.
5. Wu X, Long E, Lin H, Liu Y. Prevalence and epidemiological characteristics of congenital cataract: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2016;6:28564.
6. Zetterström C, Lundvall A, Kugelberg M. Cataracts in children. *J Cataract Refract Surg.* 2005;31(4):824-40.
7. Gilbert C, Foster A. Childhood blindness in the context of VISION 2020--the right to sight. *Bull World Health Organ.* 2001;79(3):227-32.
8. Haargaard B, Wohlfahrt J, Fledelius HC, Rosenberg T, Melbye M. A nationwide Danish study of 1027 cases of congenital/infantile cataracts: etiological and clinical classifications. *Ophthalmology.* 2004;111(12):2292-8.
9. Lambert SR, Drack AV. Infantile cataracts. *Surv Ophthalmol.* 1996;40(6):427-58.
10. Rahi JS, Dezateux C. Congenital and infantile cataract in the United Kingdom: underlying or associated factors. British Congenital Cataract Interest Group. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(8):2108-14.
11. Wirth MG, Russell-Eggitt IM, Craig JE, Elder JE, Mackey DA. Aetiology of congenital and paediatric cataract in an Australian population. *Br J Ophthalmol.* 2002;86(7):782-6.

12. Haargaard B, Wohlfahrt J, Rosenberg T, Fledelius HC, Melbye M. Risk factors for idiopathic congenital/infantile cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(9):3067-73.
13. Lim ME, Buckley EG, Prakalapakorn SG. Update on congenital cataract surgery management. *Curr Opin Ophthalmol.* 2017;28(1):87-92.
14. Vasavada AR, Praveen MR, Tassignon MJ, Shah SK, Vasavada VA, Van Looveren J, De Veuster I, Trivedi RH. Posterior capsule management in congenital cataract surgery. *J Cataract Refract Surg.* 2011;37(1):173-93.
15. Medsinghe A, Nischal KK. Pediatric cataract: challenges and future directions. *Clin Ophthalmol.* 2015;9:77-90.
16. Jensen AA, Basti S, Greenwald MJ, Mets MB. When may the posterior capsule be preserved in pediatric intraocular lens surgery? *Ophthalmology.* 2002;109(2):324-7; discussion 8.
17. Apple DJ, Solomon KD, Tetz MR, Assia EI, Holland EY, Legler UF, Tsai JC, Castaneda VE, Hoggatt JP, Kostick AM. Posterior capsule opacification. *Surv Ophthalmol.* 1992;37(2):73-116.
18. Metge P, Cohen H, Graff F. Intercapsular Intraocular Lens Implantation in Children: 35 cases. *European Journal of Implant and Refractive Surgery.* 1989;1(3):169 - 73.
19. Liu CS, Wormstone IM, Duncan G, Marcantonio JM, Webb SF, Davies PD. A study of human lens cell growth in vitro. A model for posterior capsule opacification. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37(5):906-14.
20. de longh RU, Wederell E, Lovicu FJ, McAvoy JW. Transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in the lens: a model for cataract formation. *Cells Tissues Organs.* 2005;179(1-2):43-55.
21. Wormstone IM, Wang L, Liu CS. Posterior capsule opacification. *Exp Eye Res.* 2009;88(2):257-69.
22. Saika S. TGFbeta pathobiology in the eye. *Lab Invest.* 2006;86(2):106-15.

23. Liu J, Hales AM, Chamberlain CG, McAvoy JW. Induction of cataract-like changes in rat lens epithelial explants by transforming growth factor beta. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994;35(2):388-401.
24. Dawes LJ, Eldred JA, Anderson IK, Sleeman M, Reddan JR, Duncan G, Wormstone IM. TGF beta-induced contraction is not promoted by fibronectin-fibronectin receptor interaction, or alpha SMA expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(2):650-61.
25. Lovicu FJ, Schulz MW, Hales AM, Vincent LN, Overbeek PA, Chamberlain CG, McAvoy JW. TGFbeta induces morphological and molecular changes similar to human anterior subcapsular cataract. *Br J Ophthalmol.* 2002;86(2):220-6.
26. Gordon-Thomson C, de longh RU, Hales AM, Chamberlain CG, McAvoy JW. Differential cataractogenic potency of TGF-beta1, -beta2, and -beta3 and their expression in the postnatal rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(8):1399-409.
27. Hales AM, Chamberlain CG, McAvoy JW. Cataract induction in lenses cultured with transforming growth factor-beta. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36(8):1709-13.
28. Raghavan CT, Smuda M, Smith AJ, Howell S, Smith DG, Singh A, Gupta P, Glomb MA, Wormstone IM, Nagaraj RH. AGEs in human lens capsule promote the TGFβ2-mediated EMT of lens epithelial cells: implications for age-associated fibrosis. *Aging Cell.* 2016;15(3):465-76.
29. Wormstone IM, Eldred JA. Experimental models for posterior capsule opacification research. *Exp Eye Res.* 2016;142:2-12.
30. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(3):178-96.
31. Wormstone IM, Tamiya S, Eldred JA, Lazaridis K, Chantry A, Reddan JR, Anderson I, Duncan G. Characterisation of TGF-beta2 signalling and function in a human lens cell line. *Exp Eye Res.* 2004;78(3):705-14.
32. Horbelt D, Denkis A, Knaus P. A portrait of Transforming Growth Factor β superfamily signalling: Background matters. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(3):469-74.

33. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet.* 2001;29(2):117-29.
34. Meng Q, Guo H, Xiao L, Cui Y, Guo R, Xiao D, Huang Y. mTOR regulates TGF- $\beta_2$ -induced epithelial-mesenchymal transition in cultured human lens epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2013;251(10):2363-70.
35. Kurosaka D, Kato K, Nagamoto T, Negishi K. Growth factors influence contractility and alpha-smooth muscle actin expression in bovine lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36(8):1701-8.
36. Olivero DK, Furcht LT. Type IV collagen, laminin, and fibronectin promote the adhesion and migration of rabbit lens epithelial cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993;34(10):2825-34.
37. VanSlyke JK, Boswell BA, Musil LS. Fibronectin regulates growth factor signaling and cell differentiation in primary lens cells. *J Cell Sci.* 2018;131(22).
38. Dawes LJ, Elliott RM, Reddan JR, Wormstone YM, Wormstone IM. Oligonucleotide microarray analysis of human lens epithelial cells: TGFbeta regulated gene expression. *Mol Vis.* 2007;13:1181-97.
39. Sponer U, Pieh S, Soleiman A, Skorpik C. Upregulation of alphavbeta6 integrin, a potent TGF-beta1 activator, and posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg.* 2005;31(3):595-606.
40. Mamuya FA, Wang Y, Roop VH, Scheiblin DA, Zajac JC, Duncan MK. The roles of  $\alpha_V$  integrins in lens EMT and posterior capsular opacification. *J Cell Mol Med.* 2014;18(4):656-70.
41. Walker J, Menko AS. Integrins in lens development and disease. *Exp Eye Res.* 2009;88(2):216-25.
42. Wang X, Garcia CM, Shui YB, Beebe DC. Expression and regulation of alpha-, beta-, and gamma-crystallins in mammalian lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(10):3608-19.

43. Andley UP. Crystallins in the eye: Function and pathology. *Prog Retin Eye Res.* 2007;26(1):78-98.
44. Horwitz J. Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(21):10449-53.
45. Liu Y, Zhang X, Luo L, Wu M, Zeng R, Cheng G, Hu B, Liu B, Liang JJ, Shang F. A novel alphaB-crystallin mutation associated with autosomal dominant congenital lamellar cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(3):1069-75.
46. Liu M, Ke T, Wang Z, Yang Q, Chang W, Jiang F, Tang Z, Li H, Ren X, Wang X, Wang T, Li Q, Yang J, Liu J, Wang QK. Identification of a CRYAB mutation associated with autosomal dominant posterior polar cataract in a Chinese family. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(8):3461-6.
47. Cousins SW, McCabe MM, Danielpour D, Streilein JW. Identification of transforming growth factor-beta as an immunosuppressive factor in aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991;32(8):2201-11.
48. Kang JS, Liu C, Derynck R. New regulatory mechanisms of TGF-beta receptor function. *Trends Cell Biol.* 2009;19(8):385-94.
49. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 2009;19(2):156-72.
50. Dawes LJ, Sleeman MA, Anderson IK, Reddan JR, Wormstone IM. TGFbeta/Smad4-dependent and -independent regulation of human lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(11):5318-27.
51. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* 2009;19(1):128-39.
52. Guo R, Meng Q, Guo H, Xiao L, Yang X, Cui Y, Huang Y. TGF- $\beta$ 2 induces epithelial-mesenchymal transition in cultured human lens epithelial cells through activation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Mol Med Rep.* 2016;13(2):1105-10.
53. Ibaraki N. Human lens epithelial cell culture. *Methods Mol Biol.* 2002;188:1-6.

54. Joppien S. Basics Experimentelle Doktorarbeit 1. ed. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2011. 117 p.
55. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-8.
56. Asano Y, Ihn H, Yamane K, Jinnin M, Mimura Y, Tamaki K. Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in alpha2(I) collagen gene expression in normal and scleroderma fibroblasts. *J Immunol.* 2004;172(11):7123-35.
57. Yokoyama K, Kimoto K, Itoh Y, Nakatsuka K, Matsuo N, Yoshioka H, Kubota T. The PI3K/Akt pathway mediates the expression of type I collagen induced by TGF- $\beta$ 2 in human retinal pigment epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2012;250(1):15-23.
58. Shintani Y, Maeda M, Chaika N, Johnson KR, Wheelock MJ. Collagen I promotes epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer cells via transforming growth factor-beta signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008;38(1):95-104.
59. Banasiak P, Strzalka-Mrozik B, Forminska-Kapuscik M, Filipek E, Mazurek U, Nawrocka L, Pieczara E, Berezowski P, Kimsa M. Quantitative relationships between transforming growth factor beta mRNA isoforms in congenital and traumatic cataracts. *Mol Vis.* 2011;17:3025-33.
60. Xiao Y, Zhao B, Gao Z, Pan Q. Overaccumulation of transforming growth factor-beta1 and basic fibroblast growth factor in lens epithelial cells of congenital cataract. *Can J Ophthalmol.* 2009;44(2):189-92.
61. Nahomi RB, Pantcheva MB, Nagaraj RH.  $\alpha$ B-crystallin is essential for the TGF- $\beta$ 2-mediated epithelial to mesenchymal transition of lens epithelial cells. *Biochem J.* 2016;473(10):1455-69.
62. Fleming TP, Song Z, Andley UP. Expression of growth control and differentiation genes in human lens epithelial cells with extended life span. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(8):1387-98.

63. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ.* 2005;29(3):151-9.
64. Stark R, Grzelak M, Hadfield J. RNA sequencing: the teenage years. *Nat Rev Genet.* 2019;20(11):631-56.
65. Lin H, Ouyang H, Zhu J, Huang S, Liu Z, Chen S, Cao G, Li G, Signer RA, Xu Y, Chung C, Zhang Y, Lin D, Patel S, Wu F, Cai H, Hou J, Wen C, Jafari M, Liu X, Luo L, Qiu A, Hou R, Chen B, Chen J, Granet D, Heichel C, Shang F, Li X, Krawczyk M, Skowronska-Krawczyk D, Wang Y, Shi W, Chen D, Zhong Z, Zhong S, Zhang L, Morrison SJ, Maas RL, Zhang K, Liu Y. Lens regeneration using endogenous stem cells with gain of visual function. *Nature.* 2016;531(7594):323-8.
66. Solebo AL, Hammond CJ, Rahi JS. Improving outcomes in congenital cataract. *Nature.* 2018;556(7699):E1-E2.

## EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Laura Wernecke, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **„Kindliche Katarakt: Genexpressionsanalyse in humanen Linsenepithelzellen sowie HLE-B3 Zellen und der Einfluss von Transforming Growth Factor Beta-2“** selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet. In der vorliegenden Dissertation handelt es sich um eine wesentliche Vertiefung der Thematik der in Modul 23 des Modellstudiengangs der Charité angefertigten Hausarbeit.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

---

Datum

---

Unterschrift

## AUSFÜHRLICHE ANTEILSERKLÄRUNG AN DER ERFOLGTEN PUBLIKATION

Publikation 1: **Wernecke L, Keckeis S, Reichhart N, Strauß O, Salchow DJ. Epithelial-Mesenchymal Transdifferentiation in Pediatric Lens Epithelial Cells.** Invest Ophthalmol Vis Sci 2018;59:5785-5794.

Beitrag im Einzelnen:

- Planung der Studie und Erstellen des Versuchsdesigns zusammen mit Prof. Dr. med. Salchow und Prof. Dr. rer. nat. Strauß.
- Eigenständiges Durchführen der experimentellen Arbeiten und entscheidender Beitrag zur Etablierung einer pLEC Zellkultur. Ausgenommen: Immunzytochemische Färbungen wurden durch Dr. med. Nadine Reichhart durchgeführt.
- Erstellen aller in der Publikation aufgeführten Grafiken und Tabellen.
- Wesentlicher Anteil an Datenerhebung, Datenauswertung und Mitarbeit an der Interpretation der Daten. Zur Auswahl der statistischen Verfahren wurde eine einmalige statistische Beratung in Anspruch genommen.
- Selbstständige Formulierung des Manuskriptes der o. g. Publikation unter Revision durch Prof. Dr. med. Salchow und Prof. Dr. rer. nat. Strauß sowie Dr. med. Nadine Reichhart.
- Beteiligung an der Revision der Publikation und der dafür notwendigen experimentellen Arbeiten.

---

Unterschrift der Doktorandin

## AUSZUG AUS DER JOURNAL SUMMARY LIST

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2017** Selected Editions: SCIE,SSCI  
 Selected Categories: **“OPHTHALMOLOGY”** Selected Category Scheme: WoS  
**Gesamtanzahl: 59 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	PROGRESS IN RETINAL AND EYE RESEARCH	5,926	11.653	0.010480
2	OPHTHALMOLOGY	37,957	7.479	0.058310
3	JAMA Ophthalmology	4,063	6.669	0.020240
4	Ocular Surface	1,978	5.530	0.002880
5	Annual Review of Vision Science	227	5.140	0.001660
6	AMERICAN JOURNAL OF OPHTHALMOLOGY	25,234	4.795	0.031820
7	RETINA-THE JOURNAL OF RETINAL AND VITREOUS DISEASES	10,237	4.013	0.019810
8	SURVEY OF OPHTHALMOLOGY	5,468	3.764	0.004670
9	INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE	52,637	3.388	0.073210
10	BRITISH JOURNAL OF OPHTHALMOLOGY	19,828	3.384	0.024350
11	OCULAR IMMUNOLOGY AND INFLAMMATION	1,893	3.348	0.002880
12	ACTA OPHTHALMOLOGICA	7,839	3.324	0.012990
13	CLINICAL AND EXPERIMENTAL OPHTHALMOLOGY	3,090	3.217	0.005490
14	EXPERIMENTAL EYE RESEARCH	11,514	3.152	0.015040
15	JOURNAL OF CATARACT AND REFRACTIVE SURGERY	13,221	2.680	0.016490
16	JOURNAL OF REFRACTIVE SURGERY	4,242	2.649	0.007450
17	CURRENT OPINION IN OPHTHALMOLOGY	3,199	2.533	0.005340
18	EYE	8,628	2.478	0.011900
19	CORNEA	9,988	2.464	0.013310
20	DOCUMENTA OPHTHALMOLOGICA	1,692	2.362	0.001910
21	JOURNAL OF VISION	8,983	2.266	0.016960
22	OPHTHALMIC AND PHYSIOLOGICAL OPTICS	2,606	2.262	0.003500

## DRUCKEXEMPLAR DER AUSGEWÄHLTEN PUBLIKATION

Lens

## Epithelial-Mesenchymal Transdifferentiation in Pediatric Lens Epithelial Cells

Laura Wernecke,<sup>1,2</sup> Susanne Keckeis,<sup>1</sup> Nadine Reichhart,<sup>1</sup> Olaf Strauß,<sup>1</sup> and Daniel J. Salchow<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Experimental Ophthalmology, Department of Ophthalmology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany

<sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany

Correspondence: Daniel J. Salchow, Department of Ophthalmology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Campus Virchow Klinikum, Augustenburger Platz 1, Berlin 13353, Germany; daniel.salchow@charite.de.

Submitted: January 4, 2018

Accepted: October 19, 2018

Citation: Wernecke L, Keckeis S, Reichhart N, Strauß O, Salchow DJ. Epithelial-mesenchymal transdifferentiation in pediatric lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018;59:5785–5794. <https://doi.org/10.1167/iovs.18.23789>

**PURPOSE.** Posterior capsule opacification (PCO) is a complication after cataract surgery, particularly in children. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) of lens epithelial cells, mediated by transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ), contributes to PCO. However, its pathogenesis in children is poorly understood. We correlated cell growth in culture with patient characteristics, studied gene expression of pediatric lens epithelial cells (pLEC), and examined the effects of TGF $\beta$ -2 on these cells in vitro.

**METHODS.** Clinical characteristics of children with cataracts correlated with growth behavior of pLEC in vitro. mRNA expression of epithelial ( $\alpha$ B-crystallin, connexin-43) and mesenchymal ( $\alpha$ <sub>v</sub>-integrin,  $\alpha$ -smooth muscle actin, collagen-1 $\alpha$ 2, fibronectin-1) markers was quantified in pLEC and in cell line HLE-B3 in the presence and absence of TGF $\beta$ -2.

**RESULTS.** Fifty-four anterior lens capsules from 40 children aged 1 to 180 months were obtained. Cell outgrowth occurred in 44% of the capsules from patients  $\leq$  12 months and in 33% of capsules from children aged 13 to 60 months, but in only 6% of capsules from children over 60 months. TGF $\beta$ -2 significantly upregulated expression of  $\alpha$ B-crystallin (HLE-B3),  $\alpha$ <sub>v</sub>-integrin (HLE-B3), collagen-1 $\alpha$ 2, and fibronectin-1 (in pLEC and HLE-B3 cells).

**CONCLUSIONS.** Patient characteristics correlated with growth behavior of pLEC in vitro, paralleling a higher clinical incidence of PCO in younger children. Gene expression profiles of pLEC and HLE-B3 suggest that upregulation of  $\alpha$ <sub>v</sub>-integrin, collagen-1 $\alpha$ 2, and fibronectin-1 are involved in EMT.

**Keywords:** cataract, children, posterior capsule opacification, epithelial-mesenchymal transformation, lens epithelial cells, transforming growth factor beta-2

Opacification of the lens (cataract) can significantly impair vision. Although more common in older adults, cataracts occur in childhood (congenital and juvenile cataracts). Congenital cataracts are responsible for 5% to 20% of cases of treatable blindness in children.<sup>1</sup> Childhood cataracts may be isolated or in association with other entities, including trauma, infection, inflammation, and metabolic and syndromic disorders.<sup>1,2</sup> A significant proportion of bilateral childhood cataracts is hereditary.<sup>3,4</sup> Visually significant congenital cataracts are usually operated within the first few weeks of life to prevent refractory amblyopia.<sup>5</sup>

Posterior capsule opacification (PCO), an obscuration of the lens capsule after cataract surgery, is especially common in young children. If extending centrally, visual axis opacification (VAO) may result and reduce vision. This postoperative complication has been reported in up to 44% of children within the first year after cataract surgery, and it occurs more frequently in younger children.<sup>6,7</sup> Although surgical techniques such as a primary posterior capsulotomy and anterior vitrectomy reduce the risk for VAO in children, these surgical steps are associated with a higher risk of postoperative complications such as retinal detachment, cystoid macular edema, glaucoma, endophthalmitis, and inflammation.<sup>5,8–12</sup>

The knowledge of the pathogenesis of PCO in children and its prevention remains limited. As it is virtually impossible to remove all lens epithelial cells during cataract surgery, remaining cells can undergo epithelial-mesenchymal transition (EMT), defined as a loss of polarity, cell-to-cell contact, and epithelial characteristics.<sup>13</sup> Transformed cells may proliferate and migrate to the visual axis, where the resulting opacification can necessitate surgical intervention.<sup>14</sup>

Transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ) appears to play a key role in the pathology of PCO in adults.<sup>15,16</sup> In the aqueous humor of the anterior chamber, TGF $\beta$  is secreted as an inactive complex.<sup>17</sup> In the eye, the isoform TGF $\beta$ -2 dominates and appears to be the most potent isoform to be associated with the development of PCO.<sup>15,17,18</sup> It is thought that TGF $\beta$  is upregulated and activated by postoperative inflammation and that surgical complications may further increase its levels in the anterior chamber.<sup>15</sup>

The signaling pathways of TGF $\beta$  in adult PCO are well described. In lens epithelial cells, activated TGF $\beta$  increases the expression of mesenchymal markers such as fibronectin-1 (*FN1*),  $\alpha$ -smooth muscle actin ( *$\alpha$ SMA*), and collagen-1 $\alpha$ 2 (*COL1A2*).<sup>15,16,19</sup> TGF $\beta$  also decreases the expression of epithelial markers such as  $\alpha$ B-crystallin (*CRYAB*) and connexin-43 (*Cx43*) in cells undergoing EMT.<sup>15,16</sup> Furthermore, PCO is



## Transdifferentiation of Lens Epithelial Cells

IOVS | December 2018 | Vol. 59 | No. 15 | 5786

associated with upregulated levels of  $\alpha$ -integrin subunits (*ITGAV*), which are involved in TGF $\beta$  activation and signaling.<sup>20,21</sup> The latent TGF $\beta$  complex is marked by a noncovalent association between propeptides and TGF $\beta$ .<sup>22</sup> Recent reports suggest that  $\alpha$ <sub>v</sub> $\beta$ 6-integrin<sup>21</sup> and other alpha integrins have the ability to disrupt this association, activating TGF $\beta$  and allowing it to interact with its receptor.<sup>20</sup> Nevertheless, these findings are based only on the induction of EMT by TGF $\beta$  in animal cells,<sup>23,24</sup> adult human lens epithelial cells,<sup>25</sup> and human lens cell lines.<sup>26,27</sup> Experimental studies that describe the molecular basics of pediatric lens epithelial cells (pLEC) are lacking. Since regrowth of the lens from pLEC was presented as a new therapeutic approach for pediatric cataract patients recently,<sup>28</sup> a better understanding of the molecular pathomechanisms involved in the formation of PCO in children becomes more important. Due to the rarity of childhood cataracts, the pathogenesis and signaling cascades remain largely unexplored.

In order to study the cellular characteristics of pLEC in culture, we established a protocol for cell culture. We then correlated patient characteristics with growth behavior of pLEC in vitro, and generated a gene expression profile to define the differentiation status of these cells. Confirmatory experiments were performed on the lens cell line HLE-B3. We then investigated the effect of TGF $\beta$ -2 on the gene expression profiles to study the molecular basis of EMT in pLEC in children.

## METHODS

## Patient Characteristics

Forty children (age 1 to 180 months) with uni- or bilateral cataracts presenting to the Department of Ophthalmology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, participated in this study. The parents provided informed consent to participate in the study. The study protocol was approved by the ethics committee (institutional review board of Charité-Universitätsmedizin Berlin). All procedures involving human material were performed in accordance with current ethical standards of the institutional and national research committee and with the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

The following clinical parameters were collected: age at cataract surgery, sex, laterality of cataract, type of cataract, etiology (e.g., family history of cataracts, presence of disorders related to cataract), and other ocular comorbidities such as strabismus and nystagmus.

## Cell Culture

**Cultivation of Pediatric Lens Epithelial Cells.** Fifty-four anterior lens capsules of 40 children were harvested during cataract surgery by means of manual curvilinear capsulorhexis (Fig. 1A). Modifying the method described by Ibaraki,<sup>29</sup> we established a protocol to cultivate pLEC as follows:

1. Anterior lens capsules of approximately 5-mm diameter with attached pLEC, obtained during cataract surgery in children, were immediately transported to the laboratory in balanced salt solution and were transferred to 35-mm culture wells (Eppendorf, Hamburg, Germany) within 30 minutes of collection.
2. After allowing them to rest for 5 minutes, the lens capsules were covered with 60  $\mu$ L Dulbecco's modified Eagle's medium/F-12 (Sigma-Aldrich Corp., Schnelldorf, Germany) supplemented with 20% fetal calf serum (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) and 1% penicillin-

streptomycin (Biochrom AG, Berlin, Germany) and secured at the bottom of the well with 12-mm glass coverslips. This concentration of serum has been described as optimal for culturing human lens epithelial cells.<sup>29-32</sup>

3. Lens capsules were cultured at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Based on other studies, all cells were cultured at atmospheric oxygen levels.<sup>30,33,34</sup> After 24 hours, 1 mL culture medium was carefully added to the culture plates.
4. The medium was changed every 3 days. At this stage, 16 capsules showed cell outgrowth and pLEC from six capsules were immediately used for analysis of mRNA expression. The remaining 10 capsules were subcultured on day 13 using Accutase (PAA) and transferred to a 12-well plate, while empty lens capsules were removed.
5. After reaching confluence in 4 to 6 days, pLEC were subcultured again and seeded on two culture plates.
6. Upon reaching a confluence of 70%, cells of six capsules were serum starved for 24 hours followed by stimulation with 10 ng/mL TGF $\beta$ -2 (Sigma-Aldrich Corp.) for 48 hours in serum-free medium to study its effect on the cells. Serum-free cells cultivated without TGF $\beta$ -2 served as the control. For comparison, each experiment and control was performed on samples of the same lens capsule (see step 5 above).

Cells were monitored daily by phase contrast microscopy, and capsules with cell outgrowth were correlated with patient characteristics. Anterior lens capsules without proliferation tendency were classified as proliferation negative. Other authors performed experiments using lens epithelial cells in passages 1-5.<sup>30,33,35</sup> To ensure comparability, we used early-passage cells (passage 2) to study the effect of the growth factor TGF $\beta$ -2. To determine the properties of primary isolated pLEC, cells in passage 0 (p0) were used.

**Cultivation of HLE-B3 Cells.** To validate the results obtained on pLEC, cells of the commercially available human lens epithelial cell line HLE-B3 (ATCC, Manassas, VA, USA) were cultured at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM; ATCC) containing 20% fetal calf serum (PAA) and 1% penicillin-streptomycin (Biochrom AG). As in pLEC, gene expression profiles of serum-free HLE-B3 cells in the absence and presence of TGF $\beta$ -2 were studied. A short tandem repeat analysis certificate was provided by the manufacturer.

## RNA Isolation and Reverse Transcription

Due to the small number of pLEC obtained from the donor capsules, RNA of pLEC was isolated with a reagent (TRI-Reagent; Sigma-Aldrich Corp.) and a visible dye-labeled carrier (Pellet Paint; Novagen, San Diego, CA, USA). RNA was extracted from HLE-B3 cells in passage 5 to 9 using a kit (RNeasy Micro Kit; Qiagen, Hilden, Germany).

In pLEC and HLE-B3 cells, a reverse transcription kit (QuantiTect; Qiagen) was used to synthesize cDNA. To eliminate genomic DNA contamination, 2  $\mu$ L gDNA wipeout buffer was added to the samples.

## Quantitative Real-Time PCR and Gel Electrophoresis

Gene expression of pLEC and HLE-B3 cells was assessed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) using Rotor-Gene SYBR Green PCR Mix (Qiagen) on a real-time PCR cyclotherm (Rotor-Gene Q; Qiagen). For analysis of each candidate gene, triplicates were prepared. Primers were designed using Primer-BLAST

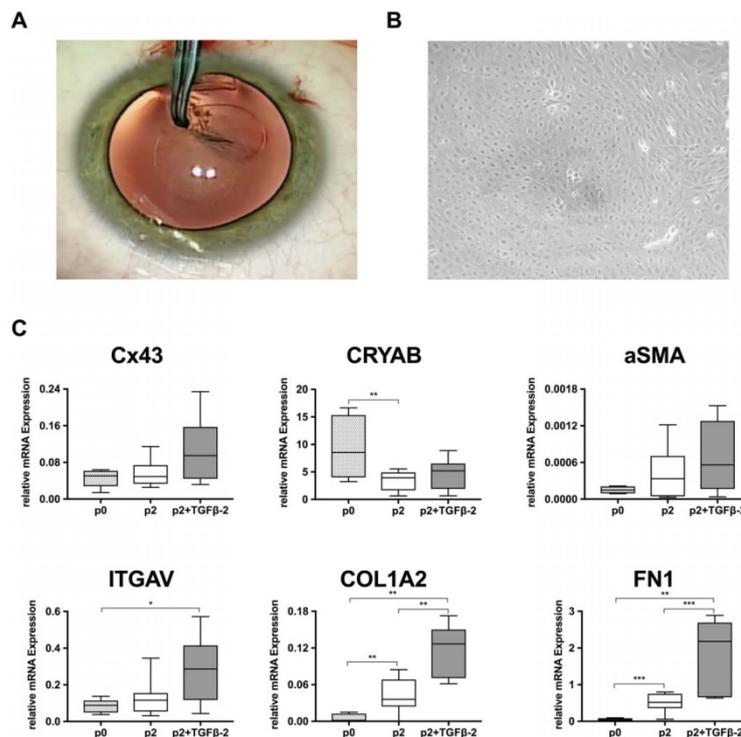


FIGURE 1. Gene expression profile of pediatric lens cells. (A) Manual capsulorhexis during cataract surgery on a child. The anterior lens capsule with the attached primary lens epithelial cells is harvested. (B) Cultivated pLEC were monitored by phase contrast microscopy on day 6 (objective  $\times 20$ ). Cells near the capsule were predominantly cuboid, whereas remote cells had an elongated character. (C) Quantitative RT-PCR was used to analyze mRNA expression for *Cx43*, *CRYAB*, *aSMA*, *ITGAV*, *COL1A2*, and *FN1*. TGFβ-2 (10 ng/mL for 48 hours) increased gene expression of *COL1A2* and *FN1* significantly ( $P < 0.05$ ) in pLEC. *GAPDH* was selected as housekeeping gene. p0, passage 0; p2, passage 2.

Investigative Ophthalmology & Visual Science

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>; provided in the public domain by the National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). *GAPDH* was selected as internal control gene for relative quantification. Primers were obtained from Eurofins MWG Operon (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany). Primer sequences and expected product sizes are listed in Table 1.

Data were analyzed with software (Rotor-Gene; Qiagen) and relative mRNA expression was calculated by employing the comparative  $C_T$  method.<sup>36</sup>

Gel electrophoresis was used to test for specific amplification and primer dimers.

Molecular imager Chem Doc XRS (Biorad, Munich, Germany) allowed identification of PCR amplicons by their product size (see Supplementary Fig. S1).

### Immunocytochemistry (ICC)

At passage p0, pLEC, as well as stimulated and unstimulated HLE-B3 cells on glass coverslips, were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 minutes at room temperature. After incubation in a blocking solution containing 5% BSA in Tris-buffered saline for 30 minutes, the following primary antibodies were applied overnight at 4°C: anti-actin, aSMA-

Cy3 (1:500, mouse monoclonal; Sigma-Aldrich Corp.), and anti-fibronectin (1:250, mouse monoclonal; Sigma-Aldrich Corp.). For visualization of fibronectin, another incubation step at room temperature for 1 hour was added using the secondary antibody goat anti-mouse (AF546, 1:5000; Thermo Fisher, Darmstadt, Germany). The negative control was performed with HLE-B3 cells stained only with secondary antibody without primary antibody incubation (see Supplementary Fig. S2). Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich Corp.). Subsequently, coverslips were mounted onto glass slides and subjected to an Axio Imager 2 and Zen lite 2012 Software (Zeiss, Jena, Germany). Fluorescence signal analysis was performed by measuring color pixels per square micrometer of 13 cells per group. To determine the mean corrected total cell fluorescence (CTCF) the following formula was used<sup>37</sup>:

$$CTCF = \frac{\text{Integrated Density}}{(\text{Area of selected cell} \times \text{Mean fluorescence of background readings})}$$

Pixel analysis was done with ImageJ 2.0 software (<http://imagej.nih.gov/ij/>; provided in the public domain by the National Institutes of Health).<sup>38</sup>

TABLE 1. Primer Sequences Used for mRNA Quantification by qRT-PCR

Gene	Forward	Backward	Product Size, bp
<i>Cx43</i>	CAAAATCGAATGGGGCAGGC	GCTGGTCCACAATGGCTAGT	136
<i>CRYAB</i>	ACTCTCAGAGATGCGCCTGG	GCTGGGATCCGGTATTTC	186
<i>aSMA</i>	AGCTTTCAGCTTCCTGAACA	CACCATCACCCCTGATGTCT	223
<i>ITGAV</i>	AGGCTGGAACCTCAACTCTTAGC	GCTCCAGTTTGGAATCGGA	222
<i>COLIA2</i>	GGAGGTTTCGGCTAAGTTGGA	CGGCTGGGCCCTTCTTACA	228
<i>FN1</i>	GAGCTGAGTGAGGAGGGAGA	GCATCAGGCGCTGTTGTTT	176
<i>GAPDH</i>	TCAACGACCACTTGTCAAGCTCA	GCTGGTGGTCCAGGGGTCTTACT	119
<i>TGFβ-2</i>	GTGCTTTGGATGCGGCCCTA	GGCATGCTCCAGCACAGAA	147

*GAPDH*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

**Statistical Analysis**

All experiments were performed at least three times. Statistical analysis was done with statistical software (GraphPad Prism 7; GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). First, the ROUT method was employed to detect outliers. Normality was assessed using the Shapiro-Wilk test.

To explore statistical significance, Fisher exact test,  $\chi^2$  test, Student's *t*-test or Mann-Whitney *U* test were performed, with a *P* value < 0.05 (\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001) considered as statistically significant. Box plot whiskers represent the range, and mean ± standard error of the mean was reported.

**RESULTS**

**Patient Characteristics**

Of 40 children with cataracts included in this study, 38% were female and 68% were diagnosed with bilateral cataracts (Table 2). In 25% of cases, family history was positive for childhood cataracts. Associated diagnoses such as chromosomal anomalies, craniofacial syndromes, dermatologic disorders, aniridia, or uveitis were noted in 23% of patients. In 53% of children, the etiology of the cataracts remained unclear (Table 2).

**Patient Characteristics and Cell Outgrowth**

Of the 54 harvested anterior capsules, cell outgrowth was observed in 16 (30%). Gender did not affect the likelihood of cell outgrowth. While 44% of capsules from children ≤12

months of age at the time of surgery showed cell outgrowth, this was the case in 33% of capsules from children aged 13 to 60 months and in only 1 of 17 capsules (6%) from a child older than 60 months (Fig. 2A; Table 3). There was a significant association between age at cataract surgery and cell outgrowth in vitro ( $\chi^2 = 7.153$ ; *df* = 2; *P* = 0.03).

Outgrowth of pLEC was observed in 43% of the capsules obtained from patients with a positive family history for childhood cataract, 36% of capsules from children with cataracts associated with other entities, and 21% of capsules from patients with idiopathic cataracts (Fig. 2B, Table 3).

As for the type of cataract, cell outgrowth was observed in 8/10 capsules from lenses with total cataracts, in 1/2 lenses with posterior polar cataracts, and in 2/3 lenses with persistent fetal vasculature (PFV). Two of 13 capsules with zonular cataract, 1/9 with complex cataract, and 2/9 capsules without specified cataract morphology showed cell outgrowth. Capsules from lenses with other types of cataracts did not show cell outgrowth (Fig. 2C; Table 3). There was a significant association between cataract type and cell growth in vitro ( $\chi^2 = 20.89$ ; *df* = 7; *P* = 0.004).

**mRNA Expression of Primary pLEC Versus pLEC in Passage 2**

ICC and qRT-PCR were performed to investigate the molecular properties of the primary isolated pLEC (p0). In order to determine possible changes caused by the cell culturing and passaging, mRNA expressions were compared with pLEC in passage 2.

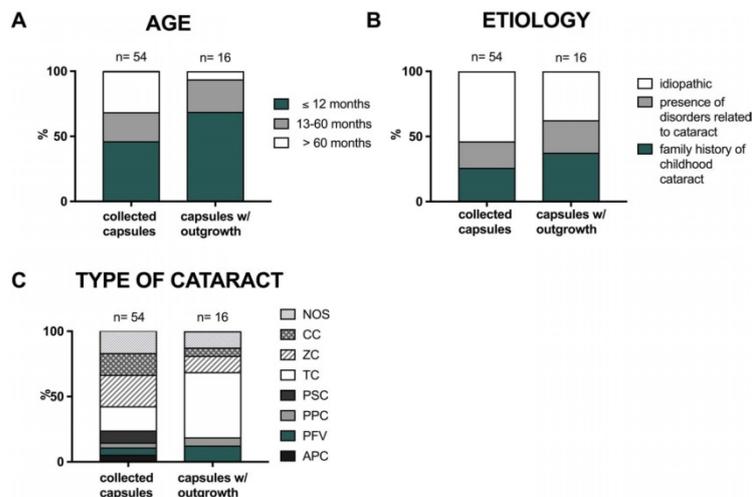
Subculturing did not have significant effects on mRNA expression of *Cx43*, *aSMA*, and *ITGAV*. However, there was a significant increase in mRNA expression of *COLIA2* (*P* = 0.005, *n*<sub>p0</sub> = 6, *n*<sub>p2</sub> = 9) and *FN1* (*P* = 0.0009, *n*<sub>p0</sub> = 6, *n*<sub>p2</sub> = 10) of cells in passage 2 compared to primary isolated pLEC (Fig. 1C). mRNA expression levels of *CRYAB* showed a significant reduction during subculturing (*P* = 0.009, *n*<sub>p0</sub> = 6, *n*<sub>p2</sub> = 9). Immunocytochemistry confirmed expression of mesenchymal markers *aSMA* and *FN1* as proteins in primary isolated pLEC (see Supplementary Fig. S3).

**Effect of TGFβ-2 on mRNA Expression in pLEC**

The effect of TGFβ-2 on pLEC was examined at passage 2 (Fig. 1B). There was a significant increase in mRNA expression of *COLIA2* (*P* = 0.003, *n*<sub>control</sub> = 9, *n*<sub>TGFβ-2</sub> = 5) and *FN1* (*P* = 0.0009, *n*<sub>control</sub> = 10, *n*<sub>TGFβ-2</sub> = 6) in response to TGFβ-2 (Fig. 1C). However, TGFβ-2 stimulation did not have a significant effect on mRNA expression of *ITGAV*, *Cx43*, and *aSMA*. Although mRNA expression of *CRYAB* in pLEC was the highest of all investigated genes, no significant change after stimulation with TGFβ-2 was observed (Fig. 1C).

TABLE 2. Characteristics of 40 Child Study Participants With Cataracts

	Number of Patients	Percentage
Sex		
Female	15	37.5
Male	25	62.5
Age at cataract surgery		
Average in mo	41.4	
≤12 mo	19	47.5
13–60 mo	8	20.0
>60 mo	13	32.5
Laterality		
Unilateral	13	32.5
Bilateral	27	67.5
Etiology		
Family history of childhood cataract	10	25.0
Cataract associated with other disorders	9	22.5
Idiopathic, isolated	21	52.5



**FIGURE 2.** Frequency distribution of properties of all collected capsules versus capsules with outgrowth of pLEC. (A) Effect of age at time of surgery on outgrowth of pLEC in culture. Of capsules showing cell growth, 69% came from children 12 months or younger, 25% of children aged 13–60 months, and the remaining 6% from children older than 60 months. (B) Effect of cataract etiology on outgrowth of pLEC in culture. (C) Effect of clinical type of cataract on outgrowth of pLEC in culture. APC, anterior polar cataract; CC, complex cataract; NOS, not otherwise specified; PFV, persistent fetal vasculature; PPC, posterior polar cataract; PSC, posterior subcapsular cataract; TC, total cataract; ZC, zonular cataract.

**Effect of TGFβ-2 on mRNA Expression and Immunocytochemistry in HLE-B3**

Stimulation of HLE-B3 cells (Fig. 3A) with TGFβ-2 significantly increased mRNA expression of *CRYAB* ( $P = 0.0003$ ,  $n = 9$ ),

**TABLE 3.** Properties of the Capsules Included in the Study Regarding Patients' Features

	Capsules	Capsules With Cell Outgrowth (%)
Cases	54	16 (29.6)
Sex		
Female	22	7 (31.8)
Male	32	9 (28.1)
Age at cataract surgery		
≤12 mo	25	11 (44.0)
13–60 mo	12	4 (33.3)
>60 mo	17	1 (5.9)
Etiology		
Family history of childhood cataract	14	6 (42.9)
Cataract associated with other disorders	11	4 (36.4)
Idiopathic, isolated	29	6 (20.7)
Type of cataract		
Anterior polar	3	0 (0)
Persistent fetal vasculature	3	2 (66.7)
Posterior polar	2	1 (50.0)
Posterior subcapsular	5	0 (0)
Total cataract	10	8 (80.0)
Zonular cataract	13	2 (15.4)
Complex cataract	9	1 (11.1)
Not otherwise specified	9	2 (22.2)

*ITGAV* ( $P = 0.01$ ,  $n = 9$ ), *COL1A2* ( $P = 0.0002$ ,  $n = 9$ ), and *FNI* ( $P < 0.0001$ ,  $n = 9$ ) (Fig. 3B). As in pLEC, TGFβ-2 did not significantly affect expression of *Cx43* and *aSMA* (Fig. 3B). Stimulated and unstimulated cells showed comparable levels fluorescence signals from staining of αSMA protein (Fig. 4A, C), while the protein expression of FN appeared significantly increased in the immunofluorescence staining in response to TGFβ-2 ( $P = 0.009$ ,  $n = 13$ ) (Fig. 4B, C).

**Comparison of mRNA Expression in Primary pLEC and HLE-B3**

In unstimulated primary pLEC (p0), total mRNA levels were higher than in unstimulated HLE-B3 cells for most investigated genes. Particularly, mRNA expressions of *COL1A2* (10-fold), *CRYAB* (194-fold), and *aSMA* (15-fold) were higher in pLEC than in HLE-B3 cells; mRNA expressions of *Cx43* (4-fold) and *ITGAV* (3-fold) were moderately higher (Fig. 5A). The higher expression rates of these genes were associated with significantly higher mRNA levels of *TGFβ-2* in primary pLEC compared to HLE-B3 cells ( $P = 0.0005$ ,  $n_{p0} = 5$ ,  $n_{HLE-B3} = 6$ ) (Fig. 5B). Primary isolated pLEC showed lower mRNA levels of *FNI* (0.3-fold) compared to unstimulated HLE-B3 cells.

**DISCUSSION**

Pediatric cataracts are rare,<sup>2,4,39</sup> and research concerning the pathogenesis of both childhood cataract pathogenesis and PCO is limited, making therapeutic strategies difficult to develop. We provide insight into the pathophysiology of after-cataracts in children, which could serve as basis for future research to better understand the molecular mechanisms of this process and its prophylaxis.

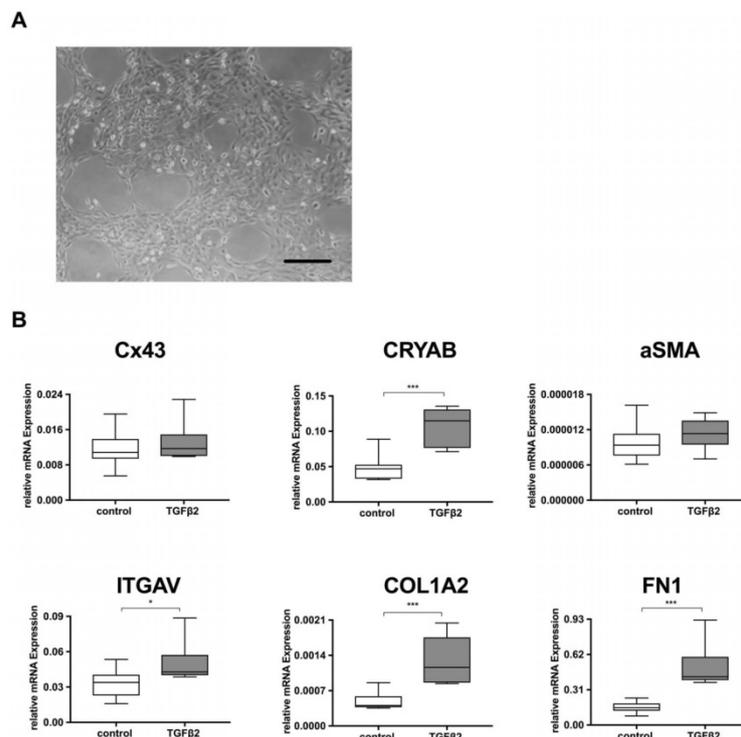


FIGURE 3. Effects of TGFβ-2 on HLE-B3 cells. (A) Phase contrast microscopy of cell line HLE-B3 in passage 5 (objective ×20). Scale bar: 1 mm. (B) Relative mRNA expression of all investigated genes in absence and presence of 10 ng/mL TGFβ-2. CRYAB, ITGAV, COL1A2, and FN1 were significantly increased after stimulation with TGFβ-2 for 48 hours ( $P < 0.05$ ).

### Patient Characteristics Affect Growth Behavior of Cells in Vitro

The purpose of this study was to establish a standardized protocol for cell culture of pediatric pLEC and to correlate cell outgrowth with clinical characteristics. Using the established cell-culturing protocol, 16 of the 54 capsules showed outgrowth of cells. We found that pLEC from lens capsules from younger children more often showed cell outgrowth in culture than did those from older children. This in vitro finding agrees with clinical experience that young age is a risk factor for PCO after pediatric cataract surgery.<sup>7</sup>

Cataract type also affected pLEC outgrowth. While cell outgrowth in vitro happened in most capsules from lenses with a total cataract, PFV, or a posterior polar cataract, it occurred less frequently in capsules from zonular and complex cataracts. Capsules from anterior polar cataracts and posterior subcapsular cataract showed no cell outgrowth.

Of note, cataract type is often related to patient age at surgery. For example, it is likely that denser (total) cataracts are diagnosed and operated on earlier than for subtler ones. A larger number of cases would be desirable, and future research may further study age and type of cataract as factors affecting behavior of pLEC in cell culture.

A recent report suggested that regrowth of the lens from pLEC remaining in the lens capsule at the time of surgery may be possible.<sup>28</sup> While this approach has the potential to

revolutionize current concepts on optical rehabilitation after cataract surgery in children, the validity and reproducibility of this strategy remains to be confirmed. Our results would suggest that cell outgrowth may be more frequent in younger children with total cataracts, but whether a regenerated lens is sufficiently clear needs to be confirmed in clinical studies. However, understanding the cellular mechanisms underlying proliferation of pLEC in children is a prerequisite for the evaluation and implementation of novel therapeutic approaches for pediatric cataracts.

### Effect of TGFβ on pLEC

EMT is thought to be involved in the development of after-cataracts in adults.<sup>16</sup> Our data support the hypothesis that the same mechanism applies for pLEC. Prior research described the induction of EMT by TGFβ in rat lens cells,<sup>23,24</sup> adult human lens epithelial cells,<sup>25</sup> and human lens cell lines<sup>26,27</sup> as a characteristic feature of after-cataract formation.<sup>40</sup> In after-cataract formation, TGFβ is known to act via the well-studied SMAD cascade and various SMAD independent signaling pathways.<sup>19,40-43</sup> EMT is characterized by an increased expression of α-smooth muscle actin, collagen-I, integrins, fibronectin, and other proteins considered to be mesenchymal markers. Conversely, epithelial markers are downregulated in the presence of TGFβ.<sup>25,24,44-46</sup> It can be assumed that this growth factor has comparable effects on pediatric lens cells.

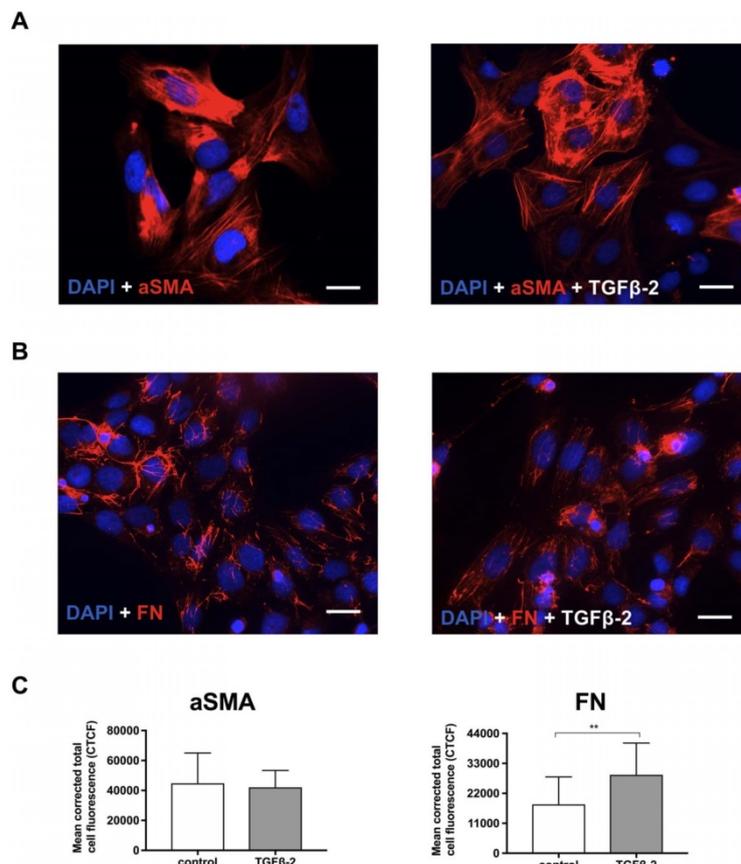


FIGURE 4. Immunocytochemistry of HLE-B3 cells. Immunocytochemistry of HLE-B3 cells stained with antibodies against  $\alpha$ SMA (A) and FN (B) in absence and presence of 10 ng/mL TGF $\beta$ -2. Nuclei were stained with DAPI. Mean corrected cell fluorescence of FN was significantly increased by TGF $\beta$ -2 (C),  $P < 0.05$ . Scale bar: 50  $\mu$ m.

However, to our knowledge, no studies have qualified the influence of TGF $\beta$ -2 on these cells. Building on these studies, the present work describes the response of pediatric lens cells to TGF $\beta$ -2 that, however, might differ in its mechanism from that of adult EMT.

We found an increased mRNA expression of extracellular matrix genes in presence of TGF $\beta$ -2 in pLEC. Stimulation with TGF $\beta$ -2 promoted an intense mRNA upregulation of *FN1* and *COL1A2* as features of a myofibroblastic transformation in pLEC.

FN, an extracellular matrix protein, is reported to be involved in EMT.<sup>16,47</sup> It was found to accumulate in experimental PCO, specifically in anterior subcapsular plaques in vitro<sup>16</sup> and appears to be essential for integrin-promoted activation of TGF $\beta$ <sup>47</sup> Moreover, FN supports migration of rabbit lens epithelial cells in vitro and therefore might promote migration of lens epithelial cells to the posterior lens capsule.<sup>48</sup> Consistent with these findings, pLEC showed significantly upregulated mRNA levels of *FN1* in response to TGF $\beta$ -2. It appears likely that this pathway is involved in the formation of

PCO, and it may be particularly responsible for fibrotic types of PCO in children.

We demonstrated that TGF $\beta$ -2-mediated upregulation of mRNA for *COL1A2* also occurs in pLEC. This substantiates previous immunohistologic studies identifying collagen-I-rich cells in congenital cataracts.<sup>49</sup> In general, collagen-I is involved in TGF $\beta$ -related diseases such as idiopathic lung fibrosis, systemic sclerosis, and certain types of cancer.<sup>50,51</sup> Overexpression of *COL1A2* in pediatric lens cells with its fibrotic and migrating patterns may contribute to high incidence of PCO and VAO in children.

TGF $\beta$ -induced upregulation of *aSMA* has been reported as a key factor in EMT.<sup>16,46</sup> However, we found that TGF $\beta$ -2 had no significant effect on *aSMA* expression in pLEC or in HLE-B3 cells. The most likely explanation is that TGF $\beta$  signaling in juvenile cataract differs from that in adult cataract. TGF $\beta$ -mediated stimulation of *aSMA* expression appears to be age dependent.<sup>52</sup> A lower proportion of advanced glycation end products in lens epithelial cells of younger donors may be associated with a weaker TGF $\beta$ -dependent effect on *aSMA*

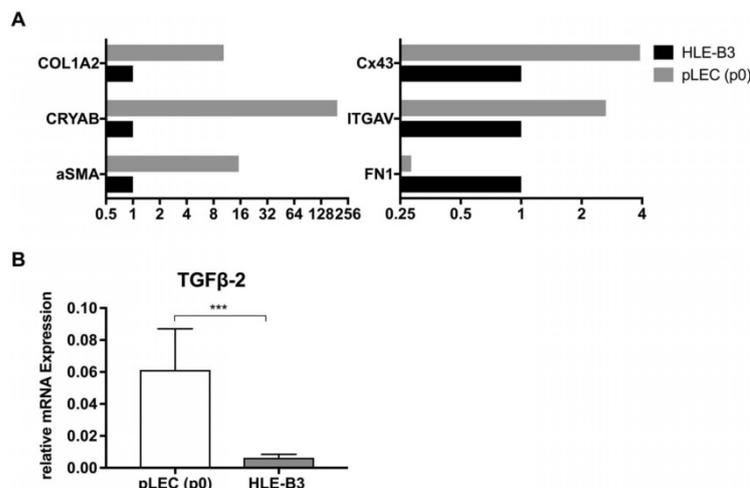


FIGURE 5. Fold expression of unstimulated primary pLEC and unstimulated HLE-B3 cells. (A) Fold expression of *COL1A2*, *CRYAB*, and *aSMA* are up to 194-fold higher in primary pLEC (p0) compared to HLE-B3. mRNA expression of *Cx43* and *ITGAV* are up to 4-fold higher in primary pLEC compared to HLE-B3, while expression of *FN1* was lower in primary pLEC (p0). mRNA expression of HLE-B3 was normalized to 1. (B) Relative mRNA expression of *TGFβ-2* was significant higher in primary isolated pLEC (p0) compared to HLE-B3 cells ( $P < 0.05$ ).

expression.<sup>52</sup> The exact underlying mechanism of this TGFβ-mediated *aSMA* expression has not yet been identified. Although TGFβ may induce the expression of *aSMA* directly, indirect pathways and interactions with other TGFβ-induced proteins should be considered.<sup>53</sup> In our study, a lack of TGFβ-2 effect on mRNA expression of *aSMA* might result from already elevated mRNA levels of *aSMA* in pLEC so that TGFβ-2 may not further upregulate this gene.<sup>54</sup> Finally, it is important to note that variations in experimental methodology may affect stimulation results. Further research into delineating the underlying mechanisms is necessary.

Detectable basal gene expression rates in primary pLEC for mesenchymal markers in the absence of TGFβ-2 suggest that these cells may have lost their epithelial features to some extent. These changes could be caused by an overexpression of TGFβ in congenital cataracts<sup>55,56</sup> or an increased level of TGFβ following cataract surgery.<sup>57</sup> Indeed, our study demonstrated higher basal expression rates of *TGFβ-2* in pLEC compared to HLE-B3 cells. Stimulation of pLEC with TGFβ-2 further led to a significant increase in mRNA expression of mesenchymal genes, *COL1A2* and *FN1*, implying transdifferentiation toward myofibroblastic characteristics. Interestingly, there was no significant concomitant reduction of epithelial markers in response to TGFβ-2. This is in line with the clinical observation that lens epithelial cells continue to produce lens material while proliferating and migrating on the remaining lens capsule. It remains to be demonstrated if success of recent therapeutic approaches such as regeneration of the lens from pLEC is limited by the transdifferentiation status of these cells. *FN1* and *COL1A2* seem to be characteristic genes in EMT in pLEC, so they can be recommended as potential targets to reduce PCO in children.

As a limitation, one should consider that qRT-PCR measures gene expression but does not reflect changes on the protein level. The main obstacle to quantitative protein levels by Western blotting was the limited number of pLEC and the low amount of RNA per harvested lens capsule. Moreover, mRNA expression was investigated 48 hours after stimulation with

TGFβ-2. One should consider that gene expression may vary at different times. Nevertheless, qRT-PCR is a highly reproducible and sensitive method, allowing quantification of specific DNA sequences.<sup>58,59</sup>

#### Similar Effect of TGFβ-2 in HLE-B3 and pLEC

Consistent with findings in pLEC, we found TGFβ-2-induced gene expression profiles compatible with EMT in HLE-B3 cells. These cells served as a control for the experimental setup used to analyze pediatric lens cells. TGFβ-2 promoted a significant upregulation of *ITGAV*, *FN1*, and *COL1A2* gene expression in HLE-B3 compared to untreated cells. Contrary to the well-studied effects of TGFβ-2 on mesenchymal markers,<sup>16,21,23,24,44</sup> the present study also detected a significant upregulation of *CRYAB* in HLE-B3 cells after stimulation with TGFβ-2. With its chaperone-like and heat-shock protein activity, α-crystallin suppresses stress-induced cell death and lenticular protein aggregation and therefore preserves transparency of the lens.<sup>60,61</sup> Overexpression of *CRYAB* under conditions of stress contributes to increased stress resistance of cells.<sup>62</sup> Moreover, mutations in the α-crystallin gene cause congenital cataracts.<sup>63</sup> Intriguingly, *CRYAB* also appears to be involved in EMT.<sup>62</sup> One study found that depletion of *CRYAB* by siRNA has reduced TGFβ-induced mesenchymal changes in lens cells.<sup>62</sup> It is possible that TGFβ-2 increases the expression of *CRYAB*, which subsequently results in an increased expression of EMT genes,<sup>62</sup> and that increased *CRYAB* levels lead to an increased nuclear localization of Smad4, which induces mesenchymal genes and increased proliferative and migratory capacity.<sup>62,64</sup> We detected high basal expression levels of *CRYAB* in pLEC and a TGFβ-2-promoted mRNA elevation of *CRYAB* in cell line HLE-B3. Whether this was due to an abortive protective mechanism of α-crystallin in lens cells undergoing EMT or whether high *CRYAB* levels contribute to the pathogenesis of PCO due to their antiapoptotic properties remains unclear.<sup>65</sup>

We show that pLEC and HLE-B3 cells respond similarly to stimulation with TGFβ-2 with respect to mesenchymal markers

*FN1* and *COL1A2*, but that total expression rates of most examined genes were considerably higher in pLEC. This may reflect the greater vitality and metabolic activity of pLEC in children compared with the cell line. Changes in molecular expression cell lines can occur due to subculturing and growth medium composition. HLE-B3 cells are, although lens cells, not native cells and may not accurately reflect the behavior of pLEC.

We found that pLEC from younger children were more likely to grow in cell cultures. These cells exhibit a gene expression profile that indicates a phenotypic shift from epithelial to mesenchymal properties (EMT). In the light of recent approaches for pediatric cataracts, our findings may help design research to better understand the molecular mechanisms involved in the formation of PCO.

#### Acknowledgments

The authors thank Gabriele Fels (Charité, Universitätsmedizin Berlin) for technical support and Eckart Bertelmann (Charité, Universitätsmedizin Berlin) for providing lens capsules.

Supported by the Marie-Luise-Geissler-Stiftung (Berlin, Germany), the German Research Foundation (DFG), and the Open Access Publication Fund of Charité – Universitätsmedizin Berlin.

Disclosure: **L. Wernecke**, None; **S. Keckeis**, None; **N. Reichhart**, None; **O. Strauß**, None; **D.J. Salchow**, None

#### References

- Zetterström C, Lundvall A, Kugelberg M. Cataracts in children. *J Cataract Refract Surg*. 2005;31:824-840.
- Trumler AA. Evaluation of pediatric cataracts and systemic disorders. *Curr Opin Ophthalmol*. 2011;22:365-379.
- Zetterström C, Kugelberg M. Paediatric cataract surgery. *Acta Ophthalmol Scand*. 2007;85:698-710.
- Wirth MG, Russell-Eggitt IM, Craig JE, Elder JE, Mackey DA. Aetiology of congenital and paediatric cataract in an Australian population. *Br J Ophthalmol*. 2002;86:782-786.
- Lim ME, Buckley EG, Prakalapakorn SG. Update on congenital cataract surgery management. *Curr Opin Ophthalmol*. 2017; 28:87-92.
- Apple DJ, Solomon KD, Tetz MR, et al. Posterior capsule opacification. *Surv Ophthalmol*. 1992;37:73-116.
- Jensen AA, Basti S, Greenwald MJ, Mets MB. When may the posterior capsule be preserved in pediatric intraocular lens surgery? *Ophthalmology*. 2002;109:324-327; discussion 328.
- Plager DA, Lynn MJ, Buckley EG, Wilson ME, Lambert SR; Infant Aphakia Treatment Study Group. Complications, adverse events, and additional intraocular surgery 1 year after cataract surgery in the infant Aphakia Treatment Study. *Ophthalmology*. 2011;118:2330-2334.
- Hager T, Schirra F, Seitz B, Käsmann-Kellner B. Treatment of pediatric cataracts. Part 2: IOL implantation, postoperative complications, aphakia management and postoperative development [in German]. *Ophthalmologe*. 2013;110:179-190.
- Whitman MC, Vanderveen DK. Complications of pediatric cataract surgery. *Semin Ophthalmol*. 2014;29:414-420.
- Medsing A, Nischal KK. Pediatric cataract: challenges and future directions. *Clin Ophthalmol*. 2015;9:77-90.
- Vasavada AR, Praveen MR, Tassignon MJ, et al. Posterior capsule management in congenital cataract surgery. *J Cataract Refract Surg*. 2011;37:173-193.
- Martinez G, de Iongh RU. The lens epithelium in ocular health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42:1945-1963.
- Nibourg LM, Gelens E, Kuijter R, Hooymans JM, van Kooten TG, Koopmans SA. Prevention of posterior capsular opacification. *Exp Eye Res*. 2015;136:100-115.
- Wormstone IM, Wang L, Liu CS. Posterior capsule opacification. *Exp Eye Res*. 2009;88:257-269.
- de Iongh RU, Wederell E, Lovicu FJ, McAvoy JW. Transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in the lens: a model for cataract formation. *Cells Tissues Organs*. 2005;179:43-55.
- Saika S. TGFbeta pathobiology in the eye. *Lab Invest*. 2006; 86:106-115.
- Gordon-Thomson C, de Iongh RU, Hales AM, Chamberlain CG, McAvoy JW. Differential cataractogenic potency of TGF-beta1, -beta2, and -beta3 and their expression in the postnatal rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39:1399-1409.
- Saika S, Yamanaka O, Sumioka T, et al. Fibrotic disorders in the eye: targets of gene therapy. *Prog Retin Eye Res*. 2008;27: 177-196.
- Walker J, Menko AS. Integrins in lens development and disease. *Exp Eye Res*. 2009;88:216-225.
- Sponer U, Pich S, Soleiman A, Skorpik C. Upregulation of alphavbeta6 integrin, a potent TGF-beta1 activator, and posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg*. 2005;31:595-606.
- Todorovic V, Jurukovski V, Chen Y, Fontana L, Dabovic B, Rifkin DB. Latent TGF-beta binding proteins. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37:38-41.
- Liu J, Hales AM, Chamberlain CG, McAvoy JW. Induction of cataract-like changes in rat lens epithelial explants by transforming growth factor beta. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35:388-401.
- Hales AM, Chamberlain CG, McAvoy JW. Susceptibility to TGFbeta2-induced cataract increases with aging in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:3544-3551.
- Wormstone IM, Tamiya S, Anderson I, Duncan G. TGF-beta2-induced matrix modification and cell transdifferentiation in the human lens capsular bag. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43:2301-2308.
- Wormstone IM, Tamiya S, Eldred JA, et al. Characterisation of TGF-beta2 signalling and function in a human lens cell line. *Exp Eye Res*. 2004;78:705-714.
- Li J, Tang X, Chen X. Comparative effects of TGF-beta2/Smad2 and TGF-beta2/Smad3 signaling pathways on proliferation, migration, and extracellular matrix production in a human lens cell line. *Exp Eye Res*. 2011;92:173-179.
- Lin H, Ouyang H, Zhu J, et al. Lens regeneration using endogenous stem cells with gain of visual function. *Nature*. 2016;531:323-328.
- Ibaraki N. Human lens epithelial cell culture. *Methods Mol Biol*. 2002;188:1-6.
- Andley UP, Rhim JS, Chylack LT, Fleming TP. Propagation and immortalization of human lens epithelial cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35:3094-3102.
- Ibaraki N, Lin LR, Reddy VN. Effects of growth factors on proliferation and differentiation in human lens epithelial cells in early subculture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36: 2304-2312.
- Power W, Neylan D, Collum L. Growth characteristics of human lens epithelial cells in culture. Effect of media and donor age. *Doc Ophthalmol*. 1993;84:365-372.
- Liu H, Feng G, Wu L, et al. The effects of rapamycin on lens epithelial cell proliferation, migration, and matrix formation: an in vitro study. *Mol Vis*. 2010;16:1646-1653.
- Liu CS, Wormstone IM, Duncan G, Marcantonio JM, Webb SE, Davies PD. A study of human lens cell growth in vitro. A model for posterior capsule opacification. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37:906-914.
- Kubo E, Shibata S, Shibata T, Kiyokawa E, Sasaki H, Singh DP. FGF2 antagonizes aberrant TGFbeta regulation of tropomyosin:

## Transdifferentiation of Lens Epithelial Cells

IOVS | December 2018 | Vol. 59 | No. 15 | 5794

- role for posterior capsule opacity. *J Cell Mol Med.* 2017;21:916-928.
36. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3:1101-1108.
  37. McCloy RA, Rogers S, Caldon CE, Lorca T, Castro A, Burgess A. Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle.* 2014;13:1400-1412.
  38. Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, et al. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics.* 2017;18:529.
  39. Lambert SR, Drack AV. Infantile cataracts. *Surv Ophthalmol.* 1996;40:427-458.
  40. Wormstone IM, Eldred JA. Experimental models for posterior capsule opacification research. *Exp Eye Res.* 2016;142:2-12.
  41. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 2009;19:156-172.
  42. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15:178-196.
  43. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* 2009;19:128-139.
  44. Lovicu FJ, Schulz MW, Hales AM, et al. TGFbeta induces morphological and molecular changes similar to human anterior subcapsular cataract. *Br J Ophthalmol.* 2002;86:220-226.
  45. Gotoh N, Perdue NR, Matsushima H, Sage EH, Yan Q, Clark JI. An in vitro model of posterior capsular opacity: SPARC and TGF-beta2 minimize epithelial-to-mesenchymal transition in lens epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:4679-4687.
  46. Lee EH, Joo CK. Role of transforming growth factor-beta in transdifferentiation and fibrosis of lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:2025-2032.
  47. Fontana L, Chen Y, Prijatelj P, et al. Fibronectin is required for integrin alphavbeta6-mediated activation of latent TGF-beta complexes containing LTBP-1. *FASEB J.* 2005;19:1798-1808.
  48. Olivero DK, Furcht LT. Type IV collagen, laminin, and fibronectin promote the adhesion and migration of rabbit lens epithelial cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993;34:2825-2834.
  49. Johar K, Vasavada AR, Tatsumi K, Dholakia S, Nihalani B, Rao SS. Anterior capsular plaque in congenital cataract: occurrence, morphology, immunofluorescence, and ultrastructure. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:4209-4214.
  50. Asano Y, Ihn H, Yamane K, Jinnin M, Mimura Y, Tamaki K. Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in alpha2(I) collagen gene expression in normal and scleroderma fibroblasts. *J Immunol.* 2004;172:7123-7135.
  51. Ramirez F, Tanaka S, Bou-Gharios G. Transcriptional regulation of the human alpha2(I) collagen gene (COL1A2), an informative model system to study fibrotic diseases. *Matrix Biol.* 2006;25:365-372.
  52. Raghavan CT, Smuda M, Smith AJ, et al. AGEs in human lens capsule promote the TGFβ2-mediated EMT of lens epithelial cells: implications for age-associated fibrosis. *Aging Cell.* 2016;15:465-476.
  53. Nagamoto T, Eguchi G, Beebe DC. Alpha-smooth muscle actin expression in cultured lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:1122-1129.
  54. Jong-Hesse YD, Lang GK, Kampmeier J, Lang GE. Effect of growth factors on the differentiation of porcine lens epithelial cells [in German]. *Klin Monbl Augenheilkd.* 2004;221:175-179.
  55. Xiao Y, Zhao B, Gao Z, Pan Q. Overaccumulation of transforming growth factor-beta1 and basic fibroblast growth factor in lens epithelial cells of congenital cataract. *Can J Ophthalmol.* 2009;44:189-192.
  56. Banasiak P, Strzalka-Mrozik B, Forminska-Kapuscik M, et al. Quantitative relationships between transforming growth factor beta mRNA isoforms in congenital and traumatic cataracts. *Mol Vis.* 2011;17:3025-3033.
  57. Saika S, Miyamoto T, Ishida I, et al. TGFbeta-Smad signalling in postoperative human lens epithelial cells. *Br J Ophthalmol.* 2002;86:1428-1433.
  58. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol.* 2002;29:23-39.
  59. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ.* 2005;29:151-159.
  60. Andley UP. Effects of alpha-crystallin on lens cell function and cataract pathology. *Curr Mol Med.* 2009;9:887-892.
  61. Horwitz J, Bova MP, Ding LL, Haley DA, Stewart PL. Lens alpha-crystallin: function and structure. *Eye (Lond).* 1999;13:403-408.
  62. Nahomi RB, Pantcheva MB, Nagaraj RH. αB-crystallin is essential for the TGF-β2-mediated epithelial to mesenchymal transition of lens epithelial cells. *Biochem J.* 2016;473:1455-1469.
  63. Liu M, Ke T, Wang Z, et al. Identification of a CRYAB mutation associated with autosomal dominant posterior polar cataract in a Chinese family. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:3461-3466.
  64. Bellaye PS, Wettstein G, Burgy O, et al. The small heat-shock protein αB-crystallin is essential for the nuclear localization of Smad4: impact on pulmonary fibrosis. *J Pathol.* 2014;232:458-472.
  65. Andley UP. Crystallins in the eye: function and pathology. *Prog Retin Eye Res.* 2007;26:78-98.

## **LEBENS LAUF**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

**PUBLIKATIONSLISTE**

Publikation 1:

**Wernecke L**, Keckeis S, Reichhart N, Strauß O, Salchow DJ. Epithelial-Mesenchymal Transdifferentiation in Pediatric Lens Epithelial Cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2018;59(15):5785-94. doi:<https://doi.org/10.1167/iovs.18-23789>

Impact Faktor zum Zeitpunkt der Einreichung: 3,388

Publikation 2:

Keckeis S, **Wernecke L**, Salchow DJ, Reichhart N, Strauß O. Activation of a Ca(2+)-dependent cation conductance with properties of TRPM2 by reactive oxygen species in lens epithelial cells. Exp Eye Res. 2017;161:61-70.

doi: <https://doi.org/10.1016/j.exer.2017.06.006>

Impact Faktor zum Zeitpunkt der Einreichung: 3,332

Publikation 3:

**Wernecke L**, Keckeis S, Reichhart N, Strauß O, Salchow DJ. Nachstar bei Kindern – Molekulargenetische Analyse kindlicher Linsenzellen. Posterpräsentation auf dem 113. Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG) 2015, Berlin.

## DANKSAGUNG

Ein besonderer Dank gilt **Prof. Dr. med. Salchow** und **Prof. Dr. rer. nat. Strauß**, die mich auf meinem wissenschaftlichen Weg begleitet haben. Dabei gelang es ihnen, mich mit ihrer Erfahrung und ihrem Enthusiasmus für die Ophthalmologie zu begeistern. Ihre entgegengebrachte Hilfe sowie die zahlreichen konstruktiven Gespräche haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin möchte ich **Prof. Dr. med. Bertelmann** für die gute Zusammenarbeit und das Bereitstellen von Patientenmaterial danken.

Ganz herzlich bedanke ich mich auch beim Laborteam, insbesondere bei **Dr. med. Nadine Reichhart** sowie **Dr. rer. nat. Susanne Keckeis**, für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, helfenden Ratschläge und wertvollen Diskussionen.

Ein weiteres Dankeschön gilt meinen engsten Freunden, die für den nötigen Ausgleich gesorgt haben sowie Dennis für Geduld, Verständnis und den liebevollen Rückhalt.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, besonders meinen Eltern Lutz und Diana Wernecke sowie meiner Tante Sonja Wernecke: Danke für die stetige Förderung und eure uneingeschränkte Unterstützung.