

Aus der Klinik für Augenheilkunde
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. Berthold Seitz

Charakterisierung der Epithelzelllinie HCE-T (RCB 2280) im Vergleich zu primären Limbusepithelzellkulturen sowie primären Korneaepithelzellen

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2018

vorgelegt von: Anna-Klara Magdalena Rubelowski

geb. am 19.02.1996 in Datteln

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Zusammenfassung	3
1.1 Summary	5
2 Einleitung	7
2.1 Anatomie und Funktion der Kornea	7
2.2 Limbusepithelzellen (LEZ)	7
2.3 Humane primäre Korneaepithel-Zellen (pCEZ).....	8
2.4 HCE-T Zelllinie.....	9
2.5 Konjunktiva	9
2.6 Augenoberflächenentzündungen (Ocular surface diseases; OSD)	10
2.7 Zielgene als Differenzierungsmarker	11
2.7.1 Keratin- und Zellverbindungsmarker	12
2.7.2 Stammzell- und Differenzierungsmarker	13
2.7.3 Weitere untersuchte Marker	14
2.8 Zielsetzung	15
3 Material und Methoden	16
3.1 Materialien.....	16
3.2 Methoden.....	19
3.3 Zellkulturen	19
3.3.1 Kultivierung der Limbusepithelzellen (LEZ).....	19
3.3.2 Kultivierung der primären Korneaepithel-Zellen (pCEZ).....	20
3.3.3 Humane Korneaepithel-Zelllinie (HCE-T).....	20
3.3.4 Passagieren der Zellkulturen (LEZ, pCEZ und HCE-T)	20
3.3.5 Ernten der Zellkulturen (LEZ, pCEZ und HCE-T)	20
3.4 RNA- und Proteingewinnung	21
3.4.1 RNA-Integrität.....	21
3.4.2 Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR).....	21
3.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford.....	23
3.4.4 Western Blot.....	23
4 Ergebnisse	25
4.1 RNA-Integrität.....	25
4.2 Keratin- und Zellverbindungsmarker	26
4.3 Stammzell- und Differenzierungsmarker	27
4.4 Weitere untersuchte Marker	29
5 Diskussion	30
5.1 Korneale Differenzierung in LEZ, pCEZ, HCE-T und HCE-T/KSFM.....	30

5.2	Einfluss des Mediumwechsels.....	31
5.3	Konjunktivamarker.....	32
5.4	Stammzellmarker.....	32
5.5	HCE-T Phänotyp.....	33
5.6	Schlussfolgerungen.....	34
	Literaturverzeichnis.....	35
	Abbildungsverzeichnis.....	39
	Publikation.....	40
	Danksagung.....	41

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
BPE	Bovine Pituitary Extract
cDNA	Komplementäre DNA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DANN	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epithel growth factor
FC	Fold Change
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gewichtskraft oder Gramm
HCE-T	Humane Korneaepithel-Zelllinie
HCE-T/KSFM	HCE-T in KSFM
IST	Insulin, Transferrin und Selenium
kDa	Kilodalton
KSFM	Keratinocyten Serumfreies Medium
LEZ	Limbusepithelzellen
ml	Milliliter
Min	Minuten
mm	Millimeter
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
nm	Nanometer
OSD	Augenoberflächenentzündungen (Ocular surface diseases)
PBS	Phosphate buffered Saline
pCEZ	Primäre Korneaepithel-Zellen
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate

TAC	Transient amplifizierende Zellen
TBP	Tata binding protein
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
°C	Grad Celsius
%	Prozent

1 Zusammenfassung

Ziel: Die korneale HCE-T Zelllinie ist aktuell ein akzeptiertes Modell für pharmakologische Versuche über Barriereigenschaften und Toxizität von Medikamenten. Es ist bisher wenig über die Differenzierung der HCE-T Zelllinie bekannt. Diese Zelllinie sollte die gleiche Differenzierung wie das korneale Ursprungsgewebe widerspiegeln. Daher wird die HCE-T Zelllinie in dieser Arbeit auf mRNA und Proteinebene charakterisiert. Diese Daten wurden mit differenzierten primären Korneaepithel-Zellen und Limbusepithelzellen verglichen. Ziel war es, ein besseres Verständnis der Korneaepithel-Zellen und deren Differenzierungsprozess zu gewinnen, um zu klären, ob an dieser Zelllinie weitergehende in vitro Versuche zu den Differenzierungsprozessen des Hornhautepithels durchgeführt werden können.

Methoden: Die HCE-T Zelllinie ist kommerziell erwerblich bei dem RIKEN-Institut (RCB 2280). Die unterschiedlichen Passagen der Zelllinie wurden zum einen in einem Standardmedium mit fetalem Kälberserum (HCE-T) und zum anderen in einem serumfreien Medium kultiviert (HCE-T/KSFM). Die primären Korneaepithel-Zellen (pCEZ) und die limbalen Epithelzellen (LEZ) wurden durch eigene Präparation von Spenderhornhäuten der LIONS Hornhautbank Saar-Lor-Lux Trier/Westpfalz der Augenklinik des Universitätsklinikums Homburg/Saar, Deutschland, gewonnen und in serumfreiem Medium kultiviert. Mit der quantitativen Polymerasenkettenreaktion wurde die mRNA-Expression von den Keratin- und Zellverbindungsmarkern Keratin 3 (KRT3), Keratin 12 (KRT12), Desmoglein 1 (DSG1), Keratin 13 (KRT13) und Keratin 19 (KRT19), den Stammzell- und Differenzierungsmarkern Paired box Gen 6 (PAX6), Aldehyddehydrogenase 1 Mitglied A1 (ALDH1A1), Alkoholdehydrogenase 7 (ADH7), Tumorprotein 63 (TP63) und ATP-binding cassette subfamily G Mitglied 2 (ABCG2) und die weiteren untersuchten Marker Cathepsin V (CTSV1), Serinprotease kazal Typ 7 (SPINK7) und Dickkopf WNT-Reaktionsweg Inhibitor 1 (DKK1) bestimmt. Zusätzlich wurden die Proteinlevel von KRT 3, KRT 12, DSG1 und PAX6 mit Western Blot Versuchen analysiert.

Ergebnisse: Die mRNA-Expression der Keratin- und Zellverbindungsmarker KRT3, KRT12, DSG1, KRT13 und KRT19 der pCEZ waren verglichen mit der HCE-T Zelllinie und den LEZ höher exprimiert. In den pCEZ war die mRNA-Expression am höchsten. Diese Tendenz zeigt sich auch in den Expressionsdaten der Stammzell- und Differenzierungsmarker PAX6, ALDH1A1, ADH7 und TP63. Ausgenommen ist das ABCG2, welches die niedrigste mRNA-Expression in den pCEZ aufwies. Die weiteren untersuchten Marker CTSV1 und SPINK7, außer dem DKK1, weisen ebenfalls die zunehmende Expression in der Reihenfolge HCE-T < HCE-T/KSFM < LEZ < pCEZ auf. Das KRT3- und KRT12-Protein konnte in den HCE-T und den LEZ als schwach sichtbare Bande detektiert werden. Das stärkste Signal wurde in den pCEZ Proben gemessen. DSG1 konnte nur in den pCEZ detektiert werden. Die PAX6 Proteinexpression war in den LEZ und den pCEZ nachweisbar.

Schlussfolgerungen: Die Expressionsdaten zeigen, dass die HCE-T Zelllinie einen undifferenzierten Phänotyp in Bezug auf die untersuchten Marker aufweist. Um die Differenzierungsprozesse der Hornhautepithelzellen zu untersuchen, ist die HCE-T Zelllinie nicht geeignet, da große Unterschiede in der Expression zwischen der Zelllinie und den pCEZ bestehen. Für Studien über Differenzierungsprozesse des Hornhautepithels sollte nach einer Optimierung der Kultivierung von primären differenzierten Zellen gesucht oder die LEZ zur Differenzierung getriggert werden.

1.1 Summary

Characterization of the HCE-T cell line (RCB 2280) and its comparison with primary limbal epithelial cell culture and primary corneal epithelial cells

Purpose: The HCE-T cell line is actually used as an accepted model for pharmacological barrier and toxicity tests. However, to date there is not much information on differentiation of the HCE-T cell line. The cell line should possess a similar differentiation status as the original corneal tissue. Therefore, we characterized the HCE-T cell line at mRNA and protein level. This was also performed for differentiated primary corneal epithelial and limbal epithelial cell cultures. Our purpose was to have a better understanding of corneal epithelial cells and their differentiation processes, in order to clarify if the HCE-T cell line could serve as a tool for in vitro experiments on differentiation processes.

Methods: HCE-T cell line is available commercially at RIKEN institute (RCB 2280). Its different passages were cultured in standard medium with fetal calf serum (HCE-T) and in serum free medium (HCE-T/KSFM). Primary corneal epithelial cells (pCEZ) and limbal epithelial cells (LEZ) were obtained from donor corneas of the LIONS Cornea Bank, Saar-Lor-Lux Trier/Westpfalz at the Department of Ophthalmology of Saarland University Medical Center, Homburg/Saar, Germany, and were cultured in serum free medium. Quantitative polymerase chain reaction was used to measure mRNA expression of the keratin markers and adhesion markers keratin 3 (KRT3), keratin 12 (KRT12), desmoglein 1 (DSG1), keratin 13 (KRT13) and keratin 19 (KRT19), the stem cell markers and differentiation markers paired box gene 6 (PAX6), aldehyde dehydrogenase 1 member A1 (ALDH1A1), alcohol dehydrogenase 7 (ADH7), tumor protein 63 (TP63) and ATP-binding cassette subfamily G member 2 (ABCG2), and the “other markers” cathepsin V (CTSV1), serine peptidase kazal type 7 (SPINK7) and dickkopf wnt-pathway inhibitor 1 (DKK1). KRT3, KRT12, DSG1 and PAX6 protein levels were analyzed using Western blot.

Results: KRT3, KRT12, DSG1, KRT13 and KRT19 mRNA expression was higher in pCEZ as in LEZ and HCE-T cells. The mRNA expression was the highest in pCEZs. The same tendency could be observed regarding PAX6, ALDH1A1, ADH7 and TP63 stem cell/ transcription marker mRNA expression. ABCG2 expression (stem cell marker) was an exception, as its mRNA expression was in pCEZs the lowest. CTSV1 and SPINK7 mRNA expression showed an increasing mRNA expression from HCE-T < HCE-T/KSFM < LEZ < to pCEZ, but DKK1 did not. KRT3 and KRT12 protein expression was hardly detected in HCE-T and LECs. The strongest signal was detected in pCEZ samples. DSG1 protein expression was only detected in pCEZs. PAX6 protein expression was detectable in LEZs and pCEZs.

Conclusions: The HCE-T cell line has an undifferentiated phenotype, regarding the investigated markers. The HCE-T cell line is not suitable to study the differentiation processes of the corneal epithelium, as the expression pattern of pCEZs and HCE-T differs. To study the corneal epithelial

differentiation processes, a primary corneal epithelial cell culture should be optimized or LEZ differentiation should be triggered.

2 Einleitung

2.1 Anatomie und Funktion der Kornea

Die Kornea als vorderste Begrenzung des Augapfels hat zwei wichtige Aufgaben: Zum einen stellt die Hornhaut eine mechanische Barriere dar und zum anderen ist die Hornhaut mit +43 Dioptrien Brechkraft ein wichtiger Bestandteil des Sehapparats. Die avaskuläre, klare Kornea weist durchschnittlich einen Durchmesser von 12 mm und eine Dicke von 520 µm auf. Der fünfschichtige Aufbau der Kornea setzt sich aus dem oberflächlichen Epithel, welches durch die Bowman-Lamelle begrenzt wird, dem Stroma, welches von der Descemet-Membran begrenzt wird, und dem Endothel zusammen. Daran schließt sich die vordere Augenkammer mit dem Kammerwasser an. Das Korneaepithel ist rundherum begrenzt durch den kornealen Limbus, der den Übergangsbereich zwischen dem Korneaepithel und der Bindehaut des Auges bildet.

2.2 Limbusepithelzellen (LEZ)

Richtung Peripherie ist die Kornea begrenzt durch den Limbus des Auges, welcher die Limbusepithelzellen beinhaltet. In dem Bereich des Limbus werden die Limbusstammzellen lokalisiert ^{1,2}. Die Limbusstammzellen sitzen im Bereich des Limbus in der Basalschicht der epithelialen Papillen der Vogt'schen Pallisaden ³. Die Limbusstammzellen führen zur Regeneration des Korneaepithels durch Proliferation, Migration und Differenzierung ⁴. Die Limbusstammzellen bilden transient amplifizierenden Zellen (TAC), die mehrere Mitosen zur Amplifizierung durchlaufen ⁴. Aus den TAC entstehen postmitotische Zellen und aus diesen wiederum die endgültig differenzierten Zellen ⁴.

Durch die Lokalisation der Limbusepithel- und Limbusstammzellen rund um die Kornea verhindern diese Zellen ein Eindringen von konjunktivalen Zellen in die Kornea ⁵ und bilden dadurch eine Barriere zwischen dem kornealen Epithel und den konjunktivalen Zellen ⁶.

Limbusstammzellinsuffizienz

Mehrere Wege führen zum pathologischen Zustand der Stammzellinsuffizienz (siehe **Tabelle 1**). Eine äußere (mechanische) Schädigung der Zellen oder Mutationen können zu einer Dysfunktion oder Destruktion der Limbusstammzellen führen ⁷. Patienten weisen ein weites Spektrum an Symptomen in Folge der gestörten epithelialen Wundheilung auf. Häufig haben die Patienten gemischte Bindehautinjektion, Schmerzen, sind lichtempfindlich und können Blepharospasmen entwickeln ⁷. Die Sehschärfe ist häufig schwer herabgesetzt.

Table 1. Erkrankungen der Kornea, die mit einer Stammzellinsuffizienz einhergehen ⁸.

Verlust der Stammzellpopulation durch Zerstörung	<ul style="list-style-type: none"> a. Verätzungen oder Verbrennungen b. Steven-Johnson-Syndrom c. Lyell Syndrom d. Kontaktlinsen induzierte Keratopathie e. Viele Operationen oder Cryotherapien des Limbus f. Virale oder bakterielle Infektionen
Fehlfunktionen der epithelialen Stammzellen oder der Stammzellnische	<ul style="list-style-type: none"> a. Anirdie (vererbt) b. Keratitis c. Neurotrophe Keratopathie d. Periphere Entzündung, Ulcus oder chronische Limbitis

2.3 Humane primäre Korneaepithel-Zellen (pCEZ)

Das Korneaepithel ist die äußerste Schicht der Hornhaut des Auges. Es besteht aus 5-6 Schichten mehrschichtigen Epithels, das eine Dicke von insgesamt 40-60 µm hat ⁹. Die Dicke nimmt in Richtung des Limbus zu ⁹. Das Korneaepithel besitzt ein gewebsspezifisches Expressionsmuster der Differenzierungsmarker. Beispielsweise wurde an Mauskorneas festgestellt, dass, zu dem Zeitpunkt wenn sich das Epithel anfängt zu schichten, die Expression von Keratin 12 in dem Korneaepithel, nicht aber in den Limbusepithelzellen, ansteigt ¹⁰. Das Epithel stellt durch Desmosomen und Tight junctions eine physikalische Barriere dar ¹¹. Im Falle von oberflächlichen Verletzungen kann das Korneaepithel durch Zellproliferation, Migration und Differenzierung der Limbusstammzellen narbenlos abheilen ^{7,11}. Neuere Arbeiten deuten darauf hin, dass differenzierte Korneaepithel-Zellen ebenfalls zu Limbusstammzellen mit deren Gewebeeigenschaften und Genexpressionen dedifferenzieren können ¹².

Korneamodelle

Da das Epithel die Hauptbarriere der Hornhaut darstellt, basieren viele Zellmodelle zur Korneapermeabilität auf Epithelzellkulturen. Aktuell werden Primärkulturen, immortalisierte Zelllinien und 3D-Kulturen als unterschiedliche Modelle für Korneapermeabilitätstests genutzt. Diese werden hauptsächlich zur Untersuchung von Barriere-, Toxizitäts- und Medikamentenstudien verwendet ¹³⁻¹⁵.

2.4 HCE-T Zelllinie

Die humane korneale HCE-T Zelllinie wurde 1995 von Araki Sasaki et al. hergestellt, indem Hornhautepithelgewebe einer 49-jährigen Frau, die an einem Nasennebenhöhlenkarzinom verstorben war, durch eine SV40-Adenovirus Behandlung immortalisiert wurde¹⁶. Zur Verifizierung der Stabilität der Zelllinie wurde gezeigt, dass die Zellen nach über 7 tägiger Kultivierung weiterhin korneaspezifisches 64 kDa Zytokeratin (KRT3) exprimieren und dass ebenfalls die Aldehyddehydrogenase-Aktivität konstant bleibt¹⁶. Somit wurde von dieser Arbeitsgruppe geschlossen, dass die Zelllinie die Eigenschaften des Ursprungsgewebes widerspiegelt¹⁶.

Morphologie, Differenzierung, Permeabilitäts- und Toxizitätsversuche

Seit der Herstellung der Epithelzelllinie wurden viele Studien mit einem Focus auf Permeabilität und Toxizität von Medikamenten an der Zelllinie durchgeführt. Reichl et al. verglichen die Zelllinie mit anderen Zellkulturmodellen (CEPI, SIRC), primären Kulturen (HCEpiC) und weiteren kommerziellen Kulturen (RHC, Epiocular). Sie stellten fest, dass die HCE-T Zelllinie am besten geeignet ist um Tierexperimente an Korneas abzulösen¹⁷. Eine andere Arbeitsgruppe kam zu dem Ergebnis, das aufgrund der hohen Anzahl von Zellverbindungen wie Desmosomen und tight junctions die Zelllinie gut für Versuche zur Permeabilität von Medikamenten geeignet ist, was ihre weite Verbreitung in Laboren erklärt¹³. Becker et al. stufte die HCE-T Zelllinie in Bezug auf Morphologie und Permeabilität undifferenzierter als andere Korneamodelle ein¹⁸. Es stellte sich auch heraus, dass die Toxizitätsstudien an der Zelllinie schwierig vom Modell auf das menschliche Auge zu übertragen sind¹⁹.

Genetische Stabilität

Eine Zelllinie sollte über einen langen Zeitraum die Eigenschaften des Ursprungsgewebes beibehalten und von wenigen Eigenschaftsveränderungen gekennzeichnet sein. Auf genetischer Ebene wurde die HCEC-T Zelllinie von Yamasaki et al. untersucht. Die Array-CGH-Analyse dieser Arbeitsgruppe zeigt, dass die Zelllinie genomisch von normalen Korneaepithel-Zellen abweicht. Außerdem stellten sie fest, dass die Zelllinie aus einer Mischung heterogener Zellsubpopulationen besteht²⁰. Eine weitere Studie untersuchte die Auswirkungen von unterschiedlichen Kultivierungsformen (Monolayer, air-lifted-Kultur und 3D-Kultur) auf die Gen-Expression mit dem Ergebnis, dass die unterschiedlichen Kultivierungsformen keinen Effekt auf die Expression bewirkten¹⁹.

2.5 Konjunktiva

Die Konjunktiva überzieht als Tunica conjunctiva palpebrarum die Rückseite des Lids und als Tunica conjunctiva bulbi weiter bis zum Limbus des Auges⁹. Die Konjunktivaoberfläche setzt sich aus den Konjunktivaepithelzellen und den Becherzellen, die den Mukus zur Tränenfilmstabilisation produzieren zusammen²¹.

2.6 Augenoberflächenentzündungen (Ocular surface diseases; OSD)

Viele Krankheiten können eine OSD bedingen und eine komplexe Interaktionen von unterschiedlichen Komponenten der Augenoberfläche machen die Diagnostik schwierig ²². Klinisch manifeste Zeichen einer OSD sind punktförmige, fadenförmige Keratopathien, wiederholte Korneaerosionen oder Konjunktividen ²².

Die Pathogenese einer OSD ist vielfältig und wird von nicht beeinflussbaren Faktoren wie dem Alter, Autoimmunerkrankungen und Hormonen beeinflusst ²³. Krankheiten, die beispielsweise zu einer OSD führen, sind kontaktlinseninduzierte Keratopathie, bakterielle Konjunktivitis, Aniridie, viele chirurgische Eingriffe am Auge, Neoplasien, die eine Limbusstammzellinsuffizienz hervorrufen, das Stevens-Johnson oder das Lyell-Syndrom, chemische und thermische Verletzungen, die eine Insuffizienz von Limbus und Konjunktiva zu Folge haben ²¹.

Durch einen Untergang der Stammzellen kommt es zu einem veränderten Hornhautepithel: Bei schweren Formen der OSD wurde ein Fehlen von KRT12 und PAX6 in den veränderten Epithelien nachgewiesen ²⁴. Zusätzlich zeigten experimentelle Manipulationen von PAX6, dass diese eine Reduktion von KRT3 und KRT12 in Korneaepithel-Zellen zur Folge hatte ²⁵. Die veränderte Genexpression von PAX6, KRT3 und KRT12 wurde auch in Zusammenhang mit der Aniridie assoziierter OSD gebracht, welche mit einer Limbusstammzellinsuffizienz einhergeht ²⁵⁻²⁷.

Die Therapiemöglichkeiten sind schwierig, da eine Entfernung des abnormalen Epithels häufig zu einer Reinvansion des abnormalen Hornhautepithels führt ²¹. Zum Therapiemanagement gehört eine Elimination von Exzerbationsfaktoren, eine Tränenfilmsubstitution, entzündungshemmende Medikamente in Form von Augentropfen und therapeutische Kontaktlinsen ²².

2.7 Zielgene als Differenzierungsmarker

Um ein Expressionsprofil über die kornealen Differenzierungsmarker und pathophysiologisch wichtigen Marker, welche bei OSD verändert sein können, anzulegen, wurden die folgenden Zielgene (**Abbildung 1**) untersucht.

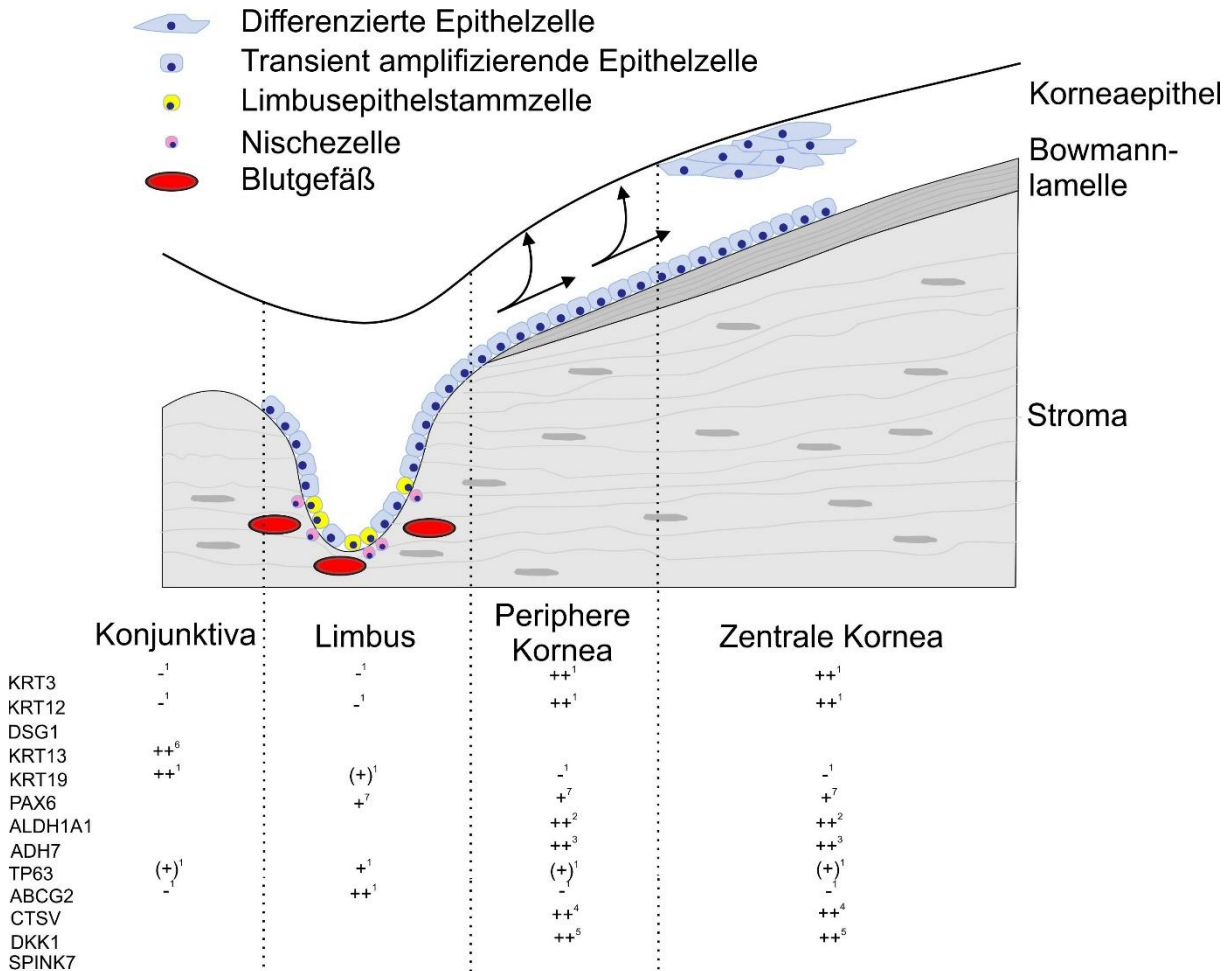


Abbildung 1. „Schematische Darstellung der Stammzellnische“: Die Entwicklung der Limbusstammzellen zu differenziertem Korneaepithel wird gezeigt. Die epithelialen Limbusstammzellen sind am Boden der Vogt’schen Papillen lokalisiert. Die postmitotischen differenzierten Zellen wandern über die periphere Kornea in Richtung des Zentrums und bilden dort eine basale und oberflächliche Schicht.

Darunter abgebildet ist die semiquantitative Genexpression in den verschiedenen Geweben Konjunktiva, Limbus und Kornea. (- keine Expression, (+) schwache Expression, + Expression, ++ sehr hohe Expression). (Adacbi et al. 1998⁴; Davis 2003⁸; Kitazawa et al. 2017⁷; Labrecque et al. 1995²; Nakatsu et al. 2011⁵; Ramirez-Miranda et al. 2011⁶; Satre, Žgombić-Knight, and Duester 1994³; Schlötzer-Schrehardt and Kruse 2005¹)

2.7.1 Keratin- und Zellverbindungsmarker

Humanes Keratin 3 (KRT3) und humanes Keratin 12 (KRT12)

Beide Keratine (KRT3 und KRT12) sind spezifische Marker für das *Korneaepithel*. Keratin 3 und Keratin 12 sind Mitglieder der Familie der Keratin-Gene. Das KRT3 gehört zu den Typ II und das KRT12 zu den Typ I Zytokeratinen. Die Keratine 3 und 12 sind für die epitheliale Stabilität von Bedeutung, da das spezifische Zytoskelett des Korneaepithels daraus aufgebaut wird ^{34,35}.

Pathophysiologisch relevant sind die beiden Keratine bei epithelialen Defekten, die bei OSD auftreten. In diesen Fällen sind die Marker reduziert oder sogar nicht mehr nachweisbar. Sowohl in Aniridie-Mausmodellen und bei humanen OSD stellte sich heraus, dass die Expression von KRT12 und PAX6 fehlt ³⁶. Zudem führte eine experimentelle Runterregulation des PAX6 zu einer starken Reduktion von KRT3 und KRT12 in Korneaepithel-Zellen ^{25,37,38}, wodurch ein instabiles Epithel entstand.

Nicht nur in der Pathophysiologie der OSD, sondern auch bei Dystrophien der Hornhaut, spielen die Keratine 3 und 12 eine Rolle. Die Meesmann'sche Hornhautdystrophie beruht auf einer genetischen Mutation in den kodierenden Genabschnitten des KRT3 oder des KRT12 ^{34,35,39,40}.

Humanes Keratin 13 (KRT13) und humanes Keratin 19 (KRT19)

Keratin 13 ist ein spezifischer Marker für *Konjunktivzellen*, da es verstärkt in diesem Zelltyp exprimiert wird ³³. Das Protein kodierende KRT13 Gen gehört zu der Familie der Keratin-Gene. Als Part der Intermediärfilamente sorgt das KRT13 für strukturelle Integrität des Epithels.

Das KRT19 gehört zu den präferenziell exprimierten Transkripten in der Konjunktiva ³³ und ist zusammen mit KRT13 ein Marker-Gen für die *Konjunktiva* ⁵. Als Mitglied der Keratin-Gen Familie kodiert das KRT19 für Intermediärfilament-Proteine und trägt zur Integrität des Epithels bei. Es ist das kleinste Typ I Zytokeratin dieser Familie. Eine gemeinsame Expression von KRT12 und KRT19 wurde in Zellen rund um den Limbus und der peripheren Kornea gefunden ³³.

Durch eine höhere Expression des KRT13 als KRT19, soll es ein besserer Marker für Zellen der Konjunktiva sein als Keratin 19 ³³. Da KRT13 stärker und vermutlich spezifischer exprimiert wird als KRT19, gilt dieser Marker als Hauptmarker für Konjunktivzellen. Dennoch gelten beide Gene (KRT13 und KRT19) gemeinsam als die am meisten akzeptierten Marker zur Identifikation von Bindehautzellen ⁵.

Humanes Desmoglein 1 (DSG1)

DSG1 ist Mitglied der Desmogleinprotein-Familie. Desmogleine sind Cadherin-ähnliche-Transmembranglykoproteine, die hauptsächlich in den Desmosomen lokalisiert sind. Als tight junction ist die Funktion dieses Proteins die Zelladhäsion. In *Aniridie*-Mausmodellen (oder bei *OSD*) findet man eine reduzierte Expression des DSG1-Proteins ²⁵.

2.7.2 Stammzell-und Differenzierungsmarker

Humanes Paired Box Gene 6 (PAX6)

PAX6 gehört zu der Familie der gewebspezifischen Pax-Transkriptionsfaktoren und besitzt zwei DNA-bindende Domänen (Homeo- und Pairedomäne)⁴¹. Entdeckt wurde es 1995 von Walter Gehring. Es existieren zwei Isoformen in den zwei Größen: 46 kDa (a) und 48 kDa (b)⁴². PAX6 ist an der Augenentwicklung während der Embryogenese in der 6. bis 12. Woche beteiligt⁴³. Eine veränderte Menge des PAX6-Transkripts führt zu multiplen Pathophysiologien (*Aniridie und weitere OSD*) des Auges mit der Folge, dass die Kornea verändert ist^{44,45}.

Das PAX6 Gen wurde auch durch positionelle Klonierung mit Aniridie assoziiert (M.Hanson et al. 1993). Es wurde gezeigt, dass PAX6 die Transkription von KRT12 steuert^{36,45,47}, welches an der epithelialen Integrität des Korneaepithels beteiligt ist.

Humane Aldehyddehydrogenase 1 Familienmitglied A1 (ALDH1A1)

Als Mitglied der Aldehyddehydrogenasen Familie spielt das Gen eine Rolle in dem Reaktionsweg des Alkoholmetabolismus. In der Kornea katalysiert diese Isoform der Aldehyddehydrogenase im Retinolstoffwechsel all-cis zu all-trans Retinol²⁸. Im *Korneaepithel* ist ALDH1A1 höher exprimiert als in Zellen der Konjunktiva⁴⁸.

Humane Alkoholdehydrogenase 7 (ADH7)

Das ADH7, als Mitglied der Familie der Alkoholdehydrogenase, metabolisiert Substrate des Ethanol-/Retinolstoffwechsels und ist an der Lipidperoxidation beteiligt. ADH7 wurde 1994 charakterisiert und identifiziert als die Retinoldehydrogenase, die sehr aktiv am Retinolstoffwechsel beteiligt ist²⁹. Das ADH7 ist in dem *Korneaepithel* höher exprimiert als in der Konjunktiva⁴⁸. In einer Studie zeigte sich, dass bei einer gestörten Epitheldifferenzierung und artifizieller Runterregulation von PAX6 das ADH7 ebenfalls runterreguliert ist⁴⁹.

Humanes Tumorprotein 63 (TP63)

Dieses Gen ist Mitglied der p53-Familie der Transkriptionsfaktoren. Durch alternatives Spleißen und Verwendung alternativer Promotoren existieren viele Isoformen. TP63 wurde als *Stammzellmarker* der Limbusstammzellen identifiziert^{6,50}. Bei Schäden des Korneaepithels migrieren TP63-positive Zellen aus dem Limbusbereich zum Bereich des zentralen Korneaepithels und tragen zur epithelialen Regeneration bei⁵¹.

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

Die Familie des ABCG2 ist die Großfamilie der ATP-bindenden ABC-Transporter. Die ABC-Transporter befinden sich membranständig in extra- und intrazellulären Membranen. Das ABCG2 wird

vermehrt im Vergleich zu differenzierten Epithelzellen in epithelialen Stammzellen exprimiert und gilt deswegen als *Stammzellmarker* der Limbusstammzellen^{6,52}.

2.7.3 Weitere untersuchte Marker

Humanes Cathepsin V (CTSV)

CTSV ist Mitglied der C1 Peptidasen Familie. Das kodierte Protein des CTSV-Gens ist eine lysosmale Zysteinprotease. CTSV als Protein wurde aus *Korneaepithel* isoliert und ist in diesem Gewebe die am stärksten vertretende Proteinase³⁰.

Humaner Serinprotease-Inhibitor Kazal Typ 7 (SPINK7)

Der SPINK6-Protease Inhibitor inhibiert die Kallikreinprotease, welche eine wichtige Rolle für die epitheliale Regeneration spielt^{53,54}. SPINK7, das ein Verwandter des SPINK6 ist, könnte die gleiche Funktion in der *Korneaepithel*-Homöostase erfüllen. Bei *Aniridie* assoziierter Keratopathie haben wir in einer Studie herausgefunden, dass SPINK7 in den betroffenen LEZ runterreguliert ist⁴⁹.

Humaner Dickkopf WNT-Reaktionsweg Inhibitor 1 (DKK1)

Dieses Gen ist Teil der Dickkopf-Familie und spielt eine Rolle im WNT-Reaktionsweg. Die Dickkopf-Familie ist in die WNT-β-Catenin-Kaskade involviert, welche an der Differenzierung von Osteoblasten beteiligt ist⁵⁵. Nakatsu et al. fanden heraus, dass die Expression von wnt2, wnt6, wnt11, wnt16b und vier WNT-Inhibitoren (DKK1, WIF1, FRZB, SFRP-5) spezifisch in der limbalen Region vorkommen und wnt3, wnt7a, wnt7b und wnt10 in dem Korneaepithel hochreguliert sind. Das DKK1 war im *Limbus* hochreguliert³¹.

2.8 Zielsetzung

Es ist bisher wenig über die Differenzierung der HCE-T Zelllinie bekannt. Nach unserem Kenntnisstand existiert lediglich eine Studie über die Genexpression von air-lifted HCE-T-Kulturen im Vergleich mit primären Korneaepithel-Zellen, die zu dem Ergebnis kam, dass die kornealen Differenzierungsmarker in der HCE-T Zelllinie runterreguliert sind⁵⁶. Diese erlaubte jedoch keine Einordnung der Expressionsstärke der einzelnen Gene in Relation zu Limbusstammzellen, die ebenfalls einen undifferenzierten Phänotyp haben. Die Proteinexpression wurde in der Arbeit von Greco et al. ebenfalls nicht untersucht. Es wurde bereits gezeigt, dass die HCE-T Zelllinie genetisch variabel ist und Subpopulationen aufweist. Dies kann von Labor zu Labor zu unterschiedlichen Ergebnissen führen, sodass es sinnvoll ist, die im eigenen Labor verwendete Zelllinie eingehender zu prüfen.

Primäres Korneaepithel weist ein gewebsspezifisches Expressionsmuster der mRNA und Proteine auf. Da eine Zelllinie ein möglichst ähnliches Expressionsprofil wie das Ausgangsgewebe widerspiegeln soll, verfolgt diese Arbeit das Ziel die Zelllinie auf mRNA und Proteinebene zu charakterisieren und in Bezug zu primären Korneaepithel-Zellen und Limbusstammzellen zu setzen.

Gleichzeitig soll ein besseres Verständnis der Korneaepithel-Zellen und deren Expressionsprofil aufgezeigt werden, weil viele Krankheiten wie OSD dieses Expressionsmuster verändern können.

Die Limbusstammzellen dienen als weitere Vergleichszellen und sollten unserer Erwartung nach als undifferenzierte Zellen ein anderes Expressionsprofil als die primären Korneaepithel-Zellen sowie die HCE-T Zellen aufweisen. Es soll geklärt werden, ob die Zelllinie HCE-T für in vitro Versuche zum besseren Verständnis der Epithelzellen der Kornea geeignet ist. Zelllinien sind aufgrund ihrer leichteren Handhabung und besserer Kontrolle der Versuchsbedingungen gut für in vitro Versuche geeignet.

Die vorliegende Dissertation verfolgt das Ziel durch eine semiquantitative Beschreibung der Expression der Differenzierungsmarker eine Einordnung der unterschiedlichen Zelltypen (HCE-T, LEZ und pCEZ) untereinander vornehmen zu können. Die Arbeitshypothese der Einteilung sieht folgendermaßen aus: Die LEZ sind die undifferenzierten und die pCEZ sind die differenzierten Referenzzellen. Bei den HCE-T Zellen wird ein Expressionsprofil erwartet, das zwischen den beiden Referenzzelltypen liegt.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Verwendete Zellen

Epithelzelllinie:	HCE-T, Riken-Zellbanknummer 2280
LEZ:	Eigene Präparation von Spenderhornhäuten der LIONS Hornhautbank Saar-Lor-Lux Trier/Westpfalz der Universitätsklinikum des Saarlandes, Klinik für Augenheilkunde, Homburg (Saar)
pCEZ:	Eigene Präparation von Spenderhornhäuten der LIONS Hornhautbank Saar-Lor-Lux Trier/Westpfalz der Universitätsklinikum des Saarlandes, Klinik für Augenheilkunde, Homburg (Saar)

Hergestellte Puffer, Lösungen und Medien

Standardmedium:	DMEM 5 % FCS 1 % ITS 0,5 % DMSO 10 ng/ml EGF
Laemmlinpuffer:	125 mM Tris (pH 6,8) 60 % Glycerin 2,5 % SDS 0.01 % Bromphenolblau 63 µl/ml Mercaptoethanol
2%-Agarosegel:	65 ml TBE-Puffer 1,2 g Agarose 5 µl Ethidiumbromid

Kommerziell erwerbliche Produkte

Tabelle 2. Verwendete Kits.

KIT	Hersteller
Bradford Reagenz	Merck, Darmstadt, Deutschland
One Tag RT-PCR Kit	New England BioLabs, Frankfurt a.M., Deutschland
RNA/DNA/Protein isolation kit (Isolate II)	Bioline, London, UK

Tabelle 3. Puffer, Lösungen und Medien.

Produkte	Hersteller
Agarose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
anti-mouse-/oder anti-rabbit-Blockinglösung Western Froxx	BioFroxx GmbH, Einhausen, Deutschland
anti-mouse-/oder anti-rabbit-Waschlösung Western Froxx	BioFroxx GmbH, Einhausen, Deutschland
anti-mouse-/oder anti-rabbit-Fertiglösung zur Detektion Western Froxx	BioFroxx GmbH, Einhausen, Deutschland
BSA	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Collagenase A	Roche Pharma AG, Reinach, Schweiz
Cryo-SFM	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
DMEM	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenheim, Deutschland
dual-colour-Marker	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Dulbeccos PBS	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenheim, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
FCS	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Glycerin	Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland
ITS	Sigma-Aldrich GmbH Deisenheim, Deutschland
KSFM	Gibco, Carlsbad, USA
RNAse freies Wasser	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
SDS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SYBR-Green	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenheim, Deutschland
Western Froxx Waschlösung	BioFroxx GmbH, Einhausen, Deutschland
Western-Froxx Stripping Puffer 10x	BioFroxx GmbH, Einhausen, Deutschland
Western lightning chemo luminescence Plus ECL Reagenz	PerkinElmer Life Sciences, Waltham, Massachusetts, USA
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenheim, Deutschland
6fach- Ladepuffer	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenheim, Deutschland

Tabelle 4. *Verwendete Geräte.*

Gerät	Hersteller
CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Heraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Geldokumentationssystem, BDA compact	Biometra Analytik Jena, Jena, Deutschland
Imaging System LAS 4000	GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfon, UK
Inkubator HERAcell 240i	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Megafuge Heraeus16R	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Stereolupe OPMI1-FR	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Sterilwerkbank Safe 2020	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Thermocycler CFX Connect	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Thermoblock TB2	Biometra GmbH Analytik Jena, Jena, Deutschland
Trans Blot Turbo Transfer System (high molecular program)	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland

Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Einmalmaterialien, die nicht in nachfolgender Tabelle aufgelistet sind, wurden von Sarsted AG & Co, Nürnberg, Deutschland und von Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland, erworben.

Tabelle 5. *Verbrauchsmaterialien.*

Material	Beschreibung	Hersteller
Stanze	AcuPunch, Größe 1,5 mm	Acuderm, Florida, USA
Cell-Tricks	Maschenweite 20 µm	Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Deutschland
NuPage Bis-Tris SDS Gel	4-12 %ige inkl. MOPS-Puffer	Invitrogen, Waltham, MA, USA

3.2 Methoden

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Versuche bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Versuche an primären humanen Limbusepithelzellen wurden durch die Ethikkommission des Saarlandes (Ethiknummer 226/15) bewilligt.

3.3 Zellkulturen

Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde unter einer Sterilwerkbank mit vertikalem Abzug gearbeitet. Die weitere Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Atmosphäre.

3.3.1 Kultivierung der Limbusepithelzellen (LEZ)

Limbusstammzellpräparation

Zur Präparation der Limbusstammzellen wurde unter der Stereolupe mit 40facher Vergrößerung gearbeitet. Die Zellen des Limbusbereichs (enthält Limbusstammzellen und Limbusepithelzellen) wurden mit einer Stanze herausgestanzt und in 12-Wellplatten mit Kollagenase (5 mg/ml) versetzt. Darin erfolgte eine Inkubation für 12 h in einem Brutschrank. Die Suspension aus der Wellplatte wurde mit einem Cell-Trick gefiltert und mit mindestens 10 ml PBS gespült. Danach wurde der Filter invertiert und mit 2,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung gespült, die Zellsuspension aufgefangen und für 10 min bei 37°C inkubiert. Zwischen den beiden Waschsritten wurde die Suspension gemischt, um die Zellen aus den Zellclustern zu vereinzeln. Zur Inaktivierung des Trypsins wurde dieselbe Menge DMEM mit 5 % FCS verwendet. Nach der Zentrifugation (5 min, 800 g) wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in einem Well einer 24-well-Platte mit KSF-Medium ausgesät. Die weitere Kultivierung erfolgte im Brutschrank.

Medium

Verwendet wurde ein fertig gemischtes serumfreies Medium (KSFM), welches mit EGF und BPE supplementiert wurde. Bis zum Erreichen eines konfluenten Wachstums wurde das Medium alle 3 Tage gewechselt.

3.3.2 Kultivierung der primären Korneaepithel-Zellen (pCEZ)

Die Hornhautzellen wurden unter einer Stereolupe bei 40facher Vergrößerung präpariert. Dazu wurden in einer kleinen Petrischale die Korneas mit dem Epithel nach oben ausgerichtet und mit Hilfe eines Skalpells und einer Pinzette die korneale Epithelschicht abgetragen. Die Epithelschicht wurde in PBS gesammelt. Nach anschließender Zentrifugation und Entfernung des Überstandes wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C tiefgefroren verwahrt.

3.3.3 Humane Korneaepithel-Zelllinie (HCE-T)

Epithelzelllinie HCE-T

Die verwendete Zelllinie wurde 1995 aus dem Kornea-Gewebe einer 49-jährigen Frau mit einem Nasennebenhöhlenkarzinom (Sinus maxillaris) generiert. Die Zellen wurden durch einen rekombinaten SV40-Adenovirus immortalisiert und anschließend kultiviert ⁵⁷.

Medium

Die Kultivierung der HCE-T (Passage 11, 13 und 14) erfolgte in 75 cm² Kulturgewebsflaschen in dem Standardmedium. Zum anderen wurden Zellkulturen der HCE-T (Passage 13, 15 und 16) in dem kommerziell erwerblichen KSF-Medium angelegt.

Bis zum Erreichen einer 90 %igen Konfluenz wurde das Medium alle 3 Tage gewechselt.

3.3.4 Passagieren der Zellkulturen (LEZ, pCEZ und HCE-T)

Kurz vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert um ein weiteres Wachstum und die Nährstoffversorgung zu gewährleisten. Dazu wurde das verbrauchte Medium mit einer Pipette entfernt und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung bedeckt für 5 min bei 37 °C inkubiert, um die adhärent wachsenden Zellen abzulösen. Zur Inaktivierung der Trypsin-EDTA-Lösung wurde dieselbe Menge Medium mit 5 % FCS zur Zellkultur hinzugegeben. Die entstandene Suspension wurde für 5 min bei 800 g zentrifugiert. Danach konnte der Überstand verworfen werden, die sedimentierten Zellen in frischem Medium resuspendiert und in neuen 75 cm² Kulturgewebsflaschen ausgesät werden.

3.3.5 Ernten der Zellkulturen (LEZ, pCEZ und HCE-T)

Das Ernten der Zellen erfolgte wie das Passagieren. Statt die Zellen erneut auszusähen, wurden diese durch anschließende Zentrifugation (5 min, 800 g) pelletiert und in Cryo-SFM aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C tiefgefroren verwahrt.

3.4 RNA- und Proteingewinnung

Zur Gewinnung der RNA- und der Proteinproben wurde pro Probe vier 6-Wells der Limbuszellkultur (LEZ), Präparationen von 5-7 Spenderhornhautpräparationen (pCEZ) und die Hälfte der Zellmenge einer 75 cm² Kulturflasche der Zelllinie HCE-T verwendet. Die RNA und das Protein wurden nach Anleitung des Herstellers mit dem RNA/DNA/Protein isolation kit isoliert. Die RNA wurde in 50 µl und das Protein in 100 µl des Elutions-Puffers eluiert.

3.4.1 RNA-Integrität

Zur Überprüfung der RNA-Integrität wurde die RNA mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Ein Ansatz bestand aus 250 ng RNA, 10 µl H₂O und 4 µl 6fach- Ladebuffer. Dieser wurde in die Taschen eines 2% igen Agarosegels, welches mit Ethidiumbromid versetzt wurde, pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde in der Elektrophorese-Kammer, gefüllt mit TBE-Puffer, bei 130 V für 30 min durchgeführt. Das Gel wurde mit Hilfe eines Geldokumentationssystems fotografiert.

3.4.2 Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentration wurde mit dem Nanodrop 1000, dessen Messverfahren auf UV/Vis-Spektroskopie basiert, gemessen. Die Kalibrierung erfolgte mit 1,5 µl H₂O. Zur Messung wurden 1,5 µl der jeweiligen RNA-Probe mit einer Präzisionspipette auf die untere Messoberfläche pipettiert.

cDNA-Erststrangsynthesen

Die RNA wurde mithilfe des M-MuLV Enzyme Mix aus dem OneTag Kit und oligo-dT Primer in cDNA konvertiert. Dazu wurde pro Ansatz 500 ng Gesamt-RNA eingesetzt und anschließend nach dem Protokoll der Firma NEB die cDNA gewonnen.

Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Tabelle 6. Ansatz für einen Reaktionsmix für die qPCR-Messungen.

Reaktionsmix	Volumen (Gesamtvolumen 20 µl)
Primer (Tabelle 6)	2,5 µl
SYBR-Green	12,5 µl
H ₂ O	5 µl

Für die Experimente wurde eine 96-well-Platte verwendet. Für den Reaktionsmix wurde 1 µl cDNA eingesetzt. Des Weiteren wurde nach Herstellerangaben gearbeitet. Die Amplifikation und Messung erfolgte mit dem Thermocycler CFX Connect unter Verwendung des PCR-Profiles 95 °C für 10 s, 58 °C

für 10 s und 72 °C für 10 s für 44 Zyklen. Ausgenommen war das Keratin 13, das mit einer Annealing Temperatur von 64 °C amplifiziert wurde.

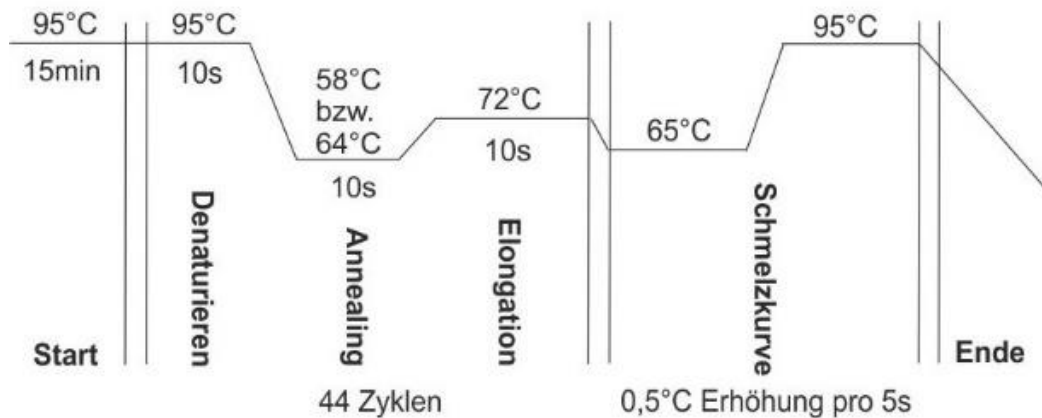


Abbildung 2. „Thermocycler Profil“: Bedingungen der qPCR zur Amplifizierung und quantitativen Messung der cDNA.

Als Referenzgen wurde das TATA binding Protein (TBP) verwendet und jeweils unter denselben Bedingungen gemessen. Die Bio-Rad CFX Manager Software 3.1 wurde zur Analyse genutzt. Zur Ermittlung der differentiellen Expression wurde die $\Delta\Delta C_q$ -Methode gewählt. Aus den vom CFX-Manager ermittelten C_q -Werten wurde mit Excel 2013 die $\Delta\Delta C_q$ -Werte sowie fold change ($2^{\Delta\Delta C_q}$) und \log_2 des fold changes berechnet. Die Graphiken wurden mit GraphPad Prism7 erstellt. Jede qPCR-Messung als Duplikat wurde 5x mit biologischen Replikaten wiederholt (n=5).

Tabelle 6. Verwendete Primer.

Primer	Cat. No	Amplifikationsgröße (bp)
PAX6: NM_000280, NM_001127612, NM_001604, NM_001258462, NM_001258463, NM_001258464, NM_001258465	QT00071169	113 bp
KRT12: NM_000223	QT00011949	104 bp
KRT3: NM_057088	QT00050365	118 bp
DSG1: NM_001942	QT00001617	96 bp
ABCG2: NM_004827, NM_001257386	QT00073206	114 bp
ADH1A1: NM_000689	QT00013286	97 bp
ADH7: NM_000673, NM_001166504	QT00000217	85 bp
CTSV: NM_001201575, NM_001333, XM_006716960	QT00015113	111 bp
DKK1: NM_012242	QT00009093	137 bp
SPINK7: NM_032566	QT00039585	126 bp

<i>KRT13</i> : NM_002274 NM_153490	QT00068747	60 bp
<i>KRT19</i> : NM_002276	QT00081137	117 bp
<i>TP63</i> : NM_001114978, NM_001114979, NM_001114980, NM_001114981, NM_001114982, NM_003722	QT02424051	116 bp
<i>TBP</i> : NM_001172085, NM_003194	QT00000721	132 bp

3.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Mit der Bradford Reagenz wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Die zu messenden Proben (je 2,5 µl) wurden mit 125 µl der Bradford Reagenz gemischt und jeweils in ein Well einer 96-well-Platte pipettiert. Mit einer Wellenlänge von 595 nm wurde die Extinktion gemessen und anhand der mitgeführten Standardkurve die Konzentration berechnet.

3.4.4 Western Blot

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Von den Proteinproben wurden 20 µg Gesamtprotein mit 5fach Laemmli-puffer versetzt. Anschließend wurden die Proben im Thermoblock inkubiert (5 min, 90 °C), um die Proteine zu denaturieren. Das 4-12 %ige NuPage Bis-Tris SDS Gel wurde mit den Proteinproben und dem dual-colour-Marker beladen. Zur Größenauftrennung der Proteine wurde die Elektrophoresekammer mit MOPS-Laufpuffer gefüllt und eine Spannung von 200 Volt für 1 h angelegt.

Western Blot/ Detektion

Das aufgetrennte Protein wurde in der Semi-Dry-Blotkammer auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Anschließend wurde die Membran 3 x 5 min mit der WesternFroxx Waschlösung gewaschen. Die Inkubation mit der gemischten Blocking- und Antikörperlösung (**Tabelle 7**. Verwendete Antikörper) erfolgte über 1 h.

Die verwendeten Antikörper wurden jeweils in der angegebenen Verdünnung (**Tabelle 7**. Verwendete Antikörper) mit anti-mouse-/oder anti-rabbit-Fertiglösung für die Immunodetektion gelöst.

Erneut erfolgte ein Waschschritt: 3 x 5 min waschen mit der Waschlösung.

Zur Detektion wurde die Western lightning chemo luminescence Plus ECL Reagenz benutzt. Die Bilder wurden mit dem Imaging System aufgenommen und mit der kommerziell erwerbliche Software Corel Draw bearbeitet. Jeder Western Blot Versuch wurde an vier unabhängigen Proben wiederholt (n=4). Zur Bestätigung des Einsatzes vergleichbarer Proteinmengen in den verschiedenen Proben wurde zusätzlich das Referenzprotein β-Actin (ACTB) detektiert.

Tabelle 7. *Verwendete Antikörper.*

Antikörper	Katalognummer	Hersteller	Verdünnung
<i>KRT3</i> (anti-Maus)	CBL218	EMD Millipore	1:500
<i>KRT12</i> (anti-Maus)	sc-515882	Santa Cruz Biotechnology	1:200
<i>PAX6</i> (anti-Maus)	Sc-32766	Santa Cruz Biotechnology	1:200
<i>DSG1</i> (anti-Maus)	sc-59904	Santa Cruz Biotechnology	1:200
<i>ACTB</i> (anti-Kaninchen)	A8227	ABCAM	1:5000

4 Ergebnisse

Vor den qPCR Versuchen wurde die RNA-Qualität mittels einer Gelelektrophorese bestimmt. Die Ergebnisse der qPCR wurden dargestellt, um die unterschiedlichen Marker im Vergleich mit den unterschiedlichen Zelltypen darzustellen. In den dargestellten Abbildungen ist die mRNA-Expression als \log_2 fold change (\log_2 FC) aufgetragen. In den Graphen sind die Werte der HCE-T zur Normierung verwendet worden. Für ausgewählte Gene ist zusätzlich ein Western Blot aufgeführt, um einen Vergleich der Proteinexpression mit der mRNA-Expression zu ermöglichen.

4.1 RNA-Integrität

Die Messung der RNA-Integrität ist in **Abbildung 3** (Fluoreszenzaufnahme des 2 %igen Agarosegels der Gelelektrophorese) dargestellt. Aufgetragen wurden je 5 Proben (I-V) der Gesamt-RNA von den jeweiligen Zelltypen. Die verwendeten Proben I-V sind aus unterschiedlichen Präparationen und Passagen entstanden. In allen Proben sind die rRNA-Banden der 28 S- und der 18 S-Untereinheiten zu sehen. Das Verhältnis der beiden Banden zueinander ist circa 2:1 und es sind keine Fragmentierungen der rRNA-Banden zu erkennen. Damit entspricht die aufgetragene RNA einer hohen Qualität und konnte für die folgenden qPCR-Versuche verwendet werden.

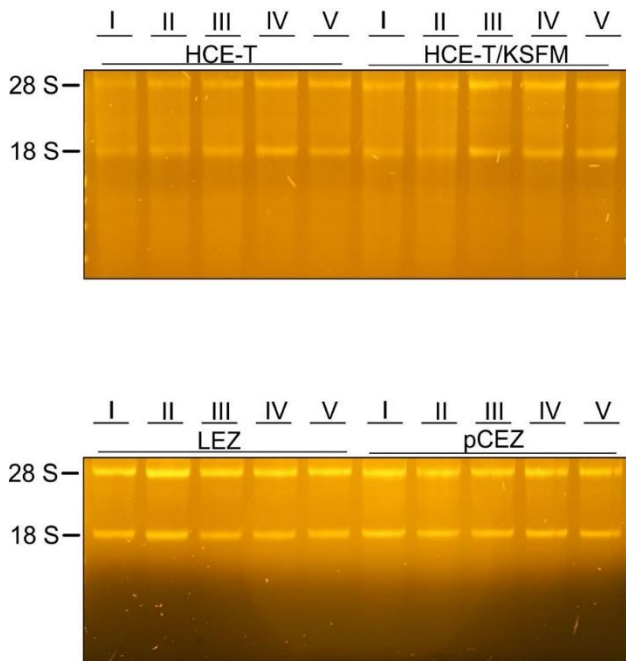


Abbildung 3. „RNA-Integrität“: Fluoreszenzaufnahme der Gelelektrophorese von jeweils fünf Proben der untersuchten Zelltypen (HCE-T, HCE-T/KSFM, LEZ und pCEZ).

4.2 Keratin- und Zellverbindungsmarker

Wie in **Abbildung 4 (A-E)** dargestellt, gibt es einen großen Unterschied zwischen den einzelnen Zelltypen in der Expression der untersuchten Keratinen (**A-E**). LEZ und pCEZ haben eine mehr als tausendfach ($> 10 \log_2FC$) höhere mRNA-Expression als HCE-T und in KSFM kultivierte HCE-T. Die Messungen im Vergleich zwischen LEZ und pCEZ zeigen eine wesentlich höhere Expression in den pCEZ (**Abbildung 4 A-D**). Das KRT19 in **Abbildung 4 E** stellt eine Ausnahme dar, da eine annähernd gleiche Expression zwischen LEZ und pCEZ gemessen wurde.

KRT3

In den Messungen des Keratin 3 zeigte sich ebenfalls ein deutlicher Unterschied. Die HCE-T in KSFM erreichten Werte von $2,5 \pm 1,5 \log_2FC$, die LEZ $13,9 \pm 1,1 \log_2FC$ und die pCEZ $17,7 \pm 1,1 \log_2FC$. Somit zeigen die pCEZ eine 130tausendfach höhere mRNA Expression des KRT3-Gens als HCE-T Zellen. Im Western Blot konnte das stärkste KRT3 Signal in den Proben der pCEZ detektiert werden (**Abbildung 4 A**).

KRT12

Die mRNA Expression der LEZ lag bei $13,9 \pm 2,3 \log_2FC$ und die der pCEZ lag bei $20,7 \pm 1,7 \log_2FC$. Im Western Blot spiegeln sich die unterschiedlichen mRNA Expressionen auf der Proteinebene wieder. Man sieht einen leichten Anstieg der detektierten Signalstärke der Banden für KRT12, wobei die pCEZ-Probe das stärkste KRT12-Signal zeigt (**Abbildung 4 B**).

DSG1

Die DSG1 Expression in den LEZ war $6,6 \pm 2,5 \log_2FC$, wohingegen die pCEZ einen Wert von $13,1 \pm 1,3 \log_2FC$ erreichen. Im Western Blot konnte das DSG1-Protein in den pCEZ detektiert werden (**Abbildung 4 C**).

KRT13

Die mRNA-Expression des KRT13 ist in den HCE-T am niedrigsten. LEZ erreichen einen Wert von $13,8 \pm 2,6 \log_2FC$, dies entspricht circa einer 14.000fach höheren Expression der LEZ im Vergleich zu den HCE-T. Die pCEZ erreichen einen Wert von $19,3 \pm 0,7 \log_2FC$, sodass diese Zellen eine über 600tausendfach höhere mRNA Expression des KRT13 haben als HCE-T Zellen (**Abbildung 4 D**).

KRT19

KRT19 stellt eine Ausnahme in den Keratinmarkern dar. Die Expression ist in den LEZ ($14,9 \pm 1,2 \log_2FC$) und in den pCEZ ($13,7 \pm 0,8 \log_2FC$) annähernd gleich (**Abbildung 4 E**).

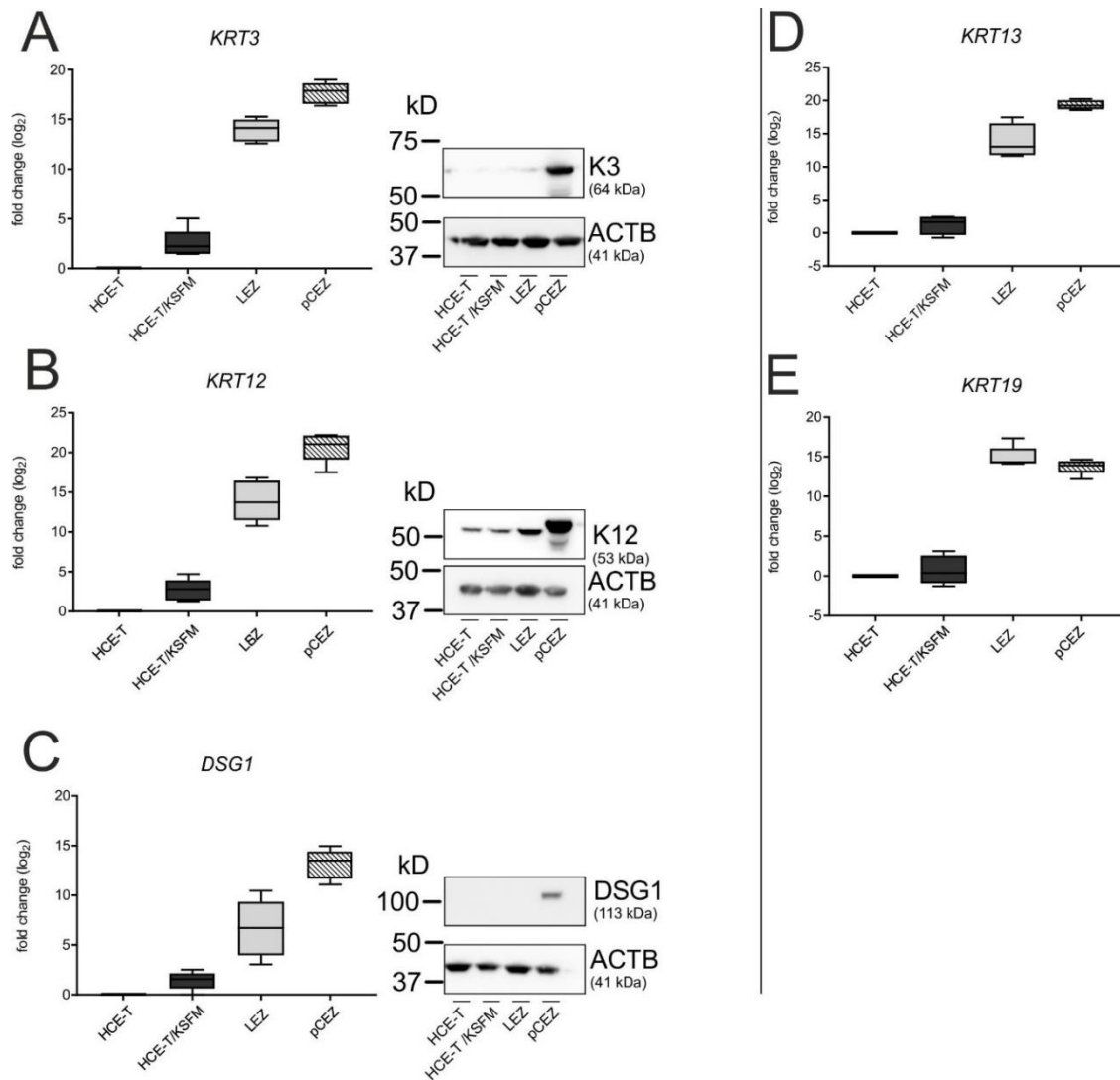


Abbildung 4. „Keratinmarker und Zellverbindungsmarker“: Die Ergebnisse der qPCR-Messungen der mRNA-Expression für die verschiedenen Zielgene KRT3 (A), KRT12 (B), DSG1 (C), KRT13 (D) und KRT19 (E) im Vergleich mit den unterschiedlichen Zelltypen (Zelllinie [HCE-T, HCE-T/KSFM], Limbusepithelzellen [LEZ] und primären Korneaepithel-Zellen [pCEZ]) sind dargestellt. Die Expression (y-Achse) ist als log₂ fold change (log₂FC) gezeigt. Ausgewählte Zielgene sind mithilfe eines Western Blots analysiert worden (A-C). Die aufgetragene Proteinmenge jeder Bande wurde mit beta-Actin (ACTB) als Ladekontrolle überprüft.

4.3 Stammzell- und Differenzierungsmarker

Bei den mRNA-Expressionen in **Abbildung 5 (A-D)** für die Gene PAX6 (A), ALDH1A1 (B), ADH7 (C) und TP63 (D) zeigt sich dieselbe Tendenz wie zuvor in den Keratinmarkern in **Abbildung 5**. Die mRNA-Expression nimmt in dieser Reihenfolge HCE-T < HCE-T/KSFM < LEZ < pCEZ zu. ABCG2 folgt nicht dieser Tendenz, da die Expression der pCEZ niedriger als die der HCE-T, HCE-T/KSFM und LEZ liegt.

PAX6

Die PAX6-mRNA Expression in den LEZ ($2,9 \pm 1,4$ log₂FC) zeigt eine größere Variabilität als die

Expression in pCEZ ($6,4 \pm 0,7 \log_2FC$). Das PAX6 im Western Blot stellt sich als Doppelbanden dar (46 kDa und 48 kDa). In den Messungen der LEZ und den pCEZ zeigen beide Zelltypen ähnlich starke Signale des PAX6 Proteins. In den HCE-T wurde das PAX6 Protein als ein leichter Schatten detektiert (**Abbildung 5 A**).

ALDH1A1

Die qPCR-Daten für ALDH1A1 zeigen, dass die mRNA Expression in den HCE-T/KSFM ungefähr 5fach ($2,4 \pm 0,9 \log_2FC$), in den LEZ 90fach ($6,6 \pm 1,8 \log_2FC$) und in den pCEZ 630fach ($9,3 \pm 1,1 \log_2FC$) höher als in den HCE-T Zellen liegen (**Abbildung 5 B**).

ADH7

Die ADH7-mRNA-Expression ist in den Messungen der unterschiedlichen Zelltypen mit einer fast 4tausendfach ($11,9 \pm 0,6 \log_2FC$) höheren Expression in den pCEZ am höchsten (**Abbildung 5 C**).

TP63

Die FC-Werte zwischen den LEZ ($5,9 \pm 1,5 \log_2FC$) und den pCEZ ($6,9 \pm 1,9 \log_2FC$) zeigen keinen großen Unterschied in der Expression des TP63. Die höchste Expression wurde in den pCEZ detektiert. Die Expression der HCE-T und der HCE-T/KSFM Zellen ist am niedrigsten. (**Abbildung 5 D**).

ABCG2

Die mRNA-Expression des ABCG2 weist in den pCEZ eine um $-3,5 \pm 0,9 \log_2FC$ niedrigere Expression als in den HCE-T Zellen, HCE-T/KSFM Zellen und LEZ auf (**Abbildung 5 E**).

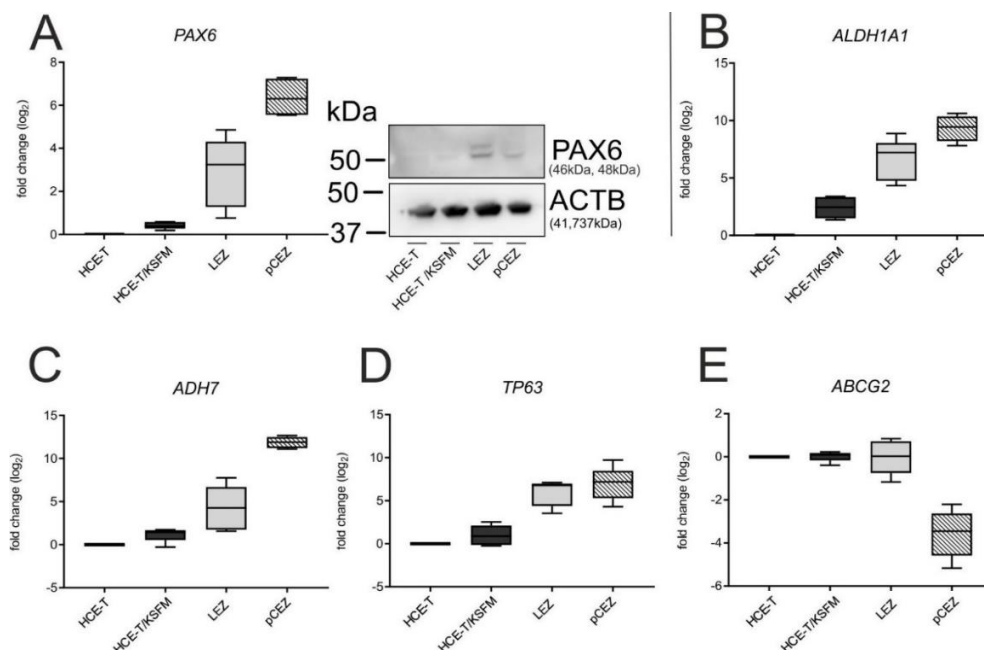


Abbildung 5. „Stammzell- und Differenzierungsmarker“: A-E zeigt die Ergebnisse der qPCR-Messung der mRNA-Expression der Zielgene PAX6 (A), ALDH1A1 (B), ADH7 (C), TP63 (D) und ABCG2 (E) im Vergleich mit den unterschiedlichen Zelltypen HCE-T, HCE-T/KSFM, LEZ und pCEZ. Auf der y-Achse sind die log₂ fold changes (log₂FC) der mRNA-Expression dargestellt. Ausgewählte Zielgene sind durch einen Western Blot analysiert worden (A). Die aufgetragene Proteinmenge jeder Bande wurde mit Hilfe von beta-Actin (ACTB) als Ladekontrolle überprüft.

4.4 Weitere untersuchte Marker

Zusätzlich wurden die Zielgene CTSV, SPINK7 und DKK1 in **Abbildung 6** dargestellt.

CTSV

Die höchste Expression wurde in den pCEZ ($3,8 \pm 1,0 \log_2FC$) gemessen. Diese liegt circa 14fach höher als die der HCE-T Zellen (**Abbildung 6 A**).

SPINK7

Hier (B) zeigt sich eine annähernd gleiche Expression in den LEZ ($11,1 \pm 2,2 \log_2FC$) und den pCEZ ($9,7 \pm 1,8 \log_2FC$). Die Expression der pCEZ liegt somit 512fach höher als in den HCE-T Zellen (**Abbildung 6 B**).

DKK1

In den pCEZ ($-6,8 \pm 1,9 \log_2FC$) wurde die niedrigste Expression der mRNA gemessen im Gegensatz zu den anderen Zelltypen. Diese ist 111fach niedriger als die mRNA-Expression der HCE-T Zellen. (**Abbildung 6 C**).

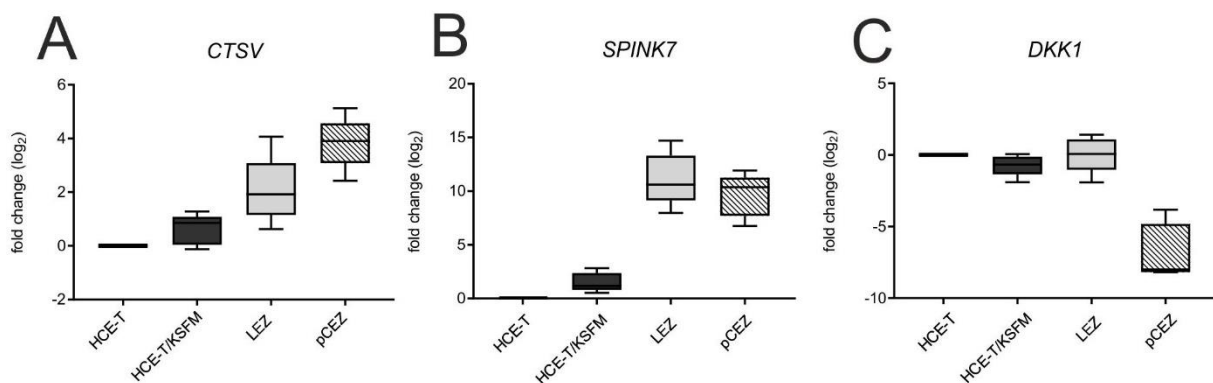


Abbildung 6. „Weitere untersuchte Marker“: A-C zeigt die Ergebnisse der qPCR-Messung der mRNA-Expression für die Zielgene CTSV (A), SPINK7 (B) und DKK1 (C) im Vergleich mit den unterschiedlichen Zelltypen (HCE-T, HCE-T/KSFM, LEZ und pCEZ). Die Expression ist auf der y-Achse als log₂ fold change (log₂FC) dargestellt.

5 Diskussion

5.1 Korneale Differenzierung in LEZ, pCEZ, HCE-T und HCE-T/KSFM

Die Expressionsdaten zeigen, dass die HCE-T Zelllinie in Bezug auf die untersuchten Marker nicht differenziert ist, weil korneaspezifische Differenzierungsmarker nicht exprimiert werden und die mRNA-Expression der korneaspezifischen Keratine in den HCE-T tausendfach unter der mRNA-Expression derselben Gene in den pCEZ lag. Die Messungen zeigen, dass alle Keratinmarker und Desmoglein (**Abbildung 4**) am höchsten in den pCEZ exprimiert werden. Da die Zelllinie aus differenziertem Korneaepithel generiert wurde, erwarteten wir eine ähnlich hohe Expression in den HCE-T-Zellen wie in den pCEZ, aber dies konnte durch die Versuche nicht nachgewiesen werden.

Die Untersuchung von Rönkkö et al. bestätigen unsere Ergebnisse zu den HCE-T-Zellen mit einer weiteren unabhängigen Methode und unter Verwendung anderer Kulturbedingungen¹⁹. Dies deckt sich auch mit den morphologischen Untersuchungen von Becker et al., der die Zelllinie ebenfalls als undifferenziert charakterisiert hat¹⁸. Im Vergleich zu den LEZ fiel die Expression niedriger aus als wir erwartet hätten. Da die Zelllinie ursprünglich anhand der stabilen Proteinexpression des KRT3 und der Aldehyddehydrogenase beschrieben wurde¹⁶, entsprach die viel geringere mRNA-Expression dieser Gene nicht der Erwartung. Selbst die mRNA-Expression der LEZ lag hundertfach über den Werten der HCE-T. Aus diesen Werten geht hervor, dass die HCE-T Zellen weniger differenziert sind als die LEZ. Ausgenommen ABCG2 und DKK1, zeichnete sich die Reihenfolge ab, dass die HCE-T Zellen die geringste, die LEZ eine hundertfach höhere und die pCEZ eine tausendfach höhere Expression und damit auch Differenzierung aufweisen.

Die Marker SPINK7 und KRT19 erreichten in den LEZ ähnlich hohe Expressionen wie die pCEZ. Dies bedeutet, dass diese Marker trotz fortschreitender Differenzierung nicht höher exprimiert werden. Da ABCG2 und DKK1 Stammzellmarker sind, die in Stamm- beziehungsweise in undifferenzierten Zellen hochreguliert sind, entsprechen die niedrigeren Werte in den differenzierten pCEZ der Erwartung.

Die Western Blot Versuche von KRT3, KRT12, DSG1 und PAX6 überprüften die Korrelation zwischen mRNA-Expression und Proteinmenge. Der Proteinnachweis für die Keratine gelang in den pCEZ. Trotz hoher mRNA-Expression in den LEZ konnte eine spezifische Signalbande für KRT3 genau wie in den HCE-T-Zellen, die eine kaum nachweisbare mRNA-Expression aufwiesen, allenfalls erahnt werden. Die hohe mRNA-Expression des DSG1 der LEZ spiegelt sich nicht im Western Blot wieder, da das DSG1-Protein nur in den pCEZ detektiert werden konnte (**Abbildung 4**). Die Korrelation zwischen mRNA und Protein ist, soweit man es im Rahmen dieser Versuche beurteilen kann, nicht linear. Nur sehr starke Unterschiede zeigen sich im Western Blot. Eine eventuell fehlende Korrelation zeigt sich besonders bei dem Nachweis von PAX6 (**Abbildung 5**). Die mRNA-Expression der pCEZ liegt deutlich

über der Expression in den LEZ und dennoch konnte die Bandenintensität des PAX6-Proteins in den LEZ stärker oder zu mindestens gleich stark detektiert werden.

Die Arbeitsgruppe um Araki et al. wiesen 64 kDa Zytokeratin in den HCE-T Zellen nach ¹⁶. Dies konnte in **Abbildung 4** als leichter Schatten detektiert werden, aber die Bandenintensität von KRT3 war in den pCEZ um ein vielfaches stärker. Das bedeutet, dass zwar KRT3-Protein in den HCE-T Zellen exprimiert wird, aber in viel geringeren Mengen als in den pCEZ.

5.2 Einfluss des Mediumwechsels

Die HCE-T Zellen wurden zusätzlich zu dem Standardmedium mit FCS in serumfreiem Medium (KSFM) kultiviert, weil Serum durch unbekannte Wachstumsinhibitoren die Proliferation und Differenzierung in LEZ und pCEZ unterdrücken soll ⁵⁸. Es gibt zurzeit noch kein Standardverfahren, das die Kultivierung der pCEZ-Modelle optimiert hat.

Eine andere Arbeitsgruppe testete die Differenzierung von air-lift Kultivierung an den HCE-T Zellen im Vergleich zu pCEZ mit mRNA-Microarrays und kam zu den Ergebnissen, dass diese Kultivierung keinen Einfluss auf die Differenzierung bewirkte ⁵⁶. Wir schließen daraus, dass die Differenzierung in der air-lift Kultivierung im Vergleich mit unserer HCE-T Kultivierung im Hinblick auf die Differenzierung der pCEZ keinen signifikanten Unterschied brachte. Das KSFM-Medium hatte keinen eindeutigen Effekt auf das Expressionsmuster der HCE-T Zellen. In unserer Arbeit zeigt sich auch, dass das serumfreie Medium keine Differenzierung anstößt. Beispielsweise wurde für KRT3 in den KSFM kultivierten HCE-T Zellen eine mRNA-Expression von $2,5 \pm 1,5 \log_2FC$ gemessen. Dies entspricht einer 5,6fach höheren Expression als in dem Standardmedium mit FCS kultivierten HCE-T Zellen. Im Gegensatz dazu ist die mRNA-Expression des KRT3 in den pCEZ über 200.000fach höher ($17,7 \pm 1,1 \log_2FC$). Diese geringen Unterschiede der KSFM kultivierten Zellen zu HCE-T Zellen, die im Standardmedium kultiviert wurden, und die enorm höher Expression der pCEZ zeigt sich für alle gemessenen Gene.

Generell soll KSF-Medium und das häufiger verwendete Medium mit EGF die PAX6-Expression reduzieren und dadurch zu einem geringer ausgeprägtem kornealen Phänotyp führen. Eine Studie schlägt daher ein Medium mit Keratinozytenwachstumsfaktoren und rho-Kinase-Inhibitoren versetzt vor ⁵⁹. Die Daten der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass mit dieser Behandlung der Zellkultur nicht die Expression mit vergleichbar hohen Werten der pCEZ erreichen lässt.

Eine zusätzlich höhere Begasung mit 7 % CO₂ soll eine Differenzierung anstoßen, weil dies in kornealen Progenitorzellen und LEZ eine Erhöhung des ABCG2-Transporters und TP63 herbeiführt ⁶⁰.

Insgesamt kann man schließen, dass die undifferenzierten Eigenschaften nicht ausschließlich auf genetische Instabilität und Subklonierung der HCE-T zurückzuführen sind, und die Differenzierung der

HCE-T Zellen in Kultur bisher sehr begrenzt steuerbar ist (Yamasaki et al. 2009). Alles in allem deuten die Ergebnisse darauf hin, dass im Zellkulturmodell eine Differenzierung schwer zu induzieren ist, und es aktuell an Zellkulturen von differenzierten Zellen mangelt.

5.3 Konjunktivamarker

Die kornealen Marker KRT3 und KRT12 waren kaum nachweisbar in den HCE-T Zellen (**Abbildung 4 A, B**). Die Konsequenz daraus war die Frage, ob die HCE-T Zelllinie einen konjunktivalen Phänotyp aufweist. Jedoch waren die konjunktivalen Marker KRT13 und KRT19 ebenfalls niedrig exprimiert (**Abbildung 4 [D, E]**). Entgegen der Erwartung wurden KRT13 und KRT19 in den LEZ und den pCEZ exprimiert. Das legt die Schlussfolgerung nahe, dass in Konjunktivazellen die Expression höher liegen muss, da andere Arbeitsgruppen KRT13 und KRT19 in der Immunfluoreszenz zur selektiven Unterscheidung von Korneaepithel und Bindehaut einsetzen⁵. Eine Erhöhung der KRT13- oder KRT19-Expression ist somit nicht ausreichend um Zellen aus einer LEZ-Kultur als differenzierende Konjunktivazellen zu identifizieren. In Zukunft könnte es sinnvoll sein, eine qPCR-Messung zur genaueren Quantifizierung der mRNA durchzuführen und dadurch eine genauere Definierung des vorliegenden Zelltypens zu erreichen.

5.4 Stammzellmarker

Der Stammzellmarker DKK1 war in den HCE-T Zellen fast genauso hoch exprimiert wie in den LEZ. Das DKK1-Protein ist in den WNT-Reaktionsweg eingebunden⁵⁵ und spielt vielleicht eine Rolle in der Expression von Connexin43, das vor allem in der Kornea hoch exprimiert ist⁴⁸. Dies könnte erklären, warum DKK1 in den LEZ hoch exprimiert und in den pCEZ wiederum runterreguliert ist.

Das ABCG2, das ebenfalls ein Stammzellmarker für die LEZ ist, ist ebenfalls genauso hoch in den HCE-T Zellen exprimiert wie in den LEZ. In den pCEZ ist ABCG2 runterreguliert. Hohe ABCG2- und DKK1-Expressionen sind charakteristisch für LEZ und die HCE-T Zellen entsprechen in diesen beiden Markern den LEZ und nicht den differenzierten pCEZ.

Der Stammzellmarker TP63 ist in den HCE-T Zellen im Vergleich zu den LEZ und pCEZ runterreguliert. Die Isoform TP63 α könnte die Isoform sein, welche undifferenzierte Zellen identifiziert⁵¹. Jedoch werden in der qPCR alle TP63-Isoformen gemessen und dadurch könnte sich erklären, warum die TP63-Expression in den undifferenzierten LEZ genauso hoch gemessen wurde wie in den differenzierten pCEZ.

Die PAX6 mRNA-Expression weist zwischen den LEZ ($2,8 \pm 1,4 \log_2FC$) und den pCEZ ($6,3 \pm 0,7 \log_2FC$) einen deutlichen Unterschied auf. Dieser konnte auf Proteinebene im Western Blot nicht nachgewiesen werden. Die Proteinbande in den LEZ ist stärker ausgeprägt. Beide PAX6 Isoformen

(46 kDa und 48 kDa) konnten im Western Blot detektiert werden (**Abbildung 5**). Diese Variabilität zwischen LEZ und den pCEZ konnte in allen 4 wiederholten Messungen nachgewiesen werden. Die beiden Isoformen sind spezifisch an der Regulation von Zielgenen beteiligt⁶²⁻⁶⁴. In Zukunft sollten deswegen beide Isoformen kombiniert im Western Blot und qPCR betrachtet werden, um einen möglichen Zusammenhang zu ermitteln, wie die Isoformen des PAX6 unterschiedlich in die Differenzierung eingreifen. Die Arbeitsgruppe um Kitazawa regulierte per CRISPR/Cas-Technik PAX6 runter und stellte denselben Mangel an Differenzierung mit starken Überlappungen zu unserer Expressionsanalyse fest³². Im Umkehrschluss könnte an der Zelllinie getestet werden, ob eine Erhöhung der PAX6-Isoformen eine Differenzierung anstößt.

5.5 HCE-T Phänotyp

In Aniridie-Primärkulturen und Mausmodellen-/ Gewebeproben von OSD wurde ein undifferenzierter Phänotyp festgestellt^{25,27,65}. Die HCE-T Zellen zeigen in den hier untersuchten Markern einen Phänotyp, der den Aniridie-Modellen und den Modellen der OSD gleicht. Es wurde nur eine geringe Anzahl möglicher Marker untersucht, deswegen ist nicht klar, ob die Zelllinie einen anderen Phänotyp angenommen hat. Jedoch eignet sich die Zelllinie im Hinblick auf die niedrige Expression der untersuchten Marker nicht, um die Prozesse der Differenzierung zu Korneaepithelzellen zu untersuchen. Vielmehr sollten primäre Kulturen von differenzierten Zellen etabliert werden, um herauszufinden, durch welche Signale LEZ zu differenzierten pCEZ heranreifen. Wenn man LEZ gezielt zur Differenzierung anstoßen kann, könnte man in Zukunft an solchen Modellen die Pathomechanismen der OSD erforschen.

5.6 Schlussfolgerungen

Die Hypothese, dass HCE-T differenzierte Zellen sind, die dem Expressionsmuster der pCEZ ähneln, muss verworfen werden. Um weiterführende in vitro Versuche über Differenzierungsprozesse der Kornea durchzuführen, ist die HCE-T Zelllinie kein gutes Modell. Die Zellkulturen weisen große Unterschiede zu dem primären differenzierten Ursprungsgewebe von Spendern auf. Um dies zu umgehen, wären folgende Möglichkeiten theoretisch denkbar:

1) *Primäre Kulturen von differenzierten Zellen*

Die Nutzung von kommerziell erwerblichen immortalisierten primären Kornea-Epithelzellkulturen könnte ein guter Ansatz sein¹⁸, aber diese müssen zum aktuellen Zeitpunkt noch optimiert werden.

2) *Differenzierung triggern*

Die Signale, die zur Differenzierung führen, sind zurzeit noch weitestgehend unbekannt. Ebenso fehlen Studien in welchem Ausmaß das korneale Stroma Einfluss auf die Differenzierung der Epithelzellen nimmt.

Es könnte versucht werden LEZ zu kultivieren und an diesen die Differenzierung anzustoßen. Dies könnte durch eine PAX6-Induktion oder über weitere Optimierung der Kulturbedingungen erreicht werden. Die Versuche über Toxizität und Barriereigenschaften für Medikamentenstudien sind an dieser Zelllinie trotz hoher Variabilität an Barrierephänotypen unter kontrollierten Bedingungen geeignet¹⁷.

Literaturverzeichnis

1. Boulton M, Albon J, Grant MB. Stem Cells in the Eye. In: Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition. 2013. p. 1399–412.
2. Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE. Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res* 2005; 81: 247–64.
3. Townsend WM. The limbal palisades of Vogt. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1991; 89: 721–56.
4. Tseng SC. Concept and application of limbal stem cells. *Eye (Lond)* 1989; 3: 141–57.
5. Ramos T, Scott D, Ahmad S. An Update on Ocular Surface Epithelial Stem Cells: Cornea and Conjunctiva. *Stem Cells Int.* 2015; 601731.
6. Ebrahimi M, Taghi-Abadi E, Baharvand H. Limbal stem cells in review. *J Ophthalmic Vis Res* 2009; 4: 40–58.
7. Le Q, Xu J, Deng SX. The diagnosis of limbal stem cell deficiency. *Ocul. Surf.* 2018; 16: 58–69.
8. Tseng SC. Regulation and clinical implications of corneal epithelial stem cells. *Mol Biol Rep* 1996; 23: 47–58.
9. Axenfeld T, Pau H. *Lehrbuch und Atlas der Augenheilkunde*. Auflage 12. Gustav Fischer, Stuttgart; 1980.
10. Liu CY, Zhu G, Westerhausen-Larson A, et al. Cornea-specific expression of k12 keratin during mouse development. *Curr Eye Res* 1993; 12: 963–74.
11. Curren RD, Harbell JW. In vitro alternatives for ocular irritation. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 485–92.
12. Nasser W, Amitai-Lange A, Soteriou D, et al. Corneal-Committed Cells Restore the Stem Cell Pool and Tissue Boundary following Injury. *Cell Rep* 2018; 22: 323–31.
13. Toropainen E, Ranta VP, Talvitie A, et al. Culture model of human corneal epithelium for prediction of ocular drug absorption. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 2942–8.
14. Reichl S. Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. *Br J Ophthalmol* 2004; 88: 560–5.
15. Robertson DM, Li L, Fisher S, et al. Characterization of growth and differentiation in a telomerase-immortalized human corneal epithelial cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46: 470–8.
16. Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, et al. An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36: 614–21.
17. Reichl S. Cell culture models of the human cornea - a comparative evaluation of their usefulness to determine ocular drug absorption in-vitro. *J Pharm Pharmacol* 2008; 60: 299–307.
18. Becker U, Ehrhardt C, Schneider M, et al. A comparative evaluation of corneal epithelial cell cultures for assessing ocular permeability. *ATLA Altern to Lab Anim* 2008; 36: 33–44.
19. Rönkkö S, Vellonen K-S, Järvinen K, et al. Human corneal cell culture models for drug toxicity studies. *Drug Deliv Transl Res* 2016; 6: 660–75.
20. Yamasaki K, Kawasaki S, Young RD, et al. Genomic aberrations and cellular heterogeneity in SV40-immortalized human corneal epithelial cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 604–13.

21. Holland EJ. Epithelial transplantation for the management of severe ocular surface disease. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1996; 94: 677–743.
22. Ong HS, Dart JKG. Managing ocular surface disease: A common-sense approach. *Community Eye Heal J* 2016; 29: 44–6.
23. Rolando M, Geerling G, Dua HS, et al. Emerging treatment paradigms of ocular surface disease: proceedings of the Ocular Surface Workshop. *Br J Ophthalmol* 2010; 94: i1-9.
24. Li W, Chen YT, Hayashida Y, et al. Down-regulation of Pax6 is associated with abnormal differentiation of corneal epithelial cells in severe ocular surface diseases. *J Pathol* 2008; 214: 114–22.
25. Davis J. Requirement for Pax6 in corneal morphogenesis: a role in adhesion. *J Cell Sci* 2003; 116: 2157–67.
26. Lagali N, Edén U, Utheim TP, et al. In vivo morphology of the limbal palisades of vogt correlates with progressive stem cell deficiency in aniridia-related keratopathy. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54: 5333–42.
27. Latta L, Viestenz A, Stachon T, et al. Human aniridia limbal epithelial cells lack expression of keratins K3 and K12. *Exp Eye Res* 2018; 167: 100–9.
28. Labrecque J, Dumas F, Lacroix A, et al. A novel isoenzyme of aldehyde dehydrogenase specifically involved in the biosynthesis of 9-cis and all-trans retinoic acid. *Biochem J* 1995; 305: 681–4.
29. Satre MA, Žgombić-Knight M, Duester G. The complete structure of human class IV alcohol dehydrogenase (retinol dehydrogenase) determined from the ADH7 gene. *J Biol Chem* 1994; 269: 15606–12.
30. Adacbi W, Kaivamoto S, Obno I, et al. Isolation and characterization of human cathepsin V: A major proteinase in corneal epithelium. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 1789–96.
31. Nakatsu MN, Ding Z, Ng MY, et al. Wnt/ β -catenin signaling regulates proliferation of human cornea epithelial stem/progenitor cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52: 4734–41.
32. Kitazawa K, Hikichi T, Nakamura T, et al. PAX6 regulates human corneal epithelium cell identity. *Exp Eye Res* 2017; 154: 30–8.
33. Ramirez-Miranda A, Nakatsu MN, Zarei-Ghanavati S, et al. Keratin 13 is a more specific marker of conjunctival epithelium than keratin 19. *Mol Vis* 2011; 17: 1652–61.
34. Irvine AD, Corden LD, Swensson O, et al. Mutations in cornea-specific keratin K3 or K12 genes cause Meesmann’s corneal dystrophy. *Nat Genet* 1997; 16: 184–7.
35. Corden LD, Swensson O, Swensson B, et al. Molecular genetics of Meesmann’s corneal dystrophy: Ancestral and novel mutations in keratin 12 (K12) and complete sequence of the human KRT12 gene. *Exp Eye Res* 2000; 70: 41–9.
36. Liu JJ, Kao WWY, Wilson SE. Corneal epithelium-specific mouse keratin K12 promoter. *Exp Eye Res* 1999; 68: 295–301.
37. Ramaesh K, Ramaesh T, Dutton GN, et al. Evolving concepts on the pathogenic mechanisms of aniridia related keratopathy. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 547–57.
38. Li G, Xu F, Zhu J, et al. Transcription factor PAX6 (paired box 6) controls limbal stem cell lineage in development and disease. *J Biol Chem* 2015; 290: 20448–54.
39. Courtney DG, Atkinson SD, Allen EHA, et al. SiRNA silencing of the mutant keratin 12 allele in corneal limbal epithelial cells grown from patients with Meesmann’s epithelial corneal dystrophy. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2014; 55: 3352–60.

40. Szaflik JP, Oldak M, Maksym RB, et al. Genetics of Meesmann corneal dystrophy: a novel mutation in the keratin 3 gene in an asymptomatic family suggests genotype-phenotype correlation. *Mol Vis* 2008; 14: 1713–8.
41. Callaerts P, Halder G, Gehring WJ. PAX-6 in development and evolution. *Annu Rev Neurosci* 1997; 20: 483–532.
42. PAX6 paired box 6 (Homo sapiens) [Internet]. 2018 [cited 2018 Aug 26]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5080>
43. Terzić J, Saraga-Babić M. Expression pattern of PAX3 and PAX6 genes during human embryogenesis. *Int J Dev Biol* 1999; 43: 501–8.
44. Mort RL, Bentley AJ, Martin FL, et al. Effects of aberrant Pax6 gene dosage on mouse corneal pathophysiology and corneal epithelial homeostasis. *PLoS One* 2011; 6: e28895.
45. Ramaesh T, Collinson JM, Ramaesh K, et al. Corneal abnormalities in Pax6^{+/-} small eye mice mimic human aniridia-related keratopathy. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 1871–8.
46. Hanson I, Seawright A, Hardman K, et al. PAX6 mutations in Aniridia. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 915–20.
47. Collinson JM. Corneal Development, Limbal Stem Cell Function, and Corneal Epithelial Cell Migration in the Pax6^{+/-} Mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(4): 1101–8.
48. Turner HC, Budak MT, Akinci M a M, et al. Comparative analysis of human conjunctival and corneal epithelial gene expression with oligonucleotide microarrays. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 2050–61.
49. Latta L, Stachon T, Nordström K, et al. Expression of retinoic acid signaling components ADH7 and ALDH1A1 is reduced in aniridia limbal epithelial cells and a siRNA primary cell based aniridia model (unpublished). 2018.
50. Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, et al. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 3156–61.
51. Di Iorio E, Barbaro V, Ruzza A, et al. Isoforms of Np63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102: 9523–8.
52. Budak MT, Alpdogan OS, Zhou M, et al. Ocular surface epithelia contain ABCG2-dependent side population cells exhibiting features associated with stem cells. *J Cell Sci* 2005; 118: 1715–24.
53. Furio L, Hovnanian A. When activity requires breaking up: LEKTI proteolytic activation cascade for specific proteinase inhibition. *J Invest Dermatol* 2011; 131: 2169–73.
54. Meyer-Hoffert U, Wu Z, Kantyka T, et al. Isolation of SPINK6 in human skin: Selective inhibitor of kallikrein-related peptidases. *J Biol Chem* 2010; 285: 32174–81.
55. Van Der Horst G, Van Der Werf SM, Farih-Sips H, et al. Downregulation of Wnt signaling by increased expression of Dickkopf-1 and -2 is a prerequisite for late-stage osteoblast differentiation of KS483 cells. *J Bone Miner Res* 2005; 20: 1867–77.
56. Greco D, Vellonen K-S, Turner HC, et al. Gene expression analysis in SV-40 immortalized human corneal epithelial cells cultured with an air-liquid interface. *Mol Vis* 2010; 16: 2109–20.
57. Araki K, Ohashi Y, Sasabe T, et al. Immortalization of rabbit corneal epithelial cells by a recombinant SV40-adenovirus vector. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34: 2665–71.
58. Kruse FE, Tseng SC. Serum differentially modulates the clonal growth and differentiation of cultured limbal and corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34: 2976–89.
59. Yoshihara M, Sasamoto Y, Hayashi R, et al. High-resolution promoter map of human limbal

- epithelial cells cultured with keratinocyte growth factor and rho kinase inhibitor. *Sci Rep* 2017; 7: 2845.
60. Zhang C, Du L, Pang K, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into corneal epithelial progenitor cells under defined conditions. *PLoS One* 2017; 12: e0183303.
 61. Yamasaki K, Kawasaki S, Young RD, et al. Genomic aberrations and cellular heterogeneity in SV40-immortalized human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 604–13.
 62. Kiselev Y, Eriksen TE, Forsdahl S, et al. 3T3 cell lines stably expressing Pax6 or Pax6(5a)--a new tool used for identification of common and isoform specific target genes. *PLoS One* 2012; 7: e31915.
 63. Forsdahl S, Kiselev Y, Hogseth R, et al. Pax6 regulates the expression of Dkk3 in murine and human cell lines, and altered responses to Wnt signaling are shown in Flpln-3T3 cells stably expressing either the Pax6 or the Pax6(5a) Isoform. *PLoS One* 2014; 9: e102559.
 64. Sasamoto Y, Hayashi R, Park SJ, et al. PAX6 Isoforms, along with Reprogramming Factors, Differentially Regulate the Induction of Cornea-specific Genes. *Sci Rep* 2016; 6: 20807.
 65. Li W, Chen YT, Hayashida Y, et al. Down-regulation of Pax6 is associated with abnormal differentiation of corneal epithelial cells in severe ocular surface diseases. *J Pathol* 2008; 214: 114–22.

Abbildungsverzeichnis

Tabellen

Tabelle 1. Erkrankungen der Kornea, die mit einer Stammzellinsuffizienz einhergehen	8
Tabelle 2. Verwendete Kits	16
Tabelle 3. Puffer, Lösungen und Medien	17
Tabelle 4. Verwendete Geräte	18
Tabelle 5. Verbrauchsmaterialien.....	18
Tabelle 6. Ansatz für einen Reaktionsmix für die qPCR-Messungen	21
Tabelle 7. Verwendete Primer	22
Tabelle 8. Verwendete Antikörper	24

Abbildungen

Abbildung 1. Schematische Abbildung der Stammzellnische.....	11
Abbildung 2. Thermocycler Profil.....	22
Abbildung 3. RNA-Integrität.....	25
Abbildung 4. Keratin- und Zellverbindungsmarker.....	27
Abbildung 5. Stammzell- und Differenzierungsmarker.....	28
Abbildung 6. Weitere untersuchte Marker.....	29

Publikation

Rubelowski AK, Latta L, Stachon T, Käsmann-Kellner B, Seitz B, Szentmáry N. HCE-T cell line lack corneal specific differentiation markers compared to primary limbal epithelial cells and differentiated corneal epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2018; eingereicht.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Nóra Szentmáry, Oberärztin der Klinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg/Saar, bedanken für die Möglichkeit, meine Promotion unter ihrer Leitung durchführen zu dürfen. Vielen Dank für die interessante Thematik, an der ich mit viel Freude gearbeitet habe.

Herrn Dr. Lorenz Latta danke ich insbesondere für die ausgesprochen gute Betreuung, die sich durch zahlreiche Tipps und einer ständigen Bereitschaft Fragen zu beantworten auszeichnet. Ohne seine Unterstützung und persönliche Förderung während meiner Laborarbeit wäre es wesentlich schwieriger gewesen diese Arbeit fertigzustellen.

Frau Tanja Stachon möchte ich für die Einarbeitung in die Zellkulturtechniken herzlich danken. Die darüberhinausgehende Unterstützung durch Ratschläge hat mir meine Arbeit sehr erleichtert. Durch die Anteilnahme und Unterstützung während meiner Forschungsarbeit konnte ich von wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Gesprächen profitieren. Danke für die schöne Zusammenarbeit!

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Berthold Seitz, Klinikdirektor der Klinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg/Saar, für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Gerätschaften im biologischen Labor seiner Klinik.

Zuletzt möchte ich ein großes Dankeschön an meine Familie richten, die mich immer wort- und tatkräftig unterstützt.