

# **Einfluss von IRF8 auf limbale corneale Epithelstammzellen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Christiane Kesper  
geboren am 04.11.1991 in Hannover

Betreuer: apl. Prof. Dr. med. Thomas Hammer

Gutachterin/Gutachter: 1. apl. Prof. Dr. Thomas Hammer, Halle (Saale)

2. Prof. Dr. Thomas Fuchsluger, Rostock

3. Prof. Dr. Frank Wilhelm, Greifswald

Datum der Verteidigung: 08.03.2023

## Referat

Die Hornhaut des Auges ist für die Sehschärfe des Menschen von enormer Bedeutung. Die äußerste Schicht der Hornhaut, das Epithel, unterliegt einer ständigen Erneuerung. Diese geht von einer Population adulter Stammzellen im Limbus des Auges aus, welcher den Übergang der Hornhaut in die bulbäre Conjunctiva bzw. die Sklera darstellt. Um die Stammzellen dieser Region zu identifizieren sind Stammzellmarker notwendig. Von den bislang untersuchten Markern wird keiner exklusiv von den Stammzellen exprimiert. Zur weiteren Charakterisierung sind Untersuchungen an potentiellen Modellen der limbalen epithelialen Stammzellen, wie beispielsweise einer Zelllinie, notwendig. Der Transkriptionsfaktor IRF8, welcher vor allem in hämatopoetischen Zellen vorkommt, wurde bereits im Auge nachgewiesen. Die Verteilung und die Funktion von IRF8 in der Hornhaut und im Limbus sind bislang jedoch unbekannt. Ziel der Arbeit ist es, die hTCEpi-Zelllinie als Modell für limbale epitheliale Stammzellen zu etablieren. Weiterhin soll IRF8 in limbalen epithelialen Stammzellen nachgewiesen und dessen Funktion detektiert werden.

Hierzu wurden histologische und immunhistologische Färbungen an der hTCEpi-Zelllinie und an Mausaugen durchgeführt. Weiterhin erfolgten unter anderem Tests zur Populationsverdopplungszeit, Differenzierungsversuche und *scratch assays* zur Charakterisierung der Zelllinie.

Sowohl im Mausauge als auch in den hTCEpi-Zellen ist eine IRF8-Expression nachweisbar. Weiterhin zeigten die Untersuchungen, dass IRF8 eine Rolle bei der Proliferation, der Differenzierung und der Wundheilung der hTCEpi-Zellen spielt. Ferner ergaben diese Untersuchungen, dass die hTCEpi-Zelllinie ein gutes Modell für die Region des Limbus, jedoch keine reine Stammzelllinie darstellt. Durch Vergleich der immunhistochemischen Färbungen am Mausauge und an IRF8-Knockout-Mausaugen kann ein Einfluss von IRF8 auf den Limbus und die Cornea festgestellt werden.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>V</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 ANATOMIE DER HUMANEN CORNEA .....	1
1.1.1 Aufbau und Struktur der Cornea.....	1
1.1.2 Regeneration des cornealen Epithels.....	2
1.1.3 Aufbau des Limbus.....	3
1.1.4 Limbale epitheliale Stammzellen .....	4
1.1.5 Limbusstammzellinsuffizienz.....	7
1.2 INTERFERON REGULATORY FACTOR 8 (IRF8) .....	11
<b>2 ZIELSTELLUNG.....</b>	<b>13</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>14</b>
3.1 MATERIALIEN UND GERÄTE.....	14
3.1.1 Antikörper.....	14
3.1.2 Chemikalien .....	15
3.1.3 Materialien für die Zellkultivierung .....	16
3.1.4 Materialien für histologische Methoden an Mausaugen.....	17
3.1.5 Materialien für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	18
3.1.6 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software.....	19
3.2 ZELLKULTIVIERUNG .....	21
3.2.1 Zelllinie.....	21
3.2.2 Kultivierung .....	21
3.2.3 Subkultivierung von Zellen.....	21
3.2.4 Kryokonservierung von Zellen.....	21
3.2.5 Reaktivierung kryokonservierter Zellen .....	22
3.2.6 Zellzahl-Bestimmung.....	22
3.2.7 Test zur Überprüfung der Puromycin-Resistenz.....	22
3.2.8 Ermittlung der Populationsverdopplungszeit.....	22
3.2.9 Beschichtung von Deckgläsern mit Gelatine.....	23
3.2.10 Immunzytochemische Färbungen (ICC) an den hTCEpi-Zellen .....	23
3.2.11 Differenzierung der Zellen.....	24
3.2.12 Stimulationsversuche mit Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) zur Erhöhung der IRF8-Expression.....	24
3.2.13 Scratch-Assay (Wundheilungsversuch) .....	25
3.3 HISTOLOGISCHE METHODEN AN MAUSAUGEN.....	26
3.3.1 Entnahme, Präparation und Fixierung der Mausaugen .....	26
3.3.2 Einbettung der Augen in Paraffin .....	26
3.3.3 Anfertigung von Mikrotomschnitten.....	26
3.3.4 Entparaffinierung.....	27
3.3.5 Periodsäure Schiff's-Färbung (PAS-Färbung).....	27
3.3.6 Immunhistochemische Färbungen an Mausaugen.....	27
3.3.7 Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC) Methode.....	28
3.3.8 Mikroskopie und Fotografie .....	29
3.4 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR) .....	29
3.4.1 RNA-Isolation aus einem Zellpellet.....	29
3.4.2 cDNA-Synthese .....	30

3.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	30
3.4.4 Gelelektrophorese .....	31
3.5 STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	31
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>32</b>
4.1 ALLGEMEINE EIGENSCHAFTEN DER hTCEPI-ZELLEN.....	32
4.2 EXPRESSION VON POTENTIELLEN STAMMZELLMARKERN IN DEN hTCEPI-ZELLEN.....	33
4.3 EXPRESSIONSVERÄNDERUNG DER STAMMZELLMARKER NACH DIFFERENZIERUNG DER ZELLEN.....	41
4.4 AUSWIRKUNGEN DER INTERFERON-GAMMA-BEHANDLUNG AUF DIE ZELLMORPHOLOGIE UND DAS ZELLWACHSTUM.....	44
4.5 VERÄNDERUNG DER IRF8-EXPRESSION DURCH BEHANDLUNG MIT IFN- $\gamma$ .....	46
4.6 UNTERSCHIEDE IM <i>SCRATCH</i> -ASSAY BEI STIMULATION MIT IFN- $\gamma$ .....	49
4.7 EXPRESSION VON IRF8 IM MAUSAUGE.....	51
4.8 BESTIMMUNG DER LIMBUSREGION AM MAUSAUGE UND EINFLUSS VON IRF8 AUF DIE GRÖÖBE DER REGION .....	52
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>55</b>
5.1 hTCEPI-ZELLEN ALS MODELL FÜR LIMBALE EPITHELIALE STAMMZELLEN .....	55
5.2 ROLLE VON IRF8 IN LIMBALEN EPITHELIALEN STAMMZELLEN .....	58
5.2.1 IRF8 wird in den hTCEpi-Zellen und im Mausauge exprimiert.....	59
5.2.2 IRF8 als potentieller Stammzellmarker .....	59
5.2.3 Zusammenhang von IRF8 und Proliferation.....	60
5.2.4 Einfluss von IRF8 auf die Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften und Differenzierung .....	62
5.2.5 Anstieg der IRF8-Expression in den hTCEpi-Zellen durch IFN- $\gamma$ -Zugabe.....	63
5.3 LIMITATIONEN.....	64
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>65</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>67</b>
<b>THESEN .....</b>	<b>76</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>77</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>77</b>
<b>SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....</b>	<b>IX</b>
<b>ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE PROMOTIONSVERSUCHE .....</b>	<b>VIII</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>IX</b>

## Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex
AML	akute myeloische Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovine serum albumin
bzw	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	complementary desoxyribonucleid acid
CK14	Cytokeratin 14
CLET	cultivated limbal epithelial transplantation
CML	chronisch myeloische Leukämie
DABCO	Diazobicyclo[2.2.2]octan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleid acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
FBS	fetal bovine serum
FGF	Fibroblast growth factor
FGFR2	Fibroblast growth factor rezeptor 2
g	Gramm

H <sub>2</sub> O	Wasser
HRP	horseradish-Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
hTCEpi-Zelllinie	mit Telomerase immortalisierte menschliche corneale Epithelzelllinie
ICC	Immuncytochemie
ICSBP	interferon consensus sequence-binding protein
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IHC	Immunhistochemie
IHC-P	immunhistochemische Färbungen auf Paraffinschnitten
IRF8	Interferon regulatory factor 8
IRF8 <sup>-/-</sup>	IRF8-Knockout
ISRE	Interferon-stimulated response element
kDa	Kilodalton
KGM-2	Keratinocyte Growth Medium-2
Log	Logarithmus
LSZI	Limbusstammzellinsuffizienz
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MHC-I	Major Histocompatibility Complex 1
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat

N-Cadherin	neuronaies Cadherin
ng	Nanogramm
NP40	Nonident P40
OD	optische Dichte
PAS-Färbung	Periodic Acid Schiff's-Färbung
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
PVZ	Populationsverdopplungszeit
RNA	ribonucleid acid
rpm	rounds per minute
SD	standard deviation
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SJS	Stevens-Johnson-Syndrom
SLET	simple limbal epithelial transplantation
TAC	transient amplifying cell
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-buffered saline
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
UV	Ultraviolet
W	Watt
WT	Wildtyp

# **1 Einleitung**

## **1.1 Anatomie der humanen Cornea**

Die Cornea bildet zusammen mit der Sklera die äußere Augenhaut und trennt die vordere Augenkammer mit dem Kammerwasser von der Außenwelt. Häufig wird sie als „Fenster zur Welt“ bezeichnet. Denn durch ihre Transparenz und die mit ca. 43 Dioptrien anteilig größte Brechkraft des Sehapparates hat sie eine enorme Bedeutung für den Sehprozess und die Sehschärfe. Die Hornhaut des menschlichen Auges hat einen Durchmesser von durchschnittlich 11 mm und ist im Zentrum etwa 550 µm dick, wobei sie zur Peripherie hin dicker wird (bis zu 700 µm). Weiterhin ist die Hornhaut frei von Blutgefäßen, weshalb sie durch Diffusion aus dem Kammerwasser, dem Tränenfilm und den conjunctivalen Blutgefäßen mit Nährstoffen versorgt werden muss. Im Bereich des Limbus geht die Hornhaut in die Sklera beziehungsweise in die Conjunctiva über (Lüllmann-Rauch und Asan 2015).

### **1.1.1 Aufbau und Struktur der Cornea**

Die Hornhaut selbst besteht aus mehreren Schichten. Die innerste Schicht bildet das corneale Endothel. Dieses ist einschichtig und aus hexagonalen Zellen aufgebaut, grenzt innen an die vordere Augenkammer und steht dort mit dem Kammerwasser in direktem Kontakt. Die Endothelzellen sind über Zonulae adherentes und occludentes miteinander verbunden und verhindern so ein unkontrolliertes Eindringen von Kammerwasser in die nachfolgenden cornealen Schichten. Sie sind außerdem über Natrium-Kalium-ATPasen aktiv in den Wasserhaushalt der Hornhaut eingebunden und können über diese überschüssiges Wasser in die vordere Augenkammer abpumpen. Im Falle eines Verlustes an Endothelzellen können diese nicht durch Zellteilung ersetzt werden, weshalb die Anzahl an Endothelzellen im Verlauf des Lebens abnimmt. Der Verlust wird durch eine Verdünnung und Ausbreitung der benachbarten Endothelzellen kompensiert, sodass es nicht zu einer Visusbeeinträchtigung kommt. Es folgt die 5-10 µm dicke, aus fibrillärem Kollagen VIII bestehenden, Descemet-Membran. Diese stellt die Basalmembran der Endothelzellen dar und gewinnt im Laufe des Lebens an Dicke hinzu. Sie kann bei einem Erwachsenen dreimal so dick wie das Endothel werden. (Lüllmann-Rauch und Asan 2015; Welsch 2014; Kohnen 2011).

Vor der Descemet-Membran befindet sich das Stroma. Dieses besteht aus Typ-I-Kollagenfibrillen, Proteoglykanen, Wasser, einzelnen elastischen Fasern und Fibroblasten. Es macht mit 400-500 µm den größten Anteil der Hornhautdicke aus. Für die Transparenz des Stromas sind die parallele Anordnung der Kollagenfibrillen in ca. 200 Lamellen sowie der kontrollierte Wasserhaushalt von Bedeutung. Kommt es beispielsweise durch einen Endotheldefekt zu einem unkontrollierten Wassereinstrom in das Stroma, führt dies zu einem

Aufquellen und einer Eintrübung der Cornea. Im Bereich des Limbus geht das transparente Stroma allmählich in die undurchsichtige Sklera über. Anterior des Stromas liegt die Bowman-Schicht, welche glykoproteinreich ist und unregelmäßig angeordnete Kollagenfasern vom Typ I und II enthält. Diese Schicht ist, wie auch die Descemet-Membran, nicht regenerationsfähig (Lüllmann-Rauch und Asan 2015; Welsch 2014; Kohnen 2011).

Die äußerste Schicht der Hornhaut bildet das Epithel. Es ist im Durchschnitt 50 µm dick und besteht aus einem fünf- bis sechsschichtigen unverhornten Plattenepithel. Im Epithel lassen sich Basalzellen, Flügelzellen und Oberflächenzellen voneinander unterscheiden. Die innen liegenden basalen Zellen sind kubisch und über Hemidesmosomen an der Basalmembran verankert. Untereinander sind die Basalzellen über tight junctions miteinander verbunden. Die darüber liegenden Flügelzellen überspannen die Basalzellen schirmartig und bilden kleine flügelartige Fortsätze aus. Die Oberflächenzellen stellen das ausdifferenzierte Stadium der Epithelzellen dar. Sie sind stark abgeflacht und deutlich dünner als die Basalzellen und die Flügelzellen. Die apikale Membran der Oberflächenzellen besitzt zahlreiche Mikrovilli, Mikrofaltungen und eine komplexe Glykokalyx. Diese dienen der Haftung des Tränenfilms sowie der Wasserhaushaltsregulation durch Natrium-Kalium-ATPasen und der Versorgung mit Nährstoffen (Lüllmann-Rauch und Asan 2015; Welsch 2014; Kohnen 2011).

Zwischen der Basalmembran des cornealen Epithels und dem Stroma liegt die Bowman-Schicht (Lamina limitans anterior), welche aus Proteoglykanen und Kollagenfibrillen besteht. Diese Zusammensetzung lässt auf eine stromale Herkunft schließen. Über die Bowman-Schicht ist die Basalmembran der Epithelzellschicht mit dem Stroma verankert. Von der basalen Zellschicht ausgehend kann das Epithel innerhalb von sieben Tagen komplett erneuert werden. Im Bereich des Limbus geht die transparente Cornea in die Conjunctiva bulbi beziehungsweise in die Sklera über (Lüllmann-Rauch und Asan 2015; Welsch 2014; Kohnen 2011).

### **1.1.2 Regeneration des cornealen Epithels**

Die corneale Integrität ist für die refraktive Funktion der Cornea und für den Schutz des Auges von herausragender Bedeutung, weshalb der Regeneration der Hornhaut eine besondere Rolle zukommt. Das corneale Epithel unterliegt einer ständigen Selbsterneuerung, da die Oberflächenzellen durch den Wimpernschlag fortlaufend abgeschilfert werden. So erreicht eine Basalzelle innerhalb von sieben Tagen die Position einer Oberflächenzelle, wobei sie zunehmend ausdifferenziert. Da Läsionen der Hornhaut durchaus häufig vorkommen, ist die Selbsterneuerungsfähigkeit auch bei der Wundheilung von Bedeutung. Die Regeneration der Hornhaut geht von einer epithelialen Stammzellpopulation im Bereich des Limbus aus, welche für die lebenslange Erneuerung des Epithels zuständig ist. Bereits 1983 stellten Thoft et al. die XYZ-Hypothese auf, welche den Limbus als Reservoir für epitheliale Stammzellen beschreibt.

Durch asymmetrische Zellteilung entsteht aus einer Stammzelle im Limbus eine Tochterstammzelle und eine Progenitorzelle, welche als transient amplifizierte Zelle (TAC) bezeichnet wird. Diese TAC wandert vom Limbus ausgehend nach zentripetal und unterläuft dabei viele, aber keine unbegrenzte Anzahl an Zellteilungen. Im Laufe der Zellteilungen verliert die TAC fortlaufend ihre stammzellähnlichen Eigenschaften. Die Proteinexpression der TAC ändert sich und sie verliert ihre Plattierungseffizienz. Schlussendlich differenziert sie zu einer superfiziellen Zelle und wird abgeschilfert. Dieser Prozess sorgt sowohl für die ständige Selbsterneuerung der Cornea als auch für die Wundheilung bei Defekten im cornealen Epithel, beispielsweise einer Erosio corneae. Somit steht die XYZ-Hypothese für die Migration von Hornhautzellen von basal nach superfiziell (X), für die vom Limbus ausgehende zentripetale Migration der TAC (Y) und für die Abschilferung der Zellen von der Hornhautoberfläche (Z). Für die corneale Wundheilung und den Zellersatz ist somit sowohl die Proliferation als auch die Zellmigration und -differenzierung von Bedeutung (Thoft und Friend 1983).

### **1.1.3 Aufbau des Limbus**

Der Limbus, welcher als Sitz der Stammzellnische bekannt ist, wird definiert als der Übergang des Stromas in die Sklera beziehungsweise des cornealen Epithels in die Conjunctiva bulbi. Dieser Übergang hat beim Menschen eine Länge von 1,0-1,5 mm und lässt sich in eine vordere (bläuliche) und eine hintere (weiße) Zone unterteilen. Der vordere Abschnitt ist der Bereich des Limbus zwischen dem Ende der Bowman-Schicht und dem Ende der Descemet-Membran. Der hintere Abschnitt beginnt mit dem Ende der Descemet-Membran (Schwalbe-Linie) und endet am Übergang der Iris in den Ziliarkörper, der sogenannten Iriswurzel (Kohnen 2011; Grehn 2012). Beim Menschen ist der Bereich des Limbus bei der Spaltlampenuntersuchung an den Vogt-Palisaden erkennbar, welche erstmals 1930 durch Vogt beschrieben wurden (Vogt 1930). Es handelt sich hierbei um radiär orientierte, fibrovaskuläre Epithelleisten, deren Zwischenräume die epithelialen Stammzellen beherbergen. Die Palisaden sind vor allem am oberen und unteren Limbus, dort wo sie normalerweise vom Augenlid verdeckt werden, stark ausgeprägt (Shortt et al. 2007). Die Stammzellnische des Limbus schützt die dort liegenden Stammzellen vor verschiedenen inneren und äußeren potentiell schädlichen Einflüssen und soll sie vor einer Differenzierung zu cornealen Epithelzellen bewahren (Tseng 1996; Watt 2000). So werden die Stammzellen durch ihre Lage in den Krypten der Vogt-Palisaden und die Abdeckung durch das Augenlid vor mechanischen Schäden geschützt (Shortt et al. 2007). Die Melanozyten, welche in den Krypten der Vogt-Palisaden gehäuft vorkommen, schützen die Stammzellen vor ultraviolettem Licht, welches DNA-Schäden verursachen kann (Higa et al. 2005). Durch die gute Blutversorgung der Limbusregion wird außerdem sichergestellt, dass die Stammzellen bestmöglich mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren versorgt werden (Tseng 1996). Auch die Basalmembran des Epithels unterscheidet sich im Limbus von der zentralen Cornea. So ist neben

dem Fehlen der Bowman-Schicht unterhalb der Basalmembran auch die Zusammensetzung eben dieser eine andere. Die Basalmembran des Limbus enthält Typ IV-Kollagen  $\alpha$ , die Laminine  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$  und  $\gamma 3$ , Nidogen, Agrin, BM40/SPARC, Tenascin-C, Fibronectin, Vitronectin und Thrombospondin-4. Wohingegen die Basalmembran der zentralen Epithelzellen Typ IV-Kollagen  $\alpha 3$ , Typ V-Kollagen, Thrombospondin-1, Fibrillin-1 und Endostatin enthält. Einige der Komponenten der Basalmembran des Limbus sind mit potentiellen Stammzellmarkern der epithelialen Stammzellen kolokalisiert, weshalb vermutet wird, dass die unterschiedliche Zusammensetzung der Basalmembranen ein Faktor bei der Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften ist (Schlötzer-Schrehardt et al. 2007). Des Weiteren stellt der Limbus eine Barriere zur angrenzenden Conjunctiva dar. So wird verhindert, dass die conjunctivalen Zellen und Blutgefäße den Limbus und die Cornea überwuchern, was zur Einschränkung der Transparenz der Cornea und somit zu einer Visusreduktion führen würde (Ahmad 2012). Außerdem befinden sich in der Limbusregion viele antigenpräsentierende Langerhans-Zellen und T-Lymphozyten zur bestmöglichen Immunabwehr (Vantrappen et al. 1985).

#### **1.1.4 Limbale epitheliale Stammzellen**

In vielen menschlichen Geweben, wie zum Beispiel dem Knochenmark, den gastrointestinalen Organen und dem Auge, gibt es Populationen von sogenannten adulten Stammzellen. Diese Stammzellen sind im Gegensatz zu den embryonalen Stammzellen in ihren Differenzierungsmöglichkeiten eingeschränkt und zählen somit zu den multipotenten Zellen. Multipotente (adulte) Stammzellen sind nicht mehr in der Lage verschiedene Organsysteme zu bilden, können allerdings verschiedene Gewebetypen eines Organs produzieren. Die Stammzellen selbst sind undifferenziert und haben keinerlei gewebetypischen Funktionen, da sie in erster Linie dem Zellersatz dienen. Innerhalb ihres Organsystems machen die Stammzellen nur einen geringen Anteil an der Gesamtzellzahl aus. Um die Anzahl an Stammzellen im Gewebe aufrecht zu erhalten, sind diese in der Lage symmetrische Zellteilungen zu durchlaufen. Hierbei entstehen aus einer cornealen Stammzelle zwei neue Tochterstammzellen, welche hinsichtlich ihrer Eigenschaften der Ursprungsstammzelle entsprechen. Allgemein teilen sich die Stammzellen nur langsam, besitzen allerdings ein hohes klonogenes Potential (Alison et al. 2002, Alison und Islam 2009; Morrison und Kimble 2006). Die Stammzellen der Cornea befinden sich, wie oben beschrieben, in den Krypten der Vogt-Palisaden des Limbus. Diese Zellen teilen sich in ihrer Ruhephase nur sehr langsam oder befinden sich sogar im Wachstumsarrest. Bei Verletzungen der Hornhaut steigt die Zellteilungsrate jedoch erheblich an. Die Stammzellen durchlaufen nun asymmetrische Zellteilungen und bilden jeweils eine neue Stammzelle und eine transient amplifizierte Zelle (TAC) Diese TAC wandert im Rahmen des Gewebeersatzes nach zentripetal und sorgt so für den fortlaufenden Zellersatz im cornealen Epithel (siehe 1.1.2). Außerdem besitzen die Stammzellen des Limbus ein deutlich höheres klonogenes Potential als

die basalen Zellen der zentralen Cornea. Auch die Morphologie der limbalen Stammzellen unterscheidet sich von den Zellen der zentralen Hornhaut. Sie sind kuboid, haben einen Durchmesser von 10  $\mu\text{m}$  und ein hohes Kern-Plasma-Verhältnis. Außerdem weisen sie wenige Zellorganellen und intrazelluläre Verbindungen auf, was ein Indiz für eine geringe Zellteilungsrate darstellt. Auch die Multipotenz der limbalen Stammzellen konnte schon gezeigt werden. So sind sie in der Lage, neben den epithelialen Hornhautzellen, verschiedenste Zelltypen, wie Fibroblasten, Photorezeptoren und neuronale Zellen in Abhängigkeit von ihrer Umgebung zu bilden (Kawakita et al. 2005; Zhao et al. 2008b; Zhao et al. 2002).

Zur eindeutigen Unterscheidung der limbalen Stammzellen von TAC oder ausdifferenzierten Zellen sind Stammzellmarker notwendig. Diese können entweder exklusiv von den jeweiligen Zellen exprimiert werden oder die Zellen durch ihr Fehlen kennzeichnen.

Typisch für limbale epitheliale Stammzellen ist das Fehlen von Zytokeratin 3 und 12. Diese Zytokeratine sind spezifische Intermediärfilamente des Zytoskeletts von differenzierten cornealen Epithelzellen. Das bedeutet, dass die differenzierten Zellen der peripheren und zentralen Cornea diese Zytokeratine exprimieren, jedoch nicht die limbalen Stammzellen (Schermer et al. 1986; Kurpakus et al. 1990). Zu denen, von limbalen epithelialen Stammzellen exprimierten Zytokeratinen, zählt das Zytokeratin 14 (CK14). Dieses Zytokeratin wurde ursprünglich als Marker für epitheliale Stammzellen der Haut entdeckt (Moll et al. 1982; Fuchs und Green 1980), konnte aber auch als potentieller Marker für limbale Stammzellen nachgewiesen werden (Kasper et al. 1988). Die CK14-Expression ist in der basalen Zellschicht des Limbus besonders hoch, wohingegen die basalen Zellen der zentralen Cornea eine wesentlich geringere Expression aufweisen. Da jedoch auch basale und superfizielle Zellen der limbusnahen Cornea eine Expression zeigen, ist es wahrscheinlich, dass auch die TAC eine Expression aufweisen. Die an den Limbus grenzende Conjunctiva zeigt ebenfalls eine starke Expression von CK14 (Zhao et al. 2008a; Yoshida et al. 2006).

Allgemeine Stammzellmarker, wie Oct4 und Nanog, die unter anderem für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz und die Verhinderung einer Differenzierung benötigt werden, konnten ebenfalls in limbalen Epithelzellen nachgewiesen werden (Zhou et al. 2010; Pauklin et al. 2011; Luo et al. 2013).

Der Transkriptionsfaktor p63, der bereits als Stammzellmarker der Keratinozyten der Epidermis beschrieben ist, wird ebenfalls von limbalen Epithelstammzellen exprimiert (Pellegrini et al. 2001). Er spielt eine wichtige Rolle bei der epithelialen Entwicklung und der Differenzierung. So fehlt bei p63-defizienten Mäusen das mehrschichtige Plattenepithel, was auf eine mangelhafte Aufrechterhaltung der Stammzellpopulationen zurückgeführt werden kann (Yang et al. 1999). Neuere Studien zeigen jedoch, dass p63 kein spezifischer Marker für limbale Stammzellen ist, da

auch basale Zellen der peripheren und zentralen Cornea diesen Transkriptionsfaktor exprimieren (Dua et al. 2003). Di Iorio et al. untersuchten daraufhin die verschiedenen Isoformen von p63 und wiesen die Isoform  $\Delta Np63\alpha$  als spezifischeren Marker für limbale epitheliale Stammzellen nach. Dafür sprechen die Existenz von  $\Delta Np63\alpha$ -positiven Clustern ausschließlich im limbalen basalen Epithel, die geringe Anzahl an positiven Zellen (8 %) sowie die deutliche Expression in Holoklonen (höchste proliferative Kapazität) und die fehlende Expression in Mero- und Paraklonen (niedrigere proliferative Kapazität) (Di Iorio et al. 2005).

Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (FGFR2), welcher zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen gehört, stellt ebenfalls einen potentiellen Marker limbalen epithelialer Stammzellen dar. Bereits 1997 konnte dieser Rezeptor in der sich entwickelnden Cornea von Ratten nachgewiesen werden (de Iongh et al. 1997). Der FGFR2 bindet hochaffin die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren 7 und 10 (FGF-7 und -10), welche unter anderen von stromalen Zellen der Cornea sezerniert werden können (Li und Tseng 1996). Über FGF-7, welches vor allem bei Verletzungen verstärkt ausgeschüttet wird, ist der FGFR2 stark in die corneale Wundheilung und somit in die Proliferation der limbalen Stammzellen eingebunden (Carrington und Boulton 2005). Außerdem spielt der FGFR2 eine wichtige Rolle in der Differenzierung von Stammzellen und der Aufrechterhaltung der Pax6-Expression, welche von enormer Bedeutung für die Entwicklung des Auges und der epithelialen Strukturen ist (Zhang et al. 2015).

Das transmembranäre Glykoprotein N-Cadherin (neuronales Cadherin) wird im Limbus in basalen Epithelzellclustern exprimiert und zeigt außerdem eine Koexpression mit den oben beschriebenen Stammzellfaktoren CK14 und  $\Delta Np63\alpha$  (Hayashi et al. 2007; Higa et al. 2009). Über eine Koexpression mit Frizzled 7 ist es vermutlich in den stammzelltypischen wnt-Signalweg involviert (Mei et al. 2014). Außerdem zeigen N-Cadherin-positive Zellen in vitro ein höheres proliferatives Potential, als N-Cadherin-negative Zellen. Weiterhin ist das Glykoprotein mit dem aus Melanozyten stammenden Melan A assoziiert. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die limbalen epithelialen Stammzellen über N-Cadherin Kontakt zu den Melanozyten der Stammzellnische besitzen. Da N-Cadherin in der Stammzellnische des Knochenmarks an der Regulation der Stammzell-Stilllegung beteiligt ist, wird vermutet, dass dies in der Stammzellnische des Limbus ebenfalls der Fall sein kann (Hayashi et al. 2007; Zhang et al. 2003). Hier wurde es bereits als möglicher Faktor bei der Aufrechterhaltung von Progenitorzellen in Kolonien von limbalen epithelialen Stammzellen beschrieben (Higa et al. 2009).

Zusätzlich zu den hier beschriebenen Stammzellmarkern gibt es noch eine Reihe an weiteren potentiellen Markern. Es besteht jedoch das Problem, dass eine Unterscheidung von den limbalen epithelialen Stammzellen zu den frühen TAC bislang nicht vollständig möglich ist. Bislang wird

die Kombination mehrerer Stammzellmarker als die beste Möglichkeit, limbale epitheliale Stammzellen zu isolieren, angesehen. Jedoch besteht auch hier die Möglichkeit, dass sich unter diesen Zellen vor allem die frühen TAC befinden, weshalb es bislang nicht möglich ist, ausschließlich limbale epitheliale Stammzellen zu isolieren (Schlötzer-Schrehardt und Kruse 2005).

Ebenfalls von enormer Bedeutung für die limbalen epithelialen Stammzellen sind die für Stammzellen typischen Signalwege. Der wnt/ $\beta$ -catenin-Signalweg ist unter anderem wichtig für die Regulierung der Selbsterneuerung von Stammzellen sowie für die Steuerung der Embryogenese (Dickinson und McMahon 1992). In den limbalen Stammzellen wird die Proliferation und die Aufrechterhaltung einer undifferenzierten Form durch diesen Signalweg gesteuert (Nakatsu et al. 2011). Ein weiterer bedeutender Signalweg in Stammzellen ist der TGF- $\beta$  Signalweg. Dieser spielt ebenfalls eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften (Watabe und Miyazono 2009). In der Cornea konnten bereits verschiedene Komponenten des TGF- $\beta$  Signalwegs nachgewiesen werden, was bedeutet, dass dieser auch hier eine Rolle spielt. So ist dieser Signalweg wichtig für die Kontrolle des Zellwachstums, der Wundheilung und Differenzierung (Nishida et al. 1994). Als Bestandteile dieses Signalweges sind vor allem die TGF- $\beta$ -Rezeptoren I und II in der Limbusregion exprimiert, wohingegen diese in der zentralen Cornea kaum vorhanden sind (Joyce und Zieske 1997).

### **1.1.5 Limbusstammzellinsuffizienz**

Der Limbusstammzellinsuffizienz (LSZI) liegt ein Funktionsverlust der limbalen Stammzellen zu Grunde, welcher unterschiedliche Ursachen haben kann. In der Maximalform kommt es im Verlauf zu starken Schmerzen und Visuseinschränkungen bis hin zur Erblindung des Betroffenen. Deshalb ist eine frühzeitige Therapie unabdingbar.

#### Ätiologie und Pathogenese

Das Krankheitsbild der LSZI zählt zu den seltenen Erkrankungen, welche sich in drei ätiologische Gruppen einteilen lässt: hereditär, erworben und idiopathisch. Zu der hereditären LSZI kommt es auf Grund einer primären Zerstörung der limbalen Stammzellen beispielsweise im Rahmen einer kongenitalen Aniridie, epidermalen Dysplasie und Keratitis mit multipler endokriner Insuffizienz. Zu den erworbenen Ursachen der LSZI zählen Verätzungen und Verbrennungen an der Augenoberfläche sowie autoimmunologische Erkrankungen, wie das Stevens-Johnson-Syndrom (SJS), die toxisch-epidermale Nekrolyse (TEN) und das okuläre Pemphigoid. Auch iatrogene Auslöser der Krankheit, wie multiple chirurgische Eingriffe, Therapie mit Antimetaboliten (Mitomycin C, 5-Fluorouracil) und eine Bestrahlung des Kopf-Hals-Bereiches gehören zu dieser Gruppe. In den letzten Jahren ist auch das Tragen von vor allem weichen Kontaktlinsen als Ursache für die LSZI identifiziert worden. Weitere Auslöser der erworbenen LSZI sind schwere

mikrobielle okuläre Entzündungen mit Limbusbeteiligung, chronische Limbitis, periphere ulcerierende Keratitis, chronisch bullöse Keratopathie und das Pterygium. Bei dieser zweiten Gruppe führen die oben genannten Ursachen zu einer Destruktion der Stammzellnische am Limbus und darüber zu einer Schädigung der limbalen Stammzellen. Die Ursache der idiopathischen Form ist unbekannt. Es wird weiterhin zwischen einer partiellen und einer kompletten LSZI unterschieden. Bei der partiellen Form kommt es zu einer lokal begrenzten Zerstörung von limbalen epithelialen Stammzellen. Diese führt dazu, dass aus diesem Bereich ein vaskularisierter Pannus auf die Hornhautoberfläche wächst, welcher das Sehvermögen erheblich reduzieren kann. Bei der kompletten LSZI sind die meisten der limbalen epithelialen Stammzellen zerstört, was zu einer vollständigen Conjunctivalisierung und Vaskularisierung der Hornhautoberfläche führt. Die Schädigung im Limbusbereich führt zu Störungen der Eigenschaften der dort liegenden Zellen. Die Barrierefunktion der Nische geht verloren und die Regeneration der Hornhaut durch limbale epitheliale Stammzellen ist nicht mehr gewährleistet (Grueterich 2012; Lang und Lang 2015; Walter und Plange 2017; Rossen et al. 2016; Puangsricharern und Tseng 1995).

### Klinik

Das Initialstadium der LSZI verläuft häufig asymptomatisch. Im Verlauf der Erkrankung klagen Betroffene über eine erhöhte Lichtempfindlichkeit, ein reduziertes Sehvermögen, Epiphora, Blepharospasmus und rezidivierende Schmerzen im Augenbereich. Durch die gestörte Regeneration der Hornhaut kommt es außerdem zu persistierenden, schmerzhaften Erosionen, welche die Gefahr einer sekundären Infizierung und Ulceration mit sich bringen. Durch die verlorengegangene Barrierefunktion der limbalen Stammzellnische kommt es zum überschießenden Wachstum der Conjunctiva über den Limbus hinaus. Dieses Phänomen wird als Conjunctivalisierung der Cornea beschrieben und ist teilweise bereits mit bloßem Auge sichtbar. Bei besonders fortgeschrittenen Fällen kann sich auf der Hornhautoberfläche ein fibrovaskulärer bzw. degenerativer Pannus bilden, welcher der Augenoberfläche ein hautähnliches Aussehen verleiht und das Sehvermögen massiv einschränkt und bis zur völligen Erblindung führen kann (Grueterich 2012; Walter und Plange 2017).

### Diagnostik

Von entscheidender Bedeutung in der Diagnostik bei LSZI sind die Anamnese und die ophthalmologische Untersuchung. Bei der spaltlampenmikroskopischen Untersuchung fallen die bereits beschriebene Conjunctivalisierung und Vaskularisierung der Hornhautoberfläche auf. Fehlende Vogt'sche Palisaden in der Limbusregion können einen Hinweis auf eine bestehende LSZI sein. Bei einer Fluoreszein-Anfärbung der Hornhaut kommt es im Falle einer Conjunctivalisierung zum sogenannten „*late-staining*“, was für das Vorliegen einer LSZI typisch ist (Huang et al. 1990). Zur Diagnosesicherung wird eine corneale Impressionszytologie

durchgeführt, bei welcher die oberflächlichen Hornhautzellen zytologisch untersucht werden. So spricht das Vorhandensein von typischen conjunctivalen Zellen (Becherzellen), sowie das Fehlen des hornhauttypischen Zytokeratin 3 für das Vorliegen einer LSZI. Durch die in vivo konfokale Mikroskopie der Limbusregion, welche eine höhere Auflösung als die Spaltlampenmikroskopie ermöglicht, lässt sich die Diagnose LSZI außerdem bestätigen (Singh et al. 2005; Walter und Plange 2017; Ahmad et al. 2010; Grueterich 2012; Miri et al. 2012).

### Therapie

Im Bereich der Therapie der LSZI hat es in den letzten Jahren einige Fortschritte durch die Einführung neuer Verfahren gegeben. Die bislang etablierten Verfahren der autologen und homologen Transplantation, bei denen limbares Gewebe von gesunden auf erkrankte Augen transplantiert wird, wurden durch Therapien mit kultivierten limbalen Stammzellen ergänzt.

Für das Endergebnis der Behandlung ist es, unabhängig von der Therapieform, wichtig, dass im Vorfeld die Augenoberfläche optimiert und entsprechend vorbehandelt wird. Dies dient der Schaffung eines möglichst optimalen Milieus für die noch vorhandenen Stammzellen im erkrankten Auge und die später transplantierten Stammzellen. Außerdem soll dadurch intaktes corneales Epithel erhalten werden. Wichtig hierbei ist eine Behandlung von potentiell Ursachen der LSZI, wie conjunctivalen Tumoren, okulären Infektionen oder einer extremen Sicca-Symptomatik sowie auch palpebrale Ursachen. Auch eine Behandlung anderer okulärer Komorbiditäten ist von Bedeutung. Ein Tränenmangel sollte durch Tränenersatzmittel, „punctum plugs“ oder autologe Serumaugentropfen ausgeglichen werden. Auch Veränderungen im Bereich der Lider oder der Conjunctiva, wie beispielsweise eine Symblepharonbildung, Trichiasis oder ein Lagophthalmus, sollten behoben werden. Vor der Therapie sollten außerdem vorhandene Systemerkrankungen bestmöglich therapiert werden (Meller und Thomasen 2017).

Die zwei bislang etabliertesten Verfahren zur Therapie der LSZI sind die autologe und die homologe Transplantation. Sie unterscheiden sich in erster Linie in der Herkunft des Spendergewebes. Beiden Verfahren ist gemein, dass die nicht mehr vorhandenen Limbusstammzellen im betroffenen Auge durch die Transplantation von intaktem Limbusgewebe ersetzt werden. Die autologe Transplantation wird vor allem bei unilateraler LSZI angewandt. Es werden vom gesunden Auge des Patienten zwei Transplantate aus der Limbusregion entnommen, wobei die Transplantatgröße von der Defektgröße am erkrankten Auge abhängig ist. Das entnommene Gewebe wird auf das erkrankte Auge transplantiert. Bei Patienten, die an primärer oder beidseitiger LSZI erkrankt sind, steht kein gesundes eigenes Auge zur Entnahme von Limbusgewebe zur Verfügung. Bei dieser Patientengruppe kann anstelle der autologen Transplantation die homologe Transplantation durchgeführt werden. Hierbei wird Limbusgewebe von kürzlich Verstorbenen oder von Verwandten des Patienten entnommen und

auf das erkrankte Auge des Patienten transplantiert. Nachteilig hierbei ist, dass der Patient in der Regel eine Immunsuppression zur Verhinderung einer Abstoßungsreaktion benötigt. Außerdem ist bei einer Lebendspende das Endergebnis besser. Sowohl bei der autologen als auch bei der homologen Transplantation besteht im Falle einer Lebendspende durch die Entnahme von Limbusgewebe an einem gesunden Auge, das Risiko einer iatrogen verursachten LSZI (Meller et al. 2002, Pellegrini et al. 1997, Sangwan et al. 2012).

In den letzten Jahren wurde die Möglichkeit der ex vivo Kultivierung von limbalen Stammzellen und anschließender Transplantation etabliert, was als „*cultivated limbal epithelial transplantation (CLET)*“ bezeichnet wird. Dieses Verfahren wurde 1997 erstmals beschrieben (Pellegrini et al. 1997) und in den letzten Jahren weiterentwickelt. Bei der CLET wird entweder homolog oder autolog eine kleine Limbusbiopsie (2x2mm) durchgeführt und die so entnommenen limbalen Epithelstammzellen auf humaner kryokonservierter Amnionmembran oder auf einem fibrinbasierten Substrat kultiviert und expandiert. Durch die deutlich kleinere Gewebeentnahme wird das Risiko für eine iatrogene LSZI erheblich reduziert. Mittlerweile wurden zwei verschiedene Kultivierungstechniken entwickelt. Zum einen die Explantatechnik, bei der die entnommenen Zellen auf humaner Amnionmembran in vitro kultiviert und nach 2-3 Wochen auf das erkrankte Auge retransplantiert werden (Meller et al. 2002). Bei der zweiten Methode, dem Suspensionsverfahren, werden nach der Gewebeentnahme die limbalen Stammzellen enzymatisch aus dem Gewebeverband herausgelöst. Diese vereinzelt Zellen werden dann auf Fibrinsubstratträgern oder auf einer Amnionmembran kultiviert und bei Konfluenz auf das erkrankte Auge retransplantiert (Pellegrini et al. 1997). Besonders gut geeignet ist das Verfahren der CLET bei LSZI in Folge von Verbrennungen und Verätzungen, welche mit 20 % die häufigste Ursache der Erkrankung darstellen (Spoler et al. 2008). Bei Transplantation von allogenen Gewebe kann eine Immunsuppression notwendig sein und außerdem besteht die Gefahr von Krankheitsübertragungen. Mit einer Erfolgsrate von 70 % stellt dieses Verfahren eine gute Alternative zu den bereits etablierten Verfahren dar (Haagdorens et al. 2016).

Im Jahr 2012 entwickelten Sangwan et al. ein neues Verfahren, welches simple limbal epithelial transplantation (SLET) genannt wird (Sangwan et al. 2012). Hierbei wird ebenfalls eine 2x2mm kleine Gewebeprobe aus der Limbusregion eines gesunden Auges entnommen und in viele kleine Stücke zerteilt. Diese werden dann mittels Fibrinkleber auf eine frische Amnionmembran, welche im Vorfeld auf dem erkrankten Auge befestigt wurde, aufgetragen und in vivo expandiert. Der ideale Patient/die ideale Patientin für dieses Verfahren hat eine unilaterale LSZI, aber eine intakte Tränenproduktion, was beispielsweise bei Tumoren mit Limbusbeteiligung (Kaliki et al. 2017) oder auch bei Verbrennungen oder Verätzungen der Fall sein kann. Postoperativ wird auf das Auge zum Schutz der transplantierten Zellen eine Kontaktlinse aufgesetzt und antibiotische und steroidhaltige Augentropfen appliziert. Bereits nach dem zweiten postoperativen Tag ist eine

Proliferation des Hornhautepithels aus den Transplantaten sichtbar und nach 4-12 Tagen ist eine vollständige Epithelialisierung der Hornhaut erreicht (Mittal et al. 2015). Erste Studien zu diesem noch jungen Therapieansatz sind sehr erfolgsversprechend, müssen allerdings auf Grund der noch geringen Probandenanzahl der ersten Studien noch validiert werden (Haagdorens et al. 2016).

Ein erstes stammzellbasiertes Arzneimittel (Holoclar<sup>®</sup>) zur Therapie der LSZI wurde im Februar 2015 auf den Markt gebracht. Es enthält autologe humane Hornhautepithelzellen mit etwa 3,5 % limbalen Stammzellen auf einer Fibrinmembran und ist ausschließlich zur Therapie der uni- und bilateralen LSZI durch Verbrennungen oder Verätzungen zugelassen. Voraussetzung für die Therapie ist ein intakter Limbusbereich der Patienten/Patientinnen von 1-2 mm<sup>2</sup>, aus welchem eine Biopsie genommen wird und die so gewonnenen Zellen ex vivo expandiert werden. Die Zellen werden so lange expandiert, bis die optimale Zellzahl von 79.000-315.000 Zellen pro cm<sup>2</sup> erreicht ist. Anschließend wird die Membran mit den expandierten Zellen auf das Defektareal aufgebracht. Durch diese Methode konnte das Risiko einer Transplantatabstoßung und einer iatrogenen LSZI minimiert werden. In einer multizentrischen, unkontrollierten, retrospektiven Fallserien-Kohortenstudie mit 106 Patienten und Patientinnen wurde für 72,1 % der Fälle ein positives Endergebnis festgestellt. Die Sehschärfe der Betroffenen verbesserte sich und die Anzahl an Betroffenen mit Symptomen sank. (Bakker und Langer 2015; European Medicines Agency 2015).

Homologe Stammzellen können auch im Rahmen der Hornhauttransplantation als Limbokeratoplastik (Reinhard et al. 2004), als tektonische add-on-Sklerokorneoplastik (Krause et al. 1995), als modifizierte Sklerokorneoplastik (Viestenz et al. 2018) und als PALT (Kesper et al. 2021) übertragen werden.

Durch diese neuartigen Therapieoptionen ist auch das Interesse an den Eigenschaften und der Beeinflussbarkeit der limbalen epithelialen Stammzellen gewachsen. Bei dem Verfahren der CLET und bei Holoclar können verbesserte oder neue Kultivierungsprotokolle therapeutische Vorteile bedeuten. Außerdem kann untersucht werden, ob Augentropfen mit speziellen Inhaltsstoffen die Proliferation der Stammzellen und Heilung der Augenoberfläche beschleunigen, was bei allen Therapieverfahren sinnvoll wäre, wie beispielsweise schon Wu et al. und Stachon et al. zeigen konnten (Wu et al. 2015; Stachon et al. 2017).

## **1.2 Interferon regulatory factor 8 (IRF8)**

Der Transkriptionsfaktor IRF8 (*Interferon-regulatory factor 8*), auch bekannt als ICSP (interferon consensus sequence-binding protein) wurde erstmals 1990 beschrieben und gehört zur Familie der IRFs, welche bei Säugetieren aus neun Mitgliedern besteht. Die Expression des 50 kDa großen IRF8 wird durch Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) hochreguliert, wohingegen die Expression der anderen Mitglieder der IRF-Familie hauptsächlich durch die Interferone  $\alpha$  und  $\beta$  stimuliert wird.

IRF8 bindet mit seiner N-terminalen DNA-bindenden Domäne an eine bestimmte DNA-Sequenz, die *interferon-stimulated response element* (ISRE) genannt wird und sich an der Promotor-Region des MHC I-Gens befindet. Dort kann IRF8 mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren und die Translation von Genen beeinflussen. IRF8 ist vor allem im Zellkern, aber zu einem geringeren Anteil auch zytoplasmatisch aufzufinden (Driggers et al. 1990; Nelson et al. 1993; Tamura et al. 2008).

Exprimiert wird IRF8 vor allem in hämatopoetischen Zellen, wobei die Funktionen vielseitig sind. So wird IRF8 zum Beispiel in B-Zellen, T-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert (Nelson et al. 1993). In T-Zellen bewirkt IRF8 eine Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen (Holtschke et al. 1996) und induziert durch eine Aktivierung der Interleukin-12-Produktion in Makrophagen die Differenzierung von TH0-Zellen zu TH1-Zellen (Scharton-Kersten et al. 1997). Neben der Aktivierung der Interleukin-12-Produktion in Makrophagen ist IRF8 hier für die Induktion von IFN- $\gamma$ -induzierbaren Genen von Bedeutung, welche eine wichtige Rolle bei der Abwehr bakterieller Infektionen spielen (Contursi et al. 2000). IRF8 hat außerdem eine tumorsuppressive Funktion in myeloischen Zellen. Mäuse mit einem Knockout des IRF8-Gens entwickeln ein Krankheitsbild, das der chronisch-myeloischen Leukämie (CML) sehr ähnlich ist. Ein weiterer Hinweis für einen bedeutenden Effekt in der myeloischen Zellreihe ist, dass der IRF8-Spiegel bei Patienten mit CML und AML im Vergleich zur Normalbevölkerung erniedrigt ist (Holtschke et al. 1996; Schmidt et al. 1998). In hämatopoetischen Stammzellen und lymphoiden Progenitorzellen wird IRF8 kaum exprimiert, dafür aber in Progenitorzellen der Monozyten, Granulozyten und dendritischen Zellen (Kurotaki et al. 2014; Wang et al. 2014).

In den letzten Jahren konnte IRF8 auch außerhalb des hämatopoetischen Systems nachgewiesen werden. So wird IRF8 außerdem in mikroglialen Zellen des ZNS (Masuda et al. 2012), Osteoklasten (Zhao et al. 2009), Herzmuskelzellen (Jiang et al. 2014), glatten Muskelzellen (Zhang et al. 2014) und gastrischen Epithelzellen (Yan et al. 2016) exprimiert. Auch im Auge konnte bereits eine Expression nachgewiesen werden. So wird es in der Retina in den mikroglialen Zellen der Ganglionzellschicht, in Zellen der inneren Körnerzellschicht, sowie den Photorezeptoren exprimiert (Kim et al. 2015). Nach den Untersuchungen von Li et al. spielt IRF8 außerdem eine entscheidende Rolle bei der Linsenentwicklung (Li et al. 1999). Über eine Expression in der Cornea oder dem Limbus ist bislang nichts bekannt.

## **2 Zielstellung**

Ziel der Arbeit ist, die mit Telomerase immortalisierte menschliche corneale Epithelzelllinie (hTCEpi-Zelllinie) zu charakterisieren. Hierbei soll vor allem die Expression verschiedener Stammzellmarker analysiert werden. Außerdem sollen die Abläufe bei der Differenzierung der Zelllinie näher untersucht werden, wobei auch hier das Hauptaugenmerk auf der Stammzellmarkerexpression liegt.

Basierend auf den Untersuchungen an der Zelllinie soll erstmalig der Transkriptionsfaktor IRF8 sowohl in der hTCEpi-Zelllinie als auch im Mausauge nachgewiesen werden und dessen Einfluss auf die Stammzellen und deren Eigenschaften, insbesondere im Hinblick auf Stammzeleigenschaften, Proliferation und Differenzierung herausgearbeitet werden.

### 3 Material und Methoden

Nachfolgend werden die für die Laborversuche verwendeten Antikörper, Lösungen, Substrate, Chemikalien und Geräte sowie Analyse- und Imaging-Programme aufgelistet.

#### 3.1 Materialien und Geräte

##### 3.1.1 Antikörper

Tabelle 1: Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Anti-FGFR2-Antikörper (IgG)	Kaninchen polyklonal	abcam (ab10648)	1:1000 (IHC-P) 1:500 (ICC)
Anti-p63-Antikörper (IgG)	Kaninchen monoklonal [EPR5701]	abcam (ab124762)	1:500 (IHC-P) 1:200 (ICC)
Anti-Nanog Antikörper (IgG)	Kaninchen polyklonal	abcam (ab80892)	1:200 (IHC-P) 1:200 (ICC)
Anti-N-Cadherin-Antikörper (IgG)	Kaninchen monoklonal [EPR1791-4]	abcam (ab76011)	1:500 (IHC-P)
Anti-E-Cadherin-Antikörper (IgG1)	Maus monoklonal [M168]	abcam (ab76055)	1:100 (IHC-P) 1:200 (ICC)
Anti-Oct4-Antikörper (IgG)	Kaninchen polyklonal	abcam (ab19857)	1:50 (IHC-P) 1:500 (ICC)
Anti-IRF8-Antikörper (IgG)	Kaninchen polyklonal	Invitrogen (PA5-20088)	1:100 (IHC-P) 1:100 (ICC)
Anti-Cytokeratin 14-Antikörper (IgG)	Kaninchen monoklonal [EPR17350]	abcam (ab181595)	1:2000 (IHC-P) 1:1000 (ICC)
Anti-ICSBP-Antikörper (IgG2b)	Maus monoklonal (E-9)	santa cruz (sc-365042)	1:50 (IHC-P) 1:50 (ICC)
Anti-humanes Ki-67/MKI67-Antikörper (IgG)	Schaf polyklonal	R&D Systems (AF7617)	1:20 (ICC)

Tabelle 2: Sekundärantikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Anti-Kaninchen-Antikörper (Alexa Fluor 488 gekoppelt, IgG)	Ziege polyklonal	abcam (ab150077)	1:500 (IHC-P und ICC)

Anti-Maus-Antikörper (Alexa Fluor 488 gekoppelt, IgG)	Ziege polyklonal	abcam (ab150113)	1:500 (IHC-P und ICC)
Anti-Schaf-Antikörper (Alexa Fluor 568 gekoppelt, IgG)	Esel polyklonal	abcam (ab175712)	1:500 (ICC)

### 3.1.2 Chemikalien

Tabelle 3: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Aceton	Fluka
Albumin Fraktion 5 (bovin; BSA (bovine serum albumin))	Roth
Diazobicyclo[2.2.2]octan (DABCO )	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Ethanol 100 %	Sigma
Ethylendiamin-Tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	AppliChem
Glycerol	AppliChem
Hoechst 33258	Fluka
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat ( $MgSO_4 \times 7 H_2O$ )	Merck
Methanol	Fluka
Mowiol 4-88	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem
Natriumdisulfit	Roth
Natriumhydrogencarbonat ( $NaHCO_3$ )	Roth
Nonidet ® P40 (NP40)	AppliChem
Paraformaldehyd (PFA)	Roth
Salzsäure (37 %; rauchend)	Roth
Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat	Roth
Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan (Tris)	Roth
Triton X100	Roth
Tween®20	Roth
Wasserstoffperoxid 30 %	Roth
Xylol	Sigma
Ziegen-Serum (hitzeinaktiviert)	abcam (ab156046)

### 3.1.3 Materialien für die Zellkultivierung

Tabelle 4: Materialien

Materialien	Hersteller
KGM-2 + BulletKit	Lonza
Calciumchlorid-Dihydrat	Roth (Zellkultur getestet)
Penicillin-Streptomycin (10000 U/ $\mu$ l)	ThermoFisher (Art. Nr. 15140122)
Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin)	Sigma
Trypsin-Inhibitor	Serva
Dulbecco's PBS w/o Ca/Mg	Promocell
Fetal bovine serum heat inactivated (FBS)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Gelatine aus Schweinehaut	Sigma
Collagen A	Millipore Merck
Interferon gamma	R&D Systems
Kristallviolett	Merck

Tabelle 5: Zusammensetzung verwendeter Lösungen

Lösungen	Zusammensetzung
Calciumchlorid-Lösung (15mM)	0,11026 g Calciumchlorid-Dihydrat in 50 ml sterilisiertem Wasser gelöst
Kulturmedium (500 ml)	KGM-2 + BulletKit + 5 ml Penicillin-Streptomycin + 5 ml 15 mM Calciumchlorid-Lösung (0,15 mM in Medium)
Trypsin-Inhibitor-Lösung	0,05 % Trypsin-Inhibitor in Dulbecco's PBS w/o Ca/Mg
Einfrriermedium	FBS mit 10 % DMSO
Phosphat-buffered Saline (PBS)	137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid und 12 mM Gesamt-Phosphat ( $\text{HPO}_4^{2-}$ und $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ )
Gelatine-Lösung	0,1 % Gelatine in doppelt destilliertem Wasser gelöst
Blockierungs- und Permeabilisierungslösung	PBS +10 % Ziegen-Serum +0,1 % Triton X100
Fixierungslösung	4% PFA in PBS (pH-Wert = 7,0-7,4)
Primärantikörper-Lösung	Antikörper verdünnt in Blockierungs- und Permeabilisierungslösung (Verdünnungen siehe Tabelle 1)
Sekundärantikörper-Lösung	PBS + 0,5 % BSA
Hoechst-Lösung	10 $\mu$ g/ml Hoechst 33258 in PBS
Eindeckmedium	Mowiol mit 2,5 % DABCO

Collagen A-Lösung	Collagen A und Reinstwasser 1:1 vermischt
Differenzierungsmedium	KGM-2 + BulletKit + Penicillin-Streptomycin + 1,15 mM Calciumchlorid
Stimulationsmedium	Kulturmedium versetzt mit 10 ng/ml Interferon gamma
Kristallviolett-Lösung	50 g Kristallviolett + 500 ml Leitungswasser + 5 g NaCl

### 3.1.4 Materialien für histologische Methoden an Mäuseaugen

Tabelle 6: Materialien

Materialien	Hersteller
Hämalaun-Lösung nach Mayer	Roth
Eosin G	Merck
Entellan	Merck
Schiff's Reagenz	Roth
Periodsäurelösung 1 %	Roth
Trypsin Enzymatic Antigen Retrieval Solution	abcam (ab970)
ZytoChem-Plus HRP Kit, Broad Spectrum	Zytomed systems
Real Antibody Diluent	Dako
3,3'-Diaminobenzidin -Chromogen und Substrat-Puffer	Dako

Tabelle 7: Zusammensetzung verwendeter Lösungen

Lösungen	Zusammensetzung
<i>Scott's tap water</i>	2 g NaHCO <sub>3</sub> + 20g MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O auf 1 L mit dH <sub>2</sub> O auffüllen; pH-Wert = 8
Sulfitwasser	1 g Natriumdisulfit + 10 ml 1 molare Salzsäure + 200 ml Leitungswasser
Tris-buffered Saline (TBS)	50 mM Tris, 150 mM NaCl; pH-Wert = 7,6
Waschlösung	TBS + 0,1 % Tween®20
EDTA-Puffer	1 mM EDTA; pH-Wert = 8,0
Blockierungs- und Permeabilisierungslösung	TBS + 10 % Ziegen-Serum + 0,2 % NP40
Primärantikörper-Lösung	Antikörper verdünnt in Blockierungs- und Permeabilisierungslösung (Verdünnungen siehe Tabelle 1)
Sekundärantikörper-Lösung	TBS + 1 % BSA + 0,2 % NP40
Hoechst-Lösung	10 µg/ml Hoechst 33258 in TBS

Eindeckmedium	Mowiol mit 2,5 % DABCO
Diaminobenzidin-Lösung	ein Tropfen DAB in 1 ml Substrat-Puffer

### 3.1.5 Materialien für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Tabelle 8: Materialien

Materialien	Hersteller
RNAseZAP	Sigma
GenUP™ Total RNA Kit	biotechrabbit
Ethanol (100 % und 70 %)	Sigma
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth
iScript cDNA Synthese Kit	Bio-Rad
dNTP-Mix (25mM each)	Biozym
Taq DNA Polymerase (Thermus aquaticus)	EUR <sub>x</sub>
50x Tris-Acetat-EDTA Elektrophorese Puffer (TAE-Puffer)	Fermentas
Agarose	PeqLab
Ethidiumbromid	Roth
Quantitas DNA-Marker (100 bp - 1000 bp)	Biozym
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Proteinase K	Quiagen

Tabelle 9: Zusammensetzung verwendeter Lösungen

Lösungen	Zusammensetzung
DEPC-behandeltes Wasser	1 ml DEPC in 1 Liter Wasser, über Nacht rühren, autoklavieren
Agarosegel-Lösung	0,3 g Agarose in 30 ml 1x TAE-Puffer lösen (1%ig), 0,3 µl Ethidiumbromid zugeben (0,1 µg/ml)
Lysepuffer	10 mM Tris, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,5 % SDS und 50 µg/ml Proteinase K

**Tabelle 10: verwendete Primer**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>	<b>Annealing-Temperatur</b>
hIRF8 forward	CAGTGGCTGATCGAGCAGATTGA	61,3 °C
hIRF8 reverse	ATTCACGCAGCCAGCAGTTGCCA	61,3 °C
hOct4 forward	AGTGAGAGGCAACCTGGAGA	54,3 °C
hOct4 reverse	ACACTCGGACCACATCCTTC	54,3 °C
hNanog forward	TTCCTTCCTCCATGGATCTG	53,3 °C
hNanog reverse	TCTGCTGGAGGCTGAGGTAT	53,3 °C
hΔNp63 forward	TGCCCAGACTCAATTTAGTGA	62,0 °C
hΔNp63 reverse	TCTGGATGGGGCATGTCTTTG	62,0 °C
hGAPDH forward	AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA	55,0 °C
hGAPDH reverse	GCCAGTGGACTCCACGACGT	55,0 °C

### 3.1.6 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software

6-well-Platten	TPP
24-well-Platten	TTP
AxioCam MRc5	Zeiss
Axiovert 135	Zeiss
Axiovision Rel. 4.6	Zeiss
Chemikalienabzug	Bense Laborbau
Automatische Gewebeinfiltration	Leica TP1020
Brutschrank	Heraeus
Citavi	Citavi
Dampfgarer MultiGourmet	Braun
Deckgläser (verschiedene Größen und Formen)	Menzel-Gläser
Drucker	Kyocera
Einfrierbox für Zellen	ThermoFisher Scientific
Elektrische Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf
Eppendorf Research Pipetten (verschiedene Größen)	Eppendorf
Fettstift ImmEdge®	Vector
Feuchte Kammer	Eigenbau
Fluoreszenzmikroskop	Nikon Eclipse80i
Gefrierschrank	Liebherr
Gelelektrophorese-Kammer	Whatman Biometra Horizon 58
Handschuhe	Meditrade
Image-J	Bildverarbeitungsprogramm

Kamerasystem für Fluoreszenzmikroskop	Color Camera Nikon DS-Fi3
Kryoröhrchen	Greiner Bio-one
Kühlschrank	Liebherr
Magnetrührer	IKA
Microsoft Office	Microsoft
Mikroskop	LEICA DM IL
Mikrotom	ThermoFisher scientific HM 355S
Mikrowelle	Continent MW800
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld
Objektgläser SuperFrost <i>Ultra Plus</i> ®	Thermofisher Scientific
Parafilm	Sigma
PC	Lenovo
pH-Meter	WTW pH526
Pipettenspitzen (verschiedene Größen)	Biozym
Pubmed	NCBI
Reaktionsgefäße (verschiedene Größen)	Eppendorf
Schüttler	CAT RM-5
Serologische Pipetten (verschiedene Größen)	TTP
Einweg-Skalpell	Mediware
Thermocycler	Biometra TGradient und TPersonal
UV-Lampe	Hoefer Mighty Bright UVTM
Zellkulturbank	HERA safe
Zellkultur-Einsätze ThinCert mit Kollagen-I-Beschichtung	Greiner Bio-One
Zellkulturflaschen T25	TPP
Zellkulturschalen 60 cm <sup>2</sup>	TPP
Zentrifuge	Heraeus Biofuge Primo R
Zentrifugenröhrchen (verschiedene Größen)	TTP

## **3.2 Zellkultivierung**

Alle Arbeiten der Zellkultivierung wurden unter Einhaltung sämtlicher Hygiene- und Sicherheitsvorschriften des Universitätsklinikums Halle (Saale) durchgeführt. Falls nicht anders beschrieben, wurden sämtliche Vorgänge unter einer Zellkulturbank durchgeführt.

### **3.2.1 Zelllinie**

Die Zelllinie (hTCEpi-Zelllinie) wurde aus menschlichen, limbalen Epithelstammzellen, die mittels Telomerase immortalisiert wurden, gewonnen (Robertson et al. 2005). Es konnte bereits gezeigt werden, dass diese Zelllinie ein gutes Modell für menschliche limbale Epithelstammzellen darstellt (Robertson et al. 2005; Robertson et al. 2008; Shaharuddin et al. 2016). Die Zelllinie wurde uns freundlicherweise von Frau PD Dr. Ulrike Hampel (Universität Mainz) mit Erlaubnis von Dr. James Jester (University of Southern California) zur Verfügung gestellt.

### **3.2.2 Kultivierung**

Die Zellen wurden in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit 5 ml des Kulturmediums bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung im Brutschrank inkubiert (Standardkulturbedingung). An jedem zweiten Tag wurde das Kulturmedium gewechselt, wobei das alte Medium vorsichtig abgesaugt und im Anschluss 5 ml frisches Kulturmedium hineingegeben wurde.

### **3.2.3 Subkultivierung von Zellen**

Bei einem konfluenten Wachstum von 90 % wurden die Zellen subkultiviert. Zunächst wurde das Kulturmedium abpipettiert und die Zellen mit 4 ml PBS gewaschen. Im Anschluss wurden 1,5 ml vorgewärmte Trypsin-Lösung (37 °C) auf die Zellen gegeben und für fünf Minuten im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Lichtmikroskopisch wurde kontrolliert, ob sich die Zellen sich vom Boden der Kulturflasche abgelöst hatten. Waren noch adhärente Zellen zu sehen, konnten diese durch leichtes Klopfen und Schwenken der Zellkulturflasche vom Boden mobilisiert werden. Anschließend wurden 1,5 ml 37 °C warme Trypsin-Inhibitor-Lösung (Verhältnis Trypsin zu Trypsin-Inhibitor: 1:1) hinzugegeben und die Zellen in Suspension gebracht. Im nächsten Schritt wurde die Zellsuspension abpipettiert, in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und fünf Minuten bei 1000 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und das entstandene Zellpellet in 3 ml des Kulturmediums resuspendiert. Mittels Neubauer-Zählkammer wurde anschließend die Zellzahl bestimmt (siehe 3.2.6). Von der Suspension wurden dann je 375.000 Zellen in neue Zellkulturflaschen, welche bereits 4 ml 37 °C warmes Kulturmedium enthielten, pipettiert. Anschließend wurden die Zellen unter Standardkulturbedingungen inkubiert.

### **3.2.4 Kryokonservierung von Zellen**

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese zunächst mittels Trypsin vom Flaschenboden abgelöst (trypsinisiert). Im Folgenden wurde das Trypsin durch die Trypsin-Inhibitor-Lösung wieder

inaktiviert (siehe 3.2.3). Die Zellsuspension wurde dann in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und für fünf Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet mit 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen pipettiert. Anschließend wurde das Röhrchen mit Hilfe einer Einfrierbox kontrolliert eingefroren und bei -80 °C in der Gefriertruhe gelagert.

### **3.2.5 Reaktivierung kryokonservierter Zellen**

Beim Reaktivieren der tiefgefrorenen Zellen wurde die Zellsuspension zunächst in 37 °C warmem Wasser aufgetaut. Im Anschluss wurde diese in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert, 3 ml Kulturmedium hinzugefügt und fünf Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das entstandene Zellpellet in 2 ml Kulturmedium resuspendiert. Im folgenden Schritt wurde die Zellsuspension in ein Zellkulturfläschchen, welches bereits 3 ml 37 °C warmes Kulturmedium enthielt, gegeben. Abschließend wurde das Fläschchen in den Brutschrank gelegt.

### **3.2.6 Zellzahl-Bestimmung**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Die Zellen wurden für die Zählung zunächst abgelöst, zentrifugiert und resuspendiert (siehe 3.2.3). Anschließend wurden 50 µl der Zellsuspension in die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Um eine genauere Bestimmung der Zellzahl zu erlangen, wurde in zwei Zählkammern die Zellzahl ausgezählt. Der Durchschnittswert pro Quadrant wurde ermittelt und mit dem Faktor 10.000 multipliziert, was die Zellanzahl pro Milliliter Suspension ergab.

### **3.2.7 Test zur Überprüfung der Puromycin-Resistenz**

Im Rahmen des Puromycin-Tests sollten die Zellen auf eventuelle Veränderungen hin untersucht werden. Dies erfolgte, da Robertson et al. die Zellen mit einem retroviralen Vektor infizierten, der ein Gen enthielt, das in den Zellen eine Puromycin-Resistenz bewirkt (Robertson et al. 2005). Für die Überprüfung wurden in eine 24-Well-Platte 20.000 Zellen pro Well ausplattiert und die Zellen für zwei Tage in Kulturmedium bei Standardkulturbedingungen bebrütet. Danach wurde das Medium mit 1 µg/ml beziehungsweise 5 µg/ml Puromycin versetzt. Es wurden täglich lichtmikroskopische Kontrollen der Vitalität durchgeführt.

### **3.2.8 Ermittlung der Populationsverdopplungszeit**

Die Populationsverdopplungszeit (PVZ) sollte zur besseren Charakterisierung der Zelllinie hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens durchgeführt werden. Zur Bestimmung der PVZ wurden in einer 24-Well-Platte 15.000 Zellen pro Well ausplattiert. Es wurden täglich zur selben Uhrzeit die Zellen aus drei Wells abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Dazu wurden täglich zur selben Uhrzeit zu den Zellen aus drei Wells 200 µl Trypsin-EDTA-Lösung pipettiert und für vier Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde die Ablösung vom Boden lichtmikroskopisch kontrolliert und das Trypsin durch 200 µl Trypsin-Inhibitor-Lösung inhibiert.

Nun konnten die Zellen mit der Neubauer-Zählkammer ausgezählt werden (siehe 3.2.6). Von den drei ermittelten Werten wurde der Durchschnittswert ermittelt. Der Versuch wurde über acht Tage durchgeführt und die gewonnenen Daten in einem Diagramm aufgetragen. Die Zellzahl wurde auf der Y-Achse und die Anzahl der Stunden auf der X-Achse dargestellt. Anhand des Diagramms konnte die exponentielle Phase des Zellwachstums (log-Phase) bestimmt werden, in welcher die Zellen sich mit der maximalen Teilungsrage vermehren. Es wurde anschließend eine Regressionsgerade durch die Punkte der log-Phase gelegt und die Geradengleichung ( $y=mx+b$ ) ermittelt. Die PVZ konnte nun mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{PVZ (Stunden)} = \frac{\log_{10}(2)}{m} \times 24$$

### 3.2.9 Beschichtung von Deckgläsern mit Gelatine

Zum Beschichten der Deckgläser mit Gelatine mussten diese zunächst gesäubert und autoklaviert werden. Anschließend wurden sie in 6-Well-Platten überführt und jedes Deckglas mit 2 ml 0,1 %iger Gelatine-Lösung bedeckt. Folgend wurden die Platten für mindestens eine Stunde bei 4 °C aufbewahrt. Vor dem Verwenden der Deckgläser wurde die Gelatine-Lösung abpipettiert.

### 3.2.10 Immunzytochemische Färbungen (ICC) an den hTCEpi-Zellen

Zunächst wurde eine 6-Well-Platte mit gelatinebeschichteten Deckgläsern bestückt und 2 ml des Kulturmediums in jedes Well pipettiert. Dazu wurden nun 150.000 Zellen gegeben und bei Standardkulturbedingungen inkubiert. Nach zwei Tagen Inkubation wurden die Deckgläser aus den Wells entnommen und in PBS gewaschen. Anschließend wurden sie zum Fixieren der Zellen auf dem Deckglas in eine neue 6-Well-Platte überführt. Zum Fixieren wurden sie für 20 Minuten in 2 ml PBS mit 4 % PFA bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal in PBS gewaschen. Nun wurde die Blockierungs- und Permeabilisierungslösung auf die Zellen gebracht und für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen mit der entsprechenden Primärantikörper-Lösung versetzt (siehe Tabelle 1) und in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es wurden Antikörper gegen p63, N-Cadherin, E-Cadherin, Nanog, Oct4, FGF-Rezeptor 2, IRF8 und Zytokeratin 14 getestet. Am folgenden Tag wurden die Zellen dreimal für je fünf Minuten in PBS gewaschen und anschließend mit der dem Primärantikörper entsprechenden Sekundärantikörper-Lösung versetzt. Nun wurden die Zellen für eine Stunde bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nachfolgend wurde die Hoechst-Lösung auf die Zellen gegeben und für zehn Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer belassen. Im Anschluss wurden die Zellen lichtgeschützt dreimal für je fünf Minuten in PBS gewaschen. Hinterher wurde auf Objektträger das Eindeckmedium pipettiert und das Deckglas mit der zellbeschichteten Seite nach unten auf den Objektträger gelegt. Zur besseren Haltbarkeit wurden die Objektträger lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt und die Übergänge des Deckglases zum Objektträger mit Klarlack

abgedichtet. Die Auswertung der immunzytochemischen Färbungen erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse 80i mit dem Kamerasystem Color Camera Nikon DS-Fi3. Es wurden verschiedene Vergrößerungen (20-fach, 40-fach und 60-fach) gewählt und Fotografien von verschiedenen Stellen des Deckglases angefertigt. Bei jeder Fotografie wurden Negativkontrollen durchgeführt. Sollte der Anteil an angefärbten Zellen bestimmt werden, wurden Fotografien an sechs festgelegten Stellen auf dem Deckglas angefertigt. Anschließend wurden die Anzahl positiver Zellen und die Anzahl der Zellkerne mit dem Programm ImageJ ermittelt und ins Verhältnis gesetzt.

### **3.2.11 Differenzierung der Zellen**

Die hTCEpi-Zellen wurden durch Erhöhung der Calcium-Konzentration im Medium sowie durch *Airlifting*-Bedingungen zur Differenzierung angeregt. Die Calcium-Konzentration im Kulturmedium wurde dafür von 0,15 auf 1,15 mM erhöht. Zur Differenzierung wurden 17.000 Zellen in Zellkultur-Einsätze einer 24-Well-Platte, die eine Kollagen-I-beschichtete Membran besaßen, pipettiert und mit 100 µl des Differenzierungsmediums bedeckt. In das dazugehörige Well wurden 350 µl des Differenzierungsmediums gegeben. Das Differenzierungsmedium wurde über sieben Tage lang täglich erneuert. Anschließend wurde mit dem *Airlifting* begonnen. Dazu wurde das Medium aus dem Zellkultur-Einsatz entnommen und nur noch das Medium im entsprechenden Well täglich gewechselt, sodass die Zellen nur noch über die Membran ernährt wurden.

Zu festgelegten Zeitpunkten nach Versuchsbeginn wurden die Membranen mit einem Skalpell aus den Einsätzen herausgeschnitten, fixiert, in Paraffin eingebettet, mit einem Mikrotom in 4µm dicke Scheiben geschnitten und angefärbt (siehe 3.3.2, 3.3.3, 3.3.4 und 3.3.6). Zur Anfärbung wurden die Antikörper gegen IRF8, p63, Oct4, Nanog, E-Cadherin, N-Cadherin und CK14 (siehe Tabelle 1) und die entsprechenden Sekundärantikörper verwendet (siehe Tabelle 2).

### **3.2.12 Stimulationsversuche mit Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) zur Erhöhung der IRF8-Expression**

In den Stimulationsversuchen sollten die hTCEpi-Zellen durch IFN- $\gamma$ -Zugabe in das Kulturmedium zu einer verstärkten Expression von IRF8 angeregt werden. Die Expressionserhöhung sollte durch immunzytochemische Färbungen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse des Stimulationsansatzes wurden mit entsprechenden Negativkontrollen verglichen. Hierzu wurden die Zellen in unbehandeltem Kulturmedium anstelle des Stimulationsmediums kultiviert. Um eine bestmögliche Stimulation zu erzielen, wurden mehrere Stimulationsansätze mit unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt. Zu Beginn des Stimulationsansatzes wurden die Zellen aus den Zellkulturflaschen abgelöst, zentrifugiert, resuspendiert und anschließend in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt (siehe 3.2.3 und 3.2.6). Anschließend wurde eine

definierte Anfangszellzahl auf gelatinebeschichtete Deckgläser in einer 6-Well-Platte pipettiert und mit 2 ml Kulturmedium bedeckt. Nach unterschiedlichen Anwachszeiten wurde dann das Medium mit verschiedenen Konzentrationen an IFN- $\gamma$  versetzt. Die Zellen wurden unterschiedlich lange mit dem Stimulationsmedium versetzt und bei Standardkulturbedingungen inkubiert. Das Medium wurde über die Stimulationszeit täglich erneuert. Außerdem wurde in Versuch 3 getestet, wie lange die Expressionserhöhung nach Beendigung der Stimulation anhält. Die folgende Tabelle enthält eine Übersicht über die getesteten Bedingungen:

**Tabelle 11: Schema der Stimulationsversuche**

Name	Anfangs-zellzahl	Anwachs-zeit	Stimulations-zeit	Nach-betrachtung	IFN- $\gamma$ -Konzentration
Versuch 1	150.000	2 Tage	3 Tage	keine	10 ng/ml
	150.000	2 Tage	3 Tage	keine	5 ng/ml
	150.000	2 Tage	3 Tage	keine	1 ng/ml
	150.000	2 Tage	3 Tage	keine	0 ng/ml
Versuch 2	50.000	2 Tage	6 Tage	keine	5 ng/ml
	50.000	2 Tage	6 Tage	keine	1 ng/ml
	50.000	2 Tage	6 Tage	keine	0 ng/ml
Versuch 3	150.000	2 Tage	3 Tage	5 Tage	1 ng/ml
	50.000	2 Tage	3 Tage	7 Tage	1 ng/ml

Während der Stimulationszeit wurde täglich zur selben Uhrzeit ein Deckglas entnommen, um die Expressionserhöhung über den Stimulationszeitraum beurteilen zu können. Die Zellen wurden nach der Deckglasentnahme auf diesem fixiert und gegen IRF8 angefärbt (siehe 3.2.10). Nach Fertigstellung der Färbung konnten die Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Es wurden an sechs verschiedenen, festgelegten Positionen auf dem Deckglas Fotografien der Zellen angefertigt, die Zellkerne mit ImageJ ausgezählt und anschließend die Anzahl IRF-8-positiver Zellen bestimmt. Dadurch konnte der Anteil an IRF-8-positiven Zellen ermittelt werden und die Ergebnisse bei verschiedenen Konzentrationen über die Tage verglichen werden.

Außerdem wurden täglich lichtmikroskopische Fotografien der Zellen in Kultur gemacht, um den morphologischen Einfluss der unterschiedlichen IFN- $\gamma$ -Behandlung vergleichen zu können.

### 3.2.13 *Scratch*-Assay (Wundheilungsversuch)

In dem *Scratch*-Assay sollte das Migrationsverhalten der hTCEpi-Zellen nach dem Hinzufügen einer, durch einen Kratzer simulierten Wunde, untersucht werden. Es wurden 150.000 Zellen in ein Well einer 6-Well-Platte pipettiert und bei Standardkulturbedingungen einen Tag lang

inkubiert. Anschließend wurde das Medium in drei Wells mit 1 ng/ml IFN- $\gamma$  versetzt und das Medium täglich gewechselt. Bei den anderen Wells wurde das Medium nicht mit IFN- $\gamma$  versetzt, aber ebenfalls täglich erneuert. Die nicht mit IFN- $\gamma$  behandelten Zellen dienten als Kontrolle. Nach drei Tagen wurde mit einer gelben (Fassungsvermögen bis 200  $\mu$ l) und einer blauen Pipettenspitze (Fassungsvermögen bis 1000  $\mu$ l) dem Zellrasen ein Defekt zugefügt. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen vorsichtig mit 2 ml PBS gewaschen, damit sich die abgeschabten Zellen nicht nachträglich wieder auf dem Defektareal anheften konnten. Danach wurden die Zellen mit 2 ml Kulturmedium (ohne IFN- $\gamma$ ) bedeckt und bei Standardkulturbedingungen inkubiert. Das Defektareal wurde unter dem Lichtmikroskop siebenmal an unterschiedlichen Stellen fotografiert und die Größe des Defektareals mit der Software ImageJ vermessen. Bis der Defekt zugewachsen war, wurden im 24 -Stunden-Takt lichtmikroskopische Fotografien des Defektareals angefertigt und dieses mit ImageJ vermessen.

### **3.3 Histologische Methoden an Mausaugen**

#### **3.3.1 Entnahme, Präparation und Fixierung der Mausaugen**

Die Untersuchungen an den Mausaugen wurden an adulten Wildtyp-Mäusen (C57BL/6) und IRF8-Knockout (IRF8<sup>-/-</sup>) Mäusen (C57BL/6) (Holtschke et al. 1996) durchgeführt. Bei den tierexperimentellen Untersuchungen wurden alle entsprechenden Tierschutz- und ethischen Richtlinien eingehalten (Tötungsantrag AZK6IVM1). Die Mausaugen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Marina Scheller (Klinik für Hämatonkologie, Universitätsklinikum Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden durch Genickbruch getötet, ihre Augen entnommen und unter Zuhilfenahme einer Lupe überflüssiges adhärentes orbitales Gewebe entfernt. Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen und in 4%igem Paraformaldehyd über Nacht bei 4 °C fixiert.

#### **3.3.2 Einbettung der Augen in Paraffin**

Nach der Fixierung wurden die Augen zunächst zwei Stunden in PBS gewaschen. Im folgenden Schritt wurden die Augen zur Entwässerung für je eine Stunde in aufsteigende Konzentrationen von Ethanol (70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 2x 100 %) und danach in Xylol gegeben. Folgend wurden die Augen in flüssiges Paraffin überführt, welches dreimal nach je einer Stunde gewechselt wurde. Abschließend wurden die Augen in Paraffin eingebettet, wobei zur richtigen Positionierung der Augen eine Lupe verwendet wurde. Im Anschluss wurden die Paraffinblöcke beschriftet und im Kühlschrank zum Erkalten und Aushärten aufbewahrt.

#### **3.3.3 Anfertigung von Mikrotomschnitten**

Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden 4  $\mu$ m dicke Schnitte der eingebetteten Augen entlang ihrer Sagittalachse angefertigt. Die Schnitte wurden in einem Warmwasserbad (35,0 - 38,0 °C) aufgefangen, gestreckt und anschließend glatt auf den Objektträger aufgebracht. Folgend wurden die Schnitte 16 Stunden bei 37 °C auf einer Heizplatte getrocknet.

### **3.3.4 Entparaffinierung**

Zunächst wurden die Objektträger für zwei Stunden bei 60 °C in einem Heizschrank inkubiert. Zur anschließenden Paraffin-Entfernung wurden die Schnitte dreimal fünf Minuten in Xylol, anschließend dreimal zwei Minuten in 100%igem Ethanol und dann je einmal eine Minute in eine absteigende Alkoholreihe (96 %, 90 %, 80 %, 70 %, 50 %) gegeben.

### **3.3.5 Periodsäure Schiff's-Färbung (PAS-Färbung)**

Nach der Entparaffinierung wurden die histologischen Schnitte in destilliertem Wasser ( $dH_2O$ ) gewaschen. Anschließend wurde für sieben Minuten mit 1%iger Periodsäure hydrolysiert. Danach wurden die Schnitte zehn Minuten in Leitungswasser gewaschen und im Folgenden nochmals zweimal zwei Minuten mit  $dH_2O$  gespült. Im Anschluss wurden die histologischen Schnitte 18 Minuten mit Schiff's Reagenz gefärbt und außerdem dreimal für je zwei Minuten mit Sulfitwasser gewaschen. Nun wurden die Schnitte fünf Minuten in warmem Leitungswasser und dann kurz in  $dH_2O$  gewaschen. Danach wurden die Schnitte mit filtrierter Hämalaun-Lösung nach Mayer zehn Minuten gegengefärbt und anschließend 15 Minuten unter fließendem lauwarmem Leitungswasser gebläut. Zur abschließenden Entwässerung wurden die Schritte der Entparaffinierung in umgekehrter Reihenfolge durchlaufen. Zuletzt wurde auf die histologischen Schnitte Entellan als Eindeckmedium pipettiert und diese mittels Deckglas blasenfrei abgedichtet.

### **3.3.6 Immunhistochemische Färbungen an Mausaugen**

Zur Färbung der Schnitte wurde die Methode der indirekten Immunfluoreszenz verwendet. Nach der Entparaffinierung (siehe 3.3.4) wurden die Objektträger zweimal für je fünf Minuten in der Waschlösung gewaschen. Im Anschluss wurde eine Antigendemaskierung durchgeführt. Hierbei wurden die Objektträger in ein Behältnis mit auf etwa 40°C vorgewärmtem EDTA-Puffer gegeben und 15 Minuten in einem Dampfgarer erhitzt. Anschließend wurden die Objektträger 15 Minuten in einem Wasserbad abgekühlt.

Im Falle einer immunhistochemischen Färbung gegen den FGF-Rezeptor 2 wurde die Antigendemaskierung mit Trypsin durchgeführt. Dazu wurde auf die vorher mit einem Fettstift umrandeten Schnitte Trypsin-Lösung pipettiert und die histologischen Schnitte für 10 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Im Anschluss an die Antigendemaskierung wurde die noch auf den Objektträgern verbliebene Flüssigkeit entfernt und die einzelnen Schnitte mit einem Fettstift umrandet. Danach wurde die Blockierungs- und Permeabilisierungslösung auf die Schnitte pipettiert und für 90 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Lösung entfernt und der Primärantikörper in seiner jeweiligen Verdünnung auf die für ihn vorgesehenen Schnitte pipettiert. Es wurden Antikörper gegen p63, N-Cadherin, E-Cadherin, Nanog, Oct4, FGF-Rezeptor 2, IRF8 und Zytokeratin 14 verwendet (siehe Tabelle 1). Die Negativkontrollen wurden erneut mit der Blockierungs- und Permeabilisierungslösung versetzt. Nun wurden die

histologischen Schnitte in der feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte für zweimal je fünf Minuten in der Waschlösung gewaschen. Alle folgenden Schritte fanden unter lichtgeschützten Bedingungen statt. Zunächst wurde der entsprechende Sekundärantikörper (siehe Tabelle 2) auf die histologischen Schnitte pipettiert und diese für eine Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde die Sekundärantikörperlösung entfernt und die Hoechst-Lösung für die Kernfärbung auf die Schnitte pipettiert. Nach Inkubation der Schnitte für 10 Minuten in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur wurden sie dreimal für je 5 Minuten in reiner TBS-Lösung gewaschen. Nun wurde die restliche Flüssigkeit entfernt, das Eindeckmedium auf die histologischen Schnitte gegeben und diese blasenfrei abgedeckt. Bis zur weiteren Untersuchung wurden die Objektträger auf Grund der Lichtempfindlichkeit der fluoreszierenden Antikörper lichtgeschützt und zur besseren Haltbarkeit bei 7 °C im Kühlschrank gelagert.

### **3.3.7 Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC) Methode**

Die ABC Methode wurde durchgeführt, um die Ergebnisse, welche mit den Fluoreszenzfärbungen mit dem IRF8-Antikörper von invitrogen erzielt wurden, mit dem IRF8-Antikörper von santa cruz zu validieren. Hierfür wurden die Mikrotomschnitte auf den Objektträgern entparaffiniert (siehe 3.3.4) und anschließend in  $dH_2O$  zweimal für je fünf Minuten gewaschen. Danach wurde die Antigendemaskierung mit EDTA durchgeführt (siehe 3.3.6). Nach dem Abkühlen der Objektträger wurden die histologischen Schnitte zur Reduktion von potentiellen Hintergrundfärbungen für zehn Minuten mit einer 3%igen Wasserstoffperoxid-Lösung versetzt und folgend zwei Minuten in TBS gewaschen. Im Anschluss an die nachfolgende Umrandung der histologischen Schnitte mit dem Fettstift wurde der Proteinblock des Kits (ZytoChem-Plus HRP Kit) auf die Schnitte pipettiert und für fünf Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde der Primärantikörper entsprechend in der Antikörper-Verdünnungslösung verdünnt und auf die vorgesehenen Schnitte pipettiert. Es wurden die Antikörper gegen IRF8 getestet (siehe Tabelle 1). Die Schnitte wurden dann für 60 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Schnitte dreimal für je zwei Minuten in TBS gewaschen. Nun wurde der Biotin-markierte Sekundärantikörper des Kits auf die Schnitte pipettiert und diese für 15 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Schnitte erneut dreimal für je zwei Minuten in TBS gewaschen. Im Anschluss wurde das Streptavidin-Horseradish Peroxidase (HRP) Konjugat des Kits, welches eine hohe Affinität für Biotin aufweist, auf die histologischen Schnitte pipettiert und für 15 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Folgend wurden die Schnitte erneut dreimal für je zwei Minuten in TBS gewaschen. Nun wurde die Diaminobenzidin-Lösung (DAB), welche durch die Peroxidase umgesetzt wird und ein braunes Endprodukt bildet, auf die Schnitte pipettiert und die

Färbungsintensität mikroskopisch kontrolliert. Beim Erreichen einer zufriedenstellenden Intensität wurde die Reaktion durch Waschen in  $dH_2O$  beendet. Danach wurden die Zellkerne der histologischen Schnitte mit Hämalaun gegengefärbt, die Schnitte anschließend entwässert und mit Entellan eingedeckt (siehe 3.3.5).

### **3.3.8 Mikroskopie und Fotografie**

Die gefärbten Präparate wurden mit dem Fluoreszenz-Mikroskop Nikon Eclipse 80i betrachtet und mit dem dazugehörigen Kamerasystem Color Camera Nikon DS-Fi3 digital dokumentiert. Es wurden Aufnahmen in verschiedenen Vergrößerungen (10-fach, 20-fach, 40-fach und 60-fach) angefertigt. Bei den Fluoreszenz-Aufnahmen wurden zudem Negativkontrollen durchgeführt. Bei der Mikroskopie der PAS-Färbungen wurde jeweils ein Weißabgleich durchgeführt. Die nachfolgende Bildverarbeitung wurde mit dem Programm ImageJ durchgeführt.

## **3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

### **3.4.1 RNA-Isolation aus einem Zellpellet**

Für die RNA-Isolation wurde das GenUP™ Total RNA Kit (biotechrabbit) verwendet. Der Arbeitsplatz wurde zunächst mit RNaseZAP gesäubert. Im Anschluss wurde auf das Zellpellet der hTCEpi-Zellen (siehe 3.2.3) 400  $\mu$ l Lysepuffer pipettiert, das Pellet resuspendiert und zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde erneut resuspendiert und für weitere drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein DNA-Filtergefäß pipettiert, welches anschließend in einem Reaktionsgefäß für zwei Minuten bei 12.000 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert wurde. Die im Filter gefangene DNA wurde verworfen. Das Filtrat wurde in 400  $\mu$ l 70%igem Ethanol resuspendiert und in ein RNA-Filtergefäß pipettiert. Dieses wurde anschließend für zwei Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert. Der Filter, in dem sich nun die RNA befand, wurde nun auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt und 500  $\mu$ l Waschpuffer A hinzu pipettiert. Die Flüssigkeit wurde anschließend für eine Minute bei 12.000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Filter auf ein neues Gefäß gesetzt, 1000  $\mu$ l Waschpuffer B hinzugegeben und erneut für eine Minute bei 12.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Filter nochmals auf ein neues Gefäß gesetzt und für zwei Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert. Folgend wurde der Filter auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt, 20  $\mu$ l Wasser auf den Filter pipettiert, eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und eine Minute bei 8.000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, allerdings ohne ein neues Reaktionsgefäß zu nehmen, da sich die RNA nun im Filtrat befand. Das Reaktionsgefäß mit dem Filtrat wurde auf Eis aufbewahrt. Die Messung des RNA-Gehaltes im Filtrat erfolgte spektrometrisch. Dazu wurden zunächst Verdünnungen des Filtrats hergestellt (1 zu 150 in DEPC-Wasser).

Anschließend wurde mittels Spektrometer die Extinktion der Verdünnung bei 260 und 280 nm Wellenlänge bestimmt (OD-Wert). Der RNA-Gehalt konnte mittels folgender Formel berechnet werden:

$$\frac{\text{OD}_{260\text{nm}} * \text{Verdünnungsfaktor} * 40}{1000} = \mu\text{g RNA}/\mu\text{l}$$

Verdünnungsfaktor = 150

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades der Probe wurde der Quotient des OD-Werts bei 260 nm und bei 280 nm gebildet.

### 3.4.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde das iScript cDNA Synthese Kit (Bio-Rad) verwendet. Dazu wurde zunächst berechnet, wie viele  $\mu\text{l}$  der RNA-Suspension insgesamt  $1 \mu\text{g}$  der RNA enthielten. Die Reaktionslösung setzte sich wie folgt zusammen:

4  $\mu\text{l}$  5x Reaktionsmix

1  $\mu\text{l}$  reverse Transkriptase

berechnetes Volumen des RNA-Templates ( $1 \mu\text{g}$  RNA) in  $\mu\text{l}$   
mit Nuklease-freiem Wasser auf 20  $\mu\text{l}$  Lösung aufgefüllt.

Dann wurde im Thermocycler das folgende Protokoll durchlaufen: fünf Minuten Priming bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , 20 Minuten reverse Transkription bei  $46 \text{ }^\circ\text{C}$  und eine Minute Inaktivierung der reversen Transkriptase bei  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ . Die Probe wurde folgend bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

### 3.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Polymerase-Kettenreaktion wurde die Taq-Polymerase von EUR<sub>x</sub> samt zugehörigen Lösungen verwendet. Zunächst wurde der PCR-Ansatz hergestellt.

Für einen 1-fachen PCR-Ansatz:

5  $\mu\text{l}$  Puffer C

2  $\mu\text{l}$  dNTPs (jedes 5 mM)

1  $\mu\text{l}$  Primer (reverse) + 1  $\mu\text{l}$  Primer (forward)

0,25  $\mu\text{l}$  Taq-Polymerase

1  $\mu\text{l}$  cDNA

Mit DEPC-Wasser auf 50  $\mu\text{l}$  auffüllen.

Anschließend wurde im Thermocycler folgendes Programm durchlaufen:

	Temperatur	Dauer	Zyklusanzahl
Denaturierung (initial)	95 °C	3 Minuten	1
Denaturierung	95 °C	30 Sekunden	} 25-35
Annealing	Primerspezifisch	45 Sekunden	
Extension	72 °C	1 Minute pro kb	
Finale Extension	72 °C	7 Minuten	1
Abkühlen	4 °C	beliebig	1

#### 3.4.4 Gelelektrophorese

Hierzu wurde ein Kamm in den Gelschlitten eingesetzt und die Agarosegel-Lösung (1% ig) in den Gelschlitten hineingegossen. Das Gel wurde für mindestens 30 Minuten zum Abkühlen belassen. Nun wurde die Elektrophorese-Kammer mit TAE-Puffer befüllt, der Kamm aus dem Gel entfernt und der Gelschlitten in die Kammer eingesetzt. Dann wurden 10 µl der cDNA-Probe und 5 µl des DNA-Größenmarkers in die jeweilige Tasche pipettiert und das Elektrophorese-Gerät auf 60 Volt und 40 mA eingestellt. Nach 60 Minuten konnte das Gel aus der Kammer entnommen werden und das Ergebnis unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

#### 3.5 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Veränderung der IRF8-Expression wurde auf Grund der binären Endpunkte der  $\chi^2$ -Test verwendet. Bei den Untersuchungen zur Wundheilung und bei der Vermessung der Limbusgröße wurde der t-Test für metrische Endpunkte verwendet.

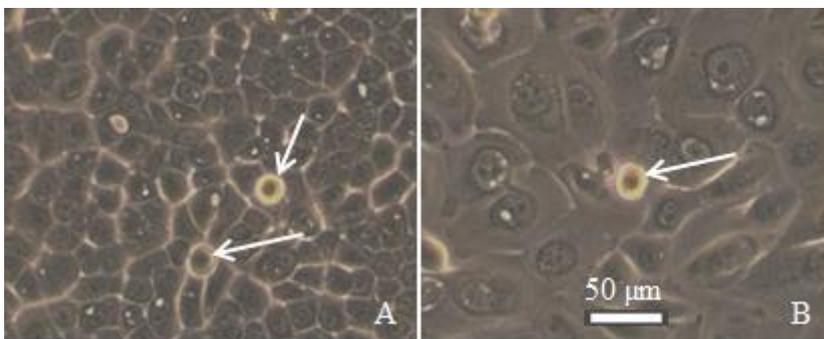
Bei der statistischen Auswertung wurden p-Werte von kleiner 0,05 als signifikant angesehen und ein p-Wert von kleiner 0,01 als hoch signifikant angesehen (Zöfel 2007).

Die statistische Auswertung erfolgte über das Programm Excel von Microsoft Office.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Allgemeine Eigenschaften der hTCEpi-Zellen

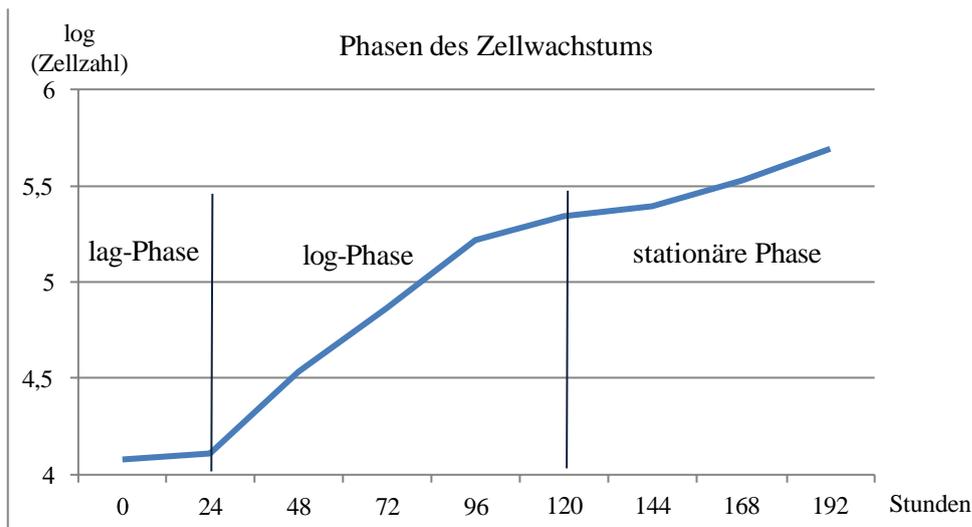
Zur allgemeinen Charakterisierung der Zelllinie wurden Tests zur Überprüfung der Puromycin-Resistenz (siehe 3.2.7) und Untersuchungen hinsichtlich der Populationsverdopplungszeit (siehe 3.2.8) durchgeführt. Laut Robertson et al. besitzen die Zellen ein Gen, welches eine Puromycin-Resistenz bewirkt (Robertson et al. 2005). Nachdem das Kulturmedium der Zellen mit Puromycin versetzt worden war, wurde das Wachstum beurteilt. Es zeigte sich, dass die Zellen bei 1  $\mu\text{g/ml}$  und bei 5  $\mu\text{g/ml}$  weiter proliferieren, wobei allerdings das Zellwachstum bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  langsamer war. Dies äußert sich morphologisch in einem weniger dichteren Wachstum und größeren Zellen als bei der Behandlung mit 1  $\mu\text{g/ml}$  (siehe Abbildung 1). Bei beiden Konzentrationen zeigten sich proliferierende Zellen. Morphologisch zeigten sich mit Ausnahme des Größenunterschiedes keine weiteren Unterschiede zwischen den verschiedenen Konzentrationen und im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Diese Ergebnisse bestätigten, dass die verwendeten Zellen wie beschrieben ein funktionierendes Puromycin-Resistenzgen besitzen.



**Abbildung 1:** Lichtmikroskopische Fotografie der hTCEpi-Zellen nach siebentägiger Behandlung mit Puromycin

(A): hTCEpi-Zellen behandelt mit 1  $\mu\text{g/ml}$  Puromycin. (B): hTCEpi-Zellen behandelt mit 5  $\mu\text{g/ml}$  Puromycin. (Pfeile: proliferierende Zellen, Balkengröße entspricht 50  $\mu\text{m}$ ).

Zur besseren Beurteilung des Wachstumsverhaltens in den Stimulationsversuchen wurden Untersuchungen zur PVZ durchgeführt. Hierbei wurde anhand der graphischen Auftragung der logarithmierten Zellzahl die Phase des exponentiellen Wachstums (log-Phase) bestimmt (siehe Abbildung 2). Mit der unter 3.2.8 beschriebenen Formel wurde anschließend die PVZ berechnet, welche bei der hTCEpi-Zelllinie 19,82 Stunden betrug.



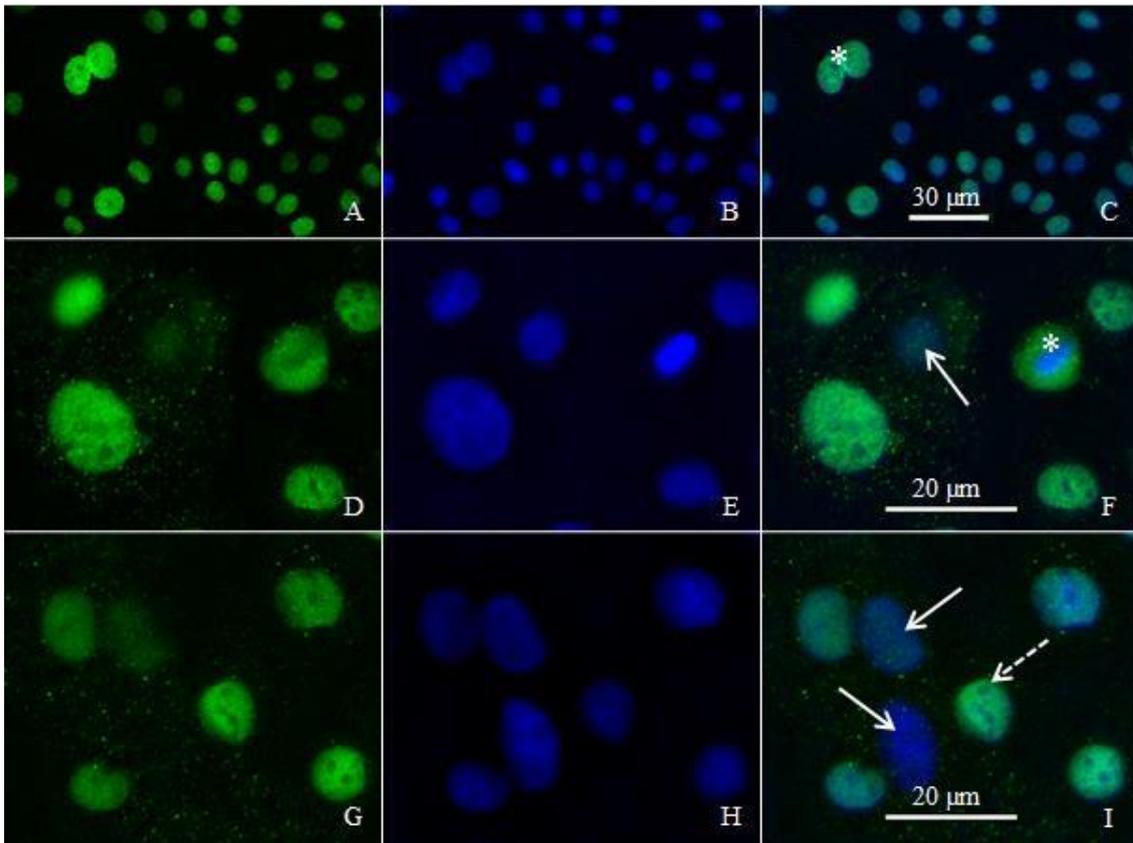
**Abbildung 2:** halblogarithmische Darstellung des Wachstumsverlaufs der hTCEpi-Zellen mit Unterteilung in lag-, log- und stationäre Phase

#### 4.2 Expression von potentiellen Stammzellmarkern in den hTCEpi-Zellen

Die Expression der in der Einleitung beschriebenen potentiellen Stammzellmarker in den hTCEpi-Zellen wurde anhand der immunzytochemischen Färbungen untersucht. Nachdem das Protokoll zur Anfertigung dieser Färbungen optimiert war, konnten die Färbungen mit dem Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse 80i ausgewertet werden. Die mit der ICC erzielten Ergebnisse konnten durch Ergebnisse der PCR ergänzt werden.

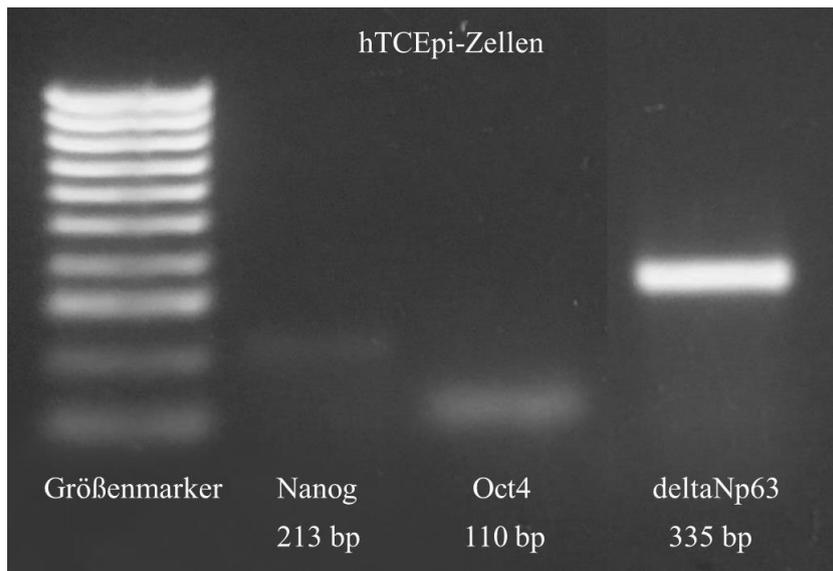
##### p63

Bei den Untersuchungen der Zellen zur Expression von p63 zeigten fast alle Zellen eine nukleäre Expression, wobei die Kernkörperchen ausgespart blieben. Einzelne Zellen zeigten eine stärkere Expression. Anhand der kondensierten Form der Zellkerne konnten diese Zellen als proliferierende Zellen identifiziert werden. Weiterhin war auffällig, dass sich die proliferierenden Zellen bei der Mikroskopie in einer Ebene vor den übrigen Zellen darstellten. Dies kommt durch die Ablösung der Zelle aus dem Zellverbund beim Vorgang der Zellteilung zustande. Außerdem fielen einzelne Zellen auf, welche kein p63 exprimierten, jedoch oftmals einen verhältnismäßig großen Zellkern aufwiesen (siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Expression von p63 in hTCEpi-Zellen (grün: p63-Expression, blau: Zellkerne, Pfeile: p63-negative Zellen, gestrichelter Pfeil: Kernkörperchen, \*: proliferierende Zellen.)

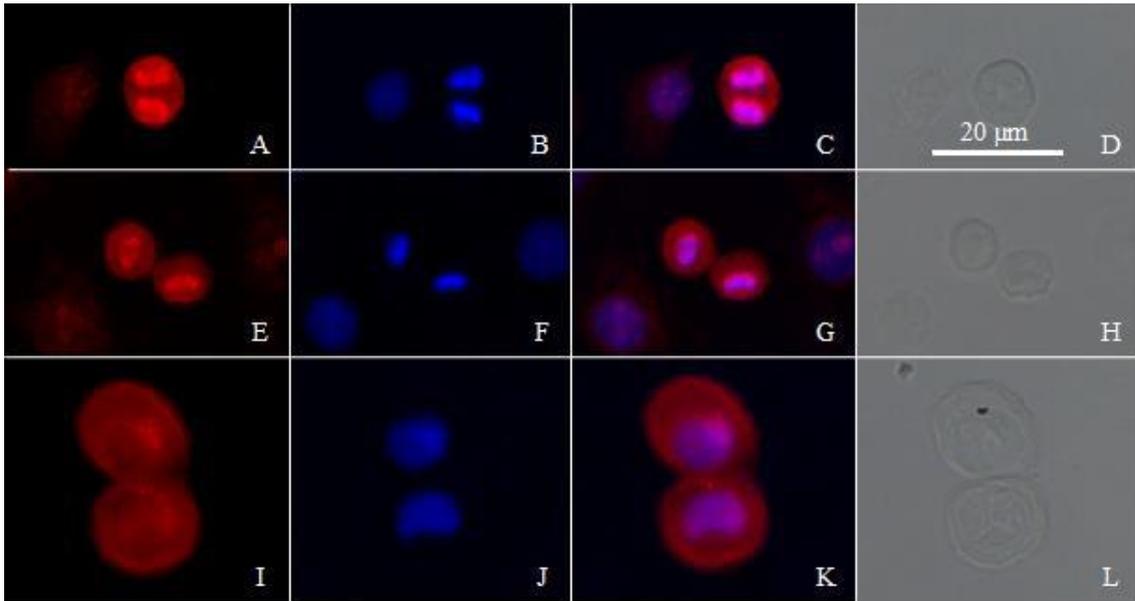
Bei der Durchführung der PCR wurde ein Primer für das Gen  $\Delta Np63\alpha$  verwendet. Diese Isoform ist spezifischer für limbale epitheliale Stammzellen als p63 (siehe 1.1.4). Es zeigte sich bei der Auswertung der Gelelektrophorese nach der PCR eine Bande im typischen Größenbereich (335 bp), was darauf hindeutet, dass die Zellen das Gen für  $\Delta Np63\alpha$  besitzen (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Ergebnis der Gelelektrophorese der PCR an hTCEpi-Zellen mit Nachweis der RNA von Nanog, Oct4 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  in dem entsprechenden Bandenbereich (links Größenmarker der Basenpaare in jeweils Abständen von je 100 bp)

#### Ki-67

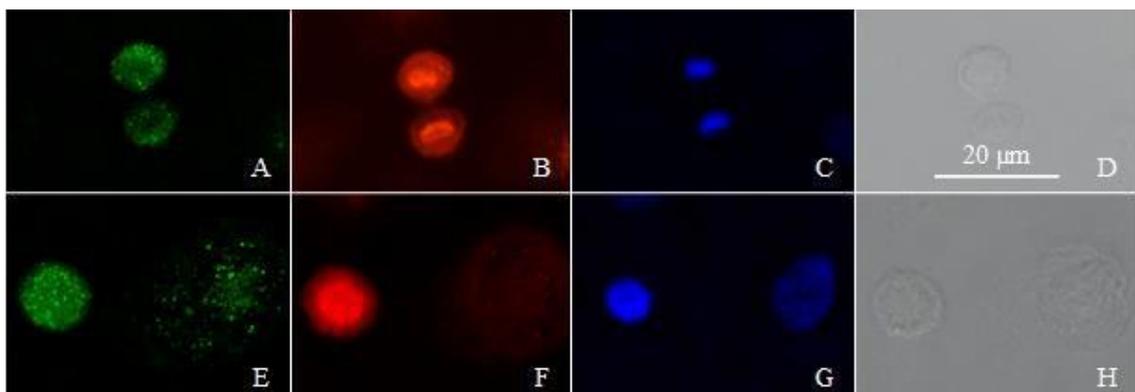
Es konnte gezeigt werden, dass der Proliferationsmarker Ki-67 in vielen der hTCEpi-Zellen exprimiert wurde (siehe Abbildung 5), was ein Kennzeichen für Zellen ist, die sich außerhalb der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus befinden. Einige der Zellen zeigten jedoch eine erheblich stärkere Expression, was bedeutet, dass diese Zellen sich gerade in der aktiven Phase der Zellteilung befinden. Auch die bereits beschriebenen typischen morphologischen Eigenschaften von proliferierenden Zellen zeigten sich bei den stark Ki-67-positiven Zellen. In der aktiven Zellteilungsphase ist in Zellen die höchste Ki-67-Expression vorzufinden (Scholzen und Gerdes 2000). Ki-67 war vorwiegend nukleär lokalisiert, wobei die meisten Zellkerne sehr stark kondensiert waren, wie es für die Zellteilung typisch ist (siehe Abbildung 5B, F). Durch Doppelfärbungen konnte gezeigt werden, dass Ki-67 mit Oct4, Nanog, FGFR2 und IRF8 koexprimiert wurde.



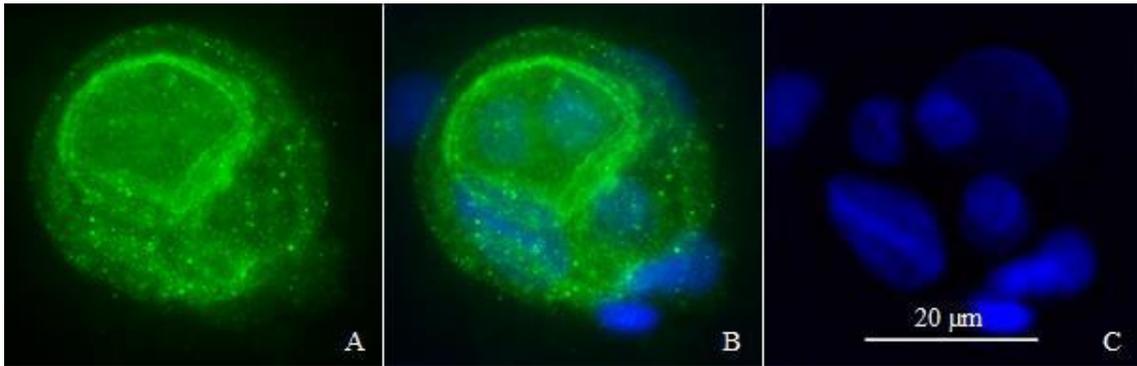
**Abbildung 5:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Expression von Ki-67 in hTCEpi-Zellen und lichtmikroskopische Aufnahme der angefärbten Zellen (rot: Ki-67-Expression, blau: Zellkerne, (D), (H), (L): lichtmikroskopische Aufnahmen, Maßstab in Bild D entspricht dem Maßstab der anderen Bilder (20 µm))

#### Oct4

Eine schwache Expression des Transkriptionsfaktors Oct4 konnte in fast allen Zellen nachgewiesen werden, wobei diese größtenteils zellkernständig, aber zum Teil auch im kernnahen Zytoplasma lokalisiert war. Einige Zellen zeigten eine verstärkte Expression von Oct4, wobei diese sowohl im Kern als auch im kernnahen Zytoplasma aufzufinden war. Diese Zellen konnten sowohl durch die morphologische Begutachtung als auch durch Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen Ki-67 als proliferierende Zellen identifiziert werden (siehe Abbildung 6). Auffällig war außerdem, dass es vereinzelt Zellansammlungen gab, die eine verstärkte Expression von Oct4 aufwiesen (siehe Abbildung 7).



**Abbildung 6:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Expression von Oct4 und Ki-67 in hTCEpi-Zellen und lichtmikroskopische Aufnahme der angefärbten Zellen (grün: Oct4-Expression, rot: Ki-67-Expression, blau: Zellkerne, (D), (H): lichtmikroskopische Aufnahmen; Maßstab in Bild D entspricht dem Maßstab der anderen Bilder (20 µm))

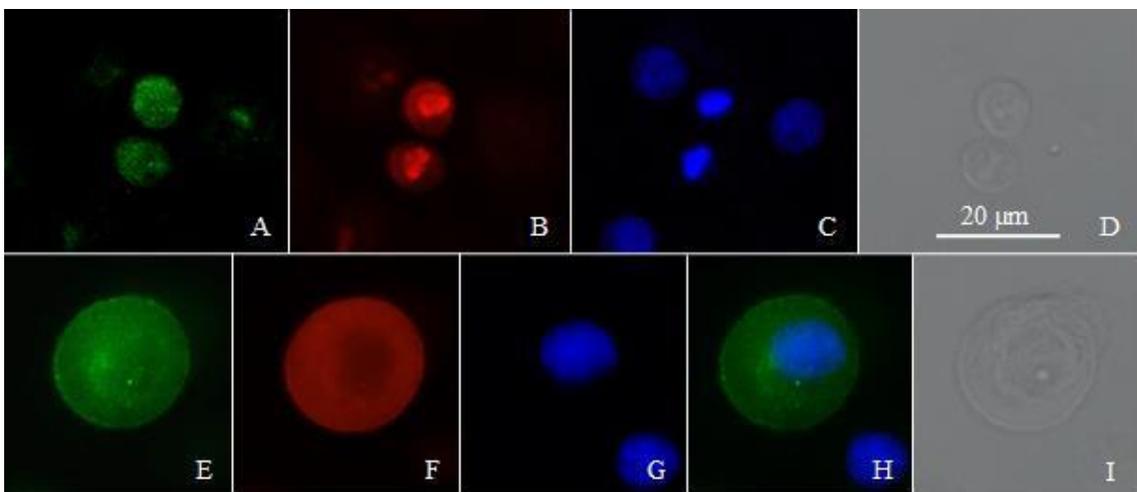


**Abbildung 7:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Oct4-Expression eines Zellclusters der hTCEpi-Zellen (grün: Oct4-Expression, blau: Zellkerne, Maßstab in Bild C entspricht dem Maßstab der anderen Bilder (20 µm))

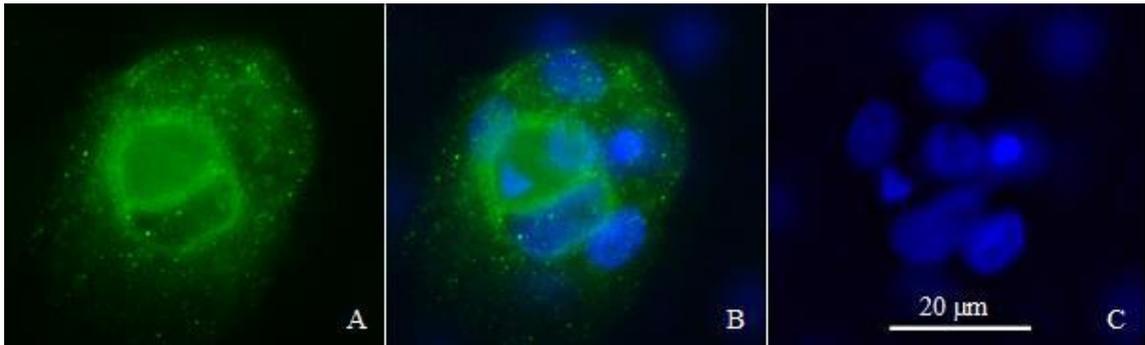
Der Anteil der Oct4-positiven Zellen betrug im Mittel 2,02 % (SD: 0,011). Die Expression von Oct4 auf RNA-Ebene konnte außerdem durch eine positive Gelelektrophorese nach PCR bestätigt werden (siehe Abbildung 4).

### Nanog

Der Stammzellfaktor Nanog wurde, ähnlich wie Oct4, in fast allen Zellen schwach zellkernständig und im kernnahen Zytoplasma exprimiert (siehe Abbildung 8). Wenige Zellen zeigten eine verstärkte Expression. Doppelfärbungen mit Ki-67 und die morphologische Begutachtung zeigten, dass es sich um proliferierende Zellen handelte (siehe Abbildung 8A-D). Analog zu der Oct4-Expression gab es vereinzelt Zellcluster, die eine erhöhte Expression von Nanog aufwiesen (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 8:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Expression von Nanog- und Ki-67 in hTCEpi-Zellen und lichtmikroskopische Aufnahme der angefärbten Zellen (grün: Nanog-Expression, rot: Ki-67-Expression, blau: Zellkerne, (D), (I): lichtmikroskopische Aufnahmen, Maßstab in Bild D entspricht dem Maßstab der anderen Bilder (20 µm))



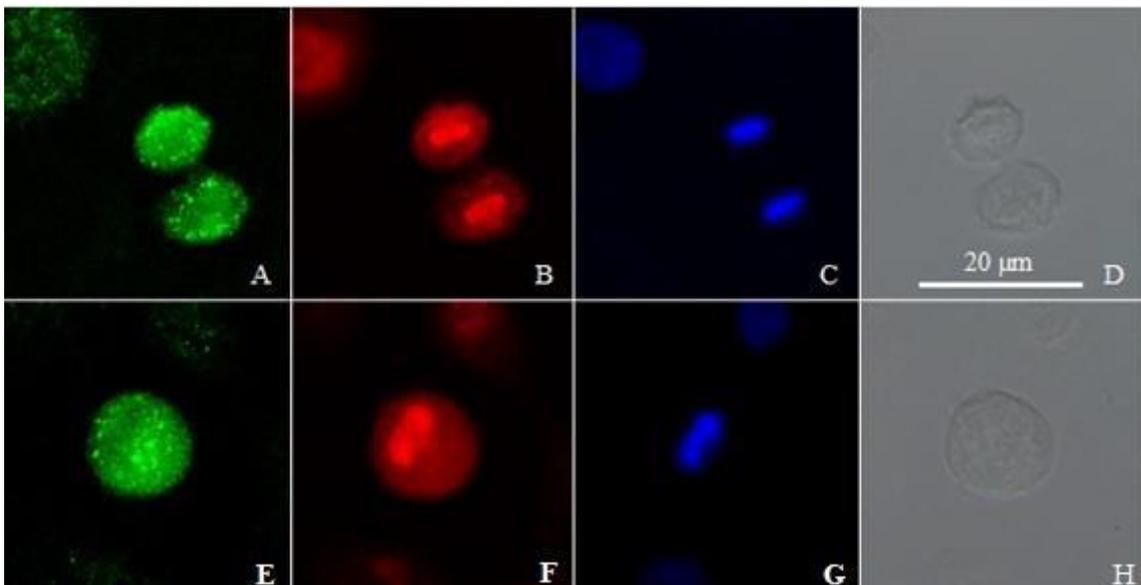
**Abbildung 9:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Nanog-Expression eines Zellclusters der hTCEpi-Zellen

(grün: Oct4-Expression, blau: Zellkerne, Maßstab in Bild C entspricht dem Maßstab der anderen Bilder (20 µm))

Der Anteil Nanog exprimierender Zellen betrug im Mittel 2,89% (SD: 0,019). Die Ergebnisse der ICC-Färbungen konnten durch die Ergebnisse der Gelelektrophorese nach reverser PCR mit dem Primer für das Nanog-Gen validiert werden (siehe Abbildung 4).

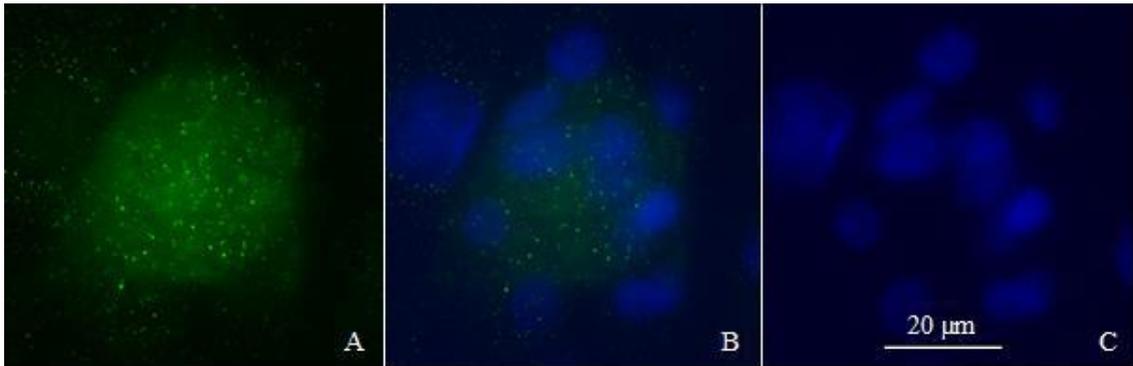
### FGFR2

Durch die ICC konnte der FGF-Rezeptor 2 in vielen Zellen nachgewiesen werden. Ki-67-positive, proliferierende Zellen zeigten eine verstärkte Expression. Diese war sowohl zytoplasmatisch als auch zellwandständig. Der Zellkern wies nur eine schwache Expression auf (siehe Abbildung 10). Außerdem existierten erneut Cluster von Zellen, welche verstärkt den FGFR2 exprimierten (siehe Abbildung 11).



**Abbildung 10:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Expression des FGFR2 und Ki-67 in hTCEpi-Zellen und lichtmikroskopische Aufnahme der angefärbten Zellen

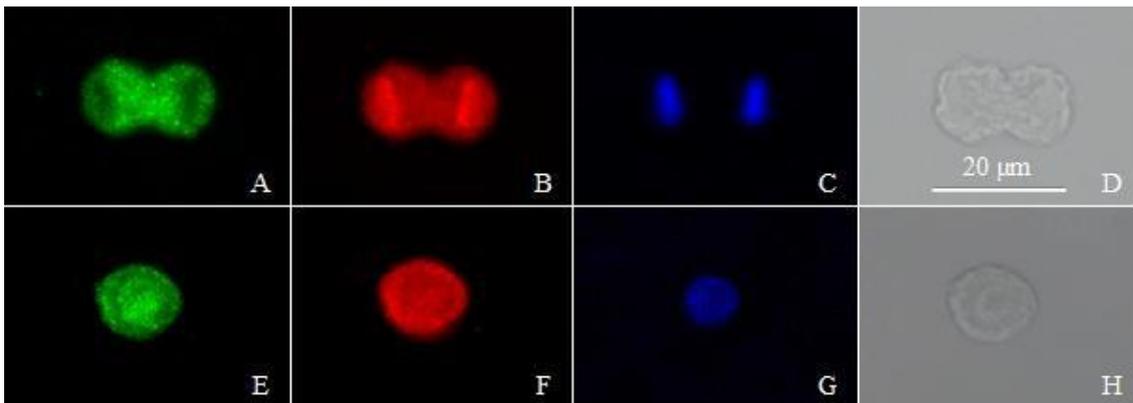
(grün: FGFR2-Expression, rot: Ki-67-Expression, blau: Zellkerne, (D), (H): lichtmikroskopische Aufnahmen, Maßstab in Bild D entspricht dem Maßstab der anderen Bilder (20 µm))



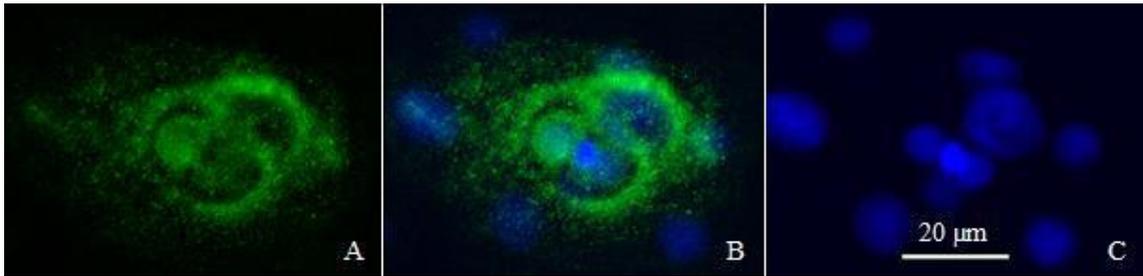
**Abbildung 11:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der FGFR2-Expression eines Zellclusters der hTCEpi-Zellen (grün: FGFR2-Expression, blau: Zellkerne, Maßstab in Bild C entspricht dem Maßstab der anderen Bilder (20 µm))

### IRF8

Viele der hTCEpi-Zellen zeigten eine schwache Expression des Transkriptionsfaktors IRF8, wobei diese vor allem zellkernständig war. Es fanden sich erneut einige Zellen, die eine stärkere Expression von IRF8 aufwiesen. Durch Doppelfärbungen mit Ki-67 und durch morphologische Beurteilung der Zellen konnten diese als proliferierende Zellen identifiziert werden (siehe Abbildung 12). Neben der erhöhten Expression in sich teilenden Zellen, ließen sich ebenfalls Zellcluster finden, deren Zellen eine erhöhte IRF8-Expression aufwiesen (siehe Abbildung 13).



**Abbildung 12:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Expression von IRF8 und Ki-67 in hTCEpi-Zellen und lichtmikroskopische Aufnahme der angefärbten Zellen (grün: IRF8, rot: Ki-67, blau: Zellkerne, (D), (H): lichtmikroskopische Aufnahme, Maßstab in Bild D entspricht dem Maßstab der anderen Bilder (20 µm))

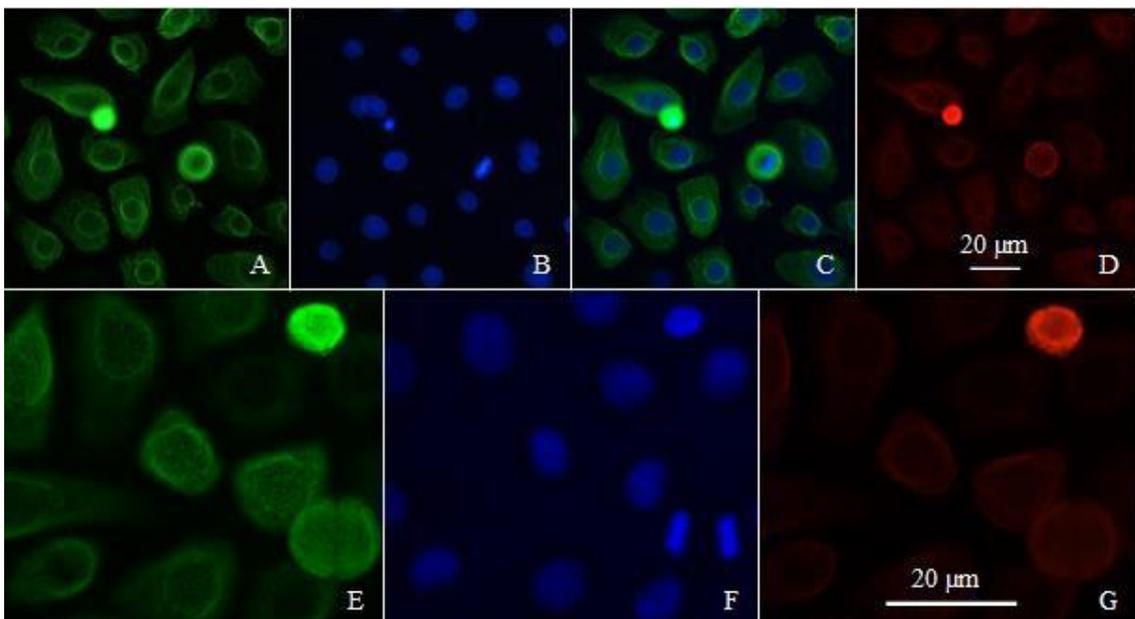


**Abbildung 13:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der IRF8-Expression von Zellen eines Zellclusters der hTCEpi-Zellen (grün: FGFR2-Expression, blau: Zellkerne, Maßstab in Bild C entspricht dem Maßstab der anderen Bilder (20 µm))

Der Anteil an IRF8-positiven Zellen beträgt hierbei im Mittel 1,47 % (SD:0,0074). Ein Nachweis von IRF8 mittels PCR gelang nicht.

#### CK14

Als Bestandteil des Zytoskeletts limbalen Stammzellen kam CK 14 in sämtlichen hTCEpi-Zellen im Bereich des Zytoplasmas und in der Kernmembran vor. Der Zellkern zeigte hingegen keine Expression. Zellen, die durch Färbung gegen Ki-67 und morphologische Begutachtung als proliferierende Zellen bestimmt werden konnten, exprimierten verstärkt CK14. Allerdings zeigten sie diese verstärkte Expression nur, solange sich noch keine zwei neuen Zellkerne gebildet hatten. Sobald die Zellkerne sich im Prozess der Zellteilung voneinander entfernen, entspricht die Stärke der Intensität der Expression der der ruhenden Zellen (siehe Abbildung 14).



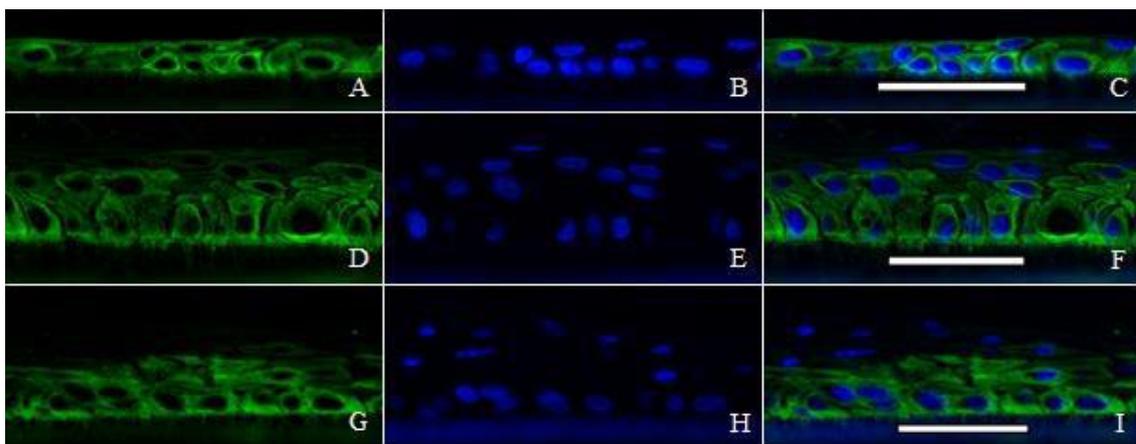
**Abbildung 14:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Expression von CK14 und Ki-67 in hTCEpi-Zellen (grün: CK14, rot: Ki-67, blau: Zellkerne, Maßstab in Bild D entspricht dem Maßstab der anderen Bilder (20 µm))

### 4.3 Expressionsveränderung der Stammzellmarker nach Differenzierung der Zellen

Die Differenzierung der hTCEpi-Zellen erfolgte auf Zellkultureinsätzen mit Kollagenbeschichteten Membranen. Zunächst wurde die Calcium-Konzentration im Medium erhöht und nach sieben Tagen mit dem *Airlifting* begonnen. Um den Differenzierungsprozess zeitlich genauer beurteilen zu können, wurden in Abständen von zwei bis drei Tagen die Membranen aus den Einsätzen gelöst, in Paraffin eingebettet, mit einem Mikrotom geschnitten und anschließend mit immunzytochemisch gefärbt.

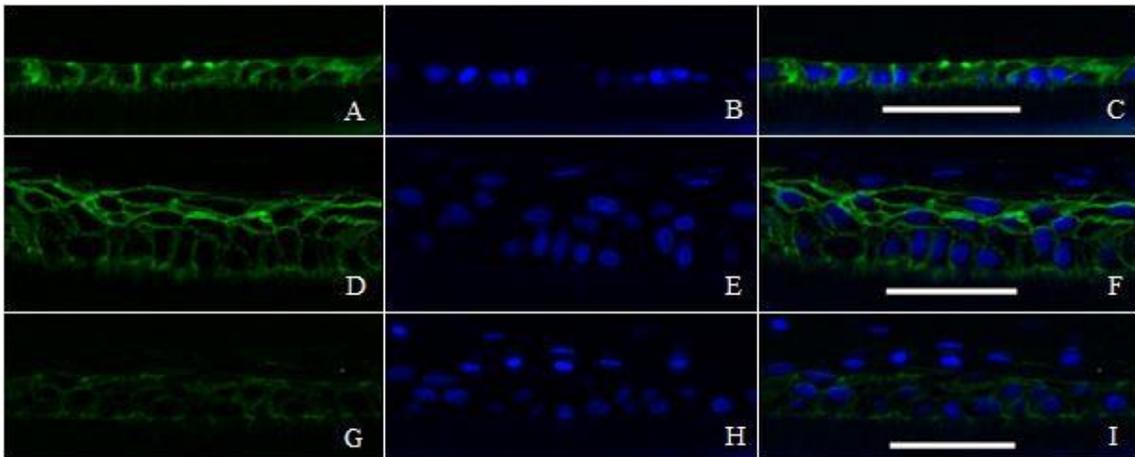
Nach der Calcium-Erhöhung hatten die Zellen eine ein- bis zweilagige Zellschicht gebildet. Nach sieben Tagen *Airlifting*-Bedingungen bestand bereits eine vier- bis fünflagige Zellschicht. Damit war der maximale Schichtungsgrad erreicht, der sich auch 21 Tage nach Beginn des *Airliftings* nicht änderte.

Vor Beginn des *Airliftings* zeigten bei der immunzytochemischen Anfärbung von CK14 alle Zellen eine Expression des Zytokeratins. Sieben Tage nach Beginn des *Airliftings* wiesen vor allem die untersten zwei Zellschichten eine starke Expression auf, welche in den äußeren Schichten schwächer war. Die Expression in den äußeren Zellschichten war 14 Tage nach dem *Airlifting* noch stärker reduziert, wohingegen die unteren zwei Zellschichten eine unverändert starke Expression aufwiesen (siehe Abbildung 15).



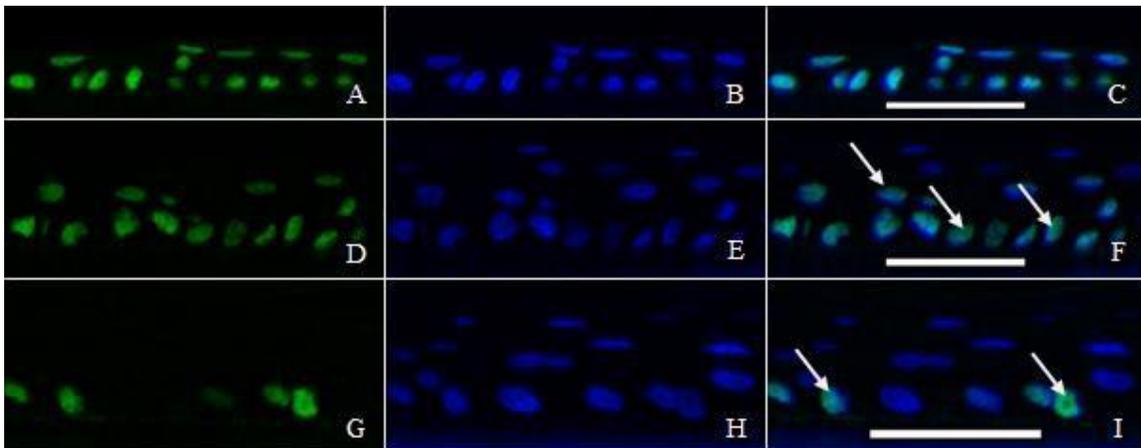
**Abbildung 15:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der CK14-Expression der hTCEpi-Zellen im Differenzierungsprozess  
(A-C): 7 Tage nach Calcium-Erhöhung im Medium. (D-F): 7 Tage nach *Airlifting*. (G-I): 14 Tage nach *Airlifting*. (grün: CK14-Expression, blau: Zellkerne, Balken: 30 µm).

Die E-Cadherin-Expression zeigte sich sieben Tage nach Calcium-Erhöhung im Medium in allen Zellschichten. Nach siebentägigem *Airlifting* wies die oberste Zellschicht keine Expression von E-Cadherin mehr auf. 14 Tage nach Beginn des *Airliftings* waren nur noch die untersten ein bis zwei Zellschichten positiv für E-Cadherin. In den obersten Schichten ließ sich keine Expression mehr nachweisen (siehe Abbildung 16).



**Abbildung 16:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der E-Cadherin-Expression der hTCEpi-Zellen im Differenzierungsprozess  
 (A-C): 7 Tage nach Calcium-Erhöhung im Medium. (D-F): 7 Tage nach *Airlifting*. (G-I): 14 Tage nach *Airlifting*. (grün: E-Cadherin-Expression, blau: Zellkerne, Balken: 30  $\mu\text{m}$ ).

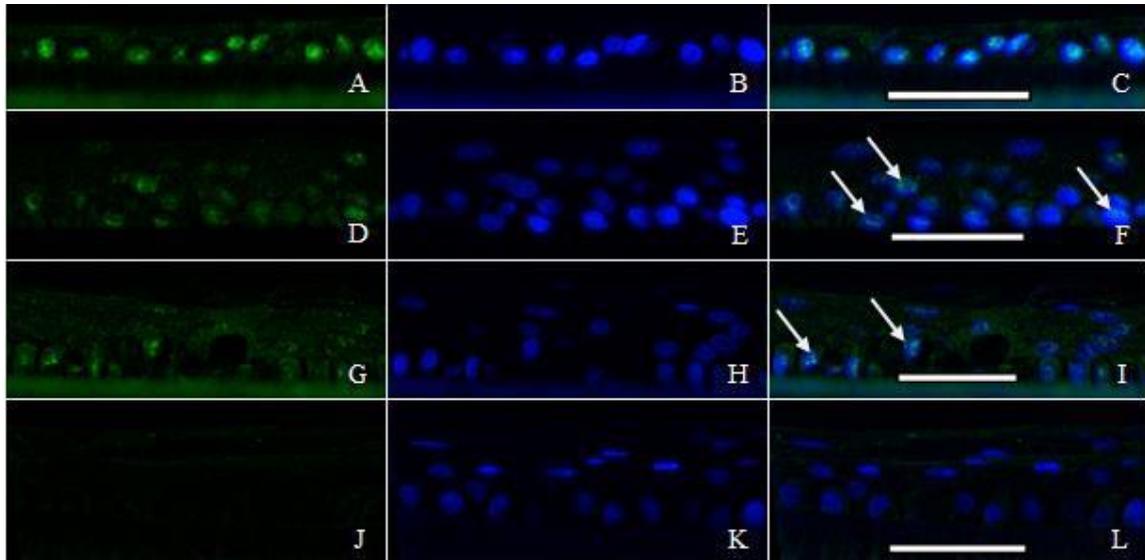
Vor Beginn des *Airliftings* zeigten alle Zellen eine Expression des Transkriptionsfaktors p63. Mit fortschreitender Differenzierung nahm die Expression in den oberen Zellschichten ab. 14 Tage nach Beginn des *Airliftings* zeigten nur noch vereinzelte basale Zellen eine Expression (siehe Abbildung 17).



**Abbildung 17:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der p63-Expression der hTCEpi-Zellen im Differenzierungsprozess  
 (A-C): 7 Tage nach Calcium-Erhöhung im Medium. (D-F): 7 Tage nach *Airlifting*. (G-I): 14 Tage nach *Airlifting*. (grün: p63-Expression, blau: Zellkerne, Pfeile: p63-exprimierende Zellen, Balken: 30  $\mu\text{m}$ ).

IRF8 wurde vor Beginn des *Airliftings* in allen Zellen stark zellkernständig exprimiert. Bereits zwei Tage nach Beginn des *Airliftings* nahm die Anzahl an IRF8-exprimierenden Zellen deutlich ab. Auch die Intensität der Färbung war reduziert. Vor allem basale und suprabasale Zellen zeigten noch eine Expression. Sieben Tage nach *Airlifting*-Beginn waren nur noch vereinzelt basale Zellen zellkernständig positiv. Außerdem zeigte sich nun vermehrt eine zytoplasmatische

Expression. Nach 14 Tagen *Airlifting* konnte keine Expression von IRF8 mehr festgestellt werden weder zytoplasmatisch noch im Zellkern (siehe Abbildung 18).



**Abbildung 18:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der IRF8-Expression der hTCEpi-Zellen im Differenzierungsprozess  
(A-C): 7 Tage nach Calcium-Erhöpfung im Medium. (D-F): 2 Tage nach *Airlifting*. (G-I): 7 Tage nach *Airlifting*. (J-L): 14 Tage nach *Airlifting*. (grün: IRF8-Expression, blau: Zellkerne, Pfeile: IRF8-exprimierende Zellen, Balken: 30 µm).

Oct4, Nanog, FGFR2 und N-Cadherin konnten im Verlauf der Differenzierung nicht nachgewiesen werden. Die folgende Tabelle dient als Übersicht über die Ergebnisse der Differenzierungsversuche.

**Tabelle 12:** Übersicht über die Ergebnisse der Differenzierungsversuche

		7 Tage nach Calciumerhöhung	7 Tage nach <i>Airlifting</i>	14 Tage nach <i>Airlifting</i>
CK14	Basale Zellen	++	++	++
	Superfizielle Zellen	/	+	(+)
E- Cadherin	Basale Zellen	++	++	++
	Superfizielle Zellen	/	(+)	-
p63	Basale Zellen	++	++	(+)
	Superfizielle Zellen	/	(+)	-
IRF8	Basale Zellen	++	(+)	-
	Superfizielle Zellen	/	-	-

++: alle Zellen exprimieren den Marker, +: einige Zellen exprimieren den Marker, (+): vereinzelte Zellen exprimieren den Marker, -: keine Zelle exprimiert den Marker, /: superfizielle Zellschicht nicht vorhanden

#### **4.4 Auswirkungen der Interferon-gamma-Behandlung auf die Zellmorphologie und das Zellwachstum**

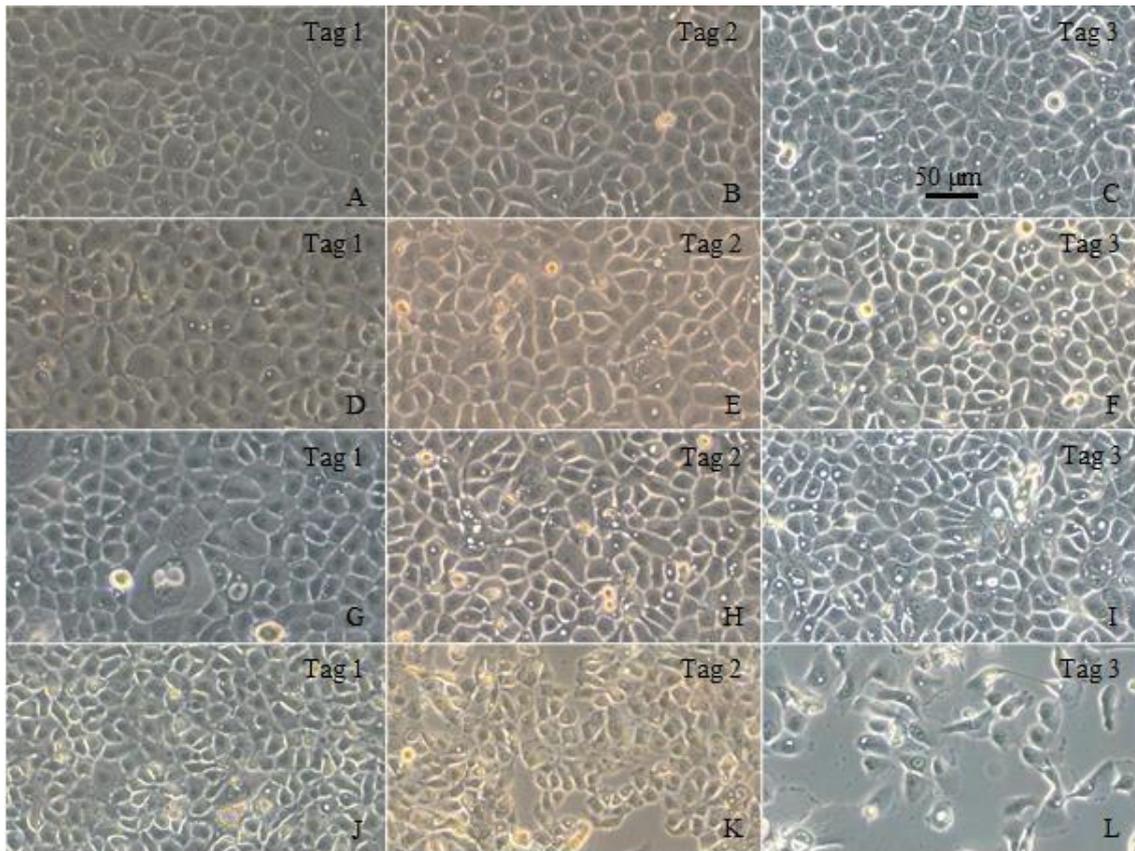
Zur Untersuchung der Auswirkungen der IFN- $\gamma$ -Behandlung auf die Zellmorphologie wurden täglich lichtmikroskopische Bilder der Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen angefertigt (siehe 3.2.12). Anhand dieser Begutachtung konnten potentielle Unterschiede an der Morphologie festgehalten werden. Zur Bestimmung der Zellzahl unter verschiedenen Kulturbedingungen wurden nach Durchführung einer immunzytochemischen Färbung Fotografien, der mit Hoechst 33258 angefärbten Zellkerne, angefertigt. Insgesamt wurden sechs Fotografien mit einer Gesamtfläche von 3,058 mm<sup>2</sup> ausgewertet. Die Zählung der Zellkerne erfolgte standardisiert mit der Software ImageJ.

Die Behandlung mit 10 ng/ml IFN- $\gamma$  bei einer Anfangszellzahl von 150.000 Zellen resultierte bereits nach 24 Stunden in Zelltrümmern und sich aus dem Zellverbund lösenden Zellen. Es ließen sich nur vereinzelt teilende Zellen auffinden. Die Menge an Zelltrümmern nahm während der Versuchsdauer zu, wohingegen die Anzahl vitaler und sich teilender Zellen deutlich abnahm. Am dritten Tag war der Zellrasen bereits merklich ausgedünnt und das Bild von Zelltrümmern dominiert (siehe Abbildung 19 J-L).

Bei der Behandlung mit 5 ng/ml IFN- $\gamma$  waren nach dem ersten Tag keine merklichen morphologischen Unterschiede im Vergleich zu den unbehandelten Zellen feststellbar. Es gab einige sich teilende Zellen und keine Zelltrümmer oder sterbenden Zellen. Ab dem zweiten Tag zeigten einige der Zellen eine zunehmende Vakuolisierung im Zytoplasma, welche am dritten Tag noch ausgeprägter war. Außerdem ließen sich dann auch Zelltrümmer finden. Über den gesamten Zeitraum der Behandlung konnten Zellteilungen beobachtet werden (siehe Abbildung 19 G-I).

In den Zellkulturen die mit 1 ng/ml IFN- $\gamma$  behandelt worden waren, teilten sich die Zellen über den gesamten Versuchszeitraum weiter. Eine Vakuolisierung des Zytoplasmas war nur in geringem Maß ab dem dritten Tag feststellbar. Es gab weder Zelltrümmer noch sterbende Zellen (siehe Abbildung 19 D-F). Der einzige morphologisch sichtbare Unterschied zu den unbehandelten Zellen war die etwas stärker ausgeprägte Vakuolisierung des Zytoplasmas.

Bei den unbehandelten Zellen zeigten sich über die gesamte Versuchsdauer teilende Zellen, aber keine Zelltrümmer (siehe Abbildung 19 A-C). Bei einer Anfangszellzahl von 50.000 Zellen konnten die gleichen Effekte beobachtet werden, wenn auch ausgeprägter als bei einer Anfangszellzahl von 150.000 Zellen.

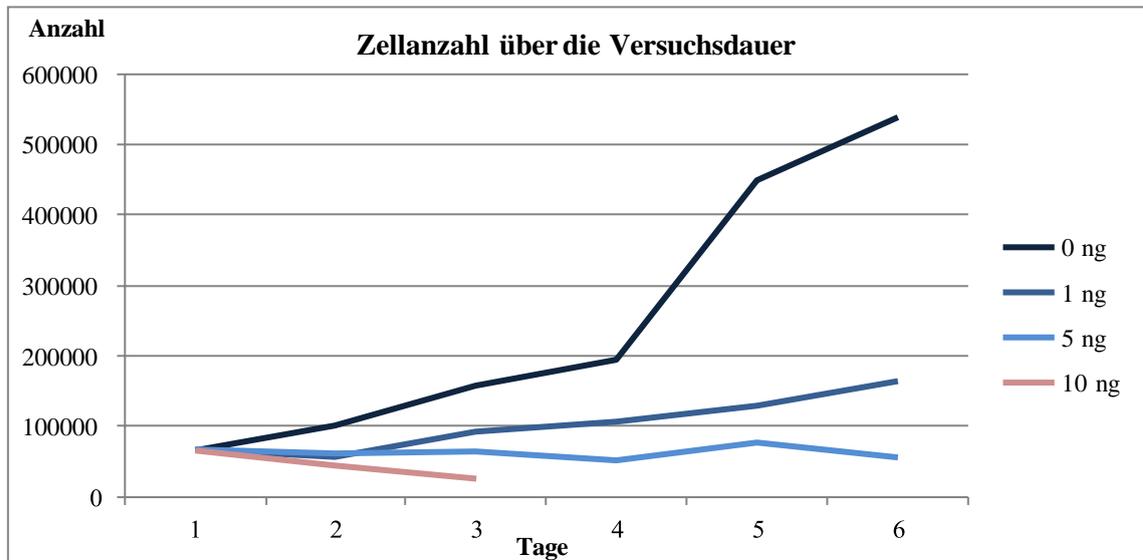


**Abbildung 19:** Lichtmikroskopische Aufnahme der hTCEpi-Zellen bei mehrtägiger Stimulation mit IFN- $\gamma$   
 (A)-(C): keine Behandlung mit IFN- $\gamma$ . (D)-(F): Behandlung mit 1 ng/ml IFN- $\gamma$ . (G)-(I): Behandlung mit 5 ng/ml IFN- $\gamma$ . (J)-(L): Behandlung mit 10 ng/ml IFN- $\gamma$ , Maßstab für alle Bilder gleich (Balken 50  $\mu$ m).

Bei der Betrachtung der Zellzahl auf den gelatinebeschichteten Deckgläsern zeigte sich, dass die Zellen generell langsamer wuchsen als auf unbehandelten Well-Platten. Dies stellte sich in einer längeren PVZ von 37,13 Stunden auf den gelatinebeschichteten Deckgläsern im Vergleich zu 19,82 Stunden bei den unbehandelten Well-Platten dar.

Wurde die Zellzahl auf gelatinebeschichteten Deckgläsern bei Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von IFN- $\gamma$  über die Versuchsdauer betrachtet, so fielen Unterschiede untereinander und im Vergleich zu den unbehandelten Zellen auf. Die Zellzahl der unbehandelten Zellen stieg kontinuierlich an. Selbiges ließ sich auch bei der Zellzahl der mit 1 ng/ml IFN- $\gamma$  behandelten Zellen feststellen. Die Zellzahl stieg hier jedoch bedeutend langsamer, sodass sich die Population erst nach vier Tagen verdoppelt hatte. Während der Behandlung der Zellen mit 5 ng/ml IFN- $\gamma$  ließ sich kein stetiger Anstieg der Zellzahl feststellen. Vielmehr schwankte die ausgezählte Zellanzahl zwischen 51.994 und 77.428 Zellen pro 3,058 mm<sup>2</sup> (17.002 beziehungsweise 25.319 Zellen pro Quadratmillimeter). Bei Behandlung mit 10 ng/ml IFN- $\gamma$  zeigte sich ein kontinuierlicher Abfall der Zellzahl über die Dauer von drei Versuchstagen. Anhand dieser Versuche wurde die Konzentration von 1 ng/ml IFN- $\gamma$  als bestmögliche, für die

Zellen verträgliche, gewählt, da sie die Vitalität der Zellen im Vergleich zu den anderen Konzentrationen nicht reduzierte. Deshalb wurden die Folgeversuche mit einer Konzentration von 1 ng/ml IFN- $\gamma$  durchgeführt. Die folgende Abbildung 20 stellt graphisch das Wachstum der Zellen unter Behandlung mit IFN- $\gamma$  dar:



**Abbildung 20:** Betrachtung der Zellanzahl pro 3,058 mm<sup>2</sup> bei Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von IFN- $\gamma$

#### 4.5 Veränderung der IRF8-Expression durch Behandlung mit IFN- $\gamma$

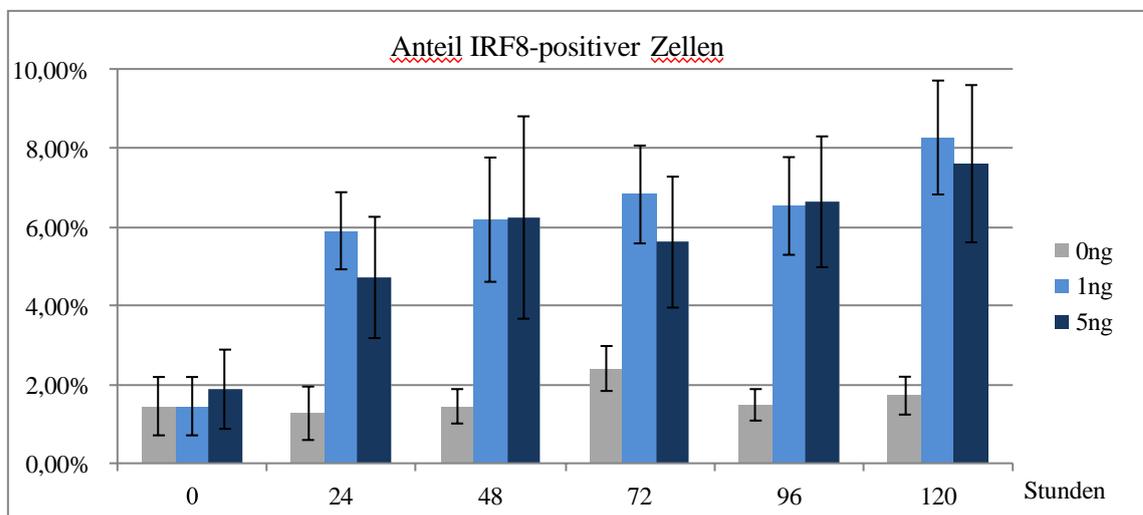
Zur Bestimmung der IRF8-Expression in den hTCEpi-Zellen wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an IFN- $\gamma$  versetzt (siehe 3.2.13). Nach unterschiedlichen Zeitspannen wurde eine immunzytochemische Färbung der auf Deckgläsern fixierten Zellen durchgeführt. Anschließend wurden sie unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und insgesamt sechs Fotografien pro Deckglas angefertigt, wobei das Foto einer Gesamtfläche von 3,058 mm<sup>2</sup> entsprach. Mit der Software ImageJ wurde anschließend die Gesamtzellzahl und die Anzahl an IRF8-exprimierenden Zellen ermittelt.

Bei den unbehandelten Zellen ließ sich keine signifikante Zu- oder Abnahme des Anteils an IRF8-positiven Zellen über einen Versuchszeitraum von 6 Tagen feststellen (siehe Abbildung 21, graue Balken). Der Anteil an positiven Zellen lag zwischen 1,29 und 2,4 % (p-Wert > 0,1).

Während der Behandlung mit 1 ng/ml IFN- $\gamma$  stieg bereits nach 24 Stunden der Anteil IRF8-positiven Zellen von 1,45 auf 5,89 % hochsignifikant an (p = 0,009). In den noch folgenden 96 Stunden der Behandlung mit IFN- $\gamma$  veränderte der Anteil jeweils im Vergleich zum Vortag nicht mehr signifikant (p > 0,1). Über den gesamten Versuchszeitraum gesehen, blieb der Anteil signifikant über dem zum Zeitpunkt 0 gemessenen Wert (p < 0,01). Außerdem lag der Anteil IRF8-exprimierender Zellen über den gesamten Behandlungszeitraum mit 1 ng/ml IFN- $\gamma$

signifikant über den Werten der unbehandelten Probe ( $p < 0,01$ ) (siehe Abbildung 21, hellblaue Balken).

Wurden die Zellen mit 5 ng/ml IFN- $\gamma$  behandelt, zeigte sich ebenfalls 24 Stunden nach Behandlungsbeginn ein signifikanter Anstieg der IRF8-positiven Zellen von 1,88 auf 4,71 % ( $p = 0,043$ ). Nach 120 Stunden wurde der mit 7,6 % höchste gemessene Anteil bestimmt, welcher im Vergleich zu dem Anteil vor Behandlungsbeginn hoch signifikant darüber lag ( $p < 0,01$ ). Dieser Wert lag allerdings nicht signifikant über den Werten der vorherigen vier Proben, welche mit 5 ng/ml IFN- $\gamma$  behandelt wurden und die zu früheren Zeitpunkten entnommen wurden ( $p > 0,1$ ). Wie auch bei der Behandlung mit 1 ng/ml IFN- $\gamma$  war der Anteil der IRF8-positiven Zellen über die gesamte Behandlungsdauer signifikant bis sehr signifikant höher als bei der unbehandelten Probe ( $p$ -Wert  $< 0,05$  beziehungsweise  $< 0,01$ ) (siehe Abbildung 21, dunkelblaue Balken). Insgesamt gesehen bewirkte also die Behandlung mit IFN- $\gamma$  eine signifikante Erhöhung der IRF8-Expression, jedoch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Behandlung mit 1 und 5 ng/ml festgestellt werden ( $p$ -Wert  $> 0,1$ ).



**Abbildung 21:** prozentualer Anteil IRF8-positiver Zellen während Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von IFN- $\gamma$  (0, 1 und 5 ng/ml) mit Angabe der Standardabweichung als Fehlerbalken

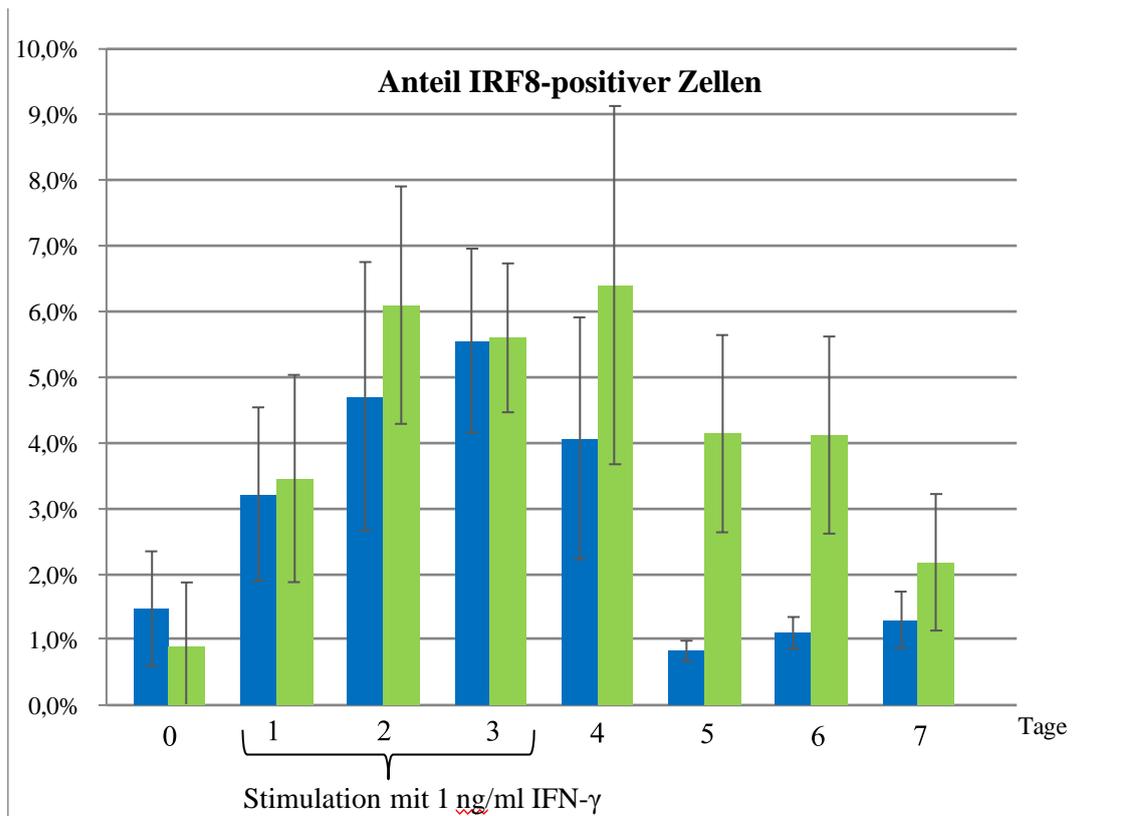
Um zu überprüfen, ob und wie lange der Anteil IRF8-positiver Zellen nach Ende der Behandlung mit IFN- $\gamma$  erhöht war, wurde die in 3.2.12 beschriebene Versuchsreihe 3 (Tabelle 11) durchgeführt. Es wurden zwei verschiedene Anfangszellzahlen (50.000 und 150.000 Zellen) getestet, welche für drei Tage mit 1 ng/ml IFN- $\gamma$  behandelt wurden. Der Anteil an IRF8-positiven Zellen wurde erneut nach Fotografie der angefertigten Färbungen auf einer Gesamtfläche von 3,058 mm<sup>2</sup> mittels ImageJ ermittelt.

Bei einer Anfangszellzahl von 150.000 Zellen betrug der Anteil IRF8-positiver Zellen (0-Wert) 1,47 %. Nach einem bzw. zwei Tagen Behandlung mit IFN- $\gamma$  ließ sich ein signifikanter Anstieg

des Anteils an IRF8-positiven Zellen (3,22 % bzw. 4,71 %,  $p = 0,044$  bzw.  $0,019$ ) feststellen. Am letzten Tag der Stimulation lag der Anteil mit 5,55 % höchst signifikant über dem 0-Wert ( $p$ -Wert =  $3,04 \times 10^{-120}$ ). Bereits 24 Stunden nach der Beendigung der IFN- $\gamma$ -Behandlung sank der Anteil hoch signifikant auf 4,07 % ab ( $p = 0,005$ ), womit er aber immer noch signifikant über dem 0-Wert lag ( $p = 0,011$ ). 48 Stunden nach Behandlungsende sank der Anteil höchst signifikant auf 0,89 % ( $p = 4,8 \times 10^{-16}$ ) ab. Damit lag er auch signifikant unter dem 0-Wert ( $p = 0,049$ ). Am insgesamt sechsten Versuchstag ließ sich mit 1,10 % IRF8-positiven Zellen kein signifikanter Unterschied im Vergleich 0-Wert mehr feststellen ( $p = 0,28$ ) (siehe Abbildung 22, blaue Balken).

Der Anteil IRF8-positiver Zellen betrug bei einer Anfangszellzahl von 50.000 Zellen 0,89 % (0-Wert). Nach 24 Stunden Behandlung mit IFN- $\gamma$  war ein signifikanter Anstieg des Anteils auf 3,45 % ( $p = 0,044$ ) zu verzeichnen. Nach der dreitägigen Behandlung lag der Anteil mit 5,60 % höchst signifikant über dem 0-Wert ( $p = 0,0007$ ). 24 Stunden nach Ende der Behandlung betrug der Anteil 6,40 %, was keinen signifikanten Unterschied zum Vortag darstellte ( $p = 0,94$ ). 48 Stunden nach Beendigung der IFN- $\gamma$ -Behandlung war ein signifikanter Abfall auf 4,14 % festzustellen ( $p = 0,045$ ), wobei der Anteil immer noch höchst signifikant über dem 0-Wert lag ( $p = 0,0008$ ). Auch 72 Stunden nach Ende der IFN- $\gamma$ -Behandlung befand sich der Anteil mit 4,12 % noch signifikant über dem 0-Wert ( $p = 0,015$ ). Vier Tage nach Behandlungsende zeigte sich im Vergleich zum Vortag ein höchst signifikanter Abfall des Anteils auf 2,18 % ( $p = 0,0001$ ). Damit ließ sich auch kein signifikanter Unterschied zum 0 -Wert mehr feststellen ( $p = 0,37$ ) (siehe Abbildung 22, grüne Balken).

Zusammengefasst war der Effekt der Expressionserhöhung von IRF8 bei einer Anfangszellzahl von 150.000 Zellen 48 Stunden nach Beendigung der Stimulation nicht mehr nachweisbar. Dieser Effekt hielt bei einer Anfangszellzahl von 50.000 Zellen mit insgesamt 96 Stunden doppelt so lange an.



**Abbildung 22:** prozentualer Anteil IRF8-positiver Zellen vor, während und nach dreitägiger Stimulation mit 1 ng/ml IFN- $\gamma$  und Angabe der Standardabweichung als Fehlerbalken bei unterschiedlichen Anfangszellzahlen (Grün: Anfangszellzahl 50.000 Zellen; Blau: Anfangszellzahl 150.000 Zellen; X-Achse: Tage; Y-Achse: Prozentzahl IRF8-positiver Zellen)

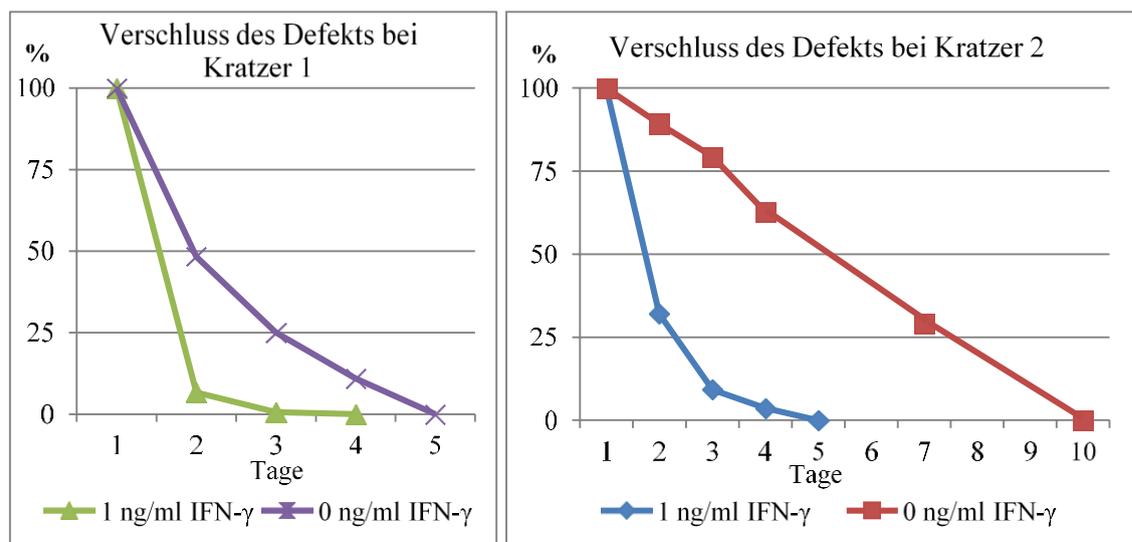
#### 4.6 Unterschiede im *Scratch-Assay* bei Stimulation mit IFN- $\gamma$

Zur Bestimmung der Unterschiede im *Scratch-Assay* nach Behandlung mit 1 ng/ml und unter Normalbedingungen wurden über vier beziehungsweise zehn Tage lichtmikroskopische Fotografien der Zellen in Kultur angefertigt, nachdem ihnen zwei Kratzer unterschiedlicher Größe (350 und 720  $\mu\text{m}$ ) zugefügt worden waren. Um den Einfluss von IFN- $\gamma$  selbst zu eliminieren, wurden die Zellen in drei Wells vor Beginn des Versuches mit 1 ng/ml IFN- $\gamma$  behandelt. Nachdem der Kratzer gesetzt worden war, wurden die Zellen ohne IFN- $\gamma$ -Zusatz kultiviert. Anschließend wurde mit dem Programm ImageJ an 18 Fotografien die Größe des Defektareals berechnet. Die ermittelte Defektfläche wurde zur besseren Vergleichbarkeit in Prozent umgerechnet, wobei die vermessene Fläche nach dem Setzen des Kratzers 100% entsprach.

Kratzer mit einer Breite von 350  $\mu\text{m}$  (Kratzer 1) waren bei unbehandelten Zellen nach 24 Stunden mit 48,27 % verbliebener Wundfläche höchst signifikant kleiner ( $p = 3,56 \times 10^{-11}$ ). Am folgenden Tag betrug das Defektareal nur noch 25,05 % der Ausgangsfläche und war damit höchst signifikant kleiner als am Vortag ( $p = 0,0005$ ). In den folgenden Tagen verringerte sich die Größe der Defektfläche nicht signifikant, bis der Kratzer am vierten Tage zugewachsen war.

Bei der vorbehandelten Probe war das Defektareal nach 24 Stunden bereits höchst signifikant auf 6,66 % geschrumpft ( $p = 1,34 \times 10^{-34}$ ), womit es außerdem signifikant unter dem der unbehandelten Probe lag ( $p = 0,043$ ). Zwei Tage nachdem der Kratzer gesetzt worden war, war dieser bei der mit IFN- $\gamma$  vorbehandelten Probe bereits wiederzugewachsen. Der Defektverschluss ist grafisch auf dem linken Abschnitt der Abbildung 23 dargestellt. Da der Wundverschluss unter diesen Bedingungen sehr schnell verlief, wurde die Migration zusätzlich bei Kratzern mit einer Breite von 720  $\mu\text{m}$  untersucht.

Bei der unbehandelten Versuchsreihe war eine kontinuierliche sowie hoch signifikante Verringerung der Defektfläche um in etwa 10 % ( $p\text{-Wert} < 0,01$ ) täglich festzustellen. Nach insgesamt zehn Tagen war das Defektareal zugewachsen. Mit 1 ng IFN- $\gamma$  vorbehandelte Zellen zeigten nach 24 Stunden nachdem der Kratzer gesetzt worden war, eine höchst signifikante Verringerung der Wundfläche auf 32,04 % ( $p = 1,06 \times 10^{-14}$ ). In den folgenden Tagen war keine signifikante Verringerung der Wundfläche mehr zu verzeichnen. Vier Tage nachdem der Kratzer gesetzt worden war, war die Wundfläche annähernd zugewachsen. Damit war der Defektverschluss sechs Tage früher abgeschlossen als bei der unbehandelten Versuchsreihe. Der Defektverschluss bei dem Kratzer mit einer Breite von 720  $\mu\text{m}$  (Kratzer 2) ist rechts in der Abbildung 23 dargestellt.



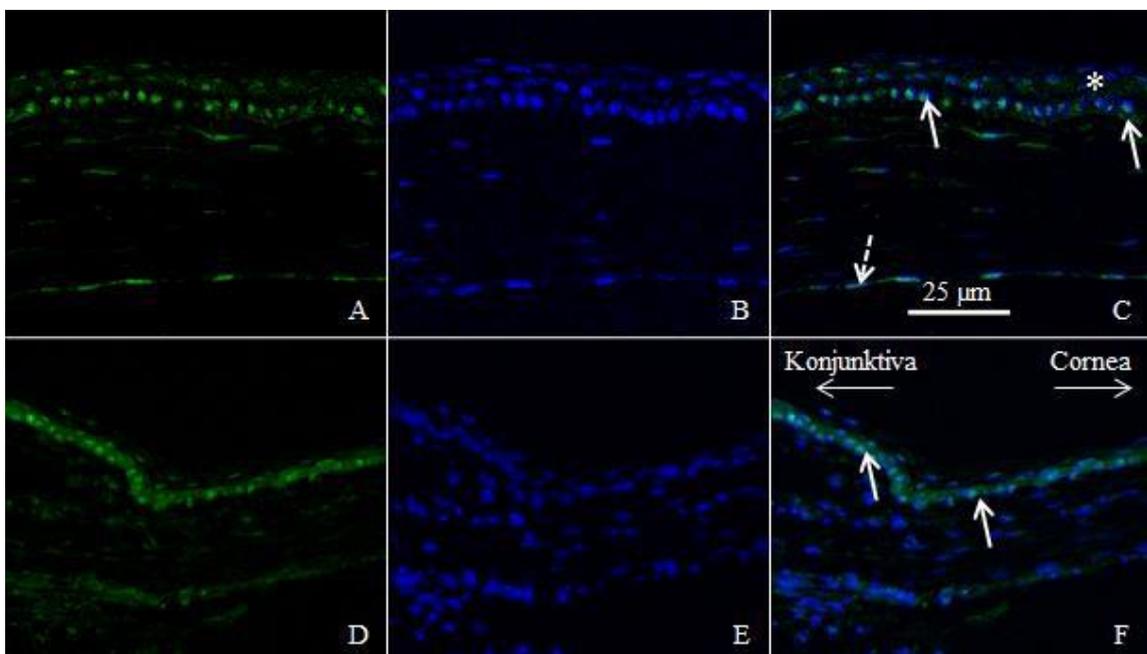
**Abbildung 23:** prozentuale Größe der Defekte im *Scratch-Assay* bei einem 350  $\mu\text{m}$  (Kratzer 1) und einem 720  $\mu\text{m}$  breiten Kratzer (Kratzer 2) (X-Achse: Zeitspanne in Tagen, Y-Achse: prozentuale Größe der Defektfläche)

Im Vergleich der beiden Versuchsreihen zeigte sich, dass der Defektverschluss der mit IFN- $\gamma$  vorbehandelten Zellen schneller verlief. So entspricht das Defektareal des ersten Tages bei der vorbehandelten Probe in etwa der des siebten Tages der unbehandelten Probe.

#### 4.7 Expression von IRF8 im Mausauge

Um die Ergebnisse an der Zelllinie bezüglich der IRF8 -Expression zu verifizieren, wurden immunhistochemische Färbungen mit zwei verschiedenen Antikörpern gegen IRF8 im Mausauge durchgeführt. Es wurden hierbei sowohl die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Färbungen als auch die Ergebnisse der Färbungen nach der ABC-Methode ausgewertet. Beide Antikörper zeigten in beiden Methoden die gleichen Ergebnisse. Insgesamt wurden 37 Färbungen an sieben verschiedenen WT-Mausaugen ausgewertet.

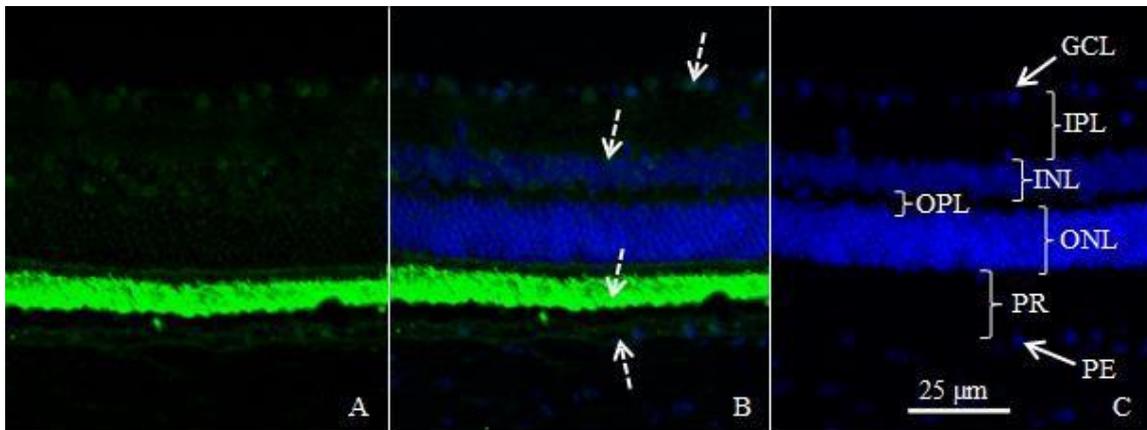
IRF8 konnte im Bereich der zentralen Cornea vor allem in basalen Epithelzellkernen nachgewiesen werden, wobei auch vereinzelt oberflächlicher gelegene Zellen eine Expression aufwiesen (siehe Abbildung 24 A-C). In Richtung des Limbus wurde die Expression stärker und es waren vermehrt auch superfizielle Zellen positiv. Neben den Zellkernen zeigte auch hier das Zytoplasma eine Expression von IRF8. Die Fibroblasten des Stromas und die Endothelzellen der Cornea exprimierten ebenfalls den Transkriptionsfaktor. Im limbalen Bereich der Cornea zeigten die basalen Zellen die stärkste Expression, wobei hier wie in der peripheren Cornea auch oberflächlich gelegene Zellen eine Expression aufwiesen (siehe Abbildung 24 D-F).



**Abbildung 24:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der IRF8-Expression in der zentralen Cornea und im Limbus im WT-Mausauge

(A-C: zentrale Cornea, D-F: Limbusregion, grün: IRF8-Expression, blau: Zellkerne, Pfeil: IRF8-exprimierende Epithelzellen, gestrichelter Pfeil: IRF8-exprimierende Endothelzellen, \*: Epithel, Maßstab in Bild C entspricht dem Maßstab der anderen Bilder (25 µm))

Im Bereich des Ziliarkörpers waren einzelne Zellkerne positiv. In der Iris zeigten sich hingegen keine fluoreszierenden Bereiche, da die dort enthaltenen Melanozyten jegliche Form von Fluoreszenz verhinderten. In der Linse wurde IRF8 in den Zellkernen der äquatorialen Linsenfasern exprimiert. In der Retina war in verschiedenen Zellen eine Expression von IRF8 festzustellen. So exprimierten sowohl die Optikusganglienzellen in der Ganglienzellschicht als auch die Außensegmente der Photorezeptoren der Retina IRF8. Die Expression war in den Photorezeptoren am stärksten. Ebenfalls positiv zeigten sich die Zellen des retinalen Pigmentepithels (siehe Abbildung 25)



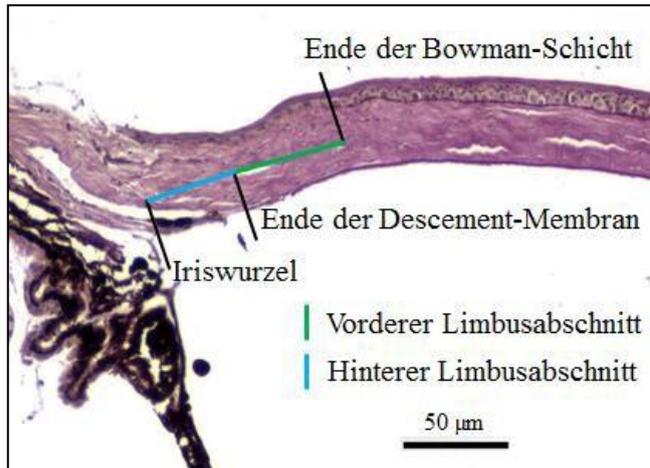
**Abbildung 25:** IRF8-Expression in der Retina eines WT-Mausauges (grün: IRF8-Expression, blau: Zellkerne, gestrichelte Pfeile: Regionen/Zellen, die IRF8 exprimieren, GCL: *Ganglion cell layer*; IPL: *inner plexiform layer*; INL: *inner nuclear layer*; OPL: *outer plexiform layer*; ONL: *outer nuclear layer*; PR: Photorezeptoren; PE: Pigmentepithel, Maßstab in Bild C entspricht dem Maßstab der anderen Bilder (25 µm))

Als Negativkontrolle bei diesen Untersuchungen dienten die IRF8<sup>-/-</sup>-Mausaugen, welche keinerlei IRF8-Expression in den untersuchten Regionen aufwiesen.

#### 4.8 Bestimmung der Limbusregion am Mausauge und Einfluss von IRF8 auf die Größe der Region

Da IRF8 im Limbusepithel in den vorangegangenen Versuchen nachgewiesen werden konnte, sollte weitergehend überprüft werden, inwieweit die Limbusregion selbst beziehungsweise deren Größe durch die Expression von IRF8 beeinflusst wird. Zur Bestimmung der Limbusregion wurden Aufnahmen der PAS-Färbungen an den Mausaugen verwendet. Bei diesen Aufnahmen wurde zur Größenbestimmung der Limbusregion die Distanz zwischen dem Ende der Bowman-Schicht und dem Ende der Schwalbe-Linie, sowie die Distanz zwischen Schwalbe-Linie und der Iriswurzel mit dem Programm ImageJ berechnet. Da sowohl die Bowman-Schicht, als auch die Descemet-Membran mittels PAS-Färbung angefärbt werden konnten, ließ sich das jeweilige Ende bestimmen. Aus der Addition der Werte konnte die Gesamtlänge des Limbus bei der Maus bestimmt werden (siehe Abbildung 26). Dieses Verfahren wurde sowohl bei den Wildtyp-Mausaugen als auch bei den IRF8<sup>-/-</sup>-Mausaugen durchgeführt. Insgesamt wurden vier WT-

Mausaugen (97 Schnitte mit PAS-Färbung) und drei IRF8<sup>-/-</sup>-Mausaugen (57 Schnitte mit PAS-Färbungen) vermessen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel über den t-Test.



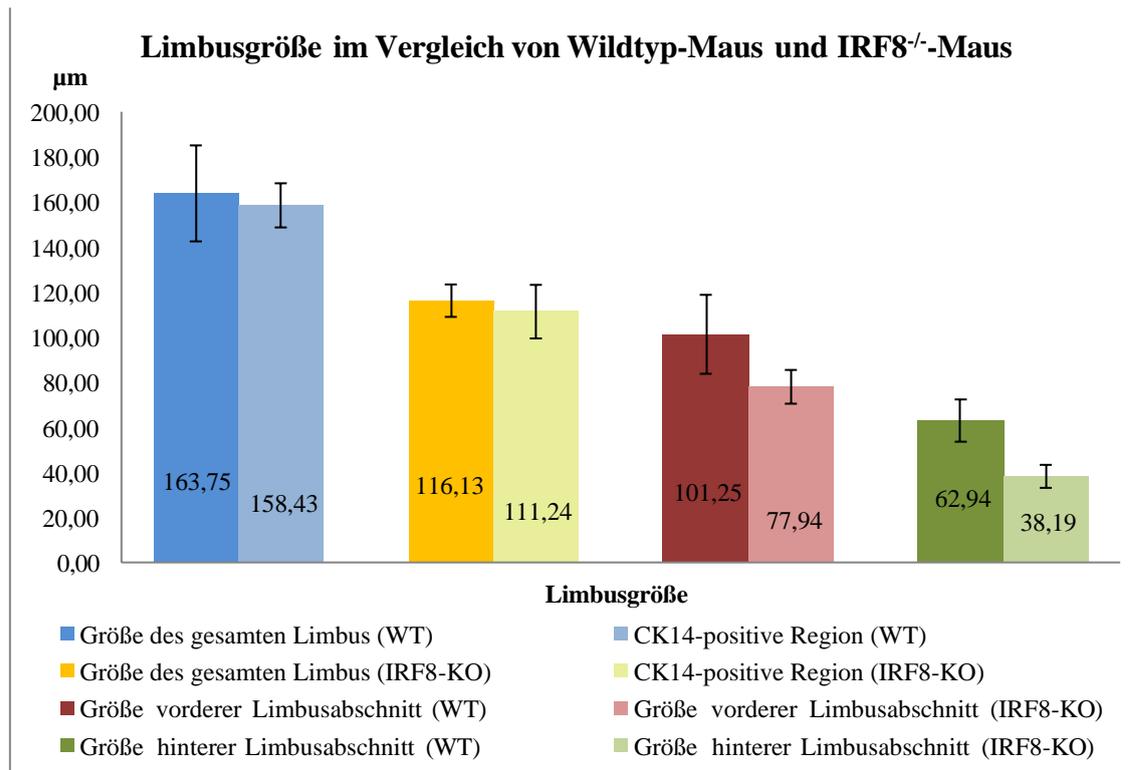
**Abbildung 26:** Schema der Vermessung des Limbus an einer PAS-Färbung eines WT Mausauges

Bei der Vermessung der Limbusgröße der WT-Mausaugen nach PAS-Färbung ergab sich eine Limbusgröße von im Mittel 163,78 µm (SD: 21,29 µm), wobei der vordere Abschnitt mit 101,25 µm (SD: 17,51 µm) gegenüber dem hinteren Abschnitt (MW: 62,94 µm, SD: 38,19 µm) den größten Anteil bildete. Die Limbusregion der IRF8<sup>-/-</sup>-Mausaugen war im Vergleich zum WT-Mausauge höchst signifikant kleiner ( $p = 2,78 \times 10^{-34}$ ). So betrug die gesamte Limbusgröße beim IRF8<sup>-/-</sup>-Mausauge im Mittel nur 116,13 µm (SD: 7,21 µm). Auch bei diesen Augen bildete der vordere Abschnitt mit durchschnittlich 77,94 µm (SD: 7,5 µm) gegenüber dem hinteren Abschnitt mit 38,19 µm (SD: 5,1 µm) den größeren Anteil. Der hintere Abschnitt des IRF8<sup>-/-</sup>-Mausauges war im Vergleich zum WT-Mausauge am deutlichsten kleiner und war nur noch 0,607-mal so groß wie im Wildtyp.

Als ein weiterer Größenmarker der Limbusregion wurde das Zytokeratin 14 untersucht. Hierbei wurden die Fotografien der Limbusregion der immunhistochemischen Färbungen mit dem Antikörper gegen CK14 ausgewertet. Es wurde die Länge von der Iriswurzel bis zum Ende der CK14-Expression vermessen. Diese Ergebnisse wurden im Anschluss mit den Ergebnissen aus den PAS-Färbungen verglichen, um festzustellen, ob sich CK14 als Größenmarker für die Limbusregion des Mausauges eignet. Insgesamt wurden 23 IHC-Präparate mit CK14-Färbung am WT-Mausauge und 20 IHC-Präparate mit CK14-Färbung am IRF8<sup>-/-</sup>-Mausauge vermessen. Hierbei ergab sich für die CK14-positive Region bei den WT-Mausaugen eine Größe von im Mittel 158,43 µm (SD: 9,80 µm). Der Unterschied zwischen den Mittelwerten der Limbusgröße bei den PAS- und CK14-Färbungen betrug nur 5,35 µm und war nicht signifikant unterschiedlich ( $p = 0,12$ ). Ähnliche Ergebnisse zeigten auch die Vermessungen am IRF8<sup>-/-</sup>-Mausauge. Hier betrug die CK14-positive Region durchschnittlich 111,24 µm (SD: 11,88 µm). Auch hier zeigte

sich zu den Ergebnissen der PAS-Färbungen am IRF8<sup>-/-</sup>-Mausauge nur ein Unterschied von 4,89 µm, was mit einem p-Wert von 0,47 ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich war. Der Unterschied zwischen den Mittelwerten der CK-14-positiven Region am WT-Mausauge und am IRF8<sup>-/-</sup>-Mausauge war wie auch bei der PAS-Färbung höchst signifikant ( $p = 8,46 \times 10^{-18}$ ).

In der folgenden Abbildung 27 sind die gemessenen Werte anschaulich dargestellt.



**Abbildung 27:** Limbusgrößen von WT und IRF8<sup>-/-</sup>-Mausaugen im Vergleich mit Darstellung der Standardabweichung als Fehlerbalken

## 5 Diskussion

### 5.1 hTCEpi-Zellen als Modell für limbale epitheliale Stammzellen

Bereits Robertson et al. sowie Shaharuddin et al. haben aus ihren Untersuchungen an der Zelllinie geschlussfolgert, dass die hTCEpi-Zelllinie ein gutes Modell für limbale epitheliale Stammzellen darstellt (Robertson et al. 2005; Robertson et al. 2008; Shaharuddin et al. 2016). Durch die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten ICC, als auch durch die Ergebnisse der PCR, zeigt sich, dass hTCEpi-Zellen die in der Einleitung beschriebenen Stammzellmarker,  $\Delta$ Np63, Oct4, Nanog, CK14 und FGFR2, exprimieren.

Der Transkriptionsfaktor p63 und dessen Isoform  $\Delta$ Np63 $\alpha$  stellen potentielle Marker für limbale Stammzellen dar (Pellegrini et al. 2001; Di Iorio et al. 2005). Die Expression des Transkriptionsfaktors  $\Delta$ Np63 $\alpha$  konnte bereits kurz nach der Entwicklung der Zelllinie nachgewiesen werden (Robertson et al. 2008) und durch die Ergebnisse von Shaharuddin et al. bestätigt werden (Shaharuddin et al. 2014). Die Expression von p63 beziehungsweise  $\Delta$ Np63 $\alpha$  kann auch im Rahmen der hier durchgeführten Experimente durch ICC beziehungsweise PCR nachgewiesen werden. Damit werden die Ergebnisse der Arbeiten von Robertson und Shaharuddin bestätigt (Robertson et al. 2008, Shaharuddin et al. 2014). Weiterhin ist dies ein erstes Indiz dafür, dass die Zelllinie potentielle Stammzellmarker exprimiert.

Auch CK14 ist als Marker für limbale epitheliale Stammzellen bekannt (Zhao et al. 2008a). In den durchgeführten Experimenten dieser Arbeit kann ebenfalls eine Expression von CK14 in der Zelllinie gezeigt werden, wie sie auch Robertson et al. beschreiben (Robertson et al. 2005). Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die Zelllinie ein gutes Modell zur Untersuchung der Limbusstammzellen darstellt.

Auch die Expression von Oct4 und Nanog, welche als allgemeine Stammzellmarker und Pluripotenzmarker gelten, konnte in limbalen Zellen bereits nachgewiesen werden (Zhou et al. 2010; Pauklin et al. 2011). Die Expression von Oct4 und Nanog in den hTCEpi-Zellen konnte Ende 2016 mittels PCR von Shaharuddin et al. nachgewiesen werden (Shaharuddin et al. 2016). Die Ergebnisse der im Rahmen der Arbeit durchgeführten ICC und PCR bestätigen, dass Oct4 und Nanog von den hTCEpi-Zellen exprimiert werden. Erstmals konnte im Rahmen der durchgeführten Experimente die Expression von Oct4 durch ICC gezeigt werden und die Lokalisation der Expression in der einzelnen Zelle dargestellt werden. Weiterhin konnte erstmals eine Koexpression von Nanog und Oct4 dargestellt werden. Es gibt jedoch verschiedene Formen von Oct4. Der Transkriptionsfaktor Oct4A wird im Zellkern exprimiert und ist einer der Regulatoren der Pluripotenz und Selbsterneuerung von Stammzellen (Wang und Dai 2010). Außerdem bewirkt er eine verstärkte Nanog-Expression (Lee et al. 2006). Die Unterform Oct4B-

190aa wird vor allem zytoplasmatisch exprimiert und spielt eine Rolle bei der Stress-Reaktion der Zellen und erfüllt eine anti-apoptotische Funktion (Guo et al. 2012; Wang et al. 2009). Der in den Experimenten verwendete Antikörper erkennt jedoch alle Unterformen von Oct4, was bedeutet, dass die Verteilung der einzelnen Unterformen nicht genau bestimmt werden kann. Somit bleibt die eigentliche Funktion von Oct4 auf Grund der fehlenden Differenzierung der Unterformen fraglich. In den durchgeführten ICC-Färbungen an den hTCEpi-Zellen zeigte sich sowohl eine nukleäre als auch eine zytoplasmatische Expression. Daraus kann geschlossen werden, dass die beiden Formen im Limbus beziehungsweise in der Cornea exprimiert werden. Welche Funktionen die beiden dort haben, bleibt im Detail jedoch unklar und bedarf weiterer Untersuchungen. Die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene Expression von Nanog und Oct4 stellt einen weiteren Hinweis dafür dar, dass die hTCEpi-Zelllinie ein geeignetes Modell für limbale Stammzellen ist.

Zhang et al. schlussfolgerten aus ihren Untersuchungen an Mäusen, dass der FGFR2-Signalweg die limbale Stammzellproliferation fördert und in die Epithelhomöostase involviert ist. Außerdem wurde ein Mitwirken von FGFR2 in der Entwicklung des cornealen Epithels festgestellt (Zhang et al. 2015). Durch die durchgeführten ICC-Färbungen mit Antikörpern gegen den FGFR2 konnte erstmals eine Expression des FGFR2 in den hTCEpi-Zellen nachgewiesen werden, welcher ebenfalls einen potentiellen Stammzellfaktor darstellt (Zhang et al. 2015). Somit lassen sich die Untersuchungen von Zhang et al. bestätigen, da auch im Rahmen dieser Arbeit eine Expression von FGFR2 in potenziellen limbalen Stammzellen nachgewiesen werden konnte. Außerdem stellt dies einen weiteren Hinweis dafür dar, dass es sich bei der untersuchten Zelllinie um limbale epitheliale Stammzellen handelt.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die beobachtete Ausbildung von Zellclustern der hTCEpi-Zellen, in welchen alle Zellen den jeweiligen Stammzellmarker aufwiesen. Die Bildung dieser Zellansammlungen ist bislang bei der Zelllinie nicht beschrieben. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass alle Zellen im Cluster aus einer Stammzelle entstammen, die ihre Eigenschaften auf die Tochterzellen ohne Verlust weitergegeben hat. Das bedeutet, dass die im Zell-Cluster liegenden Zellen möglicherweise durch symmetrische Teilung entstanden sein könnten. Die Ausbildung von Zell-Clustern, sowie das Durchlaufen von symmetrischen Teilungen ist typisch für Stammzellen (Raem et al. 2001; Morrison und Kimble 2006). Somit spricht das Vorhandensein der Zell-Cluster für die These, dass die hTCEpi-Zelllinie limbale epitheliale Stammzellen enthält und sich in den vorliegenden Zellclustern ausschließlich Stammzellen und keine Progenitorzellen befinden.

In den durchgeführten Differenzierungsversuchen konnte gezeigt werden, dass sich die hTCEpi-Zellen unter *Airlifting*-Bedingungen zu einem bis fünfschichtigen Epithelverbund differenzieren.

Dies konnten auch Robertson et al. bei der Untersuchung der Zelllinie feststellen (Robertson et al. 2005). Diese Schichtung kann unter normalen Kulturbedingungen nicht beobachtet werden, ist jedoch typisch für das differenzierte Hornhautepithel. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die hTCEpi-Zellen die für corneale Stammzellen typische Differenzierung durchlaufen und ein epitheliales Gewebe bilden können. Ein weiteres Anzeichen für die Fähigkeit der Zellen sich in corneales Epithel zu differenzieren, ist die Abnahme der Expression der Stammzellfaktoren p63 und CK14. Die Reduktion der Expression von CK14 konnte bereits durch Robertson et al. nachgewiesen werden (Robertson et al. 2005). Die Abnahme der Expression von p63 bei fortschreitender Differenzierung konnte erstmals im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden und ist ein weiteres Indiz für die erfolgreiche Differenzierung der Zellen. Die Reduktion der Expression von p63 und CK14 zeigt also, dass die Zellen während der Differenzierung ihre Stammzeleigenschaften verlieren. Ein weiterer möglicher Hinweis darauf ist, dass Zellen, welche im Zuge des Differenzierungsversuches sieben Tage mit einer erhöhten Calcium-Konzentration ausgesetzt waren, die Stammzellfaktoren Oct4, Nanog und FGFR2 nicht mehr exprimieren. Das bedeutet möglicherweise, dass schon eine alleinige Erhöhung der Calcium-Konzentration in den hTCEpi-Zellen die Differenzierung anstößt. Um dies jedoch validieren zu können, bedarf es weiterer Untersuchungen zum Einfluss einer erhöhten Calciumkonzentration auf die Zelllinie. Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass die hTCEpi-Zelllinie auch für die Untersuchung des für Stammzellen typischen Differenzierungsprozesses geeignet ist. Dafür spricht, dass der Anteil an Zellen, die potentielle Stammzellfaktoren (p63, CK14, IRF8) exprimieren, abnimmt und das für den Menschen typische fünf- bis sechsschichtige Epithel der Cornea gebildet wird. Dies bedeutet, dass weitere Erkenntnisse zum Ablauf und zur Beeinflussung der Differenzierung limbalen epithelialer Stammzellen durch Untersuchungen an dieser Zelllinie möglich sind.

Ein Problem, welches jedoch bestehen bleibt, ist die Unterscheidung von limbalen epithelialen Stammzellen zu den frühen TAC. Die eingangs beschriebene Problematik, dass die meisten Stammzellmarker nicht ausschließlich von den Stammzellen, sondern auch von den TAC exprimiert werden (Schlötzer-Schrehardt und Kruse 2005), zeigt sich auch den durchgeführten Experimenten. Von den hTCEpi-Zellen exprimiert nur ein relativ kleiner Anteil von etwa 1-3% die Stammzellfaktoren Oct4, Nanog, und FGFR2. Dies entspricht dem durchschnittlichen Anteil von 1-4 % adulter Stammzellen in epitheliale Gewebe (Dua und Azuara-Blanco 2000). Das bedeutet, dass neben den limbalen epithelialen Stammzellen auch noch andere Zellen in der Zelllinie enthalten sind. Dies können beispielsweise die TAC oder bereits weiter differenzierte Zellen sein. Das Ergebnis, dass vereinzelte Zellen keine p63-Expression aufweisen, lässt die Schlussfolgerung zu, dass auch einzelne, stärker differenzierte Zellen darunter sein können. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass limbale epitheliale Stammzellen in der Zelllinie zwar enthalten sind, aber neben ihnen auch weiter differenzierte Zellen zu finden sind. Bei diesen Zellen handelt

es sich vermutlich um TAC, da nur vereinzelte Zellen kein p63 exprimieren, was für eine Ausdifferenzierung sprechen würde. Um diese These zu bestätigen, sind jedoch zusätzliche Experimente, wie beispielsweise eine Selektierung dieser Zellen mit folgender Klonierung notwendig. Anschließend könnten die Eigenschaften dieser Zellen zum Beispiel durch PCR oder ICC weiter untersucht werden.

Zusammengefasst kann so geschlussfolgert werden, dass die hTCEpi-Zelllinie als Modell für die Zellen der Limbusregion geeignet ist, da sowohl die Stammzellen als auch die TAC und vereinzelt auch terminal differenzierte Zellen vorhanden sind. Alleinige Rückschlüsse auf die Stammzellen erscheinen aufgrund der Zusammensetzung aus verschiedenen Zellen jedoch schwer möglich. Allerdings können wie der von Shararuddin et al. durchgeführte *side population assay* zu einer Anreicherung der Stammzellen führen (Shaharuddin et al. 2014). Dies könnte die hTCEpi-Zelllinie auch für die zukünftige Erforschung der Eigenschaften und Beeinflussbarkeiten der limbalen epithelialen Stammzellen zu einem geeigneten Modell machen.

Weiterhin bedeuten die Ergebnisse, dass die Zelllinie als gutes Modell für die Untersuchung der Differenzierungsmöglichkeiten der limbalen Stammzellen darstellt. Dies konnte durch die erfolgreiche Differenzierung der hTCEpi-Zellen zu hornhautähnlichem Epithel gezeigt werden. Zukünftig könnten aus Differenzierungsversuchen Hinweise auf optimale Kulturbedingungen für die Kultivierung limbaler Stammzellen gewonnen werden, um entweder eine Differenzierung zu verhindern oder zu fördern. Dies könnte dann zum Beispiel im Rahmen der CLET, SLET oder PALT zu verbesserten Kulturbedingungen *in vitro* und *in vivo* führen und so die Anzahl an gewonnenen Stammzellen erhöhen. Obwohl die hTCEpi-Zellen in den untersuchten Eigenschaften und Expressionsmustern den menschlichen limbalen Stammzellen ähneln, bleibt jedoch kritisch zu beurteilen, inwiefern die verwendete Zelllinie den unbehandelten Stammzellen in Wachstums- und Differenzierungseigenschaften tatsächlich entspricht. Hierfür wären weiterführende vergleichende Untersuchungen notwendig. Allerdings eignet sie sich als Modell für diese Prozesse und es können erste Hinweise auf die Beeinflussbarkeiten der limbalen epithelialen Stammzellen getroffen werden.

## **5.2 Rolle von IRF8 in limbalen epithelialen Stammzellen**

Im Rahmen dieser Arbeit ist es erstmals gelungen, den Transkriptionsfaktor IRF8 in der hTCEpi-Zelllinie mittels ICC sowie in murinen limbalen Zellen durch IHC nachzuweisen. Auf Grund des erstmaligen Nachweises in limbalen beziehungsweise cornealen Zellen, müssen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse mit den Wirkungen von IRF8 in anderen Organsystemen, allen voran dem hämatopoetischen System, verglichen werden. Es ist jedoch unklar, ob dieselben Signalwege, die beispielsweise in einer hämatopoetischen Zelle ablaufen, auch in den limbalen Zellen ablaufen. Dafür sind noch weitere Experimente notwendig.

### **5.2.1 IRF8 wird in den hTCEpi-Zellen und im Mausauge exprimiert**

Im Jahr 2015 wurden erstmals IRF8-positive Zellen in den Photorezeptoren, der Ganglienzellschicht und der inneren Körnerzellschicht der Retina nachgewiesen (Kim et al. 2015). Im Rahmen dieser Arbeit konnte der Transkriptionsfaktor IRF8 mittels IHC und ICC erstmals in der hTCEpi-Zelllinie sowie in limbalen und basalen cornealen Zellen des murinen Auges nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle für den Antikörper diente hierbei die Retina des Mausauges, in welcher die Expression von IRF8 in den Photorezeptoren und den mikroglialen Zellen der Ganglienzellschicht der Retina bereits beschrieben wurde (Kim et al. 2015). Durch die durchgeführte IHC an mehreren Mausaugen konnte eine Expression von IRF8 in ebendiesen Zellen nachgewiesen werden.

Es ist nicht möglich gewesen, die RNA von IRF8 in einer Gelelektrophorese nach durchgeführter PCR in den hTCEpi-Zellen nachzuweisen. Das liegt möglicherweise daran, dass der in der PCR verwendete Primer nur eine Splice-Variante von IRF8 erkennt und diese nicht in den untersuchten Zellen vorkam. Dass es verschiedene Splice-Varianten von IRF8 gibt, konnte bereits gezeigt werden (Pogosova-Agadjanyan et al. 2013). Der in der PCR verwendete Primer deckt jedoch nicht alle Varianten ab.

Eine Theorie den Ursprung der IRF8-exprimierenden Zellen betreffend, ist, dass diese aus Zellen des Knochenmarks abstammen, da die Progenitorzellen der Monozyten, Granulozyten und dendritischen Zellen diesen exprimieren (Kurotaki et al. 2014; Wang et al. 2014). Bei Mäusen, die eine Transplantation von markierten hämatopoetischen Stammzellen bekommen haben, konnten von Nakamura et al. diese markierten Zellen aus dem Knochenmark in dem Stroma und Epithel der Cornea nachgewiesen werden. Dies spricht für eine Migration der hämatopoetischen Stammzellen in diese Bereiche. Nakamura et al. vermuteten weiterhin, dass sich diese Zellen aufgrund ihrer hohen Differenzierungskapazität zu cornealen Keratinozyten transdifferenzieren können (Nakamura et al. 2005). Es ist möglich, dass die IRF8-exprimierenden Zellen, welche im Zuge der durchgeführten Experimente nachgewiesen werden konnten, diese aus dem Knochenmark stammenden Zellen kennzeichnen. Jedoch ist fraglich, ob dieses Phänomen nur bei Zustand nach Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen auftritt oder auch ohne Transplantation der Fall ist. Möglicherweise stützen die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch die These, dass es eine Migration von hämatopoetischen Stammzellen/Progenitorzellen in die Cornea stattfindet, da diese als IRF8-positiv bekannt sind.

### **5.2.2 IRF8 als potentieller Stammzellmarker**

Im Rahmen der durchgeführten ICC-Färbungen konnte an der Zelllinie eine Koexpression von IRF8 mit den Stammzellfaktoren Oct4, Nanog und FGFR2 gezeigt werden. Die Ergebnisse aus den immunhistochemischen Färbungen am Mausauge unterstützen die These der Koexpression

von IRF8 mit Oct4, Nanog und FGFR2 (Kesper et al. 2022). So zeigen die Zellen des Mausauges, welche IRF8 exprimieren, auch eine Expression von Oct4, Nanog, CK14 und FGFR2. Dies sind vor allem limbale und basale corneale Zellen. Das bedeutet, dass IRF8 möglicherweise ebenfalls einen Stammzellmarker darstellt. Das Vorkommen von IRF8 in Stammzellen und verschiedenen Progenitorzellen konnte wie eingangs erwähnt im hämatologischen System bereits beschrieben werden. Die Tatsache, dass IRF8 im hämatopoetischen System auch von Progenitorzellen exprimiert wird, deutet darauf hin, dass diese Möglichkeit auch in den limbalen Zellen besteht und IRF8 auch von den Progenitorzellen der Cornea, also den TAC, exprimiert wird. Bestätigt wird diese These durch immunhistochemische Anfärbung von IRF8 im Mausauge. Die Expression von IRF8 ist am im Limbus des Mausauges in den basalen Zellen deutlich stärker als in den basalen Zellen der zentralen Cornea. Allerdings besitzen auch die basalen Zellen in der Cornea eine, wenn auch schwächere, Expression, die superfiziellen Zellen der Cornea und des Limbus sind hingegen negativ für IRF8. Da die Expression von IRF8 nicht auf den Limbus beschränkt ist und die basalen Zellen der Cornea nicht mehr den Stammzellen entsprechen, diese aber auch noch nicht vollends differenziert sind, spricht dies für eine Expression von IRF8 in den TAC. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass IRF8 kein reiner Stammzellmarker ist, sondern auch von frühen TACs der Cornea exprimiert wird. Eine weitere Bestätigung dieser These stellen die Ergebnisse der Differenzierungsversuche dar.

In den durchgeführten Differenzierungsversuchen zeigte sich eine Synergie der Stammzellmarker p63 und IRF8. Der Anteil exprimierender Zellen sank mit fortschreitender Differenzierung kontinuierlich ab. Dies steht im Einklang mit den Untersuchungen am Mausauge, welche zeigen, dass die Marker allenfalls in basalen Zellen der Cornea sowie im Limbus aufzufinden sind. Es werden also p63 und IRF8 von den Zellen an den Orten exprimiert, an denen gemäß der XYZ-Hypothese die Stammzellen beziehungsweise TAC liegen (Thoft und Friend 1983; Yoon et al. 2014). Da nach vierzehntägigem *Airlifting* keine IRF8-Expression in den differenzierten Zellen mehr nachzuweisen ist, jedoch noch p63-positive Zellen vorkommen, lässt sich daraus schlussfolgern, dass IRF8 ein „exklusiverer“ Marker für Stammzellen ist als p63. Dies bestätigen auch die IHC-Färbungen am Mausauge. Dort exprimieren auch die superfiziellen Zellen noch p63, wohingegen IRF8 nur in den basalen, allenfalls noch den suprabasalen, Zellen vorkommt. Da jedoch bereits vor dem *Airlifting* keine Expression von Nanog und Oct4 mehr nachweisbar ist, kann daraus geschlossen werden, dass IRF8 in seiner Selektivität für Stammzellen zwischen den Pluripotenzmarkern Nanog beziehungsweise Oct4 und p63 liegt.

### **5.2.3 Zusammenhang von IRF8 und Proliferation**

Durch immunzytochemische Doppelfärbungen an der hTCEpi-Zelllinie konnte gezeigt werden, dass die Zellen IRF8 und Ki-67 koexprimieren. Die Koexpression mit dem Proliferationsmarker Ki-67 zeigt, dass IRF8 vor allem in proliferierenden Zellen exprimiert wird. Dies konnte im

Rahmen dieser Arbeit erstmals dargestellt werden. Der Zusammenhang von IRF8 und Proliferation konnte im Rahmen einer Studie an einer Zelllinie aus Zellen eines menschlichen großzelligen B-Zell-Lymphoms nachgewiesen werden. Dort zeigte sich bei einem Knockdown der IRF8-Expression, dass die Proliferationskapazität der Zellen reduziert war. (Xu et al. 2015). Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass IRF8 sich möglicherweise fördernd auf die Proliferation der limbalen Zellen auswirkt, was sich zudem in der Koexpression mit Ki-67 widerspiegelt.

Zu einem ähnlichen Schluss führen auch die Ergebnisse des *Scratch-Assays*. Dort zeigt sich, dass Zellen, die über drei Tage mit IFN- $\gamma$  behandelt worden waren und infolgedessen eine erhöhte Expression von IRF8 aufweisen, den Defekt im Zellverbund hochsignifikant schneller verschlossen. Dies bedeutet, dass Zellen, welche eine erhöhte IRF8-Expression aufweisen, möglicherweise eine erhöhte Proliferationskapazität haben, da zur Wundheilung nicht nur die Migration, sondern auch die Proliferation eine Rolle spielt.

Es muss jedoch kritisch betrachtet werden, dass die Ergebnisse des *Scratch-Assays* im Zusammenhang mit der IFN- $\gamma$ -Behandlung stehen können. Um diesen Einfluss möglichst gering zu halten, wurde das Kulturmedium der Zellen im Vorfeld des Versuchs mit IFN- $\gamma$  versetzt, welches, nachdem der Kratzer gesetzt worden war, nicht mehr hinzugegeben wurde. Trotzdem kann ein Effekt, welcher nicht durch die erhöhte IRF8 -Expression bedingt ist, nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz hierzu stehen die Ergebnisse des Wachstums der Zellen unter IFN- $\gamma$ -Behandlung, da dort ein langsamerer Anstieg der Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrollprobe stattfindet. Die reguläre PVZ der hTCEpi-Zelllinie beträgt 19,82 Stunden. Nach Behandlung der Zellen mit 1 ng IFN- $\gamma$  steigt die PVZ auf 96 Stunden. Dies kann jedoch auf die Wirkung von IFN- $\gamma$  zurückgeführt werden. In neuralen Stammzellen konnte gezeigt werden, dass IFN- $\gamma$  vermutlich über STAT1 antiproliferativ wirkt (Pereira et al. 2015). Dies kann die verringerte Zellzahl unter Behandlung mit IFN- $\gamma$  erklären und liefert außerdem einen Hinweis darauf, dass die Ergebnisse des *Scratch-Assays* nicht durch den Einfluss von IFN- $\gamma$  entstanden sind, welches auf Grund seiner antiproliferativen Wirkung eher zu einem langsameren Defektverschluss führen müsste. Jedoch konnte in mesenchymalen Stammzellen gezeigt werden, dass IFN- $\gamma$  die Migration dieser Zellen fördert (Strojny et al. 2015). Es ist also möglich, dass IFN- $\gamma$  auch in den limbalen epithelialen Stammzellen eine erhöhte Migration bewirkt, welche einen beschleunigten Defektverschluss zur Folge haben kann. Dies würde bedeuten, dass der Effekt der beschleunigten Wundheilung auch losgelöst von einer Proliferationserhöhung zu Stande kommen könnte.

Um den Einfluss von IFN- $\gamma$  ausschließen zu können, wären Experimente geeignet, in welchen man beispielsweise mittels siRNA die Expression von IRF8 in den hTCEpi-Zellen ausschaltet. Anschließend könnten vergleichende Experimente mit und ohne IFN- $\gamma$  bezüglich der

Wundheilung mit der ursprünglichen Zelllinie durchgeführt werden. Ein anderes mögliches Experiment wäre der Vergleich der cornealen Wundheilung beispielsweise einer Erosio bei IRF8-Knockout-Mäusen und der WT-Mäusen. Außerdem wären Experimente denkbar, in welchen im Bereich der Wunde beispielsweise durch ICC-Färbungen die IRF8-Expression im zeitlichen Verlauf untersucht wird. So könnte überprüft werden, ob die Zellen, die für den Wundverschluss sorgen, IRF8 exprimieren.

#### **5.2.4 Einfluss von IRF8 auf die Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften und Differenzierung**

Im hämatopoetischen System ist IRF8 an der Festlegung des Schicksals von Immunzellen und der Differenzierung beteiligt (Scharton-Kersten et al. 1997). Übertragen auf die Ergebnisse der Untersuchungen dieser Arbeit, kann das bedeuten, dass IRF8 möglicherweise auch bei den limbalen epithelialen Stammzellen an der Festlegung des Schicksals und der Differenzierung von Bedeutung sein kann. Durch seine Funktion als Transkriptionsfaktor kann es zum Beispiel die Regulation von Genen, welche für die Differenzierung von Bedeutung sind, beeinflussen und so den Stammzellcharakter aufrechterhalten.

Bei den Untersuchungen zur Vermessung der Limbusregion zeigte sich, dass die Limbusregion bei den IRF8<sup>-/-</sup>-Mausaugen hochsignifikant kleiner war, als die Limbusregion der WT-Mausaugen (p-Wert =  $2,78 \times 10^{-34}$ ). Das bedeutet, dass die Abwesenheit von IRF8 einen negativen Effekt auf die Größe der Limbusregion, in welcher die Stammzellen liegen, hat. Daraus lässt sich ableiten, dass bei kleinerer Limbusgröße auch weniger limbale Stammzellen zur Verfügung stehen. In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei einem Knockout von IRF8 die Nanog-Expression reduziert ist (Kesper et al 2022). Das kann sich negativ auf die Proliferation und Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften der limbalen Stammzellen auswirken, da niedrige Nanog-Spiegel mit einer erhöhten Tendenz zur Differenzierung einhergehen (Kalmar et al. 2009; Luo et al. 2013). Es wären weiterführende Untersuchungen zur Wundheilung an IRF8<sup>-/-</sup>-Mausaugen interessant, da eine geringere Anzahl an Stammzellen mit einer verlangsamten Wundheilung einhergehen könnte. Des Weiteren wäre es interessant zu untersuchen, ob CML-Patienten Probleme mit der cornealen Regeneration haben oder sogar eine LSZI aufweisen. Dies erscheint möglich, da einige Patienten erniedrigte IRF8-Spiegel aufweisen (Schmidt et al. 1998). Bislang gibt es jedoch noch keinerlei Untersuchungen zu cornealen Veränderungen bei CML-Patienten.

Eine andere mögliche Ursache für die kleinere Limbusgröße bei den IRF8<sup>-/-</sup>-Mausaugen könnte aber auch ein nicht vollständig entwickeltes und somit insgesamt kleineres Auge sein. Rein makroskopisch ließ sich jedoch kein Unterschied zwischen den Wildtyp- und den IRF8<sup>-/-</sup>-Mausaugen feststellen. Genauere Untersuchungen, welche die Morphologie des gesamten Bulbus betreffen, wurden allerdings nicht durchgeführt.

Darüber hinaus ist es möglich, dass IRF8 einen Einfluss auf weitere verschiedene Signalwege hat, welche die Aufrechterhaltung von Stammzeleigenschaften im Limbus bewirken, und einer Differenzierung entgegenwirkt. Ein Beispiel hierfür ist der TGF- $\beta$ -Signalweg. In einer Leukämie-Zelllinie konnte gezeigt werden, dass IRF8 einen Einfluss auf den TGF- $\beta$  Signalweg hat, welcher auch für limbale Stammzellen wichtig ist (Nishida et al. 1995; Joyce und Zieske 1997). Eine verstärkte Expression von IRF8 bewirkt eine Hochregulation von Mitgliedern des TGF- $\beta$  Signalwegs. Das resultiert in einer verstärkten Zellproliferation und einer erhöhter Zellmigration (Sung et al. 2011; Sung et al. 2014). Dies ist eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse des *Scratch-Assays*. Diese zeigten, dass Zellen, welche eine erhöhte IRF8-Expression aufwiesen, schneller proliferieren und migrierten und so den Defekt schneller verschlossen als Zellen, welche keine erhöhte IRF8-Expression aufwiesen. Im Umkehrschluss kann ein Fehlen von IRF8 in einer verminderten Expression von Mitgliedern des TGF- $\beta$  Signalwegs resultieren und somit zu einer verminderten Proliferation und Migration der Stammzellen führen kann. Das wiederum kann sich negativ auf die Proliferation und Migration der limbalen epithelialen Stammzellen auswirken. Da der TGF- $\beta$  Signalweg auch in die Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften involviert ist (Watabe und Miyazono 2009), kann es auch darüber zu einem Verlust an Stammzellen in der Limbusregion führen. Sowohl die verminderte Proliferation und Migration als auch das verminderte Potential zur Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften können in einer kleineren Limbusregion im IRF8<sup>-/-</sup>-Mausauge resultieren.

### **5.2.5 Anstieg der IRF8-Expression in den hTCEpi-Zellen durch IFN- $\gamma$ -Zugabe**

Durch die Ergebnisse der Behandlungsversuche mit IFN- $\gamma$  konnte gezeigt werden, dass sich die hTCEpi-Zellen durch Zugabe von IFN- $\gamma$  in das Kulturmedium zu einer erhöhten Expression von IRF8 anregen lassen. Die Expressionserhöhung durch IFN- $\gamma$  konnte bislang in limbalen Zellen noch nicht nachgewiesen werden, war aber bereits beispielsweise in Makrophagen so gezeigt worden (Tamura et al. 2008). So zeigt sich nach einer dreitägigen Behandlung der hTCEpi-Zellen mit 1 ng/ml IFN- $\gamma$  eine sehr signifikante Erhöhung des Anteils an IRF8-positiven Zellen von 1,45 % auf 6,81 % (p-Wert = 0,001). Die für die Zellen bestmögliche Konzentration von IFN- $\gamma$  im Medium wurde mit 1 ng/ml bestimmt, dabei dieser Konzentration die Zellen trotz mehrtägiger Behandlung vital blieben und weiterwuchsen. Dies ist sowohl bei Behandlung mit 5 ng/ml als auch mit 10 ng/ml IFN- $\gamma$  nicht der Fall. Bei diesen Versuchen zeigte die Behandlung mit IFN- $\gamma$  ein zunehmend eingeschränktes Wachstum sowie eine zunehmende Anzahl an sterbenden Zellen. Vermutlich war die Konzentration für die hTCEpi-Zellen zu hoch und wirkte toxisch beziehungsweise antiproliferativ auf die Zellen. Insgesamt lässt sich hieraus schlussfolgern, dass die IRF8-Expression durch IFN- $\gamma$ -Zugabe gesteigert werden kann. Hierüber können weitere Experimente bezüglich des Einflusses von IRF8 auf die limbalen epithelialen Stammzellen generiert werden.

### **5.3 Limitationen**

Bei den Experimenten, welche die Mäuseaugen betreffen, muss kritisch beachtet werden, dass die Mäuseaugen selbst nicht vermessen wurden und so auch eine unterschiedliche Limbusgröße bei den IRF8<sup>-/-</sup>-Mäuseaugen auf Grund von Größenunterschieden des gesamten Auges möglich sein kann. Ein weiterer Kritikpunkt hierbei ist, dass auch die Positionierung der Augen im Paraffinblock zwar mittels einer Lupe so präzise wie möglich erfolgte, aber auch hier Abweichungen entstanden sein könnten, welche potentiell in einer unterschiedlichen Limbusgröße resultieren.

Methodisch bleiben außerdem die Aussagen zu der Fluoreszenz ein limitierender Faktor. Hier konnten gerätebedingt nur subjektiv Aussagen zu der Stärke der Fluoreszenz gemacht werden. Die Stärke der Fluoreszenz wurde also nicht objektiv gemessen, es erfolgte nur eine subjektive Beobachtung und Beurteilung.

Die bereits in Abschnitt 5.2.3 diskutierte Effektbeeinflussung der Wundheilungsversuche durch IFN- $\gamma$  stellt einen weiteren Kritikpunkt dar.

Die schwierige Beurteilung der Ergebnisse bezüglich der Funktion von IRF8 auf Grund der erstmaligen Beschreibung des Vorkommens in cornealen Epithelzellen wurde in Abschnitt 5.2 erläutert.

## 6. Zusammenfassung

Die Hornhaut des Auges ist durch seine Transparenz für die Sehschärfe des Menschen von entscheidender Bedeutung. Sie ist in fünf Schichten aufgebaut. Die äußerste Schicht der Hornhaut, das Epithel, unterliegt einer ständigen Selbsterneuerung. Diese folgt der XYZ-Theorie und geht von einer Population adulter Stammzellen im Limbus des Auges aus. Der Limbus des Auges ist Ort der Stammzellnische und befindet sich am Übergang der Hornhaut in die Conjunctiva bzw. die Sklera. Um die Stammzellen dieser Region zu identifizieren sind Stammzellmarker notwendig. Bislang konnten als potentielle Marker unter anderem p63, beziehungsweise dessen Isoform  $\Delta Np63\alpha$ , oct4, Nanog, N-Cadherin und FGFR2 nachgewiesen werden. Von den bislang untersuchten Markern wird keiner exklusiv von den Stammzellen exprimiert, sondern auch von Progenitorzellen. Die beste Möglichkeit limbale epitheliale Stammzellen zu identifizieren ist momentan die Kombination verschiedener Stammzellmarker. Für weiterführende Untersuchungen und zum Verständnis der Funktionsweise der Stammzellen ist beispielsweise eine Zelllinie als Modell der limbalen epithelialen Stammzellen im menschlichen Auge notwendig.

Der Transkriptionsfaktor IRF8, welcher vor allem in hämatopoetischen Zellen vorkommt, wurde bereits im Auge nachgewiesen. Die Verteilung und die Funktion von IRF8 in der Hornhaut und im Limbus sind bislang jedoch unbekannt.

Ziel der Arbeit war es, IRF8 in limbalen epithelialen Stammzellen als potentiellen Stammzellmarker nachzuweisen und die Funktion zu detektieren. Weiterhin sollte die hTCEpi-Zelllinie als Modell für limbale epitheliale Stammzellen charakterisiert werden.

Hierzu wurden histologische und immunhistologische Färbungen an der hTCEpi-Zelllinie und an Mausaugen durchgeführt. Weiterhin wurden verschiedene Untersuchungen zur Charakterisierung der Zelllinie durchgeführt. Hierzu zählten Differenzierungsversuche, *Scratch-assays*, Stimulationsversuche und Untersuchungen zur Populationsverdopplungszeit.

Die Untersuchungen ergaben, dass die hTCEpi-Zelllinie ein gutes Modell für die Region des Limbus darstellt, jedoch keine reine Stammzelllinie ist, da nicht alle der Zellen die typischen Stammzellmarker exprimieren.

Sowohl im Mausauge, als auch in den hTCEpi-Zellen kann eine IRF8-Expression nachgewiesen werden. Das Expressionsmuster deutet darauf hin, dass es sich hierbei um einen weiteren Stammzellmarker handelt, jedoch auch wahrscheinlich ist, dass auch frühe Progenitorzellen diesen Faktor exprimieren. Durch Behandlung mit  $IFN\gamma$  lässt sich die Expression von IRF8 steigern. Weiterhin zeigten die Untersuchungen, dass IRF8 möglicherweise eine Rolle bei der Proliferation, der Differenzierung und der Wundheilung der hTCEpi-Zellen spielt.

Da diese Arbeit erstmalig die Expression von IRF8 in limbalen epihelialis Stammzellen nachweist, sind noch weiterführende Experimente notwendig, um die Ergebnisse zu bestätigen. Weiterhin musste deshalb bei der Interpretation der Ergebnisse auf die Funktionsweise von IRF8 in anderen Systemen, vor allem dem hämatopoietischen System zurückgegriffen werden. Auch hier stellt sich die Frage, inwiefern diese Wirkungen übertragbar sind.

## Literaturverzeichnis

Ahmad S (2012): Concise review: limbal stem cell deficiency, dysfunction, and distress. In: *Stem cells translational medicine* 1 (2), S. 110–115. DOI: 10.5966/sctm.2011-0037.

Ahmad S, Osei-Bempong C, Dana R, Jurkunas U. (2010): The culture and transplantation of human limbal stem cells. In: *Journal of cellular physiology* 225 (1), S. 15–19. DOI: 10.1002/jcp.22251.

Alison MR, Islam S (2009): Attributes of adult stem cells. In: *The Journal of pathology* 217 (2), S. 144–160. DOI: 10.1002/path.2498.

Alison MR, Poulsom R, Forbes S, Wright NA (2002): An introduction to stem cells. In: *The Journal of pathology* 197 (4), S. 419–423. DOI: 10.1002/path.1187.

Bakker A-C, Langer B (2015): Zelltherapeutika - eine innovative Therapieoption in der Ophthalmologie. Stammzellen zur Behandlung von Hornhauterkrankungen. In: *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 58 (11-12), S. 1259–1264. DOI: 10.1007/s00103-015-2243-1.

Carrington LM, Boulton M (2005): Hepatocyte growth factor and keratinocyte growth factor regulation of epithelial and stromal corneal wound healing. In: *Journal of cataract and refractive surgery* 31 (2), S. 412–423. DOI: 10.1016/j.jcrs.2004.04.072.

Contursi C, Wang IM, Gabriele L, Gadina M, O'Shea J, Morse HC, Ozato K (2000): IFN consensus sequence binding protein potentiates STAT1-dependent activation of IFN $\gamma$ -responsive promoters in macrophages. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (1), S. 91–96.

de Jongh RU, Lovicu FJ, Chamberlain CG, McAvoy JW (1997): Differential expression of fibroblast growth factor receptors during rat lens morphogenesis and growth. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 38 (9), S. 1688–1699.

Di Iorio E, Barbaro V, Ruzza A, Ponzin D, Pellegrini G, de Luca M (2005): Isoforms of DeltaNp63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (27), S. 9523–9528. DOI: 10.1073/pnas.0503437102.

Dickinson ME, McMahon AP (1992): The role of Wnt genes in vertebrate development. In: *Current opinion in genetics & development* 2 (4), S. 562–566.

Driggers PH, Ennist DL, Gleason SL, Mak WH, Marks MS, Levi BZ (1990): An interferon gamma-regulated protein that binds the interferon-inducible enhancer element of major histocompatibility complex class I genes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (10), S. 3743–3747.

Dua HS, Joseph A, Shanmuganathan VA, Jones RE (2003): Stem cell differentiation and the effects of deficiency. In: *Eye (London, England)* 17 (8), S. 877–885. DOI: 10.1038/sj.eye.6700573.

Dua HS, Azuara-Blanco A (2000): Limbal Stem Cells of the Corneal Epithelium. In: *Survey of Ophthalmology* 44 (5), S. 415–425. DOI: 10.1016/S0039-6257(00)00109-0.

European Medicines Agency (2015): Holoclar. URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/holoclar-epar-summary-public\\_de.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/holoclar-epar-summary-public_de.pdf) (Stand 15.02.2022)

- Fuchs E, Green H (1980): Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. In: *Cell* 19 (4), S. 1033–1042. DOI: 10.1016/0092-8674(80)90094-X.
- Grehn F (2012): Augenheilkunde. 32., überarb. Aufl. Berlin: Springer (Springer-Lehrbuch) S.143-144
- Grueterich M (2012): Klinik der Limbusstammzellinsuffizienz. In: *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 109 (9), S. 850–856. DOI: 10.1007/s00347-011-2508-5.
- Guo CL, Liu L, Jia YD, Zhao XY, Zhou Q, Wang L (2012): A novel variant of Oct3/4 gene in mouse embryonic stem cells. In: *Stem Cell Research* 9(2):69-76. doi:10.1016/j.scr.2012.04.004.
- Haagdorens M, van Acker SI, van Gerwen V, Ni Dhuhghaill S, Koppen C, Tassignon, M-J, Zakaria N (2016): Limbal Stem Cell Deficiency: Current Treatment Options and Emerging Therapies. In: *Stem cells international* 2016, S. 9798374. DOI: 10.1155/2016/9798374.
- Hayashi R, Yamato M, Sugiyama H, Sumide T, Yang J, Okano T (2007): N-Cadherin is expressed by putative stem/progenitor cells and melanocytes in the human limbal epithelial stem cell niche. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25 (2), S. 289–296. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0167.
- Higa K, Shimmura S, Miyashita H, Kato N, Ogawa Y, Kawakita T (2009): N-cadherin in the maintenance of human corneal limbal epithelial progenitor cells in vitro. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 50 (10), S. 4640–4645. DOI: 10.1167/iovs.09-3503.
- Higa K, Shimmura S, Miyashita H, Shimazaki J, Tsubota K (2005): Melanocytes in the corneal limbus interact with K19-positive basal epithelial cells. In: *Experimental eye research* 81 (2), S. 218–223. DOI: 10.1016/j.exer.2005.01.023.
- Holtshcke T, Lohler J, Kanno Y, Fehr T, Giese N, Rosenbauer F (1996): Immunodeficiency and chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with a targeted mutation of the ICSBP gene. In: *Cell* 87 (2), S. 307–317.
- Huang AJ, Tseng SC, Kenyon KR (1990): Alteration of epithelial paracellular permeability during corneal epithelial wound healing. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 31 (3), S. 429–435.
- Jiang D-S, Wie X, Zhang X-F, Liu Y, Zhang Y, Chen K (2014): IRF8 suppresses pathological cardiac remodelling by inhibiting calcineurin signalling. In: *Nature communications* 5, S. 3303. DOI: 10.1038/ncomms4303.
- Joyce N, Zieske JD (1997): Transforming growth factor-beta receptor expression in human cornea. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 38 (10), S. 1922–1928.
- Kaliki S, Mohammad FA, Tahiliani P, Sangwan VS (2017): Concomitant Simple Limbal Epithelial Transplantation After Surgical Excision of Ocular Surface Squamous Neoplasia. In: *American journal of ophthalmology* 174, S. 68–75. DOI: 10.1016/j.ajo.2016.10.021.
- Kalmar T, Lim C, Hayward P, Muñoz-Descalzo S, Nichols J, Garcia-Ojalvo J, Martinez Arias A (2009): Regulated fluctuations in nanog expression mediate cell fate decisions in embryonic stem cells. In: *PLoS biology* 7 (7), e1000149. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000149.
- Kasper M, Moll R, Stosiek P, Karsten U (1988): Patterns of cytokeratin and vimentin expression in the human eye. In: *Histochemistry* 89 (4), S. 369–377. DOI: 10.1007/BF00500639.

- Kawakita T, Espana EM, He H, Li W, Liu C-Y, Tseng SCG (2005): Intrastromal Invasion by Limbal Epithelial Cells Is Mediated by Epithelial-Mesenchymal Transition Activated by Air Exposure. In: *The American Journal of Pathology* 167 (2), S. 381–393. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)62983-5.
- Kim S-H, Burton J, Yu C-R, Sun L, He C, Wang H (2015): Dual Function of the IRF8 Transcription Factor in Autoimmune Uveitis: Loss of IRF8 in T Cells Exacerbates Uveitis, Whereas Irf8 Deletion in the Retina Confers Protection. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 195 (4), S. 1480–1488. DOI: 10.4049/jimmunol.1500653.
- Kesper C, Viestenz A, Hammer T, Heinzelmann J, Foja S, Viestenz A (2021): PALT (Partial Allogeneic Limbal Transplantation): A New Surgical Technique For Limbal Stem Cell Deficiency, 10 November 2021, PREPRINT (Version 1) verfügbar bei Research Square doi:10.21203/rs.3.rs-1034919/v1
- Kesper C, Wiese-Rischke C, Scheller M, Viestenz A, Hammer T (2022): Impact of the transcription factor IRF8 on limbal epithelial progenitor cells in a mouse model. In *Experimental Eye Research* 25;218:108985. DOI: 10.1016/j.exer.2022.108985
- Kohnen T (2011): *Refraktive Chirurgie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. S. 14-17
- Krause A, Tost M, Schlaffer G (1995): Hornhautprotektion nach Putschkowskaja. In: *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 206 (3) S. 161-4. DOI: 10.1055/s-2008-1035422.
- Kurotaki D, Yamamoto M, Nishiyama A, Uno K, Ban T, Ichino M (2014): IRF8 inhibits C/EBP $\alpha$  activity to restrain mononuclear phagocyte progenitors from differentiating into neutrophils. In: *Nature communications* 5, S. 4978. DOI: 10.1038/ncomms5978.
- Kurpakus MA, Stock EL, Jones JC (1990): Expression of the 55-kD/64-kD corneal keratins in ocular surface epithelium. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 31 (3), S. 448–456.
- Lang GK, Lang GE (2015): *Augenheilkunde essentials*. Stuttgart u.a.: Thieme (essentials - Intensivkurs zur Weiterbildung). S. 169
- Lee J, Kim HK, Rho JY, Han YM, Kim J (2006): The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. In: *Journal of Biological Chemistry* 3;281(44):33554-65. doi: 10.1074/jbc.M603937200.
- Li DQ, Tseng SCG (1996): Differential regulation of cytokine and receptor transcript expression in human corneal and limbal fibroblasts by epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha, platelet-derived growth factor B, and interleukin-1 beta. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 37 (10), S. 2068–2080.
- Li W, Nagineni CN, Ge H, Efiok B, Chepelinsky AB, Egwuagu CE (1999): Interferon Consensus Sequence-binding Protein Is Constitutively Expressed and Differentially Regulated in the Ocular Lens. In: *J. Biol. Chem.* 274 (14), S. 9686–9691. DOI: 10.1074/jbc.274.14.9686.
- Lüllmann-Rauch R, Asan E (2015): *Taschenbuch Histologie*. 6., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag. S. 696-702
- Luo Y, Lim CL, Nichols J, Martinez-Arias A, Wernisch L (2013): Cell signalling regulates dynamics of Nanog distribution in embryonic stem cell populations. In: *Journal of the Royal Society, Interface* 10 (78), S. 20120525. DOI: 10.1098/rsif.2012.0525.

- Masuda T, Tsuda M, Yoshinaga R, Tozaki-Saitoh H, Ozato K, Tamura T, Inoue K (2012): IRF8 is a critical transcription factor for transforming microglia into a reactive phenotype. In: *Cell reports* 1 (4), S. 334–340. DOI: 10.1016/j.celrep.2012.02.014.
- Mei H, Nakatsu MN, Baclagon ER, Deng SX (2014): Frizzled 7 maintains the undifferentiated state of human limbal stem/progenitor cells. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 32 (4), S. 938–945. DOI: 10.1002/stem.1582.
- Meller D, Pires RTF, Tseng SCG (2002): Ex vivo preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane cultures. In: *The British journal of ophthalmology* 86 (4), S. 463–471.
- Meller D, Thomasen H (2017): Limbusstammzelltransplantation. Aktueller Stand und Perspektiven. In: *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 114 (4), S. 298–306. DOI: 10.1007/s00347-017-0462-6.
- Miri A, Alomar T, Nubile M, Al-Aqaba M, Lanzini M, Fares U (2012): In vivo confocal microscopic findings in patients with limbal stem cell deficiency. In: *The British journal of ophthalmology* 96 (4), S. 523–529. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2011-300551.
- Mittal V, Jain R, Mittal R (2015): Ocular Surface Epithelialization Pattern After Simple Limbal Epithelial Transplantation: An In Vivo Observational Study. In: *Cornea* 34 (10), S. 1227–1232. DOI: 10.1097/ICO.0000000000000573.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R (1982): The catalog of human cytokeratins. Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. In: *Cell* 31 (1), S. 11–24. DOI: 10.1016/0092-8674(82)90400-7.
- Morrison SJ, Kimble J (2006): Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. In: *Nature* 441 (7097), S. 1068–1074. DOI: 10.1038/nature04956.
- Nakamura T, Ishikawa F, Sonoda K-H, Hisatomi T, Qiao H, Yamada J (2005): Characterization and distribution of bone marrow-derived cells in mouse cornea. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 46 (2), S. 497–503. DOI: 10.1167/iovs.04-1154.
- Nakatsu MN, Ding Z, Ng MY, Truong TT, Yu F, Deng SX (2011): Wnt/ $\beta$ -catenin signaling regulates proliferation of human cornea epithelial stem/progenitor cells. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 52 (7), S. 4734–4741. DOI: 10.1167/iovs.10-6486.
- Nelson N, Marks MS, Driggers PH, Ozato K (1993): Interferon consensus sequence-binding protein, a member of the interferon regulatory factor family, suppresses interferon-induced gene transcription. In: *Molecular and cellular biology* 13 (1), S. 588–599.
- Nishida K, Kinoshita S, Yokoi N, Kaneda M, Hashimoto K, Yamamoto S (1994): Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 latency-associated peptide in human cornea. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 35 (8), S. 3289–3294.
- Nishida K, Sotozono C, Adachi W, Yamamoto S, Yokoi N, Kinoshita S (1995): Transforming growth factor-beta 1, -beta 2 and -beta 3 mRNA expression in human cornea. In: *Current eye research* 14 (3), S. 235–241.
- Pauklin M, Thomasen H, Pester A, Steuhl K-P, Meller D (2011): Expression of pluripotency and multipotency factors in human ocular surface tissues. In: *Current eye research* 36 (12), S. 1086–1097. DOI: 10.3109/02713683.2011.608238.

- Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, Bondanza S (2001): p63 identifies keratinocyte stem cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (6), S. 3156–3161. DOI: 10.1073/pnas.061032098.
- Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, de Luca M (1997): Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. In: *Lancet (London, England)* 349 (9057), S. 990–993. DOI: 10.1016/S0140-6736(96)11188-0.
- Pereira L, Medina R, Baena M, Planas AM, Pozas E (2015): IFN gamma regulates proliferation and neuronal differentiation by STAT1 in adult SVZ niche. In: *Frontiers in cellular neuroscience* 9, S. 270. DOI: 10.3389/fncel.2015.00270.
- Pogosova-Agadjanyan EL, Kopecky KJ, Ostronoff F, Appelbaum FR, Godwin J, Lee H (2013): The prognostic significance of IRF8 transcripts in adult patients with acute myeloid leukemia. In: *PloS one* 8 (8), e70812. DOI: 10.1371/journal.pone.0070812.
- Puangsricharern V, Tseng SCG (1995): Cytologic Evidence of Corneal Diseases with Limbal Stem Cell Deficiency. In: *Ophthalmology* 102 (10), S. 1476–1485. DOI: 10.1016/S0161-6420(95)30842-1.
- Raem AM Braun, Rüdiger W, Fenger H, Michaelis W, Nikol S, Winter SF (2001): Gen-Medizin. Eine Bestandsaufnahme. Berlin, Heidelberg: Springer. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-56818-3>.
- Reinhard T, Kontopoulos T, Wernet P, Enczmann J, Sundmacher R (2004): Langzeitergebnisse der homologen perforierenden Limbokeratoplastik bei totaler Limbusstammzellinsuffizienz nach Verätzungen/Verbrennungen. In: *Der Ophthalmologe*. 101(7):682-7. doi: 10.1007/s00347-003-0839-6.
- Robertson DM, Ho S-I, Cavanagh HD (2008): Characterization of DeltaNp63 isoforms in normal cornea and telomerase-immortalized human corneal epithelial cells. In: *Experimental eye research* 86 (4), S. 576–585. DOI: 10.1016/j.exer.2007.12.007.
- Robertson DM, Li L, Fisher S, Pearce VP, Shay JW, Wright WE (2005): Characterization of growth and differentiation in a telomerase-immortalized human corneal epithelial cell line. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 46 (2), S. 470–478. DOI: 10.1167/iovs.04-0528.
- Rossen J, Amram A, Milani B, Park D, Harthan J, Joslin C (2016): Contact Lens-induced Limbal Stem Cell Deficiency. In: *The ocular surface* 14 (4), S. 419–434. DOI: 10.1016/j.jtos.2016.06.003.
- Sangwan VS, Basu S, MacNeil S, Balasubramanian D (2012): Simple limbal epithelial transplantation (SLET): a novel surgical technique for the treatment of unilateral limbal stem cell deficiency. In: *The British journal of ophthalmology* 96 (7), S. 931–934. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2011-301164.
- Scharton-Kersten T, Contursi C, Masumi A, Sher A, Ozato K (1997): Interferon Consensus Sequence Binding Protein-deficient Mice Display Impaired Resistance to Intracellular Infection Due to a Primary defect in Interleukin 12 p40 Induction. In: *The Journal of Experimental Medicine* 197 (186 (9)), S. 1523–1534.
- Schermer A, Galvin S, Sun TT (1986): Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. In: *The Journal of cell biology* 103 (1), S. 49–62.

- Schlötzer-Schrehardt U, Dietrich T, Saito K, Sorokin L, Sasaki T, Paulsson M, Kruse FE (2007): Characterization of extracellular matrix components in the limbal epithelial stem cell compartment. In: *Experimental eye research* 85 (6), S. 845–860. DOI: 10.1016/j.exer.2007.08.020.
- Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE (2005): Identification and characterization of limbal stem cells. In: *Experimental eye research* 81 (3), S. 247–264. DOI: 10.1016/j.exer.2005.02.016.
- Schmidt M, Nagel S, Proba J, Thiede C, Ritter M, Waring JF (1998): Lack of interferon consensus sequence binding protein (ICSBP) transcripts in human myeloid leukemias. In: *Blood* 91 (1), S. 22–29.
- Scholzen T, Gerdes J (2000): The Ki-67 protein: from the known and the unknown. In: *Journal of cellular physiology* 182 (3), S. 311–322. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9.
- Shaharuddin B, Ahmad S, Md Latar N, Ali S, Meeson A (2016): A Human Corneal Epithelial Cell Line Model for Limbal Stem Cell Biology and Limbal Immunobiology. In: *Stem cells translational medicine*. DOI: 10.5966/sctm.2016-0175.
- Shaharuddin B, Harvey I, Ahmad S, Ali S, Meeson A (2014): Characterisation of human limbal side population cells isolated using an optimised protocol from an immortalised epithelial cell line and primary limbal cultures. In: *Stem cell reviews* 10 (2), S. 240–250. DOI: 10.1007/s12015-013-9481-0.
- Shortt AJ, Secker GA, Munro PM, Khaw PT, Tuft SJ, Daniels JT (2007): Characterization of the limbal epithelial stem cell niche: novel imaging techniques permit in vivo observation and targeted biopsy of limbal epithelial stem cells. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25 (6), S. 1402–1409. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0580.
- Singh R, Joseph A, Umapathy T, Tint, NL, Dua HS (2005): Impression cytology of the ocular surface. In: *The British journal of ophthalmology* 89 (12), S. 1655–1659. DOI: 10.1136/bjo.2005.073916.
- Spoler F, Frenz M, Forst M, Kurz H, Schrage NF (2008): Analysis of hydrofluoric acid penetration and decontamination of the eye by means of time-resolved optical coherence tomography. In: *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 34 (4), S. 549–555. DOI: 10.1016/j.burns.2007.05.004.
- Stachon T, Wu MF, Bischoff M, Huber M, Langenbucher A, Seitz B, Szentmáry N (2017): Amnionmembransuspension und autologes Serum – spielt der Inhalt eine Rolle für die Wundheilung? In: *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 234(8):1015-1018. doi: 10.1055/s-0042-122338.
- Strojny C, Boyle M, Bartholomew A, Sundivakkam P, Alapati S (2015): Interferon Gamma-treated Dental Pulp Stem Cells Promote Human Mesenchymal Stem Cell Migration In Vitro. In: *Journal of endodontics* 41 (8), S. 1259–1264. DOI: 10.1016/j.joen.2015.02.018.
- Sung JY, Park S-Y, Kim JH, Kang HG, Yoon JH, Na YS (2014): Interferon consensus sequence-binding protein (ICSBP) promotes epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-like phenomena, cell-motility, and invasion via TGF- $\beta$  signaling in U2OS cells. In: *Cell death & disease* 5, e1224. DOI: 10.1038/cddis.2014.189.
- Sung JY, Kim H, Kim YN, Na YS, Park B-K (2011): Interferon consensus sequence binding protein-induced cell proliferation is mediated by TGF- $\beta$  signaling and p38 MAPK activation. In:

- Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 91 (9), S. 1304–1313. DOI: 10.1038/labinvest.2011.90.
- Tamura T, Yanai H, Savitsky D, Taniguchi T (2008): The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. In: *Annual review of immunology* 26, S. 535–584. DOI: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090400.
- Thoft RA, Friend J (1983): The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 24 (10), S. 1442–1443.
- Tseng SCG (1996): Regulation and clinical implications of corneal epithelial stem cells. In: *Molecular biology reports* 23 (1), S. 47–58.
- Vantrappen L, Geboes K, Missotten L, Maudgal PC, Desmet V (1985): Lymphocytes and Langerhans cells in the normal human cornea. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 26 (2), S. 220–225.
- Viestenz A, Seitz B, Struck HG, Viestenz A (2018): Sclerocorneal graft and sequential removal of melted cornea after severe corneal burn with perforation. In: *Clinical Anatomy* 31(1):39-42. doi: 10.1002/ca.22909.
- Vogt A (1930): Lehrbuch und Atlas der Spaltlampenmikroskopie des Lebenden Auges. Erster Teil: Technik und Methodik. Hornhaut und Vorderkammer. Zugleich Zweite Auflage des 'Atlas der Spaltlampenmikroskopie'. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. S. 60-64
- Walter P, Plange N (2017): Basiswissen Augenheilkunde. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-52801-3>.
- Wang H, Yan M, Sun J, Jain S, Yoshimi R, Abolfath SM (2014): A reporter mouse reveals lineage-specific and heterogeneous expression of IRF8 during lymphoid and myeloid cell differentiation. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 193 (4), S. 1766–1777. DOI: 10.4049/jimmunol.1301939.
- Wang X, Dai J (2010) Concise review: isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology. In: *Stem Cells* 28(5):885-93. doi: 10.1002/stem.419.
- Wang X, Zhao Y, Xiao Z, Chen B, Wei Z, Wang B, Zhang J, Han J, Gao Y, Li L, Zhao H, Zhao W, Lin H, Dai J (2009): Alternative translation of OCT4 by an internal ribosome entry site and its novel function in stress response. In: *Stem Cells* 27(6):1265-75. doi: 10.1002/stem.58.
- Watabe T, Miyazono K (2009): Roles of TGF-beta family signaling in stem cell renewal and differentiation. In: *Cell research* 19 (1), S. 103–115. DOI: 10.1038/cr.2008.323.
- Watt FM (2000): Out of Eden. Stem Cells and Their Niches. In: *Science* 287 (5457), S. 1427–1430. DOI: 10.1126/science.287.5457.1427.
- Welsch U (Hg.) (2014): Lehrbuch Histologie. 4. Aufl. München: Urban & Fischer in Elsevier. S. 499-505
- Wu MF, Stachon T, Langenbacher A, Seitz B, Szentmáry N (2015): Effect of Amniotic Membrane Suspension (AMS) and Amniotic Membrane Homogenate (AMH) on Human Corneal Epithelial Cell Viability, Migration and Proliferation In Vitro. In: *Current Eye Research* 42(3):351-357. doi: 10.1080/02713683.2016.1192193.

- Xu Y, Jiang L, Fang J, Fang R, Morse HC, Ouyang G, Zhou JX (2015): Loss of IRF8 Inhibits the Growth of Diffuse Large B-cell Lymphoma. In: *Journal of Cancer* 6 (10), S. 953–961. DOI: 10.7150/jca.12067.
- Yan M, Wang H, Sun J, Liao W, Li P, Zhu Y (2016): Cutting Edge: Expression of IRF8 in Gastric Epithelial Cells Confers Protective Innate Immunity against *Helicobacter pylori* Infection. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 196 (5), S. 1999–2003. DOI: 10.4049/jimmunol.1500766.
- Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT (1999): p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. In: *Nature* 398 (6729), S. 714–718. DOI: 10.1038/19539.
- Yoon JJ, Ismail S, Sherwin T (2014): Limbal stem cells: Central concepts of corneal epithelial homeostasis. In: *World journal of stem cells* 6 (4), S. 391–403. DOI: 10.4252/wjsc.v6.i4.391.
- Yoshida S, Shimmura S, Kawakita T, Miyashita H, Den S, Shimazaki J, Tsubota K (2006): Cytokeratin 15 can be used to identify the limbal phenotype in normal and diseased ocular surfaces. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 47 (11), S. 4780–4786. DOI: 10.1167/iovs.06-0574.
- Zhang J, Upadhyaya D, Lu L, Reneker LW (2015): Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) is required for corneal epithelial cell proliferation and differentiation during embryonic development. In: *PloS one* 10 (1), e0117089. DOI: 10.1371/journal.pone.0117089.
- Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong W-G (2003): Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. In: *Nature* 425 (6960), S. 836–841. DOI: 10.1038/nature02041.
- Zhang S-H, Gao L, Zhang X-F, Zhang R, Zhu L-H, Wang P-X (2014): Interferon regulatory factor 8 modulates phenotypic switching of smooth muscle cells by regulating the activity of myocardin. In: *Molecular and cellular biology* 34 (3), S. 400–414. DOI: 10.1128/MCB.01070-13.
- Zhao B, Takami M, Yamada A, Wang X, Koga T, Hu X (2009): Interferon regulatory factor-8 regulates bone metabolism by suppressing osteoclastogenesis. In: *Nature medicine* 15 (9), S. 1066–1071. DOI: 10.1038/nm.2007.
- Zhao B, Allinson SL, Ma A, Bentley AJ, Martin FL, Fullwood NJ (2008a): Targeted cornea limbal stem/progenitor cell transfection in an organ culture model. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 49 (8), S. 3395–3401. DOI: 10.1167/iovs.07-1263.
- Zhao X, Das AV, Bhattacharya S, Thoreson WB, Sierra JR, Mallya KB, Ahmad I (2008b): Derivation of neurons with functional properties from adult limbal epithelium: implications in autologous cell therapy for photoreceptor degeneration. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 26 (4), S. 939–949. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0727.
- Zhao X, Das AV, Thoreson WB, James J, Wattnem TE, Rodriguez-Sierra J, Ahmad I (2002): Adult Corneal Limbal Epithelium. A Model for Studying Neural Potential of Non-Neural Stem Cells/Progenitors. In: *Developmental biology* 250 (2), S. 317–331. DOI: 10.1006/dbio.2002.0793.
- Zhou S-Y, Zhang C, Baradaran E, Chuck RS (2010): Human corneal basal epithelial cells express an embryonic stem cell marker OCT4. In: *Current eye research* 35 (11), S. 978–985. DOI: 10.3109/02713683.2010.516465.

Zöfel P (2007): Statistik verstehen. Ein Begleitbuch zur computergestützten Anwendung ; [ein Leitfaden zu statistischen Lösungen]. [Nachdr.]. München: Addison-Wesley (Scientific computing)., S. 53

## Thesen

1. Der Transkriptionsfaktor IRF8, welcher bislang im Auge nur in der Linsenentwicklung und in den Photorezeptoren nachgewiesen werden konnte, wird von den hTCEpi-Zellen exprimiert.
2. hTCEpi-Zellen lassen sich durch Zugabe von IFN- $\gamma$  in ihr Kulturmedium zu einer erhöhten Expression von IRF8 anregen, welche abhängig von der zugefügten IFN- $\gamma$ -Konzentration ist.
3. Die hTCEpi-Zelllinie ist in der Lage Zellcluster zu bilden, in welchen alle enthaltenen Zellen das gleiche Expressionsprofil von Stammzellmarkern aufweisen.
4. Durch immunhistochemische Färbungen kann eine Expression von IRF8 in limbalen Zellen im Mausauge nachgewiesen werden.
5. In den Photorezeptoren sowie in den retinalen Ganglienzellen im Mausauge kann die Expression von IRF8 durch immunhistochemische Färbungen bestätigt werden.
6. IRF8, bereits bekannt als Marker für einige hämapoietische Zellen, stellt einen potentiellen limbalen epithelialen Stammzellmarker dar.
7. Die hTCEpi-Zelllinie stellt auf Grund der Stammzellmarkerexpression, des Wachstumsverhalten und der Differenzierungsmöglichkeiten ein geeignetes Model zur Erforschung der Limbuszellen dar.
8. Auf Grund der zum Teil fehlenden Expression von Stammzellmarkern in einigen Zellen stellt die hTCEpi-Zelllinie keine reine Stammzelllinie dar, sondern enthält auch Progenitorzellen und noch weiter differenzierte Zellen.
9. Potentiell hat IRF8 einen Einfluss auf die Proliferation, die Migration und die Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften der limbalen epithelialen Stammzellen.
10. Das Zytokeratin 14 eignet sich als Größenmarker für die Limbusregion des Mausauges.

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primärantikörper.....	14
Tabelle 2: Sekundärantikörper.....	14
Tabelle 3: Chemikalien .....	15
Tabelle 4: Materialien .....	16
Tabelle 5: Zusammensetzung verwendeter Lösungen.....	16
Tabelle 6: Materialien .....	17
Tabelle 7: Zusammensetzung verwendeter Lösungen.....	17
Tabelle 8: Materialien .....	18
Tabelle 9: Zusammensetzung verwendeter Lösungen.....	18
Tabelle 10: verwendete Primer.....	19
Tabelle 11: Schema der Stimulationsversuche .....	25
Tabelle 12: Übersicht über die Ergebnisse der Differenzierungsversuche.....	43

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lichtmikroskopische Fotografie der hTCEpi-Zellen nach siebentägiger Behandlung mit Puromycin.....	32
Abbildung 2: halblogarithmische Darstellung des Wachstumsverlaufs der hTCEpi-Zellen mit Unterteilung in lag-, log- und stationäre Phase .....	33
Abbildung 3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Expression von p63 in hTCEpi- Zellen.....	34
Abbildung 4: Ergebnis der Gelelektrophorese der PCR an hTCEpi-Zellen mit Nachweis der RNA von Nanog, Oct4 und $\Delta Np63\alpha$ in dem entsprechenden Bandenbereich (links Größenmarker der Basenpaare in jeweils Abständen von je 100 bp) .....	35
Abbildung 5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Expression von Ki-67 in hTCEpi- Zellen und lichtmikroskopische Aufnahme der angefärbten Zellen .....	36
Abbildung 6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Expression von Oct4 und Ki-67 in hTCEpi-Zellen und lichtmikroskopische Aufnahme der angefärbten Zellen .....	36
Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Oct4-Expression eines Zellclusters der hTCEpi-Zellen .....	37
Abbildung 8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Expression von Nanog- und Ki-67 in hTCEpi-Zellen und lichtmikroskopische Aufnahme der angefärbten Zellen.....	37
Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Nanog-Expression eines Zellclusters der hTCEpi-Zellen .....	38
Abbildung 10: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Expression des FGFR2 und Ki-67 in hTCEpi-Zellen und lichtmikroskopische Aufnahme der angefärbten Zellen.....	38
Abbildung 11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der FGFR2-Expression eines Zellclusters der hTCEpi-Zellen.....	39
Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Expression von IRF8 und Ki-67 in hTCEpi-Zellen und lichtmikroskopische Aufnahme der angefärbten Zellen .....	39
Abbildung 13: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der IRF8-Expression von Zellen eines Zellclusters der hTCEpi-Zellen.....	40
Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Expression von CK14 und Ki-67 in hTCEpi-Zellen.....	40

Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der CK14-Expression der hTCEpi-Zellen im Differenzierungsprozess .....	41
Abbildung 16: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der E-Cadherin-Expression der hTCEpi-Zellen im Differenzierungsprozess .....	42
Abbildung 17: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der p63-Expression der hTCEpi-Zellen im Differenzierungsprozess .....	42
Abbildung 18: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der IRF8-Expression der hTCEpi-Zellen im Differenzierungsprozess .....	43
Abbildung 19: Lichtmikroskopische Aufnahme der hTCEpi-Zellen bei mehrtägiger Stimulation mit IFN- $\gamma$ .....	45
Abbildung 20: Betrachtung der Zellanzahl pro 3,058 mm <sup>2</sup> bei Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von IFN- $\gamma$ .....	46
Abbildung 21: prozentualer Anteil IRF8-positiver Zellen während Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von IFN- $\gamma$ (0, 1 und 5 ng/ml) mit Angabe der Standardabweichung als Fehlerbalken .....	47
Abbildung 22: prozentualer Anteil IRF8-positiver Zellen vor, während und nach dreitägiger Stimulation mit 1 ng/ml IFN- $\gamma$ und Angabe der Standardabweichung als Fehlerbalken bei unterschiedlichen Anfangszellzahlen .....	49
Abbildung 23: prozentuale Größe der Defekte im <i>Scratch-Assay</i> bei einem 350 $\mu$ m (Kratzer 1) und einem 720 $\mu$ m breiten Kratzer (Kratzer 2) (X-Achse: Zeitspanne in Tagen, Y-Achse: prozentuale Größe der Defektfläche) .....	50
Abbildung 24: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der IRF8-Expression in der zentralen Cornea und im Limbus im WT-Mausauge .....	51
Abbildung 25: IRF8-Expression in der Retina eines WT-Mausauges .....	52
Abbildung 16: Schema der Vermessung des Limbus an einer PAS-Färbung eines WT Mausauges .....	53
Abbildung 27: Limbusgrößen von WT und IRF8 <sup>-/-</sup> -Mausaugen im Vergleich mit Darstellung der Standardabweichung als Fehlerbalken .....	54

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen Hilfsmittel und Quellen als die angegebenen verwendet habe.

Datum:

Unterschrift:

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich, dass ich keinen vorausgegangenen Promotionsversuch unternommen habe, und dass kein Promotionsversuch an einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung läuft.

Datum:

Unterschrift:

## Danksagung

Der Dank an erster Stelle gebührt dem Betreuer meiner Arbeit Herrn Prof. Dr. med. Thomas Hammer. Ich möchte mich bei Ihnen für Ihre unermüdliche Unterstützung, den Zuspruch, das immer offene Ohr für meine Probleme und die konstruktiven Gespräche bedanken, die schlussendlich zum Gelingen dieser Arbeit geführt haben. Ohne Sie wäre die ganze Arbeit nicht möglich gewesen.

Besonderer Dank gebührt auch Prof. Dr. med. Arne Viestenz für die unglaubliche Unterstützung, die er mir und meiner Arbeit zukommen ließ und immer noch lässt. Dafür bin ich von Herzen dankbar. Auch für Ihre Unterstützung im Hinblick auf die Publikation und die weiteren Forschungsvorhaben bin ich Ihnen außerordentlich dankbar.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. Erik Chankiewitz bedanken, mit dem ich mein erstes Gespräch führte, was in der Entscheidung zu dieser Promotionsarbeit führte.

Für ihre Hilfe bei den Experimenten und der Verschriftlichung dieser Arbeit sowie die vielen konstruktiven Gespräche möchte ich mich auch bei Frau Dr. Cornelia Wiese-Rischke herzlich bedanken. Dies hat die Arbeit im Labor für mich zu einer sehr lehrreichen Zeit gemacht.

Ein weiterer Dank gilt außerdem Frau Dr. Marina Scheller, welche eine enorme Hilfestellung bei der Präparation der Mauseugen und der dazugehörigen Publikation leistete.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Joana Heinzemann und Frau Dr. rer. nat. Sabine Foja für Ihren Zuspruch, die wahnsinnige Unterstützung und die vielen Gespräche bedanken. Dieser Dank gilt auch den Laborteams der Augenheilkunde, der HNO und der Gynäkologie, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und mich auch nach Fehlversuchen und Rückschlägen immer wieder aufgebaut haben.

Auch bei meinen Kolleginnen und Kollegen der Augenklinik, die mich die Jahre über begleitet haben, möchte ich mich für die Unterstützung und das Verständnis gegenüber meiner Arbeit bedanken.

Ohne meine lieben Freunde Sarah, Matthias, Maximilian, Gesine, Jenny, Janna, Franzi, Britta und Insa wäre mir der doch etwas länger als geplante Weg zur Promotion sicherlich noch länger vorgekommen. Ich möchte euch von ganzem Herzen für eure langjährige Freundschaft, euer Mitgefühl, eure Unterstützung und vor allem für eure Zeit danken, die ihr mir gebt.

Das, was jeder Mensch braucht, um bei so einer doch sehr anstrengenden und langwierigen Arbeit nicht den Mut und das Durchhaltevermögen zu verlieren, ist eine Familie. Ohne meine Eltern Ingrid und Wolfgang und meine Geschwister Ulrike, Martin und Michael wäre ich nicht zu dem Menschen geworden, der ich heute bin. Ohne eure Unterstützung in allen Lebenslagen hätte ich das nicht geschafft. Und auch ohne dich Alex, deine enorme Unterstützung, dein immer offenes Ohr, deine Art, mich trotz der oft widrigen Umstände wieder auf den richtigen Weg zu bringen, mir mit deinen Worten und Taten immer ein Lächeln ins Gesicht zaubern zu können und deine bedingungslose Liebe, wäre ich nicht an diesem Punkt angekommen. Ich bin euch aus tiefster Seele und ganzem Herzen dankbar.