

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR HUMANANATOMIE UND EMBRYOLOGIE
PROF. DR. MED. ERNST R. TAMM
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN

**cDNA-Microarrayanalyse zur Genregulation
in der Kornea von TGF- β 1 transgenen Mäusen**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Maximilian Philipp Lenhardt

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ernst R. Tamm

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Olaf Strauß

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juli 2011

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	- 3 -
Struktureller Aufbau der Kornea	- 4 -
Embryonale Entwicklung des vorderen Augenabschnitts	- 7 -
TGF- β 1 Überexpression in den Augen transgener Mäuse	- 10 -
MATERIAL UND METHODEN	- 16 -
Probengewinnung	- 16 -
Genotypisierung.....	- 16 -
Isolieren von RNA.....	- 17 -
Prüfung der Integrität von RNA	- 18 -
Anfertigung von Semidünnschnitten	- 18 -
cDNA Microarray Analysen.....	- 19 -
ERGEBNISSE	- 21 -
Optimierung der Methode.....	- 21 -
Lichtmikroskopie.....	- 22 -
cDNA Microarray Analyse.....	- 23 -
Verstärkt exprimierte Gene.....	- 26 -
Vermindert exprimierte Gene	- 28 -
Datamining	- 31 -
DISKUSSION	- 35 -
Gene der extrazellulären Matrix	- 35 -
Gene der TGF- β Signalwege	- 36 -
Gene des Zytoskeletts	- 37 -
Connexin 26 (Cx26)/ Gap Junction Protein β 2 (Gjb2), Connexin 31 (Cx31)/ Gap Junction Protein β 3 (Gjb3)	- 40 -
Prostaglandin D2 Synthase (Ptgds), Early growth response 2 (Egr2)	- 41 -
Chemokinligand 14 (Cxcl14/ BRAK)	- 43 -
Dickkopf 2 (Dkk2).....	- 45 -
ZUSAMMENFASSUNG	- 47 -
LITERATURVERZEICHNIS	- 49 -
DANKSAGUNG	- 54 -
LEBENS LAUF.....	- 55 -

EINLEITUNG

Die Kornea des menschlichen Auges ist ein hoch differenziertes Gewebe, das besondere Aufgaben erfüllt und welches deshalb spezielle Eigenschaften besitzt. Sie ist als Bestandteil der Körperoberfläche ein wichtiger Schutz des Auges nach außen gegen Umwelteinflüsse und mögliche Verletzungen. Weiterhin ist sie aufgrund ihrer Transparenz und Brecheigenschaft ein unverzichtbarer Teil des Sehapparates. Der Anspruch, diese unterschiedlichen Aufgaben in sich zu vereinigen, erfordert eine hoch differenzierte Feinstruktur.

Struktureller Aufbau der Kornea

Die Kornea ist aus fünf verschiedenen Schichten aufgebaut [Abb. 1, Abb. 2], die harmonisch zusammenwirken müssen, um eine uneingeschränkte Funktion zu gewährleisten.

Die äußerste Schicht wird als Korneaepithel bezeichnet. Die 5-6 Zelllagen erneuern sich ständig durch Mitose vom Rand der Kornea her (*Limbus*) in zentripetaler Richtung und bilden, überwiegend durch Desmosomen und *Zonulae occludentes* untereinander verbunden, einen festen und geordneten Zellverbund, dem durch ein intrazelluläres Zytoskelett aus Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten (Keratine) Form und Beweglichkeit verliehen wird. Die dichte Innervation durch freie Nervenendigungen des *N. trigeminus* in diesem Gebiet ist die Basis des schützenden Kornealreflexes.

Dem Korneaepithel schließt sich nach innen hin die *Lamina limitans anterior* (Bowmann Lamelle) an. Sie ist eine zellfreie 8-14 µm dicke Stromagrenzschicht, die vor allem aus ungeordneten kollagenen Fasern (Kollagen Typ I und Typ III) und Grundsubstanz besteht.

Das Stroma bildet mit einer Dicke von 500 µm den kräftigsten Teil der Kornea. Die Stromazellen werden als Korneafibroblasten oder Keratozyten bezeichnet und machen selbst nur 2 bis 3 Prozent des Stromavolumens aus. Sie besitzen ein ausgeprägtes Zytoskelett, das hauptsächlich aus Aktinfilamenten besteht. Die Zellen sind an ihren langen Fortsätzen über *Gap Junctions* miteinander verbunden und liegen zwischen Lamellen aus extrazellulärer Matrix, welche den größten Anteil des Stromas ausmacht. Die Lamellen sind 2 µm dick und in ca. 200-250 Lagen übereinander geschichtet. Der außergewöhnlich regelmäßigen Anordnung der kollagenen Fasern und Lamellen wird große Bedeutung bezüglich der Transparenz der Kornea zugeschrieben. In den einzelnen Lamellen verlaufen alle kollagenen Fasern parallel zueinander. In der folgenden Lamelle sind die kollagenen Fasern wieder

parallel, jedoch im Winkel versetzt zur vorangegangenen Lamelle angeordnet. Dadurch entsteht der Aufbau einer mehrschichtigen Gitterstruktur [Abb. 3]. Beim Stromakollagen handelt es sich überwiegend um Kollagen Typ I mit geringeren Anteilen von Kollagen Typ III und Typ IV. Auch die Grundsubstanz trägt durch zwei Aspekte maßgeblich zur Transparenz der Kornea bei. Erstens sorgen Proteoglykane durch Wasserbindung für einen exakt gleichbleibenden Wassergehalt der Kornea, zweitens umschließt die Grundsubstanz jede einzelne kollagene Faser und sorgt so für eine optimale Anordnung mit gleicher Distanz zueinander. Beides wird als essentiell für die Durchsichtigkeit des Gewebes angesehen (Maurice, 1957).

Dem Stroma folgt als vierte Schicht die *Lamina limitans posterior* (Descemet Membran). Sie ist die Basalmembran der innersten Zellschicht, des Korneaendothels. Die Descemet Membran ist ebenfalls sehr regelmäßig konfiguriert und aus Kollagenfilamenten zusammengesetzt. Sie besteht überwiegend aus Kollagen Typ IV und Laminin, mit geringeren Anteilen von Fibronectin.

Das Korneaendothel ist ein einreihiges Epithel, welches direkt an der Grenze zur vorderen Augenkammer liegt. Mit seinem Schlussleistennetz aus *Zonulae* und *Maculae occludentes* schließt es die Kornea nach innen zum Kammerwasser hin ab. Die flachen, polygonalen Zellen sind lediglich 5 µm dick und haben eine stark eingeschränkte Mitoserate. Es wird angenommen, dass diese Zellen großen Einfluss auf die Zusammensetzung und die Wasserbindung des Interstitiums haben. Zu diesem Zweck besitzen die Endothelzellen Ionentransportsysteme, die einem Einströmen von Wasser in das Interstitium entgegenwirken.

Für die Transparenz der Kornea ist eine exakte Regulation der Wasserbindung im Interstitium essentiell. Störungen dieser Regulation, zum Beispiel im Bereich des Korneaendothels oder Epithels, führen zu einem Ödem und zu einer Trübung der Kornea. Ebenso wichtig für die Durchsichtigkeit der Kornea ist die Abwesenheit von Blutgefäßen. Da nahezu in der gesamten Hornhaut normalerweise keine Gefäße existieren, werden die einzelnen Zellschichten fast ausschließlich durch Diffusion, zum einen von außen über den Tränenfilm, zum andern von innen durch das Kammerwasser versorgt.

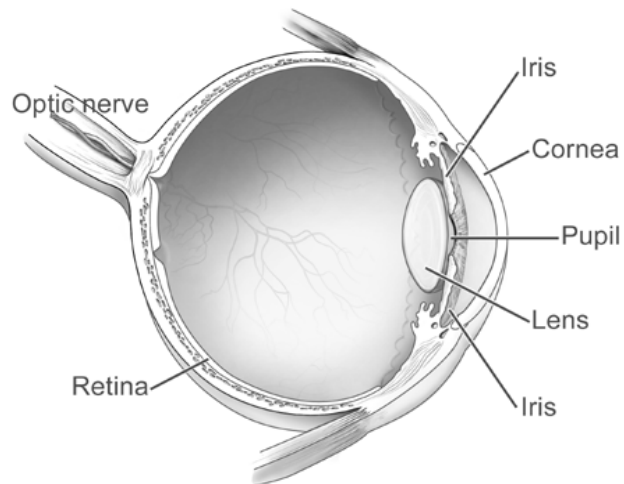


Abb. 1: Schematische Zeichnung eines Schnittes durch das menschliche Auge (http://www.nei.nih.gov/photo/eyean/images/NEA08_72.jpg).

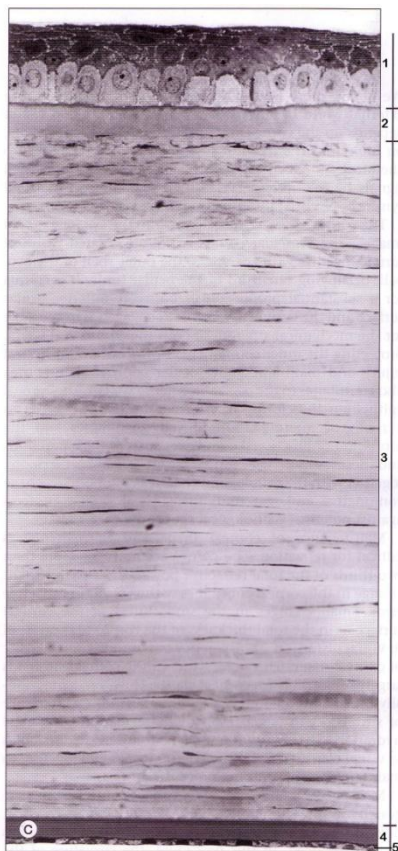


Abb. 2: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Schnittes durch die Kornea. Gezeigt sind die fünf Schichten [Bild modifiziert] (Krachmer, 2005).

- 1 Korneaepithel
- 2 Bowmann Membran
- 3 Stroma
- 4 Descemet Membran
- 5 Korneaendothel

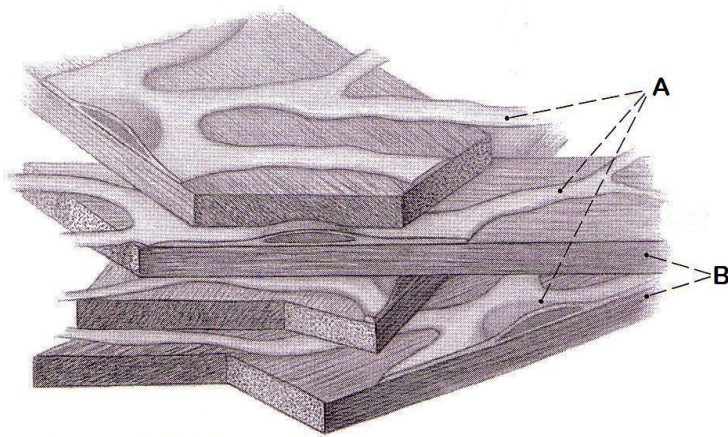


Abb. 3: Schemazeichnung der Lamellenschichtung im Korneastroma. A, Keratozyten; B, Lamellen aus Kollagenfasern (Krachmer, 2005).

Embryonale Entwicklung des vorderen Augenabschnitts

Die strukturellen Charakteristika der Kornea, wie ihre glatte Oberfläche, Krümmung, Dicke und vor allem Transparenz, werden während der fetalen Entwicklung angelegt.

Die Kornea entsteht durch eine komplexe Interaktion des Neurektoderms, des Oberflächenektoderms und der Neuralleiste [Abb. 4]. Aus dem zervikalen Neurektoderm, im Bereich des Diencephalons, beginnt Anfang der vierten Entwicklungswoche das Augenbläschen (*Vesicula optica*) in Richtung Oberflächenektoderm zu wachsen. Kommt das Augenbläschen mit dem Kopfektoderm in Kontakt, formt sich die Linsenplakode, eine Ansammlung ektodermaler Zellen, die später abgeschnürt wird, um die Linse zu bilden. Das Augenbläschen selbst beginnt in dem Bereich, wo es dem Ektoderm anliegt, eine Tasche zu formen und wird zum Augenbecher (*Cupula optica*). Dessen äußeres Blatt wird später zur Retina und sein inneres Blatt zum Pigmentepithel. Dabei spielt eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle: SIX3, PAX6 und RX1 werden zusammen im vordersten Abschnitt der Neuralplatte exprimiert. PAX6 ist der zentrale Transkriptionsfaktor bei der Interaktion von Augenbläschen und Ektoderm, ohne den sich keine korrekte Entwicklung der Linse vollziehen kann.

Die ektodermale Linsenplakode sinkt in den Augenbecher ein zur Linsengrube (*Fovea lentis*) und bildet wenig später das Linsenbläschen (*Vesicula lentis*), das sich in der fünften Woche vom Oberflächenepithel abschnürt. Danach wandern Zellen aus der Neuralleiste in den Raum zwischen Linsenbläschen und Oberflächenepithel ein. Diese Zellen verdichten sich, während der Augenbecher an Größe zunimmt, und formieren sich zu einigen flachen Zellschichten des

Stromas und des Hornhautendothels. Das Korneaepithel hingegen entsteht aus den Zellen des Oberflächenektoderms.

Die Zellen der der Retina zugekehrten Wand des Linsenbläschens verlängern sich und werden zu Linsenfasern, die den Innenraum des Bläschens allmählich ausfüllen. Während diese Fasern weiterwachsen, beginnt die Synthese der Kristalline, hochsymmetrischer Proteine, die der Linse die nötige Brechkraft und Transparenz verleihen. Sie füllen die Zellen aus und führen letztendlich zum Ausstoßen des Zellkerns. Am Ende der Embryonalzeit (8. Woche) löst sich die Linse von der Kornea ab, wobei die vordere Augenkammer entsteht. Gleichzeitig differenzieren sich die Hornhautschichten. Der vordere Rand des Augenbechers wächst aus und es entstehen nicht-neuronale Strukturen, wie Irismuskeln und Ziliarkörper. Später entsteht in diesem Bereich das drainierende System des Auges mit dem Schlemm Kanal und dem Trabekelwerk (Benninghoff, 2003; Gilbert, 2006; Kaufman, 1998).

Bei der Maus als gängigem Versuchstier stellt sich der zeitliche Ablauf dieser Entwicklung beschleunigt wie folgt dar: Am embryonalen Entwicklungstag 9 (E9) beginnt die Entwicklung des Auges mit dem Auswachsen des Augenbläschens. Bereits an E10 kann die Formation der Linsenplakode beobachtet werden, die sich in den Folgetagen zum Linsenbläschen einsenkt und schließlich abschnürt (E13). An E15 löst sich die Linse von der Kornea ab, an der die Schichtung in Epithel, Stroma und Endothel zu diesem Zeitpunkt bereits vollzogen ist [Tabelle 1].

Tabelle 1: Entwicklung des Auges bei der Maus (Gilbert, 2006; Kaufman, 1998).

Entwicklungsschritt	Embryonaler Entwicklungstag (E)
Auswachsen des Augenbläschens	E9
Ausbildung der Linsenplakode	E10
Einsenken des Linsenbläschens	E11 bis E12
Abschnürung des Linsenbläschens	E13
Auswachsen der Linsenfasern	E14
Ablösen der Linse von der Kornea	E15

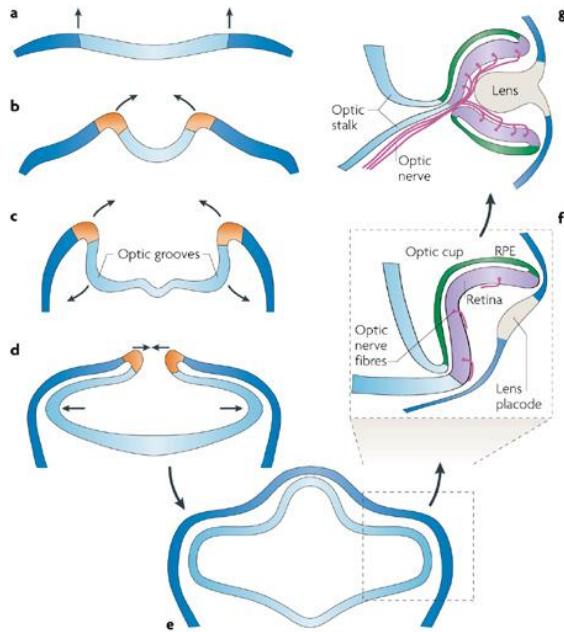


Abb. 4: Stadien der Augenentwicklung (Lamb *et al.*, 2007).

Die Fähigkeit, diese Strukturen nach einer Verletzung nachzubilden geht beim adulten Auge verloren. Eine größere Verletzung der Kornea hat daher in der Regel ein Einsprossen von Gefäßen sowie eine narbige Ausheilung zur Folge, wonach das Sehvermögen durch Trübung beeinträchtigt ist. In ausgeprägten Fällen kann dies zur Erblindung führen und eine Hornhauttransplantation erforderlich machen. Diese Narbenbildung der Kornea wird wesentlich durch den Wachstumsfaktor Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF- β 1) beeinflusst (Fini *et al.*, 2005). Darüber hinaus ist der TGF- β Signalweg bei der Augenentwicklung beteiligt. So ist bei Mäusen, die defizient für TGF- β 2 sind, im vorderen Augenabschnitt nur eine verdünnte Hornhaut angelegt (Sanford *et al.*, 1997). Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von TGF- β 1 in der Linse transgener Mäuse die Entwicklung des vorderen Augenabschnitts maßgeblich stört und zu erheblichen strukturellen Veränderungen der Kornea führt (Flügel-Koch *et al.*, 2002). Mit Hilfe dieses Mausstamms sollte in der vorliegenden Arbeit die verstärkte Wirkung von TGF- β 1 auf die Genexpression in der Kornea transgener Mäuse untersucht werden. Dazu wurde die RNA aus Korneazellen transgener Mäuse und Wildtyp-Mäusen isoliert und mittels cDNA Microarray semiquantitativ miteinander verglichen. Ziel der Untersuchung war es, Erkenntnisse über die Auswirkungen regulatorischer Einflüsse des Wachstumsfaktors TGF- β 1 auf die Kornea zu gewinnen, um zum Verständnis der Signalvorgänge während der Wundheilung der Kornea beizutragen.

TGF- β 1 Überexpression in den Augen transgener Mäuse

Arbeitsgrundlage war ein transgenes Mausmodell, in dem große Mengen des Wachstumsfaktors TGF- β 1 in der Linse gebildet werden. Dies wurde dadurch erreicht, dass ein Transgen, welches die TGF- β 1 cDNA vom Schwein enthält, in Pronuclei von FVB/N Mäusen injiziert wurde. Die Expression des Transgens wird durch einen Promotor reguliert, der die Expression des Transgens hochspezifisch in der Linse vorantreibt, der β B1-Crystallin Promotor vom Huhn (Duncan et al., 1995, 1996). Dadurch wird gewährleistet, dass das TGF- β 1 Transkript spezifisch und sehr stark in der Linse der Maus exprimiert wird (Flügel-Koch et al., 2002). Thymidinkinase (TK) PolyA-Sequenzen sorgen für eine Adenylierung des Signals und somit für die regelrechte Synthese von mRNA [Abb. 5].

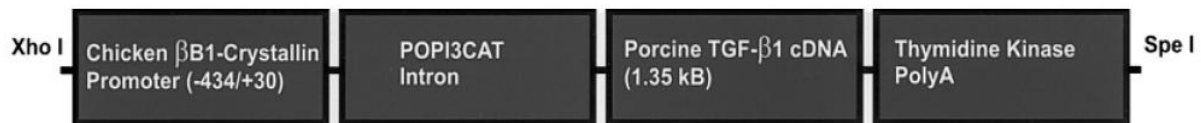


Abb. 5: Schemazeichnung des Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF- β 1) Transgens. Die TGF- β 1 cDNA kodiert für ein 1,35-kb Transkript. Der Chicken β B1-Crystallin Promotor (-434/+30) sorgt für linsenspezifische Expression bei transgenen Tieren. Ein Intron des Plasmids pOP13CAT wurde zwischen den Promotor und die TGF- β 1 cDNA eingebracht und Thymidinkinase polyA-Sequenzen sorgten für die Polyadenylierungssignale. Das Transgen wurde durch XhoI- und SpeI-Verdau freigesetzt und in *Pronuclei* von FVB/N Mäusen injiziert. (Flügel-Koch et al., 2002).

TGF- β 1 ist Mitglied einer Familie von Wachstumsfaktoren, der Transforming Growth Factor Beta-Familie, die sich bei Säugern aus 3 Isoformen (TGF- β 1-3) zusammensetzt (Massague, 1990; Rotzer, 2001). Es handelt sich dabei um Zytokine, die eine Vielzahl von unterschiedlichen Aktivitäten im Organismus haben, je nachdem auf welchen Zelltyp sie wirken und welche Umgebungsbedingungen dort herrschen. TGF- β moduliert dabei Proliferation, Apoptose, Aktivierung und Differenzierung der entsprechenden Zielzellen. Zu den wichtigsten Eigenschaften zählen die chemotaktische Wirkung auf Fibroblasten, Makrophagen und Neutrophile, die Stimulierung der extrazellulären Matrixsynthese durch Fibroblasten, sowie die Angiogenese und der Einfluss auf Zellen des Immunsystems (Massague, 1990). Aufgrund seines Aktivitätsspektrums kommt TGF- β eine herausragende Rolle bei Entzündungsreaktionen und der Regeneration von Wunden zu und spielt schon in der Entwicklung von Geweben eine wesentliche Rolle. So hat TGF- β auch proliferative Effekte auf Zellen mesenchymaler Herkunft, wie Fibroblasten (Dijke et al., 2006) und Korneaepithelzellen (Nishimura T., 1998), insbesondere auch während der Wundheilung an der Kornea (Chen et al., 2000; Cui Chen et al., ; Funderburgh et al., 2001; Shah et al., 1995; Wu et al., 2006).

Dabei wird TGF- β typischerweise in einer biologisch inaktiven Form als sogenanntes ‚latentes TGF- β ‘ (L-TGF) sezerniert, das erst später durch komplexe proteolytische Prozesse aktiviert wird (Derynck, 1994).

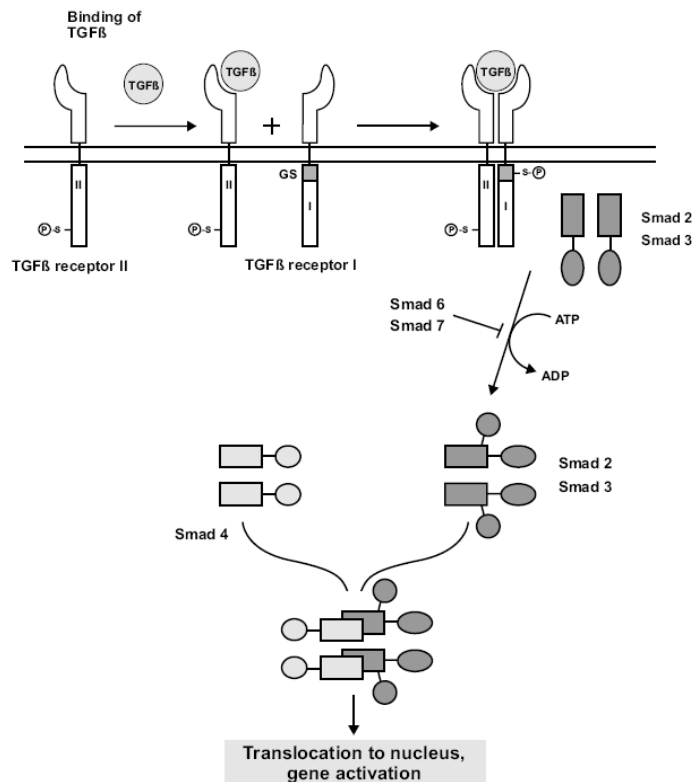


Abb. 6: Signaltransduktionsweg von TGF- β 1 über den membranständigen TGF- β Rezeptorkomplex und Smad Proteine (Heldin *et al.*, 1997).

Die Rezeptoren der TGF- β Familie sind transmembrane Glykoproteine vom Typ der Serin/Threonin-Kinasen. Auf der Zelloberfläche bindet TGF- β an den TGF- β Rezeptor Typ II (T β RII). Nach der Bindung des Liganden werden zwei T β RII Rezeptoren und zwei TGF- β Typ I Rezeptoren (T β RI/Alk5) zusammengeführt, wobei sie einen heterotetrameren Komplex bilden. Die Alk5-Kinase wird durch den T β RII Rezeptor phosphoryliert, worauf sie die intrazellulären Signalmoleküle Smad2 und 3 (für *mothers against DPP homolog proteins*) phosphoryliert und aktiviert. Zusammen mit dem Co-Mediator Smad4 transloziert dieser aktivierte Komplex in den Zellkern, wo er mit Hilfe von Co-Aktivatoren und Co-Repressoren die Genexpression steuert (Massagué, 1998; Schmierer *et al.*, 2007) [Abb. 6]. Überdies konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Alk5 auch andere Wege der Signaltransduktion in Gang setzt, wie den *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Signalweg, den *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) Signalweg, den *c-Jun NH2-*

terminal kinase (JNK) Signalweg oder den *p38* Signalweg (Dijke *et al.*, 2006; Krauss, 2003; Moustakas *et al.*, 2009).

Bei den in unseren Untersuchungen verwendeten genetisch veränderten Mäusen kodiert die transgene TGF- β 1 cDNA ein 1.35-kb großes Transkript, welches in der Pro-Region von TGF- β 1 mutiert wurde, um Serin anstelle von Cystein an den Aminosäurepositionen 223 und 225 zu kodieren. Dadurch wird sichergestellt, dass TGF- β 1 als bioaktives Protein sezerniert wird (Brunner *et al.*, 1989). Der vorgeschaltete β B1-Crystallin Promotor erhöht die Genexpression ab dem 12. embryonalen Entwicklungstag (E12.5) (Duncan *et al.*, 1996; Duncan MK, 1995), wodurch sich konsekutiv die Menge an TGF- β 1 mRNA erhöht. In früheren Arbeiten wurden mit Hilfe von Northern Blot Hybridisierungen die Zellen der Linse transgener Tiere hinsichtlich ihrer TGF- β 1 mRNA Expression untersucht. Es zeigte sich dabei die höchste Intensität für transgene TGF- β 1 mRNA am Tag der Geburt (P0). Dagegen konnte am 10. Lebenstag (P10) nur wenig Signal in den Linsen detektiert werden und ab P28 schließlich keinerlei Signal mehr (Flügel-Koch *et al.*, 2002).

Frühere Untersuchungen zeigten, dass die übermäßige Synthese von aktivem TGF- β 1 im Auge von β B1-Crystallin-TGF- β 1 Mäusen im sich entwickelnden Mesenchym der Kornea eine geordnete Entwicklung der Kornea, und dadurch auch der vorderen Kammer des Auges und der Linse verhindert (Flügel-Koch *et al.*, 2002). Dies lässt sich am Phänotyp der Augen transgener Tiere beobachten. Ab E13.5 zeigt sich eine vermehrte Ansammlung proliferierender mesenchymaler Korneazellen, die die Dicke der Kornea, verglichen mit der von Wildtyp-Mäusen, fast verdreifacht [Abb. 7]. In der nächsten Phase (E14.5 bis E17.5) werden die Zellen im späteren Zentrum der Kornea apoptotisch und es erfolgt eine Vaskularisierung des normalerweise gefäßfreien Mesenchyms. Die Differenzierung der Korneazellen in Keratozyten und innere Epithelzellen ist bei transgenen Tieren stark gestört. Normalerweise findet sich eine dünne, eindeutig differenzierte Schicht von Korneaendothelzellen, die als innerste Zellschicht die hintere Grenze der Kornea zur vorderen Augenkammer darstellt. Bei β B1-Crystallin-TGF- β 1 Mäusen bildet sich jedoch weder das Hornhautendothel, noch die Vorderkammer des Auges aus. Vielmehr stehen undifferenzierten Zellen der Kornea in direktem Kontakt zum vorderen Linsenpol.

Auch die Reifung und Organisation der Keratozyten geschieht nicht wie bei den Augen normaler Tiere. So bekommen die Stromazellen nicht ihre für Keratozyten typische längliche

Form mit regelmäßiger Ausrichtung, sondern stellen sich ungeordnet mit sternförmigem Aussehen dar [Abb. 8].

Ebenso unvollständig ist die Entwicklung des Korneaepithels an der Vorderseite des Auges. Korneaepithelzellen bedecken nur zentrale Bereiche der Kornea, wohingegen die äußeren Bereiche keinen Kontakt mehr zum Epithel haben (Flügel-Koch *et al.*, 2002).

Die Kornea der transgenen Tiere erlangt so niemals die für dieses Organ wichtige Transparenz, sondern bleibt trüb und undurchsichtig. So sind die kollagenen Fasern bei TGF- β 1 transgenen Tieren ungeordnet zwischen den undifferenzierten Stromazellen ausgerichtet und weisen nicht die typische, regelrechte Lamellenstruktur auf (Flügel-Koch *et al.*, 2002).

Es wird gemeinhin angenommen, dass der Aufbau der extrazellulären Matrix für die Durchsichtigkeit der Kornea eine wesentliche Rolle spielt, zum einen durch die Fähigkeit zur Bindung der optimalen Wassermenge, zum anderen durch die orthogonale Anordnung der kollagenen Fasern (Benedek, 1971; Maurice, 1957; Pirenne, 1967). Immunhistochemische Untersuchungen der extrazellulären Matrix in der Kornea von β B1-Crystallin-TGF- β 1 Mäusen konnten zeigen, dass Fibronektin und Perlecan –beides Proteine, die in der Hornhaut des adulten Auge nur in geringen Mengen vorhanden sind- um ein vielfaches mehr exprimiert waren als in Kontrolltieren. Kollagen Typ VI jedoch, das im differenzierten Korneagewebe stets intensiv nachweisbar ist, war bei transgenen Tieren deutlich geringer ausgeprägt.

Auch am Korneaendothel ließen sich Strukturdefekte nachweisen. So waren die Endothelzellen transgener Mäuse nicht wie gewöhnlich durch ein Schlussleistennetz miteinander verbunden, sondern lagen voneinander getrennt und von kollagenen Fasern umgeben im Gewebe.

Insgesamt wird offenbar, durch die okuläre Überexpression von TGF- β 1 im Auge von transgenen β B1-Crystallin-TGF- β 1 Mäusen, die Differenzierung einer transparenten Kornea verhindert, die stattdessen die Charakteristika eines normalen Bindegewebes erhält. Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, dieses Modell zu nutzen, um mit Hilfe einer vergleichenden Microarray-Analyse eine umfangreiche Liste von Genen zu identifizieren, die differentiell in normalen, transparenten Hornhäuten oder in transgenen Hornhäuten exprimiert werden, um so unseren Kenntnisstand zu den Genen, die essentiell sind für die Ausbildung einer transparenten Kornea, zu erweitern.

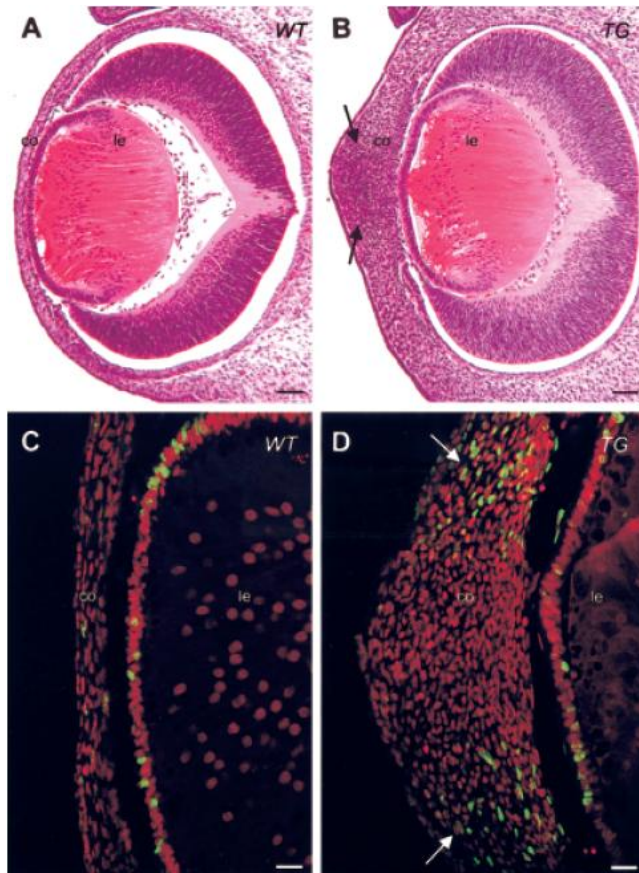


Abb. 7: Lichtmikroskopische Bilder der Augen von Wildtyp-Mäusen (WT, **A**) und transgenen Mäusen (TG, **B**) im Stadium E13.5. Die zukünftige Kornea transgener Mäuse (**B**) enthält zahlreiche Korneamesenchymzellen (Pfeile) und ist mehr als dreimal so dick als die des wildtypen Vergleichs (**A**). Transgene Tiere entwickeln keinen Glaskörperraum hinter der Linse. **C, D**: Immunhistochemische Färbung mit Bromodeoxyuridine (BrdU) 1 h nach intraperitonealer Injektion. Die *Nuclei* sind rot dargestellt, BrdU Immunoreaktivität ist grün dargestellt. Zahlreiche Zellen in der Peripherie der zukünftigen Kornea der transgenen Mäuse (**D**) sind grün dargestellt; sie zeigen die S-Phase der Mitose (Pfeile). Bei wildtyp Tieren (**C**) sind nur sehr wenige Zellen in der Kornea mit BrdU gefärbt, wohingegen einige Linsenepithelzellen hier deutliche Immunoreaktivität für BrdU zeigen. co, Kornea; le, Linse. Maßstab 45 μ m in A, B; 17 μ m in C, D. (Flügel-Koch *et al.*, 2002).

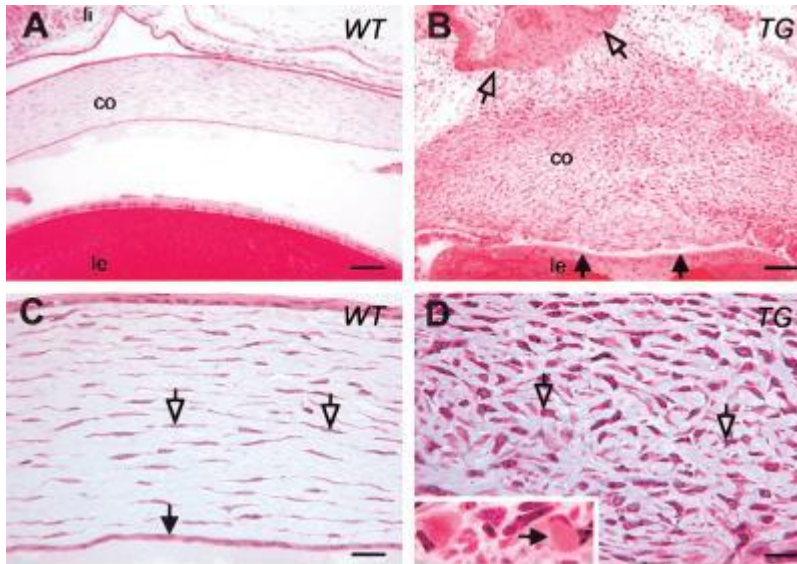


Abb. 8: Lichtmikroskopie von Wildtyp-Mäusen (WT, A,C) und $\beta B1$ -TGF $\beta 1$ -transgenen Mäusen (TG, B, D) an E 17.5

A: Die Kornea von Kontrolltieren ist differenziert in Epithel, Stroma und Endothel.

B: Bei transgenen Augen ist die Kornea dicker und enthält mehr Zellen als in der Kontrolle. Eine klare Differenzierung ist nicht erkennbar.

C: Bei normalen Augen sind die Zellen des avaskulären Stromas flach (offene Pfeile) und das Stroma ist von der vorderen Augenkammer durch das Endothel getrennt (gefüllte Pfeile).

D: Bei transgenen Tieren behalten die Stromazellen eine mesenchymale, sternartige Konfiguration (offene Pfeile). Das Stroma ist vaskularisiert (Vergrößerung, Pfeil).

Maßstab in A, B 50 μm , in C, D 18 μm (für Bildausschnitt in D 10 μm). (Flügel-Koch *et al.*, 2002)

MATERIAL UND METHODEN

Probengewinnung

Die in den Versuchen verwendeten Tiere wurden alle in demselben Raum unter standardisierten Bedingungen (Temperatur $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, relative Luftfeuchtigkeit $5\% \pm 5\%$, Futter *ad libitum*) bei einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Zur Züchtung wurde immer eine transgene $\beta\text{B1-TGF-}\beta\text{1}$ Maus (Flügel-Koch *et al.*, 2002) mit einer Wildtyp-Maus vom Stamm FVB/N miteinander verpaart. Die Tiere warfen in der Regel nach 21 Tagen. Die Hornhäute der transgenen Mäuse und der Kontrollmäuse wurden am Tag der Geburt (P0) nach schonender ENUkulation der Augen präpariert.

Um eine Ergebnisverfälschung durch den Verdau von RNA durch ubiquitär vorkommende RNAsen zu minimieren, wurde großer Wert auf schnelles und sauberes Arbeiten, häufigen Handschuhwechsel sowie zügige Inaktivierung der RNAsen gelegt.

Die Präparation der Mäuseaugen erfolgte unter dem Mikroskop bei 30-35facher Vergrößerung mit mikrochirurgischem Instrumentarium (Mikropinzette, Typ Uhrmacher, gerade, spitz und Mikroschere, 12 cm gebogen, spitz) auf einer dunklen Unterlage. Direkt nach der Präparation wurden die Korneaprobe(n) einzeln in Eppendorfcups in flüssigem Stickstoff schockgefroren (Kälteinaktivierung) und nach Präparation aller Tiere mit 1 ml Trizol (Invitrogen, Karlsruhe) versetzt. Trizol enthält Phenol und Guanidin-Isothiocyanat und deaktiviert vorhandene RNAsen zusätzlich durch chemische Enzyminaktivierung und schützt damit die RNA in den Zellen.

Genotypisierung

Transgene $\beta\text{B1-Crystallin-TGF-}\beta\text{1}$ - Mäuse wurden durch DNA Untersuchungen identifiziert. Dazu wurde DNA aus Schwanzbiopsien isoliert und mittels Polymerase Chain Reaction (PCR) transgene Sequenzen nachgewiesen. Für die DNA Isolation wurde ein ca. 5 mm langes Schwanzstück mit 5 μl Proteinase K (20 mg/ml) zum Proteinverdau in 200 μl Lysispuffer über Nacht bei 55°C im Wasserbad oder im Thermomixer inkubiert. (Lysispuffer: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 2 mM MgCl_2 , 0,1 mg/ml Gelatine, 0,45% Nonidet P-40, 0,45 % Tween 20). Danach wurden die Proben 10 Min. bei 95°C inkubiert um die Proteinase K vor der PCR zu inaktivieren. Im Anschluss wurden die Proben 10 Min. lang bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der DNA Gehalt des Lysats photometrisch vermessen. Aus dem Lysat wurde 1 μl zur PCR eingesetzt, was nach photometrischer Messung 1-10 ng DNA entsprach. Für die Genotypisierung der transgenen

Tiere wurden Primer verwendet, die eine Sequenz zwischen Promotor und einem Intron des Transgens amplifizieren. Die Sequenz des linken Primers war 5'-ACACTGATGAGCTGGCACTTCCATT-3', die des rechten Primers 5'TGTTGGCTACTTGTCTCACCATTGTA-3'. Als Produkt wurde ein 506 Basenpaare (bp) langes DNA-Fragment amplifiziert und durch Agarosegel-Elektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht. Das Temperaturprofil des PCR Zyklus lautete wie folgt: Denaturierung bei 94°C für 45 Sek., Annealing bei 50°C für 45 Sek. und Amplifikation bei 72°C für 45 Sek. in 35 Zyklen.

Isolieren von RNA

Die sich in Trizol befindlichen Präparate wurden entweder bei -20°C gelagert oder sofort weiterverarbeitet. Um RNA aus den Korneazellen zu isolieren, ist es notwendig, die Gewebeproben zu homogenisieren. Dazu wurden die Proben mit einem Gewebeshredder für Eppendorfcups bearbeitet. Der Gewebeshredder wurde nach jeder Homogenisierung mit gereinigtem Wasser und reinem Trizol gespült. Nach der Homogenisierung der Zellen wurde die RNA nach leicht abgewandelten Angaben des Herstellers isoliert (Trizol, Invitrogen). Im Einzelnen wurden folgende Schritte durchgeführt: Separieren des Lysats in 2 Phasen durch Zugabe von 0,2 ml Chloroform und 15 Sek. kräftiges Schütteln. 2 Min. bei Raumtemperatur inkubieren und anschließend 15 Min. bei 1200 g zentrifugieren. Die RNA ist danach in der oberen, wässrigen Phase gelöst, welche in ein neues Reagenzgefäß überführt wird. Durch Zugabe von 0,5 ml Isopropylalkohol kommt es zum Ausfällen der RNA. Das Material wurde bei -20°C über Nacht gelagert. Nach der Ausfällung wurde die RNA bei 1200 g abzentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das RNA Pellet wurde danach zweimal mit 1ml 75 % (v/v) Ethanol gewaschen und bei 7500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das RNA Pellet unter dem Abzug luftgetrocknet. Zum Schluss wurde das RNA-Pellet in 20 µl RNase-freiem Wasser gelöst und 1 µl der Lösung in 49 µl Wasser am Photometer (Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland) vermessen (1:50 v/v). Zum einen wird dabei der Gehalt an RNA in Nanogramm (ng) bestimmt, zum anderen eine 260/280 Absorptionsmessung durchgeführt. Akzeptable $A_{260/280}$ Messungen fallen in den Bereich zwischen 1,8 und 2,1. Werte unter 1,8 deuten dabei auf eine mögliche Kontamination mit Proteinen hin. Werte oberhalb von 2,1 lassen hingegen auf ein Degradieren der RNA oder die Präsenz freier Nukleotide schließen.

Prüfung der Integrität von RNA

Die Integrität der RNA wurde durch Gelelektrophorese auf 1%igem Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen mit 6 % Formaldehyd und anschließender Färbung mit Ethidiumbromid oder durch Blotten auf eine positiv geladene Nylon Membran (Roche) überprüft. Dabei wurden bei erhaltener Integrität zwei dominante, ribosomale RNA Banden sichtbar: Eine bei ~5 Kilobasen (kb), die der 28S Untereinheit entspricht, eine bei ~2 kb, die der 18S Untereinheit entspricht. Bevor die Proben in den Microarray Versuchen verwendet wurden, erfolgte eine erneute Integritätsprüfung durch Fluoreszenzmessung mittels Bioanalytiker. Dabei werden bei bestehender Integrität der gesamten RNA zwei Peaks entsprechend der 18S und 28S Untereinheit, nach bestimmten Laufzeiten, registriert. Schmale Peaks auf einer regelmäßigen niedrigen Nulllinie bedeuten gut erhaltene, nicht degradierte RNA (Affymetrix, 2002-2004) [Abb. 9].

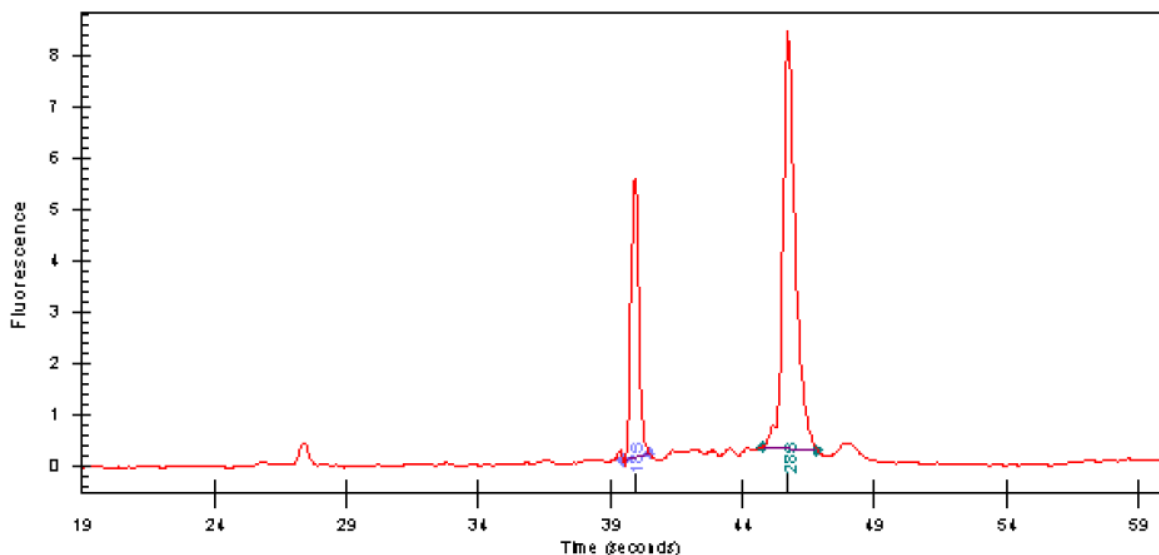


Abb. 9: Fluoreszenzmessung nicht degradierteter RNA: es zeigen sich zwei steile Peaks nach 40 Sek. (18S Untereinheit) und 46 Sek. (28S Untereinheit) (Affymetrix, 2002-2004).

Anfertigung von Semidünnschnitten

Für die Anfertigung von Semidünnschnitten wurden Hornhäute direkt nach Präparation in einer modifizierten Fixierung nach Ito und Karnovsky (2,5 % Paraformaldehyd, 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer) für mindestens 12 h immersionsfixiert und in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,4) mehrfach für mehrere Stunden gespült. Die Hornhäute wurden in 1 % Osmiumferrocyanid nachfixiert, das Osmium mit Aqua bidest ausgewaschen und die Präparate danach in aufsteigender Alkoholreihe (Ethanol 70 %, 80 %, 90 %, 100 %)

entwässert. Die Einbettung in Epon (Araldite 502, Ted Pella, Redding, USA) erfolgte mit Hilfe eines Einbettautomaten (EM-TP, Leica, Nussloch, Deutschland) über Propylenoxid nach Standardmethoden: Propylenoxid/Epon 2:1; Propylenoxid/Epon 1:1; Propylenoxid/Epon 1:2; 100 % Epon; Aushärten im Brutschrank 24 h bei 60°C.

Die Stammlösung A der Eponlösung bestand aus 62 ml Glycidether 100, gemischt mit 89 ml MNA (Serva, Heidelberg, Deutschland). Für die Einbettung wurden diese Stammlösungen (Verhältnis 1:1) mit 2 % Beschleuniger DMP-30 verwendet. Mit einem Ultramikrotom (Reichert) wurden von den Hornhäuten Semidünnschnitte (Dicke 1 µm) in der Mittsagittalebene angefertigt. Die Semidünnschnitte wurden anschließend nach Richardson gefärbt. Die gefärbten Schnitte wurden mit einem Lichtmikroskop (Zeiss, Göttingen) betrachtet und fotografiert.

cDNA Microarray Analysen

In diesem Versuchsaufbau wurden für die Genexpressionsanalyse Single-Channel cDNA Microarrays (Affymetrix 430 2.0 Mouse Arrays) benutzt. Dabei handelt es sich um Oligonukleotidarrays mit einer Sondenlänge von 25bp, die bekannte Gene oder Splicevarianten dieser Gene aus dem kompletten Mausgenom repräsentieren. Insgesamt sind 45 000 Sonden auf einem Genchip untergebracht (Affymetrix, 2004). Bei Single-Channel Arrays wird nur eine Ziel-cDNA pro Chip hybridisiert, d. h. ein Chip für ein Sample. Dies verringert das Risiko, das durch einzelne Ausreißer das Ergebnis der anderen Proben verfälscht wird. Die isolierte RNA wurde bei -80°C gekühlt und zur Expressionsanalyse an das *National Eye Institute* (NEI, National Institutes of Health, Bethesda MD) gesandt. Dabei kamen nur Proben zur Anwendung, die bei der RNA-Integritätsanalyse $A_{260/280}$ Absorptionswerte zwischen 1,8 und 2,1 aufwiesen [Tabelle 2]. Es wurde zunächst die gesamte RNA aus dem Korneagewebe transgener und wildtypischer Artgenossen isoliert. Danach muss die mRNA-Komponente der gesamten isolierten RNA durch reverse Transkription in stabile coding-Desoxyribonucleinsäure (cDNA) umgeschrieben werden. Diese wird zur späteren Visualisierung mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert und zur Hybridisierung auf den Genchip aufgetragen. Vier Chips mit Wildtyp-cDNA wurden mit vier Chips transgener cDNA verglichen und ausgewertet. Um Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Arrays zu erreichen, wurde mit der Affymetrix Gene Chip Operating Software (GCOS) Version 1.4 die Signalintensität der einzelnen Versuche auf einen gemeinsamen Gesamtwert von 150 skaliert. Statistische Analysen wurden mit der Agilent GeneSpring

Software durchgeführt und Scatter Plots zur Visualisierung der Ergebnisse angefertigt [Abb. 11, Abb. 12; Tabelle 3].

ERGEBNISSE

Optimierung der Methode

Ein wesentlicher Bestandteil der Arbeit war es, die Methode zur molekularbiologischen Untersuchung in diesem speziellen Versuchsaufbau zu etablieren. Dabei war es besonders wichtig, die Gewinnung von RNA aus der Kornea quantitativ und qualitativ zu optimieren. Beginnend von der Verpaarung der Tiere und Präparation der Gewebe zur Probengewinnung bis hin zu den RNA Isolationsprotokollen, konnten die Arbeitsschritte optimiert werden.

Bei der Zucht der Tiere erwies es sich als günstig, ein weibliches, transgenes Tier mit einem Wildtyp-Männchen zu verpaaren. Die Präparation erfolgte an P0, da zu diesem Zeitpunkt TGF- β 1 in hohem Maße exprimiert wird und bereits deutliche Veränderungen in der Kornea der transgenen Tiere beschrieben wurden (Flügel-Koch *et al.*, 2002). Bei der Präparation konnten die besten Ergebnisse mit mikrochirurgischem Operationsbesteck erzielt werden.

Beim Isolieren der RNA ist nach Zugabe von Chloroform darauf zu achten, ausschließlich aus der klaren, oberen Schicht zu pipettieren, um Kontamination mit Proteinrückständen zu vermeiden. Nach dem Ausfällen der RNA durch Zugabe von Isopropylalkohol sollte das Material bei -20°C über Nacht gelagert werden, da sich hierdurch quantitativ bessere Ergebnisse erzielen ließen [Tabelle 2]. Prinzipiell kommt für das Arbeiten mit cDNA Microarrays auch eine RNA Isolierung mit Kit-Systemen in Frage (z.B. RNEasy Mini Kit, Quiagen GmbH). Bei einer Isolation mit Trizol konnte in diesem Fall jedoch eine größere Menge an isolierter RNA gemessen werden. Da in diesem Versuchsaufbau die Masse des Probengewebes sehr gering war, sollten Materialverluste so gering wie möglich gehalten werden. Daher entschieden wir uns für ein Arbeiten mit Trizol. Die Verfahren mit Säulchensystemen erwiesen sich als zu verlustreich.

Tabelle 2: RNA Samples, deren cDNA zur Analyse auf Affymetrix cDNA Microarrays zur Anwendung kam (TG: Transgen, WT: Wildtyp).

Probennummer	RNA-Konzentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Quotient 260/280	Genotyp	Masse (μg)
12	0,4081	1,98	TG	6,1215
16	0,3516	2,03	WT	5,2740
24	0,6693	2,03	TG	10,0395
25	0,6603	2,01	WT	9,9045
29	0,3386	1,89	WT	5,0790
47	0,2043	1,81	TG	4,6989
51	0,2069	1,76	TG	4,7587
54	0,3067	1,78	TG	7,0541

Lichtmikroskopie

Um die Exaktheit der Präparation und eventuell damit verbundene Verfälschungen der Ergebnisse durch Kontamination mit an die Kornea angrenzenden Strukturen zu untersuchen, wurden histologische Schnitte transgener Präparate und der Kontrollen angefertigt. In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung können die Präparate aufgrund des hohen Kollagenanteils in der Kornea besonders gut beurteilt werden, weswegen zunächst nach HE gefärbt wurde. Diese Methode brachte jedoch in der Umsetzung Schwierigkeiten mit sich: Die flexiblen Korneapräparate behielten während der Einbettung nicht die gewünschte sphärische Form bei, sondern falteten sich im Paraffinblock zusammen. Dadurch wurden die Schnitte unübersichtlich und somit ungeeignet für eine Beurteilung der Präparationsgrenzen.

In Semidünnschnittpräparaten waren die Präparate besser zu beurteilen [Abb. 10]. Die Schichtung der Kornea in Epithel, Stroma und Endothel war gut zu erkennen und die Orientierung gut möglich. Es zeigte sich, dass die Präparation der Korneas im wesentlichen gelungen war, und an den Präparationsrändern nur sehr geringe Reste angrenzender Strukturen, hauptsächlich quergestreifter Muskulatur, vorhanden waren.

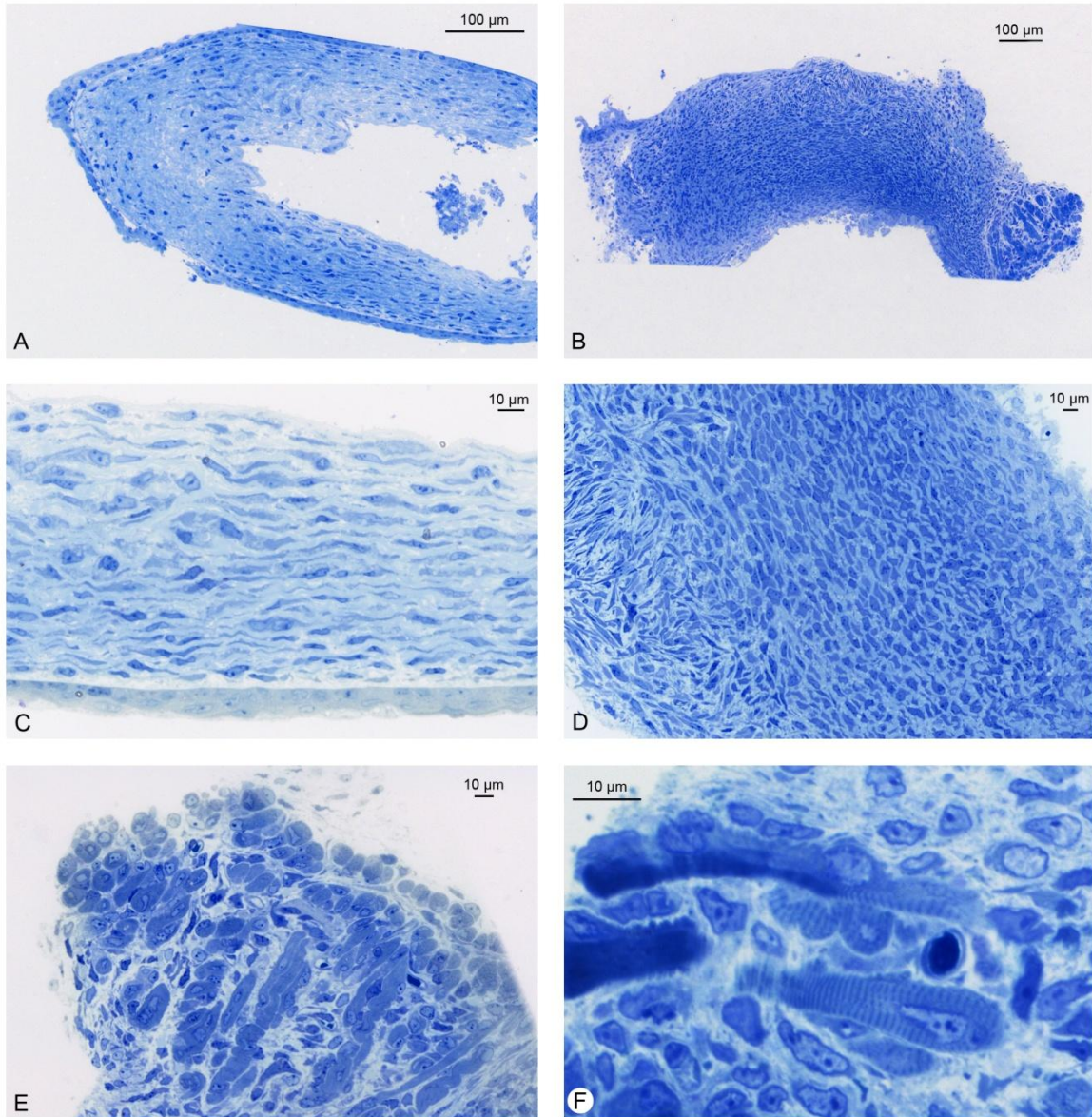


Abb. 10: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Semidünnschnitten durch Wildtyp- (WT; A, C) und TGF- β 1-transgene (TG; B, D, E, F) Kornea.

WT: Die regulären Schichten einer differenzierten Kornea sind gut erkennbar (A, C).

TG: Eine regelmäßige Schichtung ist nicht erkennbar; in allen Schichten zeigt sich entdifferenziertes Korneagewebe mit irregulärer Anordnung und Form der Mesenchymzellen (B, D). Im Randbereich der Kornea ist quergestreifte Muskulatur angeschnitten (E, F).

cDNA Microarray Analyse

Die cDNA Microarraytechnik macht sich, ähnlich wie beim Southern- oder Northern-Blotting, das Prinzip der DNA-DNA oder DNA-RNA Hybridisierung zu Nutze: Auf einer festen Oberfläche (inerte Matrix) sind bekannte Gensequenzen in definierter Anordnung kovalent auf engstem Raum gebunden. Diese Gensequenzen repräsentieren in der Regel weite Bereiche des gesamten bekannten Genoms einer Spezies. Diese DNA Spots oder Oligonukleotidsequenzen auf der Matrix werden als *Probe Sets* oder Sonden bezeichnet und

stellen die Bindungsstellen für die Ziel DNA (mit Fluoreszenzfarbstoff markierte cDNA) dar, die aus den Gewebeproben isoliert wird. Auf dem vorgefertigten DNA-Chip wird dann die Ziel-DNA mit den Sonden hybridisiert. Hierbei binden die markierten cDNA-Stücke an ihren komplementären Gegenpart auf dem Array. Nach Abwaschen der nicht gebundenen cDNA-Stücke wird das Fluoreszenzsignal jeder Position des DNA-Microarrays mittels eines Lasers ausgelesen. Dabei können nicht nur qualitative Aussagen im Sinne von „Bindung positiv oder negativ“, sondern, durch die Intensität des Signals, auch quantitative Aussagen über das „wie viel wurde gebunden“ getroffen werden. Genau hier liegt der große Vorteil dieser Expressionsanalyse im Vergleich zu dem bekannten Verfahren des Southern-Blotting: Die Expression tausender Gene kann gleichzeitig untersucht werden und ermöglicht durch die gleichzeitige Quantifizierung der Regulation im Vergleich mit einer Kontrolle Rückschlüsse auf die ursächlichen Faktoren. Deshalb ist die Genregulationsanalyse mittels Microarray ein hervorragendes Mittel um die Interaktion einer Einflussgröße auf komplexe Zellsysteme zu verstehen. Bei der Beurteilung des quantitativen Verhältnisses von Probe zu Kontrolle werden in der Regel *Cut off* Werte der Quotienten als Grenzen festgelegt. Diese werden beispielsweise bei mindestens doppelt so hoher Intensität im Vergleich zur Kontrolle oder dreimal so hoher Intensität im Vergleich zur Kontrolle usw. festgelegt.

Im konkreten Fall wurden die Gene herausgefiltert, die, verglichen mit Wildtyp-Mäusen, mehr als das Doppelte oder weniger als die Hälfte an Intensität aufwiesen, d. h. es wurden diejenigen Gene gezeigt, die bei transgenen Tieren mindestens doppelt so stark exprimiert waren oder um mindestens die Hälfte vermindert exprimiert waren (*2-fold change*). Durch diese Regelung sollte erreicht werden, dass kleinere Regulationsabweichungen zunächst nicht berücksichtigt wurden, da in dieser orientierenden Arbeit quantitativ stärkere Regulationen in der Genexpression im Fokus stehen sollen. Die Replikat-Korrelationen der Genproben von Wildtyp-Mäusen und transgenen Tieren ergab zufriedenstellende Werte [Tabelle 3]. Bei insgesamt 263 Genen traten Veränderungen in der Expression um mindestens den Faktor 2 auf. Dabei zeigte sich eine verstärkte Expression in 99 Genen, wohingegen bei 164 Genen eine verminderte Expression auftrat [Tabelle 4, Tabelle 5].

Tabelle 3: Replikat-Korrelation für Wildtyp (WT) und Transgen (TG).

Replikat-Korrelation für WT				Replikat-Korrelation für TG			
Probennummer	25	29	54	Probennummer	24	47	51
16	0,937	0,935	0,891	12	0,946	0,929	0,926
25		0,943	0,904	24		0,913	0,912
29			0,910	47			0,953

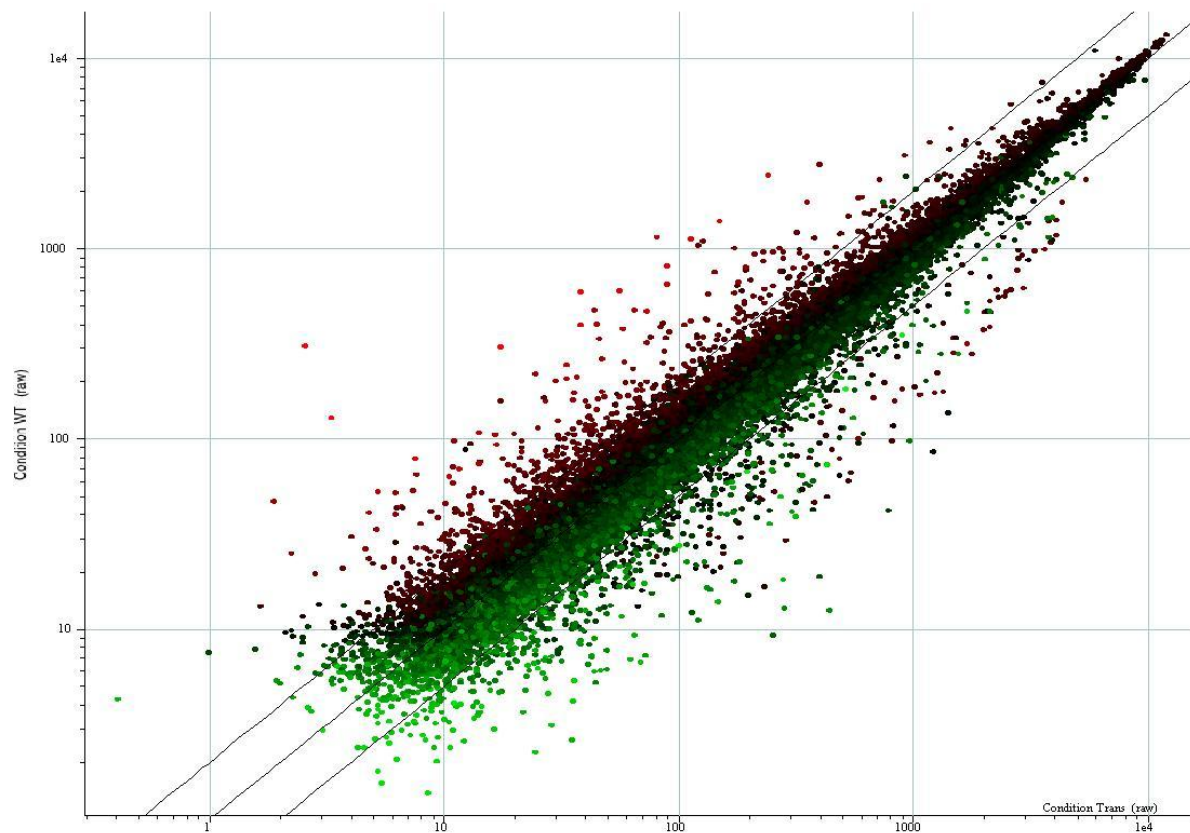


Abb. 11: Scatter Plot WT vs. TG (Gene die in mindestens 2 Samples vorhanden waren).

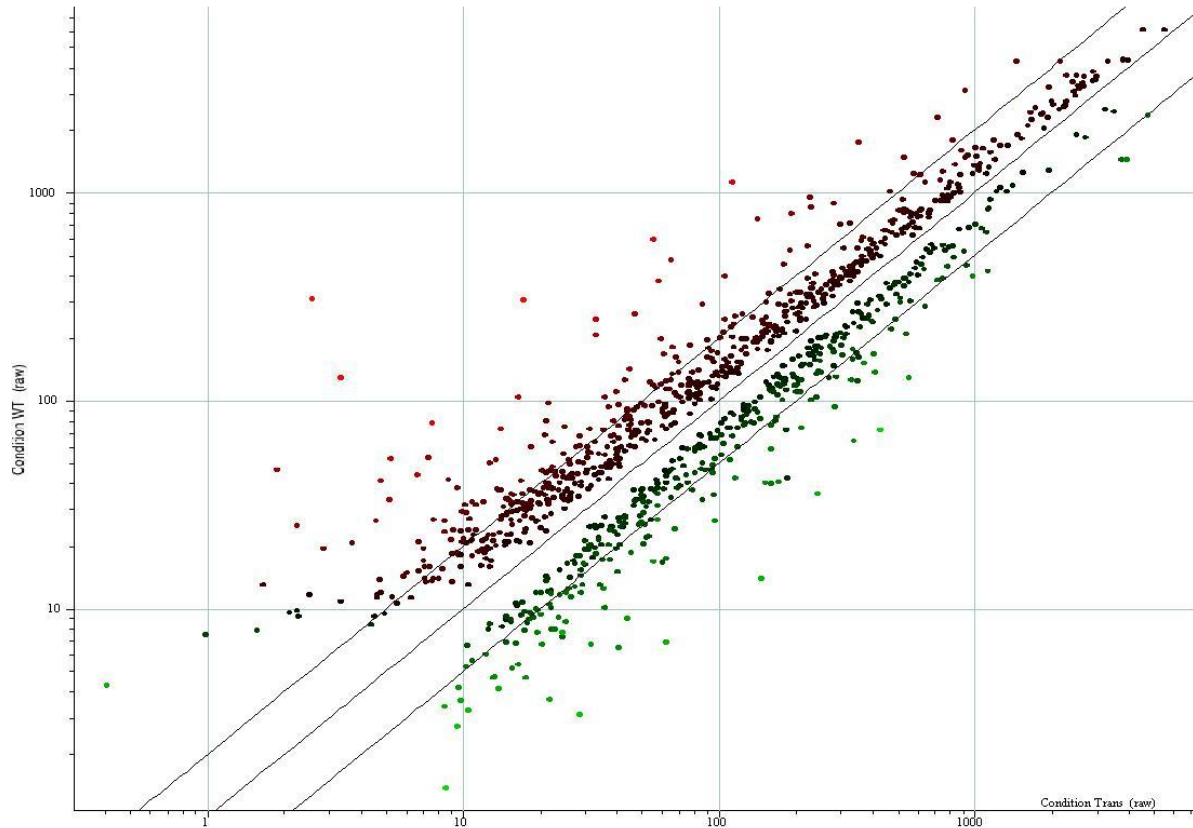


Abb. 12: Scatter Plot WT vs. TG (gefiltert mehr als „2 fold change“).

Verstärkt exprimierte Gene

Tabelle 4: Gene, die in transgenen Tieren verstärkt exprimiert waren.

p-value	Fold Change	present in #	Gen	Gensymbol	Genbank
0,0148	4,202	8	chemokine (C-X-C motif) ligand 14	Cxcl14	AF252873
0,0375	3,544	8	nitric oxide synthase 3 antisense	Nos3as	AW121498
0,0245	2,933	8	gap junction membrane channel protein beta 2	Gjb2	AV239646
0,0203	2,811	8	early growth response 2	Egr2	X06746
0,0309	2,74	8	RIKEN cDNA 9930028C20 gene	9930028C20Rik	BB201861
0,0133	2,656	8	keratin complex 1, acidic, gene 14	Krt1-14	BE197934
0,0216	2,652	8	keratin complex 1, acidic, gene 14	Krt1-14	BC011074
0,0184	2,645	8	Follistatin	Fst	BB444134
0,0142	2,556	8	G protein-coupled receptor 87	Gpr87	NM_032399
0,0402	2,552	8	fatty acid binding protein 5, epidermal	Fabp5	BC002008
0,0323	2,495	8	RIKEN cDNA 4732474O15 gene	4732474O15Rik	BB007136
0,0262	2,437	8	tumor-associated calcium signal transducer 1	Tacstd1	BC005618
0,04	2,404	8	laminin, beta 3	Lamb3	NM_008484
0,0151	2,356	8	laminin, alpha 3 /// similar to Laminin alpha-3 chain precursor (Nicein alpha subunit)	Lama3 /// LOC669814	X84014
0,0196	2,306	8	transmembrane protein 26	Tmem26	BB469903
0,0216	2,273	8	RIKEN cDNA 2310010M24 gene	2310010M24Rik	AK009282
0,045	2,207	8	expressed sequence AI843639	AI843639	AI843639
0,0038	2,184	8	Transcribed locus	---	AW543723
0,0357	2,15	8	microtubule associated serine/threonine kinase 2	Mast2	BB367890
0,0424	2,142	8	carboxypeptidase M	Cpm	AK017670
0,0405	2,113	8	LSM14 homolog A (SCD6, S. cerevisiae)	Lsm14a	BI662680
0,0449	2,108	8	hexokinase 2	Hk2	NM_013820
0,0126	2,076	8	RIKEN cDNA 4632411J06 gene	4632411J06Rik	BB832200
0,0335	2,071	8	kinesin II	Klc3	BC017147
0,0168	2,051	8	tumor-associated calcium signal transducer 1	Tacstd1	AV099587
0,011	2,04	8	nuclear factor, erythroid derived 2, like 3	Nfe2l3	NM_010903
0,0101	2,036	8	uridine-cytidine kinase 2	Uck2	AU018180

0,0243	2,026	8	major facilitator superfamily domain containing 2	Mfsd2	AK006096
0,0169	2,016	8	vacuolar protein sorting 54 (yeast)	Vps54	BB201271
0,0306	2,003	8	asparagine synthetase	Asns	AV212753
0,0472	2,001	8	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	Acs14	AB033886
0,0204	3,592	7	solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 3	Slc28a3	NM_022317
0,0263	3,471	7	transmembrane protease, serine 11f	Tmprss11f	BB149675
0,0255	3,021	7	gap junction membrane channel protein beta 3	Gjb3	NM_008126
0,0383	2,822	7	LIM motif-containing protein kinase 2	Limk2	AI604383
0,00378	2,549	7	Matrin 3	Matr3	BI249188
0,00193	2,392	7	zinc finger, AN1-type domain 3	Zfand3	BB076798
0,0286	2,251	7	expressed sequence C79267	C79267	BG066466
0,0134	2,105	7	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 6	Ddx6	BQ034009
0,0275	2,097	7	pleckstrin 2	Plek2	NM_013738
0,0107	2,05	7	forkhead box N2	Foxn2	AV295543
0,0453	2,02	7	Protein kinase C, beta 1	Prkcb1	BB160675
0,0302	5,783	6	keratin complex 1, acidic, gene 16	Krt1-16	NM_008470
0,0467	3,676	6	gap junction membrane channel protein beta 4	Gjb4	NM_008127
0,022	3,266	6	calcitonin-related polypeptide, beta	Calcb	NM_054084
0,0328	2,782	6	---	---	BB009155
0,0352	2,652	6	OTU domain containing 7	Otd7	NM_130880
0,0319	2,617	6	Cadherin 1	Cdh1	AU042807
0,00267	2,208	6	coiled-coil domain containing 45	Ccdc45	BQ173899
0,0255	2,08	6	endothelin 1	Edn1	D43775
0,038	2,072	6	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12B	Ppp1r12b	BG075390
0,0241	6,714	5	acid phosphatase, prostate	Acpp	AI324033
0,0423	4,588	5	solute carrier family 15 (oligopeptide transporter), member 1	Slc15a1	NM_053079
0,0379	4,139	5	syndecan binding protein (syntenin) 2	Sdcbp2	BC005556
0,0302	3,242	5	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 1	Slc5a1	AV371434
0,0128	2,733	5	dual specificity phosphatase 9	Dusp9	AV295798
0,00535	2,697	5	stratifin	Sfn	NM_018754
0,0194	2,319	5	---	---	AK018213
0,041	2,011	5	nuclear factor I/A	Nfia	D90176
0,0432	2,008	5	RIKEN cDNA 1700029G01 gene	1700029G01Rik	AK006490
0,047	6,156	4	matrix metalloproteinase 13	Mmp13	NM_008607
0,0365	5,158	4	keratin complex 1, acidic, gene 23	Krt1-23	NM_033373
0,0383	3,514	4	hypothetical protein LOC623781	LOC623781	BB011034
0,019	2,651	4	zinc finger protein of the cerebellum 3	Zic3	AV029604
0,0308	2,485	4	homeodomain interacting protein kinase 1	Hipk1	NM_010432
0,0191	2,373	4	Transcribed locus	---	BM942426
0,0359	2,266	4	cDNA sequence U46068	U46068	U46068
0,0371	2,181	4	intraflagellar transport 57 homolog (Chlamydomonas)	Ift57	BB203988
0,0163	10,37	3	RIKEN cDNA 5430427O21 gene	5430427O21Rik	AK017352
0,0449	8,859	3	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 4	Slc22a4	BC010590
0,00763	5,844	3	Membrane-associated ring finger (C3HC4) 3	38779	BB502175
0,012	4,825	3	matrix metalloproteinase 9	Mmp9	NM_013599
0,032	3,949	3	histidine decarboxylase	Hdc	BG072171
0,0215	3,691	3	RIKEN cDNA 5031425E22 gene	5031425E22Rik	AK017143
0,0342	3,422	3	sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha /// similar to sodium channel 25	Scn9a /// LOC671835	BB452274
0,0136	2,985	3	Potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 1	Kcnq1	BB487239
0,034	2,779	3	Transcribed locus	---	BE956260
0,0232	2,346	3	RNA binding motif protein 35b	Rbm35b	C79787
0,00793	2,09	3	carbohydrate sulfotransferase 11	Chst11	NM_021439
0,0319	9,088	2	forkhead box N1	Foxn1	BB234926
0,0236	6,145	2	RIKEN cDNA B230208H17 gene	B230208H17Rik	BB021749
0,0458	4,283	2	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	Serpine1	NM_008871
0,0307	3,271	2	adenylate kinase 1	Ak1	BE373450
0,0448	3,177	2	RIKEN cDNA 4933417G07 gene	4933417G07Rik	AK016844
0,049	3,126	2	colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)	Csf3r	NM_007782
0,0205	3,009	2	RIKEN cDNA 4930432J16 gene	4930432J16Rik	AK015290
0,0102	2,981	2	pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains 1	Pscd1	AV347405
0,0387	2,857	2	---	---	BB342968
0,0401	2,75	2	Expressed sequence AI790276	AI790276	BE634648
0,0188	2,733	2	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4	Kcnn4	BG865910

0,00514	2,599	2	copine VII	Cpne7	BB426433
0,0373	2,581	2	---	---	BG069433
0,00601	2,431	2	RIKEN cDNA 1700095J03 gene	1700095J03Rik	AK007082
0,00908	2,423	2	secretory leukocyte peptidase inhibitor	Slpi	NM_011414
0,032	2,268	2	13 days embryo head cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:3110033I20 product:hypothetical protein, full insert sequence	---	BM203260
0,00327	2,158	2	disrupted meiotic cDNA 1 homolog	Dmc1h	D58419
0,0424	2,112	2	A disintegrin and metallopeptidase domain 17	Adam17	AW538733
0,0367	2,036	2	neuropeptide B	Npb	BB442010

Vermindert exprimierte Gene

Tabelle 5: Gene, die in transgenen Tieren vermindert exprimiert waren.

p-value	fold change	present in #	Gen	Gensymb	Genbank
0,0268	0,0916	8	pink-eyed dilution	p	NM_021879
0,0261	0,0991	8	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1	Trpm1	NM_018752
0,0452	0,152	8	G protein-coupled receptor 143	Gpr143	U63918
0,0445	0,186	8	carbonic anhydrase 14	Car14	NM_011797
0,0389	0,198	8	prostaglandin D2 synthase (brain)	Ptgds	AB006361
0,0442	0,235	8	Purkinje cell protein 4	Pcp4	NM_008791
0,0343	0,238	8	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1	Trpm1	BB770967
0,028	0,263	8	keratin complex 2, basic, gene 4	Krt2-4	AV082644
0,0282	0,293	8	tyrosinase-related protein 1	Typr1	BB006219
0,0256	0,293	8	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 2	Bdh2	AK007603
0,0439	0,296	8	contactin associated protein-like 2	Cntnap2	AU079588
0,00841	0,305	8	RIKEN cDNA 1500015O10 gene	1500015O10Rik	BB392676
0,0235	0,311	8	RIKEN cDNA 1500015O10 gene	1500015O10Rik	BB426248
0,0459	0,335	8	tyrosinase-related protein 1	Typr1	BB762957
0,00987	0,337	8	glutamate receptor, metabotropic 7	Grm7	AV335221
0,0104	0,349	8	peroxisome proliferator activated receptor binding protein	Pparbp	BG066887
0,0221	0,351	8	Transcribed locus	---	AV292356
0,042	0,355	8	monocyte to macrophage differentiation-associated 2	Mmd2	AV269411
0,0172	0,356	8	opioid growth factor receptor-like 1	Ogfr1	BE650508
0,0344	0,359	8	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1	Slc11a1	NM_013612
0,00623	0,366	8	Potassium channel, subfamily T, member 2	Kcnt2	AV133559
0,00731	0,39	8	flavin containing monooxygenase 1	Fmo1	BC011229
0,00521	0,397	8	tumor suppressor candidate 1	Tusc1	AK008612
0,0494	0,41	8	cDNA sequence BC004853	BC004853	BC004853
0,00266	0,413	8	paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia	Pnkd	BC008274
0,0215	0,414	8	solute carrier family 4 (anion exchanger), member 4	Slc4a4	BE655147
0,0254	0,417	8	RIKEN cDNA 4930426D05 gene	4930426D05Rik	AK015205
0,0319	0,418	8	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14	P2ry14	AF177211
0,0365	0,42	8	insulin-like growth factor binding protein 6	Igfbp6	NM_008344
0,0403	0,433	8	reticulon 4 receptor-like 1	Rtn4rl1	BE996483
0,000903	0,44	8	RIKEN cDNA B230114P17 gene	B230114P17Rik	BB304874
0,0238	0,442	8	galactose mutarotase	Galm	AV307219
0,00479	0,452	8	dickkopf homolog 2 (Xenopus laevis)	Dkk2	NM_020265
0,0064	0,454	8	aldo-keto reductase family 1, member E1	Akr1e1	BC012692
0,0112	0,455	8	RIKEN cDNA 1500015O10 gene	1500015O10Rik	BB392676
0,00858	0,455	8	Transcribed locus	---	BE980823
0,00821	0,456	8	calmodulin-like 4	Calml4	AY061807
0,0361	0,457	8	microfibrillar associated protein 5	Mfap5	NM_015776
0,000639	0,46	8	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit alpha 2	Gabra2	BB339336
0,021	0,463	8	myosin, light polypeptide kinase	Mylk	BF451748
0,00888	0,468	8	Mpv17 transgene, kidney disease mutant	Mpv17	NM_008622
0,0277	0,477	8	MORN repeat containing 2	Morn2	BF319573
0,0216	0,482	8	leucine-rich repeat LGI family, member 2	Lgi2	BE947711
0,00251	0,482	8	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C	Sema3c	NM_013657
0,0389	0,483	8	RIKEN cDNA 2610029I01 gene	2610029I01Rik	AK011611
0,0261	0,484	8	neurexin I	Nrxn1	BB336165

0,0433	0,487	8	RIKEN cDNA 6330416G13 gene	6330416G13Rik	AV326978
0,0299	0,487	8	protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 2	Ptplad2	AV291250
0,0265	0,487	8	arylsulfatase i	Arsi	BC020108
0,017	0,488	8	microfibrillar associated protein 5	Mfap5	NM_015776
0,0271	0,497	8	RIKEN cDNA 1810014F10 gene	1810014F10Rik	AK007494
0,00625	0,498	8	RIKEN cDNA D130020L05 gene	D130020L05Rik	BE991737
0,0421	0,5	8	transketolase	Tkt	AV103412
0,0267	0,309	7	Ly6/Plaur domain containing 1	Lypd1	AK012406
0,0013	0,414	7	RIKEN cDNA B230217C12 gene	B230217C12Rik	BB376573
0,021	0,434	7	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 1	Dlgap1	AK016873
0,0398	0,444	7	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 17	Slc6a17	AV340147
0,0364	0,46	7	RIKEN cDNA 4930526H21 gene	4930526H21Rik	AI413817
0,0153	0,476	7	15 days embryo head cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D930025C07 product:unclassifiable, full insert sequence	---	BB284627
0,0187	0,482	7	protein kinase inhibitor beta, cAMP dependent, testis specific	Pkib	AV047342
0,023	0,483	7	serine peptidase inhibitor, Kazal type 2	Spink2	BE456717
0,0225	0,489	7	10 days neonate skin cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:4732488M12 product:unclassifiable, full insert sequence	---	BB009291
0,00419	0,492	7	---	---	BE993418
0,0251	0,496	7	Down syndrome critical region homolog 6 (human)	Dscr6	NM_133229
0,0279	0,497	7	Glutamate receptor, ionotropic, AMPA4 (alpha 4)	Gria4	BB330347
0,00183	0,5	7	RIKEN cDNA 5830428H23 gene	5830428H23Rik	BB766329
0,0456	0,134	6	uroplakin 3B	Upk3b	BQ084786
0,0167	0,158	6	retinal pigment epithelium derived rhodopsin homolog	Rrh	NM_009102
0,0179	0,177	6	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A	Htr3a	NM_013561
0,00353	0,217	6	phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 3	Plcxd3	BB293136
0,00654	0,252	6	fucosyltransferase 9	Fut9	AU067636
0,0453	0,261	6	paraoxonase 1	Pon1	NM_011134
0,0243	0,262	6	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 8	Slc16a8	NM_020516
0,0394	0,298	6	CD163 antigen	Cd163	NM_053094
0,00193	0,314	6	RIKEN cDNA D830007B15 gene	D830007B15Rik	BB740315
0,0208	0,324	6	Ras-like without CAAX 2	Rit2	BB271919
0,00415	0,334	6	RIKEN cDNA D630033O11 gene	D630033O11Rik	BF233964
0,0194	0,355	6	RIKEN cDNA 2900052N01 gene	2900052N01Rik	AU067665
0,00413	0,37	6	F-box only protein 7	Fbxo7	AV327590
0,041	0,401	6	dystrobrevin alpha	Dtna	BB355121
0,0363	0,426	6	solute carrier family 30, member 10	Slc30a10	BB540543
0,0115	0,436	6	Transcribed locus	---	BE628832
0,032	0,452	6	asparaginyl-tRNA synthetase 2 (mitochondrial)(putative)	Nars2	BB333383
0,0133	0,459	6	tripartite motif protein 9	Trim9	BQ174474
0,00159	0,466	6	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1A	Acaa1a	BB314154
0,0216	0,484	6	Sequestosome 1	Sqstm1	BE133829
0,0114	0,315	5	RIKEN cDNA D630045M09 gene	D630045M09Rik	BG069496
0,00736	0,331	5	alcohol dehydrogenase 7 (class IV), mu or sigma polypeptide	Adh7	NM_009626
0,0464	0,352	5	Dendritic cell protein GA17	Ga17	BB196645
0,00386	0,402	5	Ubiquitination factor E4B, UFD2 homolog (S. cerevisiae)	Ube4b	BB160318
0,016	0,432	5	kelch-like 14 (Drosophila)	Klhl14	AK018108
0,0433	0,455	5	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2	Slc7a2	M62838
0,00638	0,46	5	camello-like 1	Cml1	NM_023160
0,00825	0,461	5	Down syndrome cell adhesion molecule	Dscam	BE947485
0,0211	0,478	5	fatty acid binding protein 6, ileal (gastrotropin)	Fabp6	NM_008375
0,0301	0,499	5	MRV integration site 1	Mrv1	BB800078
0,015	0,0874	4	RIKEN cDNA 1500012D20 gene	1500012D20Rik	BB131676
0,0191	0,132	4	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 6	St8sia6	AV375081
0,0427	0,189	4	prepronociceptin	Pnoc	D50055
0,0363	0,209	4	myosin light chain 2, precursor lymphocyte-specific	Mylc2pl	NM_021611
0,0252	0,214	4	similar to Gastric triacylglycerol lipase precursor (Gastric lipase) (GL) /// similar to Gastric triacylglycerol lipase precursor (Gastric lipase) (GL) /// similar to Gastric triacylglycerol lipase precursor (Gastric lipase) (GL) /// similar to lipase, gastric ///	LOC628236 /// LOC668099 /// LOC668114 /// LOC673023 /// LOC676650	AI787666

			similar to Gastric triacylglycerol lipase precursor (Gastric lipase) (GL)		
0,0351	0,25	4	RIKEN cDNA 4931407K02 gene	4931407K02Rik	AK016516
0,0274	0,345	4	mucin 1, transmembrane	Muc1	NM_013605
0,0291	0,351	4	tripartite motif protein 9	Trim9	BB078731
0,0209	0,385	4	microphthalmia-associated transcription factor	Mitf	NM_008601
0,0405	0,41	4	potassium channel, subfamily V, member 1	Kcnv1	BB078927
0,0353	0,423	4	meteorin, glial cell differentiation regulator	Metrn	BE947704
0,0346	0,455	4	Adult male corpora quadrigemina cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:B230352I09 product:unclassifiable, full insert sequence	---	AV328224
0,0338	0,471	4	leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1	Lrig1	AW557176
0,0203	0,473	4	hypothetical protein LOC676582	LOC676582	BC017159
0,0344	0,00818	3	retinal G protein coupled receptor	Rgr	NM_021340
0,0144	0,0253	3	carboxylesterase 3	Ces3	AI315015
0,00969	0,0395	3	---	---	BB521571
0,0396	0,0558	3	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1	Trpm1	BB769896
0,0383	0,0951	3	carboxylesterase 3	Ces3	NM_053200
0,0355	0,0978	3	expressed sequence AW492955	AW492955	AW492955
0,0249	0,135	3	aldehyde oxidase 3	Aox3	NM_023617
0,0288	0,147	3	natriuretic peptide precursor type A	Nppa	BM122009
0,0316	0,151	3	glycine receptor, alpha 2 subunit	Glr2	BM899590
0,014	0,155	3	gastric inhibitory polypeptide	Gip	NM_008119
0,0231	0,171	3	carboxylesterase 3	Ces3	AI315015
0,0213	0,175	3	gene model 1140, (NCBI)	Gm1140	BG075960
0,0481	0,242	3	crumbs homolog 1 (Drosophila)	Crb1	BG295465
0,0381	0,242	3	---	---	AB036341
0,00489	0,314	3	DNA segment, Chr 1, ERATO Doi 704, expressed	D1Erd704e	BG069196
0,00808	0,336	3	RIKEN cDNA 4930451E06 gene	4930451E06Rik	AK015439
0,0254	0,353	3	RIKEN cDNA 1700013L23 gene	1700013L23Rik	BC019967
0,0147	0,363	3	solute carrier family 32 (GABA vesicular transporter), member 1	Slc32a1	NM_009508
0,0157	0,389	3	WAP, follistatin/kazal, immunoglobulin, kunitz and netrin domain containing 2	Wfikn2	AK011977
0,00606	0,393	3	leucine rich repeat transmembrane neuronal 4	Lrrtm4	BB667279
0,00438	0,4	3	16 days embryo head cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:C130014E09 product:unclassifiable, full insert sequence	---	BB272510
0,037	0,448	3	gene model 166, (NCBI)	Gm166	BG866322
0,0214	0,46	3	RIKEN cDNA C030002O17 gene	C030002O17Rik	AI844535
0,00481	0,473	3	guanylate cyclase activator 1a (retina)	Guca1a	NM_008189
0,0197	0,479	3	coronin, actin binding protein, 2B	Coro2b	BB538661
0,0235	0,482	3	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 10	Nudt10	AI853080
0,0129	0,484	3	zinc finger protein 455	Zfp455	AV172851
0,0239	0,495	3	pallidin	Pldn	NM_019788
0,0114	0,496	3	RAB2B, member RAS oncogene family	Rab2b	BF466486
0,036	0,093	2	LPS-responsive beige-like anchor	Lrba	BB494139
0,0125	0,114	2	RIKEN cDNA 1110007J02 gene	1110007J02Rik	AV008014
0,00125	0,123	2	odd Oz/ten-m homolog 1 (Drosophila)	Odz1	NM_011855
0,0104	0,129	2	RIKEN cDNA 1500012D20 gene	1500012D20Rik	AV333862
0,0179	0,143	2	0 day neonate kidney cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D630048D13 product:unclassifiable, full insert sequence	---	BB504418
0,0192	0,197	2	F-box and WD-40 domain protein 14 /// similar to F-box and WD-40 domain protein 14 /// similar to F-box and WD-40 domain protein 14	Fbxw14 /// LOC668758 /// LOC673189	BB553906
0,0457	0,211	2	RIKEN cDNA A930016P21 gene	A930016P21Rik	BB279561
0,0234	0,223	2	RIKEN cDNA 1110007F12 gene	1110007F12Rik	BB765808
0,00454	0,283	2	RAB3C, member RAS oncogene family	Rab3c	AY026947
0,0266	0,302	2	RAB3A, member RAS oncogene family	Rab3a	NM_009001
0,0405	0,303	2	solute carrier organic anion transporter family, member 1a6	Slco1a6	NM_023718
0,00228	0,333	2	fructosamine 3 kinase	Fn3k	BB020444
0,0376	0,351	2	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit beta 1 /// RIKEN cDNA B230208N19 gene	Gabrb1 /// B230208N19Rik	NM_008069
0,0471	0,377	2	sortilin-related VPS10 domain containing receptor 3	Sorcs3	AK018111
0,0316	0,389	2	15 days embryo head cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D930002E06 product:hypothetical protein, full insert sequence	---	BB079339
0,0381	0,396	2	Hypothetical LOC240327	LOC240327	AW111920

0,0182	0,401	2	carboxylesterase 7	Ces7	AK007235
0,0137	0,407	2	RNA binding motif protein 11	Rbm11	BB333100
0,0111	0,429	2	unc-13 homolog C (C. elegans)	Unc13c	BG069400
0,0385	0,434	2	RIKEN cDNA 5330427D05 gene	5330427D05Rik	BB125476
0,0101	0,435	2	RIKEN cDNA 4930579G22 gene	4930579G22Rik	BI202437
0,00652	0,462	2	pro-opiomelanocortin-alpha	Pomc1	BB020616
0,00332	0,47	2	Transcribed locus	---	BQ175171
0,027	0,477	2	RIKEN cDNA 2810406K13 gene	2810406K13Rik	AK013012
0,00894	0,49	2	Aquaporin 11	Aqp11	AI550443

Datamining

Um sich in der Liste von Rohdaten auf die wesentlichen Änderungen zu fokussieren, wurden die Daten nach bestimmten Kriterien sortiert. Zunächst wurden alle Gene, die nicht mindestens in sieben Sets detektiert werden konnten, aussortiert (*present in #*). Danach wurden alle Gene ohne bekannten Namen oder ohne bekannte Funktion aus der Liste entfernt (z. B. RIKEN cDNA), ebenso wie „_x_at“ und „_s_at“ Gene.

Erläuterung aus GeneChip Expression Analysis (Affymetrix, 2002-2004):

_a_at: Designates probe sets that recognize alternative transcripts from the same gene.

_s_at: Designates probe sets with common probes among multiple transcripts from different genes.

_x_at: Designates probe sets where it was not possible to select either a unique probe set or a probe set with identical probes among multiple transcripts. Rules for cross-hybridization were dropped in order to design the *_x* probe sets. These probe sets share some probes identically with two or more sequences and, therefore, these probe sets may cross-hybridize in an unpredictable manner.

Schließlich wurden noch alle Gene aus der Liste ausgesondert, die eine zu geringe Signalstärke aufwiesen. Dabei wurde der *Cut off* Wert bei unter 50 Einheiten festgesetzt, d. h. es blieben die Gene in der Auswertung vorhanden, bei denen in mindestens einem Array ein Signal von mindestens 50 Einheiten detektiert wurde. Nach Anwendung dieser Kriterien wurden 62 Gene als differentiell reguliert ermittelt. Darunter waren 25 Gene vermehrt exprimiert [Tabelle 6] und 37 Gene vermindert exprimiert [Tabelle 7].

Die Übersicht über die Funktionsgruppen der differentiell regulierten Gene zeigt, dass die Einflüsse von TGF- β 1 im Zellverbund vielgestaltig sind [

Tabelle 8]. Betroffen sind unter Anderem extrazelluläre Matrix (ECM), Zell-Zell-Kontakte, Zytokine und Wachstumsfaktoren sowie deren Rezeptoren. Dies spricht dafür, dass TGF- β 1 sowohl Phänotyp und Funktion der einzelnen Zelle, als auch die Kommunikation der Zellen untereinander im gesamten Zellverbund beeinflusst. Dies könnte wichtige Hinweise darauf geben, wie TGF- β 1 die Homöostase der sich entwickelnden Kornea beeinflusst.

Tabelle 6: Hochregulation (*Fold Change* > 2).

p-value	Fold Change	Gen	Gensymbol
0,0148	4,202	chemokine (C-X-C motif) ligand 14	Cxcl14
0,0375	3,544	nitric oxide synthase 3 antisense	Nos3as
0,0263	3,471	transmembrane protease, serine 11f	Tmprss11f
0,0255	3,021	gap junction membrane channel protein beta 3	Gjb3
0,0245	2,933	gap junction membrane channel protein beta 2	Gjb2
0,0203	2,811	early growth response 2	Egr2
0,0133	2,656	keratin complex 1, acidic, gene 14	Krt1-14
0,0216	2,652	keratin complex 1, acidic, gene 14	Krt1-14
0,0184	2,645	Follistatin	Fst
0,0161	2,566	follistatin	Fst
0,0142	2,556	G protein-coupled receptor 87	Gpr87
0,0402	2,552	fatty acid binding protein 5, epidermal	Fabp5
0,00378	2,549	Matrin 3	Matr3
0,0262	2,437	tumor-associated calcium signal transducer1	Tacstd1
0,04	2,404	laminin, beta 3	Lamb3
0,0151	2,356	laminin, alpha 3	Lama3
0,0196	2,306	transmembrane protein 26	Tmem26
0,0357	2,150	microtubule associated serine/threonine kinase 2	Mast2
0,0424	2,142	carboxypeptidase M	Cpm
0,0405	2,113	LSM14 homolog A (SCD6, <i>S. cerevisiae</i>)	Lsm14a
0,0449	2,108	hexokinase 2	Hk2
0,0275	2,097	pleckstrin 2	Plek2
0,0335	2,071	kinesin light chain 3	Klc3
0,011	2,040	nuclear factor, erythroid derived 2, like 3	Nfe2l3
0,0243	2,026	major facilitator superfamily domain containing 2	Mfsd2

Tabelle 7: Herunterregulation (*Fold Change* < 0,5).

p-value	Fold Change	Gen	Gensymbol
0,0251	0,496	Down syndrome critical region homolog 6 (human)	Dscr6
0,017	0,488	microfibrillar associated protein 5	Mfap5
0,0299	0,487	protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 2	Ptplad2
0,0265	0,487	arylsulfatase i	Arsi
0,0261	0,484	neurexin I	Nrxn1
0,023	0,483	serine peptidase inhibitor, Kazal type 2	Spink2
0,00251	0,482	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C	Sema3c
0,0216	0,482	leucine-rich repeat LGI family, member 2	Lgi2
0,0277	0,477	MORN repeat containing 2	Morn2
0,00888	0,468	Mpv17 transgene, kidney disease mutant	Mpv17
0,021	0,463	myosin, light polypeptide kinase	Mylk
0,0361	0,457	microfibrillar associated protein 5	Mfap5
0,00821	0,456	calmodulin-like 4	Calml4
0,0064	0,454	aldo-keto reductase family 1, member E1	Akr1e1
0,00479	0,452	dickkopf homolog 2 (<i>Xenopus laevis</i>)	Dkk2
0,0398	0,444	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 17	Slc6a17
0,021	0,434	discs, large (<i>Drosophila</i>) homolog-associated protein 1	Dlgap1
0,0403	0,433	reticulon 4 receptor-like 1	Rtn4rl1
0,0365	0,420	insulin-like growth factor binding protein 6	Igfbp6
0,0319	0,418	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14	P2ry14
0,0215	0,414	solute carrier family 4 (anion exchanger), member 4	Slc4a4

0,00266	0,413	paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia	Pnkd
0,00521	0,397	tumor suppressor candidate 1	Tusc1
0,00731	0,390	flavin containing monooxygenase 1	Fmo1
0,0344	0,359	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1	Slc11a1
0,0172	0,356	opioid growth factor receptor-like 1	Ogfr1
0,00987	0,337	glutamate receptor, metabotropic 7	Grm7
0,0459	0,335	tyrosinase-related protein 1	Tyrp1
0,0267	0,309	Ly6/Plaur domain containing 1	Lypd1
0,0439	0,296	contactin associated protein-like 2	Cntnap2
0,0256	0,293	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 2	Bdh2
0,0343	0,238	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1	Trpm1
0,0442	0,235	Purkinje cell protein 4	Pcp4
0,0389	0,198	prostaglandin D2 synthase (brain)	Ptgds
0,0452	0,152	G protein-coupled receptor 143	Gpr143
0,0261	0,0991	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1	Trpm1
0,0268	0,0916	pink-eyed dilution	p

Tabelle 8: Gene in Funktionsgruppen.

Fold Change	Gen	Symbol	Genbank-Nummer
Modulatoren der TGF-β Funktion			
2,645	Follistatin	Fst	BB444134
0,452	Dickkopf homolog 2 (Xenopus laevis)	Dkk2	NM_020265
Wachstumsfaktoren/Zytokine/Chemokine und Rezeptoren			
4,202	Chemokine (C-X-C motif) ligand 14	Cxcl14	AF252873
0,356	Opioid growth factor receptor-like 1	Ogfr1	BE650508
Zell-Zell-Kontakte und Zell-Matrix-Kontakte			
3,021	Gap junction membrane channel protein beta 3	Gjb3	NM_008126
2,933	Gap junction membrane channel protein beta 2	Gjb2	AV239646
2,437	Tumor-associated calcium signal transducer 1	Tacstd1	BC005618
0,484	Neurexin I	Nrxn1	BB336165
0,296	Contactin associated protein-like 2	Cntnap2	AU079588
Extrazelluläre Matrix			
2,404	Laminin, beta 3	Lamb3	NM_008484
2,356	Laminin, alpha 3 /// similar to Laminin alpha-3 chain precursor (Nicein lpha subunit)	Lama3 /// LOC669814	X84014
0,488	Microfibrillar associated protein 5	Mfap5	NM_015776
Transkriptionsaktivatoren und -repressoren			
2,811	Early growth response 2	Egr2	X06746
2,549	Matrin 3	Matr3	BI249188
2,04	Nuclear factor, erythroid derived 2, like 3	Nfe2l3	NM_010903
Neuropeptide und Neurotransmitter-Rezeptoren			
2,556	G protein-coupled receptor 87	Gpr87	NM_032399
0,482	Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, Secreted, (semaphorin) 3C	Sema3c	NM_013657
0,42	Insulin-like growth factor binding protein 6	Igfbp6	NM_008344
0,418	Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14	P2ry14	AF177211
0,337	Glutamate receptor, metabotropic 7	Grm7	AV335221
0,198	Prostaglandin D2 synthase (brain)	Ptgds	AB006361
0,152	G protein-coupled receptor 143	Gpr143	U63918
Proteine des Zytoskeletts			
2,656	Keratin complex 1, acidic, gene 14	Krt1-14	BE197934
2,097	Pleckstrin 2	Plek2	NM_013738
2,071	Kinesin light chain 3	Klc3	BC017147
Proteasen und Protease-Inhibitoren			
3,471	Transmembrane protease, serine 11f	Tmprss11f	BB149675
2,142	Carboxypeptidase M	Cpm	AK017670
0,483	Serine peptidase inhibitor, Kazal type 2	Spink2	BE456717
0,335	Tyrosinase-related protein 1	Tyrp1	BB762957
Tumor-Suppressoren			
0,397	Tumor suppressor candidate 1	Tusc1	AK008612
Symporter, Antiporter und sonstige Transporter			
2,552	Fatty acid binding protein 5, epidermal	Fabp5	BC002008
2,026	Major facilitator superfamily domain containing 2	Mfsd2	AK006096
0,444	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 17	Slc6a17	AV340147
0,414	Solute carrier family 4 (anion exchanger), member 4	Slc4a4	BE655147

0,359	Solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1	Slc11a1	NM_013612
Zellzyklus regulierende Kinasen und andere Proteine			
2,15	Microtubule associated serine/threonine kinase 2	Mast2	BB367890
2,113	LSM14 homolog A (SCD6, <i>S. cerevisiae</i>)	Lsm14a	BI662680
2,108	Hexokinase 2	Hk2	NM_013820
0,463	Myosin, light polypeptide kinase	Myk	BF451748
0,454	Aldo-keto reductase family 1, member E1	Akr1e1	BC012692
0,39	Flavin containing monooxygenase 1	Fmo1	BC011229
0,238	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1	Trpm1	BB770967
Sonstige Signalmoleküle, Effektoren und Modulatoren			
3,544	Nitric oxide synthase 3 antisense	Nos3as	AW121498
2,306	Transmembrane protein 26	Tmem26	BB469903
0,496	Down syndrome critical region homolog 6 (human)	Dscr6	NM_133229
0,487	Protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 2	Ptplad2	AV291250
0,487	Arylsulfatase i	Arsi	BC020108
0,482	Leucine-rich repeat LGI family, member 2	Lgi2	BE947711
0,477	MORN repeat containing 2	Morn2	BF319573
0,468	Mpv17 transgene, kidney disease mutant	Mpv17	NM_008622
0,456	Calmodulin-like 4	Calml4	AY061807
0,434	Discs, large (<i>Drosophila</i>) homolog-associated protein 1	Dlgap1	AK016873
0,433	Reticulon 4 receptor-like 1	Rtn4rl1	BE996483
0,413	Paroxysmal nonkinesiogetic dyskinesia	Pnkd	BC008274
0,309	Ly6/Plaur domain containing 1	Lypd1	AK012406
0,293	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 2	Bdh2	AK007603
0,235	Purkinje cell protein 4	Pcp4	NM_008791
0,0916	Pink-eyed dilution	p	NM_021879

DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch die Analyse eines *in vivo* Mausmodels Gene zu identifizieren, die in der Hornhaut durch TGF- β 1 reguliert werden und damit detaillierte Informationen über die Moleküle und Signalwege zu gewinnen, die für die Reifung einer differenzierten Kornea verantwortlich sind.

Gene der extrazellulären Matrix

Da TGF- β 1 die Synthese von extrazellulärer Matrix (ECM) in der Kornea stimuliert (Usui *et al.*, 1998) und der Phänotyp der β B1-Crystallin-TGF- β 1 transgenen Mäuse eine Verdickung der Kornea mit vermehrter ECM-Bildung zeigt, wurde von uns erwartet, dass auch die Genregulation in diesem Bereich auffällig verändert sein würde, mit einer verstärkten Expression von Genen, welche für ECM-Komponenten kodieren. Dazu sollten Proteine und Glykoproteine wie Laminin, Keratin, Kollagen, Fibronectin und Perlekan gehören, von denen bereits von anderen Autoren eine Expressionssteigerung in der Kornea nach Behandlung mit TGF- β gezeigt worden war (Flügel-Koch *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 1994; Usui *et al.*, 1998; Usui *et al.*, 2004). So konnte gerade bei β B1-Crystallin-TGF- β 1 Mäusen immunhistochemisch eine verstärkte Expression der ECM Komponenten Fibronectin und Perlekan in der Kornea transgener Tiere nachgewiesen werden. Auch bei Genexpressionsanalysen an Korneafibroblasten *in vitro* ließ sich eine erhöhte Expression für ECM Proteine wie Fibronectin nachweisen (You *et al.*, 2002). Wir konnten diese Befunde allerdings im cDNA Microarray nicht bestätigen und beobachteten weder eine erhöhte Menge an mRNA für Fibronectin noch für Perlekan. Dies könnte allerdings darauf zurückzuführen sein, dass die Translation beider Proteine bereits zu einem früheren Zeitpunkt erfolgt war und die Expression von mRNA bereits wieder danach abgenommen hatte. Tatsächlich konnte lichtmikroskopisch bei β B1-Crystallin-TGF- β 1 Mäusen bereits an E13.5 ein vermehrtes Vorhandensein der beiden Proteine nachgewiesen werden (Flügel-Koch *et al.*, 2002).

Eine Änderung der Expression konnte allerdings für Laminin 5 gezeigt werden. So war die Expression von Laminin α 3 und Laminin β 3 bei transgenen Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen hochreguliert [Tabelle 6]. Diese Gene kodieren für Bestandteile von Laminin 5, einer Isoform von Laminin, welches eine Hauptkomponente der Basalmembran des Korneaepithels ist (Diehn *et al.*, 2005; Ljubimov *et al.*, 1995) und von den

Korneaepithelzellen sezerniert wird (Nobuyuki *et al.*, 2000). Laminin 5 ist offenbar ein multifunktionales Protein, das über $\alpha 3\beta 1$ -Integrin sowohl Bedeutung als Ankerfilament des Epithels an der Basalmembran hat, als auch bei der Zellmigration von Korneaepithelzellen eine Rolle spielt (Nobuyuki *et al.*, 2000). Laminin 5 setzt sich aus 3 Ketten, der $\alpha 3$ -, $\beta 3$ - und $\gamma 2$ -Kette, zusammen, die von 3 verschiedenen Genen, Lama3, Lamb3, Lamc2, kodiert werden. Interessant ist, dass in diesem Experiment Lama3 und Lamb3 quantitativ in sehr ähnlicher Weise reguliert waren. Dies ließe sich biochemisch durch die äquimolare Zusammensetzung der $\alpha 3$ - und $\beta 3$ -Ketten in Laminin 5 erklären. Eine Regulation von Lamc2 konnte dagegen von uns nicht beobachtet werden. Diese Erkenntnisse stimmen überein mit Untersuchungen an humanen epidermalen Keratinozyten. Hier wurde in Zellkulturen die vermehrte Expression von Lama3, Lamb3 und Lamc2 unter dem Einfluss von TGF- β nachgewiesen. Allerdings zeigten in Keratinozyten Lama3 und Lamc2 eine stärkere Regulation, wohingegen die Regulation von Lamb3 weniger ausgeprägt war. Es wird jedoch vermutet, dass die Expression der drei Gene, die für Laminin-5 kodieren, nicht koordiniert erfolgt (Korang *et al.*, 1995). Dies lässt sich in unserem Experiment bestätigen. Das Ausmaß und die Koordination der Expression von Lama $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ sind offenbar sehr komplex und nicht nur von einem einzigen Wachstumsfaktor abhängig. Ebenfalls interessant ist der Zusammenhang der Expression von Lama $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ mit dem Signaltransduktionsprotein Smad4. Smad4 ist als Second Messenger in der TGF- β Signaltransduktionskaskade ein positiver Transkriptionsregulator für basale oder TGF- β induzierte Expression der Gene Lama3, Lamb3 und Lamc2 (Zboralski *et al.*, 2008). Obwohl keine erhöhte Expression von Smad4 im Versuch detektiert werden konnte, erscheint ein Zusammenhang auf Ebene der Signaltransduktion wahrscheinlich.

Gene der TGF- β Signalwege

TGF- $\beta 1$ ist ein Wachstumsfaktor, der über eine lange Signaltransduktionskette, angefangen bei verschiedenen Rezeptoren (T β RI und T β RII) und über intrazelluläre Smad Proteine, seine Signale bis in den Zellkern leitet (Massagué, 1998). Dies konnte auch für die ECM-Synthese in Korneaendothelzellen gezeigt werden (Usui *et al.*, 1998). Deshalb war zu erwarten, dass durch die Überexpression von TGF- $\beta 1$ auch manche Komponenten dieser Signaltransduktionskette reguliert sein würden. Diese Regulation wäre dann entweder synergistisch mit der Wirkungsweise von TGF- $\beta 1$, z. B. eine verstärkte Expression (Smad2, 3, 4 oder T β Rs), oder, um der unphysiologisch hohen Konzentration von TGF- $\beta 1$ entgegenzuwirken, eine verminderte Expression bzw. eine vermehrte Expression

inhibitorischer Signalproteine wie Smad7. Dennoch konnten von uns nur wenige Gene des TGF- β Signalwegs als differentiell reguliert gefunden werden [Tabelle 8]. Allerdings war Follistatin (Fst), ein Aktivin-bindendes Protein und damit Antagonist für Aktivin A, verstärkt exprimiert (2,6fold change) (Nakamura *et al.*, 1990). Aktivin A gehört ebenfalls der TGF- β Familie an und wirkt über Smad-Protein vermittelte Signaltransduktion auf die Effektorzellen (You *et al.*, 2002). An Zellkulturen von Korneafibroblasten konnte gezeigt werden, dass Aktivin A unter Anderem die Bildung von α -smooth muscle (sm) Aktin und Fibronektin induziert. Follistatin blockiert hingegen die Effekte von Aktivin A auf die Proteinexpression und Signaltransduktion, indem es durch spezifische Bindung an Aktivin A die Interaktion des Aktivin Rezeptors (ActR) mit seinem Liganden hemmt (You *et al.*, 2002). Da Fibronektin und α -sm Aktin in der Hornhaut transgener Tiere vermehrt nachgewiesen wurde, könnte Follistatin als intrinsischer Antagonist der TGF- β Familie reflektorisch verstärkt exprimiert sein, um die TGF- β Wirkung zu hemmen. Diese Ergebnisse sprechen für einen Rückkopplungsmechanismus und Wechselwirkungen zwischen den Angehörigen der TGF- β Familie. Des Weiteren ist interessant, dass für Follistatin eine angiogenetische Potenz *in vivo* in der Kaninchenhornhaut nachgewiesen werden konnte (Kozian *et al.*, 1997). Da ein charakteristischer Befund in der Hornhaut von β B1-Crystallin-TGF- β 1 transgenen Mäusen das Vorhandensein von Blutgefäßen ist, besteht die Möglichkeit, dass dieser Befund durch Follistatin, zumindest teilweise, vermittelt wird. Auch bei der Wundheilung der Kornea kommt es zur übermäßigen Einsprossung von Gefäßen, ein Effekt, der durch Wachstumsfaktoren vermittelt wird (Chang *et al.*, 2001; Usui *et al.*, 2004).

Gene des Zytoskeletts

In Zellkultur mit TGF- β 1 stimulierte Keratozyten zeigen eine Überexpression von Kollagen I und III sowie eine Transdifferenzierung zu einem myofibroblastischen Phänotyp unter anderem mit der Expression von α -sm Aktin (Funderburgh *et al.*, 2001). Ein analoger Befund konnte bei β B1-Crystallin-TGF β 1 transgener Mäusen beobachtet werden, die zwischen E16.6 und E17.5 eine verstärkte Immunreaktivität für α -sm Aktin im Korneamesenchym, dem späteren Stroma, aufweisen (Flügel-Koch *et al.*, 2002). Wir konnten allerdings im cDNA Microarray der neugeborenen Hornhaut keine Hochregulation von α -sm Aktin beobachten.

Allerdings konnten wir mit Pleckstrin 2 (Plek2) ein bisher in der Kornea nicht beschriebenes Protein identifizieren, das in der Untersuchung verstärkt reguliert war (2,097fold change).

Pleckstrin 2 spielt eine wichtige Rolle bei der Neuordnung von Aktin im Zytoskeletts und ist durch die Ausbildung von Lamellipodien für eine gerichtete Zellbewegung wichtig (Hu *et al.*, 1999). Die genaue Wirkungsweise von Pleckstrin 2 ist unbekannt. Prinzipiell lässt sich seine verstärkte Expression allerdings mit dem Befund vereinbaren, dass Mesenchymzellen der Kornea in β B1-Crystallin-TGF β 1 transgenen Mäusen vermehrt α -sm Aktin enthalten (Flügel-Koch *et al.*, 2002) und dass sich Keratozyten unter der Einwirkung von TGF- β 1 zu Myofibroblasten transdifferenzieren (Funderburgh *et al.*, 2001). Auch diese enthalten vermehrt α -sm Aktin und sind zur begrenzten Bewegung befähigt. Weitere Untersuchungen sollten sich anschließen, welche die Rolle von Pleckstrin 2 in der Differenzierung von Korneamesenchym genauer entschlüsseln.

Keratine sind Intermediärfilamente und damit Proteine des Zytoskeletts in Epithelzellen. Eine Vielzahl von Keratinen wurde bereits identifiziert und bestimmten Geweben und Zelltypen zugeordnet (Chu *et al.*, 2002; Moll *et al.*, 1982). So wurde in früheren Studien die Expression von Keratin 12 (K12) als gewebespezifischer Marker im Korneaepithel nachgewiesen. Keratin 14 (K14) kommt in Basalzellen fast aller geschichteten Epithelien (z. B. in Epidermis und Konjunktiva) vor (Liu *et al.*, 1994). Im vorliegenden β B1-Crystallin-TGF β 1 transgenen Mausmodell zeigte sich K14 als verstärkt exprimiert (2,65fach). K14 konnte kürzlich in Basalzellen des Korneaepithels von Mäusen während der Augenentwicklung nachgewiesen werden (Tanifuji-Terai *et al.*, 2006). Dabei war K14 während der gesamten Entwicklung und über die Geburt hinaus (ab E15.5-P10) in hohem Maße in den Basalzellen des Korneaepithels vorhanden. In diesem Zeitintervall liegt auch der Präparationszeitpunkt in unserem Experiment (P0) [Abb. 13]. K14 wird als Marker für Korneaepithel-Progenitorzellen angesehen. Diese Vorläuferzellen sind fähig, die Differenzierung von Korneaepithelzellen zu induzieren. Es wird ihnen daher ein großes Potential zur Regeneration von Korneaepithel zugeschrieben. Unter dem Einfluss von TGF- β 1 konnte eine erhöhte Expression von K14 im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nachgewiesen werden. Diese Erhöhung könnte auf eine gesteigerte Proliferation von Korneaepithel-Progenitorzellen hindeuten. Diese Theorie ist vereinbar mit dem Phänotyp der transgenen Tiere, welche eine verdickte Kornea mit einem höheren Anteil an Zellen aufweisen. Die Ergebnisse dieser Studien in der Zusammenschau zeigen neue Möglichkeiten des *Tissue Engineering* auf, mit dem Ziel, Korneaepithel aus isolierten Progenitorzellen der Basalzellschicht unter dem Einfluss von TGF- β 1 zu züchten. Diese Erkenntnis könnte einen weiteren Beitrag zur Therapie bei Hornhautläsionen leisten. Jedoch sind weitere Untersuchungen notwendig, um diese Theorie zu bestätigen.

Immunhistochemische Färbungen für K14 in Korneas von β B1-Crystallin-TGF- β 1 transgenen Mäusen und eine gesonderte Untersuchung der isolierten Basalzellen evtl. mittels Durchflusszytometrie wären dabei ein möglicher Ansatz.

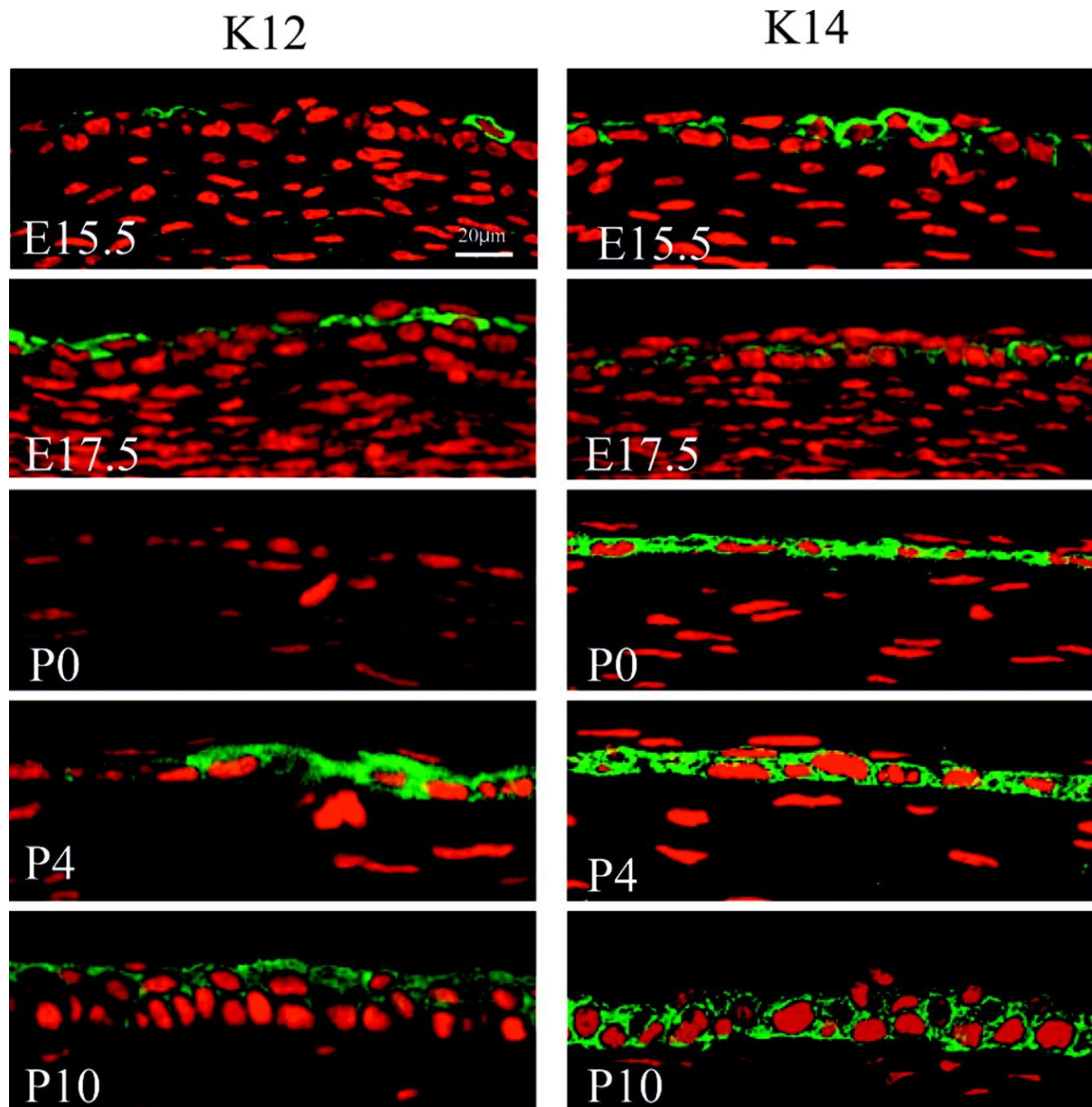


Abb. 13 Immunfluoreszenzaufnahmen von Korneas für Keratin 12 (K12) und Keratin 14 (K14) (jeweils grün markiert) zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten (P, postnataler Entwicklungstag; E, embryonaler Entwicklungstag).
links: Die Expression von K12 in suprabasalen Korneaepithelzellen variiert in ihrem Ausmaß je nach Entwicklungsstadium.
rechts: Die Expression von K14 in Basalzellen an E15.5 detektiert und konstant im gesamten Untersuchungsintervall (E15.5-P10).
(Tanifuji-Terai *et al.*, 2006).

Connexin 26 (Cx26)/ Gap Junction Protein β 2 (Gjb2), Connexin 31 (Cx31)/ Gap Junction Protein β 3 (Gjb3)

Es zeigte sich auch eine differentielle Regulation der Expression von Genen, die auf eine veränderte Interaktion zwischen Zellen hindeutet. So waren Gene für die *Gap Junction* Proteine Connexin 26 und Connexin 31, unter dem Einfluss von TGF- β 1, 3-fach erhöht in ihrer Expression [Tabelle 6]. Dabei handelt es sich um Zell-Zell-Kontakte, über die ein Signalaustausch zwischen Zellen stattfindet. Connexine fungieren dabei als Tunnelproteine zwischen Zellen, die einen Austausch von kleinen Signalmolekülen und Ionen ermöglichen (Roberto *et al.*, 1996). Derartige Verbindungen zwischen Zellen erlauben eine koordinierte zelluläre Aktivität, was große Bedeutung bei der Organhomöostase während der Entwicklung und bei reifen multizellulären Organismen hat. *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) Untersuchungen an der Kornea der Ratte lieferten bereits umfangreiche Ergebnisse über das Vorhandensein und die Lokalisation von Connexinen in der erwachsenen Hornhaut (Laux-Fenton *et al.*, 2003). Auch Cx26 und Cx31 konnten dabei deutlich nachgewiesen werden. In immunhistochemischen Untersuchungen konnte Cx26 in den Basalzellen und einer suprabasalen Zellschicht des Korneaepithels gezeigt werden, mRNA von Cx26 und Cx31 auch in Kulturen von primären Epithelzellen der Kornea (PCEC) (Shurman *et al.*, 2005). In Connexin 31.1 (Cx31.1/Gjb5) knock-down Modellen an Rattenhornhäuten konnte eine Vergrößerung des Hornhautepithels um mehrere Zellschichten beobachtet werden, im gleichen Experiment an humanen Korneas konnte eine Verringerung der Apoptoserate festgestellt werden (Chang *et al.*, 2009). In Genexpressionsanalysen an heilenden Korneas von Mäusen trat eine Down-Regulationen für Cx31 auf, wobei gleichzeitig Modulatoren von TGF- β Funktionen (z. B. Smad2, Wnt4) herunterreguliert waren (Cao *et al.*, 2002). Dies könnte insgesamt für einen zytoproliferativen bzw. zytoprotektiven antiapoptotischen Effekt von bestimmten Connexinen sprechen.

Untersuchungen konnten zudem einen Zusammenhang von Mutationen im Cx26 Gen mit den fatalen Auswirkungen auf Erkrankungen der Hornhaut, dem Keratitis-Ichtyosis-Deafness-Syndrom (KIDS), herstellen. Dabei werden u. A. Neovaskularisationen im Bereich der Kornea und eine *Keratitis punctata* beobachtet (Isabelle *et al.*, 1998; Richard *et al.*, 2002).

Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass bestimmte Connexine eine wichtige Rolle in der Homöostase, Entwicklung und Pathologie speziell der Kornea spielen. Vielleicht könnten hier durch eine Verknüpfung mit den TGF- β 1-Signalwegen neue Verbindungen in dieser komplexen Regulation entdeckt werden.

Prostaglandin D2 Synthase (Ptgds), Early growth response 2 (Egr2)

In unserem Modell war Egr2 hochreguliert (2,8 fold change) und Ptgds runterreguliert (0,198 fold change im Vergleich zur Kontrolle). Das Protein, das von dem Gen Ptgds kodiert wird ist eine Glutathion-unabhängige Prostaglandin D Synthase, die die Konversion von Prostaglandin H2 (PGH2) in Prostaglandin D2 (PGD2) katalysiert. PGD2 wirkt als Neuromodulator und trophischer Faktor im zentralen Nervensystem (Tamaoki *et al.*, 1987). Es spielt eine Rolle bei der Kontraktion glatter Muskelzellen und ist ein potenter Inhibitor der Thrombozytenaggregation (Smith *et al.*, 1974). Die Funktion von Ptgds in der Kornea ist bislang allerdings nicht geklärt.

Das Gen Egr2 kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der kürzlich in Entwicklungsuntersuchungen von Nerven in Hühnerkorneas als Marker für Schwannzellreifung und Myelinisierung der Hornhautnerven identifiziert werden konnte (Conrad *et al.*, 2009) [Abb. 14]. Die Hochregulation von Egr2 könnte sich also auf die Ausdifferenzierung von Schwannzellen während der zunehmenden Innervation der Kornea beziehen. Dies lässt die Vermutung zu, dass TGF- β 1 Auswirkungen auf die Ausreifung von Schwannzellen in der Kornea während der Entwicklung hat. Tatsächlich konnte schon in früheren Experimenten eine Beziehung von TGF- β zur Reifung von Schwannzellen gezeigt werden (D'Antonio *et al.*, 2006; Einheber *et al.*, 1995; Rhona *et al.*, 2008).

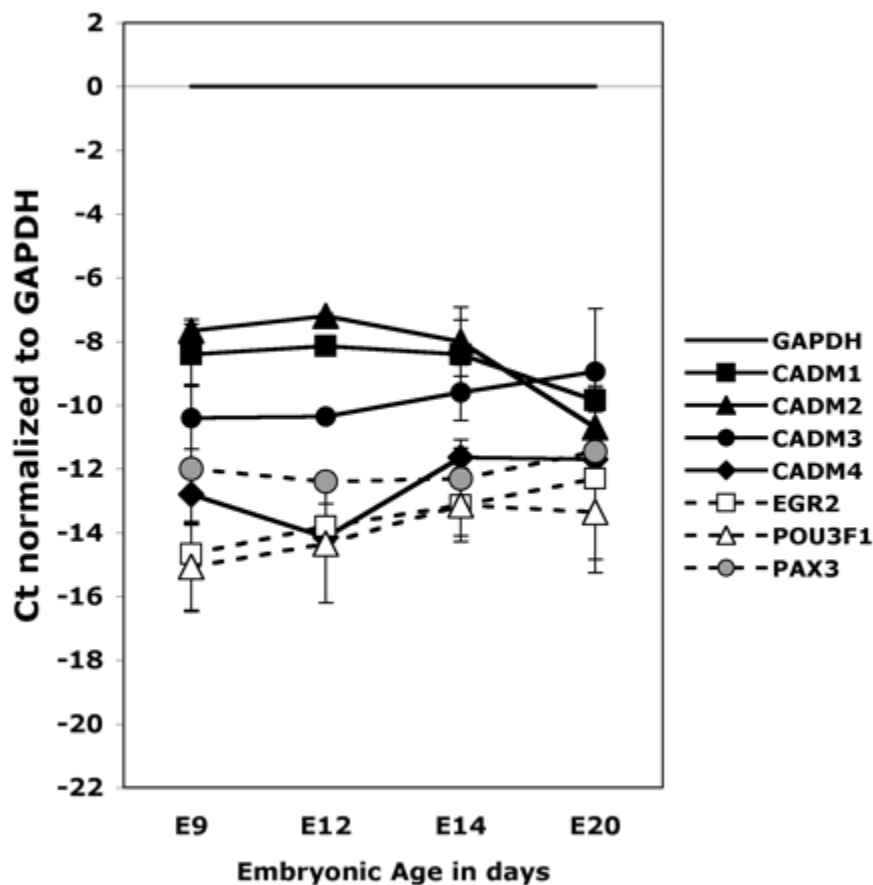


Abb. 14: Regulation von Egr2 während der embryonalen Entwicklung der Innervation von Hühneraugen. Egr2 ist als Marker für das Stadium der Reifung von myelinisierenden Schwannzellen hochreguliert (Conrad *et al.*, 2009).

Genexpressionsanalysen an Keratozytenkulturen und humanen Korneastroma-Stammzellkulturen (hCSSC) ergaben Hinweise, dass Ptgds und Egr2 als Marker der Differenzierung von reifen Keratozyten gesehen werden können. Beide Gene waren im differenzierteren Gewebe (Keratozyten aus reifer Kornea) hochreguliert im Vergleich zu Kulturen aus isolierten hCSSC (Du *et al.*, 2007) [Abb. 15]. Allerdings bestehen entscheidende Unterschiede im Versuchsaufbau: Die Untersuchungen an den Zellkulturen fanden *in vitro* isoliert in Serum-freiem Medium ohne die Einwirkungen eines Wachstumsfaktors statt. Am lebendigen Mausmodell wirken hingegen hohe Konzentrationen von TGF- β 1 auf einen multidimensionalen und interagierenden Komplex verschiedener Zelltypen ein. Trotz der grundlegenden Unterschiede ist die Betrachtung dennoch lohnend, geht es doch um dynamische Untersuchungen zur Entwicklung und Differenzierung der Gewebe. Bislang wurde die Lokalisation von Ptgds im Auge von β B1-Crystallin-TGF- β 1 transgenen Mäusen nicht untersucht.

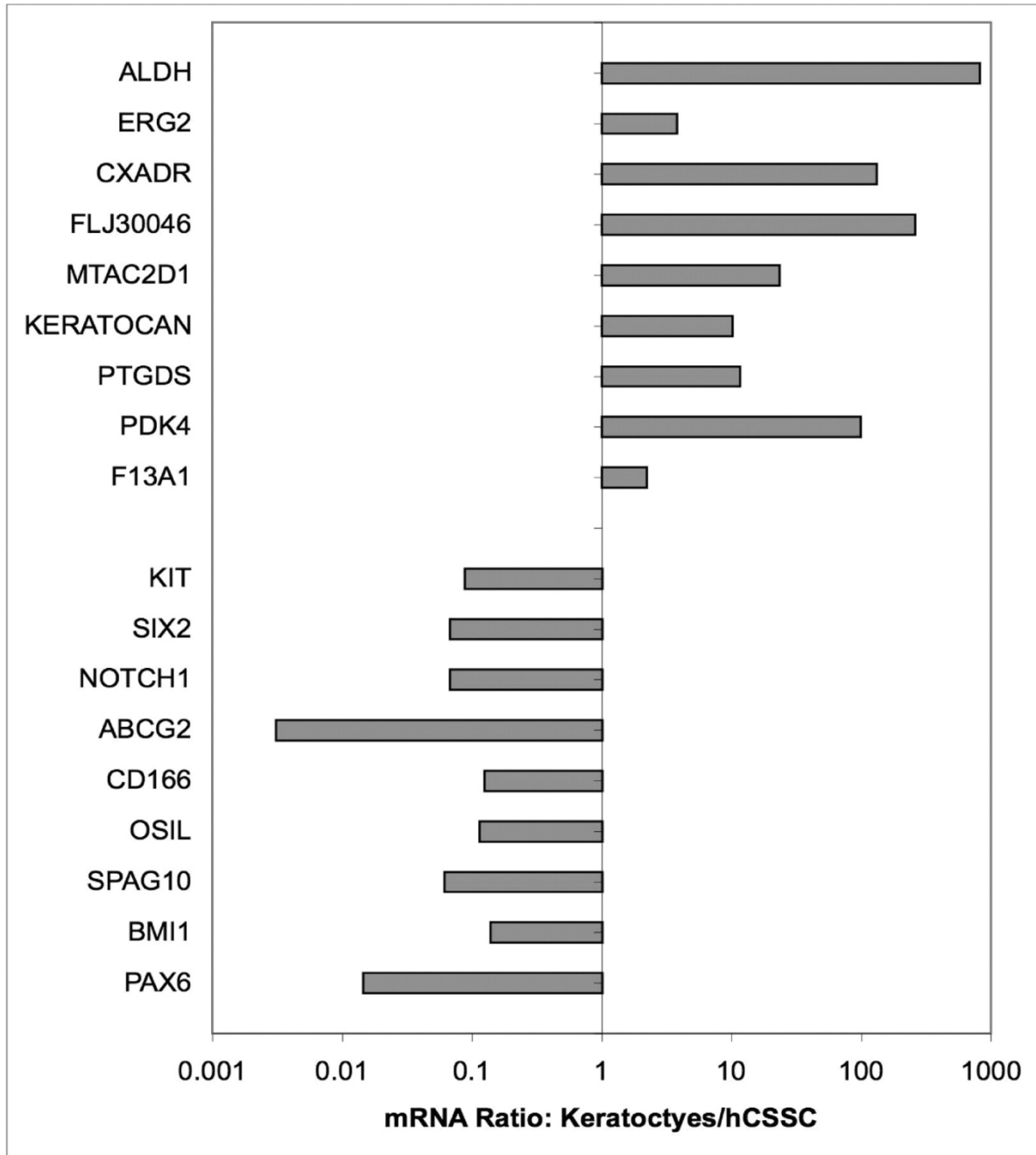


Abb. 15: Genexpressionsanalysen zur Differenzierung von Keratocyten und hCSSC (Gene Expression Pattern) (Du *et al.*, 2007).

Chemokinligand 14 (Cxcl14/ BRAK)

Interessant ist die auffallend starke Hochregulation des Gens Cxcl14 (4,2-fold change bei transgenen Tieren im Vergleich zu wildtypischen Tieren), welches für den Chemokin Liganden 14 (BRAK) kodiert. Als Chemokine bezeichnet man chemotaktisch wirkende Zytokine, die von vielen Zelltypen, u. a. Phagozyten und dendritischen Zellen, aber auch von Gewebszellen, sezerniert werden. In der Epidermis werden diese spezialisierten Gewebszellen mit chemotaktischer Funktion als Langerhans-Zellen bezeichnet. Sie kommen

als interdigitierende dendritische Zellen (IDC) auch in der Kornea vor. Chemokine können Leukozyten anlocken und aktivieren. Sie spielen daher eine wichtige Rolle als Mediatoren bei der Regulation einer gerichteten Leukozytenwanderung und den dadurch ausgelösten Entzündungsprozessen. Die Einwanderung der Leukozyten in ein Entzündungsgebiet wird durch Chemokin-Gradienten im Gewebe gelenkt. Chemokine werden in Untergruppen eingeteilt, die sich aus der charakteristischen Position von Cysteinresten am Aminoende der Peptidkette ableiten, die durch die Ausbildung von Disulfidbrücken für die tertiäre Struktur der Chemokine verantwortlich sind. Sie werden daher eingeteilt in die CC, CXC, CX₃C und C Gruppen. BRAK gehört der CXC Gruppe an, die sich je nach An- oder Abwesenheit der konservierten Aminosäuresequenz „Glu-Leu-Arg“ am NH₂-Ende wiederum in zwei strukturell und funktionell unterschiedliche Gruppen unterteilen lässt. In Experimenten konnte BRAK eine ausgeprägte antiangiogenetische Aktivität nachgewiesen werden: Es wurden *in vivo* (Rat Corneal Micropocket Assay) die angioproliferativen Effekte der Zytokine Vascular Endothelial Growth Faktor (VEGF), Interleukin 8 (IL-8) und Basic Fibroblast Growth Faktor (bFGF) in Anwesenheit von rekombinantem BRAK (rBRAK) auf Endothelzellen geblockt (Shellenberger *et al.*, 2004). TGF-β1 ist dagegen in unserem System eher ein angiogenetischer Faktor, der bei βB1-Crystallin-TGFβ1 transgenen Mäusen eine verstärkte Vaskularisierung der normalerweise gefäßfreien Kornea verursacht (Flügel-Koch *et al.*, 2002). Dies könnte bedeuten, dass BRAK die vasoproliferativen Stimuli durch TGF-β1 nicht verhindern kann, TGF-β1 ein potenterer Faktor als BRAK ist, oder dass BRAK in zu geringer Konzentration synthetisiert wird. CXCL14/BRAK ist zwar in seiner Expression auf mRNA Ebene hochreguliert, was die Translation in ein funktionierendes Protein betrifft können allerdings keine Aussagen getroffen werden. Dazu wäre es interessant zu untersuchen, ob und wie viel BRAK tatsächlich als Protein in den Zellen der Kornea synthetisiert wird, z.B. mit Hilfe von Immunhistochemie und Western-Blot Analysen. Vielleicht reicht die Konzentration, in der BRAK als Chemokin vorhanden ist, nicht aus, um der Einsprossung von Gefäßen entgegenzuwirken. CXCL14/BRAK könnte auch zu einem Zeitpunkt erst hochreguliert werden, an dem es keinen Einfluss mehr auf eine bereits abgeschlossene Angiogenese nehmen kann. Dann wäre die Hochregulation von CXCL14/BRAK im Sinne einer kompensatorischen Reaktion auf das Einwachsen von Gefäßen, die durch TGF-β1 verursacht werden, zu werten.

Dickkopf 2 (Dkk2)

Bei der Auswertung der Microarrays zeigte sich eine Herunterregulation des Gens Dickkopf homolog 2 (Dkk2). Dieses Gen kodiert für ein Protein, das bei der Differenzierung des Korneaepithels eine entscheidende Rolle zu spielen scheint. Die Familie der Dickkopf Proteine sind Inhibitoren des Wnt-Signalwegs durch Interaktion mit dem Wnt Co-Rezeptor LRP5/6 und den Kremen Transmembranproteinen (He *et al.*, 2004; Mao *et al.*, 2003). Die Signaltransduktion durch Wnt Proteine spielt sowohl in der embryonalen als auch in der späteren Entwicklung von bestimmten Geweben eine wichtige Rolle durch ihren Einfluss auf Zellproliferation und Adhäsion. In einem Dkk2 Knock-out-Maus Modell zeigten die homozygoten Mutanten (Dkk2^{-/-}) eine interessante Störung bei der Entwicklung der Kornea. Ihr Phänotyp ist charakterisiert durch eine Trübung der Kornea mit Hyperplasie des Korneaepithels und die Bildung von Haarfollikeln und Talgdrüsen, was auf eine Entwicklungsstörung in Richtung normaler, verhornender Epidermis hinweist. Des Weiteren viel auf, dass in Dkk2^{-/-} Mäusen kein Pax6 mehr in der Kornea zu finden war (E15.5 und P10) [Abb. 16]; Pax6 ist ein Transkriptionsfaktor mit Homebox DNA Bindungsdomänen, der bei der Entwicklung des Auges und der Kornea große Bedeutung hat (Davis *et al.*, 2003; Ramaesh *et al.*, 2003). Es wurde daraus gefolgert, dass ein verstärktes Wnt Signaling durch die verminderte Inhibierung durch Dkk2 die Bildung von normalem Korneagewebe verhindert und stattdessen die Entwicklung normaler Epidermis induziert wird (Mukhopadhyay *et al.*, 2006). Diese Beobachtungen korrelieren mit Befunden an β B1-Crystallin-TGF- β 1 transgenen Mäusen, die ebenfalls eine undurchsichtige Hornhaut entwickeln. Dass Pax6 in Dkk2 Knock-out-Mäusen in hohem Maße herunterreguliert ist und dies mit einer erheblichen Störung der Augenentwicklung einhergeht, ist bemerkenswert. Allerdings konnte bei den β B1-Crystallin-TGF- β 1 Mutanten bislang keine Regulationsveränderung von Pax6 gezeigt werden.

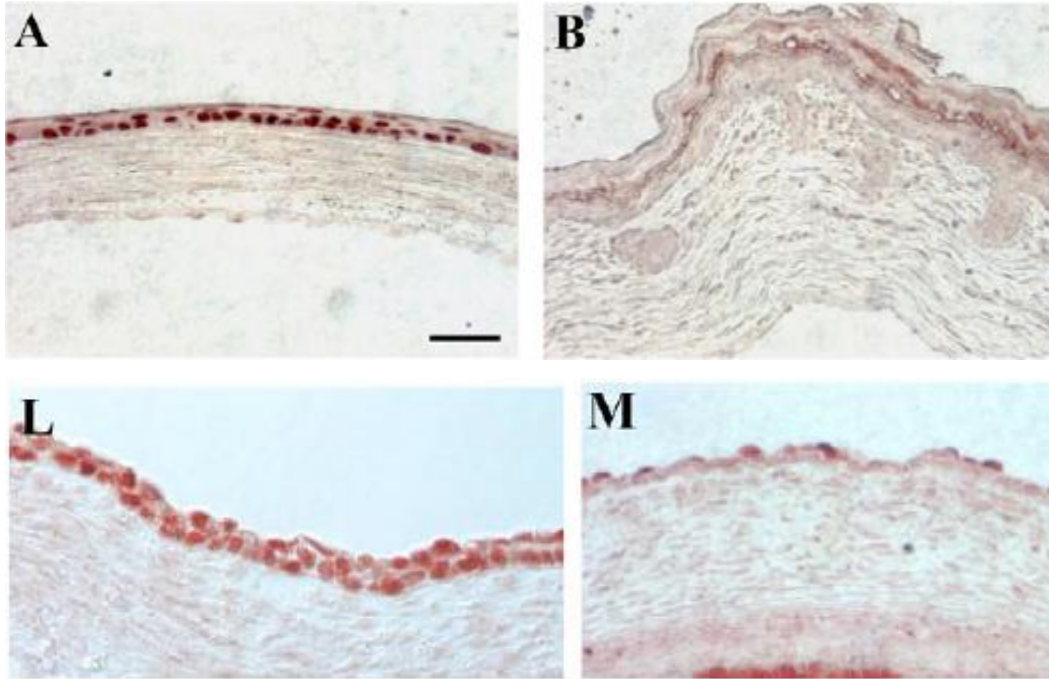


Abb. 16: An P10 wird Pax6 Protein in den Nuclei der Basalzellen des Korneaepithels von Wildtyp angefärbt (A), während es in *Dkk2*^{-/-} Mutanten fehlt (B). Das gleiche Bild zeigt sich an E15,5 in Wildtyp (L) und Mutant (M) (Mukhopadhyay *et al.*, 2006).

ZUSAMMENFASSUNG

Zum Aufbau einer differenzierten, transparenten und gefäßfreien Kornea ist die Expression zahlreicher Gene notwendig, deren Natur nicht vollständig geklärt ist. Diese Expression ist gestört bei der Wundheilung der Kornea, die zu einer undurchsichtigen Narbe führen kann, ein Vorgang bei dem Signale von TGF- β 1 eine wichtige Rolle spielen. Auch im Tiermodell führt die Überexpression von TGF- β 1 im vorderen Augenabschnitt transgener β B1-Crystallin-TGF- β 1 Mäuse zur Ausbildung einer undurchsichtigen, vaskularisierten Kornea. In der vorliegenden Arbeit sollte durch den Vergleich der Genexpression in der Kornea von β B1-Crystallin-TGF- β 1 Mäusen mit der von wildtypischen Kontrolltieren ein kompletteres Bild der Gene identifiziert werden, die für die Ausbildung einer differenzierten, transparenten Kornea notwendig sind.

Die Hornhäute von transgenen und wildtypischen Mäusen wurden am ersten Tag nach der Geburt mikroskopisch präpariert, um daraus RNA für eine Mikroarray-Analyse zu isolieren. Die nach der Analyse gewonnenen Daten wurden charakterisiert und differentiell exprimierte Gene bestimmten Funktionsgruppen zugeordnet.

Mit diesem Ansatz konnten über 200 Gene mit unterschiedlichsten molekularen Funktionen identifiziert werden, die von TGF- β 1 reguliert werden. Insbesondere konnte ein umfangreicher Einblick in die Auswirkungen von TGF- β 1 auf Synthese von Bestandteilen der extrazellulären Matrix, auf Angiogenese und auf Zell-Zell-Kommunikation erreicht werden. Besonders auffallend war dabei die differentielle Regulation der Genexpression des kornealen extrazellulären Matrixproteins Laminin 5 und des Intermediärfilaments Keratin 14, welches als möglicher Marker für Progenitorzellen des Korneaepithels nachgewiesen wurde. Ebenso konnten Prostaglandin D2 Synthase (Ptgds) und Early Growth Response 2 (Egr2) als Marker der neuronalen und kornealen Differenzierung in der undifferenzierten transgenen Kornea von β B1-Crystallin-TGF- β 1 Mäusen als differentiell reguliert beobachtet werden. Auch wurde die Hochregulation des Chemokinliganden BRAK beobachtet, welcher ein antiangiogenetischer Faktor ist und von Follistatin, welches eher angiogenetische Funktionen hat. Die differentielle Regulation der für Connexine von *Gap Junctions* kodierenden Gene lieferte interessante Hinweise auf die mögliche Bedeutung, die TGF- β 1 für die Homöostase der interzelluläre Kommunikation und Differenzierung des kornealen Zellsystems haben könnte.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit potenzielle Zielgene der Regulation durch TGF- β 1 identifiziert und dadurch zukünftige Möglichkeiten der Anwendung in Therapie und Forschung aufgezeigt. Erforderlich wird es allerdings nun sein, die aus der Microarray-Analyse gewonnenen Erkenntnisse in einem zweiten unabhängigen Assay, z. B. durch semiquantitative RT-PCR zu bestätigen. Zukünftige Untersuchungen werden zudem zeigen müssen, wie sich die Regulation der Expression auf Ebene der mRNA in der Proteinbiosynthese widerspiegelt. Westernblot und Immunoblot Untersuchungen bieten dafür gute Möglichkeiten, ebenso wie die Anfertigung von histologischen Schnitten in Spezialfärbungen und Immunhistochemie.

LITERATURVERZEICHNIS

- Affymetrix (2002-2004). GeneChip Expression Analysis Data Analysis Fundamentals
- Affymetrix (2004). Data Sheet GeneChip Mouse Genome Arrays.
- Benedek GB (1971). Theory of Transparency of the Eye. *Applied Optics* **10**(3): 459-473.
- Benninghoff A, Drenckhahn D (2003). Anatomie - Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Urban & Fischer, München.
- Brunner AM, Marquardt H, Malacko AR, Lioubin MN, Purchio AF (1989). Site-directed mutagenesis of cysteine residues in the pro region of the transforming growth factor beta 1 precursor. Expression and characterization of mutant proteins. *Journal of Biological Chemistry* **264**(23): 13660-13664.
- Cao Z, Wu HK, Bruce A, Wollenberg K, Panjwani N (2002). Detection of Differentially Expressed Genes in Healing Mouse Corneas, Using cDNA Microarrays. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**(9): 2897-2904.
- Chang CY, Laux-Fenton WT, Law LY, Becker DL, Sherwin T, Green CR (2009). Antisense down regulation of connexin31.1 reduces apoptosis and increases thickness of human and animal corneal epithelia. *Cell Biology International* **33**(3): 376-385.
- Chang J-H, Gabison EE, Kato T, Azar DT (2001). Corneal neovascularization. *Current Opinion in Ophthalmology* **12**(4): 242-249.
- Chen C, Michelini-Norris B, Stevens S, Rowsey J, Ren X-o, Goldstein M, Schultz G (2000). Measurement of mRNAs for TGF{beta} and Extracellular Matrix Proteins in Corneas of Rats after PRK. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**(13): 4108-4116.
- Chu PG, Weiss LM (2002). Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* **40**(5): 403-439.
- Conrad AH, Albrecht M, Pettit-Scott M, Conrad GW (2009). Embryonic Corneal Schwann Cells Express Some Schwann Cell Marker mRNAs, but No Mature Schwann Cell Marker Proteins. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50**(9): 4173-4184.
- Cui Chen BMN, Scott Stevens, James Rowsey, Xiao-ou Ren., Schultz MGaG Measurement of mRNAs for TGFb and Extracellular Matrix Proteins in Corneas of Rats after PRK.
- D'Antonio M, Droggiti A, Feltri ML, Roes J, Wrabetz L, Mirsky R, Jessen KR (2006). TGFbeta Type II Receptor Signaling Controls Schwann Cell Death and Proliferation in Developing Nerves. *J. Neurosci.* **26**(33): 8417-8427.
- Davis J, Duncan MK, Robison WG, Jr., Piatigorsky J (2003). Requirement for Pax6 in corneal morphogenesis: a role in adhesion. *J Cell Sci* **116**(11): 2157-2167.
- Derynck R (1994). The cytokine handbook. Academic Press Limited, Boston.

- Diehn J, Diehn M, Marmor M, Brown P (2005). Differential gene expression in anatomical compartments of the human eye. *Genome Biology* **6**(9): R74.
- Dijke Pt, Heldin C-H (2006). *Smad Signal Transduction*. Springer, Netherlands.
- Du Y, SundarRaj N, Funderburgh ML, Harvey SA, Birk DE, Funderburgh JL (2007). Secretion and Organization of a Cornea-like Tissue In Vitro by Stem Cells from Human Corneal Stroma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **48**(11): 5038-5045.
- Duncan MK, Li X, Ogino H, Yasuda K, Piatigorsky J (1996). Developmental regulation of the chicken [beta]B1-crystallin promoter in transgenic mice. *Mechanisms of Development* **57**(1): 79-89.
- Duncan MK RH, Thompson M, Kantorow M, Piatigorsky J. (1995). Chicken beta B1 crystallin: gene sequence and evidence for functional conservation of promoter activity between chicken and mouse. *Biochimica et Biophysica Acta. Mar* **14**(1261(1)): 68-76.
- Einheber S, Hannocks MJ, Metz CN, Rifkin DB, Salzer JL (1995). Transforming growth factor-beta 1 regulates axon/Schwann cell interactions. *J. Cell Biol.* **129**(2): 443-458.
- Fini MEP, Stramer BMP (2005). How the Cornea Heals: Cornea-specific Repair Mechanisms Affecting Surgical Outcomes. *Cornea* **24**(8): S2-S11.
- Flügel-Koch C, Ohlmann A, Piatigorsky J, Tamm ER (2002). Disruption of anterior segment development by TGF-beta1 overexpression in the eyes of transgenic mice. *Developmental Dynamics* **225**(2): 111-125.
- Funderburgh JL, Funderburgh ML, Mann MM, Corpuz L, Roth MR (2001). Proteoglycan Expression during Transforming Growth Factor Beta-induced Keratocyte-Myofibroblast Transdifferentiation. *Journal of Biological Chemistry* **276**(47): 44173-44178.
- Gilbert SF (2006). *Developmental Biology*. Sinauer, Sunderland, Mass.
- He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/{beta}-catenin signaling: Arrows point the way. *Development* **131**(8): 1663-1677.
- Heldin C-H, Miyazono K, ten Dijke P (1997). TGF-[beta] signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**(6659): 465-471.
- Hu MH, Bauman EM, Roll RL, Yeilding N, Abrams CS (1999). Pleckstrin 2, a Widely Expressed Paralog of Pleckstrin Involved in Actin Rearrangement. *Journal of Biological Chemistry* **274**(31): 21515-21518.
- Isabelle K-P, Sylvie H, Christian P, Réjane R, Karine R, Jean-Marc G, Philippe B (1998). Keratitis, Ichthyosis, and Deafness (KID) Syndrome in Half Sibs. *Pediatric Dermatology* **15**(3): 219-221.
- Kaufman HE (1998). *The cornea*. Butterworth-Heinemann, Boston

- Kaufman MH (1998). The atlas of mouse development. Acad. Press, London.
- Korang K, Christiano AM, Uitto J, Mauviel A (1995). Differential cytokine modulation of the genes LAMA3, LAMB3, and LAMC2, encoding the constitutive polypeptides, [alpha]3, [beta]3, and [gamma]2, of human laminin 5 in epidermal keratinocytes. *FEBS Letters* **368**(3): 556-558.
- Kozian D, Ziche M, Augustin H (1997). The activin-binding protein follistatin regulates autocrine endothelial cell activity and induces angiogenesis. *Lab Invest.* **76**(2): 267-76.
- Krachmer JHM, Mannis, Mark J. MD and Holland, Edward J. MD (2005). Cornea, 2nd Edition.
- Krauss G (2003). Biochemistry of Signal Transduction and Regulation. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Lamb TD, Collin SP, Pugh EN (2007). Evolution of the vertebrate eye: opsins, photoreceptors, retina and eye cup. *Nat Rev Neurosci* **8**(12): 960-976.
- Laux-Fenton WTM, Donaldson PJP, Kistler JP, Green CRD (2003). Connexin Expression Patterns in the Rat Cornea: Molecular Evidence for Communication Compartments. *Cornea* **22**(5): 457-464.
- Liu CY, Zhu G, Converse R, Kao CW, Nakamura H, Tseng SC, Mui MM, Seyer J, Justice MJ, Stech ME (1994). Characterization and chromosomal localization of the cornea-specific murine keratin gene Krt1.12. *Journal of Biological Chemistry* **269**(40): 24627-24636.
- Ljubimov A, Burgeson R, Butkowski R, Michael A, Sun T, Kenney M (1995). Human corneal basement membrane heterogeneity: topographical differences in the expression of type IV collagen and laminin isoforms. *Lab Invest.* **Apr**(72(4):461-73)
- Mao B, Niehrs C (2003). Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/IRP6 signaling. *Gene* **302**(1-2): 179-183.
- Massague J (1990). The Transforming Growth Factor-beta Family. *Annual Review of Cell Biology* **6**(1): 597-641.
- Massagué J (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*(Review): 67:753-91.
- Maurice DM (1957). The structure and transparency of the cornea. *The Journal of Physiology* **136**(2): 263-286.
- 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. *Cell* **31**(1): 11-24.
- Moustakas A, Heldin C-H (2009). The regulation of TGF{beta} signal transduction. *Development* **136**(22): 3699-3714.

- Mukhopadhyay M, Gorivodsky M, Shtrom S, Grinberg A, Niehrs C, Morasso MI, Westphal H (2006). Dkk2 plays an essential role in the corneal fate of the ocular surface epithelium. *Development* **133**: 2149-2154.
- Nakamura T, Takio K, Eto Y, Shibai H, Titani K, Sugino H (1990). Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science* **247**(4944): 836-838.
- Nishimura T. TS, Mitsumoto T., Oono S., Sugihara H. (1998). Effects of hepatocyte growth factor, transforming growth factor-beta1 and epidermal growth factor on bovine corneal epithelial cells under epithelial-keratocyte interaction in reconstruction culture. *Experimental Eye Research*.(Jan): 66(1):105-16.
- Nobuyuki E, Hiroto M, Kaoru M, Yasuo W, Seiichirou I, Kiyoo N, Atsushi K (2000). The Functions of Exogenous and Endogenous Laminin-5 on Corneal Epithelial Cells. *Experimental Eye Research* **71**(1): 69-79.
- Pirenne MH (1967). *Vision and the eye*. London, Chapman & Hall
- Ramaesh T, Collinson JM, Ramaesh K, Kaufman MH, West JD, Dhillon B (2003). Corneal Abnormalities in Pax6+/- Small Eye Mice Mimic Human Aniridia-Related Keratopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**(5): 1871-1878.
- Rhona M, Ashwin W, David BP, Peter A-F, Ambily B, Kristján RJ (2008). Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation. *Journal of the Peripheral Nervous System* **13**(2): 122-135.
- Richard G, Rouan F, Willoughby CE, Brown N, Chung P, Ryyänen M, Jabs EW, Bale SJ, DiGiovanna JJ, Uitto J, Russell L (2002). Missense Mutations in GJB2 Encoding Connexin-26 Cause the Ectodermal Dysplasia Keratitis-Ichthyosis-Deafness Syndrome. *The American Journal of Human Genetics* **70**(5): 1341-1348.
- Roberto B, Thomas WW, David LP (1996). Connections with Connexins: the Molecular Basis of Direct Intercellular Signaling. *European Journal of Biochemistry* **238**(1): 1-27.
- Rotzer D (2001). Biologische Charakterisierung der Rezeptoren für Transforming Growth Faktor-β. Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades.
- Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL, Doetschman T (1997). TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* **124**(13): 2659-2670.
- Schmierer B, Hill CS (2007). TGF[beta]-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(12): 970-982.
- Shah M, Foreman DM, Ferguson MW (1995). Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci* **108**(3): 985-1002.

- Shellenberger TD, Wang M, Gujrati M, Jayakumar A, Strieter RM, Burdick MD, Ioannides CG, Efferson CL, El-Naggar AK, Roberts D, Clayman GL, Frederick MJ (2004). BRAK/CXCL14 Is a Potent Inhibitor of Angiogenesis and a Chemotactic Factor for Immature Dendritic Cells. *Cancer Res* **64**(22): 8262-8270.
- Shurman DL, Glazewski L, Gumpert A, Zieske JD, Richard G (2005). In Vivo and In Vitro Expression of Connexins in the Human Corneal Epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**(6): 1957-1965.
- Smith BJ, Silver MJ, Ingerman CM, Kocsis JJ (1974). Prostaglandin D2 inhibits the aggregation of human platelets. *Thrombosis Research* **5**(3): Pages 291-299.
- Tamaoki J, Sekizawa K, Graf PD, Nadel JA (1987). Cholinergic neuromodulation by prostaglandin D2 in canine airway smooth muscle. *J Appl Physiol* **63**(4): 1396-1400.
- Tanifuji-Terai N, Terai K, Hayashi Y, Chikama T-i, Kao WWY (2006). Expression of Keratin 12 and Maturation of Corneal Epithelium during Development and Postnatal Growth. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **47**(2): 545-551.
- Usui T, Takase M, Kaji Y, Suzuki K, Ishida K, Tsuru T, Miyata K, Kawabata M, Yamashita H (1998). Extracellular matrix production regulation by TGF-beta in corneal endothelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **39**(11): 1981-1989.
- Usui T, Yamagami S, Yokoo S, Mimura T, Ono K, Amano S (2004). Gene expression profile in corneal neovascularization identified by immunology related macroarray. *Molecular Vision* **10**: 832-836.
- Wu X, Yang Y, Guo H, Chang Y (2006). The role of connective tissue growth factor, transforming growth factor β 1 and Smad signaling pathway in cornea wound healing. *Chinese Medical Journal* **119**(1)
- You L, Kruse FE (2002). Differential Effect of Activin A and BMP-7 on Myofibroblast Differentiation and the Role of the Smad Signaling Pathway. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**(1): 72-81.
- Zboralski D, Bockmann M, Zapatka M, Hoppe S, Schoneck A, Hahn S, Schmiegel W, Schwarte-Waldhoff I (2008). Divergent mechanisms underlie Smad4-mediated positive regulation of the three genes encoding the basement membrane component laminin-332 (laminin-5). *BMC Cancer* **8**(1): 215.

DANKSAGUNG

Großer Dank gilt allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Humananatomie und Embryologie der Universität Regensburg.

Für die wissenschaftliche Projektleitung, das entgegengebrachte Vertrauen und motivierende anregende Gespräche danke ich meinem Doktorvater, dem Leiter des Instituts für Anatomie und Embryologie Prof. Dr. Ernst R. Tamm.

Für mehr als professionelle Führung der Forschungsarbeit, stets fruchtsamen Ideenaustausch und freundschaftliche Zusammenarbeit meinen wissenschaftlichen Mitarbeitern und Mentoren Dr. Rudolf Fuchshofer, Dr. Markus Kröber, Dr. Monica Häring, Dr. Marcus Koch, Dr. Daniela Bohr und Dr. Andreas Ohlmann.

Für stets tatkräftige Unterstützung und professionelle Laborassistenz insbesondere Margit Schimmel (technische Assistentin Elektronenmikroskopie, Histologie), Elke Stauber (technische Assistentin Immunhistochemie und Histologie), Tina Steil (technische Assistentin Molekularbiologie), Angelika Pach (technische Assistentin Molekularbiologie und Zellbiologie) und Katharina Fizia (technische Assistentin Labortiere). Für die professionelle graphische Bildbearbeitung danke ich Herrn Antonie Maurer (technischer Assistent graphische Bildbearbeitung und Fotolabor).

Besonderer Dank gilt auch Frau Inge Köberlein, Leiterin des Sekretariats des Instituts für Humananatomie und Embryologie, für ihre stets aufmerksame Begleitung und Fürsorge während vieler Jahre.

LEBENS LAUF

Name: Lenhardt
Vornamen: Maximilian Philipp
Wohnort: Herrichstraße 18a
93049 Regensburg
Geburtsdatum: 18.06.1982
Geburtsort: Freyung
Konfession: römisch-katholisch

Aufenthaltsorte: 1982-1983 Freyung
1983-1987 Ingolstadt
1987-1992 Grainet (Besuch der Grundschule)
1992-2001 Freyung (Besuch des Gymnasiums und Abitur)
2001-2002 Bad Reichenhall (Wehrdienst)
2002-2009 Regensburg (Studium der Humanmedizin und Staatsexamen)

Auslandsaufenthalte: 2007 Italien, Auslandssemester an der Università degli Studi di Verona
2008 Südafrika, PJ Chirurgie am Victoria Hospital in Kapstadt

Ärztliche Tätigkeit: 2009-2010 Assistenzarzt in der Abteilung für Plastische- und
Ästhetische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie (Dr. med. Marita
Eisenmann-Klein, Caritaskrankenhaus St. Josef Regensburg)
Seit 2010 Assistenzarzt in der Abteilung für Chirurgie (PD Dr. med.
Alois Fürst, Caritaskrankenhaus St. Josef Regensburg)