

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Karlhans Endlich



**Regulation der Zelladhäsion in Meibomdrüsen und deren Rolle in der  
Pathogenese des Trockenen Auges**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Francesca Maria Melega

aus

Bozen, Italien

Jahr

2021



Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Karlhans Endlich



**Regulation der Zelladhäsion in Meibomdrüsen und deren Rolle in der  
Pathogenese des Trockenen Auges**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Francesca Maria Melega

aus

Bozen, Italien

Jahr

2021



---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jens Waschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Hintschich

Prof. Dr. med. Markus Sperandio

Mitbetreuung durch die  
promovierte Mitarbeiterin: Dr. rer. nat. Vera Rötzer

Dekan der medizinischen  
Fakultät: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2021



## I Eidesstattliche Versicherung



**Eidesstattliche Versicherung**  
**Affidavit**

**MELEGA, FRANCESCA MARIA**

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

**«Regulation der Zelladhäsion in Meibomdrüsen und deren Rolle in der Pathogenese des Trockenen Auges»**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Zürich, den 18.12.2021

---

Ort, Datum

Francesca Maria Melega

---

Unterschrift Doktorandin

**II Inhaltsverzeichnis**

I Eidesstattliche Versicherung ..... 7

II Inhaltsverzeichnis ..... 8

III Abkürzungsverzeichnis ..... 11

IV Übersicht ..... 14

V Abstract ..... 15

1 Einleitung..... 16

    1.1 Augenlid und Tränenfilm ..... 16

    1.2 Meibomdrüsen..... 16

    1.3 Zell-Zell-Kontakte ..... 18

        1.3.1 Desmosomen..... 18

        1.3.2 Adhärenskontakte..... 19

    1.4 Syndrom des Trockenen Auges ..... 20

        1.4.1 Definition ..... 20

        1.4.2 Einteilung, Pathogenese und Klinik..... 21

        1.4.3 Diagnose ..... 22

        1.4.4 Therapie..... 23

    1.5 Dysfunktion der Meibomdrüsen ..... 23

        1.5.1 Definition ..... 23

        1.5.2 Klassifikation und Pathogenese..... 24

    1.6 Histologie von Meibomdrüsen..... 26

    1.7 Pemphigus vulgaris und DED..... 28

    1.8 Vorarbeiten und Zielsetzung..... 29

2 Material und Methoden ..... 32

    2.1 Material ..... 32

        2.1.1 Meibom-Zelllinie ..... 32

        2.1.2 Antikörper und Mediatoren..... 32



## II Inhaltsverzeichnis

---

2.1.3 Chemikalien .....	36
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	40
2.1.5 Verbrauchsmaterialien und Geräte .....	43
2.2 Methoden .....	44
2.2.1 Zellkultur .....	44
2.2.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen .....	44
2.2.3 Aufreinigung von Patienten-/Kontrollantikörpern .....	45
2.2.4 Proteinkonzentrationsmessung .....	45
2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	46
2.2.6 Western-Blotting (WB) und Immunodetektion von Proteinen .....	46
2.2.7 Indirekte Immunfluoreszenzdarstellung.....	47
2.2.8 Zelldissoziationsversuche .....	48
2.2.10 Grafische Darstellung und statistische Auswertung der Datensätze .....	48
3 Ergebnisse.....	50
3.1 Charakterisierung der Serum-induzierten Differenzierung von Meibom-Zellen .....	50
3.1.1 Einfluss auf die adhäsiven Eigenschaften .....	51
3.1.2 Einfluss auf die Lipidproduktion .....	52
3.1.3 Einfluss auf die Bildung von Adhäsionskontakten .....	53
3.2 Modulation der Zell-Zell-Haftung und die Rolle von E-Cadherin .....	56
3.2.1 Bedeutung von E-Cadherin für die Zell-Zell-Adhäsion .....	56
3.2.2 Bedeutung von E-Cadherin für die Lipidproduktion.....	58
3.2.3 <i>Ex vivo</i> -Untersuchung von Meibomdrüsen in Dsg3 knock-out-Mäusen .....	60
3.3 Modulation der interzellulären Haftung durch Signalwege und Hyperadhäsion .....	63
3.3.1 Rolle von Signalwegen .....	63
3.3.2 Rolle der Hyperadhäsion .....	65
4 Diskussion.....	69
4.1 Serum und EPA spielen eine essentielle Rolle im Differenzierungsprozess von HMGECS .....	69

## II Inhaltsverzeichnis

---

4.2 E-Cadherin ist von zentraler Bedeutung für die Zell-Adhäsion und Lipidproduktion in Meibozyten.....	72
4.3 E-Cadherin ist für die Stabilisierung von Adhäsionsmolekülen wichtig .....	73
4.4 Korrelation zwischen Lipidproduktion und Meibomdrüsen-Morphologie in Dsg3 knock-out-Mäusen .....	74
4.5 Die Rolle der Meibomdrüsen-Dysfunktion für die Augenbeteiligung bei PV.....	74
4.6 Meibozyten erreichen einen $Ca^{2+}$ -unabhängigen Hyperadhäsionszustand .....	76
4.7 Ausblick .....	77
5 Zusammenfassung und Bewertung der wesentlichen Ergebnisse .....	79
VI Literaturverzeichnis .....	80
VII Abbildungsverzeichnis .....	89
VIII Tabellenverzeichnis .....	90
Lebenslauf.....	91
Danksagung .....	92

### III Abkürzungsverzeichnis

#### %

% *Prozent*

#### °C

°C *Grad Celsius*

#### A

Ab *engl. antibody; Antikörper*

Abb. *Abbildung*

AFM *engl. Atomic Force Microscopy*

AJ *Adhärensjunktionen*

AK23 *pathogener monoklonaler Antikörper, der gegen die extrazelluläre Domäne von Desmoglein 3 gerichtet ist*

#### B

BCA *engl. bicinchoninic acid; Bicinchoninsäure*

BSA *engl. bovine serum albumine; Kälberserum*

bzw. *beziehungsweise*

#### C

Ca<sup>2+</sup> *Calcium-Ion*

cAMP *engl. cyclic adenosinmonophosphate; zyklisches Adenosinmonophosphat*

CO<sub>2</sub> *Kohlenstoffdioxid*

#### D

d *engl. day; Tag*

DED *engl. Dry Eye Disease; Krankheit des Trockenen Auges*

DMEM *Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium*

DMSO *Dimethylsulfoxid*

Dp *Desmoplakin*

Dsc *Desmocollin*

Dsg *Desmoglein*

#### E

Ecad *E-Cadherin*

### III Abkürzungsverzeichnis

---

EGF	engl. <i>epidermal growth factor</i> ; <i>epidermaler Wachstumsfaktor</i>
EGFR	engl. <i>epidermal growth factor receptor</i> ; <i>epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor</i>
EPA	<i>Eicosapentaensäure</i>

#### F

FKS	<i>fötales Kälberserum</i>
-----	----------------------------

#### H

h	engl. <i>hour</i> ; <i>Stunde</i>
HaCaT	engl. <i>human adult low Ca<sup>2+</sup> high temperature cells</i> ; <i>humane epitheliale Keratinozyten</i>
HBSS	engl. <i>Hanks' Balanced/Buffered Salt Solution</i> , <i>gepufferte Salzlösung nach Hanks</i>
HMGECS	engl. <i>Human Meibomian Gland Epithelial Cells</i> ; <i>humane epitheliale Meibomdrüsen-Zellen</i>

#### I

IF	<i>Immunfluoreszenzdarstellung</i>
IgG	<i>Immunglobuline der Klasse G</i>

#### L

LFU	engl. <i>lacrimal functional unit</i>
-----	---------------------------------------

#### M

MGD	engl. <i>Meibomian gland dysfunction</i> ; <i>Meibomdrüsendysfunktion</i>
ml	<i>Milliliter</i>

#### N

ng	<i>Nanogramm</i>
----	------------------

#### P

PF	<i>Pemphigus foliaceus</i>
PKA	<i>Proteinkinase A</i>
PKC	<i>Proteinkinase C</i>
PV	<i>Pemphigus vulgaris</i>

---

**R**

RT *Raumtemperatur*

**S**

SDS *engl. sodium dodecyl sulfate; Natriumdodecylsulfat*

SEM *engl. standard error of mean; Standardfehler*

SFM *engl. serum free medium; serumfreies Medium*

sog. *sogenannt*

**U**

U *Unit*

**W**

WB *Westernblot*

WT *Wildtyp*

**M**

µg *Mikrogramm*

µM *mikromolar, µmol/L*

## IV Übersicht

Meibomdrüsen sind modifizierte, holokrine Talgdrüsen in den Augenlidern und sehr wichtig für den Erhalt der Integrität und der Gesundheit der Augenoberfläche. Da Meibomdrüsen mit ihrem öligen Sekret die Tränenflüssigkeit stabilisieren, ist eine Dysfunktion der Drüsen (Meibomian gland dysfunction, MGD) heutzutage als Hauptursache des sog. Trockenen Auges (Dry eye disease, DED) anerkannt. Aus früheren *in situ*-Studien unserer Arbeitsgruppe mit humanen Augenlidern ist bekannt, dass die Anzahl der Desmosomen in Meibomdrüsen im Laufe der Zelldifferenzierung zunimmt. Auch Pemphigus vulgaris (PV), eine chronische, mit Blasenbildung an Haut und/oder Schleimhäuten einhergehende Autoimmunerkrankung, die durch Autoantikörper gegen hauptsächlich desmosomale Cadherine verursacht wird, ist sehr häufig mit DED assoziiert. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit zum einen sowohl die Ausbildung als auch die Rolle der intakten Zellhaftung zwischen Meibozyten als auch eine mögliche Bedeutung der Zell-Zell-Kontakte in der Pathogenese der MGD untersucht. Dafür wurde die stabile humane Meibozyten-Zelllinie HMGEC (human meibomian gland cells) verwendet. Dafür mussten zuerst die optimalen Differenzierungsbedingungen für diese Zelllinie etabliert und zwei Zeitpunkte festgelegt werden, die sich gut mit einem frühen und einem späteren Zeitpunkt in der Reifung der Zellen in Verbindung bringen ließen. Dabei war es das Ziel, die HMGECs zu charakterisieren und die Adhäsionskräfte in den verschiedenen Differenzierungsstadien zu quantifizieren. Zunächst waren die desmosomalen Proteine im Zentrum der Untersuchungen, da diese essentiell für die Vermittlung starker Zellkontakte in vielen Geweben sind. Diese Daten zeigen jedoch, dass die Zellhaftung in Meibozyten anders als in anderen Epithelien reguliert wird. Zudem liegt Grund zur Annahme vor, dass eher Adhärensjunktionen als Desmosomen essentiell für die Adhäsionskontakte zwischen Meibomdrüsenzellen und für die Sekretproduktion sind.

Der Großteil der hier beschriebenen Ergebnisse und dargestellten Abbildungen wurde bereits veröffentlicht:

*Rötzer V, Melega F, Garreis F, Paulsen F, Waschke J. E-Cadherin Is Important for Meibomian Gland Function as Revealed by a New Human ex Vivo Slice Culture Model. Am J Pathol. 2019 Aug;189(8):1559-1568. doi: 10.1016/j.ajpath.2019.04.015. Epub 2019 May 20. PMID: 31121132.*

## V Abstract

Meibomian glands are modified, holocrine sebaceous glands within the eyelid important for the maintenance of the integrity and health of the ocular surface. These glands produce an oily secret which stabilizes the tear film. Therefore, a dysfunction of the glands (Meibomian Gland Dysfunction, MGD) is nowadays seen as the leading cause of the so-called Dry eye disease (DED). Former *in situ* research done by our group showed that the number of desmosomes in Meibomian glands increases over time during cell differentiation. What is more, Pemphigus vulgaris, a chronic blistering autoimmune disease caused by autoantibodies against desmosomal cadherins, is very often associated with DED.

With this work we firstly wanted to analyse the physiological conditions for the formation of cell-cell-contacts in Meibomian glands and secondly investigate the role of cell cohesion in the pathogenesis of the Meibomian gland dysfunction. We used a stable human meibocyte cell-line (human meibomian gland cells, HMGECs) and started with identifying the perfect conditions for differentiation. We determined two points in time that were associated with an early and a more mature state of differentiation. We then wanted to analyze the exact composition of cell cohesion molecules in Meibomian glands and quantify the adhesion strength during maturation. Desmosomal cadherins were of major interest in the beginning, because they are known to be essential for strong cell cohesion in various tissues. However, this data shows that cell cohesion is regulated differently in Meibomian glands. What is more, there is evidence that the adherens junction component E-cadherin, and not desmosomes, is crucial for the maintenance of physiological processes in Meibocytes.

## 1 Einleitung

### 1.1 Augenlid und Tränenfilm

Das Augenlid spielt eine wesentliche Rolle für den Erhalt der Homöostase des menschlichen Auges. Es erfüllt eine Schutzfunktion vor äußeren Verletzungen und sorgt dafür, dass die Tränenflüssigkeit gleichmäßig auf die Augenoberfläche verteilt wird. Ober- und Unterlid sind im Prinzip gleich aufgebaut und bestehen aus mehreren Komponenten, die alle ihren eigenen Teil zur Physiologie des Auges beitragen (Lüllmann-Rauch, 2015). Nach außen wird das Augenlid von einer dünnen Epidermisschicht bedeckt, auf die nach innen das Bindegewebe folgt. Das Bindegewebe enthält einerseits die Muskulatur, und zwar den *M. orbicularis oculi*, den *M. tarsalis superior* und *inferior* und die Sehne des *M. levator palpebrae superioris*, und andererseits Blutgefäße, Wimpern, Drüsen und den Tarsus. Letzterer ist das bindegewebige Skelett des Augenlides und in ihm befinden sich die länglichen Meibomdrüsen, die mit ihrem Ausführungsgang auf die Innenseite des Lids und somit auf die Augenoberfläche münden. Nach innen bildet die Konjunktiva die dem Auge direkt anliegende Schicht und Begrenzung des Lids (Abb. 1A) (Welsch et al., 2014).

Der Tränenfilm ist für den Erhalt der Gesundheit des Auges ausschlaggebend, da er eine gesäuberte und geschützte Oberfläche für die umliegenden Strukturen garantiert (Willcox et al., 2017). Zudem ist der Tränenfilm wesentlich an der Lichtbrechung und somit am Sehen beteiligt. In der Fachliteratur wird ein dreischichtiger Aufbau des Tränenfilms beschrieben: Der Kornea anliegend befindet sich die wässrige Schicht und darüber die Lipidschicht, welche die wässrige Schicht stabilisiert (Waschke, Böckers, & Paulsen, 2019).

### 1.2 Meibomdrüsen

Meibomdrüsen sind längliche Talgdrüsen und befinden sich im Tarsus des oberen und unteren Augenlides, weshalb sie auch Glandulae tarsales genannt werden (Abb. 1B). Es handelt sich um holokrine Drüsen, die im Unterschied zu anderen Talgdrüsen nicht in Bezug zur Behaarung und im Falle des Auges nicht in Bezug zu den Wimpern stehen (Welsch et al., 2014). Das erste Mal wurden sie im Jahre 1666 ausführlich von Heinrich Meibom beschrieben, einem deutschen Arzt, nach dem sie auch benannt sind. Obwohl diese Drüsen gewisse Ähnlichkeiten mit anderen Talgdrüsen aufweisen, unterscheiden sie sich doch beträchtlich hinsichtlich ihrer Anatomie, Lokalisation und Funktion sowie Zusammensetzung des produzierten Talgs (Knop, Knop, Millar, Obata, & Sullivan, 2011). Diese holokrinen Drüsen bestehen aus Azini, welche sich radiär um einen zentralen



Ausführungsgang befinden, der mit seiner Öffnung nahe der inneren Lidkante mündet. Im Oberlid befinden sich in etwa 30 Drüsenstränge, im Unterlid hingegen etwas weniger, wobei deren durchschnittliche Länge 2-5,5 mm beträgt (Greiner et al., 1998). Die Regulation der Drüsen erfolgt zu einem großen Teil durch Geschlechtshormone, wobei hauptsächlich Androgene stimulierend auf die Protein- und Lipidsynthese wirken (Schröder et al., 2016). Die Innervation der Meibomdrüsen erfolgt ähnlich wie bei der Tränendrüse primär parasympathisch (N. Knop & E. Knop, 2009).

Meibomdrüsen versorgen das Auge mit einem öligen Sekret, dem Meibum, der hauptsächlich aus Lipiden besteht und durch den Tränenschlag über der Augenoberfläche verteilt wird. Dadurch legt sich das Meibum auf die Tränenflüssigkeit, bildet die äußerste Schicht davon und schützt sie vor dem Verdampfen. So tragen Meibomdrüsen in entscheidendem Maße zur Homöostase des Auges und dem Erhalt der Augenfeuchtigkeit bei (N. Knop & E. Knop, 2009). Der Sekretionsmechanismus ist holokrin, was bedeutet, dass die Zellen das Sekret nicht in ein freies Lumen abgeben, sondern dass sich die apikalen Zellschichten auflösen, zugrunde gehen und so zusammen mit dem Sekret in einen gemeinsamen Ausführungsgang münden (Welsch et al., 2014). Die Sekretionsart beruht auf der Tatsache, dass die Zellen durch programmierten Zelltod sterben und dann als Ganzes (gr.: holos, ganz) das Drüsensekret bilden (Lüllmann-Rauch, 2015). In den basalen Schichten der Drüsenzini befinden sich die teilungsfähigen und proliferierenden Zellen, die im Laufe der Zeit und mit Zunahme der Reifung in die apikalen Schichten wandern und auf dem Weg dahin den Talg produzieren und im Zellinneren in Form von Tröpfchen ablagern. Das Meibum menschlicher Meibomdrüsen besteht zu 52% aus Wachs-Estern, zu 44% aus Cholesterin-Ester, zu ca. 3% aus (O-Acyl)-Omega-Hydroxyfettsäuren, zu 1,5% aus Triacylglyceriden und zu einem sehr kleinen Teil aus Phospholipiden (Butovich, Wojtowicz, & Molai, 2009; Hampel & Garreis, 2017). Da sich das Meibum über die Augenoberfläche legt und, wie bereits oben beschrieben, zur Stabilität der Tränenflüssigkeit beiträgt, wird es häufig als Bestandteil des Tränenfilms gesehen. Es trägt somit in entscheidendem Maße dazu bei, dass der Tränenfilm seine antimikrobiellen und reinigenden Aufgaben erfüllen kann (Knop et al., 2011).

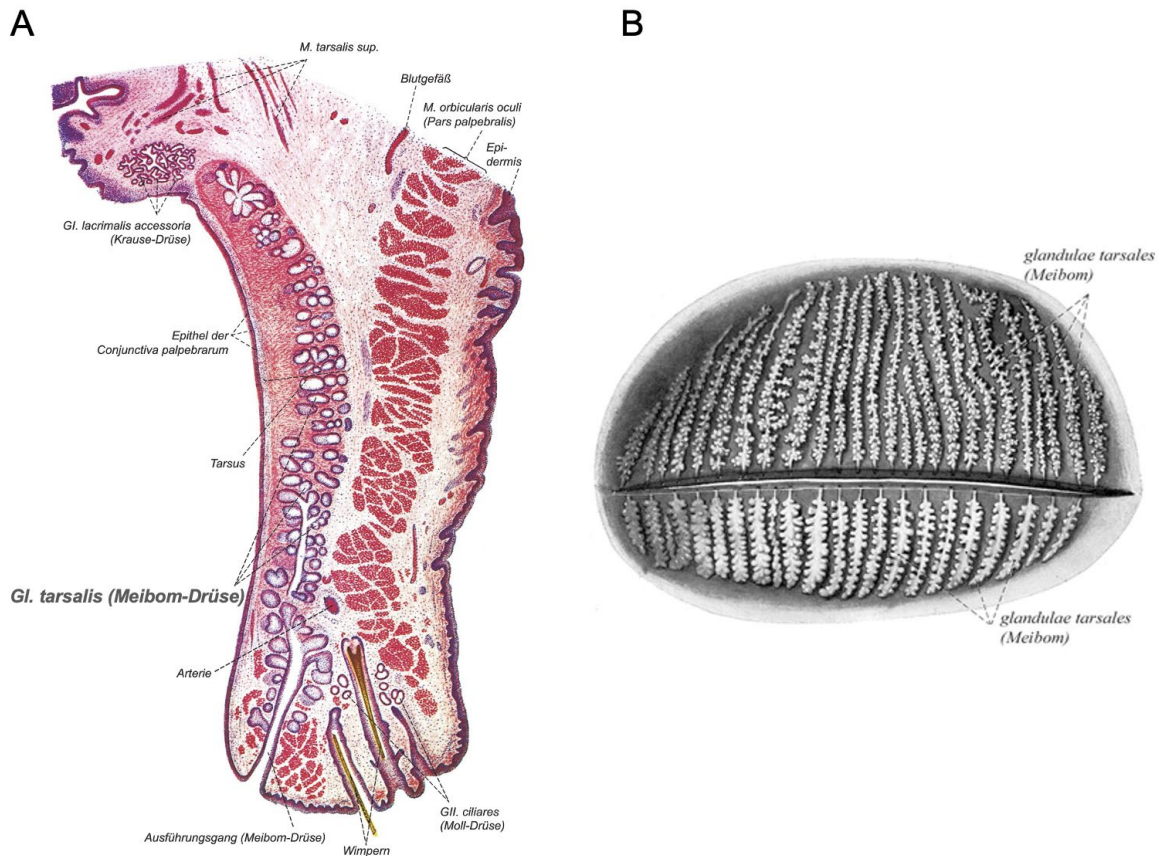


Abbildung 1: Lokalisation der Meibomdrüsen im humanen Auge

A) Histologische Darstellung eines Augenlids. Modifiziert nach Welsch, U., Deller, T., Kummer, W., 2014. Lehrbuch Histologie. Elsevier, Urban & Fischer, München. B) Anordnung der Meibomdrüsen im oberen und unteren Augenlid. Modifiziert nach Knop et al., IOVS, 2011.

## 1.3 Zell-Zell-Kontakte

### 1.3.1 Desmosomen

Desmosomen zählen zu den intrazellulären Haftkontakten, sie sind scheibenförmig aufgebaut (*Maculae adhaerentes*) und haben einen Durchmesser von ungefähr 0,3-0,5  $\mu\text{m}$ . An der Stelle, wo Zellen durch Desmosomen verbunden sind, liegt ein interzellulärer Spalt von 20-40 nm vor (Lüllmann-Rauch, 2015). Da Desmosomen im Zytoplasma eine Verbindung zu Intermediärfilamenten aufweisen, stellen sie eine adhäsive Verbindung dar, die dem Gewebe eine besondere mechanische Stärke verleiht. Daher kommen Desmosomen hauptsächlich in Geweben vor, die einem großen mechanischen Stress ausgesetzt sind, wie die Haut, die Schleimhäute und das Myokard (Waschke, 2008). Dabei sei erwähnt, dass die Stärke dieser Haftkontakte daher rührt, dass Desmosomen Teil eines Komplexes sind, der aus drei Domänen besteht. Außerhalb der Zellen befinden sich die extrazellulären Domänen, die die dichte Mittellinie der desmosomalen Cadherine

bilden, intrazellulär befinden sich die äußere und die innere dichte Plaqueregion (Garrod & Chidgey, 2008). Die drei vorkommenden Proteintypen sind: desmosomale Cadherine, Vertreter der Armadillofamilie und Vertreter der Plakinfamilie (Plaquesproteine). Die desmosomalen Cadherine (Desmogleine 1-4 und Desmocolline 1-3) bilden die interzelluläre Einheit, während die anderen zwei Komponenten an der Bildung der intrazellulären Plaques beteiligt sind (Waschke, 2008). Desmosomale Cadherine gehen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Bindungen mit den Molekülen benachbarter Zellen ein, Plakoglobin und Plakophilin aus der Familie der Armadilloproteine hingegen stellen zusammen mit Desmoplakin aus der Plakin-Proteinfamilie die Verbindung und Interaktion zu den Keratinfilamenten her. So ist eine enge Verknüpfung des Zytoskeletts mit den Zelladhäsionsmolekülen gegeben (Delva, Tucker, & Kowalczyk, 2009). Wie neuere Untersuchungen zeigen, sind die desmosomalen Cadherine auch an der Regulation von intrazellulären Signalwegen beteiligt und erfüllen dadurch Funktionen, die über die rein mechanische Haftungsfunktion hinausgehen (Waschke & Spindler, 2014).

### 1.3.2 Adhärenskontakte

Adhärenskontakte stellen neben den desmosomalen Kontakten die zweite Gruppe von intrazellulären Haftkontakten dar. In der Regel liegen Adhärensjunktionen als *Zonulae adhaerentes* vor und verbinden wie eine Art Gürtel die Zelle rundherum mit allen Nachbarzellen (Lüllmann-Rauch, 2015). Der Spalt zwischen den zwei benachbarten Zellmembranen beträgt in etwa 20 nm und die Länge der Zonula adhaerens liegt bei 0,2-0,5  $\mu\text{m}$ . Die beteiligten Adhäsionsmoleküle sind Cadherine, welche benachbarte Plasmazellmembranen verbinden, indem sie überwiegend homophile Bindungen eingehen (Niessen, 2007). Cadherine sind mit den sogenannten Cateninen assoziiert, welche zyttoplasmatische Proteine sind und ihrerseits mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden sind (Meng & Takeichi, 2009). Es wurde beobachtet, dass die Assemblierung von Adhärensjunktionen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig ist und dass die verschiedenen Cadherine je nach Zelltyp unterschiedlich exprimiert werden. So wird beispielsweise E-Cadherin (E-Cad) hauptsächlich in Epithelien und N-Cadherin (N-Cad) in Nervenzellen exprimiert. Außerdem spielt diese Art der Zell-Zell-Kontakte vor allem in der embryologischen Entwicklung eine entscheidende Rolle. P- und E-Cad werden in den embryologischen Keimblättern (Endo-, Ekto- und Mesoderm) und in der Plazenta exprimiert, wobei sich die Expressionsmuster je nach Entwicklungsstadium ändern. Das deutet an, dass die verschiedenen Cadherine eine wichtige Rolle in der Implantation und Morphogenese des Embryos spielen sowie in der Organisierung des Gewebes und der Zellwanderung, indem sie den verschiedenen Zelltypen unterschiedliche adhäsive Eigenschaften verleihen.

Cadherine sind auch an der Regulierung von verschiedenen Signalwegen beteiligt (Niessen, 2007; Niessen, Leckband, & Yap, 2011; Nose & Takeichi, 1986; Yoshida-Noro, Suzuki, & Takeichi, 1984).

### 1.4 Syndrom des Trockenen Auges

#### 1.4.1 Definition

In den letzten 30 Jahren hat das Interesse für das sogenannte Trockene Auge (engl. Dry eye disease, DED) stetig zugenommen. Dabei haben sich verschiedene Organisationen und Forschungsgruppen darum bemüht, den klinischen Umgang mit DED und die Therapieoptionen zu verbessern. Um die Diagnostik und die Therapie international zu erleichtern, hat man erstmal an einer allgemein gültigen Definition gearbeitet, die evidenzbasiert und zeitgemäß sein sollte (Craig et al., 2017). Die erste veröffentlichte Definition von DED stammt aus dem Jahre 1995 basierend auf dem Konsensus der NEI/Industry working group on Clinical Trials in Dry Eye (Lemp, 1995), laut dem eine mangelhafte Tränenflüssigkeit oder eine exzessive Verdampfung eine Fehlfunktion des Tränenfilms verursachen. Daraus resultieren die Schädigung der Augenoberfläche und die damit assoziierten Augenbeschwerden.

Im Laufe der Zeit wurde man sich zudem einig, dass das Trockene Auge aus einer Fehlfunktion der Lacrimal Functional Unit (LFU) hervorgeht. Dabei handelt es sich um ein System, das für die Aufrechterhaltung der Homöostase des Auges sorgt und aus den folgenden Anteilen besteht: der Tränendrüse, der Augenoberfläche mit Kornea und Konjunktiva, den Augenlidern und den Meibomdrüsen sowie der sensorischen und motorischen Innervation aller beteiligten Komponenten. Die LFU kontrolliert und reguliert den Großteil der Tränenzusammensetzung und -Produktion, indem sie auf hormonelle, kortikale und äußere Einflüsse reagiert. Einige oder auch alle Strukturen gemeinsam können an der Entstehung des Trockenen Auges beteiligt sein (Stern et al., 1998; Stern, Gao, Siemasko, Beuerman, & Pflugfelder, 2004; Stern, Schaumburg, & Pflugfelder, 2013). Etwa 10 Jahre nach der ersten offiziellen Definition wurde im Rahmen des „International Dry Eye Workshop“ eine neue Definition geliefert, welche die neuen Kenntnisse bezüglich der Rolle von Hyperosmolarität und Entzündung miteinschließen sollte (Lemp et al., 2007). Laut dieser wurde das Trockene Auge als ein Syndrom multifaktorieller Genese verstanden, welches hauptsächlich aufgrund der Tränenfilm-Instabilität zu einer Schädigung der Augenoberfläche führt, wobei man eine hohe Empfindlichkeit und Seheinschränkung mit begleitender Entzündung des Auges als vordergründige Symptome sah. Damit wurde festgelegt, dass es sich um eine

multifaktorielle Erkrankung handelt, deren Ätiologie und Pathogenese aber noch nicht vollends verstanden war.

Im Jahre 2017 haben die Mitglieder des Tear Film Subcommittee die Definition neu formuliert und dabei besonders die Rolle des Tränenfilms erneut evaluiert. Man hat dafür biophysische und biochemische Aspekte der Tränenflüssigkeit im Rahmen der DED überprüft und den *circulus vitiosus* der Erkrankung zur Kenntnis genommen (Baudouin et al., 2016). Zusammenfassend kann man sagen, dass besonders auf den multifaktoriellen Charakter der Krankheit sowie auf den instabilen Tränenfilm und auch auf die mögliche Rolle von neurosensorischen Abnormitäten (Belmonte et al., 2017) eingegangen wurde. Dabei wurde in der Definition betont, dass der Verlust der Homöostase des Tränenfilms ausschlaggebend für die Symptome ist und ätiologisch die Hyperosmolarität, die Tränenfilm-Instabilität, Oberflächenentzündung und -verletzung sowie neurosensorische Anomalien führend sind (Craig et al., 2017).

### 1.4.2 Einteilung, Pathogenese und Klinik

Da das offene Auge ständig der Gefahr der Austrocknung ausgesetzt ist, gibt es ein Zusammenspiel von Mechanismen und Strukturen, die den Erhalt der nötigen Feuchtigkeit sicherstellen. Im Falle der DED kommt es zu einer Fehlfunktion dieser Mechanismen, welche zu einer quantitativen oder qualitativen Veränderung der Tränenflüssigkeit und des Tränenfilms führen (Bron et al., 2017).

Analysen der größten epidemiologischen Studien zum Trockenen Auge (Women's Health Study (WHS), Physician's Health Study (PHS)) zeigen, dass ca. 5-30 % der Amerikaner über 50 Jahren von DED betroffen sind, wobei die Anzahl der betroffenen Frauen höher als die der Männer ist (Smith, 2007).

Es ist mittlerweile anerkannt, dass die sensorischen Nerven der Augenoberfläche im Rahmen der Erkrankung strukturellen und funktionellen Änderungen unterliegen, welche dann unter anderem die Symptomatik verursachen. Die Symptome reichen von mildem Unwohlsein bis hin zu starker Trockenheit und brennendem Schmerz. Bei chronischem DED ist es sehr wahrscheinlich, dass sogar mehrere Abschnitte der neurologischen Achse betroffen sind, sodass daraus eine veränderte Gewebeversorgung und Tränenproduktion sowie ein abgeschwächter Blinkreflex resultieren (Belmonte et al., 2017).

Es gibt mehrere geschlechtsbezogene Unterschiede, welche sich auf die Physiologie des Auges auswirken (Sullivan et al., 2017). Viele dieser Unterschiede hängen mit den Geschlechtshormonen zusammen, wie z.B. Androgene oder Östrogene, aber auch mit

hypothalamischen Hormonen, Glukokortikoiden, Insulin und anderen. Androgene sind beispielsweise äußerst wichtig für die Regulierung der Homöostase der Augenoberfläche und der Augenanhangsgebilde. So kann ein Androgenmangel zu einer Fehlfunktion der Tränendrüse führen und zählt zu den Risikofaktoren für die Entstehung einer Fehlfunktion der Meibomdrüsen (Schröder et al., 2016).

### 1.4.3 Diagnose

Wolffsohn et. al (Wolffsohn et al., 2017) hatten es sich zum Ziel gesetzt, die effizientesten und sichersten Tests zu nennen, um DED diagnostizieren und im Krankheitsverlauf überwachen zu können. Wichtig ist es dabei Tests miteinzuschließen, die im klinischen Alltag gängig eingesetzt werden und andere Erkrankungen ausschließen, welche eine ähnliche Symptomatik wie DED aufweisen. Fragebögen sind die am meisten verwendeten Diagnosemittel und sollten auch weiterhin verwendet werden (Korb, 2000; Nichols, Nichols, & Zadnik, 2000). Der sogenannte OSDI (Ocular Surface Disease Index) ist der am meisten verwendete Fragebogen und erfüllt seine Aufgabe sehr gut, sodass das Wolffsohn-Komitee diesen Test oder in Alternative den DEQ-5-Fragebogen (5-Item Dry Eye Questionnaire) empfiehlt (Baudouin et al., 2014; Chalmers, Begley, & Caffery, 2010; Schiffman, Christianson, Jacobsen, Hirsch, & Reis, 2000). Nachdem mittels einem dieser zwei Fragebögen der Verdacht bekräftigt wurde, dass der Patient DED haben könnte, sollte eine nicht-invasive Diagnostik durchgeführt werden. Um die Stabilität des Tränenfilms zu untersuchen, wird die sog. „Tear Film Breakup Time“ gemessen (Johnson & Murphy, 2005). Der in der Augenheilkunde gut etablierte Schirmer-Test wird verwendet, um die Produktion der Tränenflüssigkeit zu messen. Auch die Osmolarität kann nicht-invasiv gemessen werden und es steht ein Grenzwert von 316 mOsm/l fest, der vom Komitee als validiert zu betrachten gilt (Tomlinson, Khanal, Ramaesh, Diaper, & McFadyen, 2006). Als nicht-invasive Methoden werden zudem Färbungen der Kornea, der Konjunktiva und des Lidrandes vorgeschlagen, die auf eine Verletzung der genannten Strukturen schließen lässt (Korb, Herman, Finnemore, Exford, & Blackie, 2008). Was dann als Diagnostik folgen sollte, ist die Subtyp-Klassifikation der DED in Evaporative dry eye (EDE) oder Aqueous deficient dry eye (ADDE), welche aus dem Grad der MGD, der Lipiddicke und -dynamik sowie aus dem Tränenvolumen hervorgeht (Wolffsohn et al., 2017).

Auch von Tomlinson et. al wird auf übersichtliche Art ein diagnostisches Vorgehen geschildert, um die Diagnose MGD zu stellen. Dieses hat sich aus der Forschung von verschiedensten Gruppen ergeben und sieht zusammengefasst wie folgt aus: Fragebögen, Lidschlagfrequenz, Höhe des Tränenmeniskus, Tränenosmolarität, Fluoresceinfärbung,

Schirmer-Test und Meibographie (Arita, Itoh, Inoue, & Amano, 2008; Bailey, Bullimore, Raasch, & Taylor, 1991; Sparrow, Frost, Pantelides, & Laidlaw, 2000; Tomlinson et al., 2011).

### 1.4.4 Therapie

Das TFOS DEWS II-Komitee für Management and Therapy von DED (Jones et al., 2017) schlägt ein Stufenschema für die Therapie des Trockenen Auge vor. Dieses sieht zusammengefasst wie folgt aus:

1. Stufe: Patientenschulung, Eliminierung von äußeren negativen Einflüssen, diätetische Maßnahmen (wie z.B. die Einnahme von oralen essentiellen Fettsäuren), Eliminierung von Medikamenten, die die Krankheit verschlechtern; Augensalben, Augenhigiene und warme Kompressen.
2. Stufe: Erhaltung der Tränenflüssigkeit durch Verschluss der Abflusswege (puncta lacrimalia) oder durch Tragen von Feuchtigkeitsbrillen, verschreibungspflichtige Medikamente gegen die Entzündung (Antibiotika, Kortikosteroide, andere immunmodulatorische Medikamente), sekretorisch-wirkende Medikamente.
3. Stufe: Applikation oraler sekretorisch-wirkender Medikamente autologer oder allogenetischer Serum-Augentropfen sowie therapeutischer Kontaktlinsen.
4. Stufe: Gabe topischer Kortikosteroide über einen längeren Zeitraum sowie Anwendung chirurgischer Maßnahmen.

## 1.5 Dysfunktion der Meibomdrüsen

### 1.5.1 Definition

Eine Fehlfunktion der Glandulae tarsales wird im Englischen als Meibomian Gland Disease oder Meibomian Gland Dysfunction (MGD) bezeichnet. Dass im englischsprachigen Raum die Bezeichnung Meibomian Gland Dysfunction häufiger als die Bezeichnung Disease verwendet wird, hängt vermutlich damit zusammen, dass die Befunde eher als Funktionsstörung und nicht als eigenständige Erkrankung aufgefasst werden (Knop et al., 2009; Knop et al., 2011).

Das Subkomitee für Definition und Klassifikation am International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction schlägt eine Definition für die MGD vor, welche besagt, dass es sich um eine chronische Fehlfunktion der Drüsen handelt, wobei diese meistens mit einer Obstruktion der Ausführungsgänge und/oder mit Veränderungen der Sekretion einhergeht. Die Folgen dieser Anomalie können Änderungen des Tränenfilms, Irritation

des Auges, Entzündung und eine Erkrankung der Augenoberfläche sein (Nelson et al., 2011).

### 1.5.2 Klassifikation und Pathogenese

Seit Ende der 70er-Jahre werden die Meiboskopie und -graphie in der Diagnostik der MGD verwendet, um Veränderungen in der Morphologie der Drüsen zu dokumentieren und die Fehlfunktion zu klassifizieren (Jester et al., 1982; Mathers, Daley, & Verdick, 1994; Robin, Jester, Nobe, Nicolaides, & Smith, 1985). Neben diesen beiden Techniken gibt es noch weitere Tests, um eine Bewertung der Drüsen durchzuführen. Dazu zählen zum Beispiel (Foulks & Bron, 2003):

- die Evaporimetrie zur Messung des Wasserverlustes am offenen Auge
- die Interferometrie zur Messung der Lipidschichtdicke aufgrund ihrer Interferenzfarben;
- die Meniscometrie zur Messung des Volumens des Tränenmeniscus
- die Meibometrie zur Bestimmung der vorliegenden Meibum-Menge am Lidrand
- Untersuchung der Eigenschaften des sezernierten Meibums

Die Klassifikation der MGD erfolgt meistens aufgrund der Sekretionsrate. Demnach kann man eine verminderte und eine erhöhte Sekretion unterscheiden. Bei Vorliegen einer erhöhten Sekretion handelt es sich um eine hypersekretorische Störung, während man bei einer verminderten Sekretion nochmal zwei Subkategorien unterscheiden kann: Obstruktion des Ausführungsganges oder Hyposekretion ohne Vorliegen einer Obstruktion (Nichols et al., 2011). Die verminderte Lipidproduktion aufgrund einer Obstruktion ist die häufigste Ursache für MGD (Foulks & Bron, 2003; Knop et al., 2011).

Mögliche Pathomechanismen und Faktoren, die zu einer MGD führen, wurden vom International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction im Jahre 2011 vorgeschlagen und in mehreren Artikeln übernommen bzw. adaptiert (Baudouin et al., 2016; Chhadva, Goldhardt, & Galor, 2017; E. Knop & N. Knop, 2009; Knop et al., 2011; Nichols et al., 2011). Im Zentrum dieser Kausalitäten steht als häufigste Ursache die Obstruktion der Drüsenöffnungen. Als erste kausale Prozesse werden auf der einen Seite (a) Faktoren wie Alter, Geschlecht, hormonelle Störungen und Medikation betrachtet, auf der anderen Seite sind (b) Alterungsprozesse und Veränderungen des Meibum zu nennen. Die unter (a) genannten Punkte führen zur Hyperkeratinisierung des Drüsengangsystems sowie zu atrophischen Prozessen und wirken sich auch auf die Beschaffenheit des Meibums aus.



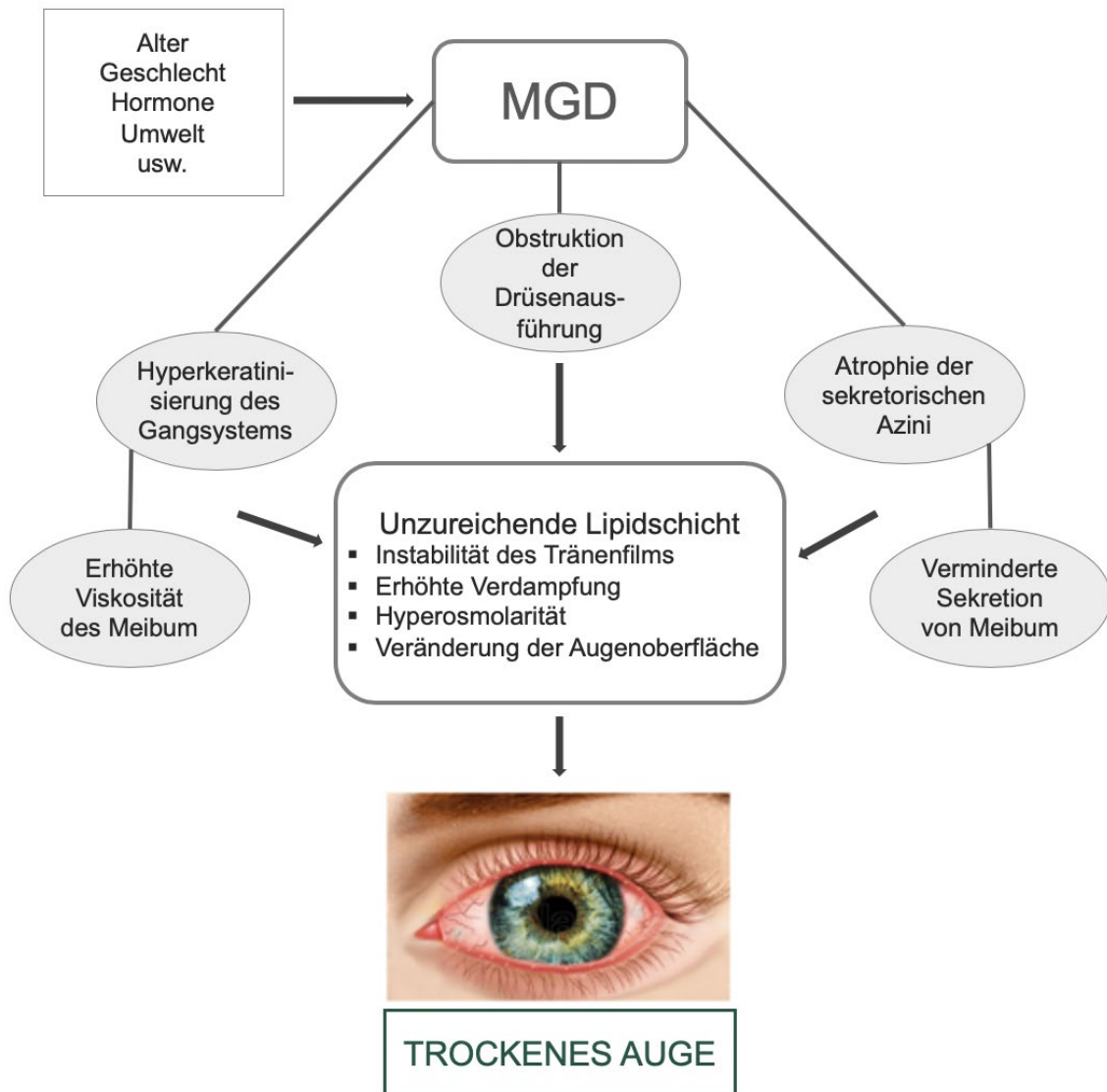


Abbildung 2: Pathophysiologie des Trockenen Auges (DED) und der Dysfunktion von Meibomdrüsen (MGD)

Modifiziert nach Knop et al., IOVS, 2011.

Die unter (b) genannten Faktoren führen einerseits zu einer erhöhten Viskosität oder zu Seborrhoe und erhöhten bakteriellen Wachstum mit nachfolgender Entzündung, die möglicherweise auch zur Atrophie führt. Die Obstruktion als zentrales Element der Dysfunktion von Meibomdrüsen führt einerseits unmittelbar zu einer verminderten Sekretion von Meibum und dann zu DED. Sie kann aber auch zu einer Reihe negativer Prozesse innerhalb der Meibomdrüsen selbst führen, indem es zur Meibumstase kommt, welche zu einem erhöhten Druck im Gangsystem und danach zu einer Dilatation führt. Die Stase kann im Sinne eines Teufelskreises ebenfalls Hyperkeratinisierung und eine erhöhte Viskosität verursachen, die wiederum zu einer vermehrten Obstruktion führen. Die Dilatation bringt zudem im Laufe der Zeit ebenfalls eine Atrophie der Azini mit sich,

wodurch auch eine verminderte Sekretion und das Trockene Auge entstehen. Eine vereinfachte Version dieser Interaktionen ist in Abb. 2 zu sehen.

Für alle Talgdrüsen gilt, dass sie durch eine Vielzahl von Faktoren reguliert werden. Diese Faktoren spielen sowohl im Gesunden als auch im Kranken eine große Rolle und regulieren Wachstum, Differenzierung, Reifung, Lipidproduktion und Sekretion. Es handelt sich dabei um Sexualhormone, Kortikosteroide, hypothalamische und epiphysäre Hormone, Retinoide, Neurotransmitter, Wachstumshormone und viele andere, wie aus einer Übersichtstabelle im Special Issue Article des IOVS (Knop et al., 2011) ersichtlich wird: Das lässt folgen, dass das Zusammenspielen mehrerer Faktoren zu einer Fehlregulation und demnach Dysfunktion der Drüsen führen kann. Die genauen Prozesse und die exakte Pathogenese sind aber noch ein offenes Feld für die Forschung. Bisher hat sich die Forschung vor allem auf die Effekte von Androgenen, Östrogenen, Progesteron, all-trans-Retinsäure und Wachstumsfaktoren konzentriert. Es gibt auch Hinweise dafür, dass gewisse Gene die Progression der Erkrankung fördern und dass sie mit einer Alteration von über 400 Genen assoziiert ist. Eine solche Genfamilie kodiert für die small proline-rich (SPRR) Proteine, welche im Rahmen einer MGD hochreguliert sind (Liu et al., 2011). Die SPRR-Gene werden in squamösen Geweben exprimiert und beeinflussen die Rigidität und Flexibilität dieser Epithelien (Tesfaigzi & Carlson, 1999). Zudem ist bekannt, dass SPRRs die Keratinisierung fördern (Kawasaki et al., 2003), sodass sie im Falle der MGD zumindest teilweise an der Hyperkeratinisierung beteiligt sein könnten.

### 1.6 Histologie von Meibomdrüsen

Histologische Untersuchungen der Meibomdrüsen fanden erstmals Anfang der 60er Jahre statt, weil man sich davor mehr auf die mit Haaren assoziierten Talgdrüsen (=Haarbalgdrüsen) konzentriert hatte. So wurden die *Glandulae tarsales* erstmals von Leeson im Jahre 1963 genauer histologisch analysiert: Die basalen Zellen sind flach und haben längliche Zellkerne, sie sind reich an Ribonukleoproteinen und Mitochondrien und besitzen kaum endoplasmatisches Retikulum. Die Zellen der zweiten Schicht haben runde Zellkerne und eine ovalere Form, besitzen zahlreiche Lipidvesikel und weisen desmosomale Zellkontakte zu den benachbarten Zellen auf. Die zentralen Zellen weisen Zeichen von Zelluntergang auf und die Plasmamembran lässt sich in der Elektronenmikroskopie oft schwer identifizieren. Trotz dieser degenerativen Prozesse sind die Zellkerne identifizierbar und sowohl Mitochondrien als auch die Plasmamembran sind noch intakt. An der Übergangsstelle zwischen den Zellen der Ausführungsgänge sind erneut zahlreiche Desmosomen sichtbar (Leeson, 1963). Später analysierten Jester et al.

die Drüsengang- und die Azinuszellen nochmals genauer mittels Elektronenmikroskopie: Sowohl in den Drüsengängen als auch in den Azini sind die basalen Zellen mit der Basalmembran und mit den benachbarten Zellen durch Hemidesmosomen und Desmosomen verbunden. Der Übergang von den Drüsengangzellen zu den Azinuszellen erfolgt abrupt von keratinisierenden Zellen zu den klassischen Meibozyten (Jester, Nicolaides, & Smith, 1981).

2016 erlangte man schließlich neue Einblicke in die Morphologie und Anatomie der menschlichen Meibomdrüsen: Rötzer et. al sahen zum ersten Mal, dass die Verteilung desmosomaler Komponenten differenzierungsabhängig ist. Sie beobachteten ein erhöhtes Vorkommen von Desmosomen in reifen Meibozyten im Zentrum der Azini (Rötzer, Egu, & Waschke, 2016) (Abb. 3A,3B).

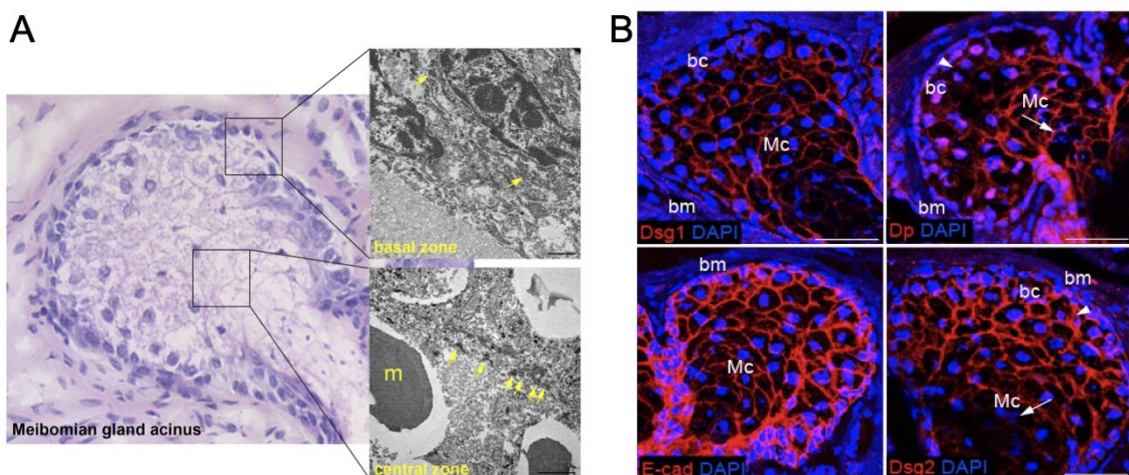


Abbildung 3: Exemplarische Darstellung der desmosomalen Verteilung in Azini von Meibomdrüsen

Histologische Untersuchung von Meibomdrüsen. (A) Basale Zellen sind kugelförmig, liegen der Basalmembran an und weisen desmosomale Kontakte auf (gelbe Pfeile). Die zentralen und reiferen Azinuszellen sind unregelmäßiger geformt und exprimieren deutlich mehr Desmosomen (gelbe Pfeile) als in der äußeren Zellschicht. Maßstab: 1000 nm. (B) Beispielhafte Färbung gegen Desmoglein 1 (Dsg1), Desmoplakin (Dp), E-Cadherin (Ecad) und Desmoglein 2 (Dsg2) (rot). Dsg1 ist gleichförmig im ganzen Azinus vorhanden, während Dsg2 vorwiegend in den Basalzellen zu sehen ist. Dp hingegen wird hauptsächlich in den reiferen zentralen Azinuszellen, während Ecad sehr stark ubiquitär exprimiert wird. Die Zellkerne wurden mit dem DNA-Marker DAPI angefärbt (blau) Maßstab: 50 µm. Modifiziert nach Rötzer et al., 2016, Histochem Cell Biol.

### 1.7 Pemphigus vulgaris und DED

Pemphigus ist eine Gruppe von autoimmunen, blasenbildenden Krankheiten der Haut und der Schleimhäute, welche durch Serum-Autoantikörper der Immunglobulin-Klasse G (IgG) gegen desmosomale Adhäsionsmoleküle charakterisiert ist. Es werden drei Subtypen der Erkrankung unterschieden: Pemphigus vulgaris (PV), Pemphigus foliaceus (PF) und der paraneoplastische Pemphigus. Der Entstehungsort der Blasen kann durch das Autoantikörperprofil, die gewebespezifische Expression von Desmogleinen und durch die unterschiedlichen beteiligten Signalwege erklärt werden. Aus diesem Grund weisen die drei Untergruppen eine unterschiedliche Lokalisation der Blasenbildung und andere Zielmoleküle auf (Amagai, Klaus-Kovtun, & Stanley, 1991; Amagai, Tsunoda, Zillikens, Nagai, & Nishikawa, 1999; Hertl, 2000; Kasperkiewicz et al., 2017; Spindler & Waschke, 2018; Waschke, 2008).

PV ist der häufigste Subtyp in Europa, den USA und Japan, wobei mehr Frauen betroffen sind und das Prävalenzalter 50-60 Jahre beträgt. PF hingegen ist der häufigste Typus in Südamerika und Nordafrika mit hauptsächlichem Befall von jüngeren Generationen (Alpsoy, Akman-Karakas, & Uzun, 2015).

Die pathogenen Autoantikörper richten sich gegen Dsg1 und Dsg3 sowie seltener gegen Desmocollin 3 (Dsc3). Die Antikörper stören dabei die Zelladhäsion entweder durch direkte Interaktion mit den Haftungsmolekülen oder indem sie Signalwege beeinflussen und modulieren, die für die Zellhaftung wichtig sind (Spindler & Waschke, 2018).

Autoimmundermatosen befallen häufig auch die Augenschleimhäute, wodurch sie das Sehen beeinträchtigen können. Die ophthalmologischen Manifestationen können je nach befallener anatomischer Struktur – Konjunktiva, Kornea oder Augenlider – eingeteilt werden (Laforest, Huilgol, Casson, Selva, & Leibovitch, 2005). Die Symptomatik bei der Augenbeteiligung reicht von milder Irritation und Trockenem Auge (DED) bis hin zu chronischer Konjunktivitis, Fehlstellung der Augenlider, Vernarbung an der Augenoberfläche, Blasenbildung und Sehverlust (Hansen, Klefter, Julian, Lynge Pedersen, & Heegaard, 2017; Vielmuth et al., 2016). In den 90er Jahren wurde in einer Studie festgestellt, dass von elf Patienten mit PV acht (72,7%) Symptome einer Augenbeteiligung angaben. Die Symptome Irritation, Fremdkörpergefühl und vermehrte Tränenproduktion wurden bemerkt, bevor sich die mukokutanen Läsionen zeigten (Hodak et al., 1990). Eine neuere Studie gab eine Augenbeteiligung bei 17 von 103 PV-Patienten an und stellte fest, dass die Manifestation am Auge unabhängig von der Krankheitsaktivität und -extension ist (Akhyani et al., 2014). Die häufigsten

Augensymptome sind Blepharitis, Konjunktivitis und DED. Es wurde gezeigt, dass Autoantikörper durch eine Spaltbildung in Kornea und Konjunktiva zur Augenbeteiligung bei Pemphigus führen können (Vielmuth et al., 2016). Die Tatsache, dass Pemphigus-Erkrankungen sehr selten sind, könnte eine Erklärung dafür sein, dass es zu einer Verzögerung in der Diagnostik von Seiten der Ophthalmologen kommt. Erschwerend kommt noch hinzu, dass der genaue Zusammenhang zwischen Pemphigus und DED noch unklar ist, wobei in beiden Fällen inflammatorische Prozesse eine wichtige Rolle spielen (Tan et al., 2015). Abbildung 4 gibt einen Überblick über die relevantesten Signalwege, welche aktiviert oder inaktiviert werden, wenn PV-IgGs an Dsg1 oder Dsg3 binden (Spindler et al., 2018; Spindler & Waschke, 2018). Möglicherweise werden einige dieser Signalwege auch dahingehend aktiviert, dass sie zum Entstehen des DED und MGD beitragen.

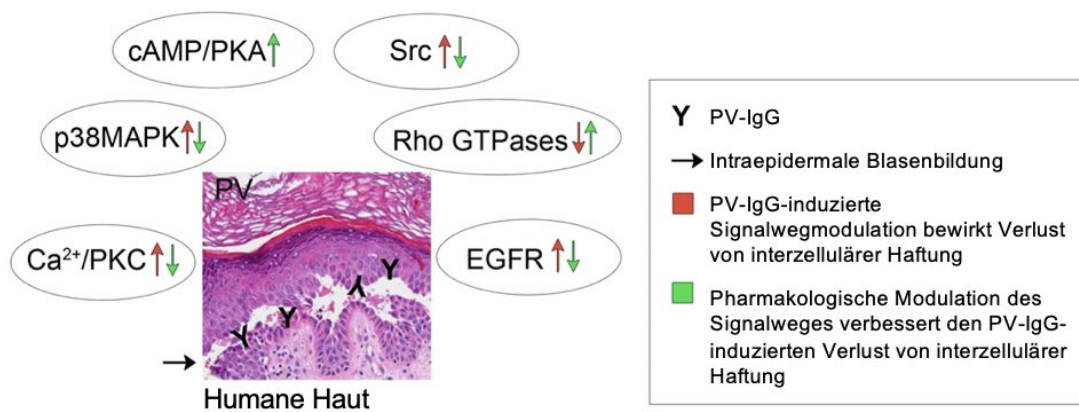


Abbildung 4: Übersicht relevanter Signalwege in der Pathogenese des PV

Signalwege, die nach Bindung von PV-IgGs an Dsg1 oder Dsg3 moduliert werden.

## 1.8 Vorarbeiten und Zielsetzung

Da wir die Hypothese untersuchen wollten, dass die interzellulären Kontakte wichtig für das richtige Funktionieren der Drüsen und für eine ausreichende Meibumbildung sind, mussten erstmal das Vorhandensein und die Zusammensetzung der Zellkontakte in intakten Meibomdrüsen *in situ* untersucht werden. Dafür wurde Probenmaterial von Körperspendern genutzt und die entnommenen Proben mit Transmissionselektronenmikroskop analysiert. Wie Rötzer et al. zeigen konnte, ändern sich Lipidgehalt und die Verteilung der Zellkontaktproteine in Abhängigkeit vom Differenzierungsstadium, wobei für Dsc3 und das Plaqueprotein Plakoglobin eine gleichmäßige Verteilung über den gesamten Drüsenazinus festgestellt wurde. Im

Gegensatz dazu wurden Dsg2 und Dsg3 vorwiegend in den basalen, jedoch kaum in gereiften zentralen Meibozyten detektiert. Interessanterweise zeigte sich, dass Desmoplakin, welches eine starke Verankerung zwischen Keratinfilamenten und den Desmosomen vermittelt, hauptsächlich von reifen Meibozyten im zentralen Azinusbereich und nicht von Basalzellen exprimiert wird. Für E-Cadherin, dem Adhäsionsmolekül der Adhärenskontakte, zeigte sich ebenfalls eine gleichmäßige Verteilung über den gesamten Azinus (Rötzer et al., 2016). Für die Kultivierungsbedingungen der Meibozyten-Linie wurden die Vorarbeiten von anderen Forschungsgruppen genutzt. Sullivan und seine Arbeitsgruppe (Sullivan et al., 2014) kultivieren HMGECs zunächst fünf bis sieben Tage (d) in serumfreiem Medium (SFM) und dann für weitere 14 d entweder weiter in SFM oder in Serum-haltigem Medium. Die Überlegung dahinter war zu beobachten, wie sich der Zusatz von Serum auf Genexpression und Lipidakkumulation auswirken würde. Es wurde außerdem für HMGECs gezeigt, dass eine Serum-induzierte Differenzierung die Bildung von Keratinfilamenten und Desmosomen bewirkt (Hampel, Schröder, et al., 2015). Auch der Zusatz von anderen Substanzen, wie z.B. Omega-3-Fettsäuren, Glucose, Insulin oder Azythromycin, hat darauf Auswirkung. Jedoch weist die Zellkultur Limitationen auf, da sich physiologische Prozesse nicht gänzlich reproduzieren lassen. In einem ersten Schritt wurde das obengenannte Protokoll angepasst, indem die Zellen Tag für Tag lichtmikroskopisch beobachtet und dann auch mit dem konfokalen Mikroskop bezüglich Merkmale der Differenzierung analysiert wurden. Wichtige Parameter für die Festlegung der Rahmenbedingungen für die Experimente waren Konfluenz, Morphologie und Bildung von Lipidvesikeln.

Zusammenfassend werden mit der vorliegenden Arbeit folgende Fragen adressiert:

1. Inwieweit unterscheiden sich die Zellkontakte bzw. die Proteinexpression zwischen nicht-ausdifferenzierten und ausdifferenzierten Meibozyten (ohne und in Anwesenheit von Serum)?
2. Gibt es einen Unterschied in der Expression der Zellhaftungsproteine nach Tag 1 (1d) bzw. Tag 6 (6d) im Differenzierungsmedium?
3. Wie beeinflussen das Vorhandensein von Serum und die Zugabe von Eicosapentaensäure (EPA), einer Omega-3-Fettsäure, die Lipidproduktion?
4. Wie lässt sich die Zellhaftung in Meibozyten stören/modulieren? Gibt es eine Korrelation zwischen der Zellhaftung und der Talgproduktion?
5. Welche Signalwege sind an der Regulation der Zellhaftung und der Lipidproduktion beteiligt?

6. Hat die gezielte Inhibierung von desmosomalen Dsg3 durch PV-Antikörper einen Einfluss auf die Zellhaftung in Meibomdrüsen und besteht ein Zusammenhang zwischen der Pathogenese des PV und des Trockenen Auges?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Meibom-Zelllinie

*Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Zelllinie*

Bezeichnung	Zellart, Gewebe, Spezies	Hersteller
HMGECs  (human meibomian gland epithelial cells)	Meibozyten, Meibomdrüse, Mensch	David Sullivan (Schepens Eye Research)

#### 2.1.2 Antikörper und Mediatoren

*Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Primärantikörper*

Antikörper	Spezies	Anwendung/ Konzentration	Hersteller
anti-DP 1+2	Kaninchen/monoklonal 1	WB/ 1:1000	Abcam, Cambridge, Großbritannien
anti-Dsg1 (clone p124)	Maus/monoklonal	WB/ 1:1000 Dispase/ 1:50	Progen, Heidelberg, Deutschland
anti-Dsg2 (clone 10G11)	Maus/monoklonal	WB/ 1:200	Progen, Heidelberg, Deutschland
Anti-Dsg2 (ohne Azid)	Maus/monoklonal	IF/1:100 Dispase/1:50	Progen, Heidelberg, Deutschland
anti-Dsg3	Kaninchen/polyklonal	WB/ 1:1000 IF/ 1:100	Biozol, Eching, Deutschland



## 2 Material und Methoden

Antikörper	Spezies	Anwendung/ Konzentration	Hersteller
anti-Dsc1	Kaninchen/monoklonal	WB/ 1:200	Abcam, Cambridge, Großbritannien
anti-Dsc2	Kaninchen/monoklonal	WB/ 1:1000	Progen, Heidelberg, Deutschland
anti-Dsc3	Kaninchen/polyklonal	WB/ 1:200	LS Bio, Seattle, Washington, USA
anti-E-Cadherin (clone 36)	Maus/monoklonal	WB/ 1:1000 IF/ 1:100	BD Transduction, Heidelberg, Deutschland
anti-E-Cadherin (SHE78-7)	Maus/monoklonal	IF/WB/Dispase 8 µg/ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
anti-Plakoglobin	Maus/monoklonal	WB/1:1000 IF/1:100	Progen, Heidelberg, Deutschland
anti-GAPDH	Maus/monoklonal	WB/ 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
anti-α-Tubulin	Maus/monoklonal	WB/ 1:5000	Abcam, Cambridge, Großbritannien
PV-IgG	Mensch (anti-Dsg1-Aktivität: 9263 U/ml; anti-Dsg3-Aktivität: 18.383 U/ml)	IF/WB/Dispase 1:50	Selbst isoliert aus Serumproben der Klinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck, Deutschland

## 2 Material und Methoden

Antikörper	Spezies	Anwendung/ Konzentration	Hersteller
DECMA	Ratte	12,5 µg/ml (Stock- konzentration 200 µg/ml)	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
anti-Notch total	Kaninchen/polyklonal	WB/1:1000	Cell Signaling Technologies, Cambridge, Großbritannien
anti-Notch cleaved	Kaninchen/polyklonal	WB/1:1000	Cell Signaling Technologies, Cambridge, Großbritannien

*Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper und Fluorophor-gekoppelten Substanzen*

Antikörper/Substanzen	Konjugierte Fluorophore	Anwendung	Hersteller
Ziege-anti-Maus	Cy3	IF	Dianova, Hamburg, Deutschland
Ziege-anti-Kaninchen	Cy3	IF	Dianova, Hamburg, Deutschland
Ziege-anti-Maus	Cy2	IF	Dianova, Hamburg, Deutschland
Ziege-anti-Maus	pox	WB	Dianova, Hamburg, Deutschland

Antikörper/Substanzen	Konjugierte Fluorophore	Anwendung	Hersteller
Ziege-anti-Kaninchen	pox	WB	Dianova, Hamburg, Deutschland

Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzdarstellung (Cy2- und Cy3 -gekoppelt) wurden in einer 1:600 Verdünnung in PBS und für Westernblot-Analysen (pox-gekoppelt) in einer 1:10.000 Verdünnung in einer Milchpulverlösung (5% Milchpulver in TBST) eingesetzt.

*Tabelle 4: Auflistung der Mediatoren*

Mediator	Konzentration	Wirkung	Hersteller
AK23	75 µg/ml	Interaktion mit Dsg3	Biozol, Eching, Deutschland
Anisomycin	60 µM	Aktivierung der p38MAPK	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BIM-X	1 µM	Inhibierung der PKC	Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland
Erlotinib	20 µM	Inhibierung von EGFR	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
EGF	5 ng/ml	Regulierung von Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung	Thermo Fisher Scientifics, Karlsruhe, Deutschland
Forskolin*	5 µmol/l	Aktivierung der Adenylylcyclase	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

H89	10 $\mu$ M (Stockkonzentration 10 mM)	Inhibierung der PKA	Sigma-Aldrich, Louis, USA	St.
PMA	50 nM	Aktivierung der PKC	Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland	
Rolipram*	10 $\mu$ mol/l	Inhibierung der Phosphodiesterase IV	Sigma-Aldrich, Louis, USA	St.
Rosiglitazone	50 $\mu$ M	PPAR $\gamma$ -Agonist	Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting, PA	
SB202190	30 $\mu$ M	Inhibierung von p38MAPK	Merck Millipore, Billerica, USA	

\*Forskolin und Rolipram wurden in Kombination verwendet (F/R).

### 2.1.3 Chemikalien

Tabelle 5: Auflistung der Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Accutase	CELLnTEC, Bern, Schweiz
Acrylamid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Amphotericin B	CELLnTEC, Bern, Schweiz
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aprotenin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
APS	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Chemikalie	Hersteller
BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DEPC	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dispase	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMEM Ham's F12 (1:1), (-) L-Glutamine	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DTT	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EGTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Eisessig	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
EPA (cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, Deutschland
FKS	Biochrom, Berlin, Deutschland
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Green Puffer (5x)	Promega, Madison, USA
HbSS	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
HCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Chemikalie	Hersteller
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kanamycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
KCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Serumfreies Keratinozytenmedium (K-FSM Kit)	Thermo Fisher Scientifics, Karlsruhe, Deutschland
Leupeptin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
LipidTox Red Neutral Stain	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Luminol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
LB-Pulver	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MES	Biomol, Hamburg, Deutschland
MeOH	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
MgCl <sub>2</sub>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
MMA	Serva, Heidelberg, Deutschland
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
NaF	Merck, Darmstadt, Deutschland

Chemikalie	Hersteller
NaOH	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NGS	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
NDS	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
NPG	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
n-Propylgallat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
PCA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin G	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Pepstatin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
PMSF	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PageRuler Prestained	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Phosphataseinhibitor-Cocktail	Roche, Basel, Schweiz
Proteaseinhibitor-Cocktail	Roche, Basel, Schweiz
SDS	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Streptomycinsulfat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
TEMED	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Triton-X-100	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Chemikalie	Hersteller
Trypsin	Serva, Heidelberg, Deutschland
TurboFect	Life Technologies, Carlsbad, USA
Tween 20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Zitronensäure-Monohydrat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

*Tabelle 6: Auflistung der Agarosepartikel*

Bezeichnung	Hersteller
Protein-A-Agarosepartikel	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
Protein-G-Agarosepartikel	Merck Millipore, Billerica, USA
Protein-G/A-Agarosepartikel	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA

#### 2.1.4 Puffer und Lösungen

*Tabelle 7: Auflistung der Puffer und Lösungen*

Puffer/Lösungen	Verwendung	Zusammensetzung
BSA/NGS	IF	0,1% (v/v) Kälberserum 10% (v/v) Ziegenserum in PBS
Dispase II-Lösung	Dissoziationsversuche	>2.4 U/ml Dispase II in HbSS
Einbettmedium (NPG)	IF	1% n-Propylgallat mit 60% Glycerin in PBS
Einfriermedium	Zellkultur	10 % DMSO in K-SFM



## 2 Material und Methoden

Entwicklerlösung	WB	ECL I: 500 µl Luminol-Lösung, 220 µl PCA-Lösung, 5 ml 1 mol/l Tris-HCl ad 50 ml H <sub>2</sub> O  ECL II: 32 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 5 ml 1 mol/l Tris-HCl ad 50 ml H <sub>2</sub> O
Fixierlösung	IF	2% Paraformaldehyd in PBS
HbSS	allgemein	130 mM HbSS-Pulver 4 mM NaHCO <sub>3</sub>
Laufpuffer	WB	1 M Glycin 124 mM Tris/HCl 17,3 mM SDS
Luminol	WB	250 mM Luminol in DMSO
PBS	allgemein	0,68 M NaCl 13,4 mM KCl 48 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7,3 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Puffer/Lösungen	Verwendung	Zusammensetzung
PBS/EDTA	Zellkultur	34,2 mM EDTA in PBS; steril
PCA	WB	90 mM Paracumaricacid in DMSO
Penicillin G/	Zellkultur	18 mM Penicillin G

## 2 Material und Methoden

Streptomycin		8,9 mM Streptomycinsulfat; steril
Probenpuffer (3x)	WB	0,19 M Tris/HCl 0,2 M SDS 4,1 M Glycerin 0,3 mM Bromphenolblau
SDS-Lysepuffer	WB	25 mM HEPES 2 mM EDTA 25 mM NaF 1% SDS    pH 7,6
Stripping-Puffer	WB	25 mM Glycin 1% SDS    pH 2,0
TBS 1M	WB	20 mM Tris/HCl 137 mM NaCl    pH 7,6
TBS-T	WB	0,05% Tween 20 in TBS
Transferpuffer (5x)	WB	25 mM Tris/HCl 195 mM Glycin 250 ml Methanol 3,5 mM SDS
Trypsin	Zellkultur	0,05% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS pH 7,2; steril
0,1% Triton-X-100	IF	0,1% Triton X-100 in PBS

Triton-X100-Puffer	WB	1% Triton X-100 10 mM Tris/HCl 140 mM NaCl 5 mM EDTA 2 mM EGTA + 20 µg/ml Leupeptin, 20 µg/ml Pepstatin, 20 µg/ml Aprotinin, 1 mM PMSF
--------------------	----	--

### 2.1.5 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Alle Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders angegeben, von Greiner Bio One (Kremsmünster, Österreich), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), VWR (Radnor, USA), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Bio-Rad (München, Deutschland) oder Marienfeld (Lauda-Königshofen, Deutschland) bezogen. Abweichende Herstellerfirmen werden an entsprechender Textstelle genannt.

Die verwendeten Geräte mit entsprechendem Hersteller sind an den jeweiligen Stellen im Text vermerkt.

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Zellkultur

HMGECs wurden einerseits in serumfreiem und andererseits in Serum-haltigem Medium gehalten und kultiviert (Liu, Hatton, Khandelwal, & Sullivan, 2010). Im Falle des Ersteren handelt es sich um ein Serum-freies basales Medium für Keratinozyten (Keratinocyte-SFM) mit low-calcium und dem Zusatz von 5 ng/ml Epidermalem Wachstumsfaktor (EGF), 5 µg/ml Rinderhypophysen-Extrakt (BPE) sowie 50 U/ml Penicillin G und 50 µg/ml Streptomycin. Dieses Medium diente der Proliferation, wobei die Zellen etwa 4 bis 5 Tage darin gehalten wurden, bis sie eine Konfluenz von 80-90% erreichten. Um eine Differenzierung zu induzieren, wurde bei ebengenannter Konfluenz zu Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM) und Ham's F12 mit einer Konzentration von 116,6 mg/l Calciumchlorid<sup>+</sup> sowie 3151 mg/l D-Glucose und Zusatz von 50 U/ml Penicillin G und 50 µg/ml Streptomycin, 10% fetalem Kälberserum (FKS) und 10 ng/ml EGF gewechselt. Zudem wurde dem Differenzierungsmedium für gewisse Versuche 100 µM Eicosapentaensäure (EPA) hinzugefügt.

Die Zellen wurden immer in konstanter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gehalten und die Medien wurden jeden zweiten Tag gewechselt.

Für Versuchsaussaaten und für das Herstellen neuer Zellpassagen wurden HMGECs zunächst mit einer PBS-EDTA-Lösung kurz gewaschen und dann 6 Minuten in 3 ml Trypsin-EDTA inkubiert, um die Zellen vom Boden der Flasche zu lösen. Nach Ablauf der sechs Minuten wurden die Zellen wieder in K-SFM aufgenommen und 4 Minuten bei 230 g und Raumtemperatur (RT) abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in K-SFM resuspendiert, mittels elektrischer Pipette homogenisiert und dann auf Flaschen bzw. 24-Mikroplatten mit/ohne Deckgläschen verteilt. In den Mikroplatten proliferieren die Zellen vier Tage lang bis zur Konfluenz. Danach erfolgte der Mediumwechsel zu Serum-haltigem Medium. Bei jeweils der Hälfte der Aussaaten wurde dem serumhaltigen Medium EPA hinzugegeben und 1 bzw. 6d nach dem Austauschen des Mediums erfolgten die Experimente.

#### 2.2.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Konfluente HMGECs wurden unter anderem auch eingefroren und in Stickstoff gelagert. Dafür wurden die Zellen vom Boden des Kulturgefäßes gelöst, pelletiert, in Einfriermedium (K-SFM mit 10% DMSO) aufgenommen und in Einfriergefäße überführt. Da DMSO toxisch auf Zellen wirkt, wurden die Einfriergefäße sofort bei -80° C eingefroren

und dann in flüssigen Stickstoff gelagert. Falls Bedarf an Zellen war, konnten die eingefrorenen Zellen wieder für Versuche herangezogen und kultiviert werden.

### 2.2.3 Aufreinigung von Patienten-/Kontrollantikörpern

Um die Wirkung von Pemphigus-Antikörpern auf die Zellkontakte in Meibozysten zu untersuchen, wurde die IgG-Fraktion eines PV-Patienten verwendet, der sowohl orale als auch Hautläsionen aufwies, wobei die Erkrankung klinisch, serologisch und histologisch nachgewiesen war. Das Serum, das uns aus Marburg zur Verfügung gestellt wurde, enthielt Antikörper gegen Dsg3 (18.383 U/ml) und Dsg1 (9263 U/ml). Da uns das Vollplasma des PV-Patienten zugesandt wurde, musste aus diesem zunächst mittels Protein-A-Affinitätschromatographie eine IgG-Fraktion (PV-IgG) aufgereinigt werden. Als Kontrolle wurden IgGs von einer gesunden Person verwendet. In den Experimenten wurden sowohl Kontroll- als auch PV-IgG in einer Konzentration von 1:50 bzw. 0,5mg/ml eingesetzt. Dafür wurden 500 µl Protein-A-Agarosepartikel in einer 5 ml Spritze zwischen zwei Glasfilter positioniert und mit 20 ml PBS gespült. Anschließend wurde 1 ml Patientenserum auf die Säule pipettiert und für mindestens 2 Stunden bei RT mit den Agarosepartikeln vermischt. Nach Ablauf der Zeit wurden die IgGs mit PBS gespült und mit 3 ml einer 20 mM Natriumcitratlösung (pH 2,4) eluiert. Das Eluat wurde dann in ein Reaktionsgefäß überführt, worin davor 60 µl einer 2 M Natriumcarbonatlösung vorgelegt wurden, und dann mittels Amicon Ultra-4 Zentrifugalfilter (Merck Millipore, Billerica, USA) aufkonzentriert. Die IgG-Fraktionen wurden nach der Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Messung (siehe 2.2.3.2) aliquotiert und bei -80° oder -20° bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.2.4 Proteinkonzentrationsmessung

Die Gesamtproteinmenge in den Zellysaten wurde für die Proteinbestimmung kolorimetrisch mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit nach Protokoll des Herstellers bestimmt. In einer 96-Mikroplatte wurden die Proben im Verhältnis 1:5 mit 200 µl des BCA Reagenzgemisches A+B versetzt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach anschließendem Abkühlen für ca. 20 Minuten wurden die Proben bei einer Wellenlänge von 562 nm im Mikroplattenleser Version 7.0 infinite 200 pro von Magellan ausgelesen. Die Proteinmenge wurde vom Programm anhand einer BSA-Standardgerade quantifiziert, wobei die Rohdaten von der Maschine in µg/ml angegeben wurden. So konnte sichergestellt werden, dass für die unterschiedlichen Konditionen dieselbe Proteinmenge miteinander verglichen und untersucht wurde.

### 2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse der Menge und Vorkommen der verschiedenen desmosomalen Proteine wurden Zellen in SDS-Puffer (25 mmol/l HEPES, 2 mmol/l EDTA, 25 mmol/l NaF and 1% SDS, pH 7,4) unter Zugabe von Proteaseninhibitoren auf Eis lysiert, homogenisiert und die Proteinmenge, wie bereits beschrieben, mittels Pierce BCA Protein Assay Kit bestimmt. Die zu untersuchenden Proben wurden mit Laemmli-Puffer, der 50 mM Dithiothreitol enthält, gemischt und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert (Laemmli, 1970). Von jeder Probe erfolgte die Auftragung der gleichen Gesamtproteinmenge in das SDS-Gel. Dafür wurde zunächst die Elektrophoresekammer von Bio-Rad mit Laufpuffer gefüllt. Nach der Auftragung in die Taschen kommt es durch Anlegen einer Spannung von 120 V zunächst zum Sammeln der Proben in einem 5%igen Polyacrylamidgel, welche dann über ein 10%iges Gel entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden. Zusammen mit den Proben wurde auch ein Marker (PageRuler Protein Ladder) aufgetragen, um das Proteingewicht zu bestimmen.

### 2.2.6 Western-Blotting (WB) und Immunodetektion von Proteinen

Um die Proteine immunchemisch zu untersuchen, wurden diese nach dem Standardprotokoll aus dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Towbin, Staehelin, & Gordon, 1979). Dies erfolgte nach dem Prinzip des Wet-Tank-Blotting-Systems von Bio-Rad, wobei das Kammersystem mit Blotting-Puffer befüllt wurde. Für die Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran war ein konstanter Stromfluss von 350 mA für 1,5 Stunden nötig. Nach Abschluss des Blotting-Vorganges wurden die Membranen für eine Stunde in einem Absättigungspuffer (10% Roti in H<sub>2</sub>O) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper, welcher in 5% Magermilchpulver in TBS-T auf die Membranen gegeben wurde, in entsprechender Verdünnung bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Membranen 3x 5 Minuten mit TBS mit 0,05% Tween 20 gewaschen und mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem Zweitantikörper im Verhältnis von 1:10.000 bei RT inkubiert. Wieder wurden die Membranen 3x 5 Minuten, wie oben beschrieben, gewaschen und dann mithilfe der ECL (engl. enhanced chemiluminescence) -Methode und dem Gerät AI600 sichtbar gemacht. Die Western-Blot-Banden wurden dann mittels Image J analysiert, indem die Intensität der Banden nach Verrechnung des Hintergrundsignals gemessen wurde.

### 2.2.7 Indirekte Immunfluoreszenzdarstellung

Diese Methode ist ein Standardverfahren zur Darstellung und Sichtbarmachung von Zellstrukturen. Das Prinzip basiert auf Fluorophor-gekoppelten Antikörpern, wobei die Primärantikörper an die Zielstruktur binden und dann mittels Fluoreszenz-gekoppelter Zweitantikörper detektiert werden können. Durch Emission von sichtbarem Licht nach Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie mit einem TCS SP5-Konfokalmikroskop werden diese sichtbar gemacht. Um dies zu ermöglichen, wurden Zellen mit 2% PFA für 10 Minuten bei RT fixiert, dann 3x 5 Minuten mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,1%igem Triton-Puffer permeabilisiert. Nach erneutem Waschen wurden die Deckgläschen auf Objektträger überführt und mit BSA/NGS für 30 Minuten inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Im Anschluss wurde der gewünschte Erstantikörper in PBS über Nacht bei 4°C dazugegeben. Am nächsten Tag wurde überschüssiger Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS für jeweils 5 Minuten entfernt und anschließend für eine Stunde bei RT mit einem spezifischen Zweitantikörper in PBS inkubiert. Vor Ablauf der letzten 10 Minuten wurden noch 10 µl DAPI zur Färbung der Zellkern auf die Deckgläschen pipettiert. Nach Abschluss des Färbens wurden die Deckgläschen auf bereits beschriebene Weise gewaschen und dann mit der Zellseite nach unten mit ca. 3 µl NPG auf die Objektträger gegeben und lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

Für die Analyse und Quantifizierung der Lipidvesikel wurden die Zellen mit LipidTox Red neutral lipid stain gefärbt. Dafür wurde LipidTox zunächst im Verhältnis 1:1000 in PBS verdünnt. Auf jedes Deckgläschen wurden dann zusammen mit dem Zweitantikörper 40 µl des verdünnten LipidTox aufgetragen und in dunkler Feuchtkammer bei RT inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgten wie oben beschrieben.

Dünnschnitte von Augenlidern aus Dsg3-KO Tieren und den entsprechenden Geschwistertieren wurden ebenfalls für die Immunfluoreszenzdarstellung gefärbt. Diese wurden für eine Publikation der AG angefertigt und mir freundlicherweise für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Gewebeschnitte wurden für 45 Minuten bei 60°C eingebrannt. Dann wurden die Schnitte in PBS für 1-2 Minuten gewaschen und für 15 Minuten in 2%igem PFA fixiert. Gleich wie im vorherigen Absatz erklärt, wurden die Schnitte gewaschen und mit höher konzentriertem (1%igem) Triton für 45 Minuten permeabilisiert. Nach erneutem Waschen wurde BSA/NGS für 1h aufgetragen und im Anschluss abgesaugt, um die Schnitte dann mit dem 1. Ab bei 4°C über Nacht zu inkubieren. Die nachfolgenden Schritte erfolgten nach dem oben beschriebenen Prozedere.

### 2.2.8 Zelldissoziationsversuche

Mittels Dispase-basierter Dissoziationsmethode ist es möglich, Rückschlüsse auf die Stärke der Zellhaftungsstärke zu ziehen (Ishii et al., 2005). Dafür wurden HMGECS für jede Kondition im Duplikat in 24-Mikroplatten ausgesät und in 4 Tagen zur Konfluenz gebracht. An Tag 4 wurde Medium gewechselt und nach 1d bzw. 6d der Versuch gestartet, nachdem die entsprechenden Testreagenzien oder inhibitorischen Antikörper hinzugegeben wurden. Die Zellen wurden mit vorgewärmtem PBS gewaschen und anschließend mit 150 µl Dispase II (>2,4 U/ml) bei 37°C für 20 Minuten inkubiert. Dadurch kann sich der Zellrasen als Ganzes vom Wellboden lösen. Nach Ablauf der 20 Minuten wurde die Dispaselösung vorsichtig mittels Pipette entfernt und durch 350 µl HBSS ersetzt. Auf den Zellrasen wurde dann mithilfe einer elektrischen Pipette ein konstanter und definierter mechanischer Stress angewandt. Die 1 ml Pipette (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) war auf ein Volumen von genau 350 µl eingestellt und die Monolayer wurden jeweils 10x damit „geschert“. Durch diesen „Scherstress“ entstanden Zellfragmente, die eine Aussage über die interzelluläre Zellhaftung erlauben. Die Zellfragmente wurden mit einem Binokular-Mikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) in immer gleichbleibender Vergrößerung gezählt, wobei eine erhöhte Anzahl im Vergleich zur Kontrolle auf einen Verlust der Haftungsstärke hinweisen. In einigen Versuchsreihen wurde zur besseren Darstellung der Zellfragmente unter dem Mikroskop 10 µM Thiazolyl Blau Tetrazolium Bromid (MTT, Sigma-Aldrich) für 20 Minuten hinzugefügt, um eine Färbung der lebenden Zellen zu erhalten.

Für die Hyperadhäsionsversuche orientierten wir uns an das etablierte Protokoll von Garrod et. al (D. Garrod & Tabernero, 2014; D. R. Garrod, 2013). Dafür behandelten wir die Zellen zunächst wie gewohnt. Nach der viertätigen Proliferation in SFM wurden die Zellen mit Serum oder Serum/EPA behandelt. Nach Ablauf von 1d bzw. 6d wurden die Monolayer, wie im obigen Absatz beschrieben, mit Dispase inkubiert, um den Zellrasen zu lösen. Dann wurde das Medium ausgetauscht, es erfolgte die Inkubation mit Ca<sup>2+</sup>-reduziertem Medium und mit 5 mmol/l des Ca<sup>2+</sup>-Chelators Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA) für 1,5 h bei 37°C. Anschließend wurden die Monolayer nach Austausch des Mediums gegen 350 µl HBSS wie oben erklärt mittels elektrischer Pipette geschert.

### 2.2.10 Grafische Darstellung und statistische Auswertung der Datensätze

Zur Bearbeitung und Zusammenstellung von Bildern wurde Photoshop CC 2017 verwendet (Adobe Systems, San Jose, CA, USA). Westernblot-Banden wurden mithilfe des Programmes ImageJ Version 1.52a (NIH, Bethesda, MD; <http://imagej.nih.gov/ij>)



ausgewertet und dann in Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) analysiert und graphisch dargestellt. Die Bilder der Zellfragmente aus den Dissoziationsversuchen wurden ebenso mit ImageJ analysiert. Dafür wurden die fotografierten Reaktionsgefäße im Programm invertiert, der Schwellenwert wurde angepasst und die Fragmente wurden dann mit einem vorprogrammierten Macro ausgezählt. Für die Auswertung der Lipidvesikel wurden die Fotos auch mit diesem Programm analysiert: Dafür wurden die am konfokalen Mikroskop aufgenommenen Bilder vom RGB-Format invertiert und dann in 8-bit-Bilder umgewandelt. Durch Schwellenwert-Bestimmung wurden Artefakte aus den Bildern eliminiert. Innerhalb eines jeden unabhängigen Experimentes wurden die gleichen Einstellungen verwendet. Auf den invertierten Bildern stellten die schwarzen Flächen die Lipidvesikel dar und die weißen Flächen den Hintergrund. Mithilfe von ImageJ konnten so die Gesamtanzahl der Vesikel und ihre Gesamtfläche berechnet werden. Die statistische Signifikanz ( $p$ ) wurde mittels  $t$ -Test ermittelt und für  $p < 0,05$  festgelegt. Die gezeigten Graphen haben Fehlerbalken, die den Standardfehler (SEM) repräsentieren.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung der Serum-induzierten Differenzierung von Meibom-Zellen

Für *in vitro* Experimente wurde in der vorliegenden Arbeit eine stabile und immortalisierte Zelllinie humaner Meibozyten (human Meibomian gland epithelial cells (HMGECS)) verwendet, welche von Sullivans Gruppe etabliert und dann freundlicherweise an verschiedenen Forschungsgruppen verteilt wurde (Liu et al., 2010). Dass die Supplementierung des Kultivierungsmediums mit gewissen Substanzen, wie z.B. die Zugabe von fötalem Kälberserum, Auswirkungen auf die Differenzierung und Reifung der Zellen hat, wurde bereits in früheren Studien gezeigt (Liu et al., 2010; Liu, Kam, Ding, Hatton, & Sullivan, 2013). Aufgrund solcher sowie in der Einleitung genannter Beobachtung unserer Arbeitsgruppe war es hier das Ziel, die Veränderungen von HMGECS während der Differenzierung genauer zu untersuchen. Dafür wurden zunächst die optimalen Zellkulturbedingungen etabliert, um die Voraussetzungen für weitere Untersuchungen und für die Zellcharakterisierung zu schaffen. Durch das entstandene Zellkultur-Protokoll wurden die Experimente immer nach einem festen Zeitschema durchgeführt (Abb. 5).

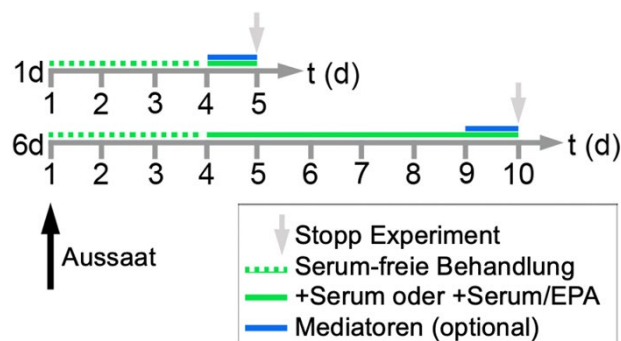


Abbildung 5: Zeitachse zur Zellkultur und Experimente von HMGECS

Modifiziert nach Rötzer et al. (Rötzer, Melega, Garreis, Paulsen, & Waschke, 2019).

Wie auf dem Zeitstrahl in Abbildung 5 erkennbar, wurden die HMGECS nach einer Proliferationsdauer von 4d ohne Serum in serumhaltigem Medium kultiviert. Dabei wurden in einer Reihe von Vorversuchen einerseits kurze (1d) und andererseits lange (6d) Untersuchungszeiträume für die Experimente, die dieser Arbeit zugrunde liegen, festgelegt. Es wurden folgende Situationen und Bedingungen miteinander verglichen:

Zum einen die Expression von Zellkontakt-Proteinen und das Vorhandensein von Lipiden in undifferenzierten versus differenzierten Meibozysten und zum anderen die Unterschiede zwischen der 1d- und 6d-Reifung in diesen Zellen. Zudem wurde die Hälfte der Zellen bei der Zugabe des Differenzierungsmediums jeweils mit EPA (Eicosapentaensäure) behandelt, um zu sehen, ob sich die Zugabe positiv auf die Lipidproduktion *in vitro* auswirken würde. Je nach Versuchsaufbau wurden zusätzlich 24 Stunden vor Beendigung der 1d- bzw. 6d- Inkubationszeiträume inhibitorische Antikörper oder Testreagenzien zugegeben.

#### **3.1.1 Einfluss auf die adhäsiven Eigenschaften**

Als Erstes lag der Fokus der vorliegenden Arbeit auf den adhäsiven Eigenschaften der HMGECs (Abb. 6). Dabei wurde mittels Dispase-basierter Dissoziationsmethode die Stärke der Zell-Zell-Haftung einerseits in Zellen gemessen, die nur im Proliferationsmedium kultiviert wurden und demnach keine Differenzierung durchliefen, und andererseits in Zellen, die im Differenzierungsmedium gehalten wurden. Wie zu erwarten, waren die Zell-Verbände der undifferenzierten Zellen aufgrund der fehlenden Zell-Zell-Kontakte so instabil, dass sie teilweise bereits nach dem Lösen vom Boden des Reaktionsgefäßes in unzählige Fragmente zerfielen. Bei Zellen hingegen, die 1d im Differenzierungsmedium gehalten wurden, zeigte sich bereits eine verstärkte Zelladhäsion, wobei die Zahl der Fragmente bei ungefähr 15 ohne und bei 30 mit EPA lag. Der Serumzusatz bewirkte also eine Zunahme der adhäsiven Kontakte zwischen den Zellen, wobei sie nach 6d sehr stark ausgeprägt waren und der Zellrasen nahezu vollständig intakt blieb; die Fragmentanzahl lag hierbei unter beiden Konditionen durchschnittlich unter zwei.

Interessanterweise bewirkte die eintägige Inkubation von EPA, aber nicht die sechstägige Inkubation, eine Minderung der Zell-Zell-Haftung im Vergleich zur reinen Serum-Zugabe.

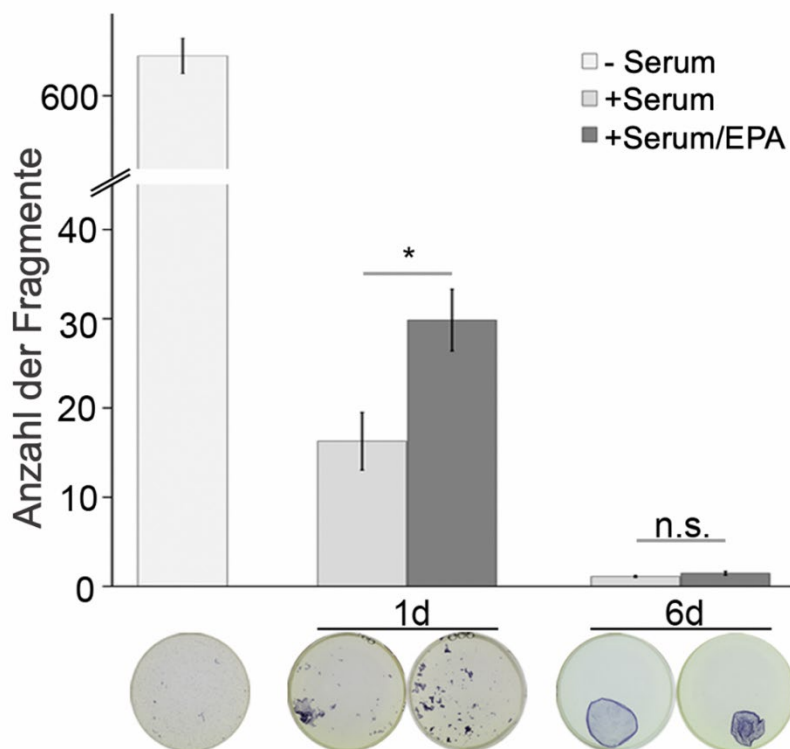


Abbildung 6: Untersuchung der adhäsiven Eigenschaften von proliferierenden und differenzierten Meibozysten

Dispase-basierter Dissoziationsversuch als Maß für die Quantifizierung der interzellulären Adhäsion. Repräsentative Bilder von Zellverbänden nach mechanischem Scherstress ( $n=7$ ;  $*p < 0.005$  vs. +serum). Modifiziert nach Rötzer et al. (Rötzer, Melega, Garreis, Paulsen, & Waschke, 2019).

### 3.1.2 Einfluss auf die Lipidproduktion

Im nächsten Schritt wurde die Lipidproduktion der Meibozysten in der Zellkultur untersucht, da es sich dabei um ein gut etabliertes Maß für den Reifegrad der Zellen handelt (Sullivan et al., 2014). Dafür wurden die Lipideinschlüsse mit LipidTox gefärbt (Abb. 7A). Vor dem Wechsel zum Differenzierungsmedium, also während der serumfreien Proliferation, waren die Lipideinschlüsse sehr spärlich vorhanden (Abb. 7A, linke Seite). Die Gabe von Serum induzierte hingegen sowohl nach 1d als auch nach 6d die Produktion von Lipidvesikeln. Die Lipidsynthese wurde dabei durch die Zugabe von EPA, einer Omega-3-Fettsäure, welche für die Biosynthese von Lipiden *in vivo* wichtig ist (Butovich, Uchiyama, Di Pascuale, & McCulley, 2007; Hampel, Kruger, et al., 2015), weiter verstärkt. Wie man aus untenstehender Grafik entnehmen kann (Abb. 7B), erhöhte EPA nach 1d die Anzahl der Vesikel in signifikantem Maße beinahe um das Sechsfache. Zudem ist es

interessant zu sehen, dass die Lipidproduktion im Laufe der 6d sistierte bzw. nicht weiter zunahm. Der Unterschied zwischen den Konditionen „+Serum“ und „+Serum/EPA“ blieb allerdings weiterhin erhalten. Dieser war auch nach 6d signifikant und belief sich in etwa auf das Dreifache. Beim Analysieren der Vesikelgröße stellte sich heraus, dass sie nach EPA-Inkubation für 1d signifikant größer war im Vergleich zur reinen Serumbehandlung (die Größe nahm durch die EPA-Zugabe um ca. 40 % zu), während sich die Vesikel nach 6d in ihrer Größe angleichen und der Unterschied nicht mehr signifikant war.

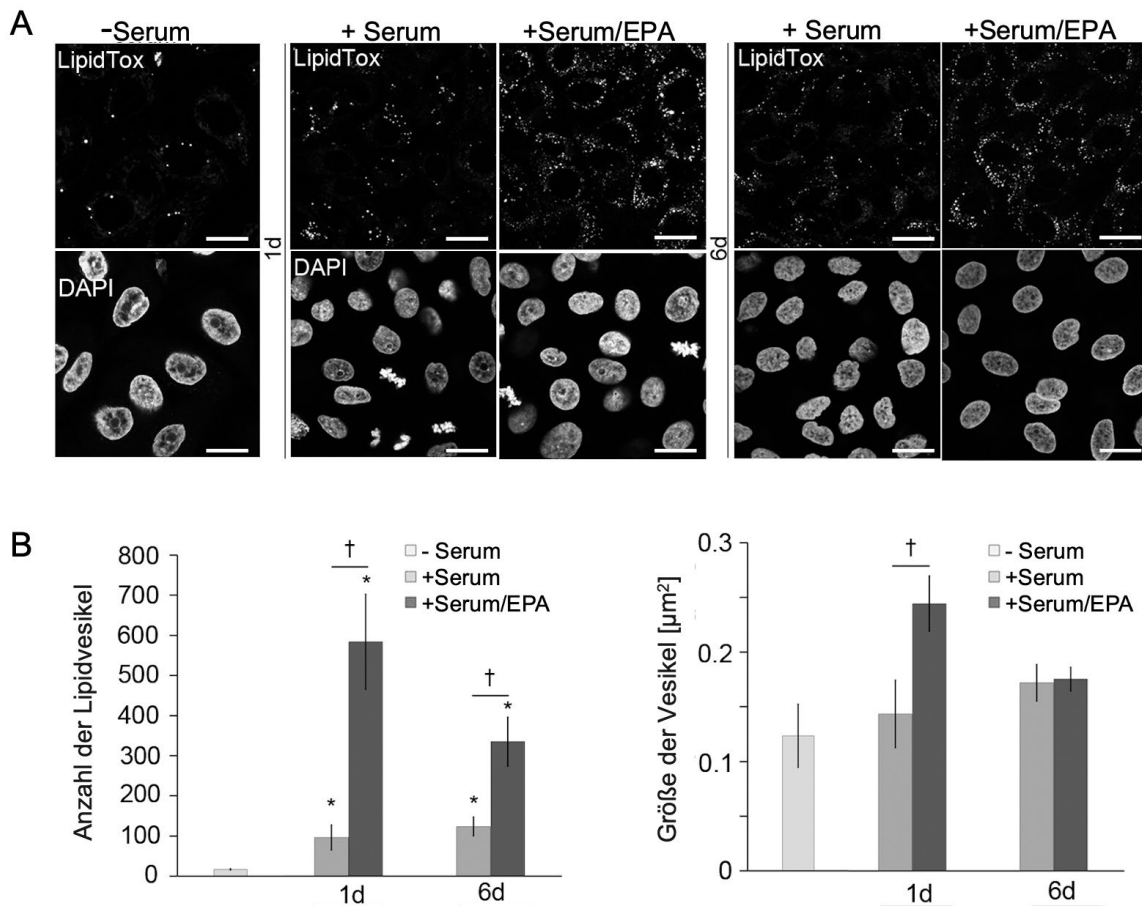


Abbildung 7: Serum-induzierte Differenzierung fördert die Bildung von Lipiden

A) LipidTox-Färbung vor und nach Wechsel zu Serum- bzw. Serum/EPA-haltigem Medium für 1d und 6d. Färbung der kernhaltigen DNA mittels DAPI-Farbstoffes. B) Auswertung und Quantifizierung der in A) gezeigten Bilder, angegeben als Anzahl und Größe der Lipidvesikel. (n=5; \*p < 0.05 vs. -Serum, †p < 0.05. Größenbalken: 10  $\mu\text{m}$ ). Modifiziert nach Rötzer et al. (Rötzer, Melega, Garreis, Paulsen, & Waschke, 2019).

### 3.1.3 Einfluss auf die Bildung von Adhäsionskontakten

Da in den Dispase-basierten Experimenten gezeigt wurde, dass HMGECS unter Zugabe von Serum konfluente Zellrasen bilden, wurde davon ausgegangen, dass die Expression von desmosomalen Komponenten differenzierungsabhängig ist und dass unter basalen,

proliferativen Bedingungen diese Komponenten entweder noch gänzlich fehlen oder in geringeren Mengen exprimiert werden. Da aus *in situ*-Untersuchungen an humanen Meibomdrüsen (Rotzer et al., 2016) bekannt ist, dass die desmosomalen Kontakte je nach Reifungsgrad unterschiedlich vorhanden sind, wurde hier nun überprüft, ob es sich auch in der Zellkultur ähnlich verhält. Außerdem führten die Ergebnisse aus den Dispase-Versuchen zur Hypothese, dass sowohl die Zugabe von EPA als auch die unterschiedliche Dauer der Seruminkubation Auswirkungen auf die Bildung von Zell-Zell-Kontakten haben müssen.

In einem ersten Schritt wurde das Vorhandensein von Zell-Zell-Kontaktproteinen mit der WB-Methode untersucht (Abb. 8A). Wie vermutet, stellte sich heraus, dass die meisten davon ohne Serumzugabe nicht oder nur sehr spärlich in den Zellen vorhanden sind. Dies traf auf nahezu alle hier untersuchten Proteine zu, bis auf E-Cadherin, welches sowohl in den proliferierenden (-Serum) als auch in den differenzierten Zellen (+Serum) ungefähr gleich stark exprimiert wurde. Auch Plakoglobin (Pg) und Desmoplakin (Dp), welche am zytoplasmatischen Aufbau von Desmosomen und deren Verbindung mit dem Zytoskelett beteiligt sind (Delva et al., 2009; Green & Simpson, 2007; Waschke, 2008), wurden schon im basalen Stadium exprimiert. In den Dispaseversuchen (Abb. 6) wurde interessanterweise beobachtet, dass die EPA-Zugabe nach 1d, aber nicht nach 6d, die intrazelluläre Haftung reduzierte. Im Einklang damit wurde auch in der Western-Blot (WB)-Analyse beobachtet, dass die zusätzliche Gabe von EPA die Proteinmengen von Dp, Dsg2, Dsg3 und Pg nach 1d signifikant reduzierte, während dies nach 6d nicht der Fall war.

Weiterhin wurden parallel zu den Western-Blot-Analysen alle für diese Arbeit relevanten Adhäsionsmoleküle mittels Immunfluoreszenzdarstellung (IF) analysiert. Die IF unterstützte dabei die Ergebnisse aus dem WB-Untersuchungen und ermöglichte es, die intrazelluläre Lokalisierung der Proteine genauer zu untersuchen. In Abb. 8B sind exemplarisch Färbungen gegen Dsg3 und E-Cadherin nach Kultivierung der HMGECs unter den jeweiligen Konditionen für 1d bzw. 6d dargestellt. Wie man in der Abbildung sehen kann, war Dsg3 im Serum-freien Medium sowohl nach 1d als auch nach 6d nicht an der Zellmembran zu detektieren, sondern befand sich lediglich in geringem Maße im Zytoplasma. Erst durch Serumzugabe war Dsg3 an der Zellmembran zu lokalisieren. Im Gegensatz dazu wurde E-Cadherin auch schon unter der Kondition ohne Serum an der Zellmembran detektiert. Die Intensität der membranständigen Färbung gegen E-Cadherin nahm dann durch die Supplementierung von Serum deutlich zu und blieb im Laufe der 6d in der Intensität fast unverändert.

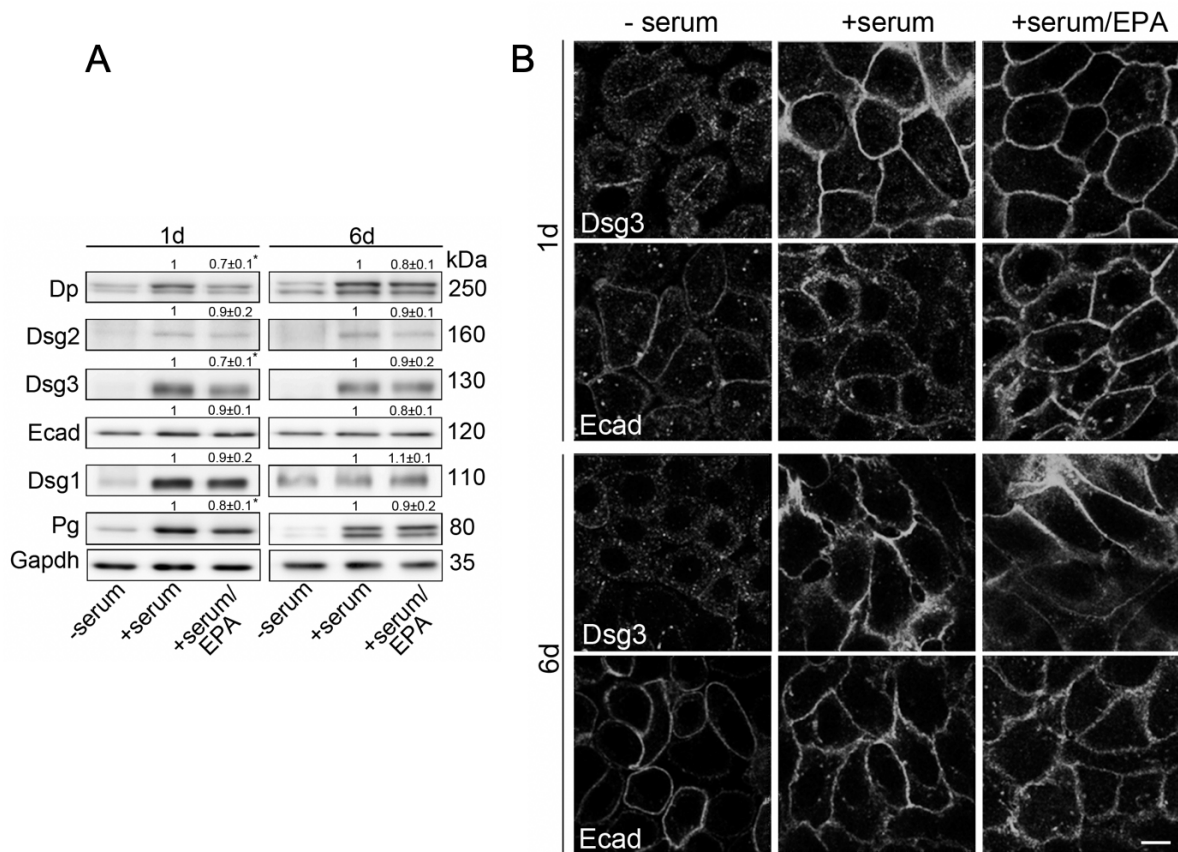


Abbildung 8: Serum-induzierte Differenzierung fördert die Bildung von Adhäsionskontakten

Repräsentativer WB von für diese Arbeit relevanten Adhäsionsmolekülen nach 1d und nach 6d vor und nach Wechsel zu Serum-haltigem Medium mit oder ohne EPA. Die Proteinmenge wurde für die „+Serum“ und „+Serum/EPA“-Kondition quantifiziert und steht oberhalb der zugehörigen WB-Banden. (n=4; \*p < 0.005 vs. +Serum). B) IF gegen Dsg3 und E-Cadherin (grün), die parallel zu den Western-Blot-Analysen durchgeführt wurden. (n=4; Größenbalken: 10 µm). *Modifiziert nach Rötzer et al. (Rötzer, Melega, Garreis, Paulsen, & Waschke, 2019).*

Vergleicht man die zwei Konditionen „+Serum“ und „+Serum/EPA“ miteinander, sieht man, dass hier ebenfalls die Ergebnisse des Western-Blots bestätigt werden: Die gefärbten Proteine waren nach 6d zwar deutlich membranständig, jedoch war das Signal in der Kondition „Serum/EPA“ weniger stark als unter reinem Serum. Zusammenfassend kann man an diesem Punkt festhalten, dass sowohl die Expression als auch die Translokation vom Zytoplasma hin zur Zellmembran von E-Cadherin und Dsg3 differenzierungsabhängig sind.

## 3.2 Modulation der Zell-Zell-Haftung und die Rolle von E-Cadherin

### 3.2.1 Bedeutung von E-Cadherin für die Zell-Zell-Adhäsion

Nach der anfänglichen Zellcharakterisierung und Quantifizierung der Lipidproduktion wurde der Zusammenhang zwischen Differenzierung und Ausbildung von starken Adhäsionskontakten weiter untersucht. Dafür wurden spezifische inhibitorische Antikörper verwendet, um die Interaktion zwischen den Adhäsionsmolekülen zu unterbinden und die Effekte auf die Zell-Zellhaftung mittels Dispase-basierter Zelldissoziations-Methode zu analysieren (Abb. 9A). Dabei wurde der Fokus auf einige wichtige Bestandteile der Adhäsionskontakte gelegt, wie Dsg1-3 und E-Cadherin. Überraschenderweise bewirkte die Antikörper-vermittelte Blockierung von E-Cadherin (anti-Ecad-Ab) sowohl alleine als auch in Kombination mit AK23, einem monoklonalen Ab aus einem PV-Maus-Modell, um Interaktionen zwischen Dsg3-Molekülen zu inhibieren, nach 1d einen enormen und signifikanten Verlust der Zelladhäsion. Wie aus untenstehender Abbildung zu entnehmen ist, lag die Fragmentzahl der Kontrollen für „+Serum“ bzw. für „+Serum/EPA“ bei  $17 \pm 3$  bzw.  $30 \pm 4$ . Bei Behandlung mit anti-Ecad-Ab bzw. anti-Ecad-Ab/AK23 belief sich die Anzahl der Fragmente auf mehrere Hunderte. Nach 6d jedoch konnte die alleinige Zugabe des anti-Ecad-Ab den Zellrasen nicht mehr signifikant destabilisieren, wobei die Fragmente unter Kontrollbedingungen im Schnitt bei max. 1,5 lagen und unter Zugabe des anti-Ecad-Ab für „+Serum“ bei  $3,3 \pm 0,7$  und für „+Serum/EPA“  $8,8 \pm 3$ . Nur in Kombination mit AK23 wurde ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Fragmente beobachtet. Dabei zeigten sich die Zellen, die zusätzlich mit EPA behandelt wurden, viel anfälliger für die Störung der Zell-Zell-Haftung. Im Gegensatz dazu hatte die alleinige Inhibition von Dsg3 durch AK23 und durch PV-IgG, also Autoantikörper von PV-Patienten zur Blockierung von Dsg3 und Dsg1, keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen.



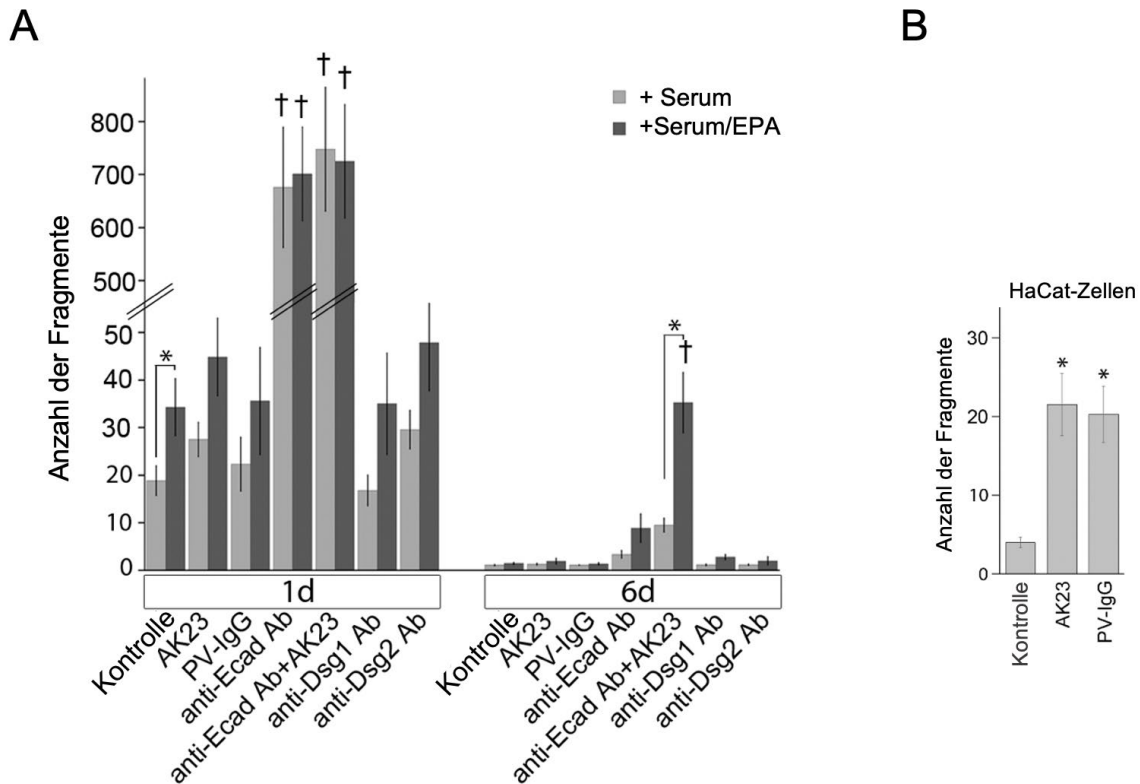


Abbildung 9: Modulation der Zell-Zell-Haftung durch spezifische Antikörper-vermittelte Hemmung der Interaktion zwischen Adhäsionsmolekülen

A) Dispase-basierte Experimente mit spezifischen Antikörpern gegen Dsg1, Dsg2, Ecad, Dsg3 (AK23) oder Dsg1/Dsg3 (PV-IgG). Nach 1d in Serum oder Serum/EPA bewirkt sowohl der anti-Ecad-Ab alleine als auch in Kombination mit AK23 einen schwerwiegenden Verlust der Zell-Zell-Adhäsion. Im Gegensatz dazu wird der gleiche Effekt nach 6d nur durch die gemeinsame Gabe von anti-Ecad-Ab und AK23 hervorgerufen. Die Inhibition von allen anderen adhäsiven Proteinen hatte hingegen keine Auswirkung auf die interzelluläre Haftung. Als Kontrolle dienten IgG aus einer gesunden Kontrollperson \* $p < 0.05$  vs. +Serum-Kondition; † $p < 0.05$  vs. respektive Kontrolle;  $n = 8$ . B) Dispase-basierter Dissoziationsversuch mit Keratinozyten, um die Wirksamkeit der Ab-basierter Inhibition mittels AK3 und PV-IgG zu ermitteln. \* $p < 0.05$  vs. +Serum-Kondition; † $p < 0.05$  vs. respektive Kontrolle;  $n = 8$ . Modifiziert nach Rötzer et al. (Rötzer, Melega, Garreis, Paulsen, & Waschke, 2019).

Die Beobachtung, dass E-Cadherin eine zentrale Rolle für die interzelluläre Haftung zwischen HMGEs spielt, während desmosomale Cadherine eine untergeordnete Rolle spielen, ist außergewöhnlich. So ist allgemein bekannt, dass in anderen Epithelien, wie etwa der Haut oder Schleimhaut, desmosomale Proteine, d.h. Desmogleine, ausschlaggebend für die Integrität der Zell-Zell-Haftung sind (Thomason, Scothern, McHarg, & Garrod, 2010; Waschke, 2008). Um dies weitergehend zu untersuchen, wurden parallel zu den Versuchen mit den HMGEs auch humane Keratinozyten (HaCaT) mit

AK23 und PV-IgG behandelt (Abb. 9B). Hierdurch konnte zum einen die Wirksamkeit von AK23 und PV-IgG nachgewiesen und zum anderen der Unterschied zwischen Keratinozyten und Meibozyten hervorgehoben werden. In Dispase-basierten Dissoziationsversuchen mit HaCaT konnte die bereits bekannte Schwächung der Zell-Zell-Kontakte durch ebengenannte Antikörper bestätigt und ein signifikanter Anstieg der Fragmente gezeigt werden.

#### **3.2.2 Bedeutung von E-Cadherin für die Lipidproduktion**

Weitere Evidenz für eine mögliche zentrale Rolle von Ecad in der physiologischen Funktion von Meibomdrüsen lieferte die Untersuchung der Lipidproduktion mittels Immunfluoreszenzdarstellung (Abb. 10). Es wurde untersucht, ob und wie sich die Integrität bzw. der Verlust der Zelladhäsion auf die Lipidproduktion auswirken würde. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, wurden HMGECs mit AK23- und anti-Ecad-Ab behandelt, um dann die Adhäsionsproteine Dsg3 und Ecad sowie die Lipidvesikel mittels einer LipidTox-basierten Färbung zu detektieren.

Da die Färbungen für die Immunfluoreszenzdarstellung parallel zu den Dispase-basierten Versuchen aus Abb. 9A durchgeführt wurden, konnte die Integrität des Zellrasens in den Kontrollen nachgewiesen werden. Außerdem war unter Kontrollbedingungen gut erkennbar, dass E-Cadherin und Dsg3 linear an der Zellmembran lokalisiert waren.

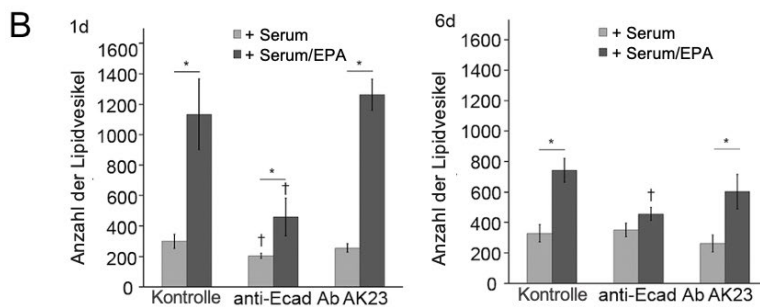
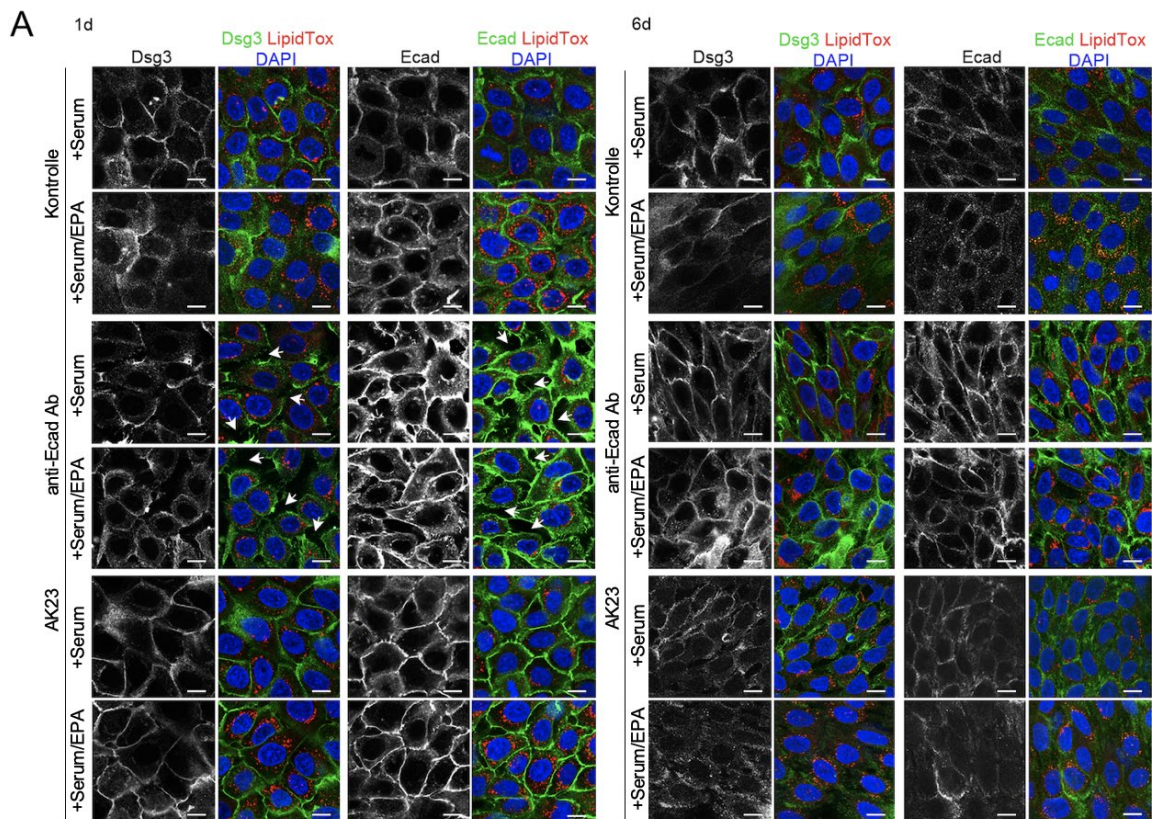


Abbildung 10: Hemmung der Haftung von Ecad und Dsg3 und ihre Auswirkung auf die zelluläre Integrität sowie Lipidakkumulation

Immunologische Färbung gegen Ecad und Dsg3 (grün), der Zellkerne mittels DAPI (blau) sowie LipidTox-Färbung zur Darstellung von Lipidvesikeln (rot) unter Kontrollbedingungen. Behandlung mit anti-Ecad-Ab und Behandlung mit AK23. Die Pfeile deuten nach 1d anti-Ecad-Ab Inkubation auf Lücken im Zellrasen hin. B) Quantifizierung der Lipidvesikel-Färbung in den Bildern aus A. n=8; \*p<0.05 vs. „+Serum-Kondition“; †p<0.05 vs. respektive Kontrolle; Größenbalken: 10 µm.

Modifiziert nach Rötzer et al. (Rötzer, Melega, Garreis, Paulsen, & Waschke, 2019).

Die Behandlung mit AK23 nach 1d der Differenzierung bewirkte eine leichte Fragmentierung der Dsg3- und E-Cadherin-Färbung entlang der Membran (Abb. 10A,

linke Seite), der Zellrasen blieb aber in seiner Integrität unverändert. Die Zugabe von anti-Ecad-Ab hingegen führte dazu, dass der Zellrasen zerfiel, wobei das Erscheinungsbild demjenigen von Zellen ähnelte, die ohne Serum kultiviert wurden. Wie die weißen Pfeile in der Abbildung verdeutlichen, entstanden Lücken im Zellrasen (Abb. 10A, 1d), welche nach AK23-Behandlung nicht entstanden. Nach 6d (Abb. 10A, rechte Seite) hatte die Inhibierung von Ecad durch anti-Ecad-Ab keinen negativen Effekt auf die interzelluläre Haftung zwischen HMGECS. Tatsächlich schienen die Meibozyten unter diesen Bedingungen resistent gegenüber der Behandlung mit anti-Ecad-Ab zu sein. Außerdem wurde weder die Färbung gegen Dsg3 noch gegen Ecad negativ beeinflusst.

Ebenfalls ergab sich die Frage, ob die Beeinträchtigung der Zell-Zell-Kontakte Auswirkungen auf die Produktion der Lipide in HMGECS haben würde. Die Quantifizierung der mit LipidTox-gefärbten Lipidvesikel (Abb. 10A) ergab, dass die Antikörper-vermittelte Störung der E-Cadherin-Haftung nach 1d eine signifikante Reduktion der Lipidvesikel zur Folge hatte. Zellen, die mit Serum/ EPA kultiviert wurden, zeigten zwar auch eine signifikante Verminderung der Lipidvesikel, jedoch war die absolute Anzahl dieser weiterhin signifikant höher als in der reinen Serum-Kultur. Die Zugabe von AK23 hatte keinen signifikanten Effekt auf die intrazelluläre Lipidakkumulation.

Bei HMGECS, die 6d lang in Kultur gehalten und dann mit den inhibitorischen Antikörpern inkubiert wurden, zeigte sich ein interessantes Phänomen. Während der Zusatz von EPA nach 1d die Anzahl der Lipidvesikel sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter Zusatz des anti-Ecad-Ab signifikant erhöhte, war dies nach 6d anders: Im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle führte die Behandlung mit anti-Ecad-Ab zwar immer noch zu einer Verminderung der Lipide; der Effekt von EPA schien vermindert zu werden. Beim Einsatz des anti-Ecad-Abs resultierte kein signifikanter Unterschied mehr in Bezug auf die Lipidvesikel zwischen den Zellen, die mit bzw. ohne EPA kultiviert worden waren (Abb. 10B).

#### **3.2.3 *Ex vivo*-Untersuchung von Meibomdrüsen in Dsg3 knock-out-Mäusen**

Der Vollständigkeit halber und für ein besseres Verständnis von pathophysiologischen Mechanismen und Korrelationen zum PV, wurden in dieser Arbeit auch Augenlider von Dsg3-KO-Mäusen im Vergleich zu ihren Geschwistertieren morphologisch untersucht. Hier wäre es natürlich interessant gewesen, Augenlider von E-Cadherin-defizienten (Ecad-knock-out; Ecad-KO) Tieren mit denen von Dsg3-depletierten (Dsg3-knock-out; Dsg3-KO)-Mäusen zu vergleichen. Jedoch stehen E-Cadherin-knock-out-Tiere nicht zur

Verfügung, da diese bereits 24h nach der Geburt versterben (Bondow, Faber, Wojta, Walker, & Battle, 2012). Um die vorherigen, zellkulturbasierten Befunde dennoch weitergehend *in vivo* zu untersuchen, wurde die Morphologie und die Akkumulation von Lipidvesikeln in Kontroll (Wildtyp, WT)- mit Dsg3-KO-Mäusen verglichen (Abb.11 A). In den Kryoschnitten der Augenlider war kein Unterschied in der LipidTox-Färbung zu sehen. Weiterhin zeigten sich die Meibomdrüsen im konfokalen Mikroskop gleich (Abb. 11 B). Um dies quantitativ zu analysieren, wurde die Menge der vorhandenen Lipidvesikel untersucht, indem die Fläche der mit LipidTox gefärbten Lipidvesikel auf die Gesamtfläche der dazugehörigen Drüse bezogen wurde. Somit zeigte die Quantifizierung der Lipidverteilung keinen signifikanten Unterschied zwischen WT- und Dsg3-KO Mäusen (Abb. 11C). Deckend mit den vorherigen Ergebnissen zeigte sich auch in diesem Fall keine Auswirkung auf Morphologie und Lipidproduktion bei Defizienz von Dsg3, sodass die bisher gezogenen Schlüsse, d.h. dass Dsg3 eine untergeordnete Rolle für die Integrität der Meibomdrüsen spielt, in einem *ex vivo*-Ansatz zusätzlich bekräftigt wurde.

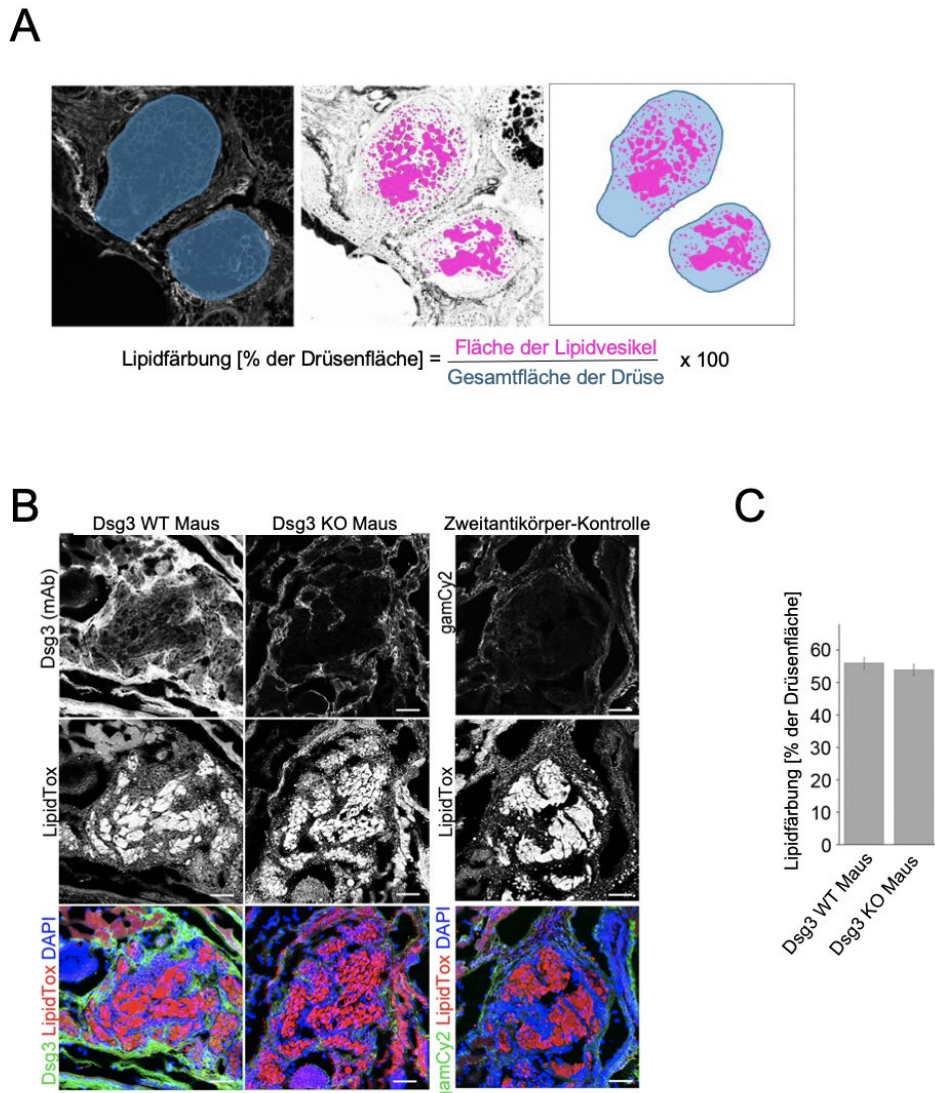


Abbildung 11: Meibomdrüsen-Morphologie und Lipidproduktion in Dsg3-KO Mäusen

Schematische Darstellung zur Beschreibung der Quantifizierung von Lipidvesikel innerhalb von Meibomdrüsen; hierbei wurde die Fläche, die die Lipidvesikel bedecken, determiniert (rosa) und auf die Gesamtfläche der Meibomdrüsen (blau) bezogen. B) Immunfluoreszenzdarstellung von Meibomdrüsen aus Kontroll (Dsg3-Wildtyp; WT)- und Dsg3-KO-Mäusen. Färbung gegen Dsg3 (grün), Lipidvesikel wurden mittels LipidTox (rot) und Zellkerne mittels DAPI (blau) dargestellt. Die Spezifität der Färbung wurde mittels einer Zweitantikörperkontrolle bestätigt, indem ausschließlich mit gamCy2 inkubiert wurde. Die Morphologie und Größe der Drüsen unterscheiden sich nicht. C) Quantifizierung der Lipide als prozentualer Anteil der Gesamtfläche der Drüsen wie in A) gezeigt. Kein signifikanter Unterschied zwischen Dsg3-WT- und -KO-Tieren. n = 3; Größenbalken: 50  $\mu$ m.

Modifiziert nach Rötzer et al. (Rötzer, Melega, Garreis, Paulsen, & Waschke, 2019).

### 3.3 Modulation der interzellulären Haftung durch Signalwege und Hyperadhäsion

#### 2.3.1 Rolle von Signalwegen

Als nächstes wurde der Fokus auf Signalwege gelegt, welche an der Regulierung der Zell-Zell-Haftung beteiligt und bereits aus anderen Epithelien bekannt sind, welche aber in HMGECs bis dato noch nicht untersucht worden waren. Dabei wurde das Augenmerk auf jene Signalwege gelegt, welche aus der Pathogenese des PV bekannt sind. Wie in Abbildung 4 in der Einleitung bereits beschrieben wurde, ist bekannt, dass spezifische Signalwege essentiell für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der zellulären Adhäsion sind. Eine Fehlregulierung dieser Signalwege durch PV-Antikörper führt zum Verlust der Zellkontakte und zum Erscheinungsbild der Krankheit (Spindler et al., 2018). In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst Effekte der induzierten Modulation der Signalwege auf HMGECs untersucht, welche cAMP/PKA, PKC und EGFR betreffen.

Hierfür wurde die Auswirkung der Modulation besagter Signalwege auf die Zell-Zell-Kontakte in HMGECs in Dispase-basierten Dissoziationsversuchen untersucht (Abb. 12). Aus vorherigen Experimenten mit Keratinozyten ist bekannt, dass eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels durch Zugabe von Forskolin und Rolipram (F/R) sowohl einen stabilisierenden Einfluss unter basalen Bedingungen als auch einen protektiven Effekt gegenüber PV-Antikörper-vermittelter Schwächung der Zelladhäsionen hat (Spindler, Vielmuth, Schmidt, Rubenstein, & Waschke, 2010).

In der Tat zeigte sich auch in den HMGECs 1d nach Differenzierung eine signifikant reduzierte Anzahl von Fragmenten, wenn die Zellen mit F/R behandelt wurden. So waren in den Kontrollzellen  $16 \pm 3$  und  $30 \pm 3,5$  („+Serum“ bzw. „+Serum/EPA“) Fragmente, während die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration die Fragmentanzahl signifikant auf unter 3 reduzierte. Dies lässt den Schluss zu, dass die Zell-Zell-Kontakte auch in Meibozysten, ähnlich wie bei Keratinozyten, durch höhere cAMP-Spiegel stabilisiert werden. Der PKC-Signalweg spielt ebenfalls eine zentrale Rolle für die Stabilität der Zellkontakte innerhalb der Haut und ist bei PV dahingehend fehlreguliert, dass er ein zentraler Mitverursacher des pathologischen Verlustes der Zell-Zell-Kontakte ist (Sajda & Sinha, 2018). Bei Modulation des PKC-Signalweges nach 1d zeigte sich interessanterweise sowohl durch Inhibierung mittels BIM-X als auch durch Aktivierung mittels PMA eine deutliche Erhöhung der Zellfragmentzahl auf über 40. Die Modulation des EGFR-Signalweges erfolgte einerseits durch Behandlung der Zellen mit EGF und andererseits mit Erlotinib. Wie in der Literatur nachzulesen ist, wurde die Rolle von EGFR in Keratinozyten bzw. in PV bereits untersucht (Saito et al., 2012; Sayar et al.,

2014; Schulze et al., 2012; Walter et al., 2019). Auch in HMGECs führte die Inhibierung von EGFR mittels Erlotinib nach 1d zu einer stark reduzierten Anzahl an Fragmenten, welche sowohl bei Serum- als auch bei Serum/EPA-Behandlung weniger als drei betrug. Die entgegengesetzte Wirkung erreichte man hingegen mit der Aktivierung von EGFR durch EGF, was signifikant mehr Zellfragmente verursachte. Die Anzahl der Fragmente lag bei  $37 \pm 5$  bzw.  $38 \pm 5$  für „Serum“ bzw. „Serum/EPA“. Ein deutlicher und signifikanter Unterschied zwischen Serum- und Serum/EPA-behandelten Zellen gab es nur in Kontrollzellen und in BIM-X-behandelten Zellen.

Zusammenfassend lässt sich für 1d-differenzierte HMGECs sagen, dass die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration, ähnlich der Inhibierung des EGFR-Signalweges, eine protektive Wirkung auf die Zell-Zell-Haftung hatte. Anders verhält es sich bei der Modulation des PKC-Signalweges, wo es sowohl durch Aktivierung mittels PMA als auch durch Inhibierung mittels BIM-X zu einer Schwächung der Zellkohäsion kam. Der nicht signifikante Unterschied zwischen Serum- und Serum/EPA-Behandlung bzgl. der Fragmentanzahl nach PMA-Behandlung betrug durchschnittlich 9 Fragmente. Nach Inkubation mit BIM-X hingegen waren die Fragmente bei Serum/EPA-behandelten Zellen um etwas mehr als das 2,5-Fache erhöht im Vergleich zu den nur mit Serum behandelten Zellen.

Interessanterweise ließen sich nach 6d Differenzierung keine Effekte der Mediatoren-vermittelten Modulation der genannten Signalwege auf die interzelluläre Adhäsion in HMGECs detektieren. Dies lässt den Schluss zu, dass HMGECs nach 6d Differenzierung nicht nur unter basalen Kontrollbedingungen, sondern auch unter Modulation von Signalwegen, die nach 1d die Zell-Zell-Haftung massiv stören, resistent gegenüber mechanischem Stress sind.



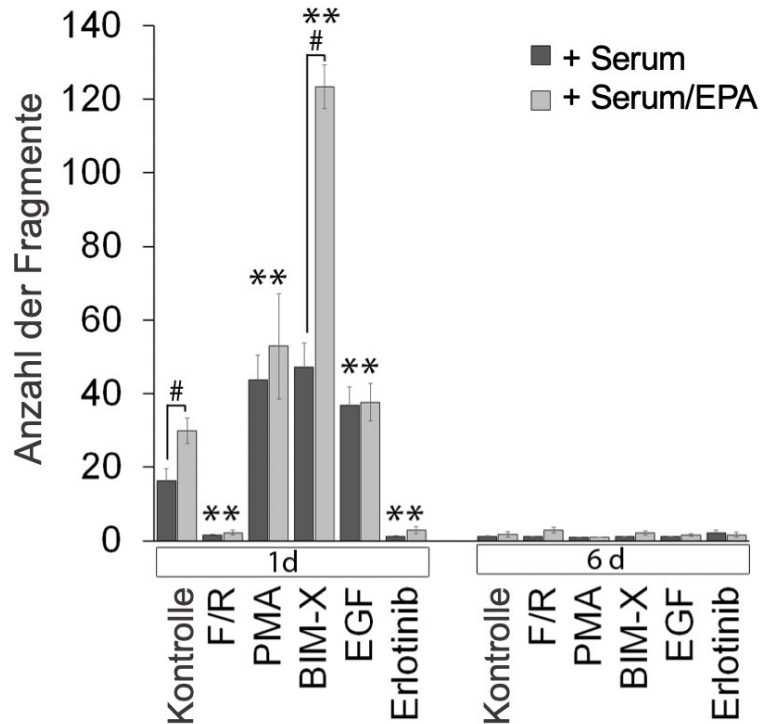


Abbildung 12: Untersuchung der Zell-Zell Haftung nach Modulation bestimmter Signalwege

Untersuchung der interzellulären Kohäsion zwischen Meibomdrüsenzellen im Dispase-basierten Dissoziationsversuch. Analyse nach Aktivierung oder Inhibition bestimmter Signalwege, welche in der Pathophysiologie von PV involviert sind. Eine Erhöhung von cAMP durch F/R bzw. durch Inhibition von EGFR durch Erlotinib nach 1d bewirkt eine signifikante Stärkung der Zell-Zell-Kontakte. Im Gegensatz dazu nahm die interzelluläre Kohäsion sowohl durch Inhibition von PKC mittels BIM-X als auch durch Aktivierung von EGFR via EGF ab. Es konnten keine dergleichen Veränderungen nach 6d beobachtet werden. (n=8, # p<0.05 vs. +Serum; \*p<0.05 vs. respektive Kontrolle; Größenbalken: 10 µm.)

### 3.3.2 Rolle der Hyperadhäsion

Aus Experimenten mit Keratinozyten ist bekannt, dass Desmosomen einen hyperadhäsiven, d.h. Ca<sup>2+</sup>-unabhängigen Zustand erlangen können (D. Garrod & Kimura, 2008), in dem sie, ähnlich wie für 6d differenzierte HMGECS (siehe Abb. 6, 9 und 12), resistent gegenüber mechanischem Stress werden. Um zu überprüfen, ob HMGECS ebenfalls einen Hyperadhäsion-Zustand einnehmen, wurde ein für Keratinozyten etabliertes Protokoll (Dehner, Rötzer, Waschke, & Spindler, 2014) angepasst. Gemäß diesem Protokoll (Abb. 13A) wurden HMGECS nach 1d bzw. 6d im Differenzierungsmedium mit Ca<sup>2+</sup>-Chelator EGTA für 1,5 Stunden behandelt. Nach dieser 1,5-stündigen Inkubation von EGTA zur Ca<sup>2+</sup>-Depletion wurden die Zellen dem Scherstress im Dispase-Assay ausgesetzt. Wie unter 3.1 erklärt, ermöglicht im Falle der

HMGECs erst der Wechsel vom Proliferations- zum Differenzierungsmedium die Ausbildung eines adhäsiven Zellrasens. Obwohl nicht gänzlich getestet, so geht man davon aus, dass  $\text{Ca}^{2+}$  auch in Meibozysten ein maßgeblicher Faktor für die Ausbildung der interzellulären Haftung ist (Hampel, Schröder, et al., 2015; Schröder et al., 2016). Wie außerdem in der Literatur beschrieben (Griswold et al., 1993; Scholz, 1989), bewirkt eine intrazelluläre Erhöhung der cAMP-Konzentration einen verstärkten, protektiven Effekt gegenüber einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Depletion. Aus diesem Grund wurden in dieser Experimentenreihe zwei weitere Konditionen untersucht: Zellen, die mit F/R zur Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels behandelt wurden und anschließend für die letzten 1,5 Stunden des Versuchsansatzes mit (EGTA+F/R) oder ohne (K+F/R) inkubiert wurden. und.

So erstaunt es nicht, dass 1d-Zellen nach EGTA-Behandlung keinen konfluenten Zellverband mehr bildeten (Abb. 13B, linke Seite). Da durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Depletion sehr viele Einzelzellen vorlagen, war es nicht möglich, diese zuverlässig im Dispase-Assay auszuzählen, weswegen auf eine Quantifizierung und Analyse der Fragmentzahl nach 1d verzichtet wurde. Interessanterweise hatte unter diesen Konditionen die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels durch F/R-Behandlung einen stark protektiven Effekt. Der Zell-Zell-Haftungsverlust wurde reduziert, was in den IF-Darstellungen gut am konfluenten Zellverband zu erkennen ist (Abb. 13B, linke Seite). Wie außerdem in Abbildung 13B zu erkennen ist, waren bei 1d-differenzierten HMGECs nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Depletion sowohl Dsg2 als auch Dsg3 nicht mehr an der Zellmembran lokalisiert. E-Cadherin hingegen war stets membranständig detektierbar, auch nach EGTA-Applikation bei nicht mehr geschlossenem Zellverband. Außerdem war es sehr eindrücklich, dass der Zellrasen unter Zugabe von F/R trotz EGTA fast vollständig intakt blieb. Auch Pg verhielt sich ähnlich wie E-Cadherin, da Pg unter allen Bedingungen an der Zellmembran detektierbar war. F/R bewirkte bei gleichzeitiger Applikation mit EGTA und der dadurch vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Depletion eine schwache, aber dennoch deutliche Lokalisation von Dsg3 entlang der Zellmembranen. Dsg2 verhält sich allerdings etwas anders als Dsg3; erstgenanntes ist nämlich auch nach F/R-Applikation in der EGTA-Kondition nicht an den Zellgrenzen zu sehen, sodass es sensibler auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Depletion zu reagieren scheint.

Interessant war weiterhin, dass für 6d differenzierte Zellen zumindest teilweise resistent gegenüber dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Entzug waren und die Zell-Zell-Haftung unter dieser Kondition durch zusätzliche F/R-Gabe weiter gestärkt werden konnte. Bei 6d-differenzierten HMGECs, die sich unserer Hypothese nach in einem hyperadhäsiven Zustand befanden, zeigte sich zunächst in der IF-Darstellung ein durchaus interessanter Aspekt (Abb. 13B,

rechte Seite): Dsg3 war nach EGTA-Behandlung nicht vollständig von der Zellmembran verschwunden. Es war noch sichtbar, die Lokalisation wirkte jedoch diskontinuierlich. E-Cadherin hingegen blieb unter jeder Bedingung an den Zellgrenzen lokalisiert, bei EGTA+F/R war es sogar verstärkt nachweisbar. Wie schon in den IF-Aufnahmen bei 1d Zellen, zeigte sich auch nach 6d eine besondere Verteilung von Dsg2. Diese war zwar noch schwach an den Membranen sichtbar, jedoch war sie unter EGTA deutlich fragmentierter als die von Dsg3 und konnte auch nicht durch zusätzliche Gabe von F/R wiederhergestellt werden.

In den parallel durchgeführten Dissoziationsversuchen, welche in untenstehender Abbildung exemplarisch nur am Beispiel von „+Serum“ gezeigt werden, sind die Zellen zumindest teilweise resistent gegenüber dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Entzug: Die Fragmentzahl beträgt sowohl unter reinen Kontrollbedingungen als auch unter Zugabe von F/R weniger als zwei. Die Inkubation mit EGTA erzeugt eine Anzahl von im Schnitt  $180 \pm 60$  Fragmenten, während die gleichzeitige Inkubation von EGTA und F/R die Fragmentzahl signifikant auf  $49 \pm 18$  reduziert.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die  $\text{Ca}^{2+}$  Depletion – ähnlich wie für Keratinozyten-Zelllinie HaCaT gezeigt und in vorherigen Arbeiten für HMGECs vermutet – einen negativen, die Erhöhung der cAMP- und somit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch F/R hingegen einen protektiven Effekt auf den Zusammenhalt der Zellen hat. Wie in der IF-Darstellung (Abb. 13B) zu sehen ist, bleibt E-Cadherin sowohl bei 1d- als auch bei 6d-Zellen trotz  $\text{Ca}^{2+}$ -Depletion mittels EGTA an der Zellmembran lokalisiert; auch Pg ist – wenn auch schwächer – noch an der Zellmembran lokalisiert. Dsg3 und Dsg2 hingegen verschwinden bei 1d-Zellen nach EGTA-Behandlung von den Zellgrenzen; bei 6d-Zellen sind diese in der EGTA-Kondition zwar schwach vorhanden, aber deutlich fragmentiert. Die Inkubation von F/R zusammen mit EGTA bewirkt einerseits, dass die Integrität des Zellverbands erhalten bleibt und dass andererseits Dsg3, E-Cadherin und Pg nicht verschwinden. Nur Dsg2 scheint deutlicher auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Entzug zu reagieren, da es bei 1d-Zellen nicht und bei 6d-Zellen kaum detektierbar ist. Im Dispase-vermittelten Dissoziationsversuch zeigte der Einsatz von F/R einen signifikant positiven Einfluss auf die Anzahl der Zellfragmente.

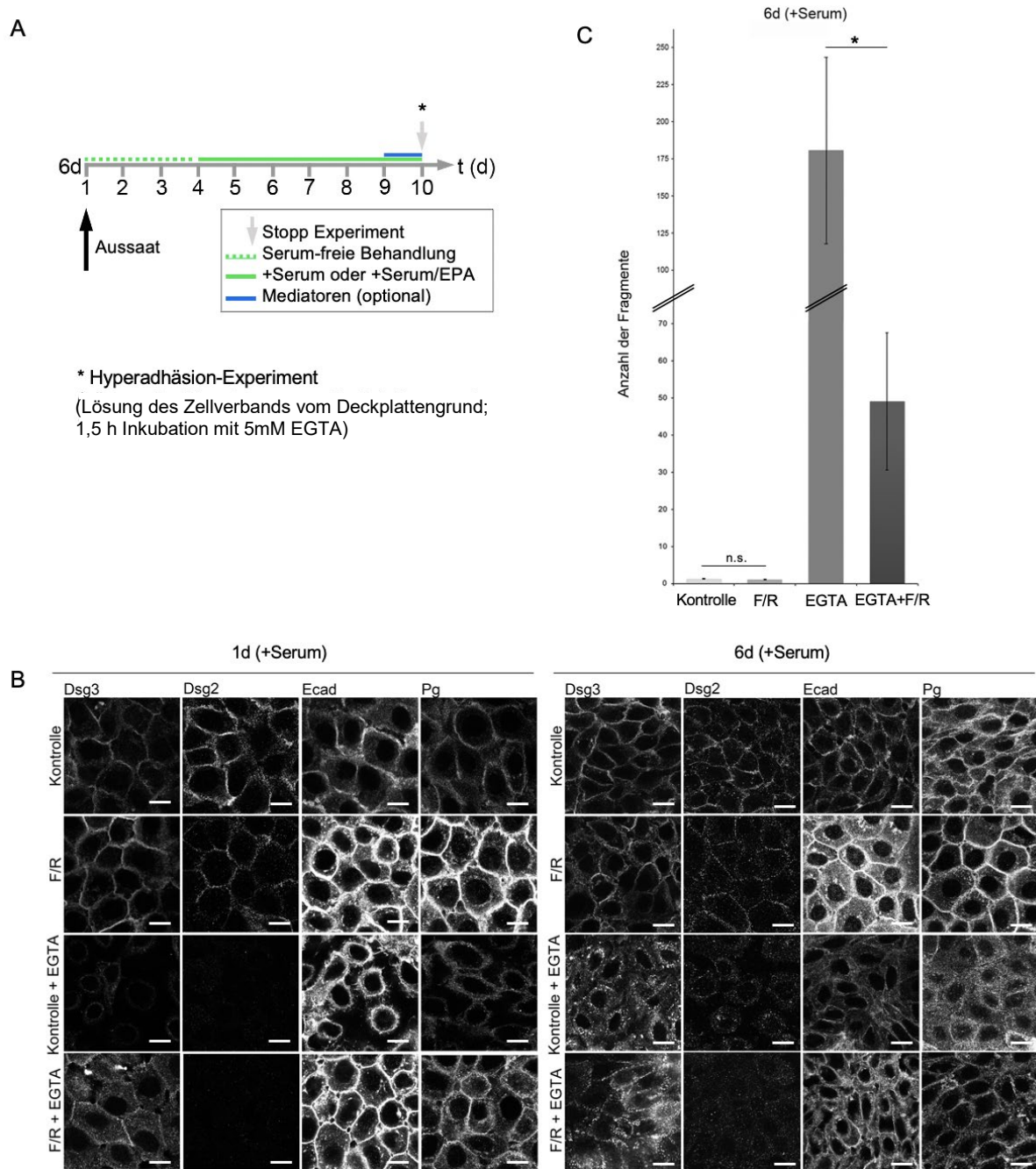


Abbildung 13: Untersuchung der Hyperadhäsion nach EGTA-vermittelter  $Ca^{2+}$ -Depletion

A) Zeitachse für die Hyperadhäsionsexperimente; Untersuchung der Hyperadhäsion nach 6d Differenzierung durch Zugabe von EGTA für 1,5 Stunden. B) Immunfluoreszenzdarstellung nach 1d- bzw. 6d-Differenzierung; Färbung gegen Dsg3, Dsg2, E-Cadherin und Pg von HMGECS, die mit und ohne EGTA behandelt wurden. Alleinige exemplarische Darstellung der Kondition +Serum, n=5. C) Quantifizierung der Fragmentanzahl im Dispase-basierten Dissoziationsversuch unter Kontrollbedingungen und unter  $Ca^{2+}$ -Entzug mittels EGTA-Gabe für die Kondition +Serum. F/R in Kombination mit EGTA hat einen signifikant protektiven Effekt gegenüber der  $Ca^{2+}$ -Depletion, n=10, \* $p < 0.05$  vs. respektive Kontrolle. Größenbalken: 10  $\mu$ m.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal die Regulation der Zell-Zell-Kontakte und die damit zusammenhängende Lipidproduktion in Meibomdrüsen untersucht. In einem ersten Schritt wurden die Meibozyten charakterisiert und die Expression von Proteinen, die für die interzelluläre Adhäsion relevant sind, analysiert. Daraufhin wurde der Fokus auf die eigentliche physiologische Aufgabe der HMGECs gelegt und die Lipidsekretion genauer betrachtet. Sowohl unter basalen Bedingungen als auch unter Verwendung von spezifischen inhibitorischen Antikörpern und Mediatoren wurden die Zusammenhänge zwischen Zelladhäsion und Lipidakkumulation in den Zellen beobachtet. Wie bereits in vorherigen Arbeiten gezeigt und etabliert werden konnte (Hampel, Schröder, et al., 2015; Sullivan et al., 2014), induziert die Kultivierung von HMGECs in Serum-haltigem Medium die Differenzierung der Zellen. Durch die im Ergebnisteil dargestellten Untersuchungen erlangten wir die Einsicht, dass sowohl die Bildung von Zell-Zell-Kontakten als auch die Produktion von Lipiden differenzierungsabhängig sind. Sehr interessant war die Erkenntnis, dass E-Cadherin anders als die desmosomalen Proteine bereits im undifferenzierten Zustand exprimiert wird. Zudem konnten mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass E-Cadherin im Gegensatz zu desmosomalen Bestandteilen für physiologische Prozesse in HMGECs von übergeordneter Rolle ist. Die hier erhobenen Daten zeigen zudem, dass die zeitliche Komponente und der Zusatz von EPA in Bezug auf die Differenzierungsprozesse eine wichtige Rolle spielen. Es wurden auch neue Ansatzpunkte geschaffen für die Weiterforschung von Signalwegen, welche an der Reifung und Differenzierung von Meibozyten beteiligt sein könnten und zudem eine mögliche Verbindung zu PV darstellen bzw. Gemeinsamkeiten mit den Signalwegen in Keratinozyten darstellen; besonders wichtig scheinen dabei die Signalwege zu sein, welche die cAMP-Konzentration und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase beeinflussen. Außerdem wurde auch die Eigenschaft der Hyperadhäsion in HMGECs untersucht, wo die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ebenfalls eine zentrale Rolle spielt. Dabei zeigten sich die immortalisierten Meibozyten anfällig gegenüber einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Depletion, welcher jedoch durch Behandlung mit F/R entgegengewirkt werden konnte. Die Zellen waren nach 6d Differenzierung gegenüber dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Entzug ein Stück weit resistent.

### 4.1 Serum und EPA spielen eine essentielle Rolle im Differenzierungsprozess von HMGECs

Wie in anderen Studien gezeigt wurde, ist der Zusatz von Serum essentiell für die Reifung der Meibozyten (Hampel & Garreis, 2017). Dies wurde mit dieser Arbeit ebenfalls

bestätigt, wobei sich die Frage ergab, ob ein Zusammenhang zwischen dem Reifungsgrad, der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und der Menge der produzierten Lipidvesikel besteht. Durch Serum-Zugabe gelang es, die Differenzierung der Meibozysten und somit sowohl die Lipidproduktion als auch die Bildung von Adhäsionskontakten zu induzieren, wie in den Abbildungen 7 und 8 im Ergebnisteil zu erkennen ist.

Gleichzeitig wurde untersucht, ob der Zusatz von Serum/EPA im Vergleich zur reinen Serum-Zugabe einerseits die intrazelluläre Lipidakkumulation alterieren und andererseits die Zellkohäsion modulieren würde. Wie Schaumberg (Schaumberg et al., 2011) zusammenfasst, gibt es mehrere klinische Studien (Barabino et al., 2003; Macsai, 2008; Rashid et al., 2008), die darauf hinweisen, dass sich die Supplementierung von  $\omega$ -3- und  $\omega$ -6-Fettsäuren positiv auf Entzündungsprozesse und auf die Symptomatik bei DED-Patienten auswirkt. Die hier erhobenen Daten zeigen, dass der Zusatz von EPA eine Steigerung der Lipidproduktion in Meibozysten bewirkte (Abb. 14).

Weiterhin zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (siehe Abb. 7), dass der EPA-Zusatz die Expression von Zellkontakt-Proteinen nach 1d Differenzierung reduzierte. Die Tatsache, dass die Zellen mit Serum/EPA weniger Desmosomen und Adhärenskontakte exprimierten, legt nahe, dass EPA die Zellen weniger schnell reifen lässt und sie in einen unreiferen Zustand hält. Dies deckt sich mit früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, dass die Anzahl der Desmosomen mit zunehmendem Reifegrad zunehmen (Rötzer et al., 2016).

Was hier in dieser Arbeit bezüglich der Lipidproduktion beobachtet wurde und sich auch mit anderen Studien deckt (Hampel & Garreis, 2017), ist, dass die Lipidproduktion durch Serum zwar induziert und gesteigert wird, jedoch nach einigen Tagen sistiert bzw. nicht weiter zunimmt. Auch hier bestätigt sich unsere Annahme, dass der Zusatz von EPA zwar in gewissem Maße die anfängliche Reifung in Bezug auf die Lipide etwas beschleunigt, die Zellen dann aber nicht weiter reifen. Hier sei jedoch vermerkt, dass Hampel et al. davon ausgeht, dass die in Kultur gehaltenen HMGEC-Linie den apoptotischen Zustand, den Zellen *in vivo* erreichen, nicht einnehmen können; dies sei als eine der Limitationen der Zellkultur zu betrachten. Außerdem wird in ebengenannter Publikation darauf aufmerksam gemacht, dass die in Kultur gehaltenen Zellen nicht wie unter physiologischen Bedingungen in Azinus- und Ductus-Zellen eingeteilt werden können, da sie Eigenschaften von beiden aufweisen. All dies legt nahe, dass die HMGECs nur

begrenzt für die Untersuchung pathophysiologischer Prozesse geeignet ist, weswegen die Konzeption neuer Modelle dringend erforderlich ist (siehe 4.7).

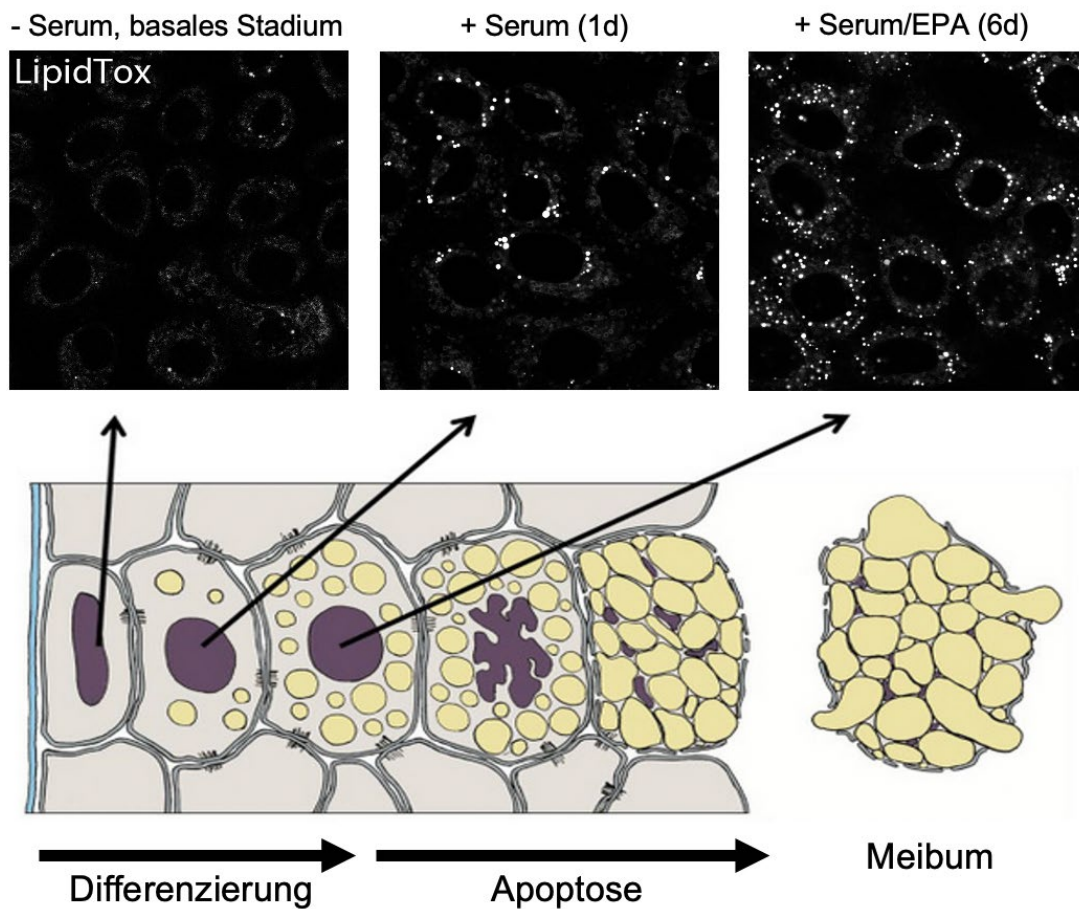


Abbildung 14: Serum-induzierte Differenzierung und Reifung in HMGECs

Oben: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Meibozyten in unterschiedlichen Reifungsstadien. Sichtbar ist die Zunahme der Lipidvesikel in LipidTox-Färbung unter Zugabe von Serum bzw. Serum/EPA. Unten: Schematische Darstellung modifiziert nach Hampel und Garreis; Meibozytenreifung und Bildung von Meibum bis hin zur Apoptose und Sezernierung des lipidreichen Materials in die Drüsengänge.

Modifiziert nach Hampel & Garreis, 2017 (Hampel & Garreis, 2017).

In Einklang mit neueren Erkenntnissen (Barabino et al., 2017) konnte ebenfalls mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Supplementierung von Fettsäuren aus dem  $\omega$ -Stoffwechsel einen positiven Effekt auf die Integrität von Meibomdrüsen hat.

Interessant ist weiterhin die Tatsache, dass EPA nach 6d Differenzierung zwar die intrazelluläre Akkumulation von Lipidvesikeln zusätzlich steigerte, jedoch die Menge an exprimiertem Pg, Dsg3 und Dp nicht signifikant reduzierte. Wie später noch diskutiert wird, könnte das dadurch erklärt werden, dass die Zellen nach 6d sowohl durch Serum als

auch durch Serum/EPA einen sehr stabilen Zustand erreichen, der als Hyperadhäsion bezeichnet wird (siehe 4.6)

## **4.2 E-Cadherin ist von zentraler Bedeutung für die Zell-Adhäsion und Lipidproduktion in Meibozyten**

Wie bereits erwähnt, wiesen Meibomdrüsen in *in situ*-Untersuchungen eine vermehrte Expression von Desmosomen in Abhängigkeit vom Reifungsgrad auf (Rötzer et al., 2016). Da auch aus anderen Epithelien bekannt ist, dass desmosomale Proteine für die Integrität der Zellverbindungen wichtig sind, entstand die Arbeitshypothese, dass auch in HMGEs vor allem desmosomale Proteine und deren verstärkte bzw. abgeschwächte Expression zu einer erhöhten oder verminderten Lipidproduktion führen könnte. Von der Hypothese ausgehend, dass desmosomale Proteine eine zentrale Rolle für die Zell-Homöostase spielen, schien auch eine mögliche Verbindung zu den Augenbeschwerden bei PV naheliegend (Tan et al., 2015), da bei PV Desmosomen die Angriffspunkte der pathophysiologischen Prozesse darstellen. Basierend auf den vorliegenden Untersuchungen ergab sich jedoch die Einsicht, dass E-Cadherin eine zentrale Rolle in der Zelladhäsion zwischen HMGEs spielt. Außerdem ist das Molekül bereits in einem sehr frühen Stadium der Zellreifung an der Zellmembran zu sehen und wird demnach im Unterschied zu den desmosomalen Cadherinen Serum-unabhängig exprimiert. Auch das spricht für eine besondere Rolle des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin. Man könnte vermuten, dass E-Cadherin im Proliferationsstadium ohne Serum eine andere Aufgabe innehat als die der Adhäsion, da sich in den Dispase-basierten Dissoziationsversuchen zeigte, dass der Zellverband nicht stabil und demnach das exprimierte E-Cadherin nicht primär zur Stabilität des Zellverbandes beiträgt bzw. nicht alleine dazu imstande ist. Im Laufe der Serum-induzierten Differenzierung ändert sich die Rolle von Ecad allerdings und erfüllt in großem Maße eine Hauptfunktion in vielerlei Hinsicht: Einerseits beeinträchtigt die Inhibition der E-Cadherin-vermittelten Haftung die interzelluläre Kohäsion. Andererseits bewirkt die Inhibition von E-Cadherin eine verminderte Lipidproduktion in HMGEs. Zudem ergeben sich morphologische Veränderungen des Zellverbandes mit Lücken zwischen den davor konfluenten Zellen. Weil der anti-Ecad-Ab im Anfangsstadium der Differenzierung nach 1d in Serum-haltigem Medium, aber nicht nach 6d, eine signifikante Störung der Zelladhäsion verursacht, spricht dies dafür, dass E-Cadherin besonders im frühen Differenzierungsstadium eine entscheidende Rolle für den Zusammenhalt des Zellverbundes spielt. In der IF-Darstellung konnte man auch



sehen, dass E-Cadherin bei Zugabe von F/R, welches in den Dissoziationsversuchen deutlich protektiv war, stärker an der Membran lokalisiert war (Abb. 13).

Die starke Beeinträchtigung der interzellulären Kohäsion nach 1d durch den Ab-vermittelte Inhibierung der E-Cadherin-vermittelten Adhäsion könnte sowohl durch direkte Interaktion mit den AJ entstehen als durch indirekte Prozesse. Diese Prozesse könnten beispielweise verschiedene Signalkaskaden auslösen, welche die physiologische Assemblierung von Zell-Zell-Kontakten und dann auch die Reifung der Meibozysten sowie die Lipidsynthese verändern. In Zukunft könnte man dahingehend untersuchen, dass man eine zusätzliche, nicht nur rein adhäsive Funktion von E-Cadherin untersucht. E-Cadherin könnte demnach noch eine Katalysator-Funktion ausüben, die Zellprozesse reguliert und im Falle der HMGECS auch Syntheseprozesse in die Wege leitet.

### **4.3 E-Cadherin ist für die Stabilisierung von Adhäsionsmolekülen wichtig**

Die Tatsache, dass die Funktionsverlust von E-Cadherin einen massiven Verlust der Zelladhäsion bewirkte wohingegen die Ab-basierte Inhibierung von desmosomalen Komponenten wie Dsg1-3 hingegen nicht, spricht stark dafür, dass die Stabilisierung der Zellhaftung in Meibozysten im Vergleich zu andere, gut beschriebene Epithelzelllinien, wie etwa die humane Keratinozytenzelllinie HaCaT, komplett anders erfolgt, obwohl frühere Studien zeigten, dass die Desmosomenverteilung in Meibozysten ähnlich wie die in der Epidermis ist (Waschke, 2008). Da jedoch nur die kombinierte Störung von E-Cadherin und Dsg3 durch gleichzeitige Anwendung von anti-Ecad-Ab und AK23 nach 6d eine signifikante Störung der Zelladhäsion bewirkte, lässt den Schluss zu, dass E-Cadherin in Meibozysten wichtig für die Stabilisierung desmosomaler Komponenten ist. Auch in HaCaTs spielt E-Cadherin eine essentielle Rolle bei der Assemblierung von Dsg3 an der Zellmembran sowie bei dessen Verankerung am Zytoskelett und Ausbildung von desmosomalen Haftkontakten (Rötzer et al., 2015). Auch frühere Forschungsbefunde belegen, dass es gut untersuchte Mechanismen zwischen Cadherinen und Desmosomen gibt, welche in der Assemblierung von Zell-Zell-Kontakten eine wichtige Rolle spielen (Gumbiner, Stevenson, & Grimaldi, 1988; Lewis, Jensen, & Wheelock, 1994; Lewis et al., 1997). Dies könnte auch bei Meibozysten der Fall sein. E-Cadherin könnte auch bei HMGECS in großem Maße dazu beitragen, dass sich Desmosomen richtig assemblieren. Diese könnten dann erst im fortgeschrittenen Differenzierungsstadium nach 6d so stabil und reichlich an der Zellmembran vorhanden sein, dass sie wichtiger für die Integrität des Zellverbands werden. Dass desmosomale Cadherine nach 6d mehr an der Zellkohäsion

beteiligt sind, wird durch die 6d Experimente unterstützt, wo nur noch die Kombination von anti-Ecad-Ab und AK23 destabilisierend wirken.

#### **4.4 Korrelation zwischen Lipidproduktion und Meibomdrüsen-Morphologie in Dsg3 knock-out-Mäusen**

Wohl wissend, dass ein humanes *ex vivo*-Modell für weiterführende Untersuchungen besser geeignet ist, wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich zur reinen Zellkultur auch ein Mausmodell verwendet, um die Morphologie von Meibomdrüsen und die Verteilung der Zellkontaktkomponenten zu analysieren. Wie in der Literatur aufgezeigt wird, gibt es noch kein richtig geeignetes Modell zur pathophysiologischen Untersuchung von Meibomdrüsen (Asano et al., 2018; Tong & Gupta, 2016). Im Zuge unserer Experimente wäre es naheliegend gewesen, ein Ecad-KO-Mausmodell zu untersuchen. Da es jedoch nicht möglich ist, an Ecad-defizienten Mäusen zu arbeiten, weil diese 24 h nach Geburt versterben und somit nicht lebensfähig sind (Bondow et al., 2012), wurde ein Dsg3-KO-Mausmodell genutzt. Wie in Abbildung 10 zu sehen ist, unterschieden sich die Drüsen von KO- und von WT-Geschwistertieren nicht, sodass unsere *in vitro*-Daten mit HMGECs bestätigt wurden, laut denen desmosomale Cadherine und insbesondere Dsg3 eine eher untergeordnete Rolle für die Homöostase von Meibomdrüsen zu spielen scheinen.

#### **4.5 Die Rolle der Meibomdrüsen-Dysfunktion für die Augenbeteiligung bei PV**

Da es mehrere Fallberichte gibt, in denen eine Augenbeteiligung bei PV beschrieben wird (Akhyani et al., 2014; Broussard, Leung, Moradi, Thorne, & Fine, 2016; Daoud, Cervantes, Foster, & Ahmed, 2005; Memar, Jabbehdari, Caughlin, & Djalilian, 2020), sollte weiterhin mit dieser Arbeit ein möglicher Zusammenhang zwischen der Meibomian Gland Dysfunction und PV untersucht werden. Dabei liegt die Prävalenz der Augenbeteiligung zwischen 7 % und 16 %, wobei am häufigsten eine Konjunktivitis beobachtet werden konnte. Wie auch in den genannten Publikationen beschrieben wird, kann noch keine signifikante Kausalität zwischen den Pemphigus-Antikörpern und den Augenbeschwerden bestätigt werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen ebenfalls, dass alleinige Störung der desmosomalen Cadherine keinen Einfluss auf die Zell-Zell-Kontakte sowie die Lipidsynthese in HMGECs zu haben scheint.

Dsg3 wird sowohl in Kornea und Konjunktiva (Memar et al., 2020) als auch in Meibozyten, wie in *in situ*-Experimenten an humanen Augenlidern gezeigt wurde (Rötzer et al., 2016), exprimiert. Wie durch die eingehende Charakterisierung der HMGECs zu Beginn dieser Arbeit gezeigt wurde, exprimieren Meibozyten ebenfalls Dsg1 und weisen somit eine

vergleichbare Verteilung von Adhäsionsmolekülen wie Zellen der Epidermis auf. Deswegen war es naheliegend, dass die Expertise im Bereich der Pemphigus-Forschung für die vorliegende Arbeit genutzt wurde, um die Auswirkungen von PV-IgG auf HMGECs zu untersuchen. Jedoch konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen einer Störung der desmosomalen Cadherine und der Zellkohäsion, der Lipidproduktion oder der Morphologie der Zellen anhand der hier angefertigten Daten aufgezeigt werden. Demnach liegt es nahe, dass die Augenbeschwerden im Rahmen der Pemphigus-Erkrankung nicht durch eine Mitbeteiligung der Meibomdrüsen zustande kommen, sondern eher durch direkte Einwirkung der Antikörper auf die Desmosomen der Konjunktiva und der Kornea (Vielmuth et al., 2016).

Trotzdem sollten in Zukunft Signalwege untersucht werden, welche aus der PV-Pathologie bekannt sind; besonders, weil Meibomdrüsen in all ihren physiologischen Regulationsmechanismen und vor allem in Bezug auf Signalkaskaden schlecht untersucht sind. Aus den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit kann man sehen, dass sich die Erhöhung der cAMP-Konzentration positiv auf die Zellkohäsion auswirkt. Wie aus den Dispase-basierten Experimenten zur Modulation der Signalwege außerdem ersichtlich ist, stellt auch die EGFR-Signalkaskade einen möglichen Ansatzpunkt dar. Auch dieser Signalweg ist in der PV-Pathophysiologie involviert, wobei er Zellhaftungsverlust und Blasenbildung in Gang setzt (Bektas, Jolly, Berkowitz, Amagai, & Rubenstein, 2013; Chernyavsky, Arredondo, Kitajima, Sato-Nagai, & Grando, 2007; Walter et al., 2019). Der EGFR-Signalweg ist weiterhin für die Augenlid-Morphogenese und für die Proliferation der Meibozyten selbst wichtig (Dong, Call, Xia, & Kao, 2017; Maskin & Tseng, 1992; Rubinstein, Weber, & Traboulsi, 2016).

Dsg3-defiziente Mäuse weisen ein Pemphigus-ähnliches Erscheinungsbild mit Blasen in der Haut und in der Konjunktiva auf (Vielmuth et al., 2016). Dies legte die Vermutung nahe, dass das Fehlen von Dsg3 auch die Morphologie und Physiologie der Meibomdrüsen verändert und womöglich pathologisch beeinflusst hätte. Die hier durchgeführten morphologischen und lipidsekretorischen Untersuchungen bestätigten diese Vermutung jedoch nicht. Dieser Befund legt nahe, dass Dsg3 vermutlich keine zentrale Rolle für (patho-)physiologische Prozesse in Meibozyten spielt. Es wäre überaus spannend, Meibomdrüsen in PV-Patienten zu untersuchen. Dies ist jedoch einerseits schwer möglich, weil die Augenbeteiligung in PV unterdiagnostiziert ist, und andererseits, weil die Entnahme eines Stück Augenslides nicht vertretbar ist. Durch die Etablierung unseres humanen *ex vivo*-Modells wurde aber ein sehr wichtiger Grundstein für weitere Untersuchungen gelegt (Rötzer, Melega, Garreis, Paulsen, & Waschke, 2019). Damit

können weitere Versuche mit anti-Ecad-Ab und PV-IgG/AK23 im Vergleich durchgeführt werden, um mögliche Auswirkungen auf die Lipidproduktion und auf den Reifegrad der Meibozyten zu beobachten. Im Zuge dieser *ex vivo*-Experimente wäre ein nächster sinnvoller Schritt, E-Cadherin und Dsg3 durch siRNA-vermittelte Genstilllegung zu depletieren oder zu überexprimieren. Dadurch würde man pathogene und protektive Effekte untersuchen können. Natürlich würde man auch unter basalen Bedingungen die verschiedenen Signalwege analysieren.

#### 4.6 Meibozyten erreichen einen $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Hyperadhäsionszustand

Es wurde beobachtet, dass die Zellen nach 6d im Differenzierungsmedium gewissermaßen resistent gegenüber einer Modulation der Zellhaftung durch spezifische inhibitorische Antikörper wurden. Nur die Kombination von anti-Ecad-Ab und AK23 hatte eine erhöhte Fragmentzahl in Dispase-vermittelten Dissoziationsversuchen zur Folge. Darauf begründet sich die Überlegung, dass sich die Zellen in einem hyperadhäsiven Zustand befinden könnten. Die Hyperadhäsion ist aus Forschungen zu Keratinozyten gut bekannt und beschreibt einen  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Haftungsstatus der Zellen (D. Garrod & Kimura, 2008). Die Hyperadhäsion ist für Desmosomen beschrieben und stellt vor allem *in vivo* eine wichtige Grundlage dar für den Erhalt der Integrität in Epithelien, die einem großen mechanischen Stress ausgesetzt sind (D. Garrod, 2010; Kimura, Merritt, & Garrod, 2007). Wie in der Literatur beschrieben, wird der (hyperadhäsive) Zustand von Desmosomen in lebenden Zellverbänden eigentlich nur gestört, wenn der Zellverband – wie im Falle einer Hautwunde zum Beispiel – von außen verletzt wird (Garrod & Chidgey, 2008; D. Garrod, 2010; Kowalczyk & Green, 2013). Da die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nahelegen, dass in HMGECs die Desmosomen eine im Vergleich zu Cadherinen untergeordnete Rolle spielen, vermuten wir, dass in Meibomdrüsen auch Adhärenz-Junktionen die Hyperadhäsion erreichen können. Zudem liegt es für uns nahe, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit anders als in Keratinozyten geregelt wird. Zudem würde sich daraus ableiten, dass das Zusammenspiel zwischen E-Cadherin und den desmosomalen Proteinen umso wichtiger wird, je weiter der Reifungsstatus der Zellen fortgeschritten ist. Gerade in diesem vermeintlichen Hyperadhäsionszustand wäre es in Zukunft interessant, auf die Signalwege genauer einzugehen und die Interaktion zwischen E-Cadherin und Dsg3 zu untersuchen. Was Dsg3 angeht, besagt die führende Meinung, dass eine Änderung der extrazellulären Domäne der Desmosomen nötig ist, um die Hyperadhäsion zu erreichen (D. R. Garrod, 2013; D. R. Garrod, Berika, Bardsley, Holmes, & Taberner, 2005). Es wäre interessant dahingehend zukünftig weitere Untersuchungen zu betreiben, ob sich auch in HMGECs Strukturänderungen der Zell-Zell-Kontakte nach

6d im Differenzierungsmedium zeigen. Man könnte die Hypothese aufstellen, dass sich die Verbindung zwischen AJ und Desmosomen ändert oder dass sich die Struktur der beiden unabhängig voneinander so umformt, dass dies zum hyperadhäsiven Zustand führt.

### 4.7 Ausblick

Meibomian Gland Dysfunction (MGD) ist vermutlich die weltweit häufigste Ursache für das Syndrom des Trockenen Auges (Bron & Tiffany, 2004; Driver & Lemp, 1996; Foulks & Bron, 2003; McCulley & Shine, 2003). In der Literatur findet man viele verschiedene Ansätze und Erklärungsversuche für diese Dysfunktion, welche von Entzündungsprozessen über Hypo-oder Hypersekretion und Obstruktion reichen, jedoch nicht zu einem einvernehmlichen Konsens führen (Blackie et al., 2010; Bron & Tiffany, 2004).

Wie wir im Laufe unserer Beschäftigung mit der humanen Meibozyten-Zelllinie HMGEC feststellen mussten, bestehen viele der mangelnden Erkenntnisse zur Pathophysiologie der Meibomdrüsen und des DED wohl zum großen Teil auch aus dem Grund, dass die Zellkultur viele limitierende Faktoren mit sich bringt und noch wenige *in vivo*-Modelle etabliert bzw. wenige *in vivo*-Experimente durchgeführt wurden.

Nichtsdestotrotz konnten in der vorliegenden Arbeit die grundlegenden Eigenschaften und Expressionsmuster der Meibozyten sowie die zentrale Rolle von E-Cadherin gezeigt werden. Dennoch sind die genauen Mechanismen, die dazu führen, dass eine Störung der E-Cadherin-Funktion die Physiologie der Meibozyten beeinflusst, noch lange nicht geklärt. Es wäre interessant, Forschung dahingehend zu betreiben, dass man die Auswirkungen einer Ausschaltung von E-Cadherin auf Genebene untersucht. Aufgrund des Mangels an Ecad-KO-Tieren wurden allerdings Dsg3-defiziente Mäuse verwendet, um ein genaueres Bild über Drüsenmorphologie und Lipidverteilung in einem *in vivo*-Modell zu erhalten. Auf der anderen Seite könnte man auch die entgegengesetzte Richtung einschlagen und eine Hochregulierung des E-Cadherin-Gens bewirken, um zu sehen, welche Auswirkungen eine Überexpression der Adhärensjunktionen verursacht. Da die Erforschung der Signalwege noch viel Spielraum zulässt, wäre auch die Untersuchung mittels einer fortgeschrittenen Fluoreszenzmethode wie FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching) in der Lebendzell-Mikroskopie ein interessanter Ansatzpunkt. Dabei könnte man die Verteilung und die zellulären Dynamiken von Dsg3 und E-Cadherin genauer analysieren, auch unter Verwendung von Ab und verschiedenen Mediatoren. Außerdem könnte man zukünftig auch die Bindungseigenschaften mittels *Atomic-Force*

*Microscopy*-Messungen (AFM) untersuchen (Hinterdorfer & Dufrene, 2006; Vielmuth, Hartlieb, Kugelmann, Waschke, & Spindler, 2015). Man würde hierbei versuchen, die homophilen Bindungseigenschaften von Ecad-Ecad-Molekülen zu charakterisieren, dann die Interaktionen zwischen E-Cadherin und Dsg3, die kürzlich beschrieben wurden (Rötzer et al., 2015), und anschließend die Eigenschaften nach Zugabe von anti-Ecad- und PV-Antikörpern zu quantifizieren.

Ein neuer und wesentlich vielversprechender Ansatz ist das *ex vivo*-Modell humaner Augenlider, das die genaue Untersuchung der Meibomdrüsen auf morphologischer und (patho-) physiologischer Ebene ermöglicht (Rötzer et al., 2019). Dieses in seiner Art einzigartige Modell bietet dabei viele verschiedene Versuchsansätze: Man könnte auch hier die inhibitorischen Auswirkungen auf die Adhäsionsmoleküle E-Cadherin und Dsg3 beobachten, indem man AK23 und anti-Ecad-Ab einsetzt. Außerdem wäre es durchaus interessant, die Effekte von F/R auf die Verteilung und Expression von E-Cadherin zu untersuchen; man könnte eine vertiefte Untersuchung verschiedener, aus der PV-Pathophysiologie bekannter Signalwege unter physiologischeren Umständen durchführen; außerdem könnte man einen mechanischen Belastungsversuchsansatz etablieren, um die Haftung zwischen den Zellen zu messen und ebenfalls versuchen, die so behandelten Zellen aus den Augenlid-Schnitten zu isolieren, um diese in Kultur zu nehmen und als stabile Zelllinie zu etablieren.

Mit der vorliegenden Arbeit und den dargestellten Befunden wurde in gewissem Maße zu einem tieferen Verständnis der Meibomdrüsen unter physiologischen wie auch unter pathologischen Situationen beigetragen. Weiterführende und darauf basierende Untersuchungen – vor allem in Hinblick auf die Korrelation zwischen (patho-)physiologischen Prozessen in Meibozyten und der Entstehung von DED und PV – sollten durchgeführt werden. Dabei scheint besonders ein besseres Verständnis von Signalwegen eine Grundlage für therapeutische Ansätze liefern zu können.

## 5 Zusammenfassung und Bewertung der wesentlichen Ergebnisse

Die Ziele dieser Dissertation waren folgende: Zunächst sollte die interzelluläre Adhäsion zwischen Meibozyten *in vitro* genauer untersucht werden, d.h. die genauen Konditionen und Zeitpunkte für die Expression der wesentlichen Adhäsionsmoleküle, wobei der Fokus zu Beginn auf deren Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad lag.

Während der  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten Differenzierung für 1 bis zu 6 Tagen nahmen in HMGEC die interzellulären Kontakte deutlich zu, wohingegen die Lipidproduktion in dieser Zeit nicht weiter anstieg. Das Expressionsprofil desmosomaler Proteine, unter anderem auch des PV-Antigens Desmoglein (Dsg) 3, war  $\text{Ca}^{2+}$ - und Serum-abhängig. Die Adhärensjunktionskomponente E-Cadherin hingegen wurde unter allen Bedingungen ähnlich stark exprimiert und war bereits unter proliferativen Bedingungen an der Zellmembran sichtbar. Überraschenderweise führte ein inhibitorischer Antikörper gegen E-Cadherin nach 1 Tag im Differenzierungsmedium, nicht aber nach 6 Tagen, zu einem enormen Verlust der Zellhaftung und zu einer reduzierten Lipidproduktion in HMGEC. Im Gegensatz dazu hatten Antikörper gegen desmosomale Cadherine – darunter auch PV-Antikörper gegen Dsg3 und Dsg1 – keinen Effekt auf die Integrität des Zellverbands, obwohl sie unter denselben Bedingungen die Zellhaftung in humanen Keratinozyten verringerten. Die Feststellung, dass die Störung von Dsg3 keinen nennenswerten Einfluss auf HMGEC hatte, wurde auch durch die Beobachtung gestützt, dass sich in Dsg3-defizienten Mäusen sowohl die Drüsenmorphologie als auch die Lipidproduktion nicht signifikant vom Wildtyp unterschieden. Außerdem deuten die Ergebnisse an, dass HMGEC nach 6 d einen hyperadhäsiven Zustand erreichen. In diesem Zustand sind die Zellen aufgrund einer gewissen  $\text{Ca}^{2+}$ -Unabhängigkeit gegenüber mechanischem Stress resistent. Mit der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal die Regulierung der Zell-Adhäsion und deren Einfluss auf die Lipidproduktion in Meibomdrüsen untersucht. Die Daten deuten darauf hin, dass sowohl die Bildung von Zell-Zell-Kontakten als auch die Lipidsynthese abhängig vom Reifungsgrad sind und dass E-Cadherin die zentrale Rolle für diese physiologischen Prozesse spielt. Außerdem wurden einige Denkanstöße für die Entwicklung eines *ex vivo*-Modells geliefert, welches durch unsere Arbeitsgruppe schlussendlich etabliert wurde (Rötzer et al., 2019) und wichtig für weitere Forschung auf diesem Gebiet sein wird.

---

**VI Literaturverzeichnis**

1. Akhyani, M., Keshtkar-Jafari, A., Chams-Davatchi, C., Lajevardi, V., Beigi, S., Aghazadeh, N., . . . Arami, S. (2014). Ocular involvement in pemphigus vulgaris. *J Dermatol*, *41*(7), 618-621. doi:10.1111/1346-8138.12447
2. Alpsyoy, E., Akman-Karakas, A., & Uzun, S. (2015). Geographic variations in epidemiology of two autoimmune bullous diseases: pemphigus and bullous pemphigoid. *Arch Dermatol Res*, *307*(4), 291-298. doi:10.1007/s00403-014-1531-1
3. Amagai, M., Klaus-Kovtun, V., & Stanley, J. R. (1991). Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell*, *67*(5), 869-877. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1720352>
4. Amagai, M., Tsunoda, K., Zillikens, D., Nagai, T., & Nishikawa, T. (1999). The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. *J Am Acad Dermatol*, *40*(2 Pt 1), 167-170.
5. Arita, R., Itoh, K., Inoue, K., & Amano, S. (2008). Noncontact infrared meibography to document age-related changes of the meibomian glands in a normal population. *Ophthalmology*, *115*(5), 911-915. doi:10.1016/j.ophtha.2007.06.031
6. Asano, N., Hampel, U., Garreis, F., Schröder, A., Schicht, M., Hammer, C. M., & Paulsen, F. (2018). Differentiation Patterns of Immortalized Human Meibomian Gland Epithelial Cells in Three-Dimensional Culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *59*(3), 1343-1353. doi:10.1167/iovs.17-23266
7. Bailey, I. L., Bullimore, M. A., Raasch, T. W., & Taylor, H. R. (1991). Clinical grading and the effects of scaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *32*(2), 422-432. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1993595>
8. Barabino, S., Horwath-Winter, J., Messmer, E. M., Rolando, M., Aragona, P., & Kinoshita, S. (2017). The role of systemic and topical fatty acids for dry eye treatment. *Prog Retin Eye Res*, *61*, 23-34. doi:10.1016/j.preteyeres.2017.05.003
9. Barabino, S., Rolando, M., Camicione, P., Ravera, G., Zanardi, S., Giuffrida, S., & Calabria, G. (2003). Systemic linoleic and gamma-linolenic acid therapy in dry eye syndrome with an inflammatory component. *Cornea*, *22*(2), 97-101. doi:10.1097/00003226-200303000-00002
10. Baudouin, C., Aragona, P., Van Setten, G., Rolando, M., Irkec, M., Benitez del Castillo, J., . . . members, O. E. C. G. (2014). Diagnosing the severity of dry eye: a clear and practical algorithm. *Br J Ophthalmol*, *98*(9), 1168-1176. doi:10.1136/bjophthalmol-2013-304619
11. Baudouin, C., Messmer, E. M., Aragona, P., Geerling, G., Akova, Y. A., Benitez-del-Castillo, J., . . . Labetoulle, M. (2016). Revisiting the vicious circle of dry eye disease: a focus on the pathophysiology of meibomian gland dysfunction. *Br J Ophthalmol*, *100*(3), 300-306. doi:10.1136/bjophthalmol-2015-307415
12. Bektas, M., Jolly, P. S., Berkowitz, P., Amagai, M., & Rubenstein, D. S. (2013). A pathophysiologic role for epidermal growth factor receptor in pemphigus acantholysis. *J Biol Chem*, *288*(13), 9447-9456. doi:10.1074/jbc.M112.438010
13. Belmonte, C., Nichols, J. J., Cox, S. M., Brock, J. A., Begley, C. G., Bereiter, D. A., . . . Wolffsohn, J. S. (2017). TFOS DEWS II pain and sensation report. *Ocul Surf*, *15*(3), 404-437. doi:10.1016/j.jtos.2017.05.002



14. Blackie, C. A., Korb, D. R., Knop, E., Bedi, R., Knop, N., & Holland, E. J. (2010). Nonobvious obstructive meibomian gland dysfunction. *Cornea*, *29*(12), 1333-1345. doi:10.1097/ICO.0b013e3181d4f366
15. Bondow, B. J., Faber, M. L., Wojta, K. J., Walker, E. M., & Battle, M. A. (2012). E-cadherin is required for intestinal morphogenesis in the mouse. *Dev Biol*, *371*(1), 1-12. doi:10.1016/j.ydbio.2012.06.005
16. Bron, A. J., de Paiva, C. S., Chauhan, S. K., Bonini, S., Gabison, E. E., Jain, S., . . . Sullivan, D. A. (2017). TFOS DEWS II pathophysiology report. *Ocul Surf*, *15*(3), 438-510. doi:10.1016/j.jtos.2017.05.011
17. Bron, A. J., & Tiffany, J. M. (2004). The contribution of meibomian disease to dry eye. *Ocul Surf*, *2*(2), 149-165. doi:10.1016/s1542-0124(12)70150-7
18. Broussard, K. C., Leung, T. G., Moradi, A., Thorne, J. E., & Fine, J. D. (2016). Autoimmune bullous diseases with skin and eye involvement: Cicatricial pemphigoid, pemphigus vulgaris, and pemphigus paraneoplastica. *Clin Dermatol*, *34*(2), 205-213. doi:10.1016/j.clindermatol.2015.11.006
19. Butovich, I. A., Uchiyama, E., Di Pascuale, M. A., & McCulley, J. P. (2007). Liquid chromatography-mass spectrometric analysis of lipids present in human meibomian gland secretions. *Lipids*, *42*(8), 765-776. doi:10.1007/s11745-007-3080-2
20. Butovich, I. A., Wojtowicz, J. C., & Molai, M. (2009). Human tear film and meibum. Very long chain wax esters and (O-acyl)-omega-hydroxy fatty acids of meibum. *J Lipid Res*, *50*(12), 2471-2485. doi:10.1194/jlr.M900252-JLR200
21. Chalmers, R. L., Begley, C. G., & Caffery, B. (2010). Validation of the 5-Item Dry Eye Questionnaire (DEQ-5): Discrimination across self-assessed severity and aqueous tear deficient dry eye diagnoses. *Cont Lens Anterior Eye*, *33*(2), 55-60. doi:10.1016/j.clae.2009.12.010
22. Chernyavsky, A. I., Arredondo, J., Kitajima, Y., Sato-Nagai, M., & Grando, S. A. (2007). Desmoglein versus non-desmoglein signaling in pemphigus acantholysis: characterization of novel signaling pathways downstream of pemphigus vulgaris antigens. *J Biol Chem*, *282*(18), 13804-13812. doi:10.1074/jbc.M611365200
23. Chhadva, P., Goldhardt, R., & Galor, A. (2017). Meibomian Gland Disease: The Role of Gland Dysfunction in Dry Eye Disease. *Ophthalmology*, *124*(11S), S20-S26. doi:10.1016/j.ophtha.2017.05.031
24. Craig, J. P., Nichols, K. K., Akpek, E. K., Caffery, B., Dua, H. S., Joo, C. K., . . . Stapleton, F. (2017). TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *Ocul Surf*, *15*(3), 276-283. doi:10.1016/j.jtos.2017.05.008
25. Daoud, Y. J., Cervantes, R., Foster, C. S., & Ahmed, A. R. (2005). Ocular pemphigus. *J Am Acad Dermatol*, *53*(4), 585-590. doi:10.1016/j.jaad.2005.02.061
26. Dehner, C., Rötzer, V., Waschke, J., & Spindler, V. (2014). A desmoplakin point mutation with enhanced keratin association ameliorates pemphigus vulgaris autoantibody-mediated loss of cell cohesion. *Am J Pathol*, *184*(9), 2528-2536. doi:10.1016/j.ajpath.2014.05.016
27. Delva, E., Tucker, D. K., & Kowalczyk, A. P. (2009). The desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *1*(2), a002543. doi:10.1101/cshperspect.a002543
28. Dong, F., Call, M., Xia, Y., & Kao, W. W. (2017). Role of EGF receptor signaling on morphogenesis of eyelid and meibomian glands. *Exp Eye Res*, *163*, 58-63. doi:10.1016/j.exer.2017.04.006

29. Driver, P. J., & Lemp, M. A. (1996). Meibomian gland dysfunction. *Surv Ophthalmol*, *40*(5), 343-367. doi:10.1016/s0039-6257(96)80064-6
30. Foulks, G. N., & Bron, A. J. (2003). Meibomian gland dysfunction: a clinical scheme for description, diagnosis, classification, and grading. *Ocul Surf*, *1*(3), 107-126. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17075643>
31. Garrod, & Chidgey, M. (2008). Desmosome structure, composition and function. *Biochim Biophys Acta*, *1778*(3), 572-587. doi:10.1016/j.bbamem.2007.07.014
32. Garrod, D. (2010). Desmosomes in vivo. *Dermatol Res Pract*, *2010*, 212439. doi:10.1155/2010/212439
33. Garrod, D., & Kimura, T. E. (2008). Hyper-adhesion: a new concept in cell-cell adhesion. *Biochem Soc Trans*, *36*(Pt 2), 195-201. doi:10.1042/BST0360195
34. Garrod, D., & Tabernero, L. (2014). Hyper-adhesion: a unique property of desmosomes. *Cell Commun Adhes*, *21*(5), 249-256. doi:10.3109/15419061.2014.930133
35. Garrod, D. R. (2013). The assay that defines desmosome hyper-adhesion. *J Invest Dermatol*, *133*(2), 576-577. doi:10.1038/jid.2012.275
36. Garrod, D. R., Berika, M. Y., Bardsley, W. F., Holmes, D., & Tabernero, L. (2005). Hyper-adhesion in desmosomes: its regulation in wound healing and possible relationship to cadherin crystal structure. *J Cell Sci*, *118*(Pt 24), 5743-5754. doi:10.1242/jcs.02700
37. Green, K. J., & Simpson, C. L. (2007). Desmosomes: new perspectives on a classic. *J Invest Dermatol*, *127*(11), 2499-2515. doi:10.1038/sj.jid.5701015
38. Greiner, J. V., Glonek, T., Korb, D. R., Whalen, A. C., Hebert, E., Hearn, S. L., . . . Leahy, C. D. (1998). Volume of the human and rabbit meibomian gland system. *Adv Exp Med Biol*, *438*, 339-343. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9634906>
39. Griswold, D. E., Webb, E. F., Breton, J., White, J. R., Marshall, P. J., & Torphy, T. J. (1993). Effect of selective phosphodiesterase type IV inhibitor, rolipram, on fluid and cellular phases of inflammatory response. *Inflammation*, *17*(3), 333-344. doi:10.1007/BF00918994
40. Gumbiner, B., Stevenson, B., & Grimaldi, A. (1988). The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. *J Cell Biol*, *107*(4), 1575-1587. doi:10.1083/jcb.107.4.1575
41. Hampel, U., & Garreis, F. (2017). The human meibomian gland epithelial cell line as a model to study meibomian gland dysfunction. *Exp Eye Res*, *163*, 46-52. doi:10.1016/j.exer.2017.03.011
42. Hampel, U., Kruger, M., Kunnen, C., Garreis, F., Willcox, M., & Paulsen, F. (2015). In vitro effects of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid on human meibomian gland epithelial cells. *Exp Eye Res*, *140*, 139-148. doi:10.1016/j.exer.2015.08.024
43. Hampel, U., Schröder, A., Mitchell, T., Brown, S., Snikeris, P., Garreis, F., . . . Paulsen, F. (2015). Serum-induced keratinization processes in an immortalized human meibomian gland epithelial cell line. *PLoS One*, *10*(6), e0128096. doi:10.1371/journal.pone.0128096
44. Hansen, M. S., Klefter, O. N., Julian, H. O., Lynge Pedersen, A. M., & Heegaard, S. (2017). Management of patients with ocular manifestations in vesiculobullous disorders affecting the mouth. *Oral Dis*, *23*(7), 849-853. doi:10.1111/odi.12590

45. Hertl, M. (2000). Humoral and cellular autoimmunity in autoimmune bullous skin disorders. *Int Arch Allergy Immunol*, *122*(2), 91-100. doi:10.1159/000024364
46. Hinterdorfer, P., & Dufrene, Y. F. (2006). Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. *Nat Methods*, *3*(5), 347-355. doi:10.1038/nmeth871
47. Hodak, E., Kremer, I., David, M., Hazaz, B., Rothem, A., Feuerman, P., & Sandbank, M. (1990). Conjunctival involvement in pemphigus vulgaris: a clinical, histopathological and immunofluorescence study. *Br J Dermatol*, *123*(5), 615-620.
48. Ishii, K., Harada, R., Matsuo, I., Shirakata, Y., Hashimoto, K., & Amagai, M. (2005). In vitro keratinocyte dissociation assay for evaluation of the pathogenicity of anti-desmoglein 3 IgG autoantibodies in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol*, *124*(5), 939-946. doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23714.x
49. Jester, J. V., Nicolaidis, N., & Smith, R. E. (1981). Meibomian gland studies: histologic and ultrastructural investigations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *20*(4), 537-547. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7194327>
50. Jester, J. V., Rife, L., Nii, D., Luttrull, J. K., Wilson, L., & Smith, R. E. (1982). In vivo biomicroscopy and photography of meibomian glands in a rabbit model of meibomian gland dysfunction. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *22*(5), 660-667. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7076409>
51. Johnson, M. E., & Murphy, P. J. (2005). The Effect of instilled fluorescein solution volume on the values and repeatability of TBUT measurements. *Cornea*, *24*(7), 811-817. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16160497>
52. Jones, L., Downie, L. E., Korb, D., Benitez-Del-Castillo, J. M., Dana, R., Deng, S. X., . . . Craig, J. P. (2017). TFOS DEWS II Management and Therapy Report. *Ocul Surf*, *15*(3), 575-628. doi:10.1016/j.jtos.2017.05.006
53. Kasperkiewicz, M., Ellebrecht, C. T., Takahashi, H., Yamagami, J., Zillikens, D., Payne, A. S., & Amagai, M. (2017). Pemphigus. *Nat Rev Dis Primers*, *3*, 17026. doi:10.1038/nrdp.2017.26
54. Kawasaki, S., Kawamoto, S., Yokoi, N., Connon, C., Minesaki, Y., Kinoshita, S., & Okubo, K. (2003). Up-regulated gene expression in the conjunctival epithelium of patients with Sjogren's syndrome. *Exp Eye Res*, *77*(1), 17-26. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12823984>
55. Kimura, T. E., Merritt, A. J., & Garrod, D. R. (2007). Calcium-independent desmosomes of keratinocytes are hyper-adhesive. *J Invest Dermatol*, *127*(4), 775-781. doi:10.1038/sj.jid.5700643
56. Knop, E., & Knop, N. (2009). [Meibomian glands : part IV. Functional interactions in the pathogenesis of meibomian gland dysfunction (MGD)]. *Ophthalmologe*, *106*(11), 980-987. doi:10.1007/s00347-009-2044-8
57. Knop, E., Knop, N., Brewitt, H., Pleyer, U., Rieck, P., Seitz, B., & Schirra, F. (2009). [Meibomian glands : part III. Dysfunction - argument for a discrete disease entity and as an important cause of dry eye]. *Ophthalmologe*, *106*(11), 966-979. doi:10.1007/s00347-009-2043-9
58. Knop, E., Knop, N., Millar, T., Obata, H., & Sullivan, D. A. (2011). The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the subcommittee on anatomy, physiology, and pathophysiology of the meibomian gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *52*(4), 1938-1978. doi:10.1167/iovs.10-6997c

59. Knop, N., & Knop, E. (2009). [Meibomian glands. Part I: anatomy, embryology and histology of the Meibomian glands]. *Ophthalmologe*, *106*(10), 872-883. doi:10.1007/s00347-009-2006-1
60. Korb, D. R. (2000). Survey of preferred tests for diagnosis of the tear film and dry eye. *Cornea*, *19*(4), 483-486. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10928763>
61. Korb, D. R., Herman, J. P., Finnemore, V. M., Exford, J. M., & Blackie, C. A. (2008). An evaluation of the efficacy of fluorescein, rose bengal, lissamine green, and a new dye mixture for ocular surface staining. *Eye Contact Lens*, *34*(1), 61-64. doi:10.1097/ICL.0b013e31811ead93
62. Kowalczyk, A. P., & Green, K. J. (2013). Structure, function, and regulation of desmosomes. *Prog Mol Biol Transl Sci*, *116*, 95-118. doi:10.1016/B978-0-12-394311-8.00005-4
63. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680-685. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063>
64. Laforest, C., Huilgol, S. C., Casson, R., Selva, D., & Leibovitch, I. (2005). Autoimmune bullous diseases: ocular manifestations and management. *Drugs*, *65*(13), 1767-1779. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16114976>
65. Leeson, T. S. (1963). Tarsal (Meigomian) Glands of the Rat. *Br J Ophthalmol*, *47*, 222-231. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14188325>
66. Lemp, M. A. (1995). Report of the National Eye Institute/Industry workshop on Clinical Trials in Dry Eyes. *CLAO J*, *21*(4), 221-232. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8565190>
67. Lemp, M. A., Baudouin, C., Baum, J., Dogru, M., Foulks, G. N., Kinoshita, S., . . . Toda, I. (2007). The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf*, *5*(2), 75-92. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17508116>
68. Lewis, J. E., Jensen, P. J., & Wheelock, M. J. (1994). Cadherin function is required for human keratinocytes to assemble desmosomes and stratify in response to calcium. *J Invest Dermatol*, *102*(6), 870-877. doi:10.1111/1523-1747.ep12382690
69. Lewis, J. E., Wahl, J. K., 3rd, Sass, K. M., Jensen, P. J., Johnson, K. R., & Wheelock, M. J. (1997). Cross-talk between adherens junctions and desmosomes depends on plakoglobin. *J Cell Biol*, *136*(4), 919-934. doi:10.1083/jcb.136.4.919
70. Liu, S., Hatton, M. P., Khandelwal, P., & Sullivan, D. A. (2010). Culture, immortalization, and characterization of human meibomian gland epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *51*(8), 3993-4005. doi:10.1167/iovs.09-5108
71. Liu, S., Kam, W. R., Ding, J., Hatton, M. P., & Sullivan, D. A. (2013). Effect of growth factors on the proliferation and gene expression of human meibomian gland epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *54*(4), 2541-2550. doi:10.1167/iovs.12-11221
72. Liu, S., Richards, S. M., Lo, K., Hatton, M., Fay, A., & Sullivan, D. A. (2011). Changes in gene expression in human meibomian gland dysfunction. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *52*(5), 2727-2740. doi:10.1167/iovs.10-6482
73. Lüllmann-Rauch, R. (2015). *Taschenbuch Histologie*. Stuttgart [u.a.]: Thieme.

74. Macsai, M. S. (2008). The role of omega-3 dietary supplementation in blepharitis and meibomian gland dysfunction (an AOS thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc*, 106, 336-356. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19277245>
75. Maskin, S. L., & Tseng, S. C. (1992). Clonal growth and differentiation of rabbit meibomian gland epithelium in serum-free culture: differential modulation by EGF and FGF. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 33(1), 205-217. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1370439>
76. Mathers, W. D., Daley, T., & Verdick, R. (1994). Video imaging of the meibomian gland. *Arch Ophthalmol*, 112(4), 448-449. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8155046>
77. McCulley, J. P., & Shine, W. E. (2003). Meibomian gland function and the tear lipid layer. *Ocul Surf*, 1(3), 97-106. doi:10.1016/s1542-0124(12)70138-6
78. Memar, O., Jabbehdari, S., Caughlin, B., & Djalilian, A. R. (2020). Ocular surface involvement in pemphigus vulgaris: An interdisciplinary review. *Ocul Surf*, 18(1), 40-46. doi:10.1016/j.jtos.2019.09.008
79. Meng, W., & Takeichi, M. (2009). Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(6), a002899. doi:10.1101/cshperspect.a002899
80. Nelson, J. D., Shimazaki, J., Benitez-del-Castillo, J. M., Craig, J. P., McCulley, J. P., Den, S., & Foulks, G. N. (2011). The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the definition and classification subcommittee. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(4), 1930-1937. doi:10.1167/iovs.10-6997b
81. Nichols, K. K., Foulks, G. N., Bron, A. J., Glasgow, B. J., Dogru, M., Tsubota, K., . . . Sullivan, D. A. (2011). The international workshop on meibomian gland dysfunction: executive summary. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(4), 1922-1929. doi:10.1167/iovs.10-6997a
82. Nichols, K. K., Nichols, J. J., & Zadnik, K. (2000). Frequency of dry eye diagnostic test procedures used in various modes of ophthalmic practice. *Cornea*, 19(4), 477-482. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10928762>
83. Niessen, C. M. (2007). Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*, 127(11), 2525-2532. doi:10.1038/sj.jid.5700865
84. Niessen, C. M., Leckband, D., & Yap, A. S. (2011). Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation. *Physiol Rev*, 91(2), 691-731. doi:10.1152/physrev.00004.2010
85. Nose, A., & Takeichi, M. (1986). A novel cadherin cell adhesion molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos. *J Cell Biol*, 103(6 Pt 2), 2649-2658. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3539943>
86. Rashid, S., Jin, Y., Ecoiffier, T., Barabino, S., Schaumberg, D. A., & Dana, M. R. (2008). Topical omega-3 and omega-6 fatty acids for treatment of dry eye. *Arch Ophthalmol*, 126(2), 219-225. doi:10.1001/archophthalmol.2007.61
87. Robin, J. B., Jester, J. V., Nobe, J., Nicolaides, N., & Smith, R. E. (1985). In vivo transillumination biomicroscopy and photography of meibomian gland dysfunction. A clinical study. *Ophthalmology*, 92(10), 1423-1426. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4069605>

88. Rötzer, V., Egu, D., & Waschke, J. (2016). Meibomian gland cells display a differentiation-dependent composition of desmosomes. *Histochem Cell Biol*, *146*(6), 685-694. doi:10.1007/s00418-016-1475-y
89. Rötzer, V., Hartlieb, E., Vielmuth, F., Gliem, M., Spindler, V., & Waschke, J. (2015). E-cadherin and Src associate with extradesmosomal Dsg3 and modulate desmosome assembly and adhesion. *Cell Mol Life Sci*, *72*(24), 4885-4897. doi:10.1007/s00018-015-1977-0
90. Rötzer, V., Melega, F., Garreis, F., Paulsen, F., & Waschke, J. (2019). E-Cadherin Is Important for Meibomian Gland Function as Revealed by a New Human ex Vivo Slice Culture Model. *Am J Pathol*, *189*(8), 1559-1568. doi:10.1016/j.ajpath.2019.04.015
91. Rubinstein, T. J., Weber, A. C., & Traboulsi, E. I. (2016). Molecular biology and genetics of embryonic eyelid development. *Ophthalmic Genet*, *37*(3), 252-259. doi:10.3109/13816810.2015.1071409
92. Saito, M., Stahley, S. N., Caughman, C. Y., Mao, X., Tucker, D. K., Payne, A. S., . . . Kowalczyk, A. P. (2012). Signaling dependent and independent mechanisms in pemphigus vulgaris blister formation. *PLoS One*, *7*(12), e50696. doi:10.1371/journal.pone.0050696
93. Sajda, T., & Sinha, A. A. (2018). Autoantibody Signaling in Pemphigus Vulgaris: Development of an Integrated Model. *Front Immunol*, *9*, 692. doi:10.3389/fimmu.2018.00692
94. Sayar, B. S., Ruegg, S., Schmidt, E., Sibilia, M., Siffert, M., Suter, M. M., . . . Muller, E. J. (2014). EGFR inhibitors erlotinib and lapatinib ameliorate epidermal blistering in pemphigus vulgaris in a non-linear, V-shaped relationship. *Exp Dermatol*, *23*(1), 33-38. doi:10.1111/exd.12290
95. Schaumberg, D. A., Nichols, J. J., Papas, E. B., Tong, L., Uchino, M., & Nichols, K. K. (2011). The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the subcommittee on the epidemiology of, and associated risk factors for, MGD. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *52*(4), 1994-2005. doi:10.1167/iovs.10-6997e
96. Schiffman, R. M., Christianson, M. D., Jacobsen, G., Hirsch, J. D., & Reis, B. L. (2000). Reliability and validity of the Ocular Surface Disease Index. *Arch Ophthalmol*, *118*(5), 615-621. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10815152>
97. Scholz, H. (1989). Mechanisms of positive inotropic effects. *Basic Res Cardiol*, *84* Suppl 1, 3-7. doi:10.1007/BF02650341
98. Schröder, A., Abrar, D. B., Hampel, U., Schicht, M., Paulsen, F., & Garreis, F. (2016). In vitro effects of sex hormones in human meibomian gland epithelial cells. *Exp Eye Res*, *151*, 190-202. doi:10.1016/j.exer.2016.08.009
99. Schulze, K., Galichet, A., Sayar, B. S., Scothern, A., Howald, D., Zymann, H., . . . Muller, E. J. (2012). An adult passive transfer mouse model to study desmoglein 3 signaling in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol*, *132*(2), 346-355. doi:10.1038/jid.2011.299
100. Smith, J. A. (2007). Research in dry eye: report of the Research Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf*, *5*(2), 179-193. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17508121>
101. Sparrow, N. A., Frost, N. A., Pantelides, E. P., & Laidlaw, D. A. (2000). Decimalization of The Oxford Clinical Cataract Classification and Grading System.

- Ophthalmic Epidemiol*, 7(1), 49-60. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10652171>
102. Spindler, V., Eming, R., Schmidt, E., Amagai, M., Grando, S., Jonkman, M. F., . . . Waschke, J. (2018). Mechanisms Causing Loss of Keratinocyte Cohesion in Pemphigus. *J Invest Dermatol*, 138(1), 32-37. doi:10.1016/j.jid.2017.06.022
  103. Spindler, V., Vielmuth, F., Schmidt, E., Rubenstein, D. S., & Waschke, J. (2010). Protective endogenous cyclic adenosine 5'-monophosphate signaling triggered by pemphigus autoantibodies. *J Immunol*, 185(11), 6831-6838. doi:10.4049/jimmunol.1002675
  104. Spindler, V., & Waschke, J. (2018). Pemphigus-A Disease of Desmosome Dysfunction Caused by Multiple Mechanisms. *Front Immunol*, 9, 136. doi:10.3389/fimmu.2018.00136
  105. Stern, M. E., Beuerman, R. W., Fox, R. I., Gao, J., Mircheff, A. K., & Pflugfelder, S. C. (1998). The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and lacrimal glands. *Cornea*, 17(6), 584-589. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9820935>
  106. Stern, M. E., Gao, J., Siemasko, K. F., Beuerman, R. W., & Pflugfelder, S. C. (2004). The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. *Exp Eye Res*, 78(3), 409-416. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15106920>
  107. Stern, M. E., Schaumburg, C. S., & Pflugfelder, S. C. (2013). Dry eye as a mucosal autoimmune disease. *Int Rev Immunol*, 32(1), 19-41. doi:10.3109/08830185.2012.748052
  108. Sullivan, D. A., Liu, Y., Kam, W. R., Ding, J., Green, K. M., Shaffer, S. A., . . . Liu, S. (2014). Serum-induced differentiation of human meibomian gland epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 55(6), 3866-3877. doi:10.1167/iovs.13-13407
  109. Sullivan, D. A., Rocha, E. M., Aragona, P., Clayton, J. A., Ding, J., Golebiowski, B., . . . Willcox, M. D. P. (2017). TFOS DEWS II Sex, Gender, and Hormones Report. *Ocul Surf*, 15(3), 284-333. doi:10.1016/j.jtos.2017.04.001
  110. Tan, J. C., Tat, L. T., Francis, K. B., Mendoza, C. G., Murrell, D. F., & Coroneo, M. T. (2015). Prospective study of ocular manifestations of pemphigus and bullous pemphigoid identifies a high prevalence of dry eye syndrome. *Cornea*, 34(4), 443-448. doi:10.1097/ICO.0000000000000335
  111. Tesfaijzi, J., & Carlson, D. M. (1999). Expression, regulation, and function of the SPR family of proteins. A review. *Cell Biochem Biophys*, 30(2), 243-265. doi:10.1007/BF02738069
  112. Thomason, H. A., Scothorn, A., McHarg, S., & Garrod, D. R. (2010). Desmosomes: adhesive strength and signalling in health and disease. *Biochem J*, 429(3), 419-433. doi:10.1042/BJ20100567
  113. Tomlinson, A., Bron, A. J., Korb, D. R., Amano, S., Paugh, J. R., Pearce, E. I., . . . Dogru, M. (2011). The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the diagnosis subcommittee. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(4), 2006-2049. doi:10.1167/iovs.10-6997f
  114. Tomlinson, A., Khanal, S., Ramaesh, K., Diaper, C., & McFadyen, A. (2006). Tear film osmolarity: determination of a referent for dry eye diagnosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(10), 4309-4315. doi:10.1167/iovs.05-1504

- 
115. Tong, L., & Gupta, P. K. (2016). Need for Animal Models of Meibomian Gland Dysfunction. *Ophthalmol Ther*, *5*(2), 129-134. doi:10.1007/s40123-016-0070-6
116. Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *76*(9), 4350-4354. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/388439>
117. Vielmuth, F., Hartlieb, E., Kugelmann, D., Waschke, J., & Spindler, V. (2015). Atomic force microscopy identifies regions of distinct desmoglein 3 adhesive properties on living keratinocytes. *Nanomedicine*, *11*(3), 511-520. doi:10.1016/j.nano.2014.10.006
118. Vielmuth, F., Rötzer, V., Hartlieb, E., Hirneiss, C., Waschke, J., & Spindler, V. (2016). Pemphigus Autoantibodies Induce Blistering in Human Conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *57*(10), 4442-4449. doi:10.1167/iovs.16-19582
119. Walter, E., Vielmuth, F., Wanuske, M. T., Seifert, M., Pollmann, R., Eming, R., & Waschke, J. (2019). Role of Dsg1- and Dsg3-Mediated Signaling in Pemphigus Autoantibody-Induced Loss of Keratinocyte Cohesion. *Front Immunol*, *10*, 1128. doi:10.3389/fimmu.2019.01128
120. Waschke, J. (2008). The desmosome and pemphigus. *Histochem Cell Biol*, *130*(1), 21-54. doi:10.1007/s00418-008-0420-0
121. Waschke, J., Böckers, T. M., & Paulsen, F. (2019). *Sobotta Lehrbuch Anatomie* (2 ed.). München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
122. Waschke, J., & Spindler, V. (2014). Desmosomes and extradesmosomal adhesive signaling contacts in pemphigus. *Med Res Rev*, *34*(6), 1127-1145. doi:10.1002/med.21310
123. Welsch et al., U. (2014). *Lehrbuch Histologie*. München: Elsevier, Urban & Fischer.
124. Willcox, M. D. P., Argueso, P., Georgiev, G. A., Holopainen, J. M., Laurie, G. W., Millar, T. J., . . . Jones, L. (2017). TFOS DEWS II Tear Film Report. *Ocul Surf*, *15*(3), 366-403. doi:10.1016/j.jtos.2017.03.006
125. Wolffsohn, J. S., Arita, R., Chalmers, R., Djalilian, A., Dogru, M., Dumbleton, K., . . . Craig, J. P. (2017). TFOS DEWS II Diagnostic Methodology report. *Ocul Surf*, *15*(3), 539-574. doi:10.1016/j.jtos.2017.05.001
126. Yoshida-Noro, C., Suzuki, N., & Takeichi, M. (1984). Molecular nature of the calcium-dependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody. *Dev Biol*, *101*(1), 19-27. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6692973>



## VII Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lokalisation der Meibomdrüsen im humanen Auge .....	18
Abbildung 2: Pathophysiologie des Trockenen Auges (DED) und der Dysfunktion von Meibomdrüsen (MGD) .....	25
Abbildung 3: Exemplarische Darstellung der desmosomalen Verteilung in Azini von Meibomdrüsen .....	27
Abbildung 4: Übersicht relevanter Signalwege in der Pathogenese des PV .....	29
Abbildung 5: Zeitachse zur Zellkultur und Experimente von HMGEC .....	50
Abbildung 6: Untersuchung der adhäsiven Eigenschaften von proliferierenden und differenzierten Meibozyten.....	52
Abbildung 7: Serum-induzierte Differenzierung fördert die Bildung von Lipiden .....	53
Abbildung 8: Serum-induzierte Differenzierung fördert die Bildung von Adhäsionskontakten .....	55
Abbildung 9: Modulation der Zell-Zell-Haftung durch spezifische Antikörper-vermittelte Hemmung der Interaktion zwischen Adhäsionsmolekülen.....	57
Abbildung 10: Hemmung der Haftung von Ecad und Dsg3 und ihre Auswirkung auf die zelluläre Integrität sowie Lipidakkumulation.....	59
Abbildung 11: Meibomdrüsen-Morphologie und Lipidproduktion in Dsg3-KO Mäusen .	62
Abbildung 12: Untersuchung der Zell-Zell Haftung nach Modulation bestimmter Signalwege .....	65
Abbildung 13: Untersuchung der Hyperadhäsion nach EGTA-vermittelter Ca <sup>2+</sup> -Depletion .....	68
Abbildung 14: Serum-induzierte Differenzierung und Reifung in HMGECs.....	71

## VIII Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Zelllinie.....	32
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Primärantikörper .....	32
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper und Fluorophor-gekoppelten Substanzen.....	34
Tabelle 4: Auflistung der Mediatoren .....	35
Tabelle 5: Auflistung der Chemikalien .....	36
Tabelle 6: Auflistung der Agarosepartikel .....	40
Tabelle 7: Auflistung der Puffer und Lösungen.....	40

## Lebenslauf

Name:	Francesca Maria Melega	
Geburtsdatum:	18.03.1994	
Geburtsort:	Bozen, Italien	
Adresse:	Hallwylstrasse 74, 8004 Zürich, Schweiz	
Telefon:	+41 76 307 1803	
E-Mail:	francmelega@yahoo.de	
Promotion:	01/2017-12/2018	Experimentelle Doktorarbeit am Institut für Anatomie und Zellbiologie, Lehrstuhl I, LMU München
Beruflicher Werdegang:	Seit 11/2020	Assistenzärztin, Universitäre Klinik für Akutgeriatrie, Stadtspital Waid, Zürich
Studium:	2013-2020	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München  Abschluss: Staatsexamen
Schulbildung:	09/2008-07/2013	Franziskaner-Gymnasium, Bozen  Abschluss: Matura (=Abitur)
Wissenschaftliche Kongresse:	09/2018	113. Jahrestagung, Anatomische Gesellschaft, Rostock, Deutschland
Publikation:	05/2019	E-Cadherin is important for Meibomian gland function as revealed by a new human ex vivo slice culture model. <i>Rötzer V, Melega F, Garreis F, Paulsen F, Waschke J (2019). The American Journal of Pathology; doi: 10.1016</i>
Forschungsstipendium:	09/2017-06/2018	Stipendiatin der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG)

### Danksagung

An diesem Punkt gebührt vielen Personen mein aufrichtiger Dank.

An erster Stelle geht ein großes Dankeschön natürlich an Prof. Dr. med. Jens Waschke, der als übergeordneter Arbeitsgruppenleiter die Promotionsthematik bereitgestellt und stets neue Fragestellungen und Ideen sowie konstruktive Kritik eingebracht hat. Danke für die Betreuung der Promotionsarbeit, die Erstellung des Erstgutachtens und für die Möglichkeit, meine Daten auf dem 113. Kongress der Anatomischen Gesellschaft vorstellen zu dürfen.

Ich bedanke mich auch bei allen Mitarbeitern und Kollegen des Lehrstuhls, die zwar nicht direkt an meinem Projekt beteiligt waren, aber trotzdem wesentlich zur Atmosphäre im Labor und außerhalb beigetragen haben; dazu gehören alle Postdocs, Doktoranden und technische Assistenten aus anderen AGs.

Danke auch der Deutschen Gesellschaft für Ophthalmologie (DOG), die mich als Stipendiatin aufgenommen und während meiner Laborzeit finanziell unterstützt hat. Das war eine große Entlastung, sodass ich mich voll und ganz der Tätigkeit als Doktorandin widmen konnte.

Meine Kommilitonen und Mitdoktoranden möchte ich natürlich auch erwähnen, die mit mir durch diesen Studiumsabschnitt gegangen sind. Sei es die Kaffeepausen, das Kochen nach einem langen Tag im Labor oder die gegenseitige Aufmunterung nach misslungenen, aber auch das Anstoßen mit einem Bier nach gelungenen Experimenten: ohne euch hätte alles nur halb so viel Spaß gemacht.

Großer Dank gebührt auch Martina Hitzenbichler, die sich stets unsere Doktorandenprobleme zu Herzen genommen und uns zum größten Teil eingearbeitet hat. Zudem Danke für all die Male, wo du mir beim Versorgen der Zellen oder beim Ausführen von langen Experimenten geholfen hast.

Mit ganzem Herzen bedanke ich mich selbstverständlich bei meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich in allem immer unterstützen. Danke auch meinen Geschwistern und meinen Freunden. Sie halten alle immer zu mir und sind mit ihrer Zuversicht stets für mich da.

Mein allergrößter Dank allerdings gebührt **Vera Rötzer**, einem ganz besonderen Menschen und der bei Weitem besten Betreuerin, die ich mir hätte wünschen können. Danke für die Einarbeitung ins Labor, für die Vermittlung wissenschaftlichen Denkens und natürlich

## Danksagung

---

für die Hilfe bei der Planung und Hinterfragung der Experimente. Danke, dass du mich immer ermutigen konntest und mir geholfen hast, auch in komplizierteren Sachverhalten den Durchblick zu behalten. Danke für deine immer freundliche Art und für das stets offene Ohr. Und last but not least: Danke für die Geduld und Sorgfalt beim Lesen und Korrigieren der geschriebenen Arbeit.