

Aus der Augenklinik und Poliklinik  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Etablierung einer primären Meibomdrüsenepithelzellkultur

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Jonas Valentin Lauff  
aus Stuttgart

Mainz, 2023

Tag der Promotion:

20. November 2023

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Relevanz der Meibomdrüsendysfunktion .....	1
1.2 Aktueller Stand der wissenschaftlichen Forschung.....	2
1.3 Ziele der Arbeit.....	3
<b>2 Literaturdiskussion</b> .....	<b>5</b>
2.1 Das Trockene Auge.....	5
2.1.1 Epidemiologie .....	5
2.1.2 Physiologie und Homöostase des Tränenfilms .....	5
2.1.3 Ätiologie und Klassifikation des Trockenen Auges .....	6
2.1.4 Immunologische Aspekte des Trockenen Auges.....	7
2.1.5 Symptome und Klinik des Trockenen Auges.....	8
2.2 Die Rolle der Meibomdrüsendysfunktion in der Pathogenese des Trockenen Auges	9
2.2.1 Meibomdrüsen und ihre Funktion.....	9
2.2.2 Zusammensetzung des Meibums .....	10
2.2.3 Definition und Klassifikation der Meibomdrüsendysfunktion.....	12
2.2.4 Symptome und Klinik der Meibomdrüsendysfunktion .....	13
2.2.5 Pathophysiologie der Meibomdrüsendysfunktion - Stand der Forschung ...	13
2.2.5.1 Alterungsprozesse.....	14
2.2.5.2 Umwelteinflüsse .....	15
2.2.5.3 Hormonelle Einflüsse.....	16
2.2.5.4 Veränderung der Meibomdrüsenstammzellen.....	17
2.2.5.5 Weitere Risikofaktoren der Meibomdrüsendysfunktion .....	17
2.3 Modelle zur Untersuchung der Meibomdrüsendysfunktion.....	18
2.3.1 Primärzellkulturen und Zelllinien als <i>in vitro</i> -Modelle .....	18
2.3.2 Aktueller Forschungsstand von <i>in vitro</i> -Modellen zur Meibomdrüsendysfunktion.....	20
2.3.3 Die humane Meibomdrüsenepithelzelllinie (HMGEC).....	21
2.3.4 Charakterisierung und Proliferation der HMGEC.....	22
2.3.5 Die Bedeutung der HMGEC als <i>in vitro</i> -Modell zur Erforschung der Meibomdrüsendysfunktion.....	23
2.4 Einfluss von PPAR $\gamma$ -Agonisten auf Meibomdrüsenzellen .....	25
2.5 <i>In vitro</i> -Einsatz von Rho-Kinase Inhibitoren in Zellkulturen .....	27
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>29</b>
3.1 Material.....	29
3.2 Methoden.....	35

3.2.1	Zellkultur.....	35
3.2.1.1	Ursprung des Gewebematerials .....	35
3.2.1.2	Probengewinnung aus Überschussgewebe der lateralen Zügelplastik .	35
3.2.1.3	Probengewinnung aus Tarsi von Körperspendern.....	35
3.2.1.4	Präparation der Gewebeproben .....	36
3.2.1.5	Kulturbedingungen .....	37
3.2.1.6	Passagieren.....	38
3.2.1.7	Bestimmung der Zellzahl .....	38
3.2.2	Inhibierungsaktivität und Resazurin Assay .....	39
3.2.3	Stimulation mit PPAR $\gamma$ -Agonisten (Rosiglitazon) .....	40
3.2.4	RNA-Isolierung .....	40
3.2.4.1	RNA-Isolierung aus Gewebe.....	40
3.2.4.2	RNA-Isolierung aus Zellen .....	41
3.2.5	DNase-Verdau .....	41
3.2.6	RNA-Konzentrationsbestimmung .....	42
3.2.7	cDNA-Synthese (Reverse Transkription).....	42
3.2.8	Polymerasekettenreaktion der Housekeeping Gene .....	43
3.2.9	Agarose-Gelelektrophorese.....	44
3.2.10	Real-Time Polymerasekettenreaktion an cDNA (RT-PCR).....	44
3.2.11	Lipidfärbungen .....	49
3.2.11.1	Sudan III Fettfärbung .....	49
3.2.11.2	Oil Red O Färbung .....	50
3.2.12	Quantitative Auswertung der Lipidfärbung.....	50
3.2.13	Überblick über das Arbeitsprogramm .....	52
3.3	Statistik.....	53
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>54</b>
4.1	Etablierung der primären Meibomdrüsenzellkulturen.....	54
4.1.1	Primäre Meibomdrüsenepithelzellkultur aus Überschussgewebe der lateralen Zügelplastik .....	54
4.1.1.1	Zusammensetzung des Spenderkollektivs .....	54
4.1.1.2	Prävalenz atrophierter Meibomdrüsen im Spenderkollektiv.....	55
4.1.1.3	Etablierte primäre Meibomdrüsenepithelzellkulturen .....	55
4.1.2	Primäre Meibomdrüsenepithelzellkultur aus Tarsi von Körperspendern .....	56
4.1.3	Kultivierung der Gewebestücke, Auswachsen der Zellen und Proliferation der Zellkultur.....	56
4.1.4	Einfluss der Dauer zwischen Probengewinnung und Kultivierung .....	59
4.1.5	Passagieren der Zellen.....	59
4.1.6	Einfluss der Rho-Kinase Hemmung auf die Kultivierung von Meibozyten ..	60
4.2	Lipidfärbungen der Meibomdrüsenzellen .....	62
4.2.1	Lipidfärbungen der basalen Meibomdrüsenepithelzellen .....	62
4.2.2	Lipidfärbung nach Stimulation mit PPAR $\gamma$ -Agonisten (Rosiglitazon) .....	66

4.2.3	Vergleich der Lipidfärbungen der basalen mit den mit PPAR $\gamma$ -Agonisten stimulierten Meibomdrüsenzellen.....	68
4.3	Genexpression der Meibomdrüsenzellkultur .....	74
4.3.1	Expression von Genen des Fettstoffwechsels.....	74
4.3.2	Expression von Genen der Muzine .....	77
4.3.3	Expression von Genen der Zytoskelettproteine.....	78
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>83</b>
5.1	Etablierung der primären Meibomdrüsenepithelzellkulturen.....	83
5.1.1	Primäre Meibomdrüsenepithelzellkultur aus Überschussgewebe der lateralen Zügelplastik .....	83
5.1.2	Primäre Meibomdrüsenepithelzellkultur aus Tarsi von Körperspendern .....	84
5.1.3	Allgemeine Herausforderungen der Etablierung einer primären Meibomdrüsenepithelzellkultur.....	85
5.1.4	Kultivierung der Meibomdrüsenzellen.....	85
5.1.5	Einfluss von ROCK-Inhibitoren auf die Kultivierung von Meibozyten.....	87
5.2	Lipidfärbungen der primären und stimulierten Meibomdrüsenzellen.....	87
5.3	Genexpression der primären und stimulierten Meibomdrüsenzellen .....	89
5.4	Die primäre Meibomdrüsenepithelzellkultur als Modell zur Untersuchung der Meibomdrüsendysfunktion .....	92
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>94</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>96</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>107</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>121</b>
<b>10</b>	<b>Tabellarischer Lebenslauf .....</b>	<b>122</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ADDE	Aqueous Deficient Dry Eye
ADFP	adipocyte differentiation-related protein
ANGPTL4	Angiopoietin-related protein 4
ANOVA	analysis of variance
AWAT2	Acyl-CoA-Wachs-Alkohol-Acyltransferase 2
bp	Basenpaar
BPE	bovine pituitary extract
cDNA	codierende DNA
CK5	Keratin 5
Cp-Werte	Crossing point-Werte
Ct-Werte	Crossing threshold Werte
DED	dry eye disease
DEPC-Wasser	mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) deionisiertes Wasser
DEWS	Dry Eye Workshop
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDE	Evaporative Dry Eye
eDNA	extrazelluläre DNA
EGF	epidermal growth factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
ELOVL4	elongation of very long chain fatty acids protein 4
EPA	Eicosapentaensäure, Eicosapentaensäure
FABP4	fatty acid-binding protein 4
FBS	fetal bovine serum, fötales Kälberserum
FGF	fibroblast growth factor
HHIP	hedgehog-interacting protein
HMGEC	human meibomian gland epithelial cell line
hTERT	humaner Telomerase reverse Transkriptase
IGF	Insulin-like growth factor, Insulin-like growth factor
JAK	Januskinase
KRT	Keratin
LFU	lacrimal functional unit
MGD	meibomian gland dysfunction
mTOR	mammalian target of rapamycin
NETs	neutrophil extracellular traps
NFκB	Nukleärer Faktor κB
PBS	phosphate-buffered saline; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PLIN2	Adipose differentiation-related protein (perilipin 2)
PPARγ	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma
RFU	relative Fluoreszenzeinheiten
ROCK	Rho-Kinase
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	Real-Time Polymerasekettenreaktion
SCD	Stearoyl-CoA desaturase
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
SFM	serum-free keratinocyte basal medium

SMA ..... Smooth Muscle Actin  
SQSTM1.....Sequestosom-1  
STAT ..... Signal Transducers and Activators of Transcription  
TBUT..... Tear Break up Time  
TFOS..... Tear Film and Ocular Surface Society  
VIM..... Vimentin  
Wnt..... wingless und int-1

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Überblick über das Krankheitsbild des Trockenen Auges .....	7
Abbildung 2	Anatomie und Histologie einer murinen Meibomdrüse .....	10
Abbildung 3	Einteilung der Meibomdrüsendiffunktion.....	12
Abbildung 4	Mögliche Einflussfaktoren und ihre Effekte in der Pathogenese der MGD... ..	14
Abbildung 5	Oberlidtarsi eines Spenders .....	36
Abbildung 6	Präparation eines Tarsusstückes.....	36
Abbildung 7	Quantitative Auswertung der Lipidfärbung mit ImageJ .....	51
Abbildung 8	Überblick über das Arbeitsprogramm zur Etablierung einer primären Meibomdrüsenkultur .....	52
Abbildung 9	Zusammensetzung des Spenderkollektives .....	54
Abbildung 10	Anteil der Spender mit Meibomdrüsen und Prävalenz der Meibomdrüsen nach Geschlecht.....	55
Abbildung 11	Etablierte Zellkulturen .....	56
Abbildung 12	Auswachskultur im zeitlichen Verlauf.....	57
Abbildung 13	Zeit bis zum Auswachsen der Meibomdrüsenzellen nach Kultivierung .....	58
Abbildung 14	Proliferation der Zellkultur .....	59
Abbildung 15	Meibomdrüsenzellzahl vor dem ersten Passagieren.....	60
Abbildung 16	Zellaktivität der Meibomdrüsenzellen im Resazurin Assay .....	61
Abbildung 17	Durchschnittliche Zellfläche der basalen Meibomdrüsen.....	62
Abbildung 18	Basale Meibomdrüsenzellen in Sudan III Fettfärbung .....	64
Abbildung 19	Oil Red O Lipidfärbung der basalen Meibomdrüsenzellen.....	65
Abbildung 20	Lipidfärbung nach Stimulation mit Rosiglitazon .....	67
Abbildung 21	Durchschnittliche Zellfläche der stimulierten Meibomdrüsenzellen .....	68
Abbildung 22	Vergleich der Lipidfärbung (Oil Red O und Sudan III) von basalen und stimulierten Meibomdrüsenzellen .....	69
Abbildung 23	Vergleich der Lipidfärbung (Oil Red O) von basalen und stimulierten Meibomdrüsenzellen.....	70
Abbildung 24	Vergleich der Zellfläche basaler und stimulierter Meibomdrüsenzellen.....	71
Abbildung 25	Vergleich des Lipidanteils zwischen basalen (Kontrolle) und stimulierten (Rosiglitazon) Meibomdrüsenzellen.....	72
Abbildung 26	Vergleich des Lipidanteils zwischen basalen und stimulierten Meibomdrüsenzellen der einzelnen Spenderproben .....	73
Abbildung 27	Darstellung der Genexpression der Fettstoffwechselfgene PLIN2, ELOVL4, SCD und FABP4.....	75
Abbildung 28	Darstellung der Genexpression der Muzine MUC5AC und MUC16 .....	77
Abbildung 29	Darstellung der Genexpression von ACTA2 und Vimentin .....	79
Abbildung 30	Darstellung der Genexpression der Keratine KRT5, KRT6 und KRT14 .....	81



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Lipidzusammensetzung des Meiboms .....	11
Tabelle 2	Kulturmedium für Gewebeverwahrung.....	35
Tabelle 3	Kulturmedium zum Auswachsen der Meibomdrüsenzellen (Auswachsmedium) .....	37
Tabelle 4	Kulturmedium zur Proliferation (Proliferationsmedium) .....	38
Tabelle 5	Kultivierungsschema der Meibomdrüsenzellen mit ROCK-Inhibitor .....	39
Tabelle 6	Kultivierungsschema der Kontrollgruppe und der Stimulationsgruppe mit Rosiglitazon.....	40
Tabelle 7	Mastermix zum DNase-Verdau.....	41
Tabelle 8	Zyklen des Reverse Transkriptase Protokolls im Thermocycler (Biometra Trio).....	43
Tabelle 9	Mastermix zur cDNA-Synthese.....	43
Tabelle 10	Primersequenzen $\beta$ -Aktin human.....	43
Tabelle 11	Reaktionsschritte der PCR .....	44
Tabelle 12	Reaktionsansatz RT-PCR .....	45
Tabelle 13	Übersicht über die verwendeten Primer .....	46
Tabelle 14	Protokoll der RT-PCR .....	47
Tabelle 15	Übersicht über die verwendeten Nachweismarker .....	48
Tabelle 16	Reaktionsschritte der Sudan III Fettfärbung von Zellen.....	49
Tabelle 17	Reaktionsschritte der Oil Red O Lipidfärbung von Zellen .....	50

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird in dieser Arbeit das generische Maskulinum verwendet. Die verwendeten Personenbezeichnungen beziehen sich, sofern nicht anders kenntlich gemacht, auf alle Geschlechter.

# 1 Einleitung

## 1.1 Relevanz der Meibomdrüsendysfunktion

Die Meibomdrüsendysfunktion (engl. meibomian gland dysfunction; MGD) ist weltweit betrachtet mit einem Anteil von zwei Drittel die Hauptursache für die Erkrankung des Trockenen Auges (engl. dry eye disease; DED). Mit einer Prävalenz von 15-17 % der Gesamtbevölkerung in Europa (in Asien bis über 60 %) kann die Erkrankung des Trockenen Auges als Volkskrankheit betrachtet werden (1). Insbesondere ältere Personen und Frauen sind gehäuft betroffen (2). Allgemein gesehen führt bei der multifaktoriellen Erkrankung des Trockenen Auges ein Verlust der Homöostase des Tränenfilms zu einer Instabilität und Hyperosmolarität des Tränenfilms. Bei der MGD bedingt eine chronische Sekretionsstörung der Meibomdrüsen einen Mangel oder eine veränderte Zusammensetzung an Lipiden im Tränenfilm. Die Folge ist ein evaporativ trockenes Auge mit okulären Symptomen, wie Fremdkörpergefühl und relevanten Visuseinschränkungen (3). Der Reizzustand mit chronischer Entzündung führt im Verlauf zu einer Schädigung der Augenoberfläche mit Folgeerkrankungen der Hornhaut und schränkt betroffene Patienten stark ein (4, 5). Als häufiges Korrelat der MGD in der klinischen Untersuchung sind Veränderungen der Augenoberfläche und der Lider mit atrophierten oder verstopften Meibomdrüsen zu beobachten (3). Neben den okulären Symptomen stehen eine verminderte Leistungsfähigkeit und assoziierte Erkrankungen wie unipolare Depressionen im Vordergrund der Erkrankung des Trockenen Auges (6-8). Insgesamt geben betroffene Patienten den erlebten Leidensdruck und die Einschränkungen in der Lebensqualität in der Schwere vergleichbar zu Patienten an, die unter Angina Pectoris Beschwerden leiden (9). Zusätzlich zu den gesundheitlichen Einschränkungen des einzelnen Patienten entstehen allein in den USA durch die Erkrankung des Trockenen Auges unmittelbare Gesundheitskosten von über 3,8 Milliarden US-Dollar jährlich (10). Die gesamtwirtschaftlichen Folgen für die Gesellschaft werden auf 55 Milliarden US-Dollar pro Jahr geschätzt (10), wobei ein Großteil der Kosten auf die MGD als Hauptursache des Trockenen Auges zurückzuführen ist. Erste Erwähnungen der MGD als eigene Entität finden sich bereits in den 1980ern in der Literatur (11). Spätestens seit dem Report der *Tear Film and Ocular Surface Society (TFOS)* zur Meibomdrüsendysfunktion im Jahr 2011 ist die Bedeutung der Erkrankung in der Entstehung des DED erkannt und eine einheitliche Definition und Klassifikation der MGD etabliert. Seither ist das Interesse an der Erforschung der Pathophysiologie und den zugrundeliegenden Ursachen der MGD stark gewachsen (12).

## 1.2 Aktueller Stand der wissenschaftlichen Forschung

Das aktuell verfügbare Wissen über die Physiologie und die Regulation der Meibomdrüsen, die Zusammensetzung und Lipidprofile des Meibomdrüsensekretes, sowie die Pathophysiologie in der Entstehung der MGD stammt aus klinischer Forschung, zahlreichen *in vivo*- und wenigen *in vitro*-Modellen. Insbesondere Mausmodelle waren bei der Identifizierung von Risikofaktoren und Signalwegen im Zusammenhang mit der MGD entscheidend (13). Von wesentlicher Bedeutung für die *in vitro*-Erforschung der MGD ist die im Jahr 2010 von Liu et al. immortalisierte Zelllinie humaner Meibomdrüsenzellen (human meibomian gland epithelial cell line (HMGEC)) eines 58-jährigen, männlichen Spenders (14). Die Charakterisierung und Entwicklung von geeigneten Kulturbedingungen der Meibomdrüsenepithelzelllinie ermöglichte zahlreiche Untersuchungen und die Ermittlung verschiedener Faktoren und deren Auswirkungen auf die Meibozytendifferenzierung auf zellulärer Ebene, den Meibozyten. Während frühere Forschungsergebnisse zur Pathogenese der MGD als Hauptursache eine verminderte Förderung von Drüsensekret aufgrund von Obstruktion der Meibomdrüsenausführungsgänge durch Hyperkeratinisierung beschrieben (15-19), wurden in neueren Studien eine Obstruktion durch inflammatorische Prozesse, wie die Aggregation von sogenannten neutrophil extracellular traps (NETs) im Meibomdrüsenausführungsgang (20) und zusätzlich alternative Wege der reduzierten Drüsenfunktion vorwiegend auf zellulärer Ebene diskutiert (21, 22). Klinische Beobachtungen wie ein gehäuftes Auftreten der MGD bei Frauen und eine steigende Prävalenz im Alter, gaben Anlass für die genaue Erforschung von Veränderungen der Meibomdrüsen und verschiedener Risikofaktoren und Einflüsse auf die Meibozytendifferenzierung (23, 24). Insbesondere Veränderungen durch Alterungsprozesse, hormonelle Einflüsse, Umwelteinflüsse wie eine geringe Luftfeuchtigkeit, topische und systemische Medikamente und Veränderungen der Meibomdrüsenstammzellen interagieren und resultieren in einer verminderten Proliferation von Azinuszellen und einer Drüsenatrophie. Dabei erwiesen sich Signalwege des Zellzyklus und des Lipidstoffwechsels, wie Wnt (wingless und int-1)- und PPAR $\gamma$  (Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor  $\gamma$ )-Signalwege, als zentral in der Entwicklung einer MGD ohne die genauen molekularen Wege dahinter zu kennen (25-27). Eine im Alter reduzierte Expression und auffällig veränderte Lokalisation des PPAR $\gamma$ -Rezeptors, der maßgeblich an der Regulation des Lipidstoffwechsel der Meibozyten beteiligt ist, prädestiniert zu der Entwicklung einer MGD (28, 29). Die Stimulation von Meibomdrüsenepithelzellen mit PPAR $\gamma$ -Agonisten, wie beispielsweise Rosiglitazon, führte zu einer gesteigerten Lipidproduktion und Zelldifferenzierung der Meibomdrüsen und gilt daher als vielversprechender möglicher therapeutischer Ansatz der MGD (30, 31). Einschränkend erwiesen sich jedoch viele der eingesetzten Modelle und aus ihnen gewonnenen Forschungsergebnisse in ihrer Übertragbarkeit auf den Menschen als begrenzt oder wurden den komplexen Vorgängen der Meibomdrüsen, ihrer einzigartigen Lipidsekretion und der Nachbildung der Entwicklung einer MGD nicht gerecht (23). So reicht

das gegenwärtige Verständnis über die Pathophysiologie und die Mechanismen der Meibomdrüsendifunktion nicht für die Entwicklung geeigneter Therapieverfahren, wie die Verfügbarkeit überwiegend supportiver Maßnahmen und das Fehlen einer wirksamen kausalen Therapie der MGD eindrücklich demonstriert (32).

### 1.3 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung einer primären Meibomdrüsenepithelzellkultur. Diese soll zur Grundlagenforschung der Physiologie und Pathogenese der Meibomdrüsendifunktion auf zellulärer Ebene, den Meibomdrüsenepithelzellen, dienen. Zum Verständnis der Physiologie und Pathologie der Meibomdrüsen und Meibomdrüsenzellen, sowie für die Entwicklung von Therapieansätzen zur Behandlung oder zur Prävention der MGD stellen Forschungsmodelle ein probates Mittel dar. Bisher fehlen geeignete *in vivo*- und insbesondere *in vitro*-Modelle. Neben der erwähnten sekundären Zelllinie immortalisierter humaner Meibomdrüsen (HMGEC) eines 58-jährigen, männlichen Spenders (14) stehen kaum geeignete Modellsysteme zur Verfügung. Für die Ergründung relevanter Pathomechanismen und um allgemeingültige und übertragbare Schlüsse ziehen zu können, ist dies nicht ausreichend. Weiterhin ist eine repräsentative humane Primärzellkultur von Meibomdrüsen zur Evaluierung verschiedener Einflussfaktoren nicht etabliert. Das Interesse an neuen Modellen, insbesondere an *ex vivo in vitro*-Kulturen, für weitere Studien ist hoch (33). Primärzellen werden direkt aus dem Gewebe entnommen und ohne Modifizierung unter geeigneten Kulturbedingungen etabliert. Damit besitzen sie als Modellsystem gegenüber anderen *in vitro*-Modellen, wie sekundären Zelllinien, den entscheidenden Vorteil, am ehesten dem Ursprungsgewebe und dem *in vivo*-Zustand mit einer normalen Physiologie zu entsprechen. Aus diesem Grund ist die Etablierung einer primären Meibomdrüsenzellkultur als optimales Modell für die Untersuchung der Physiologie und des Stoffwechsels der Meibomdrüsenzellen oberstes Ziel dieser Arbeit.

Im ersten Schritt soll eine auf mehreren Spendern begründende Zellkultur über mehrere Zellgenerationen etabliert werden. Aus überschüssigem Tarsusgewebe, das im Rahmen der lateralen Zügelplastik in der Augenklinik der Universitätsmedizin Mainz anfällt, und aus Tarsi von Körperspendern der Anatomie der Johannes Gutenberg-Universität wird die Meibomdrüsenzellkultur aufgebaut. Es soll gezeigt werden, dass eine Primärzellkultur sowohl aus Gewebe von männlichen als auch von weiblichen Spendern etabliert werden kann. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund des nachgewiesenen hormonellen Einflusses von Bedeutung. Die Etablierung geeigneter Kulturbedingungen und die Charakterisierung der Primärzellkultur steht im Vordergrund. Das Proliferationsverhalten der primären Meibomdrüsen wird mikroskopisch beobachtet und verglichen. Zur Charakterisierung der Zellen wird RNA gewonnen und auf meibomdrüsen-typische Marker untersucht. Es werden mehrere Passagen angelegt und die Zellproliferation jeweils bestimmt. Untersucht wird der Einfluss des Rho-Kinase Inhibitors

ROCK auf die Zellaktivität und die Zellproliferation der Meibomdrüsenzellen. Die für die Pathophysiologie der MGD entscheidende Lipidsekretion wird analysiert, um mögliche Hinweise auf die *in vivo* auftretenden Atrophien oder verstopften Drüsen zu finden. Im weiteren Vorgehen dient die Lipidproduktion der Meibomdrüsenepithelzellen als sensitiver Marker, um über die Visualisierung mittels Lipidfärbungen verschiedene Faktoren und deren Auswirkung auf die Lipidproduktion zu analysieren. Von besonderem Interesse ist hierbei der Einfluss von PPAR $\gamma$ -Agonisten, wie beispielsweise Rosiglitazon, auf die Lipidexpression.

Zusammenfassend werden in der Dissertation zur experimentellen Grundlagenforschung folgende wissenschaftlichen Hypothesen und Ziele adressiert:

- Hypothese 1:** Die Etablierung einer primären Meibomdrüsenkultur ist möglich.
- Hypothese 2:** Zur Kultivierung kann sowohl Gewebe von männlichen als auch weiblichen Patienten verwendet werden.
- Hypothese 3:** Die primären Meibomdrüsenzellen können proliferieren.
- Hypothese 4:** Das Proliferationsverhalten und die Zellaktivität der primären Meibomdrüsenzellen wird durch ROCK-Inhibitoren modelliert.
- Hypothese 5:** Die primären Meibomdrüsenzellen können Lipide produzieren.
- Hypothese 6:** Die Lipidsynthese der Meibomdrüsenzellen wird durch den PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon beeinflusst.
- Hypothese 7:** Die primären Meibomdrüsenzellen exprimieren meibomdrüsen-typische genetische Marker.
- Hypothese 8:** Der PPAR $\gamma$ -Agonist Rosiglitazon verändert die Genexpression der Meibomdrüsenzellen.

Ausblickend soll die Zellkultur in Zukunft ein Werkzeug für weitere Forschung darstellen, um die Analytik und die Therapie der Meibomdrüsendysfunktion voranzubringen. Weitere präventive und medikamentöse Ansätze, die zu einer gesteigerten Lipidproduktion führen und damit effektiv dem Trockenen Auge entgegenwirken, können verfolgt werden.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Das Trockene Auge

Das Trockene Auge (DED), auch Sicca-Syndrom oder Keratokonjunktivitis sicca, wird nach dem Report des *Dry Eye Workshop II (DEWS II)* der *Tear Film and Ocular Surface Society (TFOS)*, als eine multifaktorielle Erkrankung der Augenoberfläche, charakterisiert durch einen Verlust der Homöostase des Tränenfilms und begleitet von okulären Symptomen, bei der eine Instabilität und Hyperosmolarität des Tränenfilms, Entzündung und Schädigung der Augenoberfläche und neurosensorische Abnormitäten eine ätiologische Rolle spielen, definiert (34). Das Bewusstsein für die Erkrankung sowie deren Bedeutung und Erforschung hat in den vergangenen 30 Jahren stark zugenommen. In diesem Zusammenhang hat sich auch die Charakterisierung und Definition des Krankheitsbildes, von einer isolierten Erkrankung des Tränenfilms hin zu der oben genannten aktuellen und multifaktoriellen Definition gewandelt (35).

#### 2.1.1 Epidemiologie

Mit einer Prävalenz des Trockenen Auges von 15-17 % der Gesamtbevölkerung in Europa und bis über 60 % in Asien kann das Krankheitsbild als Volkskrankheit betrachtet werden (1). Global erstreckt sich die Prävalenzspanne des Trockenen Auges je nach Studie von 0,4 % (USA) (36), über 30 % (Spanien) (37) über 35 % (Taiwan) (38) bis zu 52 % (China) (39). Diese erheblichen Unterschiede erklären sich durch verschiedene Studiendesigns (geografische und methodische Unterschiede), variable Untersuchungskollektive und fehlende spezifische und sensitive Tests in der Diagnose des Trockenen Auges. Allgemein zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Prävalenz mit dem Alter und eine höhere Prävalenz bei Frauen (1). In Zukunft ist bei einer alternden Bevölkerung von einer zunehmenden Prävalenz auszugehen (10). Die unmittelbaren Gesundheitskosten der Erkrankung des Trockenen Auges belaufen sich allein in den USA auf über 3,8 Milliarden US-Dollar jährlich, die gesamtwirtschaftlichen Folgen für die Gesellschaft werden auf 55 Milliarden US-Dollar pro Jahr geschätzt (10).

#### 2.1.2 Physiologie und Homöostase des Tränenfilms

Am gesunden Auge wird die Befeuchtung des Auges und die Homöostase des Tränenfilms durch eine funktionelle Einheit bestehend aus Haupttränendrüse (Glandula lacrimalis), Meibomdrüsen, der Augenoberfläche (Cornea, Konjunktiva, akzessorische Tränendrüsen) sowie durch die reichliche sensorische und vegetative Innervation und Rückkopplung aufrechterhalten. Die beteiligten Strukturen bilden zusammen die „lacrimal functional unit“ (LFU) und können alle bei der Erkrankung des Trockenen Auges beteiligt sein (40, 41).

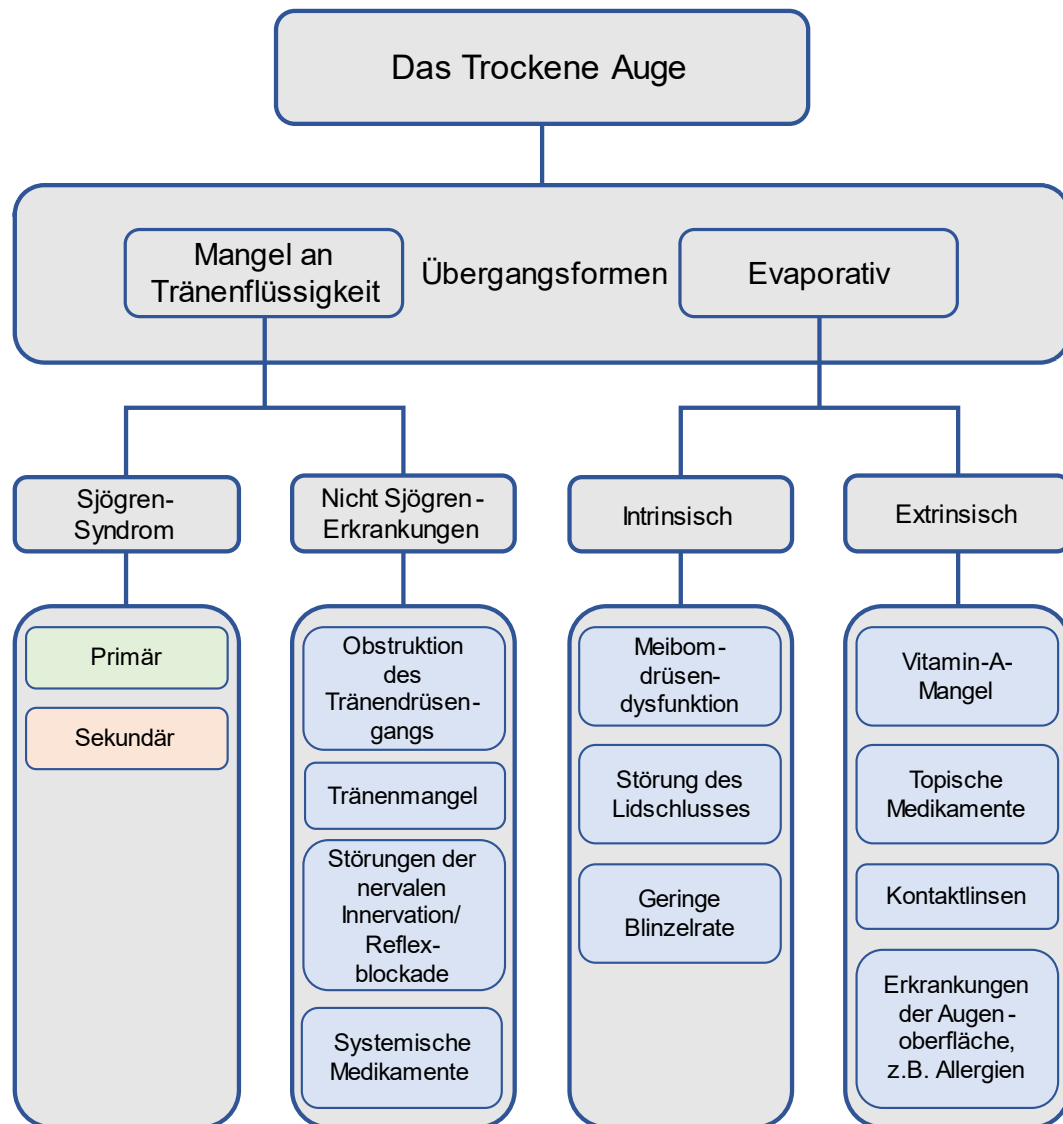
Der Tränenfilm hat trotz seiner geringen Dicke von nur etwa 3-40 µm eine lebenswichtige Funktion zum Schutz und zur Benetzung der Augenoberfläche (42, 43). Eine wässrige

Muzinschicht, überwiegend produziert von den Haupttränendrüsen und Becherzellen der Konjunktiva, wird von einer Lipidschicht bedeckt. Die Meibomdrüsen sind die Hauptquelle der Lipide im Tränenfilm. Sie sekretieren diverse polare und nichtpolare Lipide wie Wachsester, Triacylglycerine, Cholesterine, freie Fettsäuren und Phospholipide (12). Gemeinsam mit einer komplexen Zusammensetzung aus über 1500 Proteinen und Glykoproteinen entsteht ein stabiler Tränenfilm, der für eine glatte und feuchte Augenoberfläche sorgt (44). Der Tränenfilm hat eine wichtige Funktion für die Wundheilung und eine entzündungshemmende Wirkung. Als Barriere zur Umwelt bietet er Schutz vor Infektionen, Stäuben und Pollen (45). Störungen in der Homöostase, der Zusammensetzung und Stabilität des Tränenfilms haben über die Erkrankung des Trockenen Auges hinaus weitreichende Konsequenzen auf die Augenoberfläche und Degenerationsprozesse des Auges (42).

### 2.1.3 Ätiologie und Klassifikation des Trockenen Auges

Hauptrisikofaktor und pathognomonisch führend in der Entstehung des Trockenen Auges ist in etwa zwei Drittel die Meibomdrüsendysfunktion (5). Weiterhin können verschiedene Unterformen des Trockenen Auges ätiologisch unterschieden werden, wobei die Grenzen fließend sind. Als die zwei Hauptformen gelten die hyposekretorische Form (Tränenmangel) sowie die hyperevaporative Form (erhöhte Verdunstung). Eine verminderte Sekretion der wässrig-muzinösen Tränenfilmanteile begünstigt eine Störung der Tränenhomöostase und die Entstehung eines sogenannten Aqueous Deficient Dry Eye (ADDE). Eine gestörte Zusammensetzung des Tränenfilms, vor allem der Lipidanteile, reduziert die Integrität des Tränenfilms und führt über veränderte Verdunstungseigenschaften der Tränenflüssigkeit zu einem Evaporative Dry Eye (EDE) (34). Eine alleinige hyposekretorische Form tritt bei etwa 15-20 % der Patienten auf (46). Hyperevaporative Störungen liegen bei 60-80 % der Patienten vor (47, 48). Meist sind kombinierte Störungen ursächlich in der Entstehung des Trockenen Auges (1, 48). Als Risikofaktoren in der Entstehung des Trockenen Auges spielen sowohl endogene als auch exogene Faktoren eine bedeutende Rolle. Zu den Risikofaktoren mit hoher Evidenz zählen Alter, weibliches Geschlecht, Autoimmunerkrankungen (z.B. systemischer Lupus erythematodes), Medikamente (v.a. Antihistaminika,  $\beta$ -Blocker, Diuretika), Vitamin-A-Mangel, Östrogeninsuffizienz, postmenopausale Östrogentherapie, refraktive Chirurgie der Cornea und Hepatitis C (49). Ebenfalls von Bedeutung sind die Umweltfaktoren niedrige relative Luftfeuchtigkeit und hohes Windaufkommen (49). Das Trockene Auge tritt auch im Rahmen von chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankungen wie dem Sjögren-Syndrom auf, das neben Gelenken und anderen Organen vor allem die Speichel- und Tränendrüsen betrifft. Dies führt zu den Leitsymptomen eines Trockenen Auges und Mundes („Sicca Syndrom“) (50). Abbildung 1 gibt einen Überblick über das Krankheitsbild des Trockenen Auges.





**Abbildung 1** Überblick über das Krankheitsbild des Trockenen Auges

Quelle: In Anlehnung an Craig et al., 2017 (34)

#### 2.1.4 Immunologische Aspekte des Trockenen Auges

Zentral in der Aufrechterhaltung und Verstärkung des Trockenen Auges ist eine begleitende Entzündung der Augenoberfläche, die zur Schädigung der beteiligten Strukturen führt (51). Eine Entzündungskaskade, gesteuert über NFκB (Nukleärer Faktor κB) Signalwege, inflammatorische Zytokine (IL-8, IL-1, TNF-α) (20, 52), Chemokine (C5a) und Matrix-Metalloproteinasen (MMP-9) werden als Mediatoren beobachtet (53). In der Tränenflüssigkeit von Patienten mit DED konnte ein Mangel an Nucleasen und eine damit einhergehende Akkumulation von extrazellulärer DNA (eDNA) und von NETs nachgewiesen werden (54). Oberflächenstress, hervorgerufen durch die Hyperosmolarität des Tränenfilms bei DED, begünstigt dieses Ungleichgewicht und die Entzündung der Augenoberfläche (55). Die Aggregation von NETs in der Meibomdrüse führte im Mausmodell zu einem Verschluss der

Meibomdrüsenausführungsgänge und einem Rückstau der Flüssigkeit mit anschließender Atrophie des Meibomdrüsenazinus (20). Eine pharmakologische Hemmung der NET Bildung reduzierte die beschriebenen Veränderungen an den Meibomdrüsen (20).

### 2.1.5 Symptome und Klinik des Trockenen Auges

Häufige Symptome des Trockenen Auges sind ein schmerzhaftes Auge, Augenrötung, Brennen, Stechen, Fremdkörpergefühl, Pruritus sowie Photophobie (49). Betroffene äußern eine reduzierte Sehschärfe, verschwommenes oder verschleiertes Sehen und eine reduzierte Kontrastempfindlichkeit (6). Die Symptome treten häufig getriggert durch Umgebungsfaktoren wie Wind, Licht und Temperaturextreme auf (40). Die Erkrankung beeinträchtigt die visuelle Wahrnehmung und die Leistungsfähigkeit im Alltag und im Beruf, vor allem beim Lesen, Arbeiten am Computer und Autofahren (7). Zudem leidet die psychische Gesundheit unter der Erkrankung des Trockenen Auges. Angsterkrankungen und Depressionen treten signifikant häufiger bei Patienten mit DED gegenüber gesunden Probanden auf (8). Die Minderung der Lebensqualität durch die Erkrankung des Trockenen Auges geben Patienten mit 22 % bei moderaten und 28 % bei schweren Symptomen des Trockenen Auges an. Damit ist die Beurteilung der Beeinträchtigung durch DED in der Schwere ähnlich wie bei Patienten mit Angina Pectoris (9). Beobachtbare Veränderungen im Rahmen des Trockenen Auges sind eine unterschiedlich stark ausgeprägte Bindehaurötung, eine Schädigung der Augenoberfläche (Keratitis punctata superficialis), lidkantenparallele konjunktivale Falten und ein reduzierter Tränenmeniskus. Zudem können auf die Ursache hinweisende Veränderungen, wie verdickte Lidränder bei der Meibomdrüsendysfunktion vorliegen. In Spätstadien sowie bei schweren Verläufen können Epitheldefekte und Ulzerationen der Cornea auftreten (56). Schwere Komplikationen finden sich gehäuft beim Sjögren-Syndrom, bei der Ichthyosis und der Xerophthalmie (57).

Auffällig ist häufig eine Diskrepanz zwischen subjektiven Beschwerden und objektiven Veränderungen der Augenoberfläche, die das Fehlen einheitlicher klinischer Tests und das individuelle Schmerzerleben der Betroffenen nur teilweise erklärt (58, 59). Nur etwa 60 % derjenigen mit nachgewiesenen Veränderungen der Augenoberfläche klagen über Symptome (58). Neben einer Rötung der Bindehaut korrelieren eine erhöhte Tränenosmolarität (bei beiden Hauptsubtypen des Trockenen Auges vorhanden) und eine geringe Tränenstabilität (Tear Break up Time; TBUT) nur in geringem Maße mit den Beschwerden von DED-Patienten (58-61). Daher empfiehlt der *TFOS DWES II Report* die Terminologie „Symptome ohne Zeichen“ und „Zeichen ohne Symptome“ zu verwenden (34). Symptome ohne Zeichen können in präklinischen Stadien der DED oder bei gleichzeitig vorliegenden neuropathischen Schmerzen der Cornea auftreten (62). In der reichlich innervierten und schmerzempfindlichen Cornea werden durch dysfunktionale Innervation Empfindungen, wie Stechen oder Brennen ausgelöst, die unabhängig der Beschwerden des Trockenen Auges entstehen und davon abzugrenzen sind (63). Demgegenüber sind Anzeichen des Trockenen Auges ohne Symptome bei sekundär

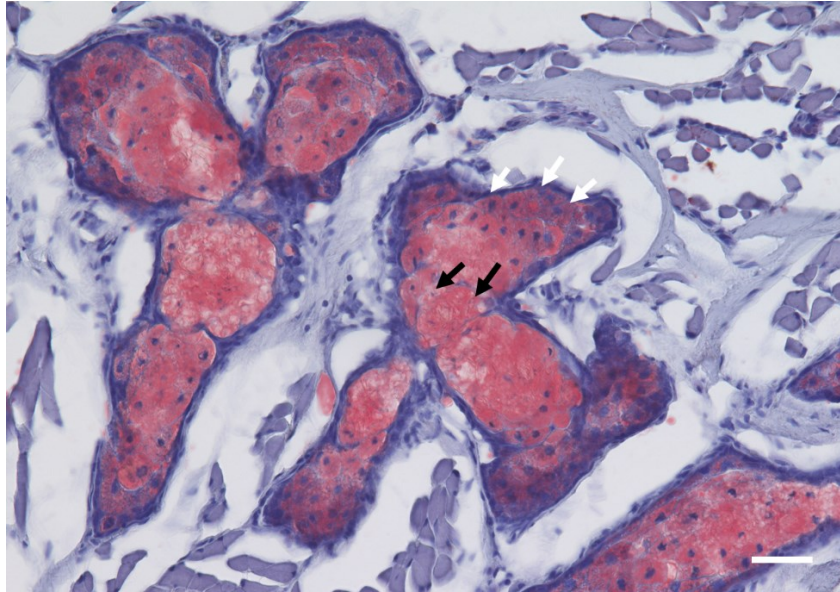
reduzierter Sensitivität der Cornea in Folge eines Progresses des Trockenen Auges beobachtbar. Liegt eine Prädisposition für ein Trockenes Auge vor, beispielsweise eine noch asymptomatische Meibomdrüsendysfunktion, können sich Veränderungen der Augenoberfläche vor dem Auftreten von Symptomen einstellen (34).

## 2.2 Die Rolle der Meibomdrüsendysfunktion in der Pathogenese des Trockenen Auges

Die Meibomdrüsendysfunktion ist ein Überbegriff mehrerer Erkrankungen der Meibomdrüsen (3). Die MGD kann sich sowohl auf die Quantität als auch auf die Qualität des ausgeschiedenen Drüsensekrets der Meibomdrüsen, das Meibum, negativ auswirken. Dies beeinflusst die Zusammensetzung des Tränenfilms. Die MGD ist mit einer Prävalenz zwischen 39-50 % weit verbreitet und nimmt im Alter signifikant zu (64). Weltweit ist die MGD die Hauptursache für ein evaporativ Trockenes Auge (EDE). Bei 65 % der Patienten mit gestörter Lipidphase des Tränenfilms ist eine MGD ursächlich, aber auch bei asymptomatischen Patienten zeigt sich gelegentlich eine MGD (65). Erste Erwähnungen der MGD finden sich bereits in den 1980ern in der Literatur (11), wobei spätestens seit dem *TFOS-Workshop Report* zu Meibomdrüsendysfunktion 2011 die Bedeutung der Erkrankung in der Entstehung des DED erkannt wurde und eine einheitliche Definition und Klassifikation der MGD etabliert wurde (12).

### 2.2.1 Meibomdrüsen und ihre Funktion

Meibomdrüsen (*Glandulae tarsales*) sind große Talgdrüsen, die mit zahlreichen separaten Drüsengängen im bindegewebigen Tarsus des Ober- und Unterlieds lokalisiert sind. Zwischen 20 und 40 einzelne Meibomdrüsen sind im Oberlid und 20 bis 30 im Unterlid vorhanden (66). Die Anatomie und der Sekretionsmechanismus der Meibomdrüsen weisen Ähnlichkeiten mit Talgdrüsen der Haut auf, sind aber im Gegensatz dazu größer und nicht mit Haaren assoziiert (3, 23). Die Azini der Meibomdrüsen sind unterschiedlich groß und leiten ihr Sekret durch kurze intralobuläre Ductuli in einen langen zentralen Ausführungsgang ab. Durch einen holokrinen Sekretionsmechanismus, bei dem die Zellen der Meibomdrüsen (Meibozyten) verschiedene Differenzierungsstadien durchlaufen, entsteht ein öliges Sekret, das Meibum (67). Randständige, undifferenzierte Basalzellen differenzieren sich zu aktiven Meibozyten, die nach und nach Lipide in Vesikeln einlagern. Die Meibozyten wandern Richtung Zentrum des Azinus und differenzieren durch Zunahme der Lipidvesikel zu vollständig differenzierten Meibozyten. Im Verlauf wird der Zellkern pyknotisch, die Zellmembran beginnt sich aufzulösen und die gesamte Zelle bildet das Meibum (68). Das Meibum fließt durch einen kurzen Verbindungsgang in einen zentralen Gang. Mehrere Drüsengänge bilden einen Ausführungsgang. Abbildung 2 zeigt die Anatomie der Meibomdrüsen und die Veränderungen der Meibozyten während des holokrinen Sekretionsmechanismus im histologischen Bild.



**Abbildung 2** Anatomie und Histologie einer murinen Meibomdrüse

Abbildung 2 zeigt einen holokrinen Meibomdrüsenazinus der murinen Meibomdrüse. Der Maßbalken entspricht 50  $\mu\text{m}$ . Der Differenzierungs- und Reifungsprozess von Meibozyten geht von den randständigen Basalzellen aus (weiße Pfeile). In Richtung des Zentrums des Azinus lagern Meibozyten Lipide ein und differenzieren sich zu reifen Meibozyten, bevor sie apoptotisch werden. Hypermature Meibozyten zeigen einen pyknotische Zellkern (schwarze Pfeile). Das Meibum ist das sekretorische Produkt aus allen Bestandteilen der Meibozyten (holokrine Sekretion).

Das Meibum wird durch den Ausführungsgang auf den freien Lidrand, durch Sekretionsdruck der Drüse und muskuläre Kräfte, nahe der inneren Lidkante ausgeschieden (69). Das Sekret sammelt sich am distalen Tränenmeniskus. Gemeinsam mit einem geringen Anteil polarer und nichtpolarer Lipide anderen Ursprungs überzieht es durch den Lidschlag die wässrige Phase des Tränenfilms mit Lipiden und reduziert damit dessen Verdunstung (70, 71). Kontinuierlich wird ein Teil der Lipidschicht des Tränenfilms nach vorne über den Lidrand und über die ableitenden Tränenwege abgeschieden, sodass der Tränenfilm einer ständigen Erneuerung unterliegt (71). Zwischen dem Blinzeln behält der normale Tränenfilm seinen Aufbau für 10-20 Sekunden bei, bevor die Lipidphase beginnt aufzubrechen und die darunterliegende wässrige Phase verdunstet (72).

### 2.2.2 Zusammensetzung des Meibums

Das Meibum ist ein hochkomplexes Lipidgemisch mit geringen Anteilen an Proteinen und weiteren Bestandteilen, das dem holokrinen Sekretionsmechanismus der Meibozyten entstammt (69). Über 90 verschiedene Proteine, unter anderem IgA und Lipocalin konnten im Meibum nachgewiesen werden (73). Lipocalin bindet zahlreiche lipophile Liganden und ist vermutlich

für die Integrität zwischen wässriger- und Lipidphase des Tränenfilms wichtig (3). Die Lipide des Meibums sind vielfältig und ihre Zusammensetzung einzigartig im menschlichen Körper (23). In den vergangenen Jahren konnte in zahlreichen Untersuchungen die Lipidzusammensetzung aufgeschlüsselt werden (67, 74-77). Demnach besteht Meibum hauptsächlich aus neutralen Lipiden wie Wachsester, Cholesterinestern, freiem Cholesterin und Triacylglycerinen, sowie kleineren Mengen eher polarer Verbindungen, wie Phospholipiden und Sphingomyelinen (Tabelle 1). Die Eigenschaften, die das Meibum einzigartig machen, sind das Verhältnis der Lipidklassen untereinander, die extreme Länge der Fettsäureketten (bis C<sub>36</sub>), umfangreiche  $\omega$ -Hydroxylierung von Fettsäuren und Alkoholen und das Vorkommen komplexer Lipide mit mehreren Esterbindungen (23). Verschiedene Befunde und individuell verschiedene Zusammensetzungen wurden auch im gesunden Kollektiv beschrieben (69). Insbesondere der Anteil polarer Lipide, denen eine verbindende Eigenschaft zwischen wässriger Phase und Lipidphase des Tränenfilms zugeschrieben wird, wurde lange Zeit zu hoch eingestuft (67, 77, 78).

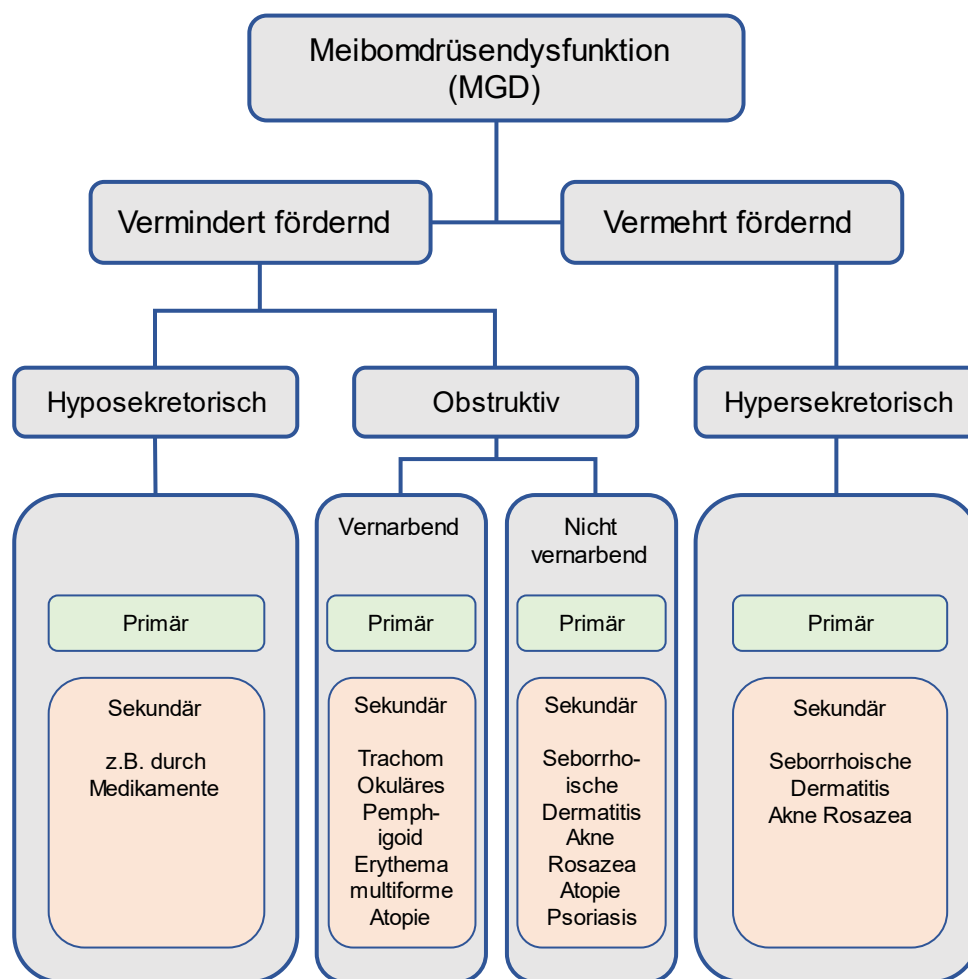
**Tabelle 1** Lipidzusammensetzung des Meiboms

<b>Bestandteile</b>	<b>Anteil am Lipidgemisch</b>
(O)-Acylated $\omega$ -hydroxy fatty acids (OAHFA)	1-5 %
Cholesterinester	30-40 %
Ceramide	In Spuren nachweisbar
Freies Cholesterin	< 0,5 %
Cholesterinester von OAHFA	3 %
Diacetylierte Diole	Nachweisbar, nicht quantifiziert
Freie Fettsäuren	~ 0,1-1 %
Phospholipide und Sphingomyeline	<< 0,1 %
Squalene	In Spuren
Glyceride	1 %
Wachsester	30-48 %

Quelle: Nach Butovich et al., 2017 (77)

### 2.2.3 Definition und Klassifikation der Meibomdrüsendysfunktion

Die aktuelle Definition des *TFOS-Workshops* zur MGD bezieht die Pathophysiologie der Meibomdrüsen und die klinische Manifestation der Symptome mit ein. Demzufolge ist die MGD eine chronisch, diffuse Abnormalität der Meibomdrüsen, gekennzeichnet durch eine Obstruktion des terminalen Ausführungsgangs der Meibomdrüsen und/oder eine qualitative oder quantitative Veränderung der Drüsensekretion. Dies kann zu Veränderungen des Tränenfilms, Irritationen und Entzündung der Augenoberfläche führen (12). Die Meibomdrüsendysfunktion ist ein Überbegriff für verschiedene Störungen der Meibomdrüsen. Die traditionelle Klassifikation beruht auf Unterschieden in der Sekretionsrate, wobei zwischen einer vermindert und einer vermehrt fördernden Form unterschieden wird (12). Die vermindert fördernde Form wird weiter in Hyposekretion der Meibomdrüsen oder obstruktive Formen (vernarbende oder nicht-vernarbende Form) unterteilt. Die vermehrt fördernde Form, die Hypersekretion, wird nicht weiter unterteilt. Bei jeder Entität werden außerdem primäre von sekundären Ursachen differenziert (12). Abbildung 3 zeigt die Einteilung der MGD.



**Abbildung 3** Einteilung der Meibomdrüsendysfunktion

Quelle: In Anlehnung an Nelson et al., 2011 (5)

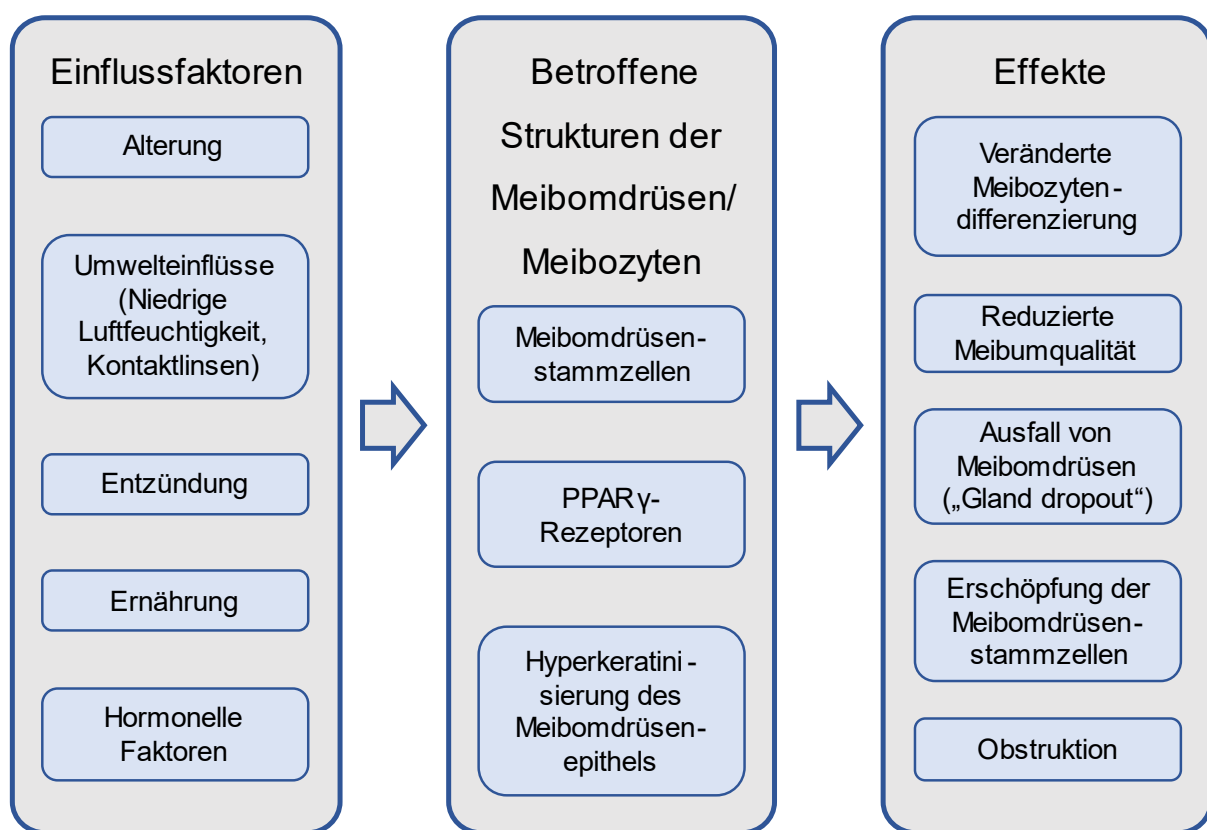
#### 2.2.4 Symptome und Klinik der Meibomdrüsendiffunktion

Meibomdrüsen haben eine entscheidende Aufgabe für den Tränenfilm und die Gesunderhaltung der Augenoberfläche. Der Funktionsverlust der Meibomdrüsen führt zu einer veränderten und reduzierten Lipidphase des Tränenfilms, einer erhöhten Tränenverdunstung und einer erhöhten Tränenfilmosmolarität (79). Dies bedingt Veränderungen der Augenoberfläche und einen instabilen Tränenfilm (80). Tritt eine MGD gemeinsam mit einer Entzündung auf, liegt bei Beteiligung des Lids eine Blepharitis und bei Beteiligung der Meibomdrüse eine Meibomitis vor (56). Da die MGD mit dem evaporativ trockenen Auge assoziiert ist, überschneiden sich viele Symptome der MGD mit denen der DED was eine eindeutige Unterscheidung erschwert (81). Ähnlich wie bei der DED, korrelieren die Zeichen der MGD häufig nicht mit der Symptomstärke. In populationsbasierten Studien zeigte sich, dass die meisten Patienten mit MGD sogar asymptomatisch sind (82, 83). Symptomatische Patienten klagen über ein schmerzhaftes Auge und Symptome des Trockenen Auges einschließlich Fremdkörpergefühl, Trockenheit, Juckreiz oder Lichtempfindlichkeit (12). Zu den vielfältigen klinischen Zeichen der MGD zählen Veränderungen der Lidmorphologie, abnorme Drüsensekretion, sowie eine fehlende Sichtbarkeit der Drüsen („gland dropout“) (81). Typische Untersuchungsbefunde der Spaltlampeuntersuchung sind verkrustete und verdickte Lidränder mit Teleangiectasien oder Hyperämie, eine veränderte Öffnungsposition und verstopfte Ausführungsgänge der Meibomdrüsen (56). Normales Meibum ist klar und leicht ausdrückbar, während bei der MGD ein trübes, granuläres und visköses Meibum vorliegt, das nur mit erheblichen Druck auf das Lid exprimiert werden kann (84).

#### 2.2.5 Pathophysiologie der Meibomdrüsendiffunktion - Stand der Forschung

Als die häufigste Form der MGD ist die verminderte Förderung aufgrund von Obstruktion beschrieben (15). Basierend auf klinischen Studien und verschiedenen Tierversuchen wird als zugrundeliegender Pathomechanismus eine Obstruktion der Meibomdrüsen durch Hyperkeratinisierung des Gangepithels vermutet (16-19). Verschiedene Faktoren, die eine Hyperkeratinisierung induzieren, wie beispielsweise das proinflammatorische Zytokin IL-1 $\beta$ , wurden identifiziert (85). Die Hyperkeratinisierung führt zu einer Blockade der Meibomdrüsenöffnung, einer Stase der Drüse mit konsekutiv zystischer Dilatation und schlussendlich zu einer Atrophie der Drüsenacini (3). Eine weitere Ursache für eine Verstopfung der Ausführungsgänge der Meibomdrüsen kann eine veränderte Lipidzusammensetzung des Meibums darstellen. Ein erhöhter Schmelzpunkt und eine damit einhergehend gesteigerte Viskosität des Meibums bedingt eine erschwerte Sekretion (86). In neueren Studien werden zusätzlich alternative Wege der reduzierten Drüsenfunktion diskutiert, nachdem in verschiedenen Untersuchungsmodellen keine Hyperkeratinisierung des Gangepithels als Ausgang einer Drüsenatrophie und einer MGD festzustellen war (21, 22). Neue Ansätze zur Erklärung der Pathophysiologie der MGD

konzentrieren sich auf die zelluläre Ebene, die Meibozyten. In Human- und Mausmodellen wurden Risikofaktoren und spezifische altersabhängige und umweltbedingte Veränderungen der Meibomdrüsenstammzellen und Meibozytendifferenzierung identifiziert, die die Funktion der Meibomdrüsen wesentlich verändern. Dazu zählen eine verminderte Proliferation von Azinuszellen, eine Drüsenatrophie und eine veränderte Expression und Lokalisation des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors (PPAR $\gamma$ ) (28, 29). Über die molekularen Wege der Steuerung der Meibozytendifferenzierung, wie beispielsweise über PPAR $\gamma$  ist jedoch aktuell nur wenig bekannt (87). Abbildung 4 gibt einen Überblick über die aktuelle Forschung nach möglichen Faktoren, deren vermutete Auswirkungen auf die Meibozyten und deren Effekte in der Pathogenese der MGD.



**Abbildung 4** Mögliche Einflussfaktoren und ihre Effekte in der Pathogenese der MGD

Quelle: Modifiziert nach Hwang et al., 2017 (87)

#### 2.2.5.1 Alterungsprozesse

Das Alter ist ein bekannter Risikofaktor für die Entwicklung einer MGD (2). Neben einer im Alter signifikant ansteigenden Prävalenz der MGD konnten insbesondere bei Patienten ab 50 Jahren Veränderungen des Lidrandes, der Meibomdrüsen, der Augenoberfläche und der Tränenfunktion erhoben werden. Bei jüngeren Patienten wurden hingegen kaum Veränderungen festgestellt (88, 89). Mit zunehmendem Alter atrophieren die Meibomdrüsenazini und produzieren weniger Lipide (3). Sullivan et al. zeigten mittels Massenspektroskopie ein verändertes



Lipidprofil des Meibums mit veränderten nichtpolaren und polaren Lipidprofilen bei älteren Personen (90). Die klinische Bedeutung und die Frage, ob die Veränderungen direkt auf das Altern der Meibomdrüsen zurückzuführen sind oder in Zusammenhang mit biologischen Veränderungen im Alter (z.B. ein Rückgang der Sexualhormonspiegel) stehen, ist Gegenstand aktueller Forschung (2). Neuere Erkenntnisse aus Human- und Mausmodellen legen nahe, dass den altersabhängigen Veränderungen der Meibomdrüsen eine verringerte Meibozytendifferenzierung, eine reduzierte Zellteilung der Meibozyten und damit Erneuerung der Meibomdrüsenzellen, eine verringerte Größe der Meibomdrüsen und eine verstärkte Infiltration von Entzündungszellen zugrunde liegen (24, 87). Auf zellulärer Ebene wurde unter anderem ein deutlicher Rückgang der Expression der Natrium-Kalium-ATPase in gealterten Meibomdrüsen festgestellt (91). Nien et al. untersuchten Augenlider von Patienten im Alter zwischen 18-95 Jahren durch immunhistochemische Färbungen des Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptor (PPAR $\gamma$ ) zur Darstellung der Meibozytendifferenzierung, um altersbedingte Veränderungen der Meibomdrüsen zu identifizieren (24). Der PPAR $\gamma$ -Rezeptor gehört zu einer Rezeptorgruppe, die maßgeblich an der Regulation von Zelldifferenzierung, Zellwachstum und Genexpression von Genen der Lipogenese beteiligt ist (92). Sie werden ubiquitär in verschiedenen Geweben exprimiert und finden sich auch in Adipozyten und Sebozyten wieder (93). Dabei zeigte sich bei der PPAR $\gamma$ -Antikörperfärbung bei jüngeren Patienten eine Lokalisation des Rezeptors im Zellkern und im Zytoplasma. Dementgegen waren bei Proben älterer Patienten die PPAR $\gamma$ -Rezeptoren überwiegend im Zellkern und nur bei den Basalzellen der Meibomdrüsenazini auch im Zytoplasma exprimiert. Antikörperfärbungen des nukleären Antigens Ki67 als Marker der Zellteilungsaktivität und des Proliferationspotentials zeigten eine signifikant höhere Zahl Ki67-positiver und damit aktiver Zellen bei jüngeren im Vergleich zu älteren Patienten (24). Entgegengesetzt zeigte sich eine Zunahme inflammatorischer Zellen (CD45-positive Zellen) in Meibomdrüsen im älteren Kollektiv (24). Vergleichbare altersassoziierte Veränderungen der PPAR $\gamma$ -Expression zeigten sich auch im Mausmodell (28). Jester et al. bestätigten mittels Western-Blotting des PPAR $\gamma$ -Rezeptorproteins von jungen und älteren Mäusen die immunzytochemischen Befunde der abnehmenden PPAR $\gamma$ -Expression im Alter (29). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Entwicklung einer MGD im Alter mit einer herabregulierten PPAR $\gamma$ -Signalübertragung, verminderter Meibozytendifferenzierung und Lipidsynthese sowie einem Verlust der Stammzellerneuerung der Meibozyten einhergeht (87). Atrophierte und hyposekretorische Meibomdrüsen könnten als Folge dieser Veränderungen betrachtet werden (30, 87).

#### 2.2.5.2 Umwelteinflüsse

Umweltfaktoren tragen ebenfalls zur Entwicklung einer MGD bei (12). Kontaktlinsen gelten seit langem als Risikofaktor der MGD (11, 19). Auch verlängerte Blinzel-Intervalle bei der Bildschirmnutzung oder beim Lesen haben einen Einfluss auf die Meibomdrüsen, wie eine signifikant erhöhte Prävalenz der MGD bei Arbeitern an Bildschirmen gegenüber

Vergleichspersonen zeigte (94). Darüber hinaus beeinflusst eine Umgebung mit niedriger Luftfeuchtigkeit die Funktion der Meibomdrüsen (95). Am Mausmodell beobachteten Suhaim et al. einen deutlichen Anstieg der basalen Meibomdrüsenzellproliferation unter Exposition in einer das Auge austrocknender Umgebung (96). Die Proliferationszunahme deutet auf eine verstärkte Meibozytenerneuerung hin, die im Rahmen des holokrinen Sekretionsmechanismus zerfallen, um Meibum freizusetzen. Erweiterte Drüsengänge deuten ebenfalls auf eine erhöhte Sekretion hin (87). Daneben löste Umweltstress in Form von Austrocknung eine Veränderung des Protein-Lipid-Verhältnisses des Meibums aus (96). Während physiologisch der Proteingehalt des Meibum durch eine Art Reifungsprozess bei der Sekretion vom Azinus hin zur Drüsenöffnung abnimmt, zeigte sich unter provozierter Austrocknung eine gestörte Reifung mit einem erhöhten Proteinanteil im Meibum (87, 96). Dieser könnte sich negativ auf die Lipidfluidität und damit auf die Stabilität des Tränenfilms auswirken, wie Untersuchungen zur Interaktion zwischen Proteinen und Tränenfilm nahelegen (97). Diese Beobachtungen zeigen den direkten Einfluss von Umweltfaktoren auf die Meibomdrüsenfunktion in Bezug auf Proliferation der basalen Azinuszellen, Meibozytendifferenzierung und Lipidsynthese (96). Kontinuierliche oder wiederholte Exposition kann möglicherweise zu einer Erschöpfung der Meibozytenstammzellen und damit zu einer frühzeitigen MGD beziehungsweise Alterung und Atrophie der Meibomdrüsen führen (87).

#### 2.2.5.3 Hormonelle Einflüsse

Sexualhormone haben eine wichtige Funktion in der Regulation von Meibomdrüsen und Meibozyten. Androgenrezeptoren und Enzyme des Androgenmetabolismus, wie die 5- $\alpha$ -Reduktase, sind in den Zellkernen von Meibozyten sowohl bei Menschen als auch bei verschiedenen Tierspezies nachgewiesen (98, 99). Insbesondere Androgene stellten sich als relevant für die Regulation der Meibomdrüsen heraus (100). Im Maus und Kaninchenmodell führte ein Mangel an Androgenen zu einer MGD, zu veränderten Lipidprofilen im Meibum, einer Instabilität des Tränenfilms und zu einem trockenen Auge durch Evaporation (100). Klinische Beobachtungen bei Männern unter antiandrogener (z.B. androgendeprivierender Therapie des Prostatakarzinoms) zeigten Meibomdrüsenveränderungen und ein funktionell trockenes Auge (100). Auch bei anderen androgenarmen Zuständen, wie bei Personen mit kompletter Androgeninsensitivität und beim Sjögren-Syndrom, wurden eine MGD und Veränderungen der Lipidmuster des Meibums beobachtet (100). *In vitro* hatten Androgene an immortalisierten humanen Meibomdrüsenepithelzellen Auswirkungen auf mehrere tausend Gene (25). Neben Androgenrezeptoren wurden auch Östrogenrezeptoren in Meibozyten nachgewiesen, die ebenfalls an der Regulation der Meibomdrüsen beteiligt sind (101). Dies bestätigen beobachtbare Veränderungen an Meibomdrüsen bei prämenopausalen Frauen während des Menstruationszyklus und erhöhte Inzidenzen des Trockenen Auges bei Frauen unter postmenopausaler Östrogentherapie (102, 103). Allgemein scheinen Androgene die Meibumsekretion sowie Drüsenfunktion zu

fördern und eine Entzündung zu unterdrücken, während Östrogenen eine entzündungsverstärkende Wirkung zugeschrieben wird (104).

#### 2.2.5.4 Veränderung der Meibomdrüsenstammzellen

Der holokrine Sekretionsmechanismus der Meibomdrüsen erfordert eine langfristige Proliferationskapazität und Selbsterneuerung der Meibozyten durch Meibomdrüsenstammzellen (3). Daher spielt in der Pathogenese der MGD die Erschöpfung der Meibomdrüsenstammzellen durch die beschriebenen Alterungsprozesse, Umwelteinflüsse und weitere Mechanismen eine entscheidende Rolle (105). Eine Erschöpfung der Proliferationskapazität der Meibomdrüsenstammzellen führt zu einem Verlust der azinären Meibozyten und einer Atrophie der Meibomdrüsen. Die Charakterisierung und Lage der Meibomdrüsenstammzellen, die für den Turnover der Meibozyten und die Sekretion des Meibums elementar sind, ist noch nicht abschließend geklärt (106, 107). Einige Studien vermuten eine Lage der Stammzellen entlang des zentralen Ductus, ähnlich wie bei Stammzellen des Haarfollikels (106). Neuste Untersuchungen lokalisieren sie am Übergang der duktafen zu den azinären Basalzellen (107, 108). Darüber hinaus wurden für die verschiedenen Abschnitte der Meibomdrüsen unterschiedliche Stammzellen gefunden (109). Die Drüsenacini stammen demnach von einer einzigen Stammzelle ab, während die Drüsengänge von Vorläuferzellen unterschiedlicher Herkunft abstammen (109). Ist die Stammzelle eines Drüsenacinus erschöpft, ist ein Verlust einzelner Azini und ein Ausfall der Meibomdrüse möglich, wie bei der MGD klinisch zu beobachten ist (87).

#### 2.2.5.5 Weitere Risikofaktoren der Meibomdrüsendysfunktion

Neben den beschriebenen Einflüssen existieren noch weitere Risikofaktoren, die mit der Entwicklung einer MGD assoziiert sind (2). Dazu gehören ophthalmologische Befunde wie eine Aniridie (110), eine Ichthyosis (111) und das Trachom (112), die die Funktion der Meibomdrüsen wesentlich beeinflussen können. Auch neurogene Faktoren der reichlich innervierten Meibomdrüsen werden in der Pathophysiologie der MGD diskutiert (113). Zusätzlich können Störungen des Fettstoffwechsels (u.a. Dyslipidämien) und diätetische Faktoren, wie eine fettarme Ernährung, die Differenzierung der Meibomdrüsen beeinflussen (114, 115). So entwickelten Mäuse, die eine spezielle Ernährung mit geringem Lipidanteil erhielten, eine MGD (114). Deutliche Auswirkungen auf die Meibomdrüsenfunktion konnten auch im Rahmen von Entzündungen und Allergien beobachtet werden (116). Die Anwendung verschiedener systemischer Medikamente, wie beispielsweise Isotretinoin (117), und topischer Medikamente, wie zum Beispiel topische  $\beta$ -Blocker in der Glaukomtherapie (118), wurden als Risikofaktoren für die Atrophie von Meibomdrüsen und die Entwicklung einer MGD identifiziert. Nicht zuletzt sind angeborene Störungen und Verminderungen der Meibomdrüsen beschrieben (119).

## 2.3 Modelle zur Untersuchung der Meibomdrüsendiffunktion

In Anbetracht der Bedeutung der MGD als Hauptursache der DED, und spätestens seit dem *TFOS-Workshop* zur MGD im Jahr 2011, ist das Interesse an der Erforschung der MGD stark gestiegen (12). Aktuell gibt es immer noch keine wirksame kausale Therapie der MGD, sondern überwiegend supportive Maßnahmen. Zum Verständnis der Physiologie und Pathologie der Meibomdrüsen und Meibomdrüsenzellen, sowie für die Entwicklung von Therapieansätzen zur Behandlung oder zur Prävention der MGD stellen Forschungsmodelle ein geeignetes Mittel dar. Nach wie vor fehlen für die Untersuchung der MGD geeignete *in vivo*- und *in vitro*-Modelle.

Der Großteil des heute verfügbaren Wissens über die Entwicklung, die Anatomie, die Physiologie und die Regulation der Meibomdrüsen, die Zusammensetzung und Lipidprofile des Meibums, sowie die Entstehung einer MGD, stammt aus diversen *in vivo*-Modellen. Neben Kaninchen- und Hundemodellen ermöglichten insbesondere Mausmodelle die Identifizierung möglicher Risikofaktoren und Signalwege, die in Zusammenhang mit der MGD stehen könnten (13, 120). Allein zwischen 2000 und 2023 finden sich über 27 beschriebene Tiermodelle zur Erforschung der MGD in der Literatur (13). Neben den Tiermodellen sind auch wenige *in vitro*-Modelle, eine humane (121), eine murine (29) und eine vom Kaninchen stammende Zelllinie (120) als Untersuchungsmodelle zur Charakterisierung und Erforschung der Pathophysiologie der MGD, etabliert worden. Außer in der Vorbereitung für die Etablierung einer immortalisierten humanen Zelllinie (121) fand eine humane primäre Meibomdrüsenepithelzellkultur noch keinen Einzug in die Forschung der MGD. Folglich steht bisher keine umfängliche primäre Zellkultur humaner Meibomdrüsenepithelzellen zur Verfügung. Daneben existiert eine weitere primäre Meibomdrüsenzellkultur, die Zhang et al. für die Untersuchung des Meibomdrüsenkarzinoms etablierten (122). Mit Hilfe von Primärkulturen aus Überschussgewebe humaner Meibomdrüsenkarzinomzellen und Meibomdrüsenzellen verglichen sie das Zellwachstum. Dabei konnte die erste Passage der Karzinomzellen bereits am 14. Tag erfolgen, die der Meibomdrüsenzellen nach drei Wochen (122). Für beide Zellkulturen konnten Zytokeratine, Androgenrezeptoren und Lipide (mittels Oil Red O Färbung) nachgewiesen werden, wobei die Lipidexpression der Meibomdrüsenkarzinomzellen gegenüber den Meibomdrüsenzellen reduziert war (122). In einem weiteren Ansatz untersuchten Rötzer et al. an einem *ex vivo in vitro*-Modell die Bedeutung und Regulierung der Zellkohäsion von Meibomdrüsenzellen durch Desmogleine und Cadherine (123). Dazu entwickelten sie ein Kulturmodell aus Schnitten von in Agarose eingebetteten und kultivierten Tarsalplatten (123).

### 2.3.1 Primärzellkulturen und Zelllinien als *in vitro*-Modelle

Primärzellkulturen entstehen durch Kultivierung von direkt aus dem Gewebe entnommenen Zellen unter optimalen Bedingungen. Die primären Zellen entsprechen damit am ehesten dem Ursprungsgewebe. Sie werden nicht modifiziert und weisen eine dem *in vivo*-Zustand ähnliche

Physiologie auf. Aus diesem Grund stellen sie äußerst relevante Modellsysteme für die Grundlagenforschung, wie beispielsweise zur Untersuchung der Wirkung von Metaboliten, Wachstumsfaktoren und Stimulantien auf die Zellen dar (124). Allerdings gestaltet sich die Kultivierung und die Vermehrung primärer Säugetierzellen aufgrund von Alterungsprozessen und Veränderungen genetischer Merkmale von Populationsgeneration zu Populationsgeneration als schwierig (125). Neben der Etablierung optimaler und reproduzierbarer Kulturbedingungen stellt das begrenzte Wachstumspotential primärer Zellen eine große Herausforderung dar. Beispielsweise gelang die Kultivierung primärer Sebozyten der Haut, die den Meibozysten ähneln, aus *Explantatgewebe* nur bis zur dritten Passage (126). Liu et al. gelang, in Vorarbeiten für eine immortalisierte Zelllinie humaner Meibozysten, nach Vorverdau und durch Dispersion der Zellen die Kultivierung einer Primärzellkultur aus Meibozysten bis zur fünften Passage (121). Zelldifferenzierung und Seneszenz der primären Zellen limitieren die Lebensdauer der Primärkultur (124). Zu der begrenzten Proliferationsfähigkeit kommt eine je nach Gewebe oft sehr begrenzte Menge an verfügbarem Gewebe hinzu (121). Eine nicht vermeidbare Variabilität der primären Zellen, abhängig von den jeweiligen Spendern, erschwert zudem direkte Vergleiche (124).

Primäre Zellen können durch genetische Veränderungen in einem *in vitro*-Prozess, der Transformation, in langlebige, sich unbegrenzt teilende Zelllinien transformiert werden (127). Die Immortalisierung von Zellen und Etablierung von Zelllinien erfordert die Umgehung zellulärer Checkpoints und Kontrollstufen der Zellalterung. Die Methoden zu genetischen Veränderungen während der Transformation adressieren im Wesentlichen zwei zelluläre Mortalitätsstufen (128-130). Die Mortalitätsstufe M1, die replikative Seneszenz, beinhaltet pRB- und/oder p53-Checkpoint-Signalwege. Virale Onkogene, wie das SV40 large T-antigen, können diese umgehen und verleihen Zellen eine längere Lebensspanne (131, 132). Die zweite Mortalitätsstufe M2 unterliegt der Telomerlänge. In den meisten somatischen Zellen des Menschen ist jede Zellteilung mit dem Verlust von 50 bis 200 bp endständiger, nichtcodierender DNA (Telomere) verbunden (133). Bei Unterschreiten einer kritischen Telomerlänge ist eine weitere Zellteilung nicht möglich. Die Zellen verlassen den Zellzyklus und treten in das M2 Stadium, auch Zellkrise („crisis“), ein und sterben ab (133). Die Infektion somatischer Zellen mit retroviraler humaner Telomerase reverse Transkriptase (hTERT) führt zur Aktivierung der Telomerase, einem Ribonukleoprotein, und verhindert den Abbau der Telomere und die anschließende telomerabhängige Seneszenz (134, 135). Trotz des längeren Zellüberlebens, der leichteren Handhabung und der größeren Vergleichbarkeit durch einheitliche Zellen limitieren abweichende Differenzierungen und eine Veränderung des genetischen Profils (121, 136) die Übertragbarkeit von Forschungserkenntnissen der Zelllinie auf die Physiologie *in vivo*. Primärzellen können daher bei der Identifizierung von *in vivo* entscheidenden Zelleigenschaften und möglicher Einflussfaktoren auf den Zellstoffwechsel dienen. Zelllinien ermöglichen hingegen durch ihre

größere Verfügbarkeit, Homogenität und bessere Charakterisierung mehr experimentelle Möglichkeiten und eine genauere Beschreibung zellulärer Signalwege.

### 2.3.2 Aktueller Forschungsstand von *in vitro*-Modellen zur Meibomdrüsendiffunktion

Bisher wurden nur wenige *in vitro*-Modelle verschiedener Ursprungsgewebe zur Erforschung der MGD genutzt. Bereits 1992 erforschten Maskin et al. an einer primären Meibomdrüsenepithelzellkultur aus Meibomdrüsen von Kaninchen das Wachstum und die Differenzierung der Meibomdrüsenepithelzellen in serumfreiem Medium sowie den Einfluss von EGF (epidermal growth factor) und FGF (fibroblast growth factor) auf die Differenzierung (137). Zum genaueren Verständnis der Meibomdrüsenphysiologie und insbesondere zur Erforschung des Ionen- und Flüssigkeittransportes der Meibomdrüsen etablierten Dongfang et al. primäre Zellkultursysteme aus Gewebe von Ratten (138). Die Zellkultur nutzte Feeder-Zellen (immortalisierte Mäusefibroblasten) als Wachstumsunterlage und extrazelluläre Matrix, um optimale Bedingungen für die anspruchsvolle Kultivierung der Meibomdrüsenzellen zu schaffen (138). Die Proliferation wurde durch Einsatz des spezifischen ROCK-Inhibitors Y-27632 gefördert (138). Mittels Real-Time PCR, In-situ-Hybridisierung und Immunfluoreszenz konnte die Expression und Lokalisation von Natrium-, Kalium- und Chloridkanälen sowie von Cotransportern in Meibomdrüsenzellen untersucht werden, die für die Sekretion und den Flüssigkeittransport der Meibomdrüsenzellen von großer Bedeutung sind (138). Xu et al. etablierten 2019 eine Primärkultur von Meibomdrüsenepithelzellen der Maus (85). Dazu kultivierten sie entnommene Meibomdrüsenepithelzellen aus Tarsusgewebe nach vorheriger Präparation und enzymatischer Vorbehandlung (85). Der Einfluss verschiedener Kulturmedien mit oder ohne Serum oder Azithromycin und eine Stimulation mit dem pro-inflammatorischen Zytokin IL-1 $\beta$  wurde an der Primärkultur untersucht (85). In diesem *in vitro*-Modell zeigte sich eine Zunahme der Lipidakkumulation und der PPAR $\gamma$ -Expression unter serum- oder azithromycinhaltigen Medien (85). IL-1 $\beta$  induzierte eine Überexpression von Keratin 1 (85). Damit konnte ein wichtiger Pathomechanismus der MGD an der Zellkultur, die Hyperkeratinisierung von Meibomdrüsenengängen, *in vitro* nachgewiesen werden. Anhand einer primären Meibomdrüsenepithelzellkultur von Kaninchen analysierten Rho et al. im Jahr 2022 die Expression der Acyl-CoA-Wachs-Alkohol-Acyltransferase 2 (AWAT2), ein für die Meibumsynthese essenzielles Enzym. Um die Kontrolle der AWAT2-Expression zu untersuchen, verglichen sie die Expression von AWAT2 in Meibomdrüsen von Mensch und Kaninchen sowie in der Zelllinie der HMGEC und in kultivierten Kaninchen-Meibozyten (120). Dafür wurden Meibozytenstammzellen von Kaninchen in einem Proliferationsmedium (Cnt-BM.1-Basalmedium) mit verschiedenen Wachstumsfaktoren und dem ROCK-Inhibitor Y-27632 kultiviert und passagiert. Mittels RNA- und Proteinanalyse wurde die AWAT2-Expression verglichen. Die AWAT2-RNA wurde im menschlichen Gewebe sowie im Kaninchengewebe stark exprimiert, nahm jedoch in der primären Kaninchen-

Meibomdrüsenepithelzellkultur deutlich ab. Für HMGECs konnte keine Expression nachgewiesen werden (120).

Neben den beschriebenen Explantatkulturen wurde auch an Zelllinien zur MGD geforscht. Durch Integration des lentiviralen SV40-Vektors in Meibozyten von 2 Monate und 2 Jahre alten Mäusen immortalisierten Jester et al. murine Meibozyten (29). Das definierte Alter der Mäuse erlaubte Rückschlüsse auf den Einfluss des Alters auf die Lipidsynthese und die Lokalisation von PPAR $\gamma$  in Meibozyten (29). Außerdem wurden die Auswirkungen einer Stimulation mit dem PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon auf die Lipidsynthese, die PPAR $\gamma$ -Lokalisierung und die Induktion von PPAR $\gamma$ -Reaktionsgenen an der Zelllinie untersucht (29). Daneben etablierten Liu et al. die bis heute einzige humanen Meibomdrüsenepithelzelllinie (HMGEC) durch Infektion primärer Meibozyten mit hTERT (121). Die Zelllinie der HMGEC ist die am weitesten verbreitete, am ausführlichsten charakterisierte und am universellsten erforschte Zelllinie zur MGD.

### 2.3.3 Die humane Meibomdrüsenepithelzelllinie (HMGEC)

Bereits im Jahr 2010 etablierten Liu et al. die bis heute einzige verfügbare Zelllinie humaner Meibomdrüsenepithelzellen (121). Diese beruht auf Meibomdrüsenepithelzellen eines einzelnen Spenders, einem 58-jährigen Mann (121). Aus Überschussmaterial von Patienten nach einer Augenlidoperation kultivierten sie Meibomdrüsenzellen von 5 Frauen und 4 Männern im Alter von 32 bis 85 Jahren, um eine primäre Zellkultur als Zellreservoir für die Immortalisierung zu gewinnen (121). Dazu präparierten sie die Tarsi aus den Augenlidern, behandelten diese enzymatisch vor (mit 0,25 % Kollagenase und Dispase II), um anschließend die Einzeldrüsen unter einem Seziernmikroskop zu isolieren (121). Die Meibomdrüsenepithelzellen wurden daraufhin dissoziiert und als Einzelzellen suspendiert (121). In serumfreiem Keratinozytenmedium wurden die Meibomdrüsenepithelzellen für 10 bis 12 Tage kultiviert und anschließend passagiert. Liu et al. gelang maximal eine Kultivierung der primären Meibomdrüsenepithelzellen bis zur 5. Passage (121). Die Immortalisierung einer humanen Meibomdrüsenepithelzelllinie gelang aus der ersten Passage primärer Meibomdrüsenepithelzellen eines 58-jährigen Mannes durch Infektion mit hTERT zur Umgehung zellulärer Checkpoints der Zellalterung (121). Liu et al. zeigten für humane Meibomdrüsenepithelzellen, dass eine alleinige Umgehung der Mortalitätsstufe M1 durch SV40 large T-antigen zu einem längeren Zellüberleben ohne Immortalisierung führte (121). Der gleichzeitige Einsatz von SV40 large T-antigen und hTERT führte zur Immortalisierung der Zellen, allerdings auch zum Auftreten von ausgeprägten Chromosomenaberrationen. Meibomdrüsenepithelzellen, die allein mit hTERT infiziert wurden, behielten ihre ursprüngliche Zellmorphologie und die Fähigkeit Lipide zu akkumulieren bei, zeigten eine wesentlich kürzere Populationsverdopplungszeit gegenüber den primären Meibomdrüsenzellen und behielten ihren normalen Karyotyp über 23 Passagen (121). Damit verfügt

die HMGEC-Zelllinie über wichtige Eigenschaften, die sie zu einem nützlichen *in vitro*-Forschungsmodell der MGD machen. Einige der bekannten Einflussfaktoren in der Pathophysiologie der MGD und molekulare Signalwege, wie die PPAR $\gamma$ -Signalübertragung, sowie Therapieansätze wurden an den HMGECs untersucht.

#### 2.3.4 Charakterisierung und Proliferation der HMGEC

Von großer Bedeutung für die Zelllinie der HMGECs sind die verschiedenen Kultivierungsbedingungen, welche die *in vivo*-Differenzierung der Meibomdrüsenzellen im Rahmen der holokrinen Sekretion nachbilden. Die zuvor beschriebene Entwicklung der Meibozyten von proliferierenden, nicht lipidproduzierenden Basalzellen hin zu nichtproliferierenden, aber lipidanreichernden und differenzierten Zellen (68) können HMGECs abhängig der Kulturbedingungen auch *in vitro* durchlaufen (121, 139). Werden die HMGECs in serumfreiem Keratinozyten Basalmedium (SFM) mit 5 ng/mL EGF und/oder 50  $\mu$ g/ml BPE (bovine pituitary extract) kultiviert, zeigt sich eine ausgeprägte Proliferation der HMGECs (139). Diese von Wachstumsfaktoren abhängigen Effekte gehen mit einer signifikant gesteigerten Expression von Genen, die mit dem Zellzyklus, der DNA-Replikation und den Ribosomen verbunden sind, einher (139). Demgegenüber steht eine Abnahme der Expression von Genen, die mit der Zelldifferenzierung, dem Lipidstoffwechsel und der PPAR $\gamma$ -Signalübertragung in Zusammenhang stehen (139). Soll stattdessen die Differenzierung der Meibozyten angeregt werden, eignet sich ein serumhaltiges Medium aus gleichen Anteilen Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) und Ham's F12 mit 10 % fetal bovine serum (FBS) und 10 ng/ml EGF (121, 139). Unter diesen Umständen wurde eine ausgeprägte Differenzierung mit gesteigerter Lipidakkumulation und Hochregulation von Genen zellulärer Komponenten, wie dem Golgi-Apparat, dem endoplasmatischen Retikulum und von Lysosomen, in HMGECs beobachtet (139). Die seruminduzierte Differenzierung reguliert zudem die Gene des Zellzyklus und der Proliferation herunter und verändert die Zusammensetzung und den Fettsäuregehalt enthaltener Lipide der Meibozyten (26). Damit durchlaufen die HMGECs ähnliche Differenzierungsschritte wie primäre Meibomdrüsenzellen (26). Die Lipidakkumulation und die Anreicherung der Lipidvesikel unter serumhaltigem Medium konnte durch Lipidfärbungen, wie LipidTOX und Sudan III, visualisiert werden (26, 121). Zudem ändert sich in serumhaltigem Medium die Zellmorphologie der HMGECs durch Ausbildung von Desmosomen und Zytokeratinfilamenten (140) sowie durch die Bildung von elektronenmikroskopisch sichtbaren Lamellarkörperchen, einer speziellen Art von lipidspeichernden Lysosomen (140, 141), die allerdings für eine für eine unphysiologische Phospholipidosis sprechen.



### 2.3.5 Die Bedeutung der HMGEC als *in vitro*-Modell zur Erforschung der Meibomdrüsendysfunktion

Die Lipidproduktion und die Differenzierung der HMGECs sind von großer Bedeutung für die Nutzbarkeit der Zelllinie als *in vitro*-Modell zur Erforschung der MGD. Verschiedene Kulturprotokolle wurden getestet, die darauf hinweisen, dass die Lipidproduktion und die Meibozytendifferenzierung der HMGECs *in vitro* durch exogene Faktoren moduliert werden können. Die Autoren berichten über eine Zunahme der Lipidproduktion unter Serum (121, 139), eine Akkumulation von kleinen lipidenthaltenden Vesikeln unter Zugabe von Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren (142, 143), eine Stimulation der Lipidproduktion unter Insulin (144), eine erhöhte Lipidanreicherung und Expression von Cholesterinestern und Triacylglycerinen unter Insulin-like growth factor (IGF)-1 (145) alleine und zusätzlich von einer erhöhten Phospholipidkonzentration in Kombination mit Azithromycin (146-148). Auch die Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen zeigte eine Zunahme an Lipidvesikeln und deren Gehalt an neutralen Lipiden (149). Begleitend wurden in mRNA-Analysen Veränderungen von Genen verschiedener Signalwege, unter anderem des Januskinase (JAK)-Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT)-Signalwegs, des mammalian target of rapamycin (mTOR), des Wnt und des PPAR-Signalwegs festgestellt, allerdings ohne sie im Detail zu untersuchen (25, 26). Darüber hinaus scheint die Notch-Signalübertragung eine wichtige Rolle bei der Meibozytendifferenzierung und Lipidproduktion zu spielen (150).

Trotz der Identifizierung zahlreicher exogener Faktoren, die die Regulation der HMGEC beeinflussen, entspricht die in HMGECs nachgewiesene Lipidzusammensetzung nicht der des menschlichen Meibums (140, 148, 151). Eine reine Induktion der Lipidproduktion in HMGECs *in vitro* ist daher nicht als äquivalent zur Bildung von Meibum *in vivo* zu betrachten (23). In mit Serum stimulierten HMGECs konnten hauptsächlich Phospholipide (55 %), freies Cholesterin (29 %) und Cholesterinester (4,3 %) nachgewiesen werden, jedoch kaum Wachsester (0,4 %) und keine Meibom-charakteristischen  $\omega$ -hydroxylierten Fettsäuren (140). Dementgegen sind Wachsester (30-48 %) und Cholesterinester (30-40 %) der Hauptbestandteil im Meibum, während Phospholipide (< 0,1 %) einen verschwindend geringen Anteil einnehmen (77). Als eine Ursache konnte die fehlende Expression von für die Meibum-Wachsester-Synthese essenzieller Enzyme, wie die AWAT2 identifiziert werden (120). Die fehlende Expression dieser Enzyme in immortalisierten humanen Meibomdrüsenepithelzellen (HMGEC) in Kultur bedingt die veränderte Lipidzusammensetzung des Meibums (120). Faktoren, die zu einer Lipidexpression führen, die der des humanen Meibums ähnlicher sind wurden erforscht. So veränderte die Behandlung mit Prostaglandinen das Lipidprofil nur gering (152). Als vielversprechend stellte sich eine Kultivierung mit dem PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon heraus (153). Das führte zu einem Lipidprofil der HMGECs, das dem normalen humanem Lipidprofil des Meibum ähnlicher ist (154). Auch der Einfluss von Sexualhormonen, die mit der Entwicklung einer MGD assoziiert

sind, wurde an HMGECs untersucht. Androgene wirkten sich auf über 3.000 Gene der HMGECs aus, darunter auch auf Wnt- und PPAR $\gamma$ -Signalwege (25). Schröder et al. wiesen mittels Western Blot Androgenrezeptoren, die Östrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  und Progesteronrezeptoren in HMGECs nach (155). Die Expression dieser Sexualhormonrezeptoren wurde durch die Kultivierung in serumhaltigem Medium signifikant induziert (155). Eine direkte Stimulation mit Sexualhormonen zeigte keine weiteren Auswirkungen auf die Proteinexpression der Sexualhormonrezeptoren (155). Auch eine Stimulation der HMGECs mit den MGD assoziierten Sexualhormonen zeigte keinen Einfluss auf die Lipidproduktion oder die Zellmorphologie (155). Nur die Zellproliferation und die Expression von Keratinisierungsgenen, wie beispielsweise Hornerin und Cornulin, wurden nach der Gabe von Sexualhormonen und Kalzium in serumfrei kultivierten HMGECs induziert (155). Dieser Mechanismus könnte an einer MGD durch Hyperkeratinisierung mit folgender Obstruktion beteiligt sein (155). In neueren Studien konnte allerdings ein indirekter Einfluss von Androgenen auf die HMGECs beobachtet werden. So führt die Behandlung mit Agonisten des Androgenrezeptors über eine Aktivierung des Proteinkinase A Signalwegs zu einer erhöhten PPAR $\gamma$ -Expression, die wiederum mit einer gesteigerten Lipidsynthese in Verbindung steht (156).

Die HMGECs, als *in vitro*-Modell der MGD, wurden bereits für einige Forschungsfragen der MGD verwendet. So wurden Risikofaktoren der MGD getestet und Auswirkungen bestimmter Medikamente beobachtet. Beispiele sind die Behandlung der HMGECs mit gebräuchlichen Konservierungsstoffen aus Kosmetika wie Methylparaben, Ethylparaben oder Phenoxyethanol (157). Diese führten, auch bei geringeren als für den Menschen zugelassenen Dosierungen, zu Atrophie und Zelltod der HMGECs (157). Das Medikament Terpinen-4-ol, ein potentes Mittel gegen Demodex-Milben, verursachte eine dosis- und zeitabhängige Abnahme des Zellüberlebens von HMGECs (158). Ebenso kann die Langzeitanwendung von topischen anti-glaukomatösen Medikamenten, wie die des Karboanhydraseinhibitors Dorzolamid, zu einer MGD führen (159).

Auch wenn die Zelllinie der HMGECs als *in vitro*-Modell der MGD bereits in verschiedenen Forschungsfragen erfolgreich eingesetzt wurde, spiegeln die immortalisierten HMGECs die Biologie von Meibomdrüsenepithelzellen *in vivo* nicht genau wider (155). Sowohl die von humanem Meibum abweichende Lipidzusammensetzung als auch der nur geringe Einfluss von Sexualhormonen auf die HMGECs im Gegensatz zu den Meibomdrüsenepithelzellen *in vivo*, geben Anlass zu dieser Bewertung. Nicht zuletzt scheint die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Allgemeinheit begrenzt, da die Etablierung der HMGEC aus einem einzelnen männlichen Spender erfolgte (121).

## 2.4 Einfluss von PPAR $\gamma$ -Agonisten auf Meibomdrüsenzellen

Die Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR) sind eine wichtige Untergruppe der nuklearen Hormonrezeptoren, die entscheidend an Vorgängen der Lipid- und Glukosehomöostase, der Kontrolle der Zellproliferation und der Differenzierung beteiligt sind (92). Als Teil dieser Gruppe ist der lipidaktivierte PPAR $\gamma$ -Rezeptor der bedeutendste Subtyp in Adipozyten, Sebozyten und nimmt auch in Meibozyten eine zentrale Position in der Regulation von Genen der Lipidsynthese, der Zelldifferenzierung und des Zellwachstum ein (87, 93). Auch in der Entwicklung und Differenzierung von Talg- sowie Meibomdrüsen spielt der PPAR $\gamma$  eine entscheidende Rolle (160). Neben den bereits beschriebenen altersabhängigen Veränderungen des PPAR $\gamma$ -Rezeptors, die zu der Entwicklung einer MGD beitragen können (24, 28), wurde der Einfluss verschiedener Agonisten des PPAR $\gamma$ -Rezeptors auf die Meibomdrüsen im Allgemeinen und deren Lipidsynthese im Speziellen untersucht. Als wichtigster PPAR $\gamma$ -Agonist etablierte sich in der Forschung der synthetische Agonist Rosiglitazon aus der Gruppe der Glitazone, einer Antidiabetikaklasse des Typ-2-Diabetes (161). Daneben fanden auch natürliche Liganden Anwendung. Im Tiermodell wurde der Einfluss des PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon an Apolipoprotein E Knockout (ApoE $^{-/-}$ ) Mäusen, die in der klinischen Untersuchung typische Zeichen einer MGD, wie „gland dropout“ und Abnormalitäten der Augenlider sowie eine Herunterregulierung der Expression von PPAR $\gamma$  in den Meibomdrüsenzellen aufwiesen, untersucht (162). Die Behandlung mit Rosiglitazon reduzierte die aufgetretenen Veränderungen im Rahmen der MGD (162). An immortalisierten murinen Meibomdrüsenepithelzelllinien junger (2 Monate) und alter (2 Jahre) Mäuse untersuchten Jester et al. den Einfluss von PPAR $\gamma$  auf die Differenzierung und die Lipidsynthese von Meibozyten (29). Die Auswirkungen einer Stimulation mit Rosiglitazon wurden an einem lipidsynthetisierenden Zellklon der Meibomdrüsenepithelzelllinie getestet (29). Dafür wurden die Meibomdrüsenzellen mit 10  $\mu\text{mol/l}$ , 20  $\mu\text{mol/l}$  oder 50  $\mu\text{mol/l}$  Rosiglitazon für 1 bis 7 Tage behandelt und die Einflüsse auf die Lipidsynthese, die Lokalisierung von PPAR $\gamma$ -Rezeptoren im Nukleus und im Zytoplasma der Zelle und die Expression von Genen, die mit PPAR $\gamma$ -Signalwegen in Verbindung stehen, untersucht (29). Dabei zeigte sich unter Rosiglitazon eine signifikante zeit- und dosisabhängige Induktion der Lipidsynthese bis auf etwa das 10-fache der Lipidwerte im Vergleich zu den Ausgangswerten (29). Mittels Western Blot wurde ein signifikanter und ebenfalls dosisabhängiger Anstieg der zytoplasmatischen Expression von PPAR $\gamma$  nach 7-tägiger Stimulation mit Rosiglitazon im Vergleich zur Kontrolle ohne Stimulation registriert (29). Zusätzlich wurden posttranslational Modifizierungen in Form von Sumoylierungen der 72 kDa-PPAR $\gamma$ -Bande festgestellt (29). Bei Stimulation mit hohen Rosiglitazonkonzentrationen (50  $\mu\text{mol/l}$ ) zeigte sich ebenfalls eine erhöhte Expression von Genen des Lipidstoffwechsels wie PPAR $\gamma$ , Adiponectin und ADFP (adipocyte differentiation-related protein) in der mRNA der Meibozyten (29).

Der Einfluss von PPAR $\gamma$  auf die Meibozytendifferenzierung und die Lipidsynthese wurde auch an HMGECs untersucht. Die Kultivierung mit Rosiglitazon für 1 bis 6 Tage in Konzentrationen zwischen 10-50  $\mu\text{mol/l}$  induzierte den Austritt der Meibozyten aus dem Zellzyklus wie eine signifikante, dosisabhängige Reduktion der Ki67-Färbung, einem Marker für aktiven Zellzyklus, innerhalb von 2 Tagen nach Rosiglitazonbehandlung demonstrierte (31). Zusätzlich führte Rosiglitazon zu einer mittels LipidTOX, Oil Red O und anderen Färbungen nachgewiesenen signifikant erhöhten Lipidakkumulation in HMGECs, deren Maximum unter 30  $\mu\text{mol/l}$  Rosiglitazon auftrat (31, 163). Die Expression von mit der Meibozytendifferenzierung assoziierten Proteinen wie PPAR $\gamma$ , ADFP, ELOVL4 (elongation of very long chain fatty acids protein 4) und FABP4 (fatty acid-binding protein 4) wurde unter der Behandlung mit Rosiglitazon signifikant um das 2,6- bis 9,6-fache hochreguliert (31). Die unter Rosiglitazon aufgetretenen Veränderungen legen nahe, dass spezifische PPAR $\gamma$ -Signalwege die Lipogenese in HMGECs regulieren, da in Kontrollen eine Blockierung der PPAR $\gamma$ -Rezeptor-Signalübertragung durch den spezifischen PPAR $\gamma$ -Antagonisten T0070907 sowohl die Lipidsynthese als auch die Hochregulation von Genen der Lipogenese und den Austritt aus dem Zellzyklus unterdrückte (31). Die PPAR $\gamma$ -abhängigen Veränderungen konnten in einer als Kontrolle verwendeten menschliche Hornhautepithelzelllinie (hTCEpi) nicht reproduziert werden, was auf spezifische Signalwege der Meibozytendifferenzierung hindeutet (31). Ein Vergleich des Transkriptom von HMGECs mit oder ohne Stimulation mit 30  $\mu\text{mol/l}$  Rosiglitazon für 1 bis 6 Tage zeigte für eine Vielzahl der etwa 58.000 in HMGECs exprimierten Gene, insbesondere für Gene die mit dem Zellzyklus und metabolischen Prozessen in Verbindung stehen, eine Veränderung unter Rosiglitazon (27). Beispielsweise wurden die Gene für die Proteine von Sequestosom-1 (SQSTM1), Angiotensin-related protein 4 (ANGPTL4) und Perilipin-2 (PLIN2), das die Bildung von Lipidtröpfchen fördert, unter Rosiglitazon signifikant hochreguliert (27). Die Gene für Keratin 5 (CK5) und HHIP (hedgehog-interacting protein) waren demgegenüber herunterreguliert (27). Die Ergebnisse des Transkriptomvergleichs legen nahe, dass neben der durch Rosiglitazon hervorgerufenen Aktivierung des PPAR $\gamma$ -Signalwegs weitere Signalwege, wie Wnt und Hedgehog, an der Regulation der Meibozytendifferenzierung und ihrem Stoffwechsel beteiligt sind (27).

Die Auswirkungen natürlicher Liganden auf die PPAR $\gamma$ -Signalübertragung und Meibozytendifferenzierung in HMGECs wurden durch die Kultivierung mit Eicosapentaensäure (EPA), einer Omega-3-Fettsäure, untersucht (164). In früheren Studien konnten bereits positive Effekte der Nahrungsergänzung mit Omega-3-Fettsäuren auf Symptome und klinische Zeichen des trockenen Auges und einer veränderten Meibumqualität nachgewiesen werden, ohne die Mechanismen dahinter zu untersuchen (165, 166). Am *in vitro*-Modell der HMGECs steigerte EPA, ähnlich dem synthetischen PPAR $\gamma$ -Agonist Rosiglitazon, in Meibozyten die Expression von Genen der Lipidsynthese (z.B. ELOVL4) (27, 164). Die Meibozytendifferenzierung wurde durch Verlassen der Meibozyten aus dem Zellzyklus induziert, wie eine verringerte Expression

des Proliferationsmarkers Ki67 und Cyclin D1 sowie eine erhöhte Expression der Zellzyklusregulatoren p21 und p27 bestätigte (27, 164). EPA erhöhte ebenfalls die Lipidanreicherung im endoplasmatischen Retikulum der HMGECs (164). Generell zeigte sich für Agonisten des PPAR $\gamma$ -Signalwegs eine Aktivierung des AMPK (AMP-activated protein kinase)/ULK1 (Unc-51 like autophagy activating kinase)-Signalwegs und der Autophagie (164).

Ziemanski et al. untersuchten die Auswirkungen von Rosiglitazon auf das Lipidprofil der HMGEC. Eine Stimulation der HMGECs mit Rosiglitazon veränderte die Sättigung der produzierten Cholesterinester (153). Während in Kulturbedingungen ohne Stimulation mit Rosiglitazon die HMGECs ein Cholesterinesterprofil aus überwiegend einfach und mehrfach ungesättigten Cholesterinester aufweisen, erhöhte die Kultivierung mit 50  $\mu\text{mol/l}$  Rosiglitazon und 2 % FBS den Anteil gesättigter sowie einfach ungesättigter Cholesterinester und reduzierte den Anteil mehrfach ungesättigter Cholesterinester (153). Zusätzlich stellte sich Rosiglitazon als selektiver Induktor der Fettsäuresynthese, insbesondere von Fettsäuren mit 16 oder 18 Kohlenstoff, heraus und ist damit ein starker Modulator des Lipidprofils (154). Insgesamt verschiebt Rosiglitazon das Sättigungsprofil der exprimierten Cholesterinester und das Fettsäureprofil der Lipide von Zellen *in vitro* in Richtung des humanen Meibums *in vivo* (153).

## 2.5 *In vitro*-Einsatz von Rho-Kinase Inhibitoren in Zellkulturen

Die Rho-Kinase (ROCK) gehört zu einer Familie von Serin/Threonin-Kinasen, die durch Interaktion mit Rho-GTPasen aktiviert werden (167, 168). ROCK ist an einer Vielzahl basaler Zellfunktionen, wie Adhäsion, Migration, Proliferation und der Regulation der Apoptose beteiligt (167-169). Die Hemmung der Rho/ROCK-Signalübertragung und der nachgeschalteten Wege durch den selektiven ROCK-Inhibitor Y-27632 zeigte Auswirkungen auf verschiedene zelluläre Funktionen, darunter die Zelladhäsion, die Zellproliferation, die Zellmotilität und eine antiapoptische Wirkung (169, 170). In der Kultivierung von humanen wie auch Hornhautendothelzellen von Cynomolgus Affen erhöhte die Zugabe des ROCK-Inhibitors Y-27632 die Zahl der lebensfähigen kultivierten Hornhautendothelzellen *in vitro* und reduzierte die Zahl apoptotischer Zellen nach 24 Stunden in Kultur (171-173). Zudem erwies sich der Gebrauch des ROCK-Inhibitors Y-27632 in der Kultivierung von humanen embryonalen Stammzellen als vorteilhaft (174). Er verbesserte das Überleben von humanen embryonalen Stammzellen nach Zelldissoziation, erhöhte die Klonierungseffizienz und erleichterte Manipulationen wie die Subklonierung primärer Zellkulturen (174). Insbesondere für die Kombination des ROCK-Inhibitors Y-27632 mit Feeder-Zellen in Epithelzellkulturen konnte gezeigt werden, dass sie ohne exogene virale oder zelluläre Gentransduktion die terminale Differenzierung von Zellen in Kultur hemmen und die zelluläre Proliferation und Passage *in vitro* erhöhen kann. Diese Kombination wurde beispielsweise für Zellkulturen der Prostata, der Brust oder der Atemwege aber auch für die von Dongfang et al. etablierte primäre Meibomdrüsenepithelzellkultur der Ratte

angewandt (138, 175-177). Auch in der Kultivierung von HMGEC und Kaninchen-Meibomdrüsenzellkulturen kam bereits der Rock-Inhibitor zum Einsatz (120). Unter anderem konnte durch Entfernen des Rock-Inhibitors und Zugabe weiterer Stimulantien eine Differenzierung von Meibozyten-Vorläuferzellen zu reifen Meibozyten bewirkt werden (120). Die Ergebnisse zeigten, dass der selektive ROCK-Inhibitor Y-27632 das Potential hat, günstig auf die Kultivierung und das Überleben von Zellen *in vitro* einzuwirken.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### Gebrauchswaren und Geräte

Thermo Multiskan Ascent Mikrotiter-plattenphotometer mit ascent software 2.6 (Software)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Brutschrank: CO <sub>2</sub> Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Eppendorf Reaktionsgefäße: Eppendorf Safe-Lock Tubes, PCR clean, ambra (Lichtschutz): 5 ml Eppendorf Safe-Lock Tubes: 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Sterilbank s@felow	BioAir S.p.A., Pero, Italien
Wasserbad WBT-Serie 12	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zählkammer Neubauer improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Mikrotitrierplatten 6-Well Plate, Nunclon Delta Surface	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Falkon-Tubes CELLSTAR® 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Abzug	ARGE Labor- und Objekteinrichtungen GmbH, Wathlingen, Deutschland
Deckgläschen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Objektträger	Diagonal GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland

Filter Whatman 595 1/2	GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, Vereinigtes Königreich
UV-Desinfektionslampe	Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland
Präzisionswaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Cell Lifter costar® 3008	Corning Inc., Corning, New York, USA
Heizblock ThermoMixer® C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Corning™ LSE™ digitales Trockenbadheizgerät	Corning Inc., Corning, New York, USA
Vakuumkonzentrator RVC 2-18 Christ	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Spektralphotometer NanoDrop™ 2000/2000c mit NanoDrop 2000/2000c Operating Software, version 1.6 (Software)	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Real-time PCR System LightCycler® 480 System Light Cycler 480 software release 1.5.0 SP4 (Software)	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
PCR-Platten für Roche® LightCycler® 480	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Thermocycler Biometra Trio	Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland
Elektrophoresekammer horizontal mit Gleitschlitten	VWR International (Peqlab); Radnor, Pennsylvania, USA
Geldokumentationssystem/Dunkelhaube DH-50 mit CCD-Kamera Gerix 1000	BioStep GmbH, Burkhardtsdorf, Germany



### **Mikroskope**

---

Inverses Mikroskop Leica Type 090-135.002	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
---	--

---

Mikroskop Nikon Eclipse TS100 mit NIS-Elements Version 4.30 (Software)	Nikon Corporation, Chiyoda, Tokio, Japan
--	--

### **Pipetten und Pipettenspitzen**

---

Pipetten 10 µl, 100 µl, 1.000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
----------------------------------	------------------------------------

---

Pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
---------------	--

---

Pipetten, serologisch: 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
---	--

---

Pipettenspitzen epT.I.P.S.® Standard 2-200 µl, 50-1.000 µl, 0,1-10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
---	------------------------------------

### **Schüttlergeräte**

---

Schüttlergerät Vortex-Genie® 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
--------------------------------	---

### **Zentrifugen**

---

Eppendorf Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
-----------------------------	------------------------------------

---

Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
-----------------------	------------------------------------

### **Kühlschränke und Gefriergeräte**

---

Liebherr Premium Laborgefriergerät -20 °C	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
---	---

---

Liebherr Premium Laborkühlgerät 4 °C	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
--------------------------------------	---

---

Thermo Scientific Tiefkühlschrank Heraeus -80 °C	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
--	---

---

### Chemikalien, Enzyme und Verbrauchslösungen

10x Rnase free Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Accutase solution® (in DPBS without Ca <sup>2+</sup> or Mg <sup>2+</sup> )	Innovative Cell Technologies, Inc., San Diego, CA, USA
Aquatex®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DEPC behandeltes Wasser	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
DNA Gel Loading Dye (6X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
DNase I, RNase-free (1 U/μL) EC-Nummer: 3.1.21.1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
dNTP-Mix (20 mM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Ethanol (99,8 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
GelRed® Nucleic Acid Gel Stain	Biotium, Hayward (Kalifornien), USA
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Low Range DNA-Leiter, peqGOLD, 80-1031 bp	VWR International; Radnor, Pennsylvania, USA
Oil Red O Solution EC-Nummer: 200-661-7	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Oligo(dT)18 Primer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
peqGOLD TriFast	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Primer (DNA Oligos)	metabion international AG, Planegg, Deutschland

Resazurin (Diazo-resorcinol) EC-Nummer 263-718-5	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
RevertAid H Minus Reverse Trans- criptase (200 U/μL)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Rho-Kinases Inhibitor Y-27632 dihy- drochloride	Bio-Techne AG, Minneapolis, USA
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/μL)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
RNaseOUT™ Recombinant Ribonu- clease Inhibitor	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, MA USA
RNaseZap™ RNase Decontamina- tion Solution	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, MA USA
Rosiglitazone CAS-Nummer: 122320-73-4	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
ROTI®Histofix 4 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Stopsolution (EDTA)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Sudan III EC-Nummer: 201-638-4	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Taq DNA Polymerase, recombinant (5 U/μL)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Trichlormethan/Chloroform CAS-Nummer: 67-66-3	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

### Medien und Zusätze

DMEM/ Ham´s F-12 (1:1)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
CnT-BM.1/ CnT-57	CELLnTEC Advanced Cell Systems AG, Bern, Switzerland
Penicillin (5.000 U/ml)-Streptomycin (5 mg/ml) Solution	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Gibco™ Keratinozyten-SFM Medium mit EGF und BPE	Fisherscientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Choleratoxin aus <i>Vibrio cholerae</i> CAS-Nummer: 9012-63-9	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hydrocortison EC-Nummer: 200-020-1	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Epidermal growth factor (EGF) CAS-Nummer: 62253-63-8	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO) EC-Nummer: 200-664-3	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Gibco™ Fötale Kälberserum, qualifiziert, Hitzeinaktiviert (fetal bovine Serum FBS)	fisherscientific; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Gibco™ Insulin-Transferrin-Selenium (ITS -G) (100X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Pen/Strep-PreMix CELLPURE®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

#### 3.2.1.1 Ursprung des Gewebematerials

Das verwendete Gewebematerial zum Aufbau der Meibomdrüsenzellkultur stammt aus zwei Quellen. Überwiegend wurde Überschussmaterial, das im Rahmen der lateralen Zügelplastik von Patienten der Augenklinik der Universitätsmedizin Mainz anfiel, verwendet. Daneben wurden Meibomdrüsen aus Tarsi von Körperspendern des Instituts für funktionelle und klinische Anatomie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz kultiviert.

#### 3.2.1.2 Probengewinnung aus Überschussgewebe der lateralen Zügelplastik

Die verwendeten Meibomdrüsen, die Konjunktiva und das Bindegewebe stammen aus Tarsusgewebe von Patienten der Augenklinik der Universitätsmedizin Mainz. Es wurde ausschließlich Überschussmaterial von Patienten verwendet, die mit der Übereignung und wissenschaftlicher Nutzung von Überschussmaterial nach § 14 Nr. 3 AVB einverstanden waren. Die im Rahmen der lateralen Zügelplastik vom Patienten gewonnen Tarsusstücke wurden intraoperativ direkt nach der Entnahme in Eppendorf Reaktionsgefäße mit Kulturmedium (Tabelle 2) überführt und bei Raumtemperatur zwischengelagert. Anschließend erfolgte die Präparation des Tarsus.

**Tabelle 2** Kulturmedium für Gewebeverwahrung

---

DMEM/HAM's F-12 1:1

10 % FKS

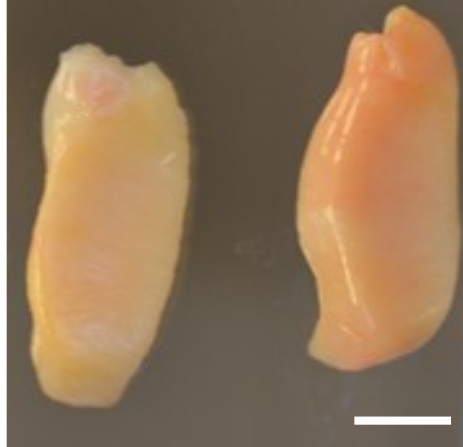
10 ml/l Streptomycin/Penicillin

---

#### 3.2.1.3 Probengewinnung aus Tarsi von Körperspendern

Die Probengewinnung aus Tarsi von Körperspendern erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für funktionelle und klinische Anatomie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Der Tarsus wurde von Körperspendern, die sich für Aufgaben der Wissenschaft zur Verfügung stellten, entnommen. Ein zustimmendes Votum der Ethik-Kommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz zur Gewebeentnahme liegt vor (Antragsnummer: 2020-15446\_1). Die Entnahme der Tarsi erfolgte in den Räumlichkeiten des Instituts für funktionelle und klinische Anatomie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Durch doppeltes Ektropionieren wird der Tarsus zugänglich und ermöglicht die makroskopische Begutachtung des Zustands der Meibomdrüsen und ihrer Ausführungsgänge. Die Meibomdrüsen sind als gelblich-weiße Stränge erkennbar, die der Ausdehnung des Tarsus von Ober- und Unterlid folgen. Anschließend

wird mit Hilfe eines Skalpells der Tarsus an der Lidkante abgesetzt und mit chirurgischer Schere vom restlichen Lid getrennt. Die entnommenen Tarsi wurden in ein 50 ml Falcon mit Kulturmedium (Tabelle 2) überführt und in der Augenklinik der Universitätsmedizin Mainz präpariert.

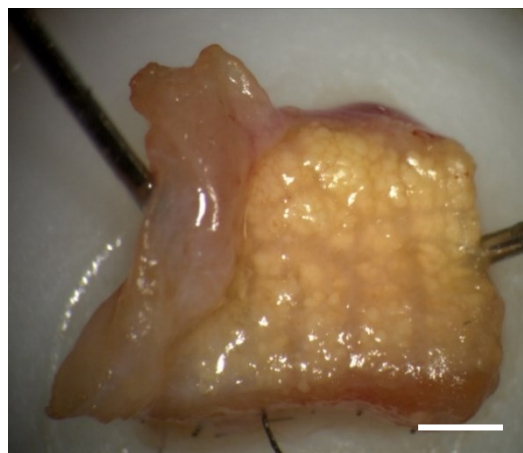


**Abbildung 5** Oberlidtarsi eines Spenders

Der Maßbalken entspricht 1 cm.

#### 3.2.1.4 Präparation der Gewebeproben

Die Präparation der Gewebe erfolgte unter einem ophthalmologischen Operationsmikroskop. Dabei wurden die Meibomdrüsen von der Konjunktiva und von den muskulären und bindegewebshaltigen Anteilen getrennt. Die Konjunktiva sowie muskuläre und bindegewebige Anteile wurden für die molekularbiologische Analyse in Eppendorf Reaktionsgefäßen überführt und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Tiefkühlschrank aufbewahrt. Die gewonnenen Meibomdrüsenstücke wurden für die Etablierung der Zellkultur verwendet.



**Abbildung 6** Präparation eines Tarsusstückes

Die Bindehaut wurde abpräpariert und nach links zur Seite geklappt, sodass die Meibomdrüsen deutlich als gelbliche Stränge sichtbar sind. Der Maßbalken entspricht 0,2 cm.

### 3.2.1.5 Kulturbedingungen

Für die Kultivierung der Meibomdrüsenzellen ist ein Zerkleinern der Meibomdrüsenstücke auf circa 1 mm in jede Raumrichtung mit einem Skalpell, zur Vergrößerung der Oberfläche, vorteilhaft. Die kleinen Stücke werden gleichmäßig auf 6-Well-Mikrotiterplatten verteilt. Zur besseren Adhärenz der Meibomdrüsenstücke am Boden werden sie mit einem Deckgläschen beschwert und anschließend in 3 ml Kulturmedium (Tabelle 3) zum Auswachsen in Kultur genommen. Die Mediumzusammensetzung für die Kultivierung von Explantatkulturen unterscheidet sich zwischen den Laboren. Ein wachstumsfaktorenthaltendes Medium mit EGF, FBS, Cholera toxin und Antibiose findet neben der Kultivierung von Meibomdrüsenepithelzellen in vielen weiteren Zellkulturprotokollen Anwendung und dient insbesondere der Aufrechterhaltung der Proliferation und der Differenzierung der Zellen (26, 121, 139, 178).

**Tabelle 3** Kulturmedium zum Auswachsen der Meibomdrüsenzellen (Auswachsmedium)

---

Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nährmedium F-12 Ham (DMEM/ Ham's F-12 (1:1)) mit 1,05 mM Calcium

30 ng/ml Cholera toxin

2 ng/ml epidermal growth factor (EGF)

0,5 % Dimethylsulfoxid (DMSO)

0,5 µg/ml Hydrocortison

10 % fötales Kälberserum (FBS) hitzeinaktiviert

1 % Insulin-Transferrin-Selenium (100X)

1 % Pen/Strep

---

In regelmäßigen Abständen von 3 Tagen erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der Meibomdrüsenstücke. Dabei wurden das Auswachsen und die Proliferation der Meibomdrüsenzellen aus den Meibomdrüsenstücken beobachtet. In Abhängigkeit des mikroskopischen Befundes der ausgewachsenen Meibomdrüsenzellen erfolgte ein Mediumwechsel auf das Proliferationsmedium (Tabelle 4) nach 5 bis 9 Tagen. Das verwendete Proliferationsmedium CnT-BM.1 mit Supplement CnT-57 (CnT-BM.1/CnT-57) ist speziell für die Isolierung und Proliferation von Epithelzellen aus Haut, Hornhaut und Gingiva bestimmt. Laut Hersteller enthält es eine niedrige Konzentration an BPE, verschiedene Aminosäuren, Mineralien und Spurenelemente, wie Selen, Mangan und Zink, Vitamine, Glukose, Pyruvat und Puffer. Zusätzlich sind Wachstumsfaktoren und Kofaktoren, darunter Insulin, Hydrocortison, EGF und FGF enthalten. Eine ähnliche Mediumzusammensetzung verwendeten Rho et al. bei der Kultivierung von Meibomdrüsenvorläuferzellen von Kaninchen (120). Im Proliferationsmedium wurde die Zellkultur so

lange weiter kultiviert, bis sich ein dichter Zellrasen gebildet hat. Abhängig der Dichte des Zellrasens erfolgten Kulturmedienwechsel zwischen 3 bis 4 Tagen.

**Tabelle 4** Kulturmedium zur Proliferation (Proliferationsmedium)

---

CnT-BM.1 (CnT Basal Medium 1)

Supplement CnT-57

---

Die Meibomdrüsen wurden unter standardisierten Bedingungen in einem Brutschrank bei 36,6 °C und 2,9 % CO<sub>2</sub> in 6-Well-Mikrotiterplatten kultiviert. Das Arbeiten mit der Zellkultur erfolgte unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank mit vertikalem Luftabzug. Verwendete Geräte und Materialien wurden vor Gebrauch mit 96-prozentigem Ethanol desinfiziert. Die Oberfläche der Sterilwerkbank wurde mit einer UV-Desinfektionslampe für eine virenfreie Oberfläche beleuchtet. Alle Kulturmedien lagerten bei 4 °C im Kühlschrank und wurden vor Anwendung im Wasserbad auf etwa 37 °C erwärmt.

#### 3.2.1.6 Passagieren

Vor der Passage werden die Zellkulturen für 2 Stunden mit dem spezifischen ROCK-Inhibitor Y-27632 inkubiert. Es folgt die Entnahme des Kulturmediums. Anschließend werden die Zellen mit 1 bis 2 ml PBS (phosphate-buffered saline) gewaschen, um abgestorbene Zellreste zu entfernen. Das Ablösen der Zellen von der Kunststofffläche der Mikrotiterplatte erfolgt durch Zugabe von 500 µl Accutase pro Well und darauffolgendem inkubieren der Zellen für 10 Minuten im Inkubator bei 37 °C. Die Kontrolle der Zellablösung erfolgt mikroskopisch. Bei nicht vollständigem Ablösen kann die Inkubationszeit etwas verlängert werden. Die Zugabe von 1 ml Kulturmedium (CnT-BM.1/CnT-57) pro 500 µl Accutase stoppt den Zellverbau. Die gewonnene Suspension wird für 5 Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert. Die Überstände werden verworfen, das gewonnene Zellpellet abhängig der Größe in 1 bis 4 ml Kulturmedium (CnT-BM.1) resuspendiert. Davon werden 10 µl unverdünnte Zellsuspension mithilfe der Neubauer-Zählkammer quantifiziert. Anschließend werden 30.000 Zellen pro Well auf neue 6-Well-Mikrotiterplatten verteilt und kultiviert.

#### 3.2.1.7 Bestimmung der Zellzahl

Um die Zellkulturen unter gleichen Bedingungen zu kultivieren, ist eine Bestimmung der Zellzahl beim Passagieren notwendig. Die Zellzahl wird dafür mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt, wobei folgende Formel im Allgemeinen zur Berechnung gilt (179):

$$\frac{\text{Anzahl Zellen}}{\text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{)} \times \text{Kammertiefe (mm)} \times \text{Verdünnung}} = \text{Zellen pro 1 } \mu\text{l}$$



Die Neubauer-Zählkammer wird mit 10 µl der Probe entnommener unverdünnter Zellsuspension beschickt. Es werden vier Quadrate je 1 mm<sup>2</sup> bei einer Kammertiefe von 0,1 mm ausgezählt. Die ermittelte Anzahl wird mit dem Faktor 10<sup>3</sup> multipliziert, um zur tatsächlichen Zellzahl pro ml zu gelangen. Vereinfachend ergibt sich:

$$\frac{\text{Anzahl Zellen}}{4} \times 10^4 = \text{Zellen pro 1 ml}$$

### 3.2.2 Inhibierungsaktivität und Resazurin Assay

Der Einfluss des ROCK-Inhibitors Y-27632 auf die Zellproliferation und Stoffwechselaktivität der Meibomdrüsenzellkultur wurde mittels Resazurin Assay untersucht. Der Vergleich erfolgte an zwei Kultivierungsschemata der Meibomdrüsenepithelzellkulturen. Nach dem Splitten der Zellen wurde eine Zellgeneration in einen Ansatz mit Inhibitor (A) und eine Kontrollreihe (B) aufgeteilt. Beide Zellreihen wurden für 2 Stunden vor Passage mit 10 µmol/l ROCK-Inhibitor kultiviert. Zellreihe A wurde mit ROCK-Inhibitor weiterkultiviert, Zellreihe B ohne ROCK-Inhibitor. Jeweils an Tag 3 und 5 nach Passage erfolgte ein Vergleich der Zellaktivität mittels Resazurin Assay.

**Tabelle 5** Kultivierungsschema der Meibomdrüsenzellen mit ROCK-Inhibitor

Zellreihe	Dauer	Kultivierungsschema
A: ROCK-Inhibitor	72 h	CnT-BM.1/CnT-57 mit 10 µmol/l ROCK-Inhibitor
B: Kontrollreihe	72 h	Kontrolle in CnT-BM.1/CnT-57
A: ROCK-Inhibitor	120 h	CnT-BM.1/CnT-57 mit 10 µmol/l ROCK-Inhibitor
B: Kontrollreihe	120 h	Kontrolle in CnT-BM.1/CnT-57

Das Resazurin Assay dient der photometrischen oder fluorometrischen Messung der Stoffwechselaktivität lebender Zellen. Das blaue, nicht fluoreszierende Resazurin (7-hydroxy-10-oxidophenoxazin-10-ium-3-one) wird durch von stoffwechselaktiven Zellen in der Atmungskette gebildetem NADH(P)H+H<sup>+</sup> zu dem fluoreszierenden Resorufin (7-hydroxyphenoxazin-3-one) (Exzitation/Emission von 530-560 nm / 590 nm) reduziert. Dabei ändert sich auch das Absorptionsmaximum (Resazurin 605 nm; Resorufin bei 573 nm). Die Reduktion von Resazurin zu Resorufin erfolgt ausschließlich in vitalen Zellen und ist in der Menge des produzierten Resorufin proportional zur Anzahl der lebensfähigen Zellen in der Probe.

Das linear zur Zellaktivität gebildete Resorufin kann sowohl mittels Fluoreszenz oder Absorption gemessen werden. Die Messung erfolgte aufgrund größerer Linearität, Robustheit sowie

Empfindlichkeit (180) im Fluoreszenzmodus durch Bestimmung der relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) mit einem Fluorometer (Exzitation/Emission von 530-560 nm / 590 nm).

Die Herstellung der Resazurinlösung erfolgt durch Lösen von Resazurin in PBS (0,15 mg Resazurin / 1 ml PBS) und anschließende Filtrierung. Nach mikroskopischer Kontrolle der Zellen bezüglich Zelldichte, Morphologie und eventueller Kontamination wird pro 1 ml Medium 100 µl Resazurinlösung hinzugefügt, durch Schwenken mit dem Medium vermischt und für 50 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgt die Fluoreszenzmessung (Exzitation: 540 nm / Emission: 590 nm) am Mikrotiterplatten-Lesegerät (Thermo Multiskan Ascent Mikrotiterplattenphotometer). Das gefärbte Kulturmedium wird abgesaugt und die Zellen mehrmals mit 3 ml PBS je Well gewaschen, bis keine blauen Resazurinrückstände mehr im Well verbleiben. Anschließend werden die Zellkulturen weiter kultiviert.

### 3.2.3 Stimulation mit PPAR $\gamma$ -Agonisten (Rosiglitazon)

Der pleiotrope Einfluss des PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon auf die basalen Meibomdrüsenzellen einer primären Meibomdrüsenepithelzellkultur wurde untersucht. Die basalen Meibomdrüsenzellen einer Auswachskultur wurden dafür in 6-Well-Mikrotiterplatten mit Proliferationsmedium CnT-BM.1/CnT-57 und 30 µmol/l Rosiglitazon für 72 Stunden inkubiert. Die Kontrollgruppe wurde für identische Dauer ausschließlich in Proliferationsmedium CnT-BM.1/CnT-57 kultiviert. Die stimulierten Meibomdrüsenzellen wurden mit der Kontrolle sowohl hinsichtlich ihrer Lipidproduktion mithilfe der Lipidfärbungen (siehe Kapitel 3.2.11) als auch hinsichtlich ihrer Genexpression durch RNA-Isolierung (siehe Kapitel 3.2.4) verglichen.

**Tabelle 6** Kultivierungsschema der Kontrollgruppe und der Stimulationsgruppe mit Rosiglitazon

	<b>Kultivierungsdauer</b>	<b>Kultivierungsbedingungen</b>
Kontrolle	72 h	CnT-BM.1/CnT-57
Rosiglitazon	72 h	CnT-BM.1/CnT-57 + 30 µmol/l Rosiglitazon

### 3.2.4 RNA-Isolierung

#### 3.2.4.1 RNA-Isolierung aus Gewebe

Nach Zerkleinerung und Lyse der tiefgefrorenen Gewebeproben (-80 °C) erfolgte die RNA-Isolierung und Reinigung mit Hilfe einer RNA bindenden Säule (RNeasy spin-column) nach dem Protokoll des Herstellers (Qiagen; RNeasy Mini kit). Dabei bindet die RNA an eine RNA-bindende Membran in der Spin-Column und kann zum Schluss in 30 µl DEPC-Wasser (mit Diethylpyrocarbonat deionisiertes Wasser) gelöst werden.

### 3.2.4.2 RNA-Isolierung aus Zellen

Die RNA-Isolierung erfolgt in drei aufeinanderfolgenden Schritten. Zuerst erfolgt die Zellyse der adhärennten Zellen mittels TriFast, gefolgt von der RNA-Extraktion durch Phasenseparation in eine wässrige und eine organische Phase. Abschließend erfolgt die Aufreinigung der RNA.

Zur Zellyse wird das Kulturmedium aus der 6-Well-Mikrotiterplatte abgesaugt. 500 µl TriFast werden pro Well hinzugegeben und bei Raumtemperatur 5 Minuten inkubiert, um die am Boden der 6-Well-Mikrotiterplatte adhärennten Meibomdrüsenzellen zu lösen. Mithilfe eines Spatels werden zusätzlich mechanisch verbleibende Zellen gelöst. Die Suspension wird anschließend mit einer 1.000 µl Pipette in ein 2,0 ml Eppendorf Reaktionsgefäß transferiert. Für die RNA-Extraktion werden unter der Abzugshaube 100 µl Chloroform pro 500 µl TriFast in das Eppendorf Reaktionsgefäß hinzugefügt und durch vortexen so lange gemischt, bis eine milchig trübe Suspension entsteht. Anschließend erfolgt eine Inkubation für 3 bis 5 Minuten bei Raumtemperatur. Die Probe wird bei 4 °C 15 Minuten bei 10.000 rpm in der Kühlzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5810 R) zentrifugiert. Dabei wird die Suspension in 3 Phasen separiert. Eine obere, wässrige, klare Phase, eine mittlere, trübe Zwischenphase und eine untere, pinke, organische Phase (Phenol/Chloroform). Dabei macht die klare, obere, wässrige Phase etwa 60 % des eingesetzten TriFast Volumens aus. Diese wird vorsichtig, ohne die Phasen zu vermischen, mit einer Micropipette in ein neues RNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wird ein äquivalentes Volumen Isopropylalkohol in jedes Reaktionsgefäß hinzugefügt und für 20 bis 40 Minuten bei -20 °C inkubiert. Durch Zentrifugieren (10 min, 10.000 rpm, 4 °C) ergibt sich ein Überstand, der abgekippt wird. Das verbleibende Pellet wird in 52 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

### 3.2.5 DNase-Verdau

Um eine Kontamination mit genomischer DNA zu verhindern, wird die isolierte RNA-Probe mittels 8 µl Mastermix, der RNase-freier DNase I (Thermo Scientific™) beinhaltet, verdaut.

**Tabelle 7** Mastermix zum DNase-Verdau

---

<b>Volumen</b>	<b>Reagenz</b>
1 µl	DNase I, RNase-free (1 U/µL)
6 µl	10x Reaktionspuffer, RNase-free
1 µl	RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor
8 µl	Mastermix

---

Der DNA-Verdau erfolgt für 30 Minuten bei 37 °C. Durch die Zugabe von 6 µl DNase-Stop Solution (50 mM EDTA) und Inkubation bei 65 °C im Trockenbadheizgerät wird die Enzymaktivität gestoppt und der DNase-Verdau beendet. Anschließend erfolgt die RNA-Fällung aus dem Reaktionsgemisch durch Zugabe von 6 µl Natrium-Azetat-Lösung (3 M) und 200 µl Isopropanol und Inkubation bei -20 °C über Nacht. Durch Zentrifugieren (30 min, 10.000 rpm) entsteht ein Überstand, der abgekippt wird. Das Pellet wird zweimal in 1 ml Ethanol (75 %) / DEPC-Wasser-Gemisch gelöst und zentrifugiert (5 min, 10.000 rpm, 4 °C). Nach Abkippen des Überstandes wird das verbleibende Pellet im Vakuumkonzentrator (Christ RVC 2-18) für 5 Minuten getrocknet, um darauffolgend in 20 µl DEPC-Wasser aufgenommen und bei 75 °C für 5 Minuten gelöst zu werden.

### 3.2.6 RNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die Extinktion im Photometer (Spektralphotometer NanoDrop™ 2000c) an 1 µl unverdünnte Probe bei 260 nm gemessen. Dabei gilt, je höher die RNA-Konzentration in der Probe, desto höher die gemessene Extinktion. Das Absorptionsmaximum von RNA liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm, während das Absorptionsmaximum vieler Proteine dagegen bei 280 nm liegt. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm wird verwendet, um die Reinheit von RNA zu beurteilen. Ein Quotient ( $A_{260}/A_{280}$ ) von ~ 2,0 wird allgemein als rein für RNA angesehen.

### 3.2.7 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Die Synthese komplementärer DNA beruht auf der Reaktion der reversen Transkriptase, bei der die gewonnene RNA in DNA umgeschrieben wird. mRNA besteht ausschließlich aus codierenden Basenabschnitten (Exons), weshalb die bei der Reversen Transkription synthetisierte DNA als codierende DNA, cDNA, bezeichnet wird. Die Herstellung der cDNA erfolgt aus 2 µg DNase verdauter RNA in verschiedenen Zyklen (Tabelle 8). Das entsprechende Volumen, abhängig von der RNA-Konzentration der jeweiligen Probe, wird mit Reinstwasser (DEPC) auf ein Gesamtvolumen von 12 µl pipettiert. Anschließend wird 1 µl an Oligo(dT)<sub>18</sub> Primer hinzugefügt. Nach Durchführung des ersten Schrittes des Reverse Transkriptase Protokolls (RT-Protokoll) im Thermocycler (Biometra Trio) erfolgt die Zugabe von 7 µl Mastermix zum Reaktionsansatz, bevor das RT-Protokoll fortgeführt wird. Das in Tabelle 9 dargestellte Pipettierschema dient der Herstellung von Mastermix zur cDNA-Synthese.

**Tabelle 8** Zyklen des Reverse Transkriptase Protokolls im Thermocycler (Biometra Trio)

2 µg RNA und DEPC im Gesamtvolumen von 12 µl mit 1 µl Oligo(dT)18 Primer	
5 min	65 °C
Hinzufügen von 7µl Mastermix	
60 min	42 °C
10 min	70 °C
Programm Ende / ∞	4 °C

**Tabelle 9** Mastermix zur cDNA-Synthese

Volumen	Reagenz
4 µl	5x Reaktionspuffer für Reverse Transkriptase
2 µl	dNTP Mix
0,5 µl	RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µL)
0,5 µl	RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (200 U/µL)

### 3.2.8 Polymerasekettenreaktion der Housekeeping Gene

Zur Kontrolle der erfolgreichen RNA-Isolierung und cDNA-Synthese erfolgt eine Polymerasekettenreaktion (PCR) eines ubiquitär exprimierten Housekeeping Gens.

**Tabelle 10** Primersequenzen β-Aktin human

Fwd-Primer	GAT CCT CAC CGA GCG CGG CTA CA
Rev-Primer	GCG GAT GTC CAC GTC ACA CTT CA

**Tabelle 11** Reaktionsschritte der PCR

Zeit	Temperatur		
5 min	95 °C		
30 s	95 °C	Denaturierung	} 30 Zyklen
20 s	60 °C	Annealing	
15 s	72 °C	Elongation	
5 min	72 °C		

### 3.2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Agarose-Gelelektrophorese werden 1,5 % Agarosegele verwendet. Zur Herstellung werden 0,75 mg Agarose in 50 ml 1x TBE-Puffer in einem Erlenmeyerkolben gelöst und in der Mikrowelle für etwa 2 Minuten bei 800 Watt erhitzt, bis sich eine klare Flüssigkeit gebildet hat. Nach kurzem Abkühlen werden 5 µl GelRed® Fluoreszenzfarbstoff zum Färben von Nucleinsäuren hinzu pipettiert, bevor die Gele gegossen werden. GelRed® interkaliert in doppelsträngigen Nucleinsäuren und sendet unter UV-Licht ein Fluoreszenzsignal aus, welches der Detektion der DNA-Fragmente dient. Als DNA-Größenstandard kommt ein DNA-Marker (Low Range DNA-Leiter, peqGOLD) im Bereich von 80-1031 bp zum Einsatz. Jeweils 25 µl einer Probe (24 µl PCR-Ansatz + 1 µl cDNA) sowie einer Negativkontrolle werden mit 5 µl 6x Loading Dye aufgetragen und bei 100 V für 45 Minuten nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Geldokumentation erfolgt unter einer Dunkelhaube. Die erwartete Bandengröße des untersuchten Housekeeping Gens ( $\beta$ -Aktin) liegt bei 298 bp.

### 3.2.10 Real-Time Polymerasekettenreaktion an cDNA (RT-PCR)

Die Real-Time PCR ist ein Verfahren, das gleichzeitig dem Nachweis und der Quantifizierung von spezifischen Nucleinsäuresequenzen dient. Mittels RT-PCR kann die Anzahl der cDNA-Transkripte in einer unbekannt Probe ermittelt werden und damit auf die Expression des Zielgens in der untersuchten Probe rückgeschlossen werden. Die Quantifizierung der cDNA erfolgt mit einer farbstoffbasierten Real-Time PCR Methode. In Echtzeit wird die Fluoreszenz eines spezifisch an doppelsträngige DNA interkalierenden Farbstoffes (*SYBR Green*) gemessen. Nach Bindung an doppelsträngige DNA nimmt die Fluoreszenz des Farbstoffs stark zu. Die Amplifikation der cDNA führt zu einer direkt zur Menge proportionalen Steigerung der Fluoreszenz. Die Anzahl an PCR-Zyklen, die für die Erreichung eines konstant definierten Fluoreszenzniveaus notwendig sind, dienen der Quantifizierung der cDNA-Startmengen und werden als Ct-Werte (Crossing threshold) oder Cp-Werte (Crossing point) bezeichnet. Ein um eine

Einheit geringerer Ct-Wert entspricht der doppelten eingesetzten cDNA beziehungsweise mRNA-Ausgangsmenge. Als interne Referenz und zur Normalisierung unterschiedlicher Proben wird die Expression der ribosomalen Untereinheit (18S) bestimmt. Diese zeigte sich in den Untersuchungen als nicht reguliert und diente als Referenzgen (Housekeeping-Gen). Im Rahmen der Normalisierung der Expressionsergebnisse wird die Genexpression des untersuchten Zielgens auf die Genexpression des nicht regulierten Referenzgens (18S) bezogen. Dafür wird für jede untersuchte Probe der  $\Delta$ Ct-Wert, durch Subtraktion des Ct-Wertes des Referenzgens (18S ribosomale Untereinheit) vom Ct-Wert des Zielgens, bestimmt (181).

$$\Delta\text{Ct (Zielgen)} = \text{Ct (Zielgen)} - \text{Ct (Referenzgen)}$$

Die  $\Delta$ Ct-Werte aller getesteter Proben eines Spenders werden zu einem Mittelwert für den jeweiligen Spender zusammengefasst, um eine unterschiedliche Gewichtung der Spender durch eine unterschiedliche Probenanzahl je Spender zu vermeiden. Die Analyse der Genexpression der primären Meibomdrüsenzellen, der mit Rosiglitazon stimulierten Meibomdrüsenzellen, der Konjunktiva und des Lidgewebes erfolgt durch Vergleich der mittleren  $\Delta$ Ct-Werte der Spender.

Die RT-PCR an cDNA wurde mit dem LightCycler® 480 II von Roche durchgeführt. Der verwendete Reaktionsansatz ist in Tabelle 12 aufgelistet und wurde jeweils für das Ziel- und das Referenzgen hergestellt. Die eingesetzten Primer sind in Tabelle 13 dargestellt. Die Reaktionsansätze werden mit jeweils einer cDNA-Probe (2  $\mu$ l) in eine 96-Multiwell-Platte pipettiert. 2  $\mu$ l Reinstwasser werden als Negativkontrolle mit aufgetragen. Vor Durchführung der RT-PCR wird die 96-Multiwell-Platte für zwei Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wird die Messung im LightCycler® wie in Tabelle 14 dargestellt begonnen. Die Qualität der entstandenen PCR-Produkte wird abschließend mittels Schmelzkurvenanalyse ermittelt, die eine Differenzierung zwischen spezifischen PCR-Produkten und unspezifisch entstandenen Primerdimeren zulässt.

**Tabelle 12** Reaktionsansatz RT-PCR

Volumen	Reagenz
10 $\mu$ l	SYBR Green I Master-Mix
0,25 $\mu$ l	Fwd-Primer/Left-Primer
0,25 $\mu$ l	Rev-Primer/Right-Primer
7,5 $\mu$ l	Reinstwasser (DEPC)
2 $\mu$ l	cDNA

**Tabelle 13** Übersicht über die verwendeten Primer

Gen	Primersequenz	Größe	Temperatur
Housekeeping Gen			
18s	Left: ggagcctgagaaacggcta	19 bp	60 °C
	Right: tcgggagtgggtaatttc	19 bp	60 °C
Fettstoffwechselfgene			
PLIN2	Left: tcagctccattctactgttcacc	23 bp	60 °C
	Right: cctgaattttctgattggcact	22 bp	60 °C
ELOVL4	Left: catttggcccatggattc	18 bp	59 °C
	Right: ccaatggtcacatggaattg	20 bp	59 °C
SCD	Left: cctagaagctgagaaactgggta	23 bp	60 °C
	Right: acatcatcagcaagccaggt	20 bp	60 °C
FABP4	Left: ccaccataaagagaaaacgagag	23 bp	60 °C
	Right: gtggaagtgacgcctttcat	20 bp	60 °C
Muzingene			
MUC5AC	Left: ctctgtggggacttcaacg	19 bp	59 °C
	Right: attccatgggtgtcagcttg	20 bp	60 °C
MUC16	Left: agtggaccttgggacctca	19 bp	60 °C
	Right: gagagggccagcagatgtag	20 bp	59 °C
Zytoskelettproteingene			
ACTA2	Left: ctgttccagccatccttcat	20 bp	60 °C
	Right: tcatgatgctgtttaggtggt	22 bp	60 °C



VIM	Left: aaaacttagccgggcttggt	20 bp	60 °C
	Right: aggttcacgccattctcctg	20 bp	60 °C
KRT5	Left: agcagatcaagaccctcaaca	21 bp	59 °C
	Right: ggtccacttggtgtccagaa	20 bp	60 °C
KRT6	Left: agttgcctcctcatcgac	20 bp	59 °C
	Right: tctgcctcacagtcttggtg	20 bp	60 °C
KRT14	Left: ccattgaggacctgaggaac	20 bp	59 °C
	Right: caatctgcagaaggacattgg	21 bp	60 °C

**Tabelle 14** Protokoll der RT-PCR

Schritt	Dauer	Temperatur	Zyklen
Enzymaktivierung	120 s	50 °C	1
Denaturierung	20 s	95 °C	55
Annealing	30 s	60 °C	55
Elongation	40 s	72 °C	55
Fluoreszenzmessung	-	-	1
Schmelzkurve	-	55-95 °C	1

Die Genexpression der ausgewachsenen Meibomdrüsenzellen, der mit Rosiglitazon stimulierten Meibomdrüsenzellen, der präparierten Konjunktiva und des umliegenden Gewebes (Lid-rest) wurde durch Untersuchung der jeweiligen mRNA analysiert. Zur Charakterisierung der Meibomdrüsenzellen und der Gewebe wurden die in Tabelle 15 dargestellten, in der Literatur beschriebenen Gene, aus den drei Übergruppen des Fettstoffwechsels, der Muzine und der Zytoskelettproteine als Nachweismarker für die verschiedenen Strukturen verwendet.

**Tabelle 15** Übersicht über die verwendeten Nachweismarker

Nachweismarker	Gen	Struktur	Referenz
<b>Fettstoffwechsel</b>			
Adipose differentiation-related protein (perilipin 2)	PLIN2	Meibomdrüsenazinus	(164, 182)
ELOVL fatty acid elongase 4	ELOVL4	Meibomdrüsenazinus	(183)
Stearoyl-CoA desaturase	SCD	Meibomdrüsenazinus	(184)
Fatty acid-binding protein 4	FABP4	Meibomdrüsen	(31)
<b>Muzine</b>			
Mucin 5AC (sekretorisches Muzin)	MUC5AC	Konjunktiva	(185, 186)
		Meibomdrüsen (murin)	(187)
Mucin 16 (membrane-bundenes Muzin)	MUC16	Konjunktiva	(188)
		Meibomdrüsen (murin)	(187)
<b>Zytoskelettproteine</b>			
Smooth muscle actin	ACTA2	Umgebendes Gewebe (Musku- latur, Fibroblasten) Meibomdrüse (murin)	(189)
Vimentin	VIM	Zytoskelettprotein mesen- chymaler Zellen (u.a. Fib- roblasten)	(190)
Zytokeratine	Zytokeratin 5	KRT5	Meibomdrüsenazinus (87)
			Meibomdrüsengang Meibomdrüsenöffnung (Orifice) Konjunktiva
	Zytokeratin 6	KRT6	Meibomdrüsengang (87, 191)
			Konjunktiva (87)
	Zytokeratin 14	KRT14	Meibomdrüsengang (87, 191)
			Meibomdrüsenacinus (191)
			Meibomdrüse (murin) (192)
			Konjunktiva (87)

### 3.2.11 Lipidfärbungen

Mittels Lipidfärbungen wird die Lipidexpression der verschiedenen stimulierten Meibomdrüsenzellen dargestellt. Dabei wurden die Sudan III und Oil Red O Lipidfärbungen zur qualitativen Beobachtung der Lipidverteilung im Gewebe eingesetzt (193, 194).

Für die Lipidfärbungen werden die Zellen auf Deckgläschen kultiviert. Bei Erreichen der festgelegten Dauer oder Konfluenz werden die Zellen mit PBS gespült und daraufhin mit ROTI®*Histofix* fixiert. Die Deckgläschen mit anheftenden Zellen werden nach erfolgter Färbung auf einen Objektträger aufgezogen und mit Aquatex, einem Eindeckmittel, das besonders für Präparate nach Lipidnachweis geeignet ist, eingedeckelt. Die Dokumentation der Lipidfärbungen erfolgte mit einem Fotomikroskop von Nikon (Nikon Eclipse TS100).

#### 3.2.11.1 Sudan III Fettfärbung

Die Sudan III Färbung erfolgt an zuvor fixierten Zellen. Für die Färbung werden die Sudan III Lösung nach Daddi sowie Saures Hämalaun nach Mayer benötigt. Sudan III färbt Fette (Triglyceride) orangerot bis dunkelrot. Hämalaun färbt die Zellkerne blau.

Für die Herstellung der Sudan III Lösung nach Daddi werden 0,2 bis 0,3 g Sudan III mit 100 ml im Wärmeschrank erhitztem 70-prozentigem Ethanol übergossen, mehrmals umgerührt und über Nacht im Wärmeschrank inkubiert. Vor Gebrauch wird die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt und filtriert. Saures Hämalaun nach Mayer wird ebenfalls vor Gebrauch filtriert.

**Tabelle 16** Reaktionsschritte der Sudan III Fettfärbung von Zellen

---

3-mal	Waschen der Zellen in Aqua dest.
15 min	Färben in Hämalaun nach Mayer
30 min	Bläuen in 8- bis 10-mal gewechseltem Leitungswasser
30 s	Inkubation in 50-prozentigem Ethanol
15 min	Inkubation in Sudan III Lösung
2-mal	Abspülen mit 50-prozentigem Ethanol zum Entfernen der überschüssigen Sudan III Lösung
3-mal	Waschen in Aqua dest.

---

### 3.2.11.2 Oil Red O Färbung

Die Oil Red O Lipidfärbung ist für die selektive Färbung und Detektion neutraler Lipide in kultivierte Zellen geeignet. Die Gegenfärbung der Zellkerne geschieht durch Hämatoxylin. Die Färbung an den zuvor fixierten Zellen auf einem Deckgläschen erfolgt durch die in der Tabelle dargestellten Abläufe.

**Tabelle 17** Reaktionsschritte der Oil Red O Lipidfärbung von Zellen

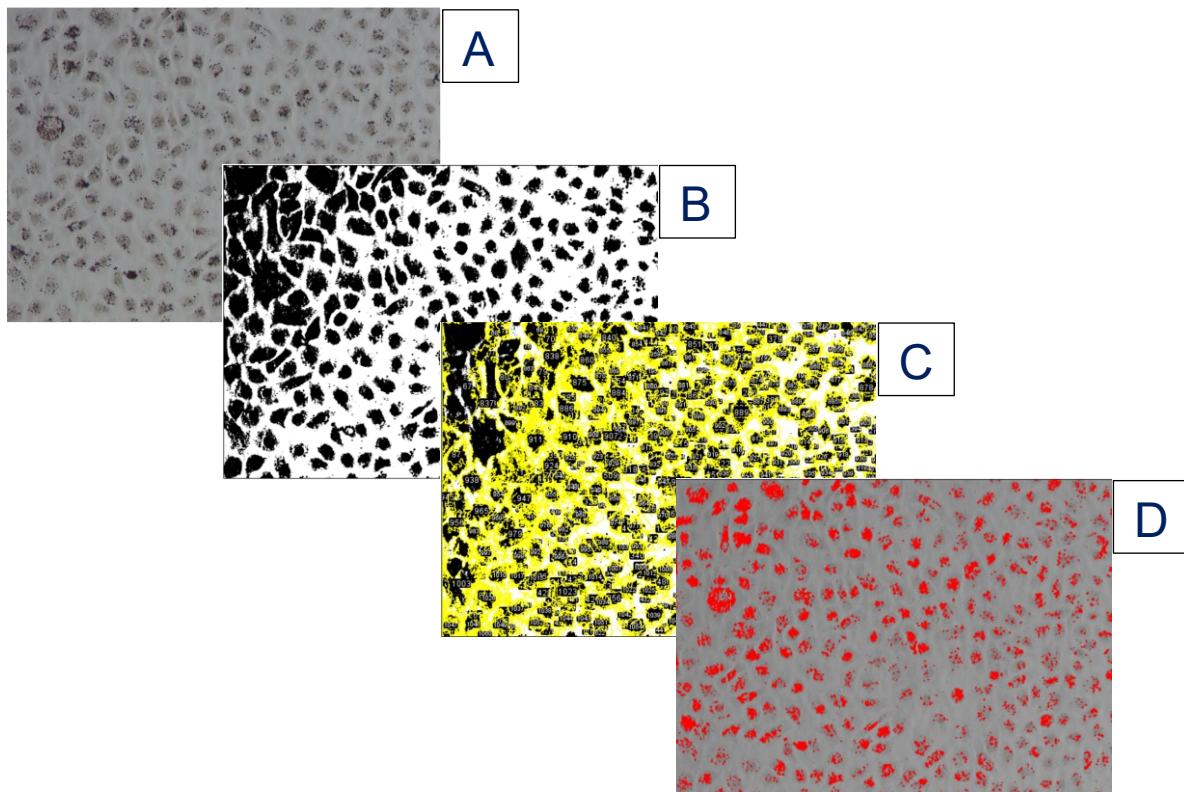
---

5 min	Inkubation in 60-prozentigem Isopropanol Entnahme Isopropanol
20 min	Färben in Oil Red O Lösung, leichtes schwenken Entnahme Oil Red O Solution
2-5-mal	Waschen der Zellen mit Wasser bis keine Färberückstände mehr sichtbar sind
7 min	Färben in Hämatoxylin
2-5-mal	Waschen der Zellen mit Leitungswasser bis keine Färberückstände mehr sichtbar sind

---

### 3.2.12 Quantitative Auswertung der Lipidfärbung

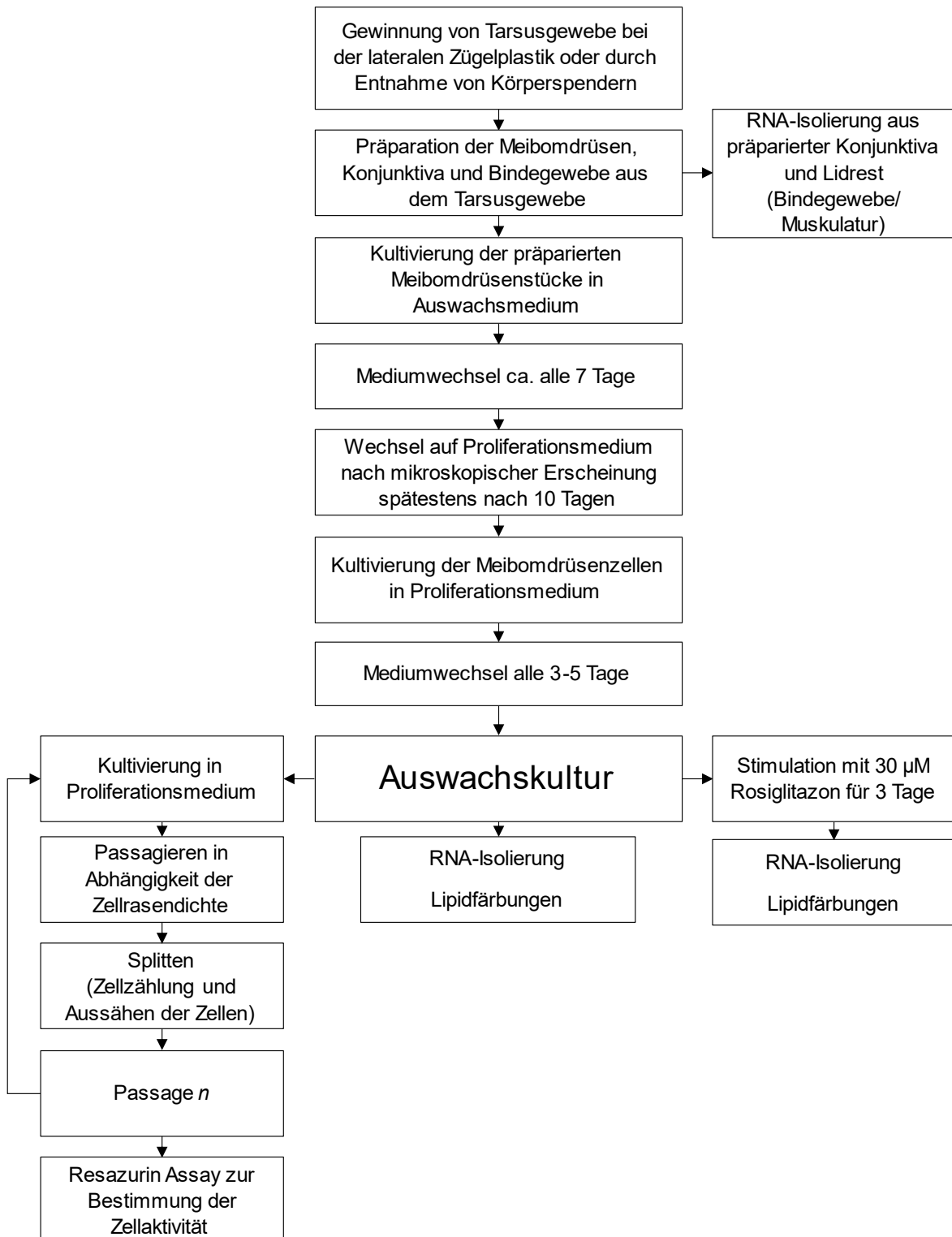
Die quantitative Auswertung der Lipidfärbung erfolgte an Oil Red O gefärbten Meibomdrüsenepithelzellen durch Bildanalyse der Mikroskopieaufnahmen. Die primären Meibomdrüsenzellkulturen wurden nach der Färbung und Fixierung auf einem Objektträger mikroskopisch aufgenommen. Dabei wurden 10 zufällig ausgewählte Sichtfelder pro Zellkultur mikroskopisch bei 20-facher Vergrößerung dokumentiert. Die Mikroskopieaufnahmen wurden mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ (Version 1.53k) analysiert. Zunächst wurde die Zellfläche jeder einzelnen Zelle bestimmt und zur Gesamtfläche summiert. Die mit Oil Red O gefärbten Lipidvesikel innerhalb einer Zelle wurden mit einem zur Farbintensität festgelegten Schwellenwert (Threshold 23/115) detektiert, um daraus die Lipidfläche innerhalb der einzelnen Zelle zu bestimmen. Der relative Lipidanteil einer Zelle wurde anschließend durch Division der versehenen Lipidfläche durch die Gesamtzellfläche berechnet. Um die Auswirkungen zufälliger Schwankungen der Farbeintensität und der Bildgebung zu verringern, wurden alle Deckgläser jedes Experiments am selben Tag gefärbt und ausgewertet.



**Abbildung 7** Quantitative Auswertung der Lipidfärbung mit ImageJ

Ausgehend von einem zufällig ausgewähltem Sichtfeld (Bild A) werden in einem ersten Schritt die Zellen erkannt und farblich abstrahiert (Bild B), sodass dann die Fläche der einzeln erkannten Zellen berechnet werden kann (Bild C, gelb umrandete Zellen; nummeriert). Nicht erkannte oder überlagerte Zellen werden manuell verbessert. Die gefärbten Lipidvesikel werden als Partikel über eine Farb- und Intensitätsschwelle selektiert und anschließend vermessen (Bild D).

### 3.2.13 Überblick über das Arbeitsprogramm



**Abbildung 8** Überblick über das Arbeitsprogramm zur Etablierung einer primären Meibomdrüsenkultur

### 3.3 Statistik

Die statistische Auswertung und Datenanalyse erfolgte mittels SPSS (IBM SPSS Statistics Version 23). Für die Auswertung der Zellkulturen wurden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus gleich kultivierten und inkubierten Zellkulturen herangezogen. Als statistisches Testverfahren wurde für Mittelwertvergleiche zwischen zwei normalverteilten Gruppen ein zweiseitiger  $t$ -Test für unabhängige Stichproben mit stetiger Zielgröße gewählt. Für Mehrgruppenvergleiche erfolgte die Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse (engl. analysis of variance; ANOVA). Als Voraussetzung für die Anwendung parametrischer Tests wurde die Zielgröße auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test geprüft. Erfüllte der Datensatz nicht die Annahme zur Normalverteilung, schaffte eine Gleichbesetzung der einzelnen Gruppen Abhilfe. Dies erzeugt zwar keine Normalverteilung, ermöglicht jedoch die Durchführung parametrischer Tests, da die Schätzer des Verfahrens bei Gruppen gleicher Größe als besonders robust gelten, selbst wenn keine Normalverteilung vorliegt (195, 196). Neben der Prüfung auf Normalverteilung wurden die Daten für jede Gruppe außerdem auf Varianzhomogenität getestet (Levene-Test). Bei Varianzhomogenität und signifikanter ANOVA schloss sich zur Identifizierung der sich unterscheidenden Gruppen der Tukey post-Hoc-Test an. Bei Varianzheterogenität wurde der Welch-Test (Welch ANOVA) auf Signifikanz geprüft. Bei signifikantem Welch-Test schloss sich zur Identifizierung der sich unterscheidenden Gruppen der Games-Howell post-Hoc-Test an. Der Vergleich von mehr als zwei unabhängigen nicht normalverteilten Stichproben auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test (H-Test). Der Kruskal-Wallis-Test prüft nicht-parametrische Stichproben durch Rangbildung der abhängigen Variable auf Signifikanz. Für die vorliegende Arbeit wurde ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  festgelegt. Folglich konnte für alle Tests ein Unterschied als signifikant beziehungsweise als hoch signifikant angesehen werden, sofern für die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$ , beziehungsweise  $p < 0,01$  erfüllt war (197). Die Effektstärken werden, gegebenenfalls nach erfolgter Umrechnung, in Cohens  $d$  angegeben. In der Literatur gelten für die Effektstärke  $d$  nach Cohen folgende anerkannte Richtwerte:  $d > 0,2$  entspricht einem kleinen Effekt,  $d > 0,5$  entspricht einem mittleren Effekt,  $d > 0,8$  entspricht einem starken Effekt.

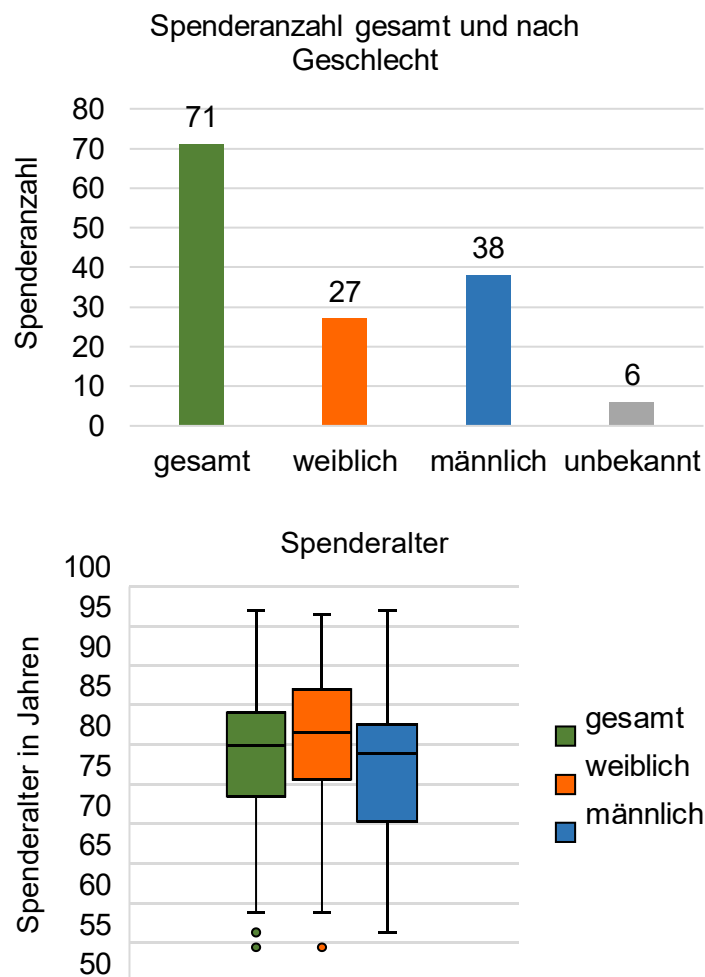
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Etablierung der primären Meibomdrüsenzellkulturen

#### 4.1.1 Primäre Meibomdrüsenepithelzellkultur aus Überschussgewebe der lateralen Zügelplastik

##### 4.1.1.1 Zusammensetzung des Spenderkollektivs

Im Rahmen der lateralen Zügelplastik konnte von 71 Patienten überschüssiges Gewebematerial als Ausgangsmaterial zur Etablierung der primären Zellkultur gewonnen werden. Das Spenderkollektiv setzte sich aus 38 Männern, 27 Frauen und 6 Personen mit unbekanntem Geschlecht zusammen. Das Spenderalter lag zwischen 54 und 96 Jahren zum Operationszeitpunkt, im Durchschnitt bei 77,6 Jahren ( $SD = 9,74$ ). Im Median waren die Spender zum Zeitpunkt der Operation 79 Jahre alt. Frauen waren gegenüber Männern bei der Operation im Durchschnitt 3,8 Jahre älter. Die genaue Darstellung der Zusammensetzung des Spenderkollektivs findet sich im Anhang (siehe Anhang A, Tabelle A1).

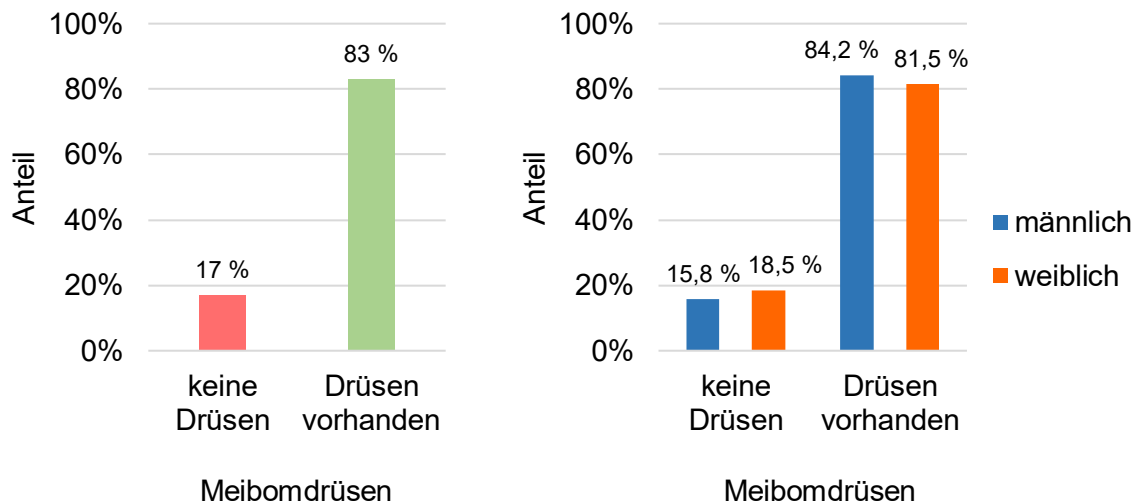


**Abbildung 9** Zusammensetzung des Spenderkollektivs



#### 4.1.1.2 Prävalenz atrophiertes Meibomdrüsen im Spenderkollektiv

Aus den erhaltenen 71 Gewebeproben konnten bei 59 Gewebeproben Meibomdrüsen in unterschiedlicher Menge präpariert werden. 12 Gewebeproben zeigten bei der Präparation unter dem Mikroskop keine oder nur stark atrophierte Meibomdrüsen, sodass insgesamt von 59 Proben Meibomdrüsenstücke kultiviert wurden. Die beobachtete Prävalenz atrophiertes oder stark reduzierter Meibomdrüsen betrug im gesamten Spenderkollektiv 16,9 %. Unter Frauen wurde mit 18,5 % ein geringfügig höheres Auftreten gegenüber Männern (15,8 %) festgestellt.

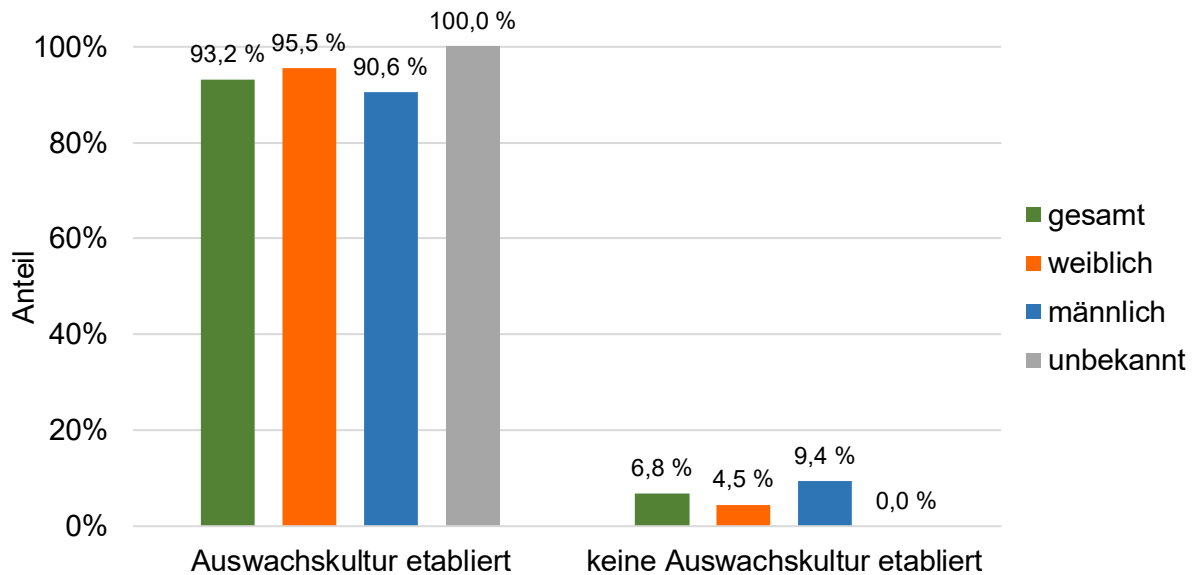


**Abbildung 10** Anteil der Spender mit Meibomdrüsen und Prävalenz der Meibomdrüsen nach Geschlecht

#### 4.1.1.3 Etablierte primäre Meibomdrüsenepithelzellkulturen

Bei 55 der 59 in Kultur genommenen Proben konnte von mindestens einem Meibomdrüsenstück ein Zellauswachsen beobachtet und eine Zellkultur etabliert werden. Dies entspricht einer Etablierungsrate von circa 93,2 %. 29 der etablierten Kulturen entstammte Gewebe männlicher Spender, 21 Kulturen weiblicher Spender und 5 Kulturen Spender unbekannter Daten. Es ist anzumerken, dass nicht von jedem Meibomdrüsenstück einer Probe ein Auswachsen sichtbar war. Von wesentlicher Bedeutung für das Auswachsen ergab sich eine kontinuierliche Adhäsion der Meibomdrüsenstücke am Boden der 6-Well-Mikrotiterplatte. Diese wurde mittels luftblasenfreier Abdeckung der Meibomdrüsenstücke im Medium unter einem Deckgläschen erreicht. Bei 4 Proben konnten auch nach 14 Tagen Kultivierungsdauer mikroskopisch weder Veränderungen der Morphologie um die Meibomdrüsenstücke noch ein Auswachsen festgestellt werden. Drei der Proben stammten von männlichen Spendern und eine Probe von einem weiblichen Spender. Differenziert nach Geschlecht ergeben sich Auswachsrate von etwa 90,63 % für männliche und 95,5 % für weibliche Spender. Damit konnte, wie eingangs in Hypothese 1 und 2 angenommen, gezeigt werden, dass die Etablierung einer primären

Meibomdrüsenepithelzellkultur aus explantierten Meibomdrüsenstücken weitestgehend unabhängig vom Geschlecht zuverlässig und reproduzierbar gelingt.



**Abbildung 11** Etablierte Zellkulturen

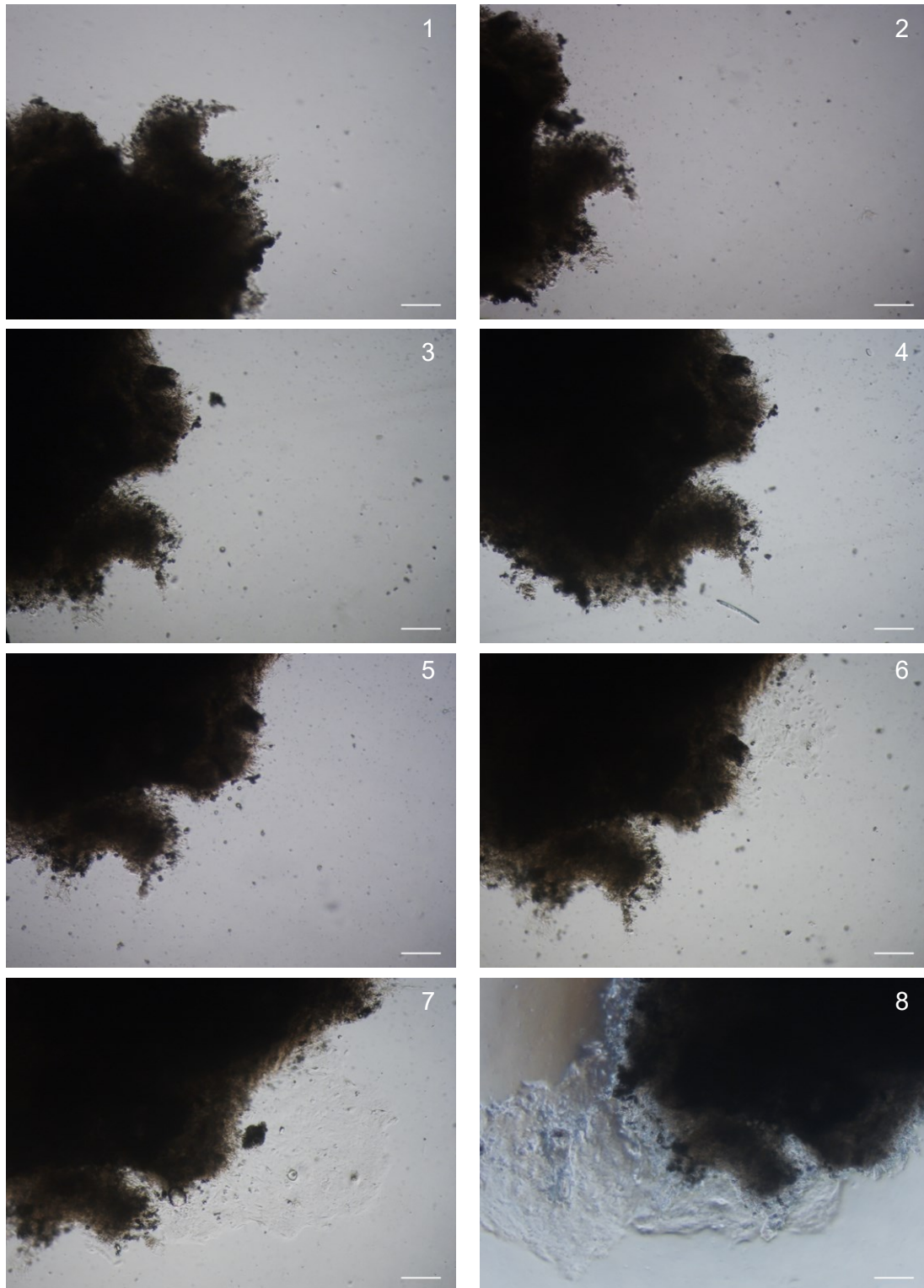
Darstellung des Anteils etablierter Zellkulturen nach Geschlecht. Die Gesamtauswachsrate der Meibomdrüsenstücke betrug 93,2 %. Der Anteil im weiblichen Kollektiv liegt circa 5 Prozentpunkte über dem männlichen Kollektiv.

#### 4.1.2 Primäre Meibomdrüsenepithelzellkultur aus Tarsi von Körperspendern

Die Entnahme von Tarsi erfolgte an insgesamt 5 Körperspendern, wobei jeweils beide Oberlidtarsi entnommen wurden. Das Spenderkollektiv setzte sich aus vier Männern und einer Frau zusammen. Das Sterbealter der Spender lag zwischen 76 und 94 Jahren, im Durchschnitt bei 81,8 Jahren ( $SD = 6,65$ ) und im Median bei 80 Jahren. Die Entnahme erfolgte frühestens 24 Stunden und spätestens 48 Stunden post mortem und bei allen Körperspendern nach der Entnahme der Hornhaut zur Organspende. Aus jedem Tarsi konnten bei der Präparation Meibomdrüsen in verschiedener Menge und makroskopisch unterschiedlicher Qualität präpariert werden. Bei allen in Kultur genommenen Meibomdrüsenstücken konnten auch nach 21 Tagen Kultivierungsdauer unter dem Mikroskop weder Veränderungen der Morphologie um die Meibomdrüsenstücke noch ein Auswachsen beobachtet werden. Drei der Kulturen zeigten zusätzlich eine mykotische Kontamination.

#### 4.1.3 Kultivierung der Gewebestücke, Auswachsen der Zellen und Proliferation der Zellkultur

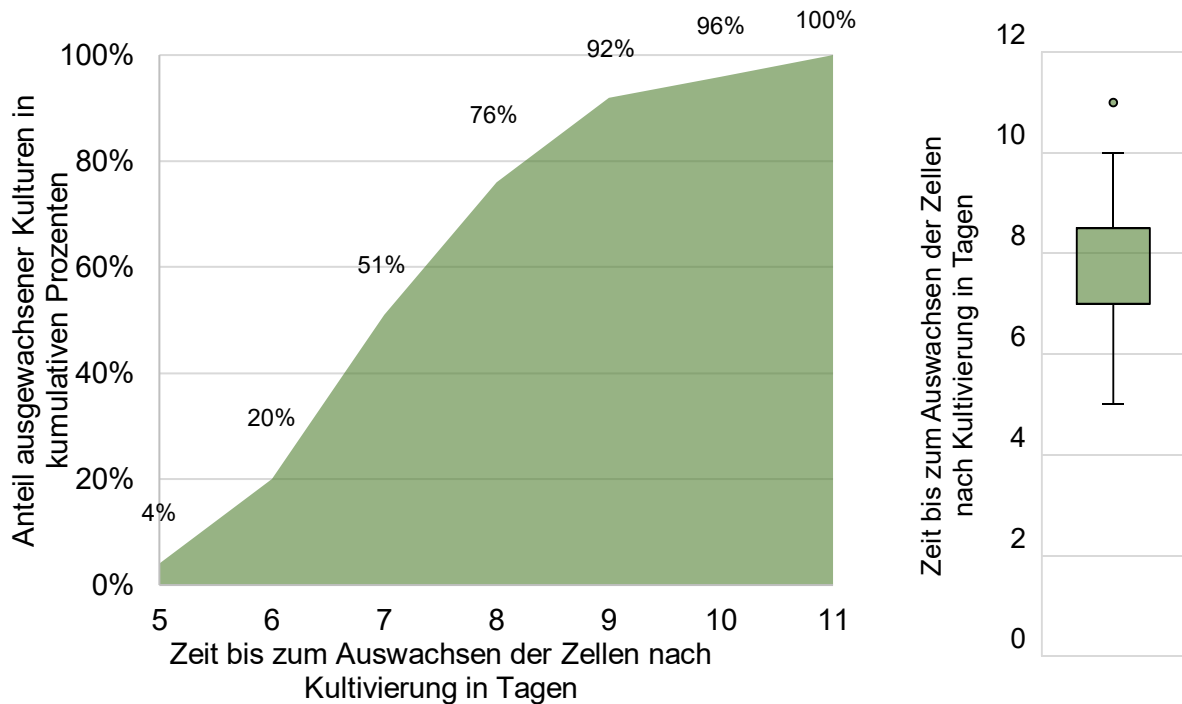
Die Zeit bis zum Auswachsen von kultivierten Meibomdrüsenstücken wurde durch tägliche mikroskopische Beobachtung und Beurteilung der Morphologie bestimmt. Die im Auswachsmedium in Kultur genommenen Gewebeproben durchliefen eine charakteristische morphologische Entwicklung, die in Abbildung 12 dargestellt ist. Das Auswachsen der Zellen stellte sich morphologisch unabhängig von Alter und Geschlecht der Spender dar.



**Abbildung 12** Auswachskultur im zeitlichen Verlauf

Darstellung des Auswachsens eines im Auswachsmedium kultivierten Meibomdrüsenstückes über die Zeit. Die Bildnummerierung entspricht der Kultivierungsdauer in Tagen. An Tag 6 ist erstmals ein Zellsumm sichtbar, der an Tag 8 deutlich abzugrenzen ist. 4-fache Vergrößerung. Der Maßbalken entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

Das Auswachsen der Zellen zeigte sich frühestens nach 5 Tagen durch ein punktuell um die Meibomdrüsenstücke auswachsenden dichten Saum. Im Mittel dauerte das Auswachsen 7,6 Tage, wobei bei den meisten kultivierten Meibomdrüsenstücken das Auswachsen nach 7 Tagen zu beobachten war (siehe Abbildung 13). Wurde nach 11 Tagen kein Auswachsen festgestellt, konnte dies im weiteren Verlauf auch nicht mehr beobachtet werden.

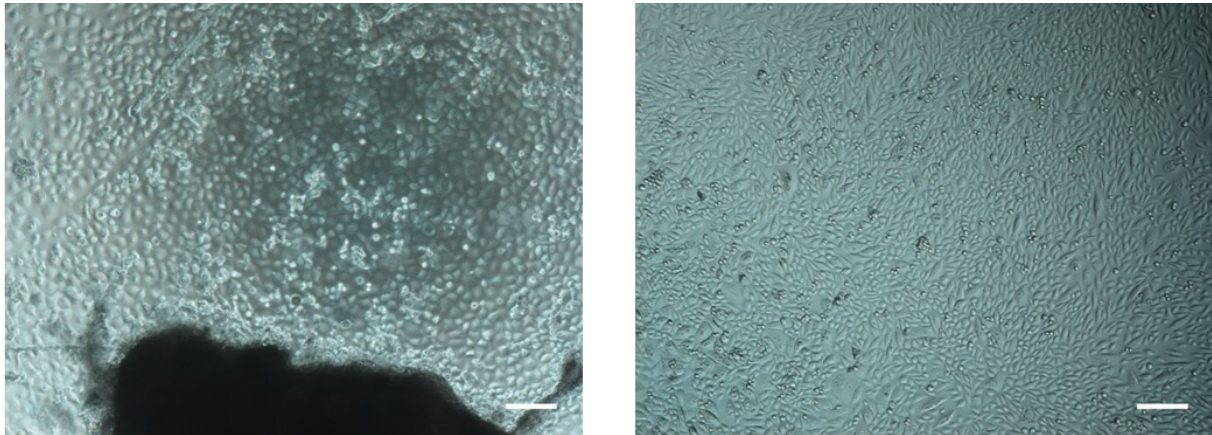


**Abbildung 13** Zeit bis zum Auswachsen der Meibomdrüsenzellen nach Kultivierung

Darstellung des zeitlichen Zusammenhangs zwischen Kultivierungsdauer und beobachtetem Auswachsen des Zellsaums. Das linke Diagramm stellt kumulativ den Anteil der ausgewachsenen Meibomdrüsenzellen über die Zeit dar. Nach 7 Tagen sind bereits 51 % der Proben ausgewachsen, nach 11 Tagen ist der Anteil bei 100 %. Proben, bei denen nach dem 11. Tag kein Auswachsen zu erkennen war, zeigten im Verlauf auch kein Auswachsen mehr. Darstellung der ausführlichen Statistik im Anhang (siehe Anhang B, Tabelle B1).

Der auswachsende Saum nahm bei weiterer Kultivierung im Auswachsmedium im Verlauf begrenzt zu. Verblieben die Zellen in dem Auswachsmedium differenzierten die Zellen bei abnehmender Proliferation rasch und ein anschließendes Passagieren war nicht möglich. Wurde nach dem Beginn des Auswachsens auf das Proliferationsmedium (CnT-BM.1/CnT-57) gewechselt, konnte ein vorzeitiges differenzieren der Zellen verhindert werden. Dies ermöglichte im Verlauf die weitere Proliferation und ein Passagieren der Zellen. Anfänglich zu beobachtende einzelne, kleine, vieleckig bis rundlich erscheinende primäre Meibomdrüsenzellen teilten sich schnell zu Zellkolonien, die im Verlauf in der Größe zunahm, bis sie miteinander konfluieren. Morphologisch imponierte nach 2 bis 4 Tagen das Bild eines kopfsteinpflasterartigen Zellrasens. Die Proliferation der Zellen wurde anhand des lichtmikroskopisch sichtbaren

Wachstumsverhalten beurteilt. Sobald eine Konfluenz der Zellen sowie ein dichter Zellrasen beobachtet wurde, konnten die Zellen passagiert werden. Die eingangs in Hypothese 3 angenommene Proliferationsfähigkeit der Meibomdrüsenzellen konnte somit gezeigt werden.



**Abbildung 14** Proliferation der Zellkultur

Meibomdrüsenzellkultur am 2. Tag nach Wechsel des Mediums auf das Proliferationsmedium. Der Zellsaum der Auswachskultur entwickelt sich zu einzelnen dicht aneinander gelagerten, kopfsteinpflasterartigen Zellen. 4-fache Vergrößerung. Der Maßbalken entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.4 Einfluss der Dauer zwischen Probengewinnung und Kultivierung

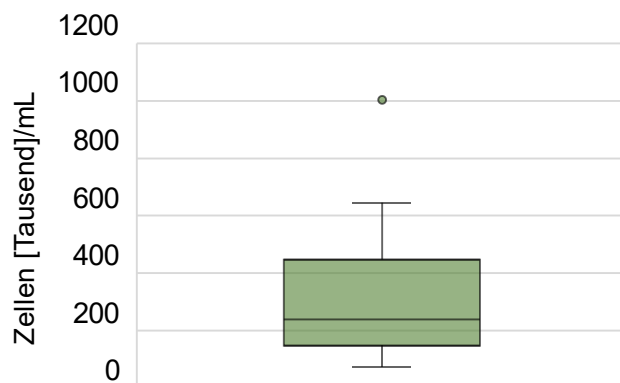
Der Einfluss der Dauer zwischen dem Zeitpunkt der Probengewinnung und dem Zeitpunkt der Kultivierung auf das Auswachsen der Meibomdrüsenstücke wurde untersucht. Die Gewebestücke wurden dafür nach der Operation in DMEM mit 10 % fetalem Kälberserum und Penicillin/Streptomycin bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von Zeiträumen zwischen 24 Stunden nach Entnahme bis zum 7. postoperativen Tag in Kultur genommen. Als Endpunkt wurde das Auswachsen der Meibomdrüsenstücke betrachtet. Dabei zeigte sich unter allen untersuchten Proben bis einschließlich zum 7. postoperativen Tag ein Auswachsen. Eine längere Lagerung ist daher möglich, da auch Zellen auswachsen, wenn die Gewebestücke 7 Tage gelagert wurden.

#### 4.1.5 Passagieren der Zellen

Von den 55 erfolgreich etablierten Auswachskulturen wurden 20 Auswachskulturen für die weitere Kultivierung und das Passagieren der Meibomdrüsenzellen verwendet. Insgesamt wurde von 9 männlichen und 11 weiblichen Spendern die Auswachskultur zum Passagieren verwendet. In Abhängigkeit der mikroskopisch beobachteten Zellrasendichte wurden die Meibomdrüsenzellen gesplittet und neu ausgesät. Im Mittel ergab sich eine Kultivierungsdauer von etwa 19 Tagen zwischen dem Zeitpunkt des Auswachsens bis zum Splitten der Meibomdrüsenzellkulturen. Die Zellzahl der Meibomdrüsenzellen pro Milliliter wurde vor dem ersten Passagieren bestimmt. Im Mittel wurde für eine Spenderprobe die Meibomdrüsenzellzahl von



337.000 Zellen pro ml bei einer Standardabweichung von 240.000 Zellen/ml ermittelt. Bei einer minimalen Zellzahl von 75.000/ml und einem Maximum von 1.002.500 Zellen/ml ergab sich eine hohe Variabilität der primären Zellen, abhängig von den jeweiligen Spendern. In Abbildung 15 ist die Meibomdrüsenzellzahl vor dem ersten Passagieren dargestellt.



**Abbildung 15** Meibomdrüsenzellzahl vor dem ersten Passagieren

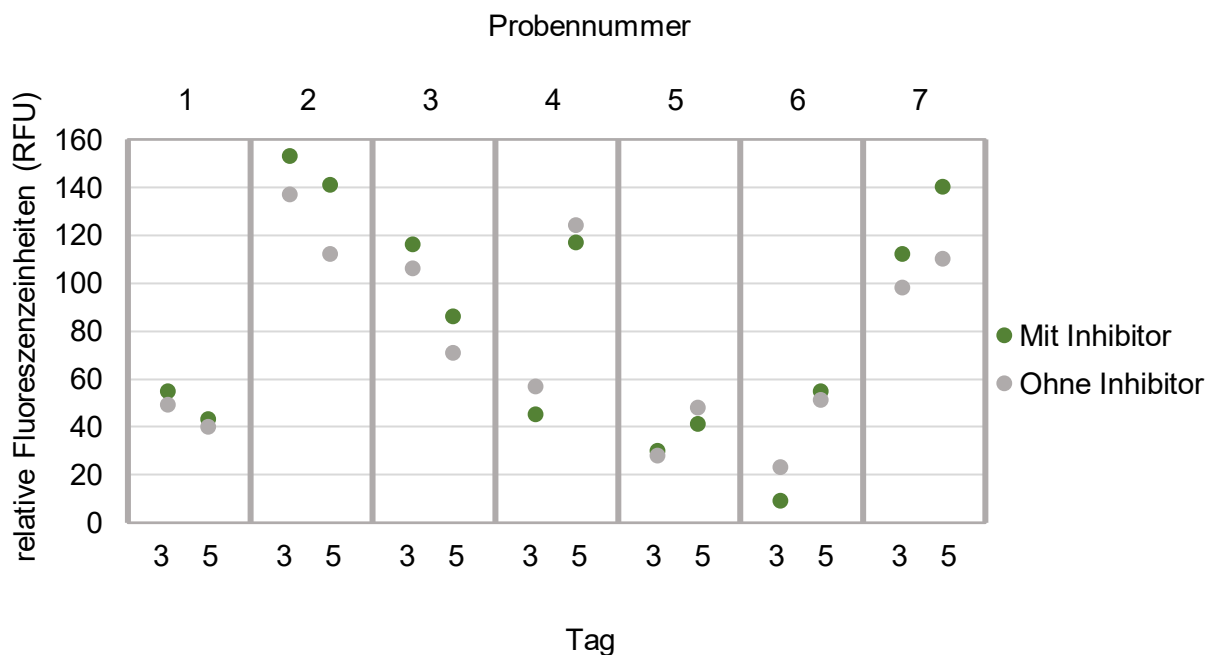
Anzahl der untersuchten Spenderkulturen  $n = 20$ .

Die Kultivierung der primären Meibomdrüsenzellkulturen gelang maximal bis zur dritten Passage, bevor eine Differenzierung und eine Abnahme der Meibomdrüsenzellen zu beobachten war. Diese Veränderungen und Eigenschaften wiesen alle untersuchten Meibomdrüsenzellkulturen unabhängig des individuellen Spenders und deren Geschlechts auf. Eine weitere Kultivierung über die dritte Generation hinaus wurde dadurch limitiert.

#### 4.1.6 Einfluss der Rho-Kinase Hemmung auf die Kultivierung von Meibozyten

Der Einfluss einer spezifischen Hemmung der Rho-Kinase (ROCK) durch den ROCK-Inhibitor (Y-27632) auf die Kultivierung von Meibozyten wurde untersucht. Als gemessener Surrogat-Marker für die in der Literatur beschriebenen vielfältigen Auswirkungen der Rho-Kinase Hemmung auf zelluläre Funktionen, die Zelladhäsion, die Zellproliferation und die Zellmotilität (169) wurde die Zellaktivität herangezogen. Die Zellaktivität wurde mittels Resazurin Assay (siehe Kapitel 3.2.2) in der Einheit der relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) bestimmt. Insgesamt wurden sieben Proben mit je einer ROCK-Inhibitor- und einer Kontrollzellkultur analysiert. In Abbildung 16 sind die jeweilig gemessenen relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) (Y-Achse) der Zellkulturen an den Tagen 3 und 5 (X-Achse) aufgetragen. Messwerte für mit ROCK-Inhibitor inkubierte Zellen sind grün und ohne Inhibitor kultivierte Zellen grau dargestellt. Die gemessenen RFUs lagen über alle Zellkulturen und beide Tage in einem Wertebereich zwischen 9 und 153 RFUs, der Mittelwert betrug 78 RFU ( $SD = 41,5$ ). An Tag 3 lagen die relativen Fluoreszenzeinheiten ohne Inhibitor zwischen minimal 23 und maximal 137, im Mittel bei 71 RFU ( $SD = 40$ ). Mit Inhibitor zwischen 9 und 153 RFU, im Mittel bei 74 RFU ( $SD = 49$ ).

An Tag 5 wurden ohne Inhibitor RFUs zwischen 40 und 124 gemessen. Der Mittelwert betrug 79 RFU ( $SD = 33$ ). Mit Inhibitor wurden minimal 41 und maximal 141 RFU gemessen, bei einem Mittelwert von 89 ( $SD = 41$ ). Tendenziell wurden minimal höhere relative Fluoreszenzeinheiten und damit eine höhere Zellaktivität in mit Inhibitor kultivierten Zellkulturen gemessen (Mittelwerte an Tag 3: 74 RFU mit Inhibitor gegenüber 71 RFU ohne Inhibitor und an Tag 5: 89 RFU mit Inhibitor gegenüber 79 RFU ohne Inhibitor). Bei allen untersuchten Zellkulturen zeigte sich für die aus einer Probe stammenden Zellkulturen die gleiche Entwicklung der Zellaktivität. Während sich die Zellaktivität bei den in Abbildung 16 dargestellten Probennummern 1 bis 3 zwischen den Tagen 3 und 5 verringerte, nahm die Zellaktivität bei den Probennummern 4 bis 7 zu. Während fünf der untersuchten Proben die ursprüngliche Richtung der Aktivitätsunterschiede zwischen Inhibitor- und Kontrollkultur beibehielten, änderte sich bei den Probennummern 5 und 6 diese Richtung. Bei Probe 5 wurde an Tag 3 noch eine minimal höhere Aktivität in der Inhibitorkultur gemessen, die an Tag 5 geringer als die Aktivität in der Kontrollgruppe ausfiel. In Probe 6 verhielt es sich umgekehrt. Ein direkter Einfluss des ROCK-Inhibitors auf die Zellaktivität, wie eingangs in Hypothese 4 vermutet, ist nicht sicher auszumachen.

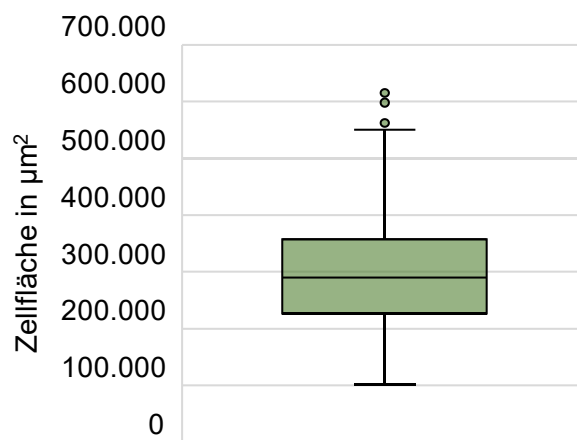


**Abbildung 16** Zellaktivität der Meibomdrüsenzellen im Resazurin Assay

## 4.2 Lipidfärbungen der Meibomdrüsenzellen

### 4.2.1 Lipidfärbungen der basalen Meibomdrüsenepithelzellen

Die mit Sudan III und Oil Red O Lipidfärbung gefärbten Meibomdrüsenepithelzellen wurden nach der Färbung mikroskopisch dokumentiert und analysiert. Es präsentierte sich eine homogene Morphologie kopfsteinpflasterartiger, typisch polygonaler epithelialer Meibomdrüsenzellen (Abbildung 18 und Abbildung 19). Die mit Hilfe der Bildanalysesoftware ImageJ ermittelte durchschnittliche Zellgröße einer basalen Meibomdrüsenzellen betrug etwa  $308.000 \mu\text{m}^2$  ( $SD = 111.349 \mu\text{m}^2$ ). Die Größe der einzelnen Zelle bewegte sich in einem Bereich zwischen etwa  $102.000 \mu\text{m}^2$  und  $615.000 \mu\text{m}^2$ .

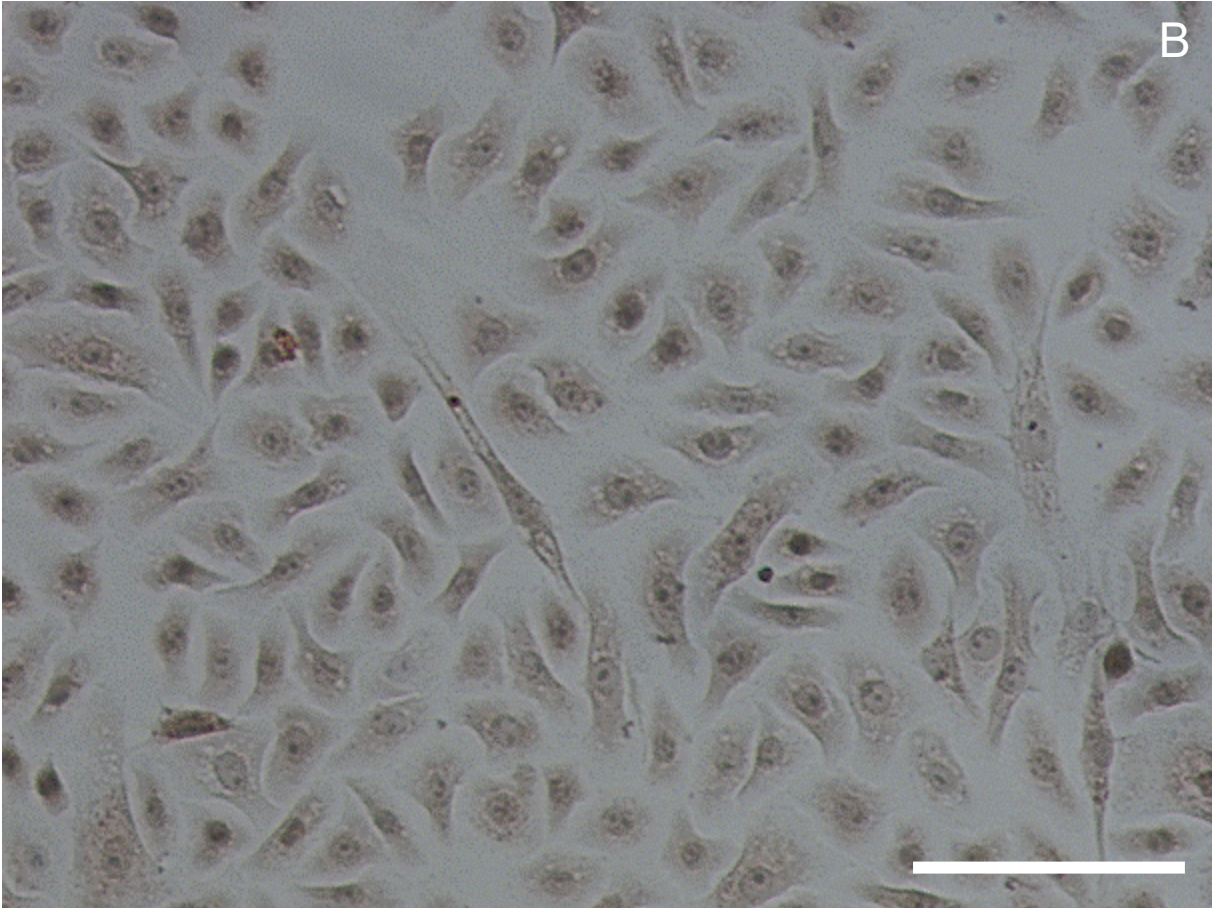
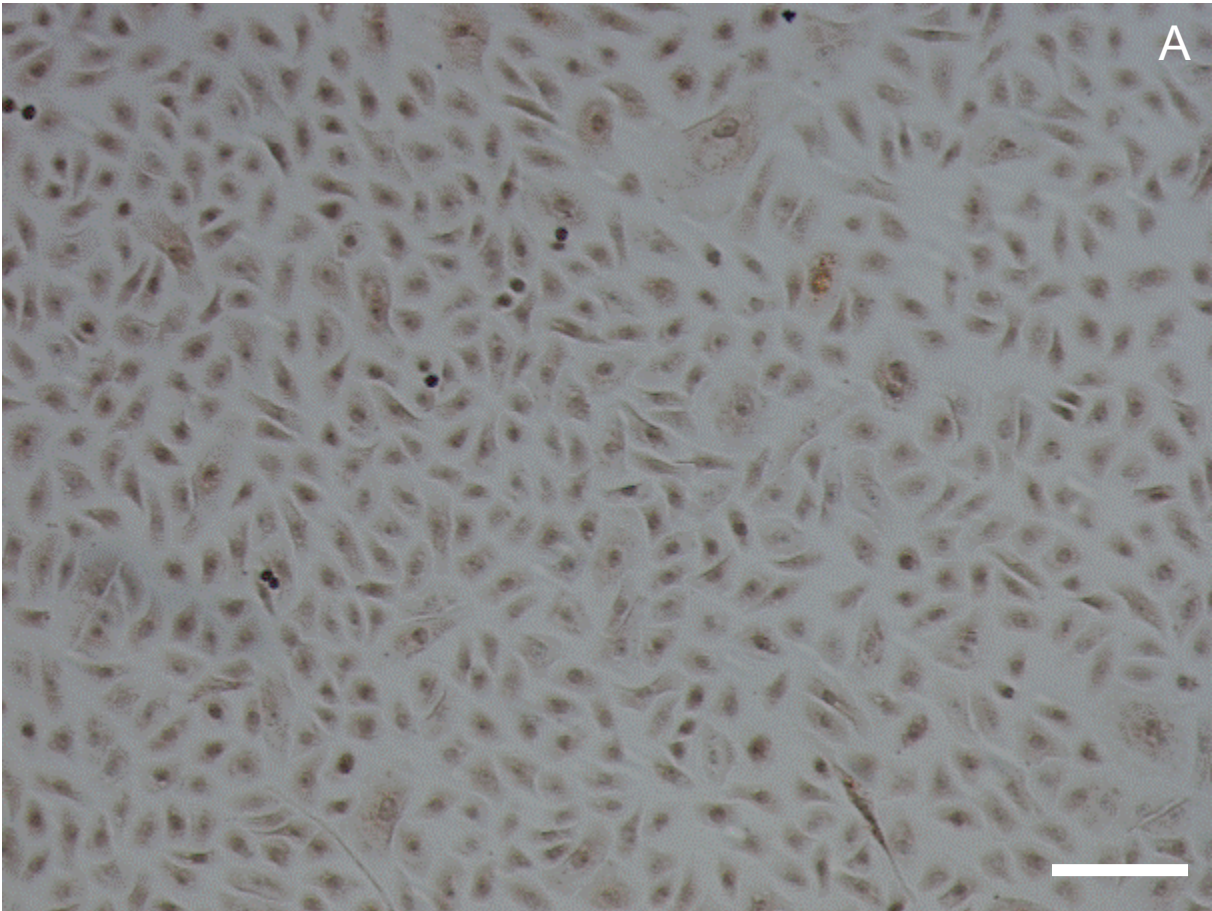


**Abbildung 17** Durchschnittliche Zellfläche der basalen Meibomdrüsen

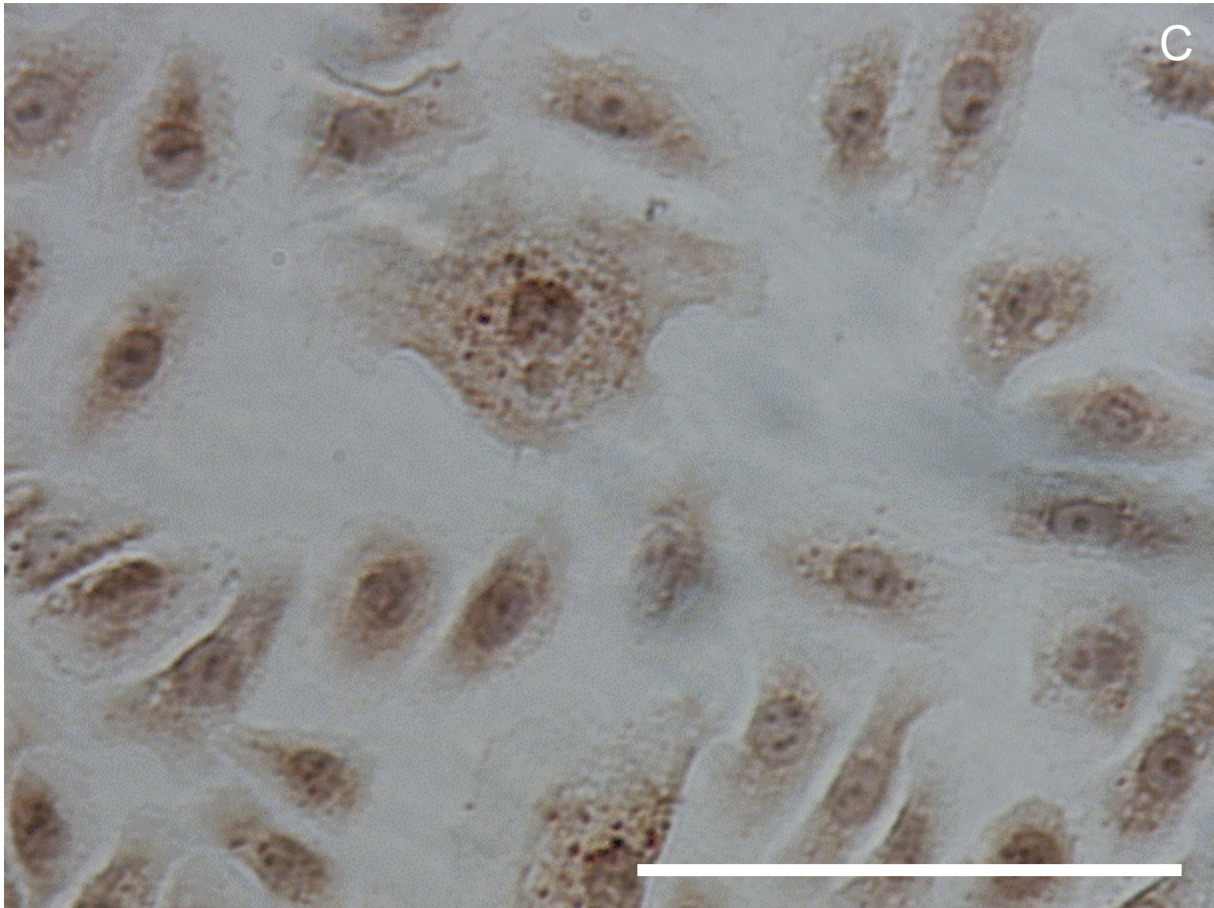
Darstellung der durchschnittlichen Zellfläche in  $\mu\text{m}^2$  der basalen Meibomdrüsenzellen.

Die Sudan III Färbung (Abbildung 18; Bild A) zeigt in 10-facher Vergrößerung einen dichten Zellrasen an Meibomdrüsenepithelzellen. Überwiegend länglich geformte und eher kleine Zellen sowie wenig rundlich geformte und größere Meibozysten prägen das Bild. Insbesondere in höherer Vergrößerung (Abbildung 18; Bild B, 20-fache Vergrößerung und Bild C, 40-fache Vergrößerung) lassen sich verschiedene Stadien des Zellzyklus und sich teilende Zellen, wie Zellen mit zwei Zellkernen zeigen, beobachten. In der Sudan III Färbung der basalen Meibomdrüsenzellen stellen sich die angefärbten Fette beziehungsweise Triglyceride orangerot bis dunkelrot dar. Die Gegenfärbung mit Hämalaun färbt die Zellkerne blau. Perinukleär fallen die mit Sudan III rötlich angefärbten Fette auf. In kleinen Vakuolen im Zytoplasma gelagert umschließen sie den Zellkern.





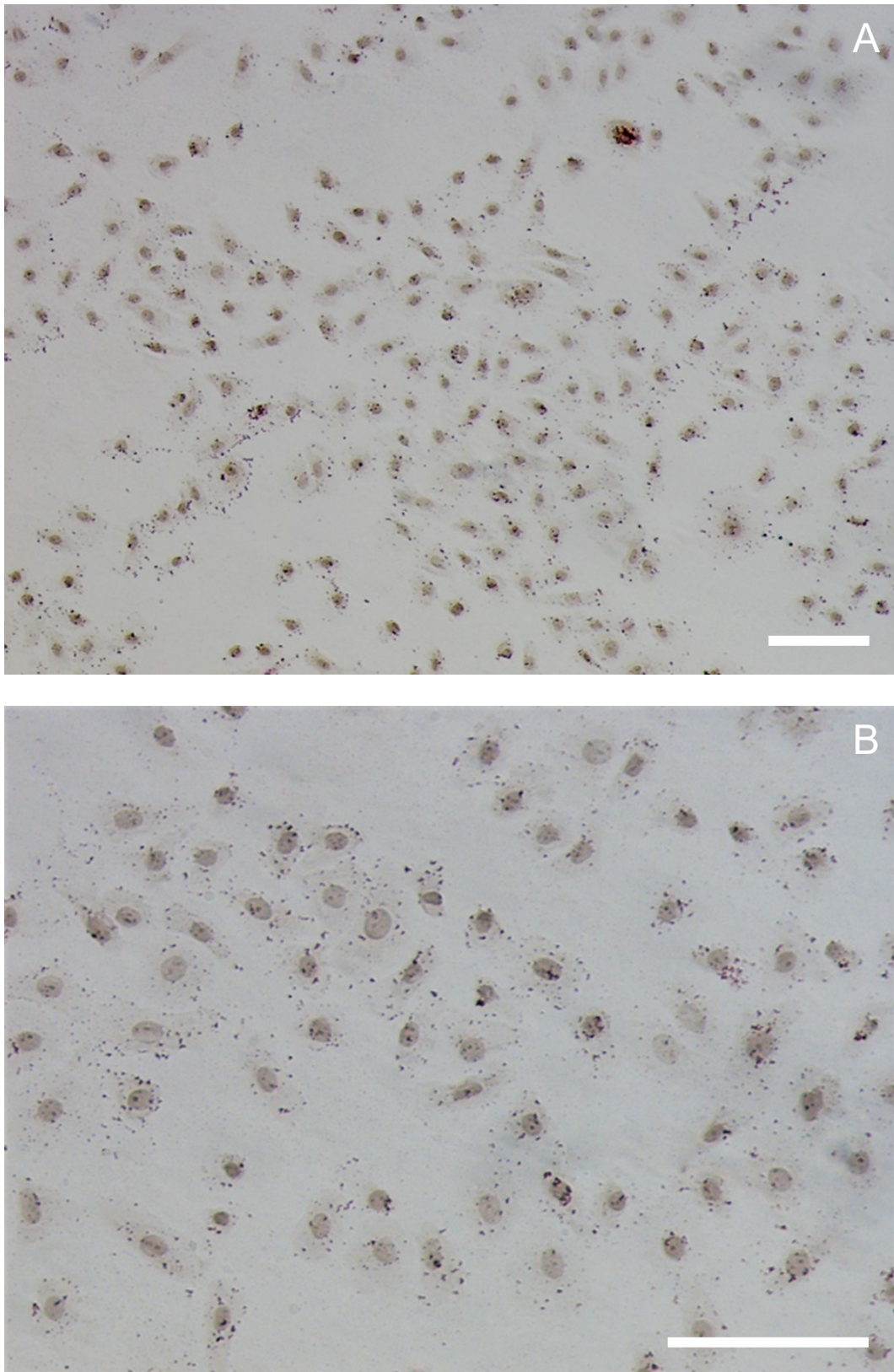




**Abbildung 18** Basale Meibomdrüsenzellen in Sudan III Fettfärbung

Darstellung der Meibomdrüsenzellen in Sudan III Lipidfärbung. Bild A zeigt die Meibozyten bei 10-facher, B bei 20-facher und C bei 40-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop. Der Maßbalken entspricht jeweils 100  $\mu\text{m}$ .

In der Oil Red O Lipidfärbung (Abbildung 19) zeigt sich ein ähnliches Bild der basalen Meibomdrüsenzellen wie in der Sudan III Färbung. Die Oil Red O Lipidfärbung färbt selektiv neutrale Lipide in den kultivierten Meibomdrüsenzellen rot an. Auch hier fallen die perinukleär verteilten roten Farbeinschlüsse im Zytoplasma auf, die den fetthaltigen Einschlüssen in den Meibomdrüsenzellen entsprechen.



**Abbildung 19** Oil Red O Lipidfärbung der basalen Meibomdrüsenzellen

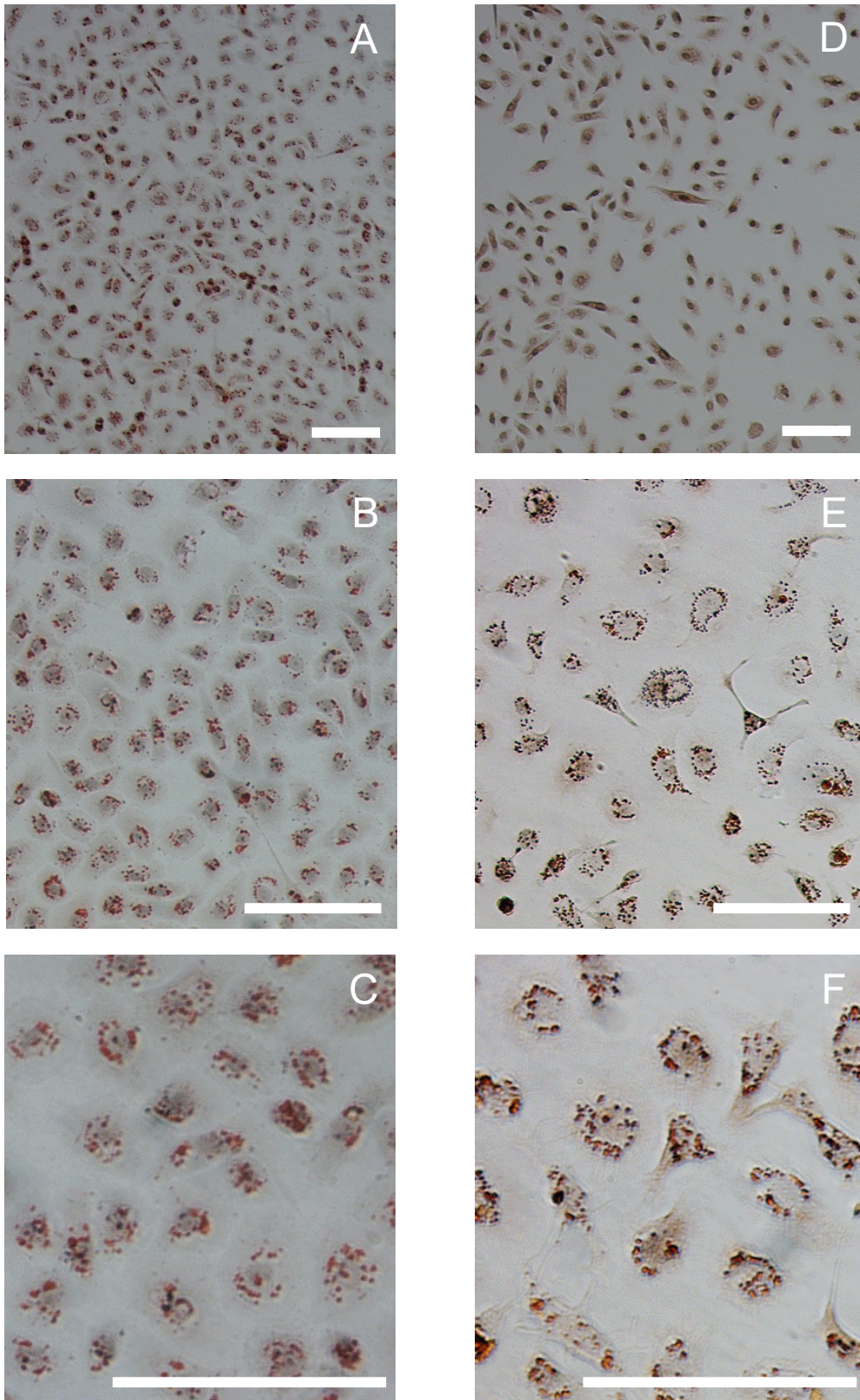
Darstellung der Meibomdrüsen nach Lipidfärbung mit Oil Red O. Bild A zeigt die Meibomdrüsen bei 10-facher, Bild B bei 20-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop. Der Maßbalken entspricht jeweils 100  $\mu\text{m}$ .

In beiden durchgeführten Lipidfärbungen konnten die lipidhaltigen Zelleinschlüsse in charakteristischer Anordnung um den Zellkern nachgewiesen werden. Auffallend ist die tendenziell gesteigerte Menge und Größe der eingeschlossenen Lipide in Meibomdrüsenzellen in Bereichen geringerer Zelldichte. Im Vergleich der Färbungen (Abbildung 18 und Abbildung 19) stellt die Sudan III Färbung gegenüber der Oil Red O Lipidfärbung den vakuolenartigen Charakter der Lipidvesikel der Meibomdrüsenzellen deutlicher heraus und bildet die verschiedenen Strukturen insgesamt detailreicher ab. Die angefärbten Lipide heben sich in der Oil Red O Färbung hingegen deutlicher von der Umgebung ab, weshalb sie sich für die durchgeführte Bildanalyse als geeignet erwies. Zur objektiven Charakterisierung der Meibomdrüsenzellen wurde der Lipidanteil innerhalb der Meibomdrüsenzellen mit der Bildanalysesoftware ImageJ bestimmt. Im Mittel ergab sich unter allen ausgewerteten Meibomdrüsenzellen jeweils ein Lipidanteil von etwa 7,09 % ( $SD = 0,997$  %) an der Gesamtzellfläche einer Meibomdrüsenzelle. Somit kann die in Hypothese 5 vermutete Lipidproduktion der primären Meibomdrüsenzellen bestätigt werden.

#### 4.2.2 Lipidfärbung nach Stimulation mit PPAR $\gamma$ -Agonisten (Rosiglitazon)

Die Lipidfärbung mit Sudan III und Oil Red O der Meibomdrüsenzellen wurde nach Stimulation mit Rosiglitazon erneut durchgeführt. In Abbildung 20 sind die Meibomdrüsenzellen nach 3-tägiger Inkubation mit 3  $\mu\text{mol/l}$  Rosiglitazon in beiden Färbungen vergleichend in 10-, 20- und 40-facher Vergrößerung dargestellt.



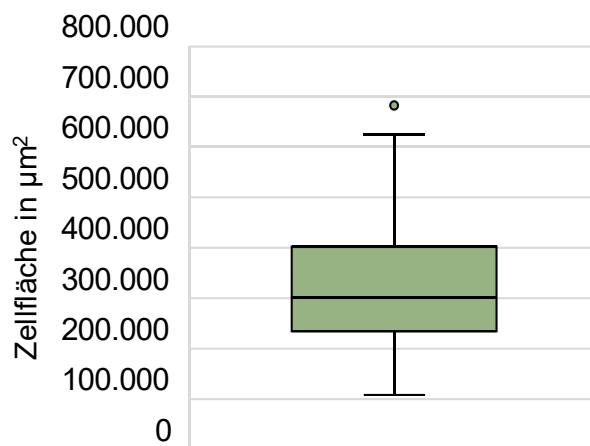


**Abbildung 20** Lipidfärbung nach Stimulation mit Rosiglitazon

Meibomdrüsenzellen nach Stimulation mit Rosiglitazon in den Bildern A, B, C in Oil Red O Färbung. Bilder D, E, F in Sudanfärbung. 10-fache (Bilder A, D), 20-fache (Bilder B, E) und 40-fache (Bilder C, F) Vergrößerung. Der Maßbalken entspricht jeweils 100 µm.

Auffallend sind die mittels Lipidfärbung angefärbten Lipideinschlüsse im Zytoplasma in perinukleärer Anordnung. Insbesondere in 40-facher Vergrößerung (Bild C und Bild F in Abbildung 20) fällt die ringartige Anordnung der Lipideinschlüsse um den Zellkern auf. Die Lipide finden sich in kleinen Vesikeln verteilt im Zytoplasma vor und sind nicht frei im Zytoplasma gespeichert, wie vor allem in Bild F der Abbildung 20 deutlich wird.

Die Bildanalyse der mit Rosiglitazon stimulierten Meibomdrüsenzellen zeigte eine durchschnittliche Zellgröße von etwa  $322.000 \mu\text{m}^2$  ( $SD = 123.204 \mu\text{m}^2$ ). Die Größe der einzelnen Meibomdrüsenzellen variierte in einem Bereich zwischen  $108.000 \mu\text{m}^2$  und  $683.583 \mu\text{m}^2$ .



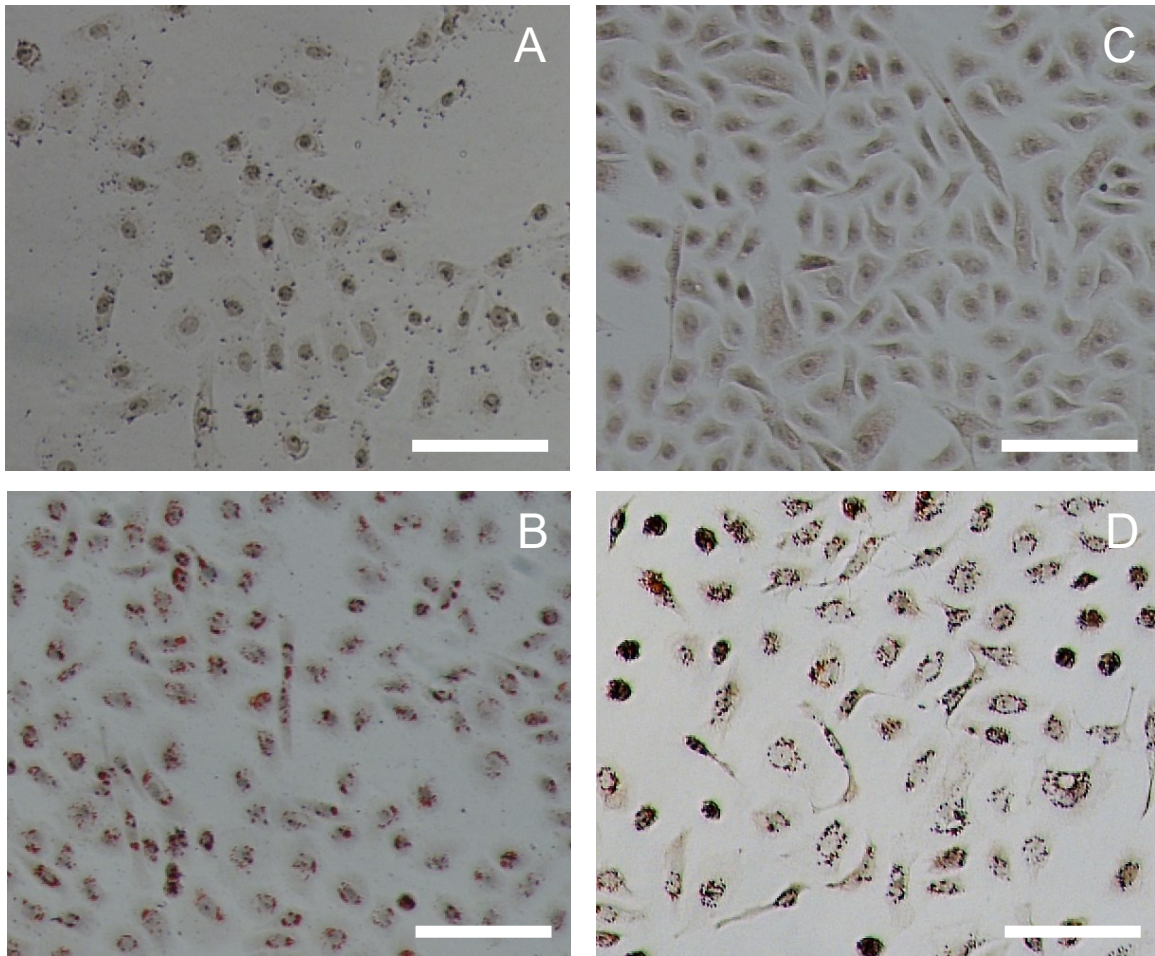
**Abbildung 21** Durchschnittliche Zellfläche der stimulierten Meibomdrüsenzellen

Darstellung der durchschnittlichen Zellfläche in  $\mu\text{m}^2$  der stimulierten Meibomdrüsenzellen.

#### 4.2.3 Vergleich der Lipidfärbungen der basalen mit den mit PPAR $\gamma$ -Agonisten stimulierten Meibomdrüsenzellen

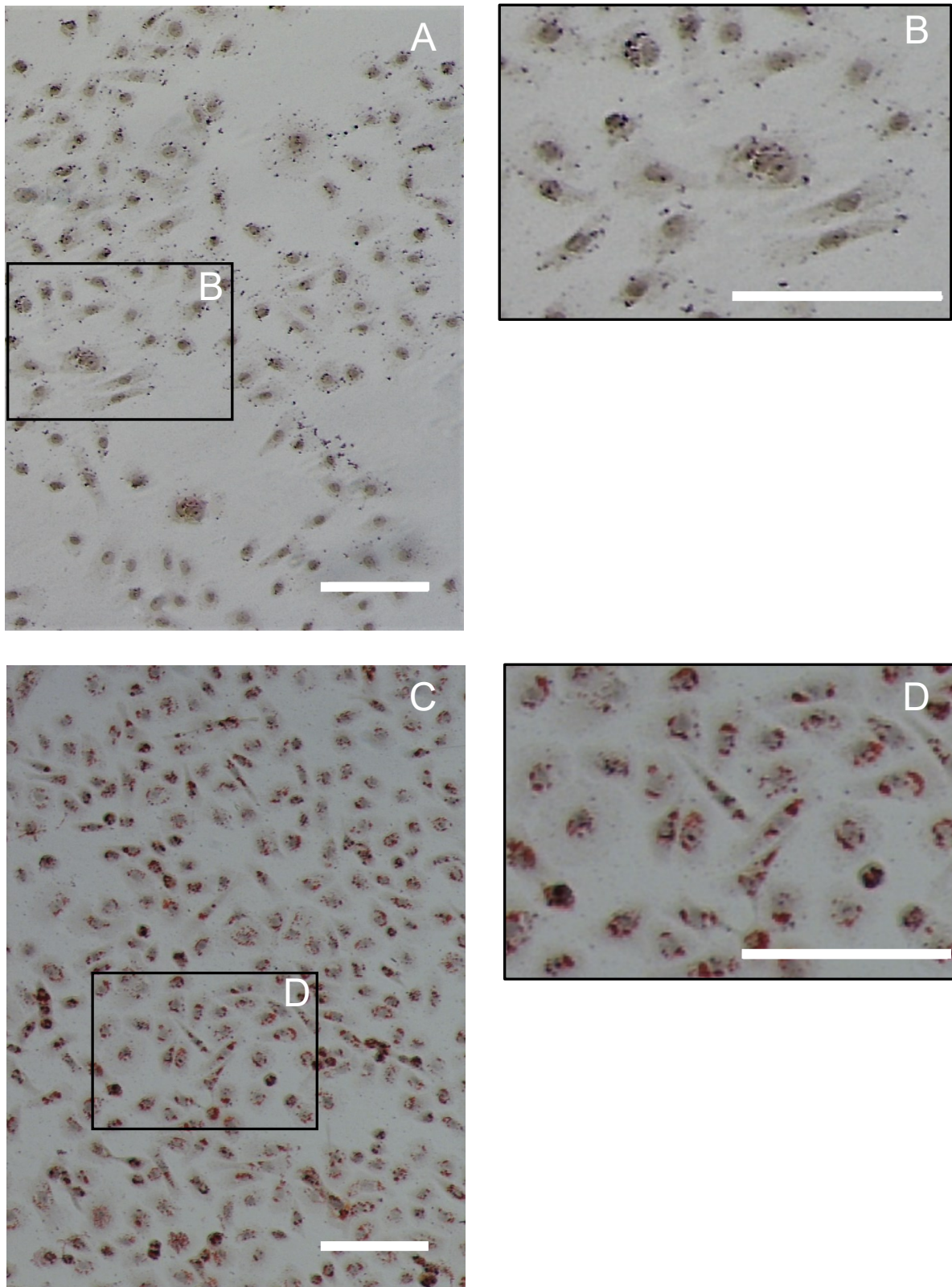
Im Folgenden werden die mit dem PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon stimulierten Meibomdrüsenzellen mit nicht stimulierten, basalen Meibomdrüsenzellen verglichen. Die stimulierten Meibomdrüsen entsprechen der Interventionsgruppe, die nicht stimulierten Meibomdrüsen der Kontrollgruppe. Der Einfluss von Rosiglitazon auf die Lipidproduktion der Meibomdrüsen wird untersucht. Im direkten Vergleich mit den basalen Meibomdrüsenzellen (Abbildung 22; Bild A und Bild C) nimmt rein visuell betrachtet die Menge an Lipid nach Stimulation mit Rosiglitazon deutlich zu (Abbildung 22; Bild B und Bild D). Sowohl der von den Lipiden eingenommene Anteil der Zellfläche als auch ihre Dichte und angefärbte Intensität sind stark erhöht. Die Größe und die förmliche Erscheinung der Meibomdrüsenzellen stellt sich nach Stimulation unverändert dar. Diese Aspekte werden detaillierter in den Ausschnitten der Abbildung 23 betrachtet.





**Abbildung 22** Vergleich der Lipidfärbung (Oil Red O und Sudan III) von basalen und stimulierten Meibomdrüsenzellen

Bild A und Bild C zeigen die basalen, Bild B und Bild D die mit Rosiglitazon stimulierte Meibomdrüsenzellen. Bild A und B in Oil Red O Färbung. Bild C und D in Sudan III Färbung. Jeweils 10-fache Vergrößerung. Der Maßbalken entspricht jeweils 100  $\mu\text{m}$ .

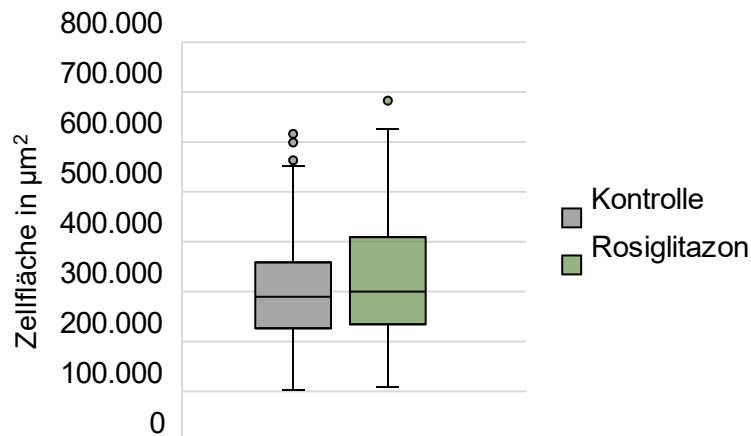


**Abbildung 23** Vergleich der Lipidfärbung (Oil Red O) von basalen und stimulierten Meibomdrüsenzellen

Die Bilder A und B zeigen basale, die Bilder C und D stimulierte Meibomdrüsenzellen. 10-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung im Bildausschnitt. Der Maßbalken entspricht jeweils 100 µm.



Die Bildanalyse zeigte eine vergleichbare durchschnittliche Zellgröße einer stimulierten Meibomdrüsenzellen von etwa  $322.000 \mu\text{m}^2$  mit der Zellgröße einer basalen Meibomdrüsenzellen mit im Mittel  $308.000 \mu\text{m}^2$ , wie in Abbildung 24 deutlich wird. Die gemessene Zellfläche der stimulierten Meibomdrüsenzellen lag im Mittel etwa  $14.000 \mu\text{m}^2$  über der der basalen Meibomdrüsenzellen (95 %-CI[- 41128, 11536]). Der Unterschied der Zellgröße war statistisch nicht signifikant,  $t(306) = -1,106$ ,  $p > 0,05$ . Die Stimulation mit Rosiglitazon veränderte die Zellfläche der einzelnen Meibomdrüsenzellen nicht signifikant.



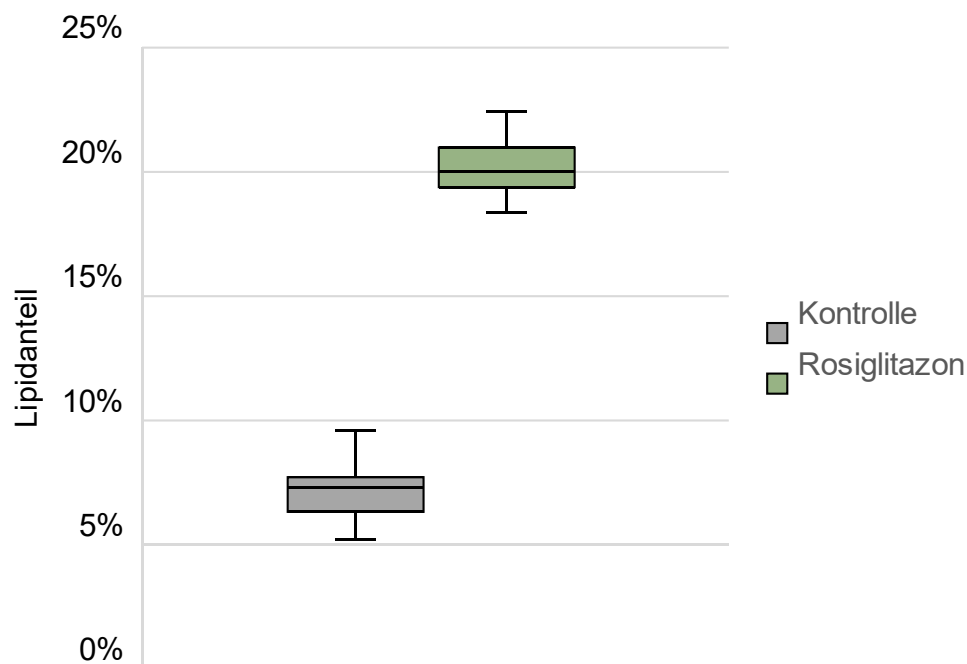
**Abbildung 24** Vergleich der Zellfläche basaler und stimulierter Meibomdrüsenzellen

Die genaue Darstellung samt Teststatistik findet sich im Anhang (siehe Anhang C, Tabelle C1 und Tabelle C2).

Für den quantitativen Vergleich des Lipidanteils an der Zellfläche der basalen und stimulierten Meibomdrüsenzellen wurden von insgesamt 5 Spendern, je 6 Wells, Meibomdrüsenzellkulturen etabliert. 3 Wells wurden mit Rosiglitazon stimuliert, die übrigen 3 Wells dienten als Kontrolle. Nach der Lipidfärbung mit Oil Red O wurden die gefärbten Meibomdrüsenzellen mikroskopisch dokumentiert. Pro Well wurden zwischen 3 und 4 Aufnahmen angefertigt. Anschließend wurde aus insgesamt 104 Aufnahmen (52 Kontroll- und 52 Rosiglitazonaufnahmen) der durchschnittliche Lipidanteil der Meibomdrüsenzellen bestimmt und mittels  $t$ -Test ausgewertet.

Unter Betrachtung der Gesamtheit aller untersuchten Spenderproben ergaben sich die in Abbildung 25 dargestellten Lipidanteile an der Meibomdrüsenzellfläche. Für die mit Rosiglitazon stimulierten Meibomdrüsenzellen wurde ein durchschnittlicher Lipidanteil von 20,16 % ( $SD = 0,95$  %) an der gesamten Zellfläche erfasst. Der Lipidanteil lag in dem Bereich zwischen minimal 18,37 % und maximal 22,43 %. Im Vergleich dazu wurde ein Mittelwert von 7,08 % ( $SD = 0,98$  %) für den Lipidanteil der basalen Meibomdrüsenzellen bestimmt. Die Spannweite lag zwischen minimal 5,23 % und maximal 9,58 % Lipidanteil. Als Voraussetzung für die Durchführung des  $t$ -Tests wurden die Messwerte auf Normalverteilung mithilfe des Shapiro-Wilk-Test geprüft. Beide Gruppen waren gemäß dem Shapiro-Wilk-Test normalverteilt ( $p > 0,05$ ).

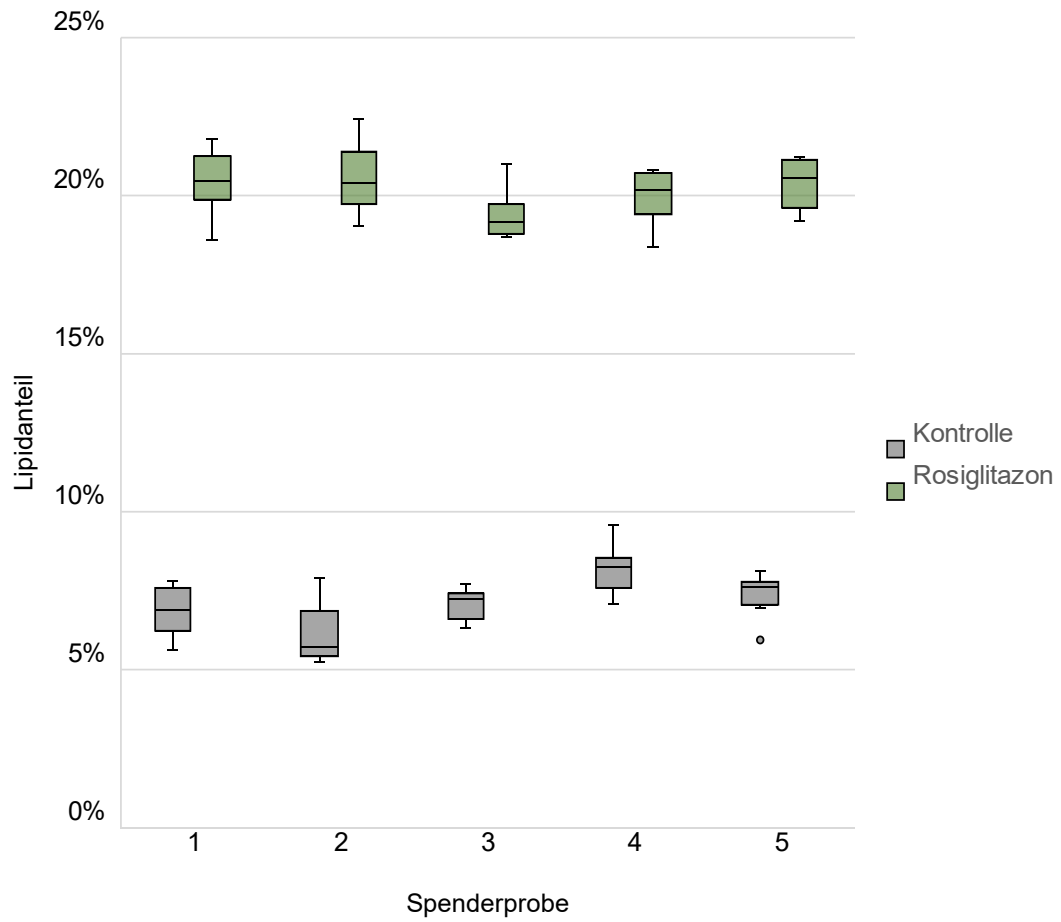
Der gemessene Lipidanteil der stimulierten Meibomdrüsenzellen lag im Mittel 13,07 % über dem der basalen Meibomdrüsenzellen (95 %-CI[12,7, 13,45]). Der Unterschied zwischen den Lipidanteilen ist statistisch hoch signifikant,  $t(102) = 69,17$ ,  $p < 0,001$ . Gemäß Cohen handelt es sich hierbei um einen starken Effekt,  $d = 13,54$  (198). Die Ergebnisse zeigen einen höheren Lipidanteil der Meibomdrüsenzelle nach Stimulation mit Rosiglitazon. Die eingangs aufgestellte Hypothese 6, die Lipidsynthese der Meibomdrüsenzellen wird durch den PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon beeinflusst, wird somit bestätigt.



**Abbildung 25** Vergleich des Lipidanteils zwischen basalen (Kontrolle) und stimulierten (Rosiglitazon) Meibomdrüsenzellen

Die genaue Darstellung samt Teststatistik findet sich im Anhang (siehe Anhang D, Tabelle D1 und Tabelle D2).

In der Einzelauswertung der individuellen Spenderproben sind Unterschiede im Lipidanteil zwischen den basalen und den stimulierten Meibomdrüsenzellen über alle Proben hinweg zu erkennen (Abbildung 26). Der Lipidanteil der stimulierten Meibomdrüsenzellen übersteigt bei allen Proben den der basalen Meibomdrüsenzellen. Die mittleren Lipidanteile der stimulierten Meibomdrüsenzellen bewegen sich zwischen 19,35 % ( $SD = 0,68$  %) und 20,53 % ( $SD = 0,98$  %) gegenüber den basalen Meibomdrüsenzellen mit einem im Mittel relativen Lipidanteil zwischen 5,95 % ( $SD = 0,84$  %) und 8,2 % ( $SD = 0,66$  %). Damit ist sowohl für die einzelne Spenderkultur als auch für die Gesamtheit der primären Meibomdrüsenzellkulturen ein steigender Effekt auf die Lipidproduktion durch Rosiglitazon auszumachen.



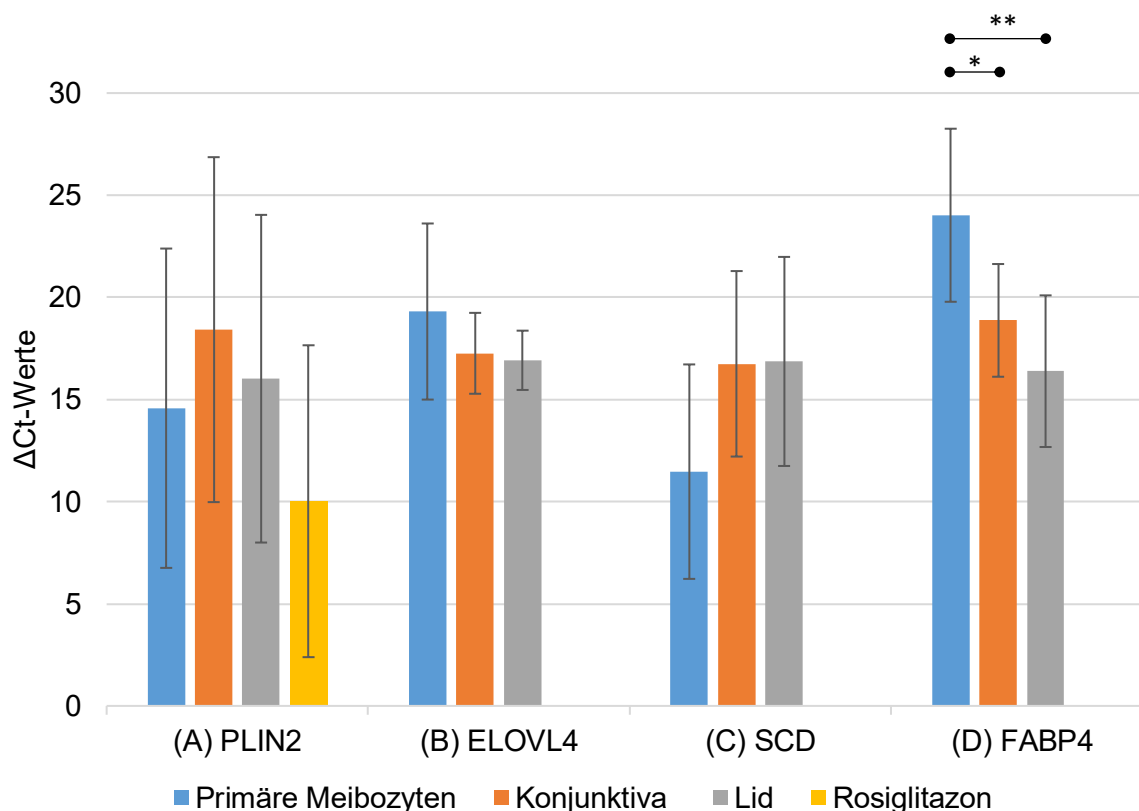
**Abbildung 26** Vergleich des Lipidanteils zwischen basalen und stimulierten Meibomdrüsenzellen der einzelnen Spenderproben

### 4.3 Genexpression der Meibomdrüsenzellkultur

Zur Charakterisierung der etablierten Zellkulturen und zur Identifikation eines möglichen Genmarkers für primäre Meibozyten wurde die Genexpression der primären Meibozyten der Zellkultur, der Konjunktiva und des Lidrestes der gewonnenen Proben untersucht. Der Einfluss von Rosiglitazon auf die Genexpression der primären Meibozyten wurde analysiert. Die Darstellung der Genexpression erfolgt gruppenweise für Markergene des Fettstoffwechsels, der Muzine und der Zytoskelettbestandteile. An Proben von Konjunktiva, Lidgewebe, primären und mit Rosiglitazon stimulierten Meibozyten von 13 Spendern wurden insgesamt 542 RT-PCRs (quantitative PCRs; qPCRs) durchgeführt. Die geringe Ausgangsmenge der mRNA beziehungsweise der cDNA der primären Meibomdrüsenzellen, sowie die erschwerte Aufbereitung der gewonnenen Proben, gestaltete die qPCR-Analyse schwierig. Dies galt insbesondere für mRNA der mit Rosiglitazon stimulierten Meibozyten, deren mittlere Genexpression nur für Gene basierend auf mindestens drei Spendern grafisch dargestellt ist. Die Analyse der Genexpression erfolgt durch Vergleich der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte (normalisierte Genexpression). Dabei gilt, je geringer der  $\Delta\text{Ct}$ -Wert, desto höher die cDNA- beziehungsweise mRNA-Ausgangsmenge und damit die jeweilige Genexpression in der Probe. Die ausführliche Darstellung der Messdaten samt Teststatistiken findet sich im Anhang (siehe Anhang E, Tabelle E1 bis Tabelle E18).

#### 4.3.1 Expression von Genen des Fettstoffwechsels

Die für die Meibozyten bedeutsame Funktion der Lipidsynthese wurde durch Analyse relevanter Gene des Fettstoffwechsels untersucht. Dafür wurde die Genexpression von PLIN2, ELOVL4, SCD und FABP4 für primäre Meibozyten, mit Rosiglitazon stimulierte Meibozyten, Konjunktiva und das Lid untersucht. Die Ergebnisse (mittlere  $\Delta\text{Ct}$ -Werte) sind in Abbildung 27 dargelegt.



**Abbildung 27** Darstellung der Genexpression der Fettstoffwechselgene PLIN2, ELOVL4, SCD und FABP4

(A) Darstellung der Genexpression von PLIN2 in primären Meibozyten ( $n = 9$ ), in Konjunktiva ( $n = 8$ ), in Lidrest ( $n = 8$ ) und in mit Rosiglitazon stimulierten Meibozyten ( $n = 3$ ).

(B) Darstellung der Genexpression von ELOVL4 in primären Meibozyten ( $n = 3$ ), in Konjunktiva ( $n = 4$ ) und in Lidrest ( $n = 4$ ).

(C) Darstellung der Genexpression von SCD in primären Meibozyten ( $n = 7$ ), in Konjunktiva ( $n = 6$ ) und in Lidrest ( $n = 7$ ).

(D) Darstellung der Genexpression von FABP4 in primären Meibozyten ( $n = 7$ ), in Konjunktiva ( $n = 6$ ) und in Lidrest ( $n = 7$ ).

\* signifikant auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$

\*\* hoch signifikant auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,01$

Für PLIN2 zeigten die primären Meibozyten ( $M = 14,57$ ,  $SD = 7,82$ ) und die mit Rosiglitazon stimulierten primären Meibozyten ( $M = 10,02$ ,  $SD = 7,63$ ) geringere  $\Delta\text{Ct}$ -Werte als die Konjunktiva ( $M = 18,42$ ,  $SD = 8,44$ ) und der Lidrest ( $M = 16,02$ ,  $SD = 8,02$ ) (Abbildung 27, Teil A). Die Genexpression für das die Bildung von Lipidtröpfchen fördernde Gen PLIN2 ist damit für die mit Rosiglitazon stimulierten Meibozyten am höchsten gefolgt von den primären

Meibozysten. In Konjunktiva und Lid fällt die Genexpression von PLIN2 geringer aus. Die Berechnung einer einfaktoriellen ANOVA ergab keinen signifikanten Unterschied in der Genexpression von PLIN2 ( $\Delta\text{Ct}$ -Werte) zwischen primären Meibozysten, mit Rosiglitazon stimulierten Meibozysten, Konjunktiva und Lidrest,  $F(3,25) = 0,9$ ,  $p > 0,05$ .

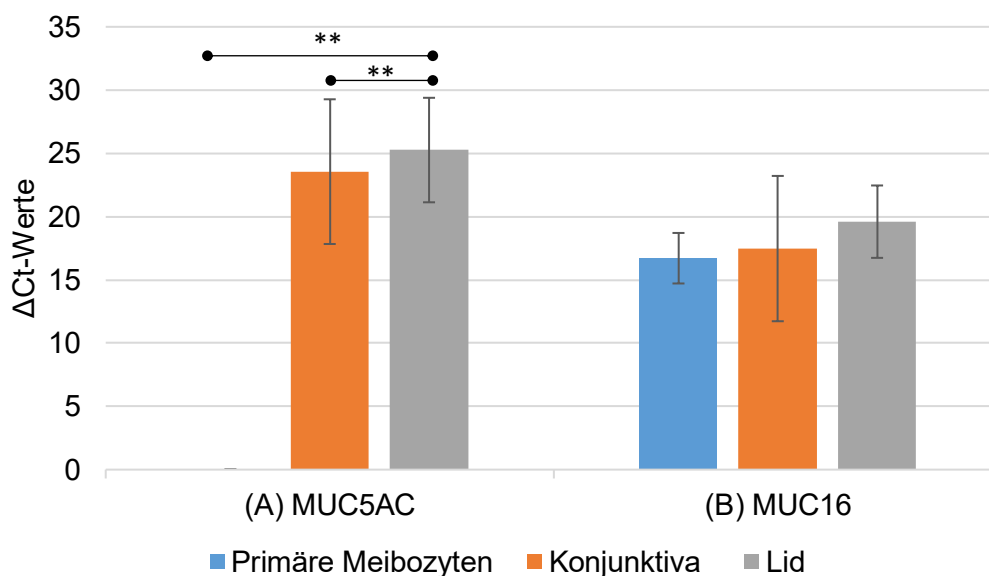
Die Expression von ELOVL4, einem Gen der Lipidsynthese, ergab für die untersuchten Gewebe mittlere  $\Delta\text{Ct}$ -Werte zwischen 16,9 für das Lid und 19,7 für die primären Meibozysten (Abbildung 27, Teil B). Die Unterschiede in der Genexpression zwischen primären Meibozysten ( $M = 19,7$ ,  $SD = 5,19$ ), Konjunktiva ( $M = 17,26$ ,  $SD = 1,98$ ) und Lidrest ( $M = 16,91$ ,  $SD = 1,45$ ) waren nicht signifikant ( $F(2,8) = 0,842$ ,  $p > 0,05$ ). Für mit Rosiglitazon stimulierte Meibozysten konnte die Expression von ELOVL4 ebenfalls nachgewiesen werden.

Die Genexpression von SCD für primäre Meibozysten, Konjunktiva, Lid und mit Rosiglitazon stimulierte Meibozysten wurde untersucht (Abbildung 27, Teil C). SCD codiert für das Enzym Stearoyl-CoA Desaturase, welches an der Bildung von einfach ungesättigten Fettsäuren beteiligt ist. Die niedrigsten mittleren  $\Delta\text{Ct}$ -Werte und damit die höchste mittlere Genexpression zeigten die primären Meibozysten ( $M = 11,46$ ,  $SD = 5,24$ ). Für Konjunktiva ( $M = 16,75$ ,  $SD = 4,54$ ) und Lid ( $M = 16,86$ ,  $SD = 5,12$ ) wurden im Mittel um circa 5 höhere  $\Delta\text{Ct}$ -Werte für SCD gemessen und folglich eine geringere Genexpression. Der Mehrgruppenvergleich mittels einfaktorieller ANOVA lieferte keine Signifikanz für den gemessenen SCD-Expressionsunterschied ( $F(2,17) = 2,59$ ,  $p > 0,05$ ). Auch für Rosiglitazon stimulierte Meibozysten konnte eine Expression von SCD nachgewiesen werden.

Die gemessene Genexpression von FABP4 (codierend für das fatty acid-binding protein 4) zeigte sich am höchsten für das Lid ( $M = 17,31$ ,  $SD = 3,88$ ), gefolgt von der Konjunktiva ( $M = 18,2$ ,  $SD = 2,59$ ) und den primären Meibozysten ( $M = 24,01$ ,  $SD = 4,24$ ) (Abbildung 27, Teil D). Auch für mit Rosiglitazon stimulierte Meibozysten konnte FABP4 nachgewiesen werden. Die Genexpression von FABP4 (gemessen durch die  $\Delta\text{Ct}$ -Werte) unterschied sich statistisch hoch signifikant für die verschiedenen Gruppen ( $F(2,18) = 6,817$ ,  $p < 0,01$ ). Im paarweisen Vergleich zeigte der Tukey post-hoc Test einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) in den  $\Delta\text{Ct}$ -Werten zwischen primären Meibozysten und Konjunktiva. Die Genexpression von FABP4 der primären Meibozysten lag unter der der Konjunktiva, wie ein 5,8 niedriger  $\Delta\text{Ct}$ -Wert für die Konjunktiva untermauert (Differenz der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte zwischen primären Meibozysten und Konjunktiva: 5,8, 95 %-CI[0,19, 11,44]). Die Differenz der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte zwischen primären Meibozysten und Lid betrug 6,7, 95 %-CI[1,87, 11,55]. Dies entsprach einem hoch signifikanten Unterschied ( $p < 0,01$ ) in der Genexpression (bzw.  $\Delta\text{Ct}$ -Werten) von FABP4 zwischen primären Meibozysten und dem Lid. Zwischen der Genexpression von Lid und Konjunktiva ergab sich kein signifikanter Unterschied,  $p = 0,91$ .

## 4.3.2 Expression von Genen der Muzine

Die Expression der Gene für die Muzine MUC5AC und MUC16 wurde für primäre Meibozyten, mit Rosiglitazon stimulierte Meibozyten, Konjunktiva und das Lid untersucht. Abbildung 28 stellt die durch die  $\Delta\text{Ct}$ -Werte gemessene Expression dar.



**Abbildung 28** Darstellung der Genexpression der Muzine MUC5AC und MUC16

(A) Darstellung der Genexpression von MUC5AC in primären Meibozyten ( $n = 6$ ), in Konjunktiva ( $n = 6$ ) und in Lidrest ( $n = 6$ ).

(B) Darstellung der Genexpression von MUC16 in primären Meibozyten ( $n = 11$ ), in Konjunktiva ( $n = 11$ ) und in Lidrest ( $n = 8$ ).

\*\* hoch signifikant auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,01$

Primäre Meibozyten, Konjunktiva und Lidreste wurden auf die Expression des Becherzellmarkers MUC5AC untersucht. Für primäre Meibozyten konnte kein Transkript detektiert werden (Ausnahme: Der  $\Delta\text{Ct}$ -Wert von 0 für MUC5AC bei primären Meibozyten bedeutet kein nachgewiesenes Transkript). Die höchste Genexpression von MUC5AC zeigte die Konjunktiva ( $M = 23,55$ ,  $SD = 5,72$ ) gefolgt von dem Lid ( $M = 25,26$ ,  $SD = 4,13$ ), wie Teil (A) der Abbildung 28 darstellt. Mittels Kruskal-Wallis-Test wurde bei nicht normalverteilter Stichprobe der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte für primäre Meibozyten auf einen signifikanten Unterschied zwischen den Gewebearten getestet. Der Unterschied in der Genexpression von primären Meibozyten, von Konjunktiva und Lid für MUC5AC zeigte sich als hoch signifikant,  $p < 0,01$ . Der paarweise Vergleich zeigte für die höhere Genexpression von MUC5AC der Konjunktiva gegenüber den primären Meibozyten, als auch für die höhere Genexpression des Lids gegenüber der primären Meibozyten einen signifikanten Unterschied,  $p < 0,05$ . Dabei handelt es sich um starke Effekte nach Cohen

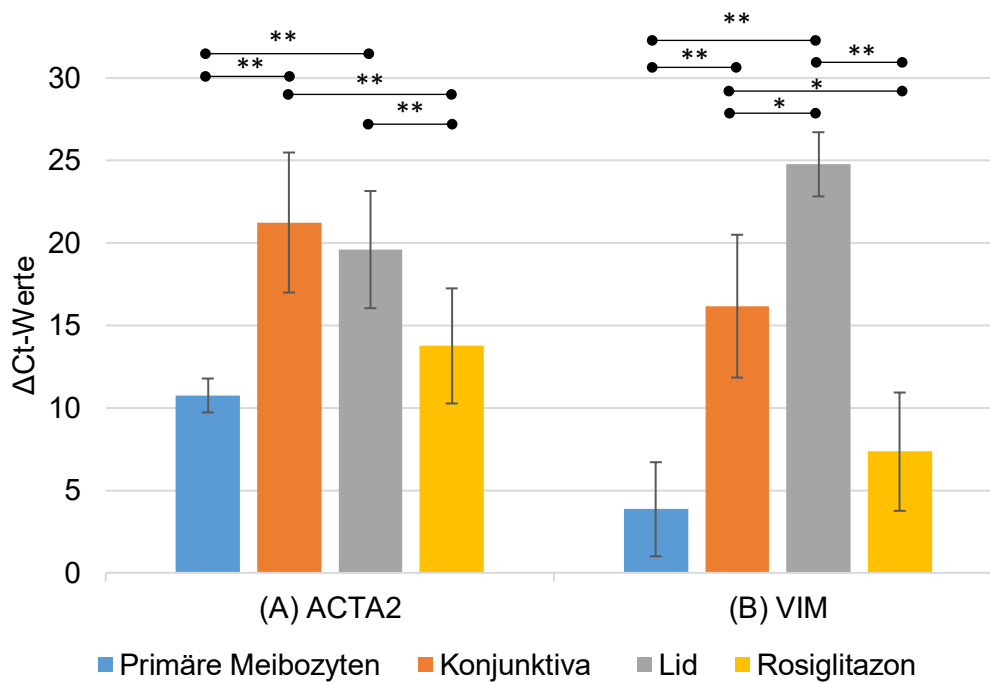
( $d = 2,76$  bzw.  $d = 4,39$ ). Zwischen Konjunktiva und Lid fand sich kein signifikanter Unterschied in der Expression von MUC5AC,  $p = 0,74$ .

Die Expression des Gens MUC16 wurde für primäre Meibozysten, Konjunktiva, Lid und mit Rosiglitazon stimulierte Meibozysten untersucht. Alle untersuchten Gewebe, inklusive der mit Rosiglitazon stimulierten Meibozysten, exprimierten MUC16. Wie in Abbildung 28 Teil (B) dargestellt, finden sich die niedrigsten mittleren  $\Delta\text{Ct}$ -Werte und damit die höchste mittlere Genexpression von MUC16 bei den primären Meibozysten ( $M = 16,71$ ,  $SD = 1,99$ ), dicht gefolgt von der Konjunktiva ( $M = 17,47$ ,  $SD = 5,74$ ) und dem Lid ( $M = 19,6$ ,  $SD = 2,86$ ). Die Unterschiede der Genexpression für MUC16 zwischen den verschiedenen Geweben stellten sich in der durchgeführten einfaktoriellen ANOVA als nicht signifikant dar, ( $F(2,26) = 1,2$ ,  $p > 0,05$ ).

#### 4.3.3 Expression von Genen der Zytoskelettproteine

Die Genexpression der Zytoskelettproteine smooth muscle actin (ACTA2), Vimentin (VIM) und der Keratine 5 (KRT5), 6 (KRT6) und 14 (KRT14) wurde für primäre Meibozysten, mit Rosiglitazon stimulierte Meibozysten, Konjunktiva und das Lid analysiert. In Abbildung 29 erfolgt die Darstellung der gemessenen  $\Delta\text{Ct}$ -Werte von ACTA2 und Vimentin. Die Genexpression der Keratine ist in Abbildung 30 visualisiert.





**Abbildung 29** Darstellung der Genexpression von ACTA2 und Vimentin

(A) Darstellung der Genexpression von smooth muscle actin (ACTA2) in primären Meibozysten ( $n = 11$ ), in Konjunktiva ( $n = 10$ ), in Lidrest ( $n = 9$ ) und in mit Rosiglitazon stimulierten Meibozysten ( $n = 4$ ).

(B) Darstellung der Genexpression von Vimentin in primären Meibozysten ( $n = 4$ ), in Konjunktiva ( $n = 3$ ), in Lidrest ( $n = 3$ ) und in mit Rosiglitazon stimulierten Meibozysten ( $n = 3$ ).

\* signifikant auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$

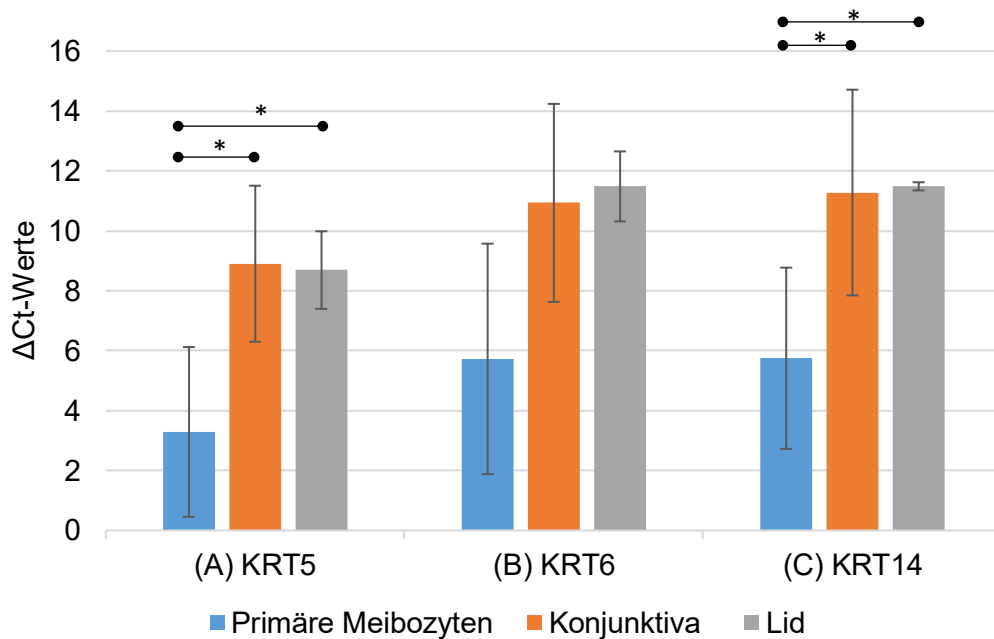
\*\* hoch signifikant auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,01$

Die Genexpression von ACTA2, das für Smooth Muscle Actin (SMA) codiert, wurde untersucht. Die gemessenen mittleren  $\Delta\text{Ct}$ -Werte sind in Teil (A) der Abbildung 29 visualisiert. Dabei zeigte sich die höchste Expression von ACTA2 für die primären Meibozysten ( $M = 10,75$ ,  $SD = 1,03$ ) gefolgt von den mit Rosiglitazon stimulierten Meibozysten ( $M = 13,76$ ,  $SD = 3,49$ ). Konjunktiva ( $M = 21,24$ ,  $SD = 4,25$ ) und Lid ( $M = 19,6$ ,  $SD = 3,55$ ) exprimierten gegenüber den primären Meibozysten weniger ACTA2. Die Genexpression von ACTA2 (gemessen durch die  $\Delta\text{Ct}$ -Werte) unterschied sich statistisch hoch signifikant für die verschiedenen untersuchten Gewebe, Welch-Test  $F(3, 9,45) = 30,8$ ,  $p < 0,01$ . Sowohl der Unterschied von 10,49 der mittleren  $\Delta\text{Ct}$ -Werte der primären Meibozysten gegenüber der Konjunktiva (-10,49, 95 %-CI[-14,31, -6,66]) als auch der Unterschied von 8,85 der mittleren  $\Delta\text{Ct}$ -Werte zwischen den primären Meibozysten und dem Lid (-8,84, 95 %-CI[-12,78, -4,91]), stellten sich im Games-Howell post-hoc Test als hoch signifikant ( $p < 0,01$ ) dar. Die Unterschiede in der

Genexpression von ACTA2 zwischen mit Rosiglitazon stimulierten Meibozyten und Konjunktiva (mittlere Differenz der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte: -7,48, 95 %-CI[-12,66, -2,31]) und zwischen mit Rosiglitazon stimulierten Meibomdrüsen und Lid (mittlere Differenz der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte: -5,84, 95 %-CI[-11,1, -0,58]) zeigten sich im Games-Howell post-hoc-Test ebenfalls als hoch signifikant ( $p < 0,01$ ) (Rosiglitazon gegenüber Konjunktiva) beziehungsweise als signifikant ( $p < 0,05$ ) (Rosiglitazon gegenüber Lid). Zwischen primären Meibozyten und mit Rosiglitazon stimulierten Meibozyten sowie zwischen Konjunktiva und Lid fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression von ACTA2,  $p = 0,45$ .

Für Vimentin, ein Intermediärfilament des Zytoskeletts, zeigte sich die höchste Genexpression, respektive die geringsten mittleren  $\Delta\text{Ct}$ -Werte, für die primären Meibozyten ( $M = 3,86$ ,  $SD = 2,85$ ), gefolgt von den mit Rosiglitazon stimulierten Meibozyten ( $M = 7,35$ ,  $SD = 3,59$ ), der Konjunktiva ( $M = 16,17$ ,  $SD = 4,33$ ) und dem Lid ( $M = 14,77$ ,  $SD = 1,95$ ). Die Berechnung einer einfaktoriellen ANOVA ergab einen hoch signifikanten Unterschied in der Genexpression von VIM (gemessen durch die  $\Delta\text{Ct}$ -Werte) zwischen primären Meibozyten, mit Rosiglitazon stimulierten Meibozyten, Konjunktiva und Lidrest,  $F(3,9) = 27,42$ ,  $p < 0,01$ . Die Expressionsunterschiede von Vimentin zwischen primären Meibozyten und der Konjunktiva (mittlere Differenz der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte: -12,31 95 %-CI[-20,07, -4,56]) als auch zwischen primären Meibozyten und dem Lid (mittlere Differenz der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte: -20,91, 95 %-CI[-28,67, -13,16]) zeigten sich im Tukey post-hoc-Test als hoch signifikant,  $p < 0,01$ . Zwischen primären Meibozyten und mit Rosiglitazon stimulierten Meibozyten fand sich kein signifikanter Unterschied in der Expression von Vimentin,  $p = 0,53$ . Die Expression von Vimentin der mit Rosiglitazon stimulierten Meibozyten gegenüber der Vimentinexpression in der Konjunktiva war signifikant höher (-8,82, 95 %-CI[-17,11, -0,53]) ( $p < 0,05$ ). Gegenüber dem Lid zeigte sich die höhere Vimentinexpression der mit Rosiglitazon stimulierten Meibozyten als hoch signifikant (-17,42, 95 %-CI[-25,71, -9,13]) ( $p < 0,05$ ). Auch der Expressionsunterschied von 8,6  $\Delta\text{Ct}$ -Werten zwischen Konjunktiva und Lid für Vimentin zeigte sich im Tukey post-Hoc Test als signifikant (-8,6, 95 %-CI[-16,89, -0,31]) ( $p < 0,05$ ).

Vor dem Hintergrund der möglichen Hyperkeratinisierung in der Pathogenese der Meibomdrüsendysfunktion wurden die primären Meibozyten, die Konjunktiva und das Lidgewebe auf die Expression der Keratine 5 (KRT5), 6 (KRT6) und 14 (KRT14) untersucht. Abbildung 30 zeigt die mittlere Genexpression der Keratine gemessen in mittleren  $\Delta\text{Ct}$ -Werten.



**Abbildung 30** Darstellung der Genexpression der Keratine KRT5, KRT6 und KRT14

(A) Darstellung der Genexpression von KRT5 in primären Meibozyten ( $n = 4$ ), in Konjunktiva ( $n = 4$ ) und in Lidrest ( $n = 4$ ).

(B) Darstellung der Genexpression von KRT6 in primären Meibozyten ( $n = 4$ ), in Konjunktiva ( $n = 4$ ) und in Lidrest ( $n = 4$ ).

(C) Darstellung der Genexpression von KRT14 in primären Meibozyten ( $n = 4$ ), in Konjunktiva ( $n = 4$ ) und in Lidrest ( $n = 4$ ).

\* signifikant auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$

Für die Keratine 5, 6 und 14 zeigte sich stets die höchste Expression für die primären Meibozyten, gefolgt von der Konjunktiva und dem Lid. Mit Rosiglitazon stimulierte Meibozyten wurden nicht auf die Genexpression der Keratine untersucht.

Die mittlere Keratin 5 Expression für die primären Meibozyten lag bei 3,29 ( $SD = 2,17$ ), für die Konjunktiva bei 8,9 ( $SD = 2,6$ ) und für das Lid bei 8,69 ( $SD = 1,29$ ). Die Berechnung einer einfaktoriellen ANOVA ergab einen signifikanten Unterschied in der Genexpression von KRT5 ( $\Delta Ct$ -Werte) zwischen den Geweben,  $F(2,9) = 7,37$ ,  $p < 0,05$ . Der paarweise Vergleich mittels Tukey post-hoc Test zeigte sowohl gegenüber der Konjunktiva ( $-5,61$ , 95 %-CI $[-10,23, -0,99]$ ) ( $p < 0,05$ ) als auch gegenüber dem Lid ( $-5,4$ , 95 %-CI $[-10,03, -0,78]$ ) ( $p < 0,05$ ) eine signifikant höhere Genexpression von KRT5. Konjunktiva und Lid unterschieden sich in ihrer Genexpression nicht signifikant,  $p = 0,99$ .

Die mittlere Genexpression von KRT6 der primären Meibozyten lag bei 5,72 ( $SD = 3,85$ ), für die Konjunktiva bei 10,9 ( $SD = 3,3$ ) und für das Lid bei 11,48 ( $SD = 1,17$ ). Die Unterschiede in der KRT6 Genexpression stellten sich signifikant dar ( $F(2,9) = 4,47, p < 0,05$ ). Der paarweise Vergleich der KRT6 Expression zwischen den Geweben zeigt keine signifikanten Expressionsunterschiede im anschließenden Tukey post-hoc-Test (jeweils  $p > 0,05$ ).

Für KRT14 wurde die mittlere Genexpression der primäre Meibozyten ( $M = 5,75, SD = 3,02$ ), der Konjunktiva ( $M = 11,28, SD = 3,43$ ) und des Lids ( $M = 11,49, SD = 0,14$ ) gemessen. Die Genexpression zwischen den Geweben unterschied sich signifikant,  $F(2,9) = 6,07, p < 0,05$ . Im anschließenden Tukey post-hoc Test zum paarweisen Vergleich zeigte sich eine signifikant höhere Genexpression von KRT14 der primären Meibozyten sowohl gegenüber der Konjunktiva ( $-5,53, 95\% \text{-CI}[-10,75, -0,31]$ ) ( $p < 0,05$ ) als auch gegenüber dem Lid ( $-5,74, 95\% \text{-CI}[-10,95, -0,51]$ ) ( $p < 0,05$ ). Zwischen der KRT14 Genexpression von Konjunktiva und Lid wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt,  $p = 0,99$ .

## 5 Diskussion

### 5.1 Etablierung der primären Meibomdrüsenepithelzellkulturen

#### 5.1.1 Primäre Meibomdrüsenepithelzellkultur aus Überschussgewebe der lateralen Zügelplastik

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang die Etablierung von 55 primären Auswachskulturen aus Meibomdrüsenepithelgewebe. Aus Überschussgewebe von 29 Männern, 21 Frauen und 5 Spendern unbekannter Daten, konnte die bis heute umfassendste Zellkultur aus Meibomdrüsenepithelgewebe aufgebaut werden. Gerade vor dem Hintergrund der individuellen Unterschiede zwischen den Spendergeweben ist die Größe des Spenderkollektives entscheidend. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Überschussgewebe von Frauen als auch von Männern zur Etablierung primärer Meibomdrüsenepithelzellkulturen geeignet ist. Die Etablierung gelang bei 93,2 % der in Kultur genommenen Gewebeproben. Damit konnten die zwei wesentlichen Ziele der Arbeit erreicht werden. Zum einen, dass die Isolierung und Etablierung einer primären Meibomdrüsenepithelzellkultur möglich ist und dass zur Kultivierung sowohl Gewebe von männlichen als auch weiblichen Patienten verwendet werden kann. Diese Ergebnisse decken sich weitgehend mit den von Liu et al. im Jahr 2010 in Vorarbeiten für die bis heute einzige verfügbare Zelllinie humaner Meibomdrüsenepithelzellen etablierten neun primäre Meibomdrüsenepithelzellkulturen aus Überschussmaterial von 5 Frauen und 4 Männern (121). Im Unterschied zu Liu et al. wurden die Meibomdrüsenzellkulturen nicht in Suspensionstechnik, sondern ohne vorherige enzymatische Vorbehandlung und Isolierung in Explantationskulturtechnik etabliert. Vergleichbare Resultate unterstreichen die Funktionalität des weniger aufwendigen und weniger zeitintensiven Etablierungsverfahrens und stellen eine geeignete Möglichkeit für die Etablierung von primären Meibomdrüsenepithelzellkulturen im größeren Maßstab dar. Erleichternd für die praktische Arbeit mit der primären Meibomdrüsenzellkultur wurde kein negativer Einfluss der Dauer zwischen dem Zeitpunkt der Probengewinnung und dem Zeitpunkt der Kultivierung auf das Auswachsen der Meibomdrüsenstücke festgestellt. Bei adäquater Verwahrung der Gewebestücke wurde für ein zeitlichen Abstand zwischen Probengewinnung und Kultivierung von bis zu 7 Tagen keine Auswirkung auf die Kultivierung und das Auswachsen der Meibomdrüsenzellen beobachtet. Auffallend war ein langsames Wachstum und lange Generationszeiten von etwa 19 Tagen der primären Meibomdrüsenepithelzellen. Auch diese Eigenschaften der primären Meibomdrüsenzellen beschrieben Liu et al. in ihren Untersuchungen (121). Die Kultivierung der primären Meibomdrüsenzellkulturen gelang maximal bis zur dritten Passage. Ähnliche Ergebnisse finden sich für die den Meibozysten ähnlichen Sebozyten der Haut. Hier gelang die Kultivierung primärer Sebozyten der Haut aus Explantatgewebe auch bis zur dritten Passage (126). Der Arbeitsgruppe von Liu gelang in Vorarbeiten für die immortalisierte Zelllinie humaner Meibozysten (HMGECs) die Kultivierung einer Primärzellkultur aus

Meibozyten bis zur fünften Passage (121). Nicht vermeidbar ist darüber hinaus die aus den jeweiligen Spendern resultierende Variabilität der primären Zellen, die direkte Vergleiche erschwert (124). Mikroskopisch zeigte sich eine typische polygonale epitheliale Morphologie der Meibomdrüsenzellen, die auch von Liu et al. (121) bei humanen und von Rho et al. bei Meibomdrüsenzellen von Kaninchen (120) beschrieben wurde.

Zusammenfassend bestätigt sich das in geringem Maße schwankende, aber begrenzte Wachstumspotential und die limitierte Lebensdauer der primären Meibomdrüsenepithelzellkulturen. Das steht im Einklang mit dem häufig für verschiedene primäre Zellkulturen beschriebenen begrenzten Wachstumspotential aufgrund von Alterungsprozessen und genetischen Veränderungen zwischen den Generationen (125). Das langsame Wachstum der Meibomdrüsenepithelzellen mit langer Generationszeit und begrenztem Wachstumspotential zeigte sich *in vitro* als charakteristisch für die primäre Meibomdrüsenzellkultur und unterstreicht die anspruchsvolle und schwierige Kultivierung der Zellkultur. Die beobachteten Eigenschaften der Meibomdrüsenzellen unter Kulturbedingungen decken sich auch mit der *in vivo* beschriebenen Vulnerabilität der Meibomdrüsenzellen und ihrer Tendenz unter nicht optimalen Bedingungen zu atrophieren, wie die eingangs aufgeführten Forschungsergebnisse zu Meibomdrüsenzellen und ihrer Rolle in der Entstehung der MGD nahelegen (siehe Kapitel 2.2.5)

#### 5.1.2 Primäre Meibomdrüsenepithelzellkultur aus Tarsi von Körperspendern

Die Etablierung einer primären Meibomdrüsenepithelzellkultur aus Tarsi von Körperspendern konnte im Gegensatz zu der aus Überschussgewebe aus der lateralen Zügelplastik nicht gezeigt werden. Dies unterstreicht die in verschiedenen Untersuchungsmodellen beobachtete Vulnerabilität der Meibomdrüsen gegenüber Umwelteinflüssen, wie eine austrocknende Umgebung und ihre Anfälligkeit unter nicht optimalen Bedingungen schnell zu atrophieren (94, 96). Die Dauer von mindestens 24 Stunden bis maximal 48 Stunden zwischen Sterbezeitpunkt und Entnahmezeitpunkt könnte womöglich zu lange sein, um vitales Gewebe mit Meibomdrüsen mit noch intaktem Stoffwechsel zu entnehmen. Obwohl im Vergleich zum Überschussmaterial der lateralen Zügelplastik ein Vielfaches der Gewebemenge präpariert werden konnte, gestaltete sich die Kultivierung als wesentlich schwieriger. Die reine Menge an verfügbarem Gewebe scheint daher nicht entscheidend zu sein, sondern vielmehr die Intaktheit der entnommenen Meibomdrüsenzellen. Ein weiterer Aspekt ist die bei allen Körperspendern zuvor durchgeführte Entnahme der Cornea für die Organspende. Eine möglicherweise schädliche Interaktion oder Reizung des Gewebes im Entnahmeprozess ist nicht auszuschließen. Eine weitere Herausforderung in der Etablierung der primären Meibomdrüsenzellkultur aus Tarsusgewebe von Körperspendern stellte die Kontamination des Primärgewebes bei Übertragung auf die Zellkultur dar. In angelegten Kulturen aus Tarsusgewebe von Körperspendern der Anatomie wurden Kontaminationen mit Hefen und anderen Pilzen festgestellt. Insbesondere in Explantatkulturen sind Kontaminationen eine lang bekannte Herausforderung (199). Unter den

sterilen Operationsbedingungen im Rahmen der lateralen Zügelplastik konnte bei Primärge-  
webe aus Überschussmaterial diese Kontamination besser vermieden werden. Jedoch ist auf-  
grund des kleinen Spenderkollektives aus 5 Körperspendern eine allgemeingültige Aussage  
über die prinzipielle Machbarkeit der Etablierung von Meibomdrüsen aus postmortalem Ge-  
webe nicht möglich. Eine weitere Verfolgung des Ansatzes unter angepassten Bedingungen,  
wie beispielsweise optimierte Zeitabläufe, stellt gerade vor dem Hintergrund der höheren Ge-  
webemenge eine vielversprechende Option dar.

### 5.1.3 Allgemeine Herausforderungen der Etablierung einer primären Meibomdrüsenepithel- zellkultur

Eine große Herausforderung stellt neben der begrenzten Proliferationsfähigkeit das begrenzt  
zur Verfügung stehende Ausgangsmaterial zur Etablierung der primären Meibomdrü-  
senepithelzellkultur dar, das auch andere Arbeitsgruppen wie die um Liu et al. als erschwerend  
in dem Aufbau einer primären Meibomdrüsenepithelzellkultur ansehen (121). Hinzu kommt  
eine hohe Variabilität der Qualität des gespendeten Gewebes, mit zum Teil keinen oder atro-  
phierten Drüsen im Spendematerial. Das durchschnittliche Alter zum Spendezeitpunkt von  
77,6 Jahren stellt, vor dem Hintergrund des bekannten Risikofaktors Alter für die Meibomdrü-  
sendysfunktion, eine weitere Herausforderung dar (2, 3). Die häufig in der Literatur beschrie-  
bene reduzierte zelluläre Aktivität und Lipidproduktion der Meibomdrüsenzellen im Alter ist  
auch für die Kultivierung der Meibomdrüsenzellen als erschwerend anzusehen (88, 89).

Von großer Bedeutung für die Kultivierung der vulnerablen Meibomdrüsenzellen erwiesen sich  
optimale Kulturbedingungen. Als grundlegende Voraussetzung für ein Auswachsen der Mei-  
bomdrüsenzellen aus den Meibomdrüsenstücken stellte sich die Adhärenz der Meibomdrü-  
senstücke am Boden der 6-Well-Mikrotiterplatte heraus. Mit luftblasenfrei aufgelagerten Deck-  
gläsern konnte dies erreicht werden. Weiterhin war die exakte Einhaltung der zeitlichen Ab-  
stände des Kulturmediumwechsels wichtig, um die Proliferation der Meibomdrüsenzellen auf-  
recht zu erhalten.

### 5.1.4 Kultivierung der Meibomdrüsenzellen

Meibomdrüsenzellen durchlaufen physiologisch verschiedene Differenzierungsstadien bis hin  
zum Zelltod in der Produktion ihres holokrinen Sekrets, dem Meibum (67). Diese Eigenschaft  
der Differenzierung ist bei den primären Meibomdrüsenzellen aus Meibomdrüsen-  
gewebe *in vitro* erhalten. Die Kultivierung der primären Meibomdrüsenzellen ist jedoch wesentlich von  
einer intakten Proliferation abhängig, die im Laufe des physiologischen Differenzierungspro-  
zesses abnimmt (69). Daraus resultieren Herausforderungen an die Kulturbedingungen in der  
Etablierung einer primären Meibomdrüsenzellkultur aus Meibomdrüsen-  
gewebe. Die Etablierung der Meibomdrüsenzellkulturen aus explantiertem Gewebe ist entscheidend von den

eingesetzten Kulturmedien abhängig. Das im Rahmen der Etablierung der primären Meibomdrüsenzellkulturen entwickelte Kultivierungsprotokoll berücksichtigt die spezifischen Anforderungen der Meibomdrüsenzellen zum jeweiligen Kultivierungszeitpunkt. Das Auswachsen der Zellen aus den Gewebestücken erfordert initial ein Medium, welches die Proliferation der Zellen begünstigt. Als geeignet stellte sich ein wachstumsfaktorenhaltendes (EGF) Medium mit FBS, Cholera toxin und Antibiose heraus. Eine ähnliche Mediumzusammensetzung verwendete die Arbeitsgruppe um Sullivan erfolgreich in der Kultivierung ihrer Meibomdrüsenepithelzellkultur (26). Auch in zahlreichen weiteren Zellkulturprotokollen für Meibomdrüsenzellen und andere epitheliale Zellen finden ähnliche Mediumzusammensetzungen Anwendung und begünstigen insbesondere die Zellproliferation (26, 121, 139, 178). Wurden die Zellen nach dem Auswachsen in dem Auswachsmedium weiterkultiviert, differenzierten die Zellen rasch bei abnehmender Proliferation. Unter diesen Bedingungen war eine weitere Kultivierung und ein Passagieren der Meibomdrüsenzellen nicht möglich. Ein Mediumwechsel nach dem Auswachsen der Zellen auf das Proliferationsmedium (CnT-BM.1/CnT-57) ermöglichte weiteres Zellwachstum und die weitere Kultivierung durch Unterbinden einer frühzeitigen Differenzierung. Das Medium (CnT-BM.1/CnT-57) zeigte sich in verschiedenen Kulturen epithelialer Zellen wie beispielsweise der Haut, der Cornea und der Blase als geeignet, um Zellwachstum und Isolierung der Zellen zu ermöglichen, ohne die Zelldifferenzierung zu initiieren (200-202).

Im Vergleich zu der in Studien zur MGD häufig untersuchten humanen Zelllinie (HMGECS) ergeben sich bezüglich der Kultivierung und Differenzierung der Meibomdrüsenzellen unterschiedliche Herausforderungen. Die langfristige *in vitro*-Kultivierung der HMGECS wird durch Immortalisierung, die eine physiologische Induktion des Zelltods unterbindet, erreicht (121). Daraus resultiert die Herausforderung wie die für Meibomdrüsenzellen charakteristische Differenzierung initiiert werden kann, die für die Lipidproduktion eine entscheidende Rolle spielt. Zahlreiche Faktoren, wie ein serumhaltiges Medium, Insulin, IGF, Azithromycin sowie PPAR $\gamma$ -Agonisten und weitere wurden untersucht, inwiefern diese die Differenzierung, die Regulation und insbesondere die Lipidproduktion der HMGECS beeinflussen und erhöhen können (121, 139, 144, 146-148). Demgegenüber ist die physiologisch ablaufende Differenzierung der Meibomdrüsenzellen in der Explantatkultur erhalten. Die primären Meibomdrüsenzellen differenzieren in einem entsprechenden Medium relativ rasch, was jedoch die langfristige *in vitro*-Kultivierung erschwert. Die Kultivierung der primären Meibomdrüsenzellen ist daher von einer Aufrechterhaltung der Zellproliferation durch ein Herauszögern der Differenzierung abhängig, welche in dem entsprechenden Proliferationsmedium (CnT-BM.1/CnT-57) besser gelingt. Unter diesen Kulturbedingungen gelang die Kultivierung der Primärzellkulturen bis zur dritten Passage. Trotz der im Vergleich zu den HMGECS kürzeren Kultivierungsdauer könnten die primären Meibomdrüsenzellkulturen als Forschungsmodell zur MGD einen wichtigen Vorteil mit sich bringen. Durch die zu dem Ursprungsgewebe der humanen Meibomdrüsen ähnlichere



Physiologie der primären Meibomdrüsenzellen, wie der erhaltenen Zelldifferenzierung, könnten die *in vitro* gewonnenen Forschungsergebnisse besser auf die humanen Meibomdrüsen *in vivo* übertragbar sein.

#### 5.1.5 Einfluss von ROCK-Inhibitoren auf die Kultivierung von Meibozyten

Die Hemmung der Rho/ROCK-Signalübertragung in primären Meibomdrüsenzellen durch den selektiven ROCK-Inhibitor Y-27632 wurde untersucht. Der Einsatz von ROCK-Inhibitoren zeigte in verschiedenen Studien mit Zellkulturen, wie Hornhautendothelzellen und embryonalen Stammzellen, einen günstigen Einfluss auf die Zelladhäsion, die Zellproliferation, die Zellmotilität und eine antiapoptotische Wirkung (169-174). Für die primäre Meibomdrüsenzellkultur wurde als interessierende Einflussgröße der Rock-Inhibierung die Zellaktivität, gemessen in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU), betrachtet. Dabei zeigte sich eine geringfügig höhere Zellaktivität (RFU) in Zellkulturen, die mit ROCK-Inhibitor kultiviert wurden. Aufgrund der geringen Unterschiede in der Zellaktivität zwischen den mit ROCK-Inhibitor kultivierten und den Kontrollzellkulturen sowie den innerhalb der Zellkulturreihen stark schwankenden Fluoreszenzeinheiten, wie hohe Standardabweichungen verdeutlichen, können diese Unterschiede vernachlässigt und ein direkter Einfluss des ROCK-Inhibitors auf die Meibozyten nicht beurteilt werden. Vielmehr auffallend ist die hohe Variabilität zwischen den einzelnen Spenderproben und damit zwischen den verschiedenen Ausgangsgeweben der Spender. Zusammengefasst unterstreichen diese Beobachtungen, dass die ursprünglichen Meibomdrüsenzellen der Gewebeproben entscheidender für die Zellaktivität und die Vitalität der Meibomdrüsenzellen sind als der Zusatz des spezifischen ROCK-Inhibitors zum Kulturmedium. Für die primären Meibomdrüsenzellen konnte weder ein positiver noch negativer Einfluss auf das Proliferationsverhalten und die Zellaktivität durch ROCK-Inhibitoren gesichert werden.

#### 5.2 Lipidfärbungen der primären und stimulierten Meibomdrüsenzellen

Zentraler Aspekt in der Forschung zur MGD an verschiedenen Meibomdrüsenzellmodellen ist die Untersuchung der Physiologie und des Stoffwechsels der Meibomdrüsenzellen. Auch in dieser Forschungsarbeit ist insbesondere die Lipidproduktion der Meibomdrüsenzellen und deren Regulation von großem Interesse. Mittels histochemischer Lipidfärbung konnte die entscheidende Eigenschaft von Meibomdrüsenzellen Lipide produzieren und anreichern zu können für die etablierten Zellkulturen aus Meibomdrüsenngewebe nachgewiesen werden. Damit konnte eine wichtige Fragestellung der Forschungsarbeit beantwortet werden. Die etablierten Meibomdrüsenzellen färbten sich in den durchgeführten Lipidfärbungen für neutrale Lipide (Oil Red O und Sudanfärbung) in charakteristischerweise an. Diese Beobachtung deckt sich mit dem Lipidnachweis mittels Oil Red O Färbung in Meibomdrüsenzellen in Studien zur Erforschung des Meibomdrüsenkarzinoms (122). Bei Betrachtung unter dem Mikroskop in höherer Vergrößerung zeigte sich in den Meibomdrüsenzellen die Ansammlung der Lipide in Form von

Vesikeln. Die Speicherung der Lipide in Vesikeln ist histologisch beschrieben für Meibomdrüsenzellen der humanen Meibomdrüse (203) und findet sich auch in dieser Form in HMGECs wieder (142, 143, 149). Ein durchschnittlicher Lipidanteil von etwa 7 % an der Gesamtfläche einer basalen noch proliferierenden Meibomdrüsenzelle bis zu über 20 % Lipidanteil bei einer stimulierten Meibomdrüsenzelle konnte mit einer Bildanalysesoftware festgestellt werden. Diese Anteile demonstrieren *in vitro* die Wichtigkeit der Lipidproduktion im Stoffwechsel der Meibomdrüsenzellen und unterstreichen die *in vivo* bekannte Funktion als Lipidproduzent für den Tränenfilm (40, 41). Die Ergebnisse legen nahe, dass die Lipidproduktion je nach Zellzyklus und Regulation, neben Zellwachstum und Proliferation einen entscheidenden Anteil am Stoffwechsel der Meibomdrüsenzellen einnimmt. Bei genauer Betrachtung zeigte sich bei abnehmender Proliferation der Zellen eine gesteigerte Akkumulation der Lipide in der Oil Red O und der Sudanfärbung. Dies könnte auf eine höhere Stoffwechselaktivität der Meibomdrüsenzelle nach Differenzierung zurückzuführen sein. Ähnliche Phänomene wurden sowohl bei Zellkulturen mit Sebozyten der Haut, die den Meibozyten ähneln, als auch von der Arbeitsgruppe um Liu in Vorarbeiten für die humane Meibomdrüsenepithelzelllinie (HMGECs) beobachtet (121, 204). Auch vor dem Hintergrund des bekannten physiologischen Differenzierungs- und Reifungsprozesses von Meibozyten *in vivo* erscheint das beobachtete Phänomen realistisch. Dort wird im Rahmen der Differenzierung eine zunehmende Einlagerung von Lipiden bei gleichzeitigem Verlust der Proliferationsfähigkeit beobachtet, bevor die Meibozyten apoptotisch und als Teil des Meibums sekretiert werden (69, 203).

Bereits in verschiedenen Untersuchungen am Tiermodell, an murinen sowie humanen Meibomdrüsenepithelzelllinien konnten verschiedene Forschungsgruppen den PPAR $\gamma$ -Signalweg als einen entscheidenden Faktor in der Lipidsynthese, der Zellproliferation und der Differenzierung von Meibomdrüsenzellen identifizieren (92, 160). Im Rahmen von Alterungsprozessen und der Entstehung einer MGD wurden Veränderungen in der Zellregulation über PPAR $\gamma$ -Rezeptoren als zentrale Mechanismen beschrieben (24, 28). Die Aktivierung des Signalwegs durch Stimulation des PPAR $\gamma$ -Rezeptors in Meibomdrüsenzellen mit PPAR $\gamma$ -Agonisten, wie Rosiglitazon, stellte sich in vielen Studien als äußerst geeignet heraus, um die Differenzierung von Meibomdrüsenzellen und die Lipidsynthese zu induzieren (29). Rosiglitazon führte im Tiermodell, bei murinen Meibomdrüsenepithelzellen und HMGECs zu dem Austritt aus dem Zellzyklus, einem Anstieg der Genexpression von Genen des Lipidstoffwechsels und zu einer mit Lipidfärbungen nachgewiesenen signifikant erhöhten Lipidakkumulation in HMGECs (27, 29, 31, 162, 163). In der vorliegenden Arbeit werden diese Ergebnisse auf die im Rahmen der Forschungsarbeit neu etablierten primären Meibomdrüsenepithelzellkulturen erweitert und die Rolle des PPAR $\gamma$ -Signalwegs bei der Kontrolle der Lipidproduktion und der Expression spezifischer an der Lipidsynthese beteiligter Meibozytengene untersucht. Eine Rosiglitazonkonzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  wurde für die Stimulation der primären Meibomdrüsenzellkulturen

eingesetzt. Diese zeigte in verschiedenen Forschungsarbeiten bei eingesetzten Rosiglitazonkonzentrationen zwischen 10  $\mu\text{mol/l}$  und 50  $\mu\text{mol/l}$  eine optimale Stimulation der Meibomdrüsenzellen (27, 29, 31, 153). Die Ergebnisse der Oil Red O Lipidfärbung zeigten im Vergleich der basalen mit den stimulierten primären Meibomdrüsenepithelzellen eine deutliche Steigerung der Lipidakkumulation in Meibomdrüsenepithelzellen nach Stimulation mit Rosiglitazon. Der Lipidanteil an der Zellfläche als auch die Lipiddichte und die angefärbte Intensität stellte sich deutlich erhöht dar. Durch die quantitative Bildanalyse der mit Oil Red O gefärbten Meibomdrüsenepithelzellen wurde eine signifikante Zunahme des durchschnittlich eingenommenen Lipidanteils an der Zellfläche von circa 7,1 % Lipidanteil bei basalen Meibomdrüsenzellen auf circa 20,2 % Lipidanteil bei stimulierten Meibomdrüsenzellen bei einer vergleichbaren durchschnittlichen Zellgröße dokumentiert. Diese Ergebnisse zeigen einen starken Effekt des PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon auf die primären Meibomdrüsenzellen, der im Einklang mit den beschriebenen Effekten von Rosiglitazon auf HMGECS, murinen Meibomdrüsenepithelzelllinien und weiteren Tiermodellen steht. Damit konnte die eingangs aufgestellte Hypothese, die Lipidsynthese primärer Meibomdrüsenzellen werde durch den PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon beeinflusst, bestätigt werden. Ausblickend sind Analysen des Lipidprofils der stimulierten primären Meibomdrüsenzellen von besonderem Interesse, da bisherige Meibomdrüsenzellmodelle, wie HMGECS, unter Stimulation mit verschiedenen Faktoren auch Meibom-untypische Lipidklassen synthetisierten (140, 155).

### 5.3 Genexpression der primären und stimulierten Meibomdrüsenzellen

Die Genexpression der etablierten primären Meibomdrüsenzellkulturen wurde zur besseren Charakterisierung und zur möglichen Identifizierung von Markergenen für Meibozyten bestimmt. Vergleichend wurde die Genexpression von Konjunktiva und Lidrest (Muskulatur/Bindegewebe), die während der Präparation des Spendertarsus gewonnen wurden, untersucht. Die Expression von Genen des Fettstoffwechsels, der Muzine und der Zytoskelettproteine, die in der Literatur im Zusammenhang mit den untersuchten Geweben stehen, wurde analysiert. Die Ergebnisse sind aufgrund des nur stark begrenzt zur Verfügung stehende Ausgangsgewebes, individueller Unterschiede im Spendergewebe, der anspruchsvollen Kultivierung der primären Meibomdrüsenzellkulturen und der verlustreichen RNA-Gewinnung als explorativ zu betrachten.

Für die primären Meibomdrüsenzellen konnte gezeigt werden, dass sie alle untersuchten Gene des Fettstoffwechsels in unterschiedlicher Ausprägung exprimierten (PLIN2, ELOVL4, SCD, FABP4). Für mit Rosiglitazon stimulierte Meibomdrüsenzellen gelang ebenfalls der Nachweis aller Fettmarkergene. Verglichen mit der Konjunktiva und dem Lidrest fanden sich für die Gene PLIN2, ELOVL4 und SCD tendenziell höhere Expressionswerte. Die Expressionsunterschiede wiesen allerdings keine Signifikanz auf. Für FABP4 fanden sich dagegen

sogar signifikant geringere Expressionswerte gegenüber Konjunktiva und Lid. Die untersuchten Fettmarker sind teilweise auch für HMGECS untersucht. So wiesen Kim et al. eine Genexpression von PLIN2 in HMGECS nach, die unter Rosiglitazon signifikant hochreguliert wurde (27). Dies deckt sich mit der tendenziell höher gemessenen Expression von PLIN2 unter Rosiglitazon für die kultivierten primären Meibomdrüsenzellen. Die Expression der Fettmarker PLIN2, ELOVL4 und SCD ist für Meibomdrüsenzellen des Azinus beschrieben (182-184). Der physiologische Sekretionsmechanismus der Meibomdrüsen, bei dem die Meibozyten ausgehend von randständigen Basalzellen verschiedene Differenzierungsstadien durchlaufen, führt zu der Einlagerung von Lipiden und zu vollständig differenzierten Meibozyten des Meibomdrüsenazinus (68). Die nur gering höhere Expression der Fettmarker in Meibozyten gegenüber den anderen untersuchten Geweben deutet darauf hin, dass die Zellen in Kultur keine vollständige Meibozytendifferenzierung durchlaufen und noch nicht identifizierte Kulturbedingungen für die Differenzierung benötigen. Ähnliche Beobachtungen machten Rho et al. für die Expression der Acyl-CoA-Wachs-Alkohol-Acyltransferase 2 (AWAT2), die an der für Meibozyten typischen Wachsestersynthese beteiligt ist. In kultivierten Meibomdrüsenzellen von Kaninchen ging die AWAT2-Expression für primäre Zellen verloren, was auf eine nicht vollständige Differenzierung oder sogar auf einen Verlust der Differenzierung unter Kulturbedingungen hindeutet (120).

Die Expression der durch ihre Wasserbindungsfähigkeit für die Stabilität des Tränenfilms wichtigen Muzine wurde für die genannten Gewebe gemessen. Das membranständige Mucin MUC16 das in den Tränenfilm ragt und so für eine Haftung der wässrigen Komponente sorgt und das von den Becherzellen der Bindehaut sezernierte Mucin MUC5AC als Schleimbestandteil wurden untersucht (205). Für die kultivierten primären Meibomdrüsenzellen konnte kein Transkript für MUC5AC detektiert werden. Die höchste Expression von MUC5AC fand sich in der Konjunktiva, was im Einklang mit der beschriebenen Sekretion von MUC5AC durch in der Konjunktiva gelegenen Becherzellen steht (185, 186). Durch die großen Expressionsunterschiede von MUC5AC zwischen primären Meibomdrüsenzellen und Konjunktiva ist eine Verunreinigung der Zellkultur mit aus der Konjunktiva stammenden Becherzellen damit unwahrscheinlich. Für murine Meibomdrüsenepithelzellen ist in Transkriptomanalysen eine Expression von Muzinen, unter anderem der untersuchten Muzine MUC5AC und MUC16, beschrieben (187). Für MUC16 konnte dies auch für die humanen primären Meibomdrüsenepithelzellen nachgewiesen werden. Die Expression von MUC16 stellte sich in vergleichbarer Höhe zu der Konjunktiva und dem Lid dar.

Die Analyse der Genexpression der Zytoskelettproteine ACTA2, Vimentin und der Keratine 5, 6 und 14 zeigte für die primären Meibozyten die höchsten Expressionswerte. Die Validität der Messergebnisse der Zytoskelettproteine einschränkend sind die höheren Genexpressionswerte der primären Meibomdrüsenepithelzellen und die ähnlich hohen oder teilweise höheren

Genexpressionswerte der Konjunktiva gegenüber dem Lidrest. Für den Lidrest wären aufgrund seiner bindegewebigen Zusammensetzung die höchsten Expressionswerte zu erwarten. Ungeachtet der genauen Expressionshöhe scheinen die Zytoskelettproteine für die primären Meibomdrüsenepithelzellen in Kultur von Bedeutung zu sein. So kann unter anderem der Differenzierungsstatus einer Meibomdrüsenazinuszelle durch das Expressionsmuster bestimmter Zytokeratine identifiziert werden (186, 206, 207). Auch für HMGECs wurde eine mit der Zeit zunehmende Bildung von Keratinfilamenten durch Serum vermittelte Induktion der Differenzierung festgestellt (140). Darüber hinaus wird in der Pathogenese der MGD die Rolle von Keratinen und insbesondere die der Hyperkeratinisierung der Meibomdrüsenzellen mit folgender Obstruktion und Blockade der Meibomdrüsenöffnung kontrovers diskutiert (16-19). Vor diesem Hintergrund sind die gemessenen Expressionsergebnisse der Keratine 5, 6 und 14 für die kultivierten primären Meibomdrüsenepithelzellen einzuordnen. Die gemessenen hohen Expressionswerte der Keratine legen nahe, dass die primären Meibomdrüsenzellen unter den gegenwärtigen Kulturbedingungen eine Neigung zur Expression bestimmter Zytokeratine aufweisen. Dies gilt auch für ACTA2 und Vimentin, die ebenfalls in primären Meibozyten höhere Expressionswerte gegenüber der Konjunktiva und dem Lidrest aufwiesen. Diese Beobachtung findet sich auch für murine Meibomdrüsen wieder. Hier wurde in Untersuchungen eine hohe Expression von Keratin 14 nachgewiesen (192). Die Kultivierung der primären Meibomdrüsenzellen mit Rosiglitazon reduzierte tendenziell die Expressionshöhe von ACTA2 und Vimentin, allerdings ohne einen signifikanten Unterschied zu verursachen.

Die kultivierten primären Meibomdrüsenzellen exprimieren, wie eingangs in Hypothese 7 vermutet, meibomdrüsen-typische Gene, die mit denen in der Literatur übereinstimmen. Unter Betrachtung der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse konnte jedoch kein eindeutiger Meibozytenmarker identifiziert werden. Vor diesem Hintergrund bietet sich eine Ausweitung der Genanalyse außerhalb und innerhalb der drei untersuchten Klassen des Fettstoffwechsels, der Muzine und der Zytoskelettproteine, die alle mit der Funktion der Meibomdrüsenzellen oder der Pathophysiologie der Meibomdrüsendysfunktion assoziiert sind, an. Zudem legen die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse nahe, dass die gegenwertigen Zellkulturbedingungen die Meibozytendifferenzierung und die Expression von für den Stoffwechsel der Meibomdrüsen kritischer Gene nicht optimal fördert. Eine Verbesserung der Kulturbedingungen unter Erforschung kritischer Signalwege der Meibozytendifferenzierung könnte dazu beitragen eine *in vivo* ähnlichere Umgebung zu schaffen. Die *in vivo* beschriebene Eigenschaft der Meibomdrüsenzellen unter nicht optimalen Bedingungen zu atrophieren, spiegelt sich in dem *in vitro* beobachtetem Genexpressionsmuster wider (94, 96). Die eingangs aufgestellte Hypothese 8, die Differenzierung mit dem PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon verändere die Genexpression der Meibomdrüsenzellen, konnte nicht abschließend beantwortet werden. Für einzelne Gene, wie

PLIN2, ACTA2 und Vimentin, ist eine Regulation möglich, die geringen Unterschiede sowie die Probenanzahl erlauben jedoch keine endgültige Bewertung.

#### 5.4 Die primäre Meibomdrüsenepithelzellkultur als Modell zur Untersuchung der Meibomdrüsendysfunktion

Geeignete Meibomdrüsenmodelle für die präklinische Forschung sind rar. Die Bedeutung der etablierten Meibomdrüsenzellkulturen, ihre Möglichkeiten und Unterschiede neben den erwähnten Tiermodellen und der von der Arbeitsgemeinschaft um Liu etablierte Zelllinie menschlicher Meibomdrüsen (HMGEC) eines männlichen Spenders, wird im Folgenden diskutiert. Die Zelllinie der HMGECs diente der Identifizierung zahlreicher Faktoren und Signalwege, die die Aktivität von Meibomdrüsenepithelzellen regulieren und eine Rolle in der Entwicklung der MGD spielen könnten (31, 121, 159). Als einschränkend für die HMGEC als Forschungsmodell der MGD stellte sich ein unterschiedliches Differenzierungsverhalten, eine begrenzte Lipidproduktion sowie ein divergierendes Lipidprofil (26, 154) und ein geringer Einfluss von Sexualhormonen (155) auf die Lipidakkumulation der Meibozysten *in vitro*, gegenüber den Meibozysten *in vivo* heraus. Hinzu kommt die für eine langfristige *in vitro*-Kultivierung notwendige Immortalisierung von HMGECs, die eine physiologische Induktion des Zelltods unterbindet (121). Die etablierten Zellkulturen primärer Meibomdrüsenzellen weisen als Modellsystem gegenüber der sekundären Zelllinie der HMGEC den großen Vorteil auf, am ehesten dem Ursprungsgewebe und damit dem *in vivo* Zustand mit einer normalen Physiologie zu entsprechen. Die kultivierten Zellen sind in der Lage Lipide zu produzieren und unterliegen in ihrer Produktion einer Regulation, wie stellvertretend die beobachtete Steigerung der Lipidproduktion durch den PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon nahelegt. Die Untersuchung verschiedener Gene des Fettstoffwechsels konnte jedoch nicht eindeutig regulierte Gene identifizieren. Die Eigenschaft der Lipidakkumulation der primären Meibomdrüsenzellen steht im Einklang mit der gleichermaßen nachgewiesenen Regulation der Meibomdrüsenzellen durch Rosiglitazon an murinen Modellen (29) als auch an der Zelllinie der HMGEC (27, 153). Damit ist für die primären Meibomdrüsenzellkulturen als Forschungsmodell eine elementare Eigenschaft nachgewiesen, die als Voraussetzung für den Einsatz als Forschungsmodell zur MGD betrachtet werden kann. Die begrenzte Kultivierungsdauer der primären Meibomdrüsenzellkulturen bis maximal zur dritten Passage ist einerseits als erschwerend in Bezug auf die begrenzte zeitliche Verfügbarkeit für experimentelle Ansätze zu sehen. Andererseits kann sie jedoch auch als Ausdruck einer intakten Physiologie der Meibomdrüsenzellen mit erhaltenem Reifungsprozess, gekennzeichnet durch Differenzierung und Induktion des Zelltodes, betrachtet werden. Weitere Studien zur Bewertung des Reifungsprozesses und der beobachteten Keratinisierung sind erforderlich, um zu klären wie die Differenzierung und der Zelltod im Detail ablaufen. Die Verwendung von Gewebe sowohl von weiblichen als auch von männlichen Spendern in größerer Spenderanzahl

in den etablierten Zellkulturen erweitert die bisherige Forschung an der HMGEC Zelllinie, um den beobachteten individuellen und Geschlechtseinflüssen gerecht zu werden (25, 98, 102). Die meisten an MGD leidenden Patienten sind weiblich (2). Vor diesem Hintergrund ist zu beachten, dass die *in vitro*-Ergebnisse an der Zelllinie der HMGECs, basierend auf Spendergewebe eines einzelnen männlichen Spenders, bei weiblichen Patienten anders ausfallen könnten (2). Die Genexpressionsanalyse konnte keinen eindeutigen Meibozytenmarker aus den untersuchten Genen identifizieren. Die Expression wichtiger Gene des Fettstoffwechsels, der Muzine und der Zytokeratine konnte für die primäre Meibomdrüsenzellkultur bestätigt werden, ohne eine Regulation durch den untersuchten PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon eindeutig festzustellen. Die Untersuchung weiterer Gene zur genaueren Charakterisierung der Zellkultur bietet sich daher an. Auch die Kultivierung von Konjunktiva unter den beschriebenen Zellkulturbedingungen könnte von Interesse sein, um sicherzustellen das mesenchymale Stammzellen der Konjunktiva unter den spezifischen Kulturbedingungen nicht zu fettproduzierenden Zellen transformieren und mit der Zellkultur primärer Meibomdrüsen interferieren.

Die ersten Forschungsergebnisse an primären Meibomdrüsenzellkulturen zeigen einen vielversprechenden Ansatz für ein neues Untersuchungsmodell zur Erforschung der MGD. Die charakteristische Eigenschaft der Lipidproduktion konnte für die kultivierten Zellen nachgewiesen werden. Die Vergleichbarkeit der *in vitro*- mit den *in vivo*-Eigenschaften von Meibomdrüsen muss insbesondere für das Lipidprofil in weiteren Studien untersucht werden. Massenspektrometrische Untersuchungen der Lipide, auch nach Stimulation mit Rosiglitazon, zur Untersuchung, ob es sich um ein meibomtypisches Lipidprofil handelt, sind in diesem Zusammenhang sinnvoll.

## 6 Zusammenfassung

Die MGD als Hauptursache des Trockenen Auges ist nach wie vor unzureichend erforscht. Trotz gesteigener Forschungsbemühungen und einer zugenommener Zahl an Veröffentlichungen über Meibomdrüsen, hat die Erforschung der Pathomechanismen bis heute zu keiner wirksamen Behandlungsmöglichkeit der MGD beigetragen (32). Nach wie vor fehlen geeignete Meibomdrüsenmodelle für die präklinische Forschung. Die Etablierung einer primären Meibomdrüsenzellkultur im Rahmen dieser Forschungsarbeit soll als geeignetes Untersuchungsmodell dazu beitragen, diese Lücke zu schließen. Es wurde gezeigt, dass die Etablierung einer Zellkultur humaner primärer Meibomdrüsenzellen möglich ist. Damit konnte das wichtigste Ziel der Grundlagenforschungsarbeit erreicht werden. Sowohl für weibliche als auch für männliche Spender gelang die Kultivierung primärer humaner Meibomdrüsenzellen. Mit 55 etablierten Zellkulturen aus Überschussmaterial verschiedener Spender konnte die bis heute umfassendste Zellkultur humaner Meibomdrüsenzellen etabliert werden. Bisherige humane primäre Meibomdrüsenzellkulturen beschränkten sich auf Vorarbeiten für die Zelllinie humaner Meibomdrüsenepithelzellen (HMGECS) von Liu et al. (121). Die Kultivierung von Meibomdrüsenzellkulturen aus Gewebe von Körperspendern konnte bisher nicht gezeigt werden. Weitere Untersuchungen unter Anpassung und Verbesserung des Entnahme- und Kultivierungsprozesses sind aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit humanen Spendergewebes von Interesse. Die primären Meibomdrüsenzellkulturen können unter den beschriebenen entwickelten Kulturbedingungen proliferieren. Es zeigte sich ein, wie für verschiedene primäre Zellkulturen beschriebenes, begrenztes Wachstumspotential mit einer limitierten Lebensdauer, wie die Kultivierung bis maximal zur dritten Passage verdeutlicht (125). Damit stellte sich die Kultivierung vergleichbar mit der von ähnlichen Zellen, wie die der Sebozyten der Haut, dar (126). Der Einsatz von ROCK-Inhibitoren in der Kultivierung der primären Meibomdrüsenzellkulturen beeinflusste weder positiv noch negativ das Proliferationsverhalten und die Zellaktivität. Ein für andere Zellkulturen angenommener günstiger Einfluss auf die Zelladhäsion, die Zellproliferation, die Zellmotilität und eine antiapoptotische Wirkung konnte für die primären Meibomdrüsenzellkulturen nicht gesichert werden (169-174). Die entscheidende Eigenschaft der humanen Meibomdrüsenzellen, die Lipidproduktion, zeigte sich für die kultivierten Zellen. Mittels histochemischer Lipidfärbung (Sudan III und Oil Red O) konnte die Lipidproduktion für die etablierten Zellkulturen aus Meibomdrüsenngewebe nachgewiesen werden. Dieser Aspekt ist zentral für die Betrachtung der kultivierten Zellen als primäre Meibomdrüsenzellen. Die quantitative Auswertung der Lipidfärbungen unterstreicht mit einem durchschnittlichen Lipidanteil zwischen etwa 7 % (basale Meibomdrüsenzelle) und über 20 % (stimulierte Meibomdrüsenzelle) *in vitro* die Bedeutung der Lipidproduktion für Meibomdrüsenzellen und geht mit der physiologisch wichtigen Funktion als Lipidproduzent des Tränenfilms einher (40, 41). Der PPAR $\gamma$ -Agonist Rosiglitazon steigert die Lipidproduktion der kultivierten Meibomdrüsenzellen



signifikant, wie ein 13,07 % höherer Lipidanteilen gegenüber den basalen Meibomdrüsenzellen ergibt. Diese Ergebnisse decken sich mit der im Tiermodell, für murine Meibomdrüsenepithelzellen und HMGECS nachgewiesenen signifikant erhöhten Lipidakkumulation unter dem Einfluss von Rosiglitazon (27, 29, 31, 162, 163). Bisherige Meibomdrüsenzellmodelle, wie HMGECS, synthetisierten unter Stimulation stets auch meibomdrüsen-untypische Lipidklassen (140, 155). Ausblickend sind massenspektrometrische Analysen des Lipidprofils der stimulierten primären Meibomdrüsenzellen daher von besonderem Interesse, auch um die Ähnlichkeit mit der physiologischen Zusammensetzung des humanem Meibums zu untersuchen. Die Genanalyse der kultivierten Meibomdrüsenzellen zeigte die Expression Meibomdrüsen-typischer Gene aus den drei untersuchten Gruppen des Lipidstoffwechsels, der Muzine und der Zytoskelettproteine, die mit beschriebenen wichtigen Genen der Meibomdrüsenzellen in der Literatur übereinstimmen (31, 87, 164, 182-184, 187, 191, 192). Ein eindeutiger Meibozystenmarker konnte nicht identifiziert werden. Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse, insbesondere die im Vergleich zu der Konjunktiva und dem Lid starke Expression von Zytoskelettproteinen, legen nahe, dass die aktuellen Zellkulturbedingungen nicht optimal die Meibozytendifferenzierung und die Genexpression kritischer Stoffwechselgene fördern. Ein Einfluss von Rosiglitazon auf die Genexpression der Meibomdrüsenzellen scheint für einzelne Gene möglich, konnte jedoch aufgrund der geringen Genexpressionsunterschiede sowie der limitierten Probenanzahl nicht abschließend bewertet werden.

Zusammenfassend zeigen die ersten Forschungsergebnisse an den etablierten primären Meibomdrüsenzellkulturen einen vielversprechenden Ansatz für ein neues Untersuchungsmodell zur Erforschung der MGD. Insbesondere der Vorteil gegenüber bisherigen Meibomdrüsenzellkulturmodellen, am ehesten dem humanem Ursprungsgewebe und damit der *in vivo* Physiologie zu ähneln, machen sie als Zellkulturmodell attraktiv. Weitere Untersuchungen zur Optimierung der Zellkulturbedingungen und zur Erforschung der Regulation der primären Meibomdrüsenzellkulturen sind erforderlich, um perspektivisch die Zellkultur als präklinisches Modell für die Entwicklung von Möglichkeiten der Vorbeugung und der Behandlung der weit verbreiteten MGD einzusetzen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Stapleton F, Alves M, Bunya VY, Jalbert I, Lekhanont K, Malet F, et al. TFOS DEWS II Epidemiology Report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):334-65.
2. Schaumberg DA, Nichols JJ, Papas EB, Tong L, Uchino M, Nichols KK. The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the subcommittee on the epidemiology of, and associated risk factors for, MGD. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2011;52(4):1994-2005.
3. Knop E, Knop N, Millar T, Obata H, Sullivan DA. The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the subcommittee on anatomy, physiology, and pathophysiology of the meibomian gland. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2011;52(4):1938-78.
4. Willcox MDP, Argüeso P, Georgiev GA, Holopainen JM, Laurie GW, Millar TJ, et al. TFOS DEWS II Tear Film Report. *The Ocular Surface.* 2017;15(3):366-403.
5. Nelson JD, Shimazaki J, Benitez-del-Castillo JM, Craig JP, McCulley JP, Den S, et al. The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the definition and classification subcommittee. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2011;52(4):1930-7.
6. Miljanović B, Dana R, Sullivan DA, Schaumberg DA. Impact of dry eye syndrome on vision-related quality of life. *American journal of ophthalmology.* 2007;143(3):409-15.
7. Deschamps N, Ricaud X, Rabut G, Labbé A, Baudouin C, Denoyer A. The impact of dry eye disease on visual performance while driving. *American journal of ophthalmology.* 2013;156(1):184-9.e3.
8. Labbé A, Wang YX, Jie Y, Baudouin C, Jonas JB, Xu L. Dry eye disease, dry eye symptoms and depression: the Beijing Eye Study. 2013;97(11):1399-403.
9. Schiffman RM, Walt JG, Jacobsen G, Doyle JJ, Lebovics G, Sumner W. Utility assessment among patients with dry eye disease. *Ophthalmology.* 2003;110(7):1412-9.
10. Yu J, Asche CV, Fairchild CJ. The Economic Burden of Dry Eye Disease in the United States: A Decision Tree Analysis. 2011;30(4):379-87.
11. Korb DR, Henriquez AS. Meibomian gland dysfunction and contact lens intolerance. *Journal of the American Optometric Association.* 1980;51(3):243-51.
12. Nichols KK, Foulks GN, Bron AJ, Glasgow BJ, Dogru M, Tsubota K, et al. The International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction: Executive Summary. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2011;52(4).
13. Sun M, Moreno IY, Dang M, Coulson-Thomas VJ. Meibomian Gland Dysfunction: What Have Animal Models Taught Us? *International Journal of Molecular Sciences.* 2020;21(22).
14. Liu S, Hatton MP, Khandelwal P, Sullivan DA. Culture, immortalization, and characterization of human meibomian gland epithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2010;51(8):3993-4005.
15. Foulks GN, Bron AJ. Meibomian gland dysfunction: a clinical scheme for description, diagnosis, classification, and grading. *Ocul Surf.* 2003;1(3):107-26.
16. Gutgesell VJ, Stern GA, Hood CI. Histopathology of meibomian gland dysfunction. *American journal of ophthalmology.* 1982;94(3):383-7.
17. Obata H. Anatomy and histopathology of human meibomian gland. *Cornea.* 2002;21(7 Suppl):S70-4.
18. Jester JV, Nicolaidis N, Smith RE. Meibomian gland dysfunction. I. Keratin protein expression in normal human and rabbit meibomian glands. *Investigative ophthalmology & visual science.* 1989;30(5):927-35.
19. Henriquez AS, Korb DR. Meibomian glands and contact lens wear. *The British journal of ophthalmology.* 1981;65(2):108-11.
20. Mahajan A, Hasíková L, Hampel U, Grüneboom A, Shan X, Herrmann I, et al. Aggregated neutrophil extracellular traps occlude Meibomian glands during ocular surface inflammation. *The Ocular Surface.* 2021;20:1-12.

21. Jester JV, Parfitt GJ, Brown DJ. Meibomian gland dysfunction: hyperkeratinization or atrophy? *BMC Ophthalmol.* 2015;15 Suppl 1:156.
22. Parfitt GJ, Xie Y, Geyfman M, Brown DJ, Jester JV. Absence of ductal hyperkeratinization in mouse age-related meibomian gland dysfunction (ARMGD). *Aging.* 2013;5(11):825-34.
23. Butovich IA. Meibomian glands, meibum, and meibogenesis. *Exp Eye Res.* 2017;163:2-16.
24. Nien CJ, Massei S, Lin G, Nabavi C, Tao J, Brown DJ, et al. Effects of age and dysfunction on human meibomian glands. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960).* 2011;129(4):462-9.
25. Khandelwal P, Liu S, Sullivan DA. Androgen regulation of gene expression in human meibomian gland and conjunctival epithelial cells. *Mol Vis.* 2012;18:1055-67.
26. Sullivan DA, Liu Y, Kam WR, Ding J, Green KM, Shaffer SA, et al. Serum-Induced Differentiation of Human Meibomian Gland Epithelial Cells. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2014;55(6):3866-77.
27. Kim SW, Brown DJ, Jester JV. Transcriptome analysis after PPAR $\gamma$  activation in human meibomian gland epithelial cells (hMGEC). *The ocular surface.* 2019;17(4):809-16.
28. Nien CJ, Paugh JR, Massei S, Wahlert AJ, Kao WW, Jester JV. Age-related changes in the meibomian gland. *Exp Eye Res.* 2009;89(6):1021-7.
29. Jester JV, Potma E, Brown DJ. PPAR $\gamma$  Regulates Mouse Meibocyte Differentiation and Lipid Synthesis. *The ocular surface.* 2016;14(4):484-94.
30. Jester JV, Brown DJ. Wakayama Symposium: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR $\gamma$ ) and meibomian gland dysfunction. *Ocul Surf.* 2012;10(4):224-9.
31. Kim SW, Xie Y, Nguyen PQ, Bui VT, Huynh K, Kang JS, et al. PPAR $\gamma$  regulates meibocyte differentiation and lipid synthesis of cultured human meibomian gland epithelial cells (hMGEC). *Ocul Surf.* 2018;16(4):463-9.
32. Sabeti S, Kheirkhah A, Yin J, Dana R. Management of meibomian gland dysfunction: a review. *Survey of ophthalmology.* 2020;65(2):205-17.
33. Phan MAT, Madigan MC, Stapleton F, Willcox M, Golebiowski B. Human meibomian gland epithelial cell culture models: Current progress, challenges, and future directions. *The Ocular Surface.* 2022;23:96-113.
34. Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, Caffery B, Dua HS, Joo CK, et al. TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):276-83.
35. Shimazaki J. Definition and Diagnostic Criteria of Dry Eye Disease: Historical Overview and Future Directions. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2018;59(14):DES7-DES12.
36. Yazdani C, McLaughlin T, Smeeding JE, Walt J. Prevalence of treated dry eye disease in a managed care population. *Clinical therapeutics.* 2001;23(10):1672-82.
37. Viso E, Gude F, Rodríguez-Ares MT. The association of meibomian gland dysfunction and other common ocular diseases with dry eye: a population-based study in Spain. *Cornea.* 2011;30(1):1-6.
38. Lin P-Y, Tsai S-Y, Cheng C-Y, Liu J-H, Chou P, Hsu W-M. Prevalence of dry eye among an elderly Chinese population in Taiwan. *Ophthalmology.* 2003;110(6):1096-101.
39. Lu P, Chen X, Liu X, Yu L, Kang Y, Xie Q, et al. Dry Eye Syndrome in Elderly Tibetans at High Altitude: A Population-based Study in China. 2008;27(5):545-51.
40. Clayton JA. Dry Eye. *N Engl J Med.* 2018;378(23):2212-23.
41. Stern ME, Gao J, Siemasko KF, Beuerman RW, Pflugfelder SC. The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. *Experimental Eye Research.* 2004;78(3):409-16.
42. Pflugfelder SC, Stern ME. Biological functions of tear film. *Exp Eye Res.* 2020;197:108115.
43. King-Smith PE, Fink BA, Fogt N, Nichols KK, Hill RM, Wilson GS. The thickness of the human precorneal tear film: evidence from reflection spectra. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2000;41(11):3348-59.

44. Zhou L, Beuerman RW. Tear analysis in ocular surface diseases. *Progress in retinal and eye research*. 2012;31(6):527-50.
45. Willcox MDP, Argueso P, Georgiev GA, Holopainen JM, Laurie GW, Millar TJ, et al. TFOS DEWS II Tear Film Report. *Ocul Surf*. 2017;15(3):366-403.
46. Reitmeir P, Linkohr B, Heier M, Molnos S, Strobl R, Schulz H, et al. Common eye diseases in older adults of southern Germany: results from the KORA-Age study. *Age Ageing*. 2017;46(3):481-6.
47. Chia EM, Mitchell P, Rochtchina E, Lee AJ, Maroun R, Wang JJ. Prevalence and associations of dry eye syndrome in an older population: the Blue Mountains Eye Study. *Clinical & experimental ophthalmology*. 2003;31(3):229-32.
48. Alghamdi YA, Mercado C, McClellan AL, Batawi H, Karp CL, Galor A. Epidemiology of Meibomian Gland Dysfunction in an Elderly Population. *Cornea*. 2016;35(6):731-5.
49. Michael A, Lemp MC. The Definition and Classification of Dry Eye Disease: Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop (2007). *The Ocular Surface*. 2007;5(2):75-92.
50. Akpek EK, Bunya VY, Saldanha IJ. Sjögren's Syndrome: More Than Just Dry Eye. *Cornea*. 2019;38(5):658-61.
51. Hessen M, Akpek EK. Dry eye: an inflammatory ocular disease. *Journal of ophthalmic & vision research*. 2014;9(2):240-50.
52. Coursey TG, Bohat R, Barbosa FL, Pflugfelder SC, de Paiva CS. Desiccating stress-induced chemokine expression in the epithelium is dependent on upregulation of NKG2D/RAE-1 and release of IFN- $\gamma$  in experimental dry eye. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2014;193(10):5264-72.
53. Li DQ, Chen Z, Song XJ, Luo L, Pflugfelder SC. Stimulation of matrix metalloproteinases by hyperosmolarity via a JNK pathway in human corneal epithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2004;45(12):4302-11.
54. Sonawane S, Khanolkar V, Namavari A, Chaudhary S, Gandhi S, Tibrewal S, et al. Ocular Surface Extracellular DNA and Nuclease Activity Imbalance: A New Paradigm for Inflammation in Dry Eye Disease. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2012;53(13).
55. Tibrewal S, Ivanir Y, Sarkar J, Nayeb-Hashemi N, Bouchard CS, Kim E, et al. Hyperosmolar stress induces neutrophil extracellular trap formation: implications for dry eye disease. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2014;55(12):7961-9.
56. Messmer EM. The pathophysiology, diagnosis, and treatment of dry eye disease. *Dtsch Arztebl Int*. 2015;112(5):71-81; quiz 2.
57. Jacobi C, Cursiefen C. [Ophthalmological complications in Sjögren's syndrome]. *Zeitschrift für Rheumatologie*. 2010;69(1):32-40.
58. Bron AJ, Tomlinson A, Foulks GN, Pepose JS, Baudouin C, Geerling G, et al. Rethinking dry eye disease: a perspective on clinical implications. *Ocul Surf*. 2014;12(2 Suppl):S1-31.
59. Sullivan BD, Crews LA, Messmer EM, Foulks GN, Nichols KK, Baenninger P, et al. Correlations between commonly used objective signs and symptoms for the diagnosis of dry eye disease: clinical implications. *Acta ophthalmologica*. 2014;92(2):161-6.
60. Wolffsohn JS, Arita R, Chalmers R, Djalilian A, Dogru M, Dumbleton K, et al. TFOS DEWS II Diagnostic Methodology report. *Ocul Surf*. 2017;15(3):539-74.
61. McMonnies CW. Why the symptoms and objective signs of dry eye disease may not correlate. *Journal of optometry*. 2021;14(1):3-10.
62. Moshirfar M, Benstead EE, Sorrentino PM, Tripathy K. *Ocular Neuropathic Pain*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.
63. Goyal S, Hamrah P. Understanding Neuropathic Corneal Pain--Gaps and Current Therapeutic Approaches. *Semin Ophthalmol*. 2016;31(1-2):59-70.
64. Hom MM, Martinson JR, Knapp LL, Paugh JR. Prevalence of Meibomian gland dysfunction. *Optometry and vision science : official publication of the American Academy of Optometry*. 1990;67(9):710-2.

65. Knop E, Knop N, Brewitt H, Pleyer U, Rieck P, Seitz B, et al. [Meibomian glands : part III. Dysfunction - argument for a discrete disease entity and as an important cause of dry eye]. *Ophthalmologe*. 2009;106(11):966-79.
66. Duke-Elder S. *The Anatomy of the Visual System*. Henry Kimpton; London: System of Ophthalmology Vol II. 1961.
67. Nicolaidis N, Kaitaranta JK, Rawdah TN, Macy JI, Boswell FM, 3rd, Smith RE. Meibomian gland studies: comparison of steer and human lipids. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1981;20(4):522-36.
68. Gorgas K, Völkl A. Peroxisomes in sebaceous glands. IV. Aggregates of tubular peroxisomes in the mouse Meibomian gland. *The Histochemical journal*. 1984;16(10):1079-98.
69. Knop E, Knop N, Schirra F. [Meibomian glands. Part II: physiology, characteristics, distribution and function of meibomian oil]. *Ophthalmologe*. 2009;106(10):884-92.
70. Pucker AD, Haworth KM. The presence and significance of polar meibum and tear lipids. *Ocul Surf*. 2015;13(1):26-42.
71. Bron AJ, Tiffany JM, Gouveia SM, Yokoi N, Voon LW. Functional aspects of the tear film lipid layer. *Exp Eye Res*. 2004;78(3):347-60.
72. Bhamla MS, Chai C, Rabiah NI, Frostad JM, Fuller GG. Instability and Breakup of Model Tear Films. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2016;57(3):949-58.
73. Tsai PS, Evans JE, Green KM, Sullivan RM, Schaumberg DA, Richards SM, et al. Proteomic analysis of human meibomian gland secretions. *The British journal of ophthalmology*. 2006;90(3):372-7.
74. Linton RG, Curnow DH, Riley WJ. THE MEIBOMIAN GLANDS: AN INVESTIGATION INTO THE SECRETION AND SOME ASPECTS OF THE PHYSIOLOGY. *The British journal of ophthalmology*. 1961;45(11):718-23.
75. Brown SH, Kunnen CM, Duchoslav E, Dolla NK, Kelso MJ, Papas EB, et al. A comparison of patient matched meibum and tear lipidomes. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2013;54(12):7417-24.
76. Lam SM, Tong L, Reux B, Duan X, Petznick A, Yong SS, et al. Lipidomic analysis of human tear fluid reveals structure-specific lipid alterations in dry eye syndrome. *Journal of lipid research*. 2014;55(2):299-306.
77. Butovich IA, McMahon A, Wojtowicz JC, Lin F, Mancini R, Itani K. Dissecting lipid metabolism in meibomian glands of humans and mice: An integrative study reveals a network of metabolic reactions not duplicated in other tissues. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1861(6):538-53.
78. Wojtowicz JC, Butovich IA, McCulley JP. Historical brief on composition of human meibum lipids. *Ocul Surf*. 2009;7(3):145-53.
79. Gilbard JP, Rossi SR, Heyda KG. Tear film and ocular surface changes after closure of the meibomian gland orifices in the rabbit. *Ophthalmology*. 1989;96(8):1180-6.
80. McCulley JP, Shine WE. Meibomian gland function and the tear lipid layer. *Ocul Surf*. 2003;1(3):97-106.
81. Tomlinson A, Bron AJ, Korb DR, Amano S, Paugh JR, Pearce EI, et al. The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the diagnosis subcommittee. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2011;52(4):2006-49.
82. Viso E, Rodríguez-Ares MT, Abelenda D, Oubiña B, Gude F. Prevalence of asymptomatic and symptomatic meibomian gland dysfunction in the general population of Spain. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2012;53(6):2601-6.
83. Jie Y, Xu L, Wu YY, Jonas JB. Prevalence of dry eye among adult Chinese in the Beijing Eye Study. *Eye (London, England)*. 2009;23(3):688-93.
84. Pflugfelder SCGG, Shigero Kinoshita, MD; Michael A. Lemp, MD; James McCulley, MD; Daniel Nelson, MD; Gary N. Novack, PhD; Jun Shimazaki, MD; Clive Wilson, PhD. Management and therapy of dry eye disease: report of the Management and Therapy Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf*. 2007;5(2):163-78.

85. Xu KK, Huang YK, Liu X, Zhang MC, Xie HT. Organotypic Culture of Mouse Meibomian Gland: A Novel Model to Study Meibomian Gland Dysfunction In Vitro. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2020;61(4):30.
86. Auw-Haedrich C, Reinhard T. [Chronic blepharitis. Pathogenesis, clinical features, and therapy]. *Ophthalmologie*. 2007;104(9):817-26; quiz 27-8.
87. Hwang HS, Parfitt GJ, Brown DJ, Jester JV. Meibocyte differentiation and renewal: Insights into novel mechanisms of meibomian gland dysfunction (MGD). *Exp Eye Res*. 2017;163:37-45.
88. Chatterjee S, Agrawal D, Sharma A. Meibomian Gland Dysfunction in a Hospital-Based Population in Central India. *Cornea*. 2020;39(5):634-9.
89. Den S, Shimizu K, Ikeda T, Tsubota K, Shimmura S, Shimazaki J. Association Between Meibomian Gland Changes and Aging, Sex, or Tear Function. 2006;25(6):651-5.
90. Sullivan BD, Evans JE, Dana MR, Sullivan DA. Influence of aging on the polar and neutral lipid profiles in human meibomian gland secretions. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960)*. 2006;124(9):1286-92.
91. Wang H, Zou Z, Wan L, Xue J, Chen C, Yu B, et al. Periplocin ameliorates mouse age-related meibomian gland dysfunction through up-regulation of Na/K-ATPase via SRC pathway. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2022;146:112487.
92. Rosen ED, Spiegelman BM. PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(41):37731-4.
93. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, et al. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Molecular cell*. 1999;4(4):611-7.
94. Fenga C, Aragona P, Cacciola A, Spinella R, Di Nola C, Ferreri F, et al. Meibomian gland dysfunction and ocular discomfort in video display terminal workers. *Eye (London, England)*. 2008;22(1):91-5.
95. McCulley JP, Uchiyama E, Aronowicz JD, Butovich IA. Impact of evaporation on aqueous tear loss. *Transactions of the American Ophthalmological Society*. 2006;104:121-8.
96. Suhaim JL, Parfitt GJ, Xie Y, De Paiva CS, Pflugfelder SC, Shah TN, et al. Effect of desiccating stress on mouse meibomian gland function. *Ocul Surf*. 2014;12(1):59-68.
97. Palaniappan CK, Schütt BS, Bräuer L, Schicht M, Millar TJ. Effects of keratin and lung surfactant proteins on the surface activity of meibomian lipids. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2013;54(4):2571-81.
98. Rocha EM, Wickham LA, da Silveira LA, Krenzer KL, Yu FS, Toda I, et al. Identification of androgen receptor protein and 5alpha-reductase mRNA in human ocular tissues. *The British journal of ophthalmology*. 2000;84(1):76-84.
99. Sullivan DA, Sullivan BD, Ullman MD, Rocha EM, Krenzer KL, Cermak JM, et al. Androgen influence on the meibomian gland. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2000;41(12):3732-42.
100. Sullivan DA, Sullivan BD, Evans JE, Schirra F, Yamagami H, Liu M, et al. Androgen deficiency, Meibomian gland dysfunction, and evaporative dry eye. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002;966:211-22.
101. Auw-Haedrich C, Feltgen N. Estrogen receptor expression in meibomian glands and its correlation with age and dry-eye parameters. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 2003;241(9):705-9.
102. Suzuki T, Minami Y, Komuro A, Yokoi N, Kinoshita S. Meibomian Gland Physiology in Pre- and Postmenopausal Women. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2017;58(2):763-71.
103. Schaumberg DA, Buring JE, Sullivan DA, Dana MR. Hormone replacement therapy and dry eye syndrome. *Jama*. 2001;286(17):2114-9.
104. Bron AJ, Tiffany JM. The contribution of meibomian disease to dry eye. *Ocul Surf*. 2004;2(2):149-65.

105. Chhadva P, Goldhardt R, Galor A. Meibomian Gland Disease: The Role of Gland Dysfunction in Dry Eye Disease. *Ophthalmology*. 2017;124(11S):S20-S6.
106. Lavker RM, Treet J, Sun T. Label-retaining Cells (LRCs) Are Preferentially Located in the Ductal Epithelium of the Meibomian Gland: Implications on the Mucocutaneous Junctional (MCJ) Epithelium of the Eyelid. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2003;44(13):3781-.
107. Olami Y, Zajicek G, Cogan M, Gnessin H, Pe'er J. Turnover and migration of meibomian gland cells in rats' eyelids. *Ophthalmic research*. 2001;33(3):170-5.
108. Parfitt GJ, Geyfman M, Xie Y, Jester JV. Characterization of quiescent epithelial cells in mouse meibomian glands and hair follicle/sebaceous glands by immunofluorescence tomography. *The Journal of investigative dermatology*. 2015;135(4):1175-7.
109. Parfitt GJ, Lewis PN, Young RD, Richardson A, Lyons JG, Di Girolamo N, et al. Renewal of the Holocrine Meibomian Glands by Label-Retaining, Unipotent Epithelial Progenitors. *Stem cell reports*. 2016;7(3):399-410.
110. Jastaneiah S, Al-Rajhi AA. Association of aniridia and dry eyes. *Ophthalmology*. 2005;112(9):1535-40.
111. Palamar M, Karaca I, Onay H, Ertam I, Yagci A. Dry eye and Meibomian gland dysfunction with meibography in patients with lamellar ichthyosis. *Contact lens & anterior eye : the journal of the British Contact Lens Association*. 2018;41(2):154-6.
112. AlDarrab A, Al-Faky YH, Mousa A, Alsuhaibani AH. Meibography of Eyes With Sequelae of Trachoma. 2018;37(4):416-20.
113. Kam WR, Sullivan DA. Neurotransmitter influence on human meibomian gland epithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2011;52(12):8543-8.
114. Miyake H, Oda T, Katsuta O, Seno M, Nakamura M. Meibomian Gland Dysfunction Model in Hairless Mice Fed a Special Diet With Limited Lipid Content. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2016;57(7):3268-75.
115. Yoo YS, Park SK, Hwang HS, Kim HS, Arita R, Na KS. Association of Serum Lipid Level with Meibum Biosynthesis and Meibomian Gland Dysfunction: A Review. *Journal of clinical medicine*. 2022;11(14).
116. Reyes N SD. Pathogenesis of meibomian gland dysfunction (MGD) requires the T cell-neutrophil axis, in the allergy setting. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016.
117. Düzgün E, Özkur E. The effect of oral isotretinoin therapy on meibomian gland morphology and dry eye tests. *The Journal of dermatological treatment*. 2020:1-7.
118. Agnifili L, Fasanella V, Costagliola C, Ciabattini C, Mastropasqua R, Frezzotti P, et al. In vivo confocal microscopy of meibomian glands in glaucoma. *The British journal of ophthalmology*. 2013;97(3):343-9.
119. Bron AJ, Mengher LS. Congenital deficiency of meibomian glands. *The British journal of ophthalmology*. 1987;71(4):312-4.
120. Rho CR, Kim SW, Lane S, Gao F, Kim J, Xie Y, et al. Expression of Acyl-CoA wax-alcohol acyltransferase 2 (AWAT2) by human and rabbit meibomian glands and meibocytes. *Ocul Surf*. 2022;23:60-70.
121. Liu S, Hatton MP, Khandelwal P, Sullivan DA. Culture, immortalization, and characterization of human meibomian gland epithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2010;51(8):3993-4005.
122. Zhang C, Zhu L, Liu X, Jiang M, Tang Q, Xu F, et al. Establishment of a human meibomian gland carcinoma cell model and analysis of differently expressed genes. *Experimental Eye Research*. 2022;219:108983.
123. 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. *The American journal of pathology*. 2019;189(8):1559-68.
124. Gstraunthaler G, Lindl T. Allgemeine Aspekte der Primärkultur. Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. p. 151-62.
125. Masters JR. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nature reviews Cancer*. 2002;2(4):315-9.

126. Fujie T, Shikiji T, Uchida N, Urano Y, Nagae H, Arase S. Culture of cells derived from the human sebaceous gland under serum-free conditions without a biological feeder layer or specific matrices. *Archives of dermatological research*. 1996;288(11):703-8.
127. Wu X, Wang S, Li M, Li J, Shen J, Zhao Y, et al. Conditional reprogramming: next generation cell culture. *Acta pharmaceutica Sinica B*. 2020;10(8):1360-81.
128. Wright WE, Pereira-Smith OM, Shay JW. Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Molecular and cellular biology*. 1989;9(7):3088-92.
129. Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA, Klingelhutz AJ. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature*. 1998;396(6706):84-8.
130. Farwell DG, Shera KA, Koop JI, Bonnet GA, Matthews CP, Reuther GW, et al. Genetic and epigenetic changes in human epithelial cells immortalized by telomerase. *The American journal of pathology*. 2000;156(5):1537-47.
131. Jha KK, Banga S, Palejwala V, Ozer HL. SV40-Mediated immortalization. *Experimental cell research*. 1998;245(1):1-7.
132. Bartek J, Bartkova J, Kyprianou N, Lalani EN, Staskova Z, Shearer M, et al. Efficient immortalization of luminal epithelial cells from human mammary gland by introduction of simian virus 40 large tumor antigen with a recombinant retrovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(9):3520-4.
133. Montalto MC, Phillips JS, Ray FA. Telomerase activation in human fibroblasts during escape from crisis. *Journal of cellular physiology*. 1999;180(1):46-52.
134. Lee KM, Choi KH, Ouellette MM. Use of exogenous hTERT to immortalize primary human cells. *Cytotechnology*. 2004;45(1-2):33-8.
135. Counter CM, Hahn WC, Wei W, Caddle SD, Beijersbergen RL, Lansdorp PM, et al. Dissociation among in vitro telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(25):14723-8.
136. Bisson F, Rochefort E, Lavoie A, Larouche D, Zaniolo K, Simard-Bisson C, et al. Irradiated human dermal fibroblasts are as efficient as mouse fibroblasts as a feeder layer to improve human epidermal cell culture lifespan. *Int J Mol Sci*. 2013;14(3):4684-704.
137. Maskin SL, Tseng SC. Clonal growth and differentiation of rabbit meibomian gland epithelium in serum-free culture: differential modulation by EGF and FGF. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1992;33(1):205-17.
138. Yu D, Davis RM, Aita M, Burns KA, Clapp PW, Gilmore RC, et al. Characterization of Rat Meibomian Gland Ion and Fluid Transport. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2016;57(4):2328-43.
139. Liu S, Kam WR, Ding J, Hatton MP, Sullivan DA. Effect of Growth Factors on the Proliferation and Gene Expression of Human Meibomian Gland Epithelial Cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2013;54(4):2541-50.
140. Hampel U, Schröder A, Mitchell T, Brown S, Snikeris P, Garreis F, et al. Serum-Induced Keratinization Processes in an Immortalized Human Meibomian Gland Epithelial Cell Line. *PLoS One*. 2015;10(6):e0128096.
141. Liu Y, Kam WR, Ding J, Sullivan DA. One man's poison is another man's meat: Using azithromycin-induced phospholipidosis to promote ocular surface health. *Toxicology*. 2014;320:1-5.
142. Liu Y, Kam WR, Sullivan DA. Influence of Omega 3 and 6 Fatty Acids on Human Meibomian Gland Epithelial Cells. *Cornea*. 2016;35(8):1122-6.
143. Hampel U, Krüger M, Kunnen C, Garreis F, Willcox M, Paulsen F. In vitro effects of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid on human meibomian gland epithelial cells. *Experimental Eye Research*. 2015;140:139-48.
144. Ding J, Liu Y, Sullivan DA. Effects of Insulin and High Glucose on Human Meibomian Gland Epithelial Cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2015;56(13):7814-20.



145. Ding J, Sullivan DA. The effects of insulin-like growth factor 1 and growth hormone on human meibomian gland epithelial cells. *JAMA ophthalmology*. 2014;132(5):593-9.
146. Liu Y, Ding J. The Combined Effect of Azithromycin and Insulin-Like Growth Factor-1 on Cultured Human Meibomian Gland Epithelial Cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2014;55(9):5596-601.
147. Liu Y, Kam WR, Ding J, Sullivan DA. Effect of azithromycin on lipid accumulation in immortalized human meibomian gland epithelial cells. *JAMA ophthalmology*. 2014;132(2):226-8.
148. Liu Y, Kam WR, Ding J, Sullivan DA. Can tetracycline antibiotics duplicate the ability of azithromycin to stimulate human meibomian gland epithelial cell differentiation? *Cornea*. 2015;34(3):342-6.
149. Liu Y, Wang J, Chen D, Kam WR, Sullivan DA. The Role of Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  in the Regulation of Human Meibomian Gland Epithelial Cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2020;61(3):1.
150. Gidfar S, Afsharkhamseh N, Sanjari S, Djalilian AR. Notch Signaling in Meibomian Gland Epithelial Cell Differentiation. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2016;57(3):859-65.
151. Kam WR, Liu Y, Ding J, Sullivan DA. Do Cyclosporine A, an IL-1 Receptor Antagonist, Uridine Triphosphate, Rebamipide, and/or Bimatoprost Regulate Human Meibomian Gland Epithelial Cells? *Investigative ophthalmology & visual science*. 2016;57(10):4287-94.
152. Ziemanski JF, Wilson L, Barnes S, Nichols KK. Prostaglandin E2 and F2 $\alpha$  Alter Expression of Select Cholesteryl Esters and Triacylglycerols Produced by Human Meibomian Gland Epithelial Cells. *Cornea*. 2022;41(1):95-105.
153. Ziemanski JF, Wilson L, Barnes S, Nichols KK. Saturation of cholesteryl esters produced by human meibomian gland epithelial cells after treatment with rosiglitazone. *Ocul Surf*. 2021;20:39-47.
154. Ziemanski JF, Wilson L, Barnes S, Nichols KK. Triacylglycerol lipidome from human meibomian gland epithelial cells: Description, response to culture conditions, and perspective on function. *Exp Eye Res*. 2021;207:108573.
155. Schröder A, Abrar DB, Hampel U, Schicht M, Paulsen F, Garreis F. In vitro effects of sex hormones in human meibomian gland epithelial cells. *Experimental Eye Research*. 2016;151:190-202.
156. Jun I, Choi YJ, Kim BR, Seo KY, Kim TI. Activation of ADRB2/PKA Signaling Pathway Facilitates Lipid Synthesis in Meibocytes, and Beta-Blocker Glaucoma Drug Impedes PKA-Induced Lipid Synthesis by Inhibiting ADRB2. *Int J Mol Sci*. 2022;23(16).
157. Wang J, Liu Y, Kam WR, Li Y, Sullivan DA. Toxicity of the cosmetic preservatives parabens, phenoxyethanol and chlorphenesin on human meibomian gland epithelial cells. *Exp Eye Res*. 2020;196:108057.
158. Chen D, Wang J, Sullivan DA, Kam WR, Liu Y. Effects of Terpinen-4-ol on Meibomian Gland Epithelial Cells In Vitro. *Cornea*. 2020;39(12):1541-6.
159. Han X, Yang S, Kam WR, Sullivan DA, Liu Y. The Carbonic Anhydrase Inhibitor Dorzolamide Stimulates the Differentiation of Human Meibomian Gland Epithelial Cells. *Current eye research*. 2020;45(12):1604-10.
160. Nien CJ, Massei S, Lin G, Liu H, Paugh JR, Liu CY, et al. The development of meibomian glands in mice. *Mol Vis*. 2010;16:1132-40.
161. Glitazones in type 2 diabetes: an update. *Drug and therapeutics bulletin*. 2008;46(4):25-9.
162. Bu J, Wu Y, Cai X, Jiang N, Jeyalatha MV, Yu J, et al. Hyperlipidemia induces meibomian gland dysfunction. *Ocul Surf*. 2019;17(4):777-86.
163. Phan MAT, Madigan MC, Willcox M, Stapleton F, Golebiowski B. Semi-quantification of lipids in human meibomian gland epithelial cells using dual staining microplate assays. *Exp Eye Res*. 2021;210:108719.
164. Kim SW, Rho CR, Kim J, Xie Y, Prince RC, Mustafa K, et al. Eicosapentaenoic acid (EPA) activates PPAR $\gamma$  signaling leading to cell cycle exit, lipid accumulation,

- and autophagy in human meibomian gland epithelial cells (hMGEC). *Ocul Surf.* 2020;18(3):427-37.
165. Macsai MS. The role of omega-3 dietary supplementation in blepharitis and meibomian gland dysfunction (an AOS thesis). *Transactions of the American Ophthalmological Society.* 2008;106:336-56.
166. Giannaccare G, Pellegrini M, Sebastiani S, Bernabei F, Roda M, Taroni L, et al. Efficacy of Omega-3 Fatty Acid Supplementation for Treatment of Dry Eye Disease: A Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *Cornea.* 2019;38(5):565-73.
167. Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes & development.* 1997;11(18):2295-322.
168. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 2002;420(6916):629-35.
169. Shi J, Wei L. Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis.* 2007;55(2):61-75.
170. Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, Maekawa M, et al. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Molecular pharmacology.* 2000;57(5):976-83.
171. Okumura N, Ueno M, Koizumi N, Sakamoto Y, Hirata K, Hamuro J, et al. Enhancement on primate corneal endothelial cell survival in vitro by a ROCK inhibitor. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2009;50(8):3680-7.
172. Achiron A, Feldman A, Karmona L, Pe'er L, Avizemer H, Bartov E, et al. Effect of Rho-associated kinase inhibitor on human corneal endothelial cell apoptosis. *Journal of cataract and refractive surgery.* 2020;46(4):612-6.
173. Mishan MA, Balagholi S, Chamani T, Feizi S, Soheili ZS, Rezaei Kanavi M. Comparative culture of human corneal endothelial cells following treatment with human platelet lysate/fibrin hydrogel versus Y-27632 ROCK inhibitor: in vitro and ex vivo study. *International ophthalmology.* 2022;42(5):1469-79.
174. Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature biotechnology.* 2007;25(6):681-6.
175. Chapman S, Liu X, Meyers C, Schlegel R, McBride AA. Human keratinocytes are efficiently immortalized by a Rho kinase inhibitor. *The Journal of clinical investigation.* 2010;120(7):2619-26.
176. Liu X, Ory V, Chapman S, Yuan H, Albanese C, Kallakury B, et al. ROCK inhibitor and feeder cells induce the conditional reprogramming of epithelial cells. *The American journal of pathology.* 2012;180(2):599-607.
177. Bove PF, Dang H, Cheluvharaju C, Jones LC, Liu X, O'Neal WK, et al. Breaking the in vitro alveolar type II cell proliferation barrier while retaining ion transport properties. *American journal of respiratory cell and molecular biology.* 2014;50(4):767-76.
178. Lorenzo Y, Haug Berg K, Ringvold A, Petrovski G, Moe MC, Collins A, et al. Levels of oxidative DNA damage are low in ex vivo engineered human limbal epithelial tissue. *Acta ophthalmologica.* 2018;96(8):834-40.
179. Paul Marienfeld GmbH. *Gebrauchsanweisung Zählkammern.* 05/2019 p. 5.
180. Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. In: Gilbert DF, Friedrich O, editors. *Cell Viability Assays: Methods and Protocols.* New York, NY: Springer New York; 2017. p. 1-17.
181. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research.* 2001;29(9):e45-e.
182. Kutsuna M, Kodama T, Sumida M, Nagai A, Higashine M, Zhang W, et al. Presence of adipose differentiation-related protein in rat meibomian gland cells. *Exp Eye Res.* 2007;84(4):687-93.
183. McMahon A, Lu H, Butovich IA. A role for ELOVL4 in the mouse meibomian gland and sebocyte cell biology. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2014;55(5):2832-40.

184. Liu S, Richards SM, Lo K, Hatton M, Fay A, Sullivan DA. Changes in gene expression in human meibomian gland dysfunction. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2011;52(5):2727-40.
185. Bhattacharya D, Yu L, Wang M. Expression patterns of conjunctival mucin 5AC and aquaporin 5 in response to acute dry eye stress. *PLoS One*. 2017;12(11):e0187188-e.
186. Tektaş OY, Yadav A, Garreis F, Schlötzer-Schrehardt U, Schicht M, Hampel U, et al. Characterization of the mucocutaneous junction of the human eyelid margin and meibomian glands with different biomarkers. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft*. 2012;194(5):436-45.
187. Portal C, Gouyer V, Gottrand F, Dessey J-L. Ocular mucins in dry eye disease. *Experimental Eye Research*. 2019;186:107724.
188. Wittmann J, Dieckow J, Schröder H, Hampel U, Garreis F, Jacobi C, et al. Plasma gelsolin promotes re-epithelialization. *Sci Rep*. 2018;8(1):13140-.
189. Yang F, Hayashi I, Sato S, Saijo-Ban Y, Yamane M, Fukui M, et al. Eyelid blood vessel and meibomian gland changes in a sclerodermatous chronic GVHD mouse model. *Ocul Surf*. 2021.
190. Kuburich NA, den Hollander P, Pietz JT, Mani SA. Vimentin and cytokeratin: Good alone, bad together. *Seminars in cancer biology*. 2022;86(Pt 3):816-26.
191. Reneker LW, Irlmeier RT, Shui YB, Liu Y, Huang AJW. Histopathology and selective biomarker expression in human meibomian glands. *The British journal of ophthalmology*. 2020;104(7):999-1004.
192. Chen X, Sullivan BD, Darabad RR, Liu S, Kam WR, Sullivan DA. Are BALB/c Mice Relevant Models for Understanding Sex-Related Differences in Gene Expression in the Human Meibomian Gland? *Cornea*. 2019;38(12):1554-62.
193. Escorcía W, Ruter DL, Nhan J, Curran SP. Quantification of Lipid Abundance and Evaluation of Lipid Distribution in *Caenorhabditis elegans* by Nile Red and Oil Red O Staining. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2018(133).
194. Khouri MR, Huang G, Shiau YF. Sudan stain of fecal fat: new insight into an old test. *Gastroenterology*. 1989;96(2 Pt 1):421-7.
195. Rasch D, Guiard V. The robustness of parametric statistical methods. *Psychology Science*. 2004;46:175-208.
196. Wilcox RR. Introduction to robust estimation and hypothesis testing (3rd ed.) *Statistical modeling and decision science* 2012.
197. Döring N, Bortz J. *Datenanalyse. Forschungsmethoden und Evaluation in den Sozial- und Humanwissenschaften*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016. p. 597-784.
198. Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences* (2nd ed.). Routledge. 1988:25-6.
199. Baust JM, Buehring GC, Campbell L, Elmore E, Harbell JW, Nims RW, et al. Best practices in cell culture: an overview. *In vitro cellular & developmental biology Animal*. 2017;53(8):669-72.
200. Adamowicz J, Pasternak I, Kloskowski T, Gniadek M, Van Breda SV, Buhl M, et al. Development of a conductive biocomposite combining graphene and amniotic membrane for replacement of the neuronal network of tissue-engineered urinary bladder. *Sci Rep*. 2020;10(1):5824.
201. Michalak-Mińska K, Büchler VL, Zapiórkowska-Blumer N, Biedermann T, Klar AS. Characterization of a melanocyte progenitor population in human interfollicular epidermis. *Cell reports*. 2022;38(9):110419.
202. Pan X, Wang Y, Lübke T, Hinek A, Pshezhetsky AV. Mice, double deficient in lysosomal serine carboxypeptidases *Scepe1* and *Cathepsin A* develop the hyperproliferative vesicular corneal dystrophy and hypertrophic skin thickenings. *PLoS One*. 2017;12(2):e0172854.
203. Knop N, Knop E. [Meibomian glands. Part I: anatomy, embryology and histology of the Meibomian glands]. *Ophthalmologie*. 2009;106(10):872-83.

204. Ito A, Sakiguchi T, Kitamura K, Akamatsu H, Horio T. Establishment of a tissue culture system for hamster sebaceous gland cells. *Dermatology* (Basel, Switzerland). 1998;197(3):238-44.
205. Dahlmann C. Grundlagen. In: Dahlmann C, editor. *Sicca-Syndrom*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019. p. 1-17.
206. Liu S, Li J, Tan DT, Beuerman RW. The eyelid margin: a transitional zone for 2 epithelial phenotypes. *Archives of ophthalmology* (Chicago, Ill : 1960). 2007;125(4):523-32.
207. Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochemistry and cell biology*. 2008;129(6):705-33.

## 8 Anhang

<b>Anhang A: Zusammensetzung des Spenderkollektives .....</b>	<b>108</b>
Tabelle A1: Zusammensetzung des Spenderkollektives der Primärzellkultur aus Überschussgewebe der lateralen Zügelplastik.....	108
Tabelle A2: Zusammensetzung des Spenderkollektives der Primärzellkultur aus Tarsi von Körperspendern.....	108
<b>Anhang B: Auswachsdauer der Meibomdrüsenzellen.....</b>	<b>109</b>
Tabelle B1: Zeit bis zum Auswachsen der Meibomdrüsenzellen nach Kultivierung .....	109
<b>Anhang C: Zellfläche.....</b>	<b>110</b>
Tabelle C1: Zellfläche der Meibomdrüsenzellen.....	110
Tabelle C2: <i>t</i> -Test für Mittelwertvergleiche der Zellfläche.....	110
<b>Anhang D: Lipidanteil.....</b>	<b>111</b>
Tabelle D1: Lipidanteil an der Zellfläche .....	111
Tabelle D2: <i>t</i> -Test für Mittelwertvergleiche des Lipidanteils.....	111
<b>Anhang E: Genexpression .....</b>	<b>112</b>
Tabelle E1: Genexpression PLIN2 (ANOVA) .....	112
Tabelle E2: Genexpression ELOVL4 (ANOVA).....	112
Tabelle E3: Genexpression SCD (ANOVA).....	113
Tabelle E4: Genexpression FABP4 (ANOVA).....	113
Tabelle E5: Paarweise Vergleiche der Genexpression FABP4 (Tukey post-hoc Test)	114
Tabelle E6: Genexpression MUC5AC (Kruskal-Wallis-Test).....	114
Tabelle E7: Paarweise Vergleiche der Genexpression MUC5AC (Kruskal-Wallis-Test) .....	114
Tabelle E8: Genexpression MUC16 (ANOVA) .....	115
Tabelle E9: Genexpression ACTA2 (Welch-Test) .....	115
Tabelle E10: Paarweise Vergleiche der Genexpression ACTA2 (Games-Howell post- Hoc-Test).....	116
Tabelle E11: Genexpression Vimentin (ANOVA).....	116
Tabelle E12: Paarweise Vergleiche der Genexpression Vimentin (Tukey post-Hoc-Test) .....	117
Tabelle E13: Genexpression Keratin 5 (ANOVA) .....	117
Tabelle E14: Paarweise Vergleiche der Genexpression Keratin 5 (Tukey post-Hoc-Test) .....	118
Tabelle E15: Genexpression Keratin 6 (ANOVA) .....	118
Tabelle E16: Paarweise Vergleiche der Genexpression Keratin 6 (Tukey post-Hoc-Test) .....	119
Tabelle E17: Genexpression Keratin 14 (ANOVA) .....	119
Tabelle E18: Paarweise Vergleiche der Genexpression Keratin 14 (Tukey post-Hoc- Test).....	120

**Anhang A: Zusammensetzung des Spenderkollektives**

Tabelle A1: Zusammensetzung des Spenderkollektives der Primärzellkultur aus Überschussgewebe der lateralen Zügelplastik

Deskriptive Statistik			
	Gesamtkollektiv	Weiblich	Männlich
Mittelwert in Jahren	77,57	79,77	76,0
Median in Jahren	79,0	81,0	78,0
Standardabweichung in Jahren	9,74	10,07	9,32
Minimum in Jahren	54	54	56
Maximum in Jahren	96	96	96

Tabelle A2: Zusammensetzung des Spenderkollektives der Primärzellkultur aus Tarsi von Körperspendern

Deskriptive Statistik			
	Gesamtkollektiv	Weiblich	Männlich
Mittelwert in Jahren	81,8	76	83,25
Median in Jahren	80	76	81,5
Standardabweichung in Jahren	6,65	-	6,68
Minimum in Jahren	76	76	76
Maximum in Jahren	94	76	94

**Anhang B: Auswachsdauer der Meibomdrüsenzellen**

Tabelle B1: Zeit bis zum Auswachsen der Meibomdrüsenzellen nach Kultivierung

Deskriptive Statistik		
Mittelwert in Tagen		7,59
Median in Tagen		7,0
Standardabweichung in Tagen		1,34
Minimum in Tagen		5
Maximum in Tagen		11
Perzentile in Tagen	25	7,0
	50	7,0
	75	8,5

**Anhang C: Zellfläche**

Tabelle C1: Zellfläche der Meibomdrüsenzellen

Intervention	n	M	Md	SD	TN	TVH
Kontrolle	154	307774,45	289774,00	111349,52	*	0,18
Rosiglitazon	154	322570,55	302318,50	123204,75		

Legende:  $n$  = Probenanzahl;  $M$  = Mittelwert des Lipidanteils in  $\mu\text{m}^2$ ;  $Md$  = Median des Lipidanteils in  $\mu\text{m}^2$ ;  $SD$  = Standardabweichung Lipidanteil in  $\mu\text{m}^2$ ; TN = Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test (\* Gleichbesetzung der Gruppen); TVH = Test auf Varianzhomogenität mittels Levene-Statistik ( $p > 0,05$  = Varianzhomogenität wird angenommen)

Tabelle C2:  $t$ -Test für Mittelwertvergleiche der Zellfläche

	Mittlere Differenz (Rosiglitazon-Kontrolle)	Standardfehler der Differenz	p	d	95 %-CI Mittelwert	
					Untere Grenze	Obere Grenze
Rosiglitazon vs. Kontrolle	14796,10	13382,03	0,27	- 0,13	- 41128,54	11536,35

Legende:  $p$  = Signifikanzwert;  $d$  = Effektstärke Cohens  $d$ ; CI = Konfidenzintervall



**Anhang D: Lipidanteil**

Tabelle D1: Lipidanteil an der Zellfläche

Intervention	n	M	Md	SD	TN	TVH
Kontrolle	52	7,09	7,31	0,98	0,19	0,97
Rosiglitazon	52	20,16	20,03	0,95	0,46	

Legende:  $n$  = Probenanzahl;  $M$  = Mittelwert des Lipidanteils in %;  $Md$  = Median des Lipidanteils in %;  $SD$  = Standardabweichung Lipidanteil in %; TN = Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test ( $p > 0,05$  = Normalverteilung wird angenommen); TVH = Test auf Varianzhomogenität mittels Levene-Statistik ( $p > 0,05$  = Varianzhomogenität wird angenommen)

Tabelle D2:  $t$ -Test für Mittelwertvergleiche des Lipidanteils

	Mittlere Differenz (Rosiglitazon-Kontrolle)	Standardfehler der Differenz	$p$	$d$	95 %-CI Mittelwert	
					Untere Grenze	Obere Grenze
Rosiglitazon vs. Kontrolle	13,07	0,19	0,00	13,54	12,7	13,45

Legende:  $p$  = Signifikanzwert;  $d$  = Effektstärke Cohens  $d$ ; CI = Konfidenzintervall

**Anhang E: Genexpression**

Tabelle E1: Genexpression PLIN2 (ANOVA)

	n	M	Md	SD	TN	A	TVH	Test	p	d
primäre Meibozysten	9	14,57	15,52	7,81	0,65	keine	0,88	Einfaktorielle ANOVA	0,46	0,66
Konjunktiva	9	18,42	18,34	8,44	0,09	keine				
Lid	8	16,02	12,88	8,02	0,06	keine				
Rosiglitazon stimulierte Meibozysten	3	10,02	6,36	7,63	0,18	keine				

Legende:  $n$  = Spenderanzahl;  $M$  = Mittelwert ( $\Delta$ Ct-Werte);  $Md$  = Median ( $\Delta$ Ct-Werte);  $SD$  = Standardabweichung ( $\Delta$ Ct-Werte); TN = Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test ( $p > 0,05$  = Normalverteilung wird angenommen); A = Ausreißer; TVH = Test auf Varianzhomogenität mittels Levene-Statistik ( $p > 0,05$  = Varianzhomogenität wird angenommen);  $p$  = Signifikanzwert;  $d$  = Effektstärke Cohens  $d$

Tabelle E2: Genexpression ELOVL4 (ANOVA)

	n	M	Md	SD	TN	A	TVH	Test	p	d
primäre Meibozysten	3	19,7	18,58	5,19	0,64	keine	0,07	Einfaktorielle ANOVA	0,47	0,92
Konjunktiva	4	17,26	16,84	1,98	0,27	keine				
Lid	4	16,91	16,89	1,45	0,89	keine				
Rosiglitazon stimulierte Meibozysten	1	19,3	-	-	-	keine				

Legende:  $n$  = Spenderanzahl;  $M$  = Mittelwert ( $\Delta$ Ct-Werte);  $Md$  = Median ( $\Delta$ Ct-Werte);  $SD$  = Standardabweichung ( $\Delta$ Ct-Werte); TN = Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test ( $p > 0,05$  = Normalverteilung wird angenommen); A = Ausreißer; TVH = Test auf Varianzhomogenität mittels Levene-Statistik ( $p > 0,05$  = Varianzhomogenität wird angenommen);  $p$  = Signifikanzwert;  $d$  = Effektstärke Cohens  $d$

Tabelle E3: Genexpression SCD (ANOVA)

	n	M	Md	SD	TN	A	TVH	Test	p	d
primäre Meibozysten	7	11,46	10,44	5,24	0,81	20,77	0,98	Einfaktorielle ANOVA	0,10	1,10
Konjunktiva	6	16,75	15,53	4,54	0,56	keine				
Lid	7	16,86	16,75	5,12	0,32	keine				
Rosiglitazon stimulierte Meibozysten	1	0,37	-	-	-	-				

Legende:  $n$  = Spenderanzahl;  $M$  = Mittelwert ( $\Delta$ Ct-Werte);  $Md$  = Median ( $\Delta$ Ct-Werte);  $SD$  = Standardabweichung ( $\Delta$ Ct-Werte); TN = Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test ( $p > 0,05$  = Normalverteilung wird angenommen); A = Ausreißer; TVH = Test auf Varianzhomogenität mittels Levene-Statistik ( $p > 0,05$  = Varianzhomogenität wird angenommen);  $p$  = Signifikanzwert;  $d$  = Effektstärke Cohens  $d$

Tabelle E4: Genexpression FABP4 (ANOVA)

	n	M	Md	SD	TN	A	TVH	Test	p	d
primäre Meibozysten	7	24,01	24,54	4,24	0,48	keine	0,66	Einfaktorielle ANOVA	0,01	1,74
Konjunktiva	5	18,2	18,49	2,59	0,76	keine				
Lid	9	17,31	16,74	3,88	0,95	keine				
Rosiglitazon stimulierte Meibozysten	1	14,39	-	-	-	-				

Legende:  $n$  = Spenderanzahl;  $M$  = Mittelwert ( $\Delta$ Ct-Werte);  $Md$  = Median ( $\Delta$ Ct-Werte);  $SD$  = Standardabweichung ( $\Delta$ Ct-Werte); TN = Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test ( $p > 0,05$  = Normalverteilung wird angenommen); A = Ausreißer; TVH = Test auf Varianzhomogenität mittels Levene-Statistik ( $p > 0,05$  = Varianzhomogenität wird angenommen);  $p$  = Signifikanzwert;  $d$  = Effektstärke Cohens  $d$

Tabelle E5: Paarweise Vergleiche der Genexpression FABP4 (Tukey post-hoc Test)

Mittelwertsvergleiche (paarweise)	Mittlere Differenz	Standardfehler	p	d	95 %-CI Mittelwert	
					Untere Grenze	Obere Grenze
primäre Meibozyten vs. Konjunktiva	5,82	2,20	0,04	1,58	0,19	11,44
Primäre Meibozyten vs. Lid	6,71	1,90	0,01	1,66	1,87	11,55
Konjunktiva vs. Lid	0,90	2,10	0,91	0,25	-4,46	6,25

Legende:  $p$  = Signifikanzwert;  $d$  = Effektstärke Cohens  $d$ ; CI = Konfidenzintervall

Tabelle E6: Genexpression MUC5AC (Kruskal-Wallis-Test)

	n	M	Md	SD	TN	A	Test	Mittlerer Rang	p
primäre Meibozyten	6	0	0	0	Nicht normal- verteilt	keine	Kruskal- Wallis- Test	3,5	0,00
Konjunktiva	6	23,55	24,9	5,72	0,34	keine		12	
Lid	6	25,26	25,33	4,13	0,72	keine		13	

Legende:  $n$  = Spenderanzahl;  $M$  = Mittelwert ( $\Delta$ Ct-Werte);  $Md$  = Median ( $\Delta$ Ct-Werte);  $SD$  = Standardabweichung ( $\Delta$ Ct-Werte); TN = Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test ( $p > 0,05$  = Normalverteilung wird angenommen); A = Ausreißer; TVH = Test auf Varianzhomogenität mittels Levene-Statistik ( $p > 0,05$  = Varianzhomogenität wird angenommen);  $p$  = Signifikanzwert;  $d$  = Effektstärke Cohens  $d$

Tabelle E7: Paarweise Vergleiche der Genexpression MUC5AC (Kruskal-Wallis-Test)

Mittelwertsvergleiche (paarweise)	Mittlere Diffe- renz der Ränge	Standardfehler	p	d
primäre Meibozyten vs. Konjunktiva	-8,5	3,03	0,01	2,76
Primäre Meibozyten vs. Lid	-9,5	3,03	0,00	4,39
Konjunktiva vs. Lid	-1,0	3,03	0,74	0,19

Legende:  $p$  = Signifikanzwert;  $d$  = Effektstärke Cohens  $d$

Tabelle E8: Genexpression MUC16 (ANOVA)

	n	M	Md	SD	TN	A	TVH	Test	p	d
primäre Meibozysten	10	16,71	17,52	1,99	0,16	keine	0,17	Einfaktorielle ANOVA	0,32	0,61
Konjunktiva	11	17,47	17,27	5,74	0,41	5,2; 28,74				
Lid	8	19,60	20,03	2,86	0,70	keine				
Rosiglitazon stimulierte Meibozysten	2	13,66	13,66	6,16	-	-				

Legende:  $n$  = Spenderanzahl;  $M$  = Mittelwert ( $\Delta$ Ct-Werte);  $Md$  = Median ( $\Delta$ Ct-Werte);  $SD$  = Standardabweichung ( $\Delta$ Ct-Werte); TN = Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test ( $p > 0,05$  = Normalverteilung wird angenommen); A = Ausreißer; TVH = Test auf Varianzhomogenität mittels Levene-Statistik ( $p > 0,05$  = Varianzhomogenität wird angenommen);  $p$  = Signifikanzwert;  $d$  = Effektstärke Cohens  $d$

Tabelle E9: Genexpression ACTA2 (Welch-Test)

	n	M	Md	SD	TN	A	TVH	Test	p	d
primäre Meibozysten	11	10,75	10,75	1,03	0,49	keine	0,005	Welch-Test	0,00	3,01
Konjunktiva	10	21,24	20,02	4,25	0,05	keine				
Lid	9	19,60	19,97	3,55	0,09	27,08				
Rosiglitazon stimulierte Meibozysten	4	13,76	12,62	3,49	0,19	keine				

Legende:  $n$  = Spenderanzahl;  $M$  = Mittelwert ( $\Delta$ Ct-Werte);  $Md$  = Median ( $\Delta$ Ct-Werte);  $SD$  = Standardabweichung ( $\Delta$ Ct-Werte); TN = Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test ( $p > 0,05$  = Normalverteilung wird angenommen); A = Ausreißer; TVH = Test auf Varianzhomogenität mittels Levene-Statistik ( $p > 0,05$  = Varianzhomogenität wird angenommen);  $p$  = Signifikanzwert;  $d$  = Effektstärke Cohens  $d$

Tabelle E10: Paarweise Vergleiche der Genexpression ACTA2 (Games-Howell post-Hoc-Test)

Mittelwertsvergleiche (paarweise)	Mittlere Differenz	Standardfehler	p	d	95 %-CI Mittelwert	
					Untere Grenze	Obere Grenze
primäre Meibozyten vs. Konjunktiva	-10,49	1,38	0,00	3,48	-14,71	-6,27
primäre Meibozyten vs. Lid	-8,85	1,22	0,00	3,56	-12,66	-5,03
primäre Meibozyten vs. Rosiglitazon stimulierte Meibozyten	-3,00	1,77	0,45	1,58	-11,21	5,20
Konjunktiva vs. Lid	1,64	1,79	0,80	0,42	-3,45	6,73
Konjunktiva vs. Rosiglitazon stimulierte Meibozyten	7,48	2,20	0,05	1,84	0,14	14,83
Lid vs. Rosiglitazon stimulierte Meibozyten	5,84	2,11	0,12	1,65	-1,49	13,17

Legende:  $p$  = Signifikanzwert;  $d$  = Effektstärke Cohens  $d$ ; CI = Konfidenzintervall

Tabelle E11: Genexpression Vimentin (ANOVA)

	n	M	Md	SD	TN	A	TVH	Test	p	d
primäre Meibozyten	4	3,86	3,7	2,85	0,49	keine	0,35	Einfaktorielle ANOVA	0,00	6,05
Konjunktiva	3	16,17	13,85	4,33	0,05	keine				
Lid	3	24,77	23,71	1,95	0,09	keine				
Rosiglitazon stimulierte Meibozyten	3	7,35	5,96	3,59	0,19	keine				

Legende:  $n$  = Spenderanzahl;  $M$  = Mittelwert ( $\Delta$ Ct-Werte);  $Md$  = Median ( $\Delta$ Ct-Werte);  $SD$  = Standardabweichung ( $\Delta$ Ct-Werte); TN = Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test ( $p > 0,05$  = Normalverteilung wird angenommen); A = Ausreißer; TVH = Test auf Varianzhomogenität mittels Levene-Statistik ( $p > 0,05$  = Varianzhomogenität wird angenommen);  $p$  = Signifikanzwert;  $d$  = Effektstärke Cohens  $d$

Tabelle E12: Paarweise Vergleiche der Genexpression Vimentin (Tukey post-Hoc-Test)

Mittelwertsvergleiche (paarweise)	Mittlere Differenz	Standardfehler	p	d	95 %-CI Mittelwert	
					Untere Grenze	Obere Grenze
primäre Meibozyten vs. Konjunktiva	-12,31	2,48	0,004	3,5	-20,07	-4,56
Primäre Meibozyten vs. Lid	-20,91	2,48	0,00	8,27	-28,67	-13,16
Primäre Meibozyten vs. Rosiglitazon stimulierte Meibozyten	-3,49	2,48	0,53	1,1	-11,25	4,26
Konjunktiva vs. Lid	-8,60	2,66	0,04	4,41	-16,89	-0,31
Konjunktiva vs. Rosiglitazon stimulierte Meibozyten	8,82	2,66	0,04	2,218	0,53	17,11
Lid vs. Rosiglitazon stimulierte Meibozyten	17,42	2,66	0,00	6,03	9,13	25,71

Legende:  $p$  = Signifikanzwert;  $d$  = Effektstärke Cohens  $d$ ; CI = Konfidenzintervall

Tabelle E13: Genexpression Keratin 5 (ANOVA)

	n	M	Md	SD	TN	A	TVH	Test	p	d
primäre Meibozyten	4	3,29	2,83	2,17	0,06	keine	0,39	Einfaktorielle ANOVA	0,01	2,6
Konjunktiva	4	8,90	2,61	2,60	0,60	keine				
Lid	4	8,70	1,30	1,29	0,99	keine				

Legende:  $n$  = Spenderanzahl;  $M$  = Mittelwert ( $\Delta$ Ct-Werte);  $Md$  = Median ( $\Delta$ Ct-Werte);  $SD$  = Standardabweichung ( $\Delta$ Ct-Werte); TN = Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test ( $p > 0,05$  = Normalverteilung wird angenommen); A = Ausreißer; TVH = Test auf Varianzhomogenität mittels Levene-Statistik ( $p > 0,05$  = Varianzhomogenität wird angenommen);  $p$  = Signifikanzwert;  $d$  = Effektstärke Cohens  $d$

Tabelle E14: Paarweise Vergleiche der Genexpression Keratin 5 (Tukey post-Hoc-Test)

Mittelwertsvergleiche (paarweise)	Mittlere Differenz	Standardfehler	p	d	95 %-CI Mittelwert	
					Untere Grenze	Obere Grenze
primäre Meibozysten vs. Konjunktiva	-5,61	1,66	0,02	2,34	-10,24	-0,99
Primäre Meibozysten vs. Lid	-5,41	1,66	0,02	3,03	-10,03	-0,78
Konjunktiva vs. Lid	0,21	1,66	0,99	0,10	-4,42	4,84

Legende:  $p$  = Signifikanzwert;  $d$  = Effektstärke Cohens  $d$ ; CI = Konfidenzintervall

Tabelle E15: Genexpression Keratin 6 (ANOVA)

	n	M	Md	SD	TN	A	TVH	Test	p	d
primäre Meibozysten	4	5,73	4,40	3,85	0,10	keine	0,25	Einfaktorielle ANOVA	0,045	1,99
Konjunktiva	4	10,94	12,15	3,30	0,1	keine				
Lid	4	11,48	11,71	1,17	0,45	keine				

Legende:  $n$  = Spenderanzahl;  $M$  = Mittelwert ( $\Delta$ Ct-Werte);  $Md$  = Median ( $\Delta$ Ct-Werte);  $SD$  = Standardabweichung ( $\Delta$ Ct-Werte); TN = Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test ( $p > 0,05$  = Normalverteilung wird angenommen); A = Ausreißer; TVH = Test auf Varianzhomogenität mittels Levene-Statistik ( $p > 0,05$  = Varianzhomogenität wird angenommen);  $p$  = Signifikanzwert;  $d$  = Effektstärke Cohens  $d$



Tabelle E16: Paarweise Vergleiche der Genexpression Keratin 6 (Tukey post-Hoc-Test)

Mittelwertsvergleiche (paarweise)	Mittlere Differenz	Standardfehler	p	d	95 %-CI Mittelwert	
					Untere Grenze	Obere Grenze
primäre Meibozysten vs. Konjunktiva	-5,21	2,12	0,09	1,45	-11,14	0,73
Primäre Meibozysten vs. Lid	-5,76	2,12	0,06	2,02	-11,69	0,17
Konjunktiva vs. Lid	-0,55	2,12	0,96	0,00	-6,48	5,38

Legende:  $p$  = Signifikanzwert;  $d$  = Effektstärke Cohens  $d$ ; CI = Konfidenzintervall

Tabelle E17: Genexpression Keratin 14 (ANOVA)

	n	M	Md	SD	TN	A	TVH	Test	p	d
primäre Meibozysten	4	5,75	4,82	3,02	0,21	keine	0,08	Einfaktorielle ANOVA	0,02	2,32
Konjunktiva	4	11,28	12,41	3,43	0,14	keine				
Lid	4	11,49	11,45	0,14	0,42	keine				

Legende:  $n$  = Spenderanzahl;  $M$  = Mittelwert ( $\Delta$ Ct-Werte);  $Md$  = Median ( $\Delta$ Ct-Werte);  $SD$  = Standardabweichung ( $\Delta$ Ct-Werte); TN = Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test ( $p > 0,05$  = Normalverteilung wird angenommen); A = Ausreißer; TVH = Test auf Varianzhomogenität mittels Levene-Statistik ( $p > 0,05$  = Varianzhomogenität wird angenommen);  $p$  = Signifikanzwert;  $d$  = Effektstärke Cohens  $d$

Tabelle E18: Paarweise Vergleiche der Genexpression Keratin 14 (Tukey post-Hoc-Test)

Mittelwertsvergleiche (paarweise)	Mittlere Differenz	Standardfehler	p	d	95 %-CI Mittelwert	
					Untere Grenze	Obere Grenze
primäre Meibozysten vs. Konjunktiva	-5,53	1,87	0,04	1,77	-10,75	-0,31
Primäre Meibozysten vs. Lid	-5,74	1,87	0,03	2,69	-10,95	-0,51
Konjunktiva vs. Lid	-0,21	1,87	0,99	0,09	-5,42	5,01

Legende:  $p$  = Signifikanzwert;  $d$  = Effektstärke Cohens  $d$ ; CI = Konfidenzintervall

## **9 Danksagung**

## **10 Tabellarischer Lebenslauf**