

AUS DER KLINIK FÜR AUGENHEILKUNDE
UNIVERSITÄTSKLINIKUM DES SAARLANDES, *UKS* HOMBURG / SAAR

TESTOSTERON REDUZIERT DIE EXPRESSION KERATINISIERUNG-FÖRDERNDER GENE IN DER
MEIBOMDRÜSE DER MAUS

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES
DOKTORS DER MEDIZIN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2014

1. TAG DER PROMOTION :

2. DEKAN :

3. BERICHTERSTATTER :



WIDMUNG

Meinen Eltern



1 INHALTSVERZEICHNIS

Inhalt

1	INHALTSVERZEICHNIS	1
2	ZUSAMMENFASSUNG	3
3	SUMMARY	5
4	EINFÜHRUNG UND FRAGESTELLUNG	7
5	MATERIAL UND METHODE	9
5.1	Versuchstiere und Hormonbehandlung	9
5.1.1	Tiere und Behandlung	9
5.1.2	Ethische Aspekte	9
5.2	MolekularBiologische Prozeduren	10
5.2.1	RNA isolation und Prozessierung	10
5.2.2	Bioarray technologie	10
5.3	Analyse	12
5.3.1	Auf- und Ab-regulierte gen-expression durch testosteron	12
5.3.2	Ontologische Analyse der regulierten gene	12
6	ERGEBNISSE	16
	Z-Score Report basierend auf herab-regulierten Genen	16
7	DISKUSSION	20
7.1	Bedeutung der Gene in Physiologie und Pathologie	20
7.2	Keratin- und Sprr-Gene	21
7.3	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	27
8	LITERATUR	29
9	PUBLIKATIONEN	38

2 ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: Die ausgeprägte Keratinisierung scheint eine wesentliche Rolle bei der Dysfunktion der Meibomdrüse zu spielen. Diese Arbeit beschreibt die potentielle Wirkung der Androgene hinsichtlich einer Begrenzung der Keratinisierung in diesem Gewebe, wodurch sie zu einer normalen Meibomdrüsenfunktion und einer gesunden Augenoberfläche beitragen.

Versuchstiere, Material und Methoden: Orchiectomierte Mäuse wurden systemisch entweder mit Testosteron oder mit Plazebo für zwei Wochen behandelt. Die mRNA wurde dann aus den Meibomdrüsen extrahiert und eine differentielle Genexpression mittels Microarray-Hybridisierung und Evaluation mit der GeneSifter Software als auch mit genontologischen Daten des Gene Ontology (GO) Consortium untersucht.

Ergebnisse: Wie durch z-Score-Berechnung ermittelt, war die "Keratinisierung" der am stärksten signifikant beeinflusste genontologische Terminus basierend auf herab-regulierten Genen in der Meibomdrüse der Maus. So wurden unter dem Einfluss von Testosteron die Gene, die für Small proline-rich protein (Sprr) 2a, Sprr 2b, Sprr 3, Keratins 6a und 17 und Periplakin kodieren, signifikant herab-reguliert, während Sprr 1a and Sprr 2f signifikant herauf-reguliert wurden. Außer in der Keratinisierung sind diese Gene auch variabel in der Epidermisentwicklung, Keratinozytendifferenzierung, Regulation der Zellform, der Zellmorphogenese, der Epithelmorphogenese und Intermediärfilament-Organisation involviert.

Schlussfolgerungen: Testosteron reguliert Gene, die eine Keratinisierung in der Meibomdrüse fördern, herab. Dies trägt möglicherweise dazu bei, eine Meibomdrüsendysfunktion durch Begrenzung einer exzessiven Keratinisierung dieses Gewebes und des angrenzenden Lidrandes zu verhindern. Unsere Ergebnisse erklären,

zumindest teilweise, den positiven Einfluss der Androgene auf die Meibomdrüsenfunktion und somit auf die Gesundheit der Augenoberfläche.

Schlüsselwörter: trockenes Auge, Testosteron, Microarray, Genexpression, Keratinisierung

3 SUMMARY

Testosterone reduces the Expression of Keratinization-promoting Genes in the Mouse Meibomian Gland

Background: Extensive keratinization appears to play a major role in the dysfunction of the meibomian gland. This work displays the potential impact of androgens on limiting keratinization in this tissue, thus, contributing to normal meibomian gland function and ocular surface health.

Materials and Methods: Orchiectomized mice were systemically treated with either testosterone or placebo for two weeks. The mRNA was then extracted from the meibomian glands and differential gene expression was investigated by microarray hybridization and evaluation with GeneSifter software as well as gene ontology information of the Gene Ontology (GO) Consortium.

Results: By z-score calculation, keratinization was the most significantly testosterone-influenced gene ontology term based on down-regulated genes in the mouse meibomian gland. In particular, under the influence of testosterone the genes coding for Small proline-rich protein (Sprr) 2a, Sprr 2b, Sprr 3, Keratins 6a and 17, and Perioplakin were significantly down-regulated, while Sprr 1a and Sprr 2f were significantly up-regulated. Apart from keratinization, these genes are variably involved in epidermis development, keratinocyte differentiation, regulation of cell shape, cell morphogenesis, epithelial morphogenesis, and intermediate filament organization.

Conclusions: Testosterone down-regulates the expression of genes promoting keratinization in the meibomian gland. This may help to prevent meibomian gland dysfunction by limiting excessive keratinization of this tissue and the adjacent lid margin. Our findings elucidate, at least in part, the beneficial impact of androgens on meibomian gland function, and thus, on ocular surface health.

Key words: dry eye, testosterone, microarray, gene expression, keratinization

4 EINFÜHRUNG UND FRAGESTELLUNG

Das von den Meibom'schen Drüsen, großen spezialisierten Talgdrüsen der Augenlider, produzierte protein- und lipidreiche Sekret bildet die äußere Phase der Tränenflüssigkeit, die mit jedem Lidschlag auf der Hornhautoberfläche verteilt wird. Das Drüsensekret hat einen stabilisierenden Einfluss auf den Tränenfilm und wirkt seinem Aufreißen und verstärkter Verdunstung entgegen, wodurch ein Austrocknen der Hornhautoberfläche verhindert wird.¹⁻⁴

Umgekehrt führt eine Meibomdrüsen-Dysfunktion, im englischen Sprachraum und international gebräuchlich, auch Meibomian Gland Dysfunction (MGD), zu einer Instabilität des Tränenfilmes, was wiederum ein Austrocknen der Hornhautoberfläche begünstigt. Dieser Zusammenhang stellt einen entscheidenden Faktor bei der Entstehung des trockenen Auges dar.

Als eine der Hauptursachen einer MGD wird neben einer Steigerung der Viskosität des Drüsensekretes eine Obstruktion der Drüsengänge durch verstärkte Keratinisierung angenommen.⁵⁻¹⁰ Genau diese Erkenntnisse sind auch wesentliche Schlussfolgerungen einer Arbeitsgruppe des aktuellen MGD-Reports der Tear Film and Ocular Surface Society (TFOS) um Knop E.¹¹ Dafür spricht auch weiterhin, dass sich bei Patienten, die an einem trockenen Auge leiden, eine vermehrte Keratinisierung im Bereich der Drüsengänge nachweisen lässt.^{6, 11, 12} Als Mitursache dieser vermehrten Keratinisierung wurde immer wieder ein Androgenmangel diskutiert.^{11, 13} Heute weiß man, dass die Meibomdrüse ein Zielorgan für Androgene ist.^{14, 15} Auch gibt es zahlreiche Anhaltspunkte dafür, dass die Regulation der Keratinisierung unter anderem der Steuerung durch Androgene unterliegt.¹⁴

Es ist naheliegend, dass eine androgenabhängige Keratinisierung im Bereich der Meibomschen Drüse möglicherweise ein Faktor bei der Entstehung des trockenen Auges darstellt.¹³

Ziel dieser Arbeit war es, aus der Unmenge der Arraydaten eine Entität zu identifizieren, die einer deutlichen Regulation durch Androgene unterliegt und gleichzeitig potentiell klinische Relevanz hat. Dies trifft auf die Keratinisierung zu. Durch Recherche der Funktionen der an der Keratinisierung beteiligten Gene sollte untersucht werden, ob die testosteroninduzierte, reduzierte Expression von pro-keratinisierenden Genen den anderweitig klinisch beobachteten, protektiven Androgen-Effekt hinsichtlich einer Keratinisierung im Bereich der Meibomdrüsen auf molekularer, funktioneller oder regulativer Ebene, zumindest teilweise, kausal erklären kann.

5 MATERIAL UND METHODE

5.1 VERSUCHSTIERE UND HORMONBEHANDLUNG

5.1.1 TIERE UND BEHANDLUNG

Junge erwachsene BALB/c Mäuse (n = 5-22/Gruppe) wurden im Alter von 8 bis 9 Wochen durch einen Veterinärchirurgen orchiektomiert und von Taconic Laboratories (Germantown, NY, USA) gekauft. Die „Standardmäuse“, ohne Besonderheiten, wurden in Räumen mit konstanter Temperatur und fixen Hell-/Dunkel-Intervallen von 12 Stunden Dauer untergebracht. Die Mäuse konnten sich vom chirurgischen Eingriff wenigstens 9 Tage erholen, wurden danach, im Alter von 10-11 Wochen, mit einer intraperitonealen Injektion von Ketamine/Xylazine anästhesiert und mit einem subkutanen Implantat eines Pellets in die Subscapularregion versehen. Dieses Pellet war entweder ein Plazebo (Cholesterol, Methylcellulose, Lactose) oder enthielt 10mg Testosteron. Diese Pellets wurden von Innovative Research of America (Sarasota, FL, USA) geliefert und sind für eine langsame aber konstante Freisetzung des Placebos oder aber physiologischer Mengen des Hormones über einen Zeitraum von 21 Tagen konzipiert. Nach zwei Behandlungswochen, dann in einem Alter zwischen 12-13 Wochen, wurden die Tiere durch CO₂-Inhalation getötet und die Meibomdrüsen der Ober- und Unterlider unter direkter Visualisierung mittels OP-Mikroskop explantiert und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

5.1.2 ETHISCHE ASPEKTE

Die Studien dieser Arbeit wurden im Schepens Eye Research Institute, Boston, MA, USA durch Dr. Frank Schirra, Postdoctoral Fellow bei David Sullivan, Ph.D., durchgeführt, finalisiert und die Primärdaten in einer Datenbank dokumentiert. Dementsprechend wurden alle Experimente mit Versuchstieren vom Institutional Animal Care and Use Committee des Schepens Eye Research Institutes evaluiert und

genehmigt und entsprachen dem Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research und der EC Directive 86/609/EEC für Versuchstiere. Die Analyse der elektronischen Datenbanken wurde unabhängig davon mit der großzügigen Erlaubnis von David A. Sullivan, Ph.D. durchgeführt.

5.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE PROZEDUREN

5.2.1 RNA ISOLATION UND PROZESSIERUNG

Um die Wirkung des Testosterons auf die Genexpression der Meibomdrüsen zu bestimmen, wurde die Gesamt-RNA mittels TRIzol Reagent (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) aus dem Gewebe isoliert. Proben hiervon wurden mit RNase-freier DNase (Invitrogen) behandelt, spektrophotometrisch bei 260nm analysiert, um die Konzentration zu bestimmen und auf einem 6.7% Formaldehyd/1.3% Agarose (Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA) Gel untersucht, um die RNA Integrität zu verifizieren. Die RNA-Proben wurden dann mittels verschiedener technischer Ansätze weiterverarbeitet. Vor der Durchführung der Microarray-Studien wurde die Integrität der glandulären RNA-Proben weiter mit Hilfe eines RNA 6000 Nano LabChip auf einem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) analysiert.

5.2.2 BIOARRAY TECHNOLOGIE

Zur Evaluation einer unterschiedlichen Genexpression wurden in erster Linie CodeLink Uniset Mouse I Bioarrays (~10,000 Gene; Amersham, Piscataway, NJ, USA) benutzt. Die RNA-Proben wurden für die CodeLink Bioarray Hybridisierung vorbereitet, wie vorbeschrieben¹⁶ mit Modifikationen, nach Redmond et al.¹⁷ Eine ausführliche Beschreibung der Prozeduren findet sich im Dokument "CodeLink Gene Expression System: Single-Assay Bioarray Hybridization and Detection, document number 63005460 (080075-00/Rev. AA/2004-04). Kurzgefasst wurde cDNA aus RNA (2 µg) mit einem CodeLink Expression Assay Reagent Kit (Amersham, Piscataway, NJ, USA)

synthetisiert und mit einem QIAquick purification kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) isoliert. Nach Probentrocknung wurde cRNA mit einem CodeLink Expression Assay Reagent Kit (Amersham) generiert, mit einem RNeasy kit (Qiagen) zurückgewonnen und mit einem UV-Spektrophotometer quantifiziert. Fragmentierte, Biotin-markierte cRNA wurde auf einem CodeLink Bioarray bei 37°C für 18 Stunden inkubiert und hin und her bewegt (300 rpm Shaker). Das Bioarray wurde dann gewaschen und mit Streptavidin-Alexa 647 inkubiert. Die Bioarrays wurden mit Hilfe der ScanArray Express Software und einem ScanArray Express HT Scanner (Packard BioScience, Meriden, CT, USA) gescannt, wobei der Laser auf 635 nm, die Laserenergie auf 100% und die Photomultiplier Röhrenspannung auf 60% eingestellt wurden. Die eingescannten Bilddateien wurden mittels CodeLink image and data analysis software (Amersham) untersucht, die sowohl unveränderte als auch normalisierte Hybridisierungs-Signalintensitäten für jeden Arrayspot generierte. Die etwa 10.000 Spotintensitäten des Microarraybildes wurden auf einen Median von 1 standardisiert. Normalisierte Daten mit Signalintensitäten > 0,50 wurden per GeneSifter software (VizX Labs LLC, Seattle, WA, USA, vizxlabs.com) analysiert. Das Programm erstellt auch Reports zur Genontologie und zum z-Score. Diese ontologischen Daten, die entsprechend der Richtlinien des Gene Ontology Consortiums (<http://www.geneontology.org/GO.doc>),¹⁸ organisiert wurden, beziehen sich auf biologische Prozesse, molekulare Funktionen und zelluläre Komponenten.

Die Daten der einzelnen Bioarrays (n = 6) sind über den Gene Expression Omnibus des National Center for Biotechnology Information über die Zugriffsnummer GSE1582 zugänglich: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/query/acc.cgi?acc=GSE1582>).

5.3 ANALYSE

5.3.1 AUF- UND AB-REGULIERTE GEN-EXPRESSION DURCH TESTOSTERON

5.3.1.1 Paarweise Analyse

Die Daten wurden innerhalb GeneSifter weder erneut normalisiert noch logarithmisch transformiert. Es wurden keine Grenzwerte festgelegt, um die Ergebnisse auf ein minimales relatives Expressionsverhältnis zu limitieren. Ein Mindestsignalintensitätswert von 0,5 wurde als Qualitätsstandard festgelegt. Die statistische Analyse der individuellen Genexpressionsdaten wurde mit dem Student's t-Test (two-tailed, unpaired) durchgeführt.

5.3.2 ONTOLOGISCHE ANALYSE DER REGULIERTEN GENE

5.3.2.1 Ansatz der Datenaufarbeitung

In unseren Microarraystudien waren wir daran interessiert, Änderungen in der Genexpression zu verstehen. Aufgrund der sehr großen Anzahl an Genen, die mit jedem Array getestet werden, mussten wir Expressionsmuster identifizieren, die auf Androgen-beeinflusste Stoffwechselfade oder biologische Funktionen hinwiesen. Viele Methoden, wie z.B. Clustering, wurden entwickelt, um diese Art der Datenaufarbeitung zu ermöglichen. Unser Ansatz war es, Expressionsänderungen von Genen zu untersuchen, deren biologische Funktion bekannt ist oder die bekannten Stoffwechselwegen angehören. Dies wurde durch den Bezug auf genontologische Datenbanken erreicht.

5.3.2.2 Das Gene Ontology (GO) Projekt

Das Gene Ontology (GO) Projekt stellt eine Zusammenarbeit zwischen Datenbanken mit dem Ziel dar, konsistente Beschreibungen von Genprodukten zu ermöglichen, dadurch, dass disparate Terminologien unterschiedlicher Datenbanken synchronisiert

werden, wie z.B. "Translation" und "Proteinsynthese". Die am GO Projekt beteiligten Datenbanken entwickeln permanent drei Ontologien, d.h. Spezifikationen eines relationalen Vokabulars, das biologische Prozesse (z.B. Keratinisierung), molekulare Funktionen (z.B. Oxidierung) und zelluläre Komponenten (z.B. mitochondrial), also intrazelluläre Lokalisationen der Funktionen und Prozesse, in einer spezies-unabhängigen Weise beschreibt.

Ontologien stellen ein von Computern nutzbares, feingliedriges Vokabular zur Verfügung, um Wissen über ein Thema und eine definierte Palette von Verbindungen, die zwischen den Elementen des Vokabulars gelten, darzustellen und zu kommunizieren. Sie können sehr komplex oder auch relativ einfach strukturiert sein. Der hierarchische Aufbau erlaubt die Kategorisierung jedes Genproduktes bis hin zum kleinsten bis heute bekannten Detail.

5.3.2.3 Gebrauch der Ontologie in GeneSifter

Für jedes Gen benutzt GeneSifter die GO-Hierarchie, um alle übergeordneten Klassifikationsbegriffe jedem bekannten Genprodukt zuzuordnen. GeneSifter kartographiert jedes Gen bis hin zu seinem spezifischsten GO-Begriff und zusätzlich innerhalb der gesamten Struktur. Dadurch, dass Gene derartig gruppiert werden, ist der Untersucher in der Lage, Gene innerhalb von Gruppen zu untersuchen, die Genexpressionsänderungen zeigen, die möglicherweise deskriptiv für die zugrundeliegende Biologie sein können. Wenn beispielsweise entdeckt wird, dass 90 von 100 Genen einer gegebenen Ontologie differentiell exprimiert werden, dann deutet dies darauf hin, dass diese Ontologie durch den im Arrayexperiment untersuchten Einflussfaktor tatsächlich beeinflusst wurde. Eine solche Ontologie, kann beispielsweise eine Genliste sein, die durch Gene definiert wird, die zu einem bestimmten Stoffwechselweg gehören oder eine bestimmte Funktion haben können.

5.3.2.4 Beurteilung des Einflusses eines Experimentes auf Ontologien

5.3.2.4.1 Ontologie Report

Der Ontologie-Report, man könnte auch frei von einem „Geneigenschaften-Report“ sprechen, von GeneSifter ordnet die Ontologien entsprechend des Ausmaßes der Einwirkung eines Experimentes auf die Gene innerhalb der jeweiligen Ontologie. Innerhalb des Reports selbst finden sich mehrere Variablen, die den Grad der Einwirkung des Experimentes auf die jeweilige Ontologie zusammenfassen. Die Variable **List** beschreibt die Anzahl der Gene in dieser Liste, die zu dem jeweiligen gegebenen ontologischen Begriff gehören. Für die paarweise Analyse ist die Liste weiter aufgesplittet in herauf-reguliert (roter Pfeil) und herab-reguliert (grüner Pfeil). Diese Zahl kann dem **Array**-Wert gegenübergestellt werden, der die Gesamtzahl der zur jeweiligen Ontologie gehörenden, auf dem Microarray befindlichen Gene darstellt. Das Verhältnis dieser beiden Werte beschreibt die relative Anzahl der regulierten Gene einer bestimmten Ontologie, die sich aus zuvor vom Untersucher festgelegten Analyseparametern definiert. Weiterhin wird in jedem Report ein z-Score für jeden ontologischen Begriff berechnet.

5.3.2.4.2 Z-Score

Der z-Score stellt eine Maßzahl dar, die beschreibt, ob die Genexpressionsänderungen häufiger oder seltener auftreten als erwartet. Der z-Score erlaubt auch ein relatives Ranking zwischen Genexpressionsänderungen in jeder Ontologie. Hierzu ist es notwendig, bei der Analyse anzugeben, ob dieses Ranking auf der Basis einer Auf- oder Ab-Regulation erfolgen soll, ob also besonders aktivierte oder besonders deaktivierten Ontologien gesucht werden sollen. In einem Ontologie-Report bewertet der z-Score, ob ein genontologischer Begriff in seiner Gesamtheit häufiger oder seltener auftritt als erwartet. Weiterhin können einzelne Gene einer überwiegend herauf-regulierten Ontologie auch herab-reguliert sein oder auch umgekehrt.

Der z-Score ist die erwartete Anzahl von Genen eines GO-Terms, subtrahiert von der beobachteten Anzahl der Gene. Dieser Wert wird dividiert durch die Standardabweichung der beobachteten Anzahl der Gene. Die Gleichung lautet:

$$z - \text{Score} = \frac{(\text{beobachtet} - \text{erwartet})}{\text{Std.abweichung}(\text{beobachtet})} \quad \text{oder} \quad = \frac{r - n \frac{R}{N}}{\sqrt{n \left(\frac{R}{N} \right) \left(1 - \frac{R}{N} \right) \left(1 - \frac{n-1}{N-1} \right)}}$$

wobei N die Gesamtzahl der gemessenen Gene ist, R die Gesamtzahl der Gene, die die Untersucher-definierten Kriterien erfüllen und die Genliste generiert hat, n die Gesamtzahl der Gene mit dem spezifischen GO-Term und r die Anzahl der Gene, die die Untersucher-definierten Kriterien erfüllen *und* mit dem spezifischen GO-Term belegt sind und die Genliste generiert hat.

Extrem positive Zahlen (größer als 2) zeigen an, dass der Begriff häufiger als erwartet auftritt, während eine extrem negative Zahl (kleiner als -2) anzeigt, dass der Begriff seltener als erwartet auftritt.

6 ERGEBNISSE

Z-SCORE REPORT BASIEREND AUF HERAB-REGULIERTEN GENEN

Wie durch z-Score-Berechnung ermittelt, war die ‐Keratinisierung‐ mit einem z-Score von 6,26 der am stärksten signifikant beeinflusste genontologische Terminus basierend auf herab-regulierten Genen in der Meibomdrüse der Maus. Dies entspricht der Frage, welcher biologische Prozess oder welche Gen-Eigenschaft unter allen, entsprechend der Qualitätskriterien berücksichtigten Genen des Arrays am stärksten durch Testosteron gedämpft wurde – Antwort: Keratinisierung. Auf dem Chip befinden sich insgesamt 15 mit der Keratinisierung assoziierte Gene, wovon acht die Qualitätskriterien erfüllten und zugleich signifikant durch Testosteron reguliert wurden. So zeigen sich unter dem Einfluss von Testosteron die sechs Gene, die für Small proline-rich protein (Sprr) 2a, Sprr 2b, Sprr 3, Keratins 6a und 17 und Periplakin kodieren, in ihrer Expression signifikant herab-reguliert, während die beiden Gene für Sprr 1a and Sprr 2f signifikant herauf-reguliert wurden.

Tabelle 1 zeigt den Einfluss der Testosteron-Behandlung auf die Genexpression der Meibomdrüse der Maus, gruppiert durch ontologische Begriffe und gereiht durch den z-Score, basierend auf herab-regulierten Genen, wie durch GeneSifter berechnet. Der mit der Keratinisierung assoziierte GO-Baum (Link in Tabelle 1) wird in Abbildung 1 dargestellt. Nebenbefundlich erscheinen in Tabelle 1 zwei weitere deutlich testosteron-beeinflusste Ontologien mit recht hohem z-Score, die sich auch im Ontologiebaum zu ‐keratinization‐ weiter proximal, d.h. im weniger spezifischen Bereich, wiederfinden. Hierbei handelt es sich um die Ontologien ‐epidermal cell differentiation‐ (z-Score: 4,99) und ‐epidermis development‐ (z-Score: 4,72).

Tabelle 1: Ontologie-Report

[[Biological Process](#) | [Cellular Component](#) | [Molecular Function](#)]

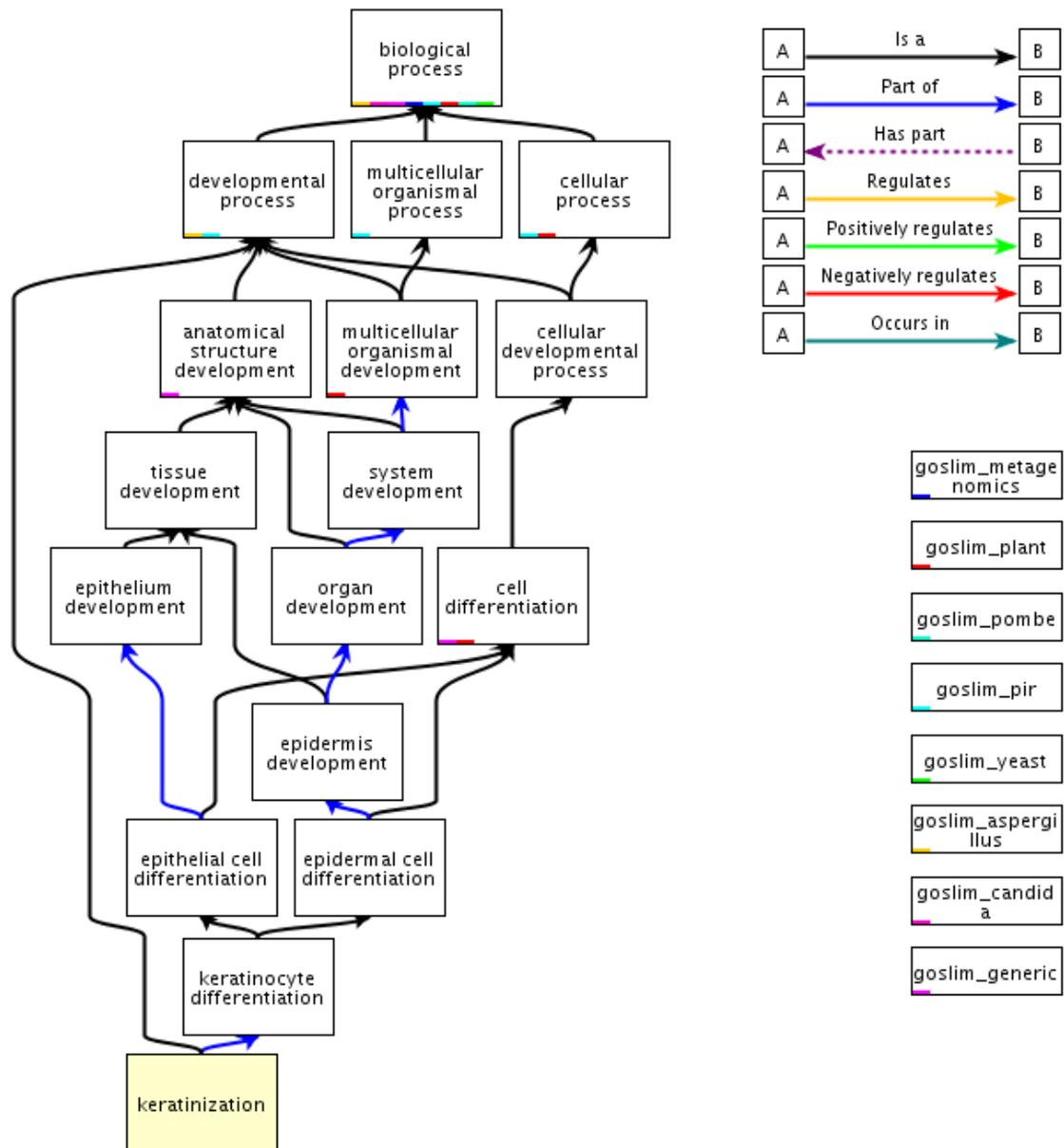
Group 1: P (T)
Group 2: T

[[Ontology Report](#) | [Z-score Report](#)]
Export Report

Ontology	Genes	GO	Totals			z-score		
			List	▲	▼	Array	▲	▼
keratinization [Export Gene List]			8	2	6	15	0.41	6.26
▼ Keratin 17								
▼ Keratin 6A								
▼ Periplakin								
▲ Small proline-rich protein 1A								
▼ Small proline-rich protein 2A								
▼ Small proline-rich protein 2B								
▲ Small proline-rich protein 2F								
▼ Small proline-rich protein 3								
epidermis morphogenesis			11	2	9	32	-0.74	6.05
mRNA splice site selection			5	0	5	12	-1.17	5.86
regulation of cell growth			19	6	13	67	-0.33	5.47
DNA replication			19	2	17	106	-2.84	5.29
cell growth			22	8	14	79	-0.01	5.25
nuclear mRNA splicing, via spliceosome			8	0	8	33	-1.94	5.11
RNA splicing, via transesterification reactions			8	0	8	33	-1.94	5.11
RNA splicing, via transesterification reactions with bulged adenosine as nucleophile			8	0	8	33	-1.94	5.11
phosphoinositide phosphorylation			3	0	3	6	-0.82	5.08
tissue morphogenesis			16	5	11	56	-0.31	5.08
epidermal cell differentiation			8	2	6	21	-0.10	4.99
regulation of anatomical structure morphogenesis			27	9	18	124	-1.08	4.94
regulation of cell morphogenesis			27	9	18	124	-1.08	4.94
epidermis development			15	4	11	61	-0.94	4.72
regulation of growth			27	10	17	119	-0.64	4.72
regulation of cell size			22	8	14	89	-0.37	4.71
spliceosome assembly			5	0	5	17	-1.39	4.65
lipid phosphorylation			3	0	3	7	-0.89	4.62
regulation of epidermal growth factor receptor activity			3	0	3	7	-0.89	4.62
regulation of receptor activity			3	0	3	7	-0.89	4.62
ectoderm development			16	5	11	66	-0.70	4.40

Tabelle 1: Einfluss der Testosteron-Behandlung auf die Genexpression der Meibomdrüse der Maus, gruppiert durch ontologische Begriffe und gereiht durch den z-Score, basierend auf herab-regulierten Genen, wie durch GeneSifter berechnet. Ein Klick auf das Symbol unter „Genes“ neben der jeweiligen Ontologie öffnet die Liste der signifikant regulierten und dieser Ontologie zugeordneten Gene – wie in dieser Tabelle gezeigt, die Ontologie „keratinization“. Ein roter nach oben gerichteter Pfeil neben der Genbezeichnung bedeutet eine signifikante Herauf-Regulation des Gens, ein grüner nach unten gerichteter Pfeil bedeutet eine signifikante Herab-Regulation des Gens durch Testosteron. „GO“ stellt einen direkten Link zum assoziierten Gene Ontologie-Baum zur Verfügung, wie in Abbildung 1 gezeigt. „Array“ bezeichnet die Anzahl der auf dem Chip implementierten Sequenzen, die dem GO-Term „keratinization“ zugeordnet sind. „List“ benennt die Anzahl der signifikant regulierten Gene der Liste und unterscheidet zwischen Auf- und Ab-Regulation durch rote und grüne Pfeile.

Abbildung 1: Ontologie-Baum für den Terminus «Keratinization»



QuickGO - <http://www.ebi.ac.uk/QuickGO>

Abbildung 1: Ontologie-Baum für den Terminus «Keratinization», wie er durch das GO-Symbol neben der in Tabelle 1 gezeigten Ontologien verlinkt ist (http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/term_details?term=GO:0031424 Ansicht: Graph View). Die Legende oben rechts ist selbsterklärend. Tiefergehende Informationen sind über die GO-Website direkt über die Elemente der Abbildung oder, speziesabhängig, über die Linkleiste unten rechts explorierbar. Das Gene Ontology

(GO) Projekt ist ein Kooperationsprojekt von Datenbanken, das ein von Computern nutzbares, feingliedriges Vokabular zur Verfügung stellt, um Wissen über ein Thema und eine definierte Palette von Verbindungen, die zwischen den Elementen des Vokabulars gelten, darzustellen und zu kommunizieren, wie im Text beschrieben.

Abbildung 2: Retentionszyste durch Überkeratinisierung



Abbildung 2: Obstruktive Meibomdrüsendysfunktion. Die Öffnung der Meibomdrüse ist hier von einer spaltlampenmikroskopisch erkennbaren dünnen Epithellamelle überdeckt. Die so entstandene Retentionszyste weist augenfällig auf eine ursächliche Verstärkung der epithelialen Keratinisierung hin.

7 DISKUSSION

In unseren Microarrayexperimenten zeigte sich nach z-Score Berechnung gerade die Keratinisierung als die, durch Testosteron, am stärksten regulierte Ontologie. Die, an der Keratinisierung beteiligten, Gene erfuhren unter Androgeneinfluss eine signifikante Beeinflussung ihrer Expression. So wurden die Gene der Small proline-rich Proteine (SPRR) 2a, Sprr2b, Sprr3, Keratin 6a, Keratin 17 und Periplakin herabreguliert, während die für Sprr1a und Sprr2f hochreguliert wurden.

In unserer Studie wurden männliche, orchiektomierte Mäuse untersucht. In der gleichen Arbeitsgruppe wurden von Tomo Suzuki auch ovariektomierte, weibliche Mäuse in ähnlicher Weise untersucht. Hierbei zeigt sich, dass die Wirkung des Testosterons auf die Expression der untersuchten Gene bei beiden Geschlechtern ausgesprochen gleichsinnig verläuft.¹⁴

Unser Ziel war es, durch Recherche der Funktionen der an der Keratinisierung beteiligten Gene, mögliche Mechanismen der Androgenprotektion hinsichtlich einer Keratinisierung - im Bereich der Meibomdrüsen auf molekularer, funktioneller oder regulativer Ebene - herauszuarbeiten und so die Schutzfunktion, zumindest teilweise, zu verstehen.

7.1 BEDEUTUNG DER GENE IN PHYSIOLOGIE UND PATHOLOGIE

Bei entzündlichen Veränderungen des Lidrandes, im Sinne einer Blepharitis, konnte schon früh ein Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen der Haut und der Hautanhangsgebilde hergestellt werden.¹⁹ Betrachtet man das klinische Bild von Erkrankungen, die mit einer überschießenden Verhornung einhergehen, am Beispiel der

Seborrhoischen Dermatitis oder der Akne, so findet man häufig eine Mitbeteiligung der Meibomdrüse.^{19, 20}

Bezüglich der Meibomdrüsendifunktion spielen sich die Verhornungsprozesse im Bereich der Ausführungsgänge der Drüse ab.⁹ Durch diesen Prozess kommt es zur Obstruktion des Gangsystems und sekundär zur Dilatation der Drüse. Bei betroffenen Patienten lassen sich dementsprechend Keratinproteine in exprimiertem Drüsensekret nachweisen.¹² Entsprechende Nachweise einer Verhornung lassen sich auch histologisch führen.^{6, 9} Die Verhornung der Drüsenausführungsgänge lässt sich klinisch an der Spaltlampe leicht erkennen und ist teilweise nahezu pathognomonisch (Abbildung 2).

7.2 KERATIN- UND SPRR-GENE

In epithelialen Anhangsgebilden exprimiert gehören Keratin 6a und Keratin 17 zu einer Gruppe von Genen, deren Expression auch in anderen Epithelien beobachtet werden kann, zum Beispiel im Rahmen der Wundheilung nach Verletzung der Haut.^{21, 22} Ihre Expression wird immer wieder mit Erkrankungen der Haut in Verbindung gebracht, bei denen eine vermehrte Hornbildung im Mittelpunkt der Pathogenese steht.²³ Zu nennen wären in diesem Zusammenhang, neben zahlreichen anderen hyperproliferativen Störungen, die Pachyonychia congenita, die Psoriasis, oder auch die Parakeratosen. Bei Letzteren konnte Keratin 6a als das, am stärksten in seiner Aktivität hochregulierte Gen, identifiziert werden.²⁴

Ähnliche Beobachtungen können an morphologisch veränderten Talgdrüsen gemacht werden, an denen ebenfalls erhöhte Expressionsraten von Keratin 6 nachweisbar sind. Keratin 6 wird an dieser Stelle als Marker pathologisch veränderter Ausführungsgänge an Talgdrüsen beschrieben.²⁵ Ebenso bei der Dysfunktion der Meibomdrüse, bei der man - neben der vermehrten Verhornung bei betroffenen Patienten - Keratinproteine im Drüsensekret findet.¹²

Ein weiteres an Keratinisierungsvorgängen beteiligtes Gen ist das Keratin 17. Auch ihm wird im Rahmen von Verhornungsstörungen Bedeutung beigemessen. So werden Mutationen in diesem Gen mit der Pathogenese akneiformer Dermatosen, wie der Pachyonychia congenita oder dem Steatocystoma multiplex, in Verbindung gebracht.²⁶

Bei den „Small proline-rich proteins“ (Sprr) handelt es sich um eine Gruppe von Proteinen die im Laufe der Differenzierung epidermaler Keratinozyten gebildet werden. Die Funktion dieser Proteinfamilie liegt in der Bildung des sogenannten „cornified envelope“, einer intrazellulären Proteinschicht, die als eine Art Schutzhülle differenzierter epidermaler Zellen verstanden werden kann. Die Erbinformation dieser Gene, die in 3 Subfamilien (Sprr 1, Sprr 2, Sprr 3) unterteilt werden, liegt beim Menschen auf Chromosom 1, q21-q22.^{27, 28} Ihre Expression wird sowohl auf Ebene der Transkription, posttranskriptionell, aber auch im Rahmen der Translation gesteuert.²⁹

Die Gene der Sprr Familie sind Bestandteil der geregelten, epidermalen Differenzierung gesunder Haut, spielen aber auch bei deren pathologischen Veränderungen eine wichtige Rolle.^{29, 30}

Ein weiteres, in unseren Untersuchungen beeinflusstes Gen, ist das Periplakin. Dieses Gen ist am Aufbau von Desmosomen als Interzellularverbindung zwischen epidermalen Keratinozyten beteiligt. Das N-terminale Ende des Proteins hat Kontakt zur Plasmamembran, das C-terminale Ende interagiert mit Intermediärfilamenten.³¹ Es wird vermutet, dass Periplakin ebenfalls eine funktionelle Rolle bei der Differenzierung epithelialer Gewebe zukommt³² und dass es Anteil an der Organisation von Keratinproteinen in der Zelle hat.³³

Der Einfluss der Androgene auf die Regulation der Funktion der Meibomdrüse gilt als gesichert.¹⁵ Es ist davon auszugehen, dass Androgene auf eine Vielzahl von Prozessen an der Meibomdrüse Einfluss nehmen. Wir wollen uns an dieser Stelle auf den

regulatorischen Einfluss der Androgene auf den Vorgang der Keratinisierung und der daran beteiligten Gene beschränken.

Die Androgenwirkung wird über den Androgenrezeptor vermittelt, der Rezeptor selbst gehört zur Gruppe der Kernrezeptoren, zu der auch der Östrogenrezeptor, der Thyroidhormonrezeptor und der Retinoidrezeptor gehören. Im Zellzyklus stellt der Androgenrezeptor, wie auch die anderen Kernrezeptoren, einen Transkriptionsfaktor dar.^{34, 35}

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Keratinisierungsvorgänge an der Meibom'schen Drüse durch Androgene gesteuert werden. Es wurde die Hypothese formuliert, dass Androgene die Meibomdrüsen vor einer überschießenden Keratinisierung schützen.¹⁴ Diese Hypothese wird durch Beobachtungen gestützt, die man an Patienten mit complete androgen insensitivity syndrome (CAIS) machen kann. Im Deutschen spricht man auch von Androgenresistenz. Bei dieser Störung liegt ein Defekt am Androgenrezeptor vor, aufgrund dessen Androgene am Zielorgan keine Wirkung entfalten können.¹³ Es findet sich bei Betroffenen eine vermehrte Verhornung der Meibomdrüsen und eine damit einhergehende Funktionsbeeinträchtigung, möglicherweise als Ausdruck des fehlenden protektiven Androgeneinflusses^{13, 36}

Erniedrigte Androgenspiegel beobachtet man auch bei Patienten, die am Sjögren-Syndrom (SS) leiden, eine Erkrankung die sich vor allem an Speichel- und Tränendrüsen manifestiert und dort zu morphologischen Veränderungen führt. Auch bei dieser Autoimmunerkrankung aus dem Formenkreis der Kollagenosen findet man eine Meibomdrüsendysfunktion und damit einhergehend eine vermehrte Trockenheit der Augen.³⁷ Beim CAIS können die Androgene ihre Wirkung am Erfolgsorgan nicht entfalten, beim Sjögren-Syndrom ist der Androgenspiegel reduziert. In beiden Fällen ist der protektive Einfluss der Androgene auf die Meibomdrüse vermindert, einhergehend mit einer Dysfunktion der Drüse und Symptomen des trockenen Auges. Im Falle des SS lassen sich in Bindehautepithelien gesteigerte Expressionsraten von Sprr 2a, sowie

Keratin 6a nachweisen, Proteine, die im Rahmen der Keratinisierung vermehrt gebildet werden³⁸ und Anzeichen einer durch Androgenmangel begünstigten Keratinisierung darstellen können.

Betrachtet man die Regulationswege von Keratingenen am Beispiel epidermaler Keratinozyten, so stellt man fest, dass sowohl Hormone als auch Vitamine über Rezeptoren am Zellkern Einfluss auf Differenzierungsprozesse nehmen. Demgegenüber stehen Wachstumsfaktoren und Zytokine, die über Rezeptoren auf der Zelloberfläche ihren regulatorischen Einfluss entfalten. Auf diese Weise wirkt am Keratinozyten der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF) expressionssteigernd auf Keratin 6 Gene, während Retinol die Expression dieser Gene auf Ebene der Transkription hemmt. Man muss davon ausgehen, dass ein Gleichgewicht aus Hormonen, Vitaminen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen für eine geregelte Genexpression verantwortlich ist; einen eindeutig dominanten Faktor scheint es dabei nicht zu geben.³⁹

Bei der Karzinogenese des Bronchialkarzinoms kommt es zu einer vermehrten Expression von Sprr 1 Genen im Rahmen der Plattenepithelmetaplasie. In diesem Zusammenhang wird sogar vom „Marker“ der Plattenepithelmetaplasie in respiratorischen Epithelien gesprochen.²⁹ Auf Ebene der Regulation scheint in diesem Falle Vitamin A eine Rolle zu spielen und zwar dahingehend, dass das Vitamin konzentrationsabhängig die Expression von Sprr1 Genen zu mindern vermag. In diesem Zusammenhang ist es ein Faktor für eine geregelte Differenzierung.^{40, 41}

Beim Trockenen Auge findet eine Entzündungsreaktion statt, in deren Zuge es zu einer vermehrten Durchlässigkeit des Hornhautepithels kommt. Gleichzeitig beobachtet man einen Anstieg der Expressionsraten von Sprr 2 Genen. Diese Expressionssteigerung ist unter antiinflammatorischer Therapie mit Doxycyclin sowie Methylprednisolon rückläufig.⁴² Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass Entzündungsreaktionen, die Ausschüttung von Zytokinen und damit einhergehende Regulationsmechanismen einen Einfluss auf Gene der Keratinisierung und deren

Expression nehmen.⁴² Dafür spricht auch die Tatsache, dass beim Trockenen Auge eine Interferon-gamma Ausschüttung durch Th1 Zellen beobachtet werden kann, anders als bei der allergischen Konjunktivitis, bei der die Th 2 Zytokine IL-4 und IL-13 eine dominierende Rolle spielen.⁴³ Im Falle des trockenen Auges hat die Interferon-gamma Ausschüttung eine Expressionssteigerung von Sprr2 Genen zur Folge. Interferon-gamma wird als ein entscheidender Faktor bei der Entstehung des Trockenen Auges im Mausmodell angesehen.⁴⁴

Auch in anderen Untersuchungen wird das Zytokin Interferon-gamma immer wieder mit der Regulation von Genen in Verbindung gebracht, die bei der Keratinisierung eine Schlüsselrolle spielen.

Beim Sjögren-Syndrom scheinen Sprr 2a und Keratin 6a Gene eine Expressionsverstärkung unter Interferon-gamma Einfluss zu erfahren. Es ist auch ein Einfluss von Interleukin-1 auf Keratinisierungsvorgänge bei der Pathogenese dieser Erkrankung beschrieben.⁴⁵ Ebenso konnte man eine Korrelation zwischen Interleukin-1 Expression und einer Reduktion des Tränenfilms feststellen.⁴⁶ Hier sei einmal mehr auf die erniedrigten Androgenwerte bei Betroffenen hingewiesen.³⁸

Ebenso gibt es Anhaltspunkte dafür, dass die Expressionsraten von Keratin 17 ebenfalls durch den Einfluss von Interferon-gamma gesteigert werden können.⁴⁷ Bei diesem, auch für die Pathogenese der Psoriasis bedeutenden Gen, wird der expressionsteigernde Effekt zumindest partiell über Interleukin-1 vermittelt.⁴⁸ Eine ähnliche Transkriptionssteigerung durch Interleukin-1 erfährt auch das Keratin 6a Gen, das ebenfalls in psoriatisch veränderten Hautarealen gefunden werden kann,⁴⁹ genau wie das Sprr1 Gen, dessen Expression in Keratinozyten unter Interleukin-1 Einfluss stimuliert sein kann.^{50, 51}

An dieser Stelle wird einmal mehr der Zusammenhang zwischen Entzündungsreaktion, Zytokinen und Keratin/Spr-Genexpression als Marker der Keratinisierung deutlich.

Auch im bereits erwähnten TFOS MGD Report wurde aktuell ein entzündliches Mikromilieu, im Gewebe mit Einfluss inflammatorischer Zytokine, als möglicher wichtiger Faktor der Hyperkeratinisierung bei MGD diskutiert.¹¹

Bei einer weiteren Untersuchung, die sich mit dem Trockenen Auge bei Sjögren Syndrom beschäftigt, wurde die Hypothese formuliert, dass die Entzündungsreaktion eine Keratinisierung auslöst. In diesem Zusammenhang konnte eine gesteigerte Sprr1b Expression gefunden werden, ein Gen, welches in unseren Untersuchungen keine signifikante Expressionsänderung zeigte, welches jedoch zur selben Unterfamilie von Genen gehört und auch immer wieder in der Literatur zusammen mit anderen Sprr Mitgliedern genannt wird. Die Autoren kamen hier zu dem Ergebnis, dass Interferon-gamma, Interleukin-1 und Interleukin-6 eine Schlüsselrolle bei der Expressionssteigerung des Sprr1b Gens zukommt.^{52, 53} In anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Interferon-gamma eine Keratinisierung zuvor nicht verhornender Zellen induzieren kann.⁵⁴

Aufgrund dieser Erkenntnisse und vor dem Hintergrund unserer Ergebnisse, dass die Keratinisierung eine der durch Androgene am stärksten beeinflussten Ontologien ist, scheint die Beobachtung interessant, dass Androgene auch an der Regulation von Immunprozessen beteiligt sind.

So zeigt sich, unter dem Einfluss des Androgens Dihydroepiandrosteron (DHEA), ein Abfallen der Interleukin-1 Produktion sowie ein Absinken des von Th1 Zellen ausgeschütteten Zytokins Interferon-gamma.⁵⁵ Eine andere Untersuchung kommt zu dem Schluss, dass DHEA einen hemmenden Einfluss auf Entzündungsreaktionen auf Ebene der Zytokinproduktion ausüben kann.⁵⁶ Eine Reduktion der Expression, unter Androgeneinfluss, konnte auch beim Zytokin Interleukin-6 nachgewiesen werden.^{57, 58} Bei unseren Recherchen zeigte sich, dass diese Zytokine besonders häufig an der Regulation von Genen beteiligt sind, die bei dem Prozess der Keratinisierung eine Rolle spielen. Die Einflussnahme auf die Zytokinausschüttung stellt in unseren Augen einen

weiteren möglichen Weg dar, wie Androgene indirekt die Expression von Genen der Keratinisierung beeinflussen könnten. Der Einfluss von Androgenen auf Immunzellen, so wird angenommen, wird wohl über Rezeptoren vermittelt.⁵⁹ Den engen Zusammenhang zwischen den hormonellen Wirkungen und immunologischen zu untersuchen bleibt jedoch zukünftigen Untersuchungen vorbehalten.

7.3 ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

In der Synopsis dieser Ergebnisse kann man feststellen, dass Vitamine, Hormone und Zytokine maßgeblich an der Regulation der von uns betrachteten Gene beteiligt sind und dass all diese Faktoren auf den Prozess der Keratinisierung Einfluss nehmen. Die Wege, über die diese Regulation stattfindet, sind vielfältig und komplex und eine eindeutige Beziehung zwischen den einzelnen Faktoren und der Expressionsregulation herzustellen, ist häufig nicht möglich. Es ist wahrscheinlich, dass die Kombination vieler Faktoren im Zusammenspiel für Veränderungen im Expressionsmuster der von uns untersuchten Gene verantwortlich ist, wobei Androgene eine entscheidende Rolle spielen.

Testosteron reguliert die Expression von Genen herab, die eine Verhornung der Meibomdrüse unterhalten. Unsere Ergebnisse erklären, zumindest in Teilen, den schützenden Effekt von Androgenen auf die Meibomdrüse und auf diese Weise deren protektiven Einfluss auf eine gesunde Hornhautoberfläche durch Drosselung einer übersteigerten Keratinisierung des Drüsengewebes und des Lidrandes durch Testosteron.

Weitere potentiell lohnende Forschungsziele ergeben sich aus folgenden Zusammenhängen: Werden in übergeordneten, weniger spezifischen Ontologien, die relativ viele Gene umfassen, hohe z-Scores erreicht, wie in Tabelle 1 die Ontologien „epidermal cell differentiation“ und „epidermis development“, die sich im Ontologiebaum zu „keratinization“ (Abb. 1) weiter proximal wiederfinden, so müssen

weitere spezifische Prozesse der übergeordneten Ontologie ebenfalls deutlich testosteron-reguliert sein. Diese gilt es in weiteren Untersuchungen zu identifizieren.

Schließlich könnten funktionelle und regulatorische Experimente auf Proteinniveau mit einer Meibomdrüsenzellkultur hilfreiche Forschungsziele sein. Nicht zuletzt erscheint, nach Experimentwiederholung, die ausgiebige histologische Aufarbeitung der Meibomdrüse im zeitlichen Verlauf sinnvoll.

8 LITERATUR

1. Bron AJ, Tiffany JM, Gouveia SM, Yokoi N, Voon LW: **Functional aspects of the tear film lipid layer.** *Experimental eye research* 2004, **78**(3):347-360.
2. Bron AJ, Tiffany JM: **The contribution of meibomian disease to dry eye.** *The ocular surface* 2004, **2**(2):149-165.
3. Knop E, Knop N, Schirra F: **[Meibomian glands. Part II: physiology, characteristics, distribution and function of meibomian oil].** *Ophthalmologie* 2009, **106**(10):884-892.
4. McCulley JP, Shine WE: **Meibomian gland function and the tear lipid layer.** *The ocular surface* 2003, **1**(3):97-106.
5. Obata H: **Anatomy and histopathology of human meibomian gland.** *Cornea* 2002, **21**(7 Suppl):S70-74.
6. Gutgesell VJ, Stern GA, Hood CI: **Histopathology of meibomian gland dysfunction.** *American journal of ophthalmology* 1982, **94**(3):383-387.
7. Jester JV, Nicolaides N, Smith RE: **Meibomian gland studies: histologic and ultrastructural investigations.** *Investigative ophthalmology & visual science* 1981, **20**(4):537-547.
8. Jester JV, Nicolaides N, Smith RE: **Meibomian gland dysfunction. I. Keratin protein expression in normal human and rabbit meibomian glands.** *Investigative ophthalmology & visual science* 1989, **30**(5):927-935.

9. Knop E, Knop N, Brewitt H, Pleyer U, Rieck P, Seitz B, Schirra F: **[Meibomian glands : part III. Dysfunction - argument for a discrete disease entity and as an important cause of dry eye]**. *Ophthalmologie* 2009, **106**(11):966-979.
10. Knop E, Knop N: **[Meibomian glands : part IV. Functional interactions in the pathogenesis of meibomian gland dysfunction (MGD)]**. *Ophthalmologie* 2009, **106**(11):980-987.
11. 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):1938-1978.
12. Ong BL, Hodson SA, Wigham T, Miller F, Larke JR: **Evidence for keratin proteins in normal and abnormal human meibomian fluids**. *Current eye research* 1991, **10**(12):1113-1119.
13. Cermak JM, Krenzer KL, Sullivan RM, Dana MR, Sullivan DA: **Is complete androgen insensitivity syndrome associated with alterations in the meibomian gland and ocular surface?** *Cornea* 2003, **22**(6):516-521.
14. Sullivan DA, Jensen RV, Suzuki T, Richards SM: **Do sex steroids exert sex-specific and/or opposite effects on gene expression in lacrimal and meibomian glands?** *Molecular vision* 2009, **15**:1553-1572.
15. Sullivan DA, Sullivan BD, Ullman MD, Rocha EM, Krenzer KL, Cermak JM, Toda I, Doane MG, Evans JE, Wickham LA: **Androgen influence on the meibomian gland**. *Investigative ophthalmology & visual science* 2000, **41**(12):3732-3742.

16. Ramakrishnan R, Dorris D, Lublinsky A, Nguyen A, Domanus M, Prokhorova A, Gieser L, Touma E, Lockner R, Tata M *et al*: **An assessment of Motorola CodeLink microarray performance for gene expression profiling applications.** *Nucleic acids research* 2002, **30**(7):e30.
17. Redmond DE, Jr., Zhao JL, Randall JD, Eklund AC, Eusebi LO, Roth RH, Gullans SR, Jensen RV: **Spatiotemporal patterns of gene expression during fetal monkey brain development.** *Brain research Developmental brain research* 2003, **146**(1-2):99-106.
18. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT *et al*: **Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium.** *Nat Genet* 2000, **25**(1):25-29.
19. Auw-Haedrich C, Reinhard T: [**Chronic blepharitis. Pathogenesis, clinical features, and therapy**]. *Ophthalmologie* 2007, **104**(9):817-826; quiz 827-818.
20. Driver PJ, Lemp MA: **Meibomian gland dysfunction.** *Survey of ophthalmology* 1996, **40**(5):343-367.
21. Takahashi K, Coulombe PA: **Defining a region of the human keratin 6a gene that confers inducible expression in stratified epithelia of transgenic mice.** *The Journal of biological chemistry* 1997, **272**(18):11979-11985.
22. McGowan KM, Coulombe PA: **Onset of keratin 17 expression coincides with the definition of major epithelial lineages during skin development.** *The Journal of cell biology* 1998, **143**(2):469-486.
23. Proby CM, Churchill L, Purkis PE, Glover MT, Sexton CJ, Leigh IM: **Keratin 17 expression as a marker for epithelial transformation in viral warts.** *The American journal of pathology* 1993, **143**(6):1667-1678.

24. Zhang ZH, Wang ZM, Crosby ME, Kang KF, Luan J, Huang W, Xiang LH, Zheng ZZ: **Reassessment of microarray expression data of porokeratosis by quantitative real-time polymerase chain reaction.** *Journal of cutaneous pathology* 2010, **37**(3):371-375.
25. Gu LH, Coulombe PA: **Hedgehog signaling, keratin 6 induction, and sebaceous gland morphogenesis: implications for pachyonychia congenita and related conditions.** *The American journal of pathology* 2008, **173**(3):752-761.
26. Covello SP, Smith FJ, Sillevius Smitt JH, Paller AS, Munro CS, Jonkman MF, Uitto J, McLean WH: **Keratin 17 mutations cause either steatocystoma multiplex or pachyonychia congenita type 2.** *The British journal of dermatology* 1998, **139**(3):475-480.
27. Steven AC, Steinert PM: **Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes.** *Journal of cell science* 1994, **107 (Pt 2)**:693-700.
28. Gibbs S, Fijneman R, Wiegant J, van Kessel AG, van De Putte P, Backendorf C: **Molecular characterization and evolution of the SPRR family of keratinocyte differentiation markers encoding small proline-rich proteins.** *Genomics* 1993, **16**(3):630-637.
29. Tesfaigzi J, Carlson DM: **Expression, regulation, and function of the SPR family of proteins. A review.** *Cell biochemistry and biophysics* 1999, **30**(2):243-265.
30. Koizumi H, Kartasova T, Tanaka H, Ohkawara A, Kuroki T: **Differentiation-associated localization of small proline-rich protein in normal and diseased human skin.** *The British journal of dermatology* 1996, **134**(4):686-692.

31. Karashima T, Watt FM: **Interaction of periplakin and envoplakin with intermediate filaments.** *Journal of cell science* 2002, **115**(Pt 24):5027-5037.
32. Aho S: **Many faces of periplakin: domain-specific antibodies detect the protein throughout the epidermis, explaining the multiple protein-protein interactions.** *Cell and tissue research* 2004, **316**(1):87-97.
33. Long HA, Boczonadi V, McInroy L, Goldberg M, Maatta A: **Periplakin-dependent re-organisation of keratin cytoskeleton and loss of collective migration in keratin-8-downregulated epithelial sheets.** *Journal of cell science* 2006, **119**(Pt 24):5147-5159.
34. McPhaul MJ, Young M: **Complexities of androgen action.** *Journal of the American Academy of Dermatology* 2001, **45**(3 Suppl):S87-94.
35. Beato M, Klug J: **Steroid hormone receptors: an update.** *Human reproduction update* 2000, **6**(3):225-236.
36. Krenzer KL, Dana MR, Ullman MD, Cermak JM, Tolls DB, Evans JE, Sullivan DA: **Effect of androgen deficiency on the human meibomian gland and ocular surface.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2000, **85**(12):4874-4882.
37. Sullivan DA, Belanger A, Cermak JM, Berube R, Papas AS, Sullivan RM, Yamagami H, Dana MR, Labrie F: **Are women with Sjogren's syndrome androgen-deficient?** *The Journal of rheumatology* 2003, **30**(11):2413-2419.

38. Kawasaki S, Kawamoto S, Yokoi N, Connon C, Minesaki Y, Kinoshita S, Okubo K: **Up-regulated gene expression in the conjunctival epithelium of patients with Sjogren's syndrome.** *Experimental eye research* 2003, **77**(1):17-26.
39. Tomic-Canic M, Freedberg IM, Blumenberg M: **Codominant regulation of keratin gene expression by cell surface receptors and nuclear receptors.** *Experimental cell research* 1996, **224**(1):96-102.
40. An G, Tesfaigzi J, Carlson DM, Wu R: **Expression of a squamous cell marker, the spr1 gene, is posttranscriptionally down-regulated by retinol in airway epithelium.** *Journal of cellular physiology* 1993, **157**(3):562-568.
41. Lau D, Xue L, Hu R, Liaw T, Wu R, Reddy S: **Expression and regulation of a molecular marker, SPR1, in multistep bronchial carcinogenesis.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2000, **22**(1):92-96.
42. De Paiva CS, Corrales RM, Villarreal AL, Farley W, Li DQ, Stern ME, Pflugfelder SC: **Apical corneal barrier disruption in experimental murine dry eye is abrogated by methylprednisolone and doxycycline.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2006, **47**(7):2847-2856.
43. Stern ME, Siemasko KF, Gao J, Calonge M, Niederkorn JY, Pflugfelder SC: **Evaluation of ocular surface inflammation in the presence of dry eye and allergic conjunctival disease.** *The ocular surface* 2005, **3**(4 Suppl):S161-164.
44. De Paiva CS, Villarreal AL, Corrales RM, Rahman HT, Chang VY, Farley WJ, Stern ME, Niederkorn JY, Li DQ, Pflugfelder SC: **Dry eye-induced conjunctival epithelial squamous metaplasia is modulated by interferon-gamma.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2007, **48**(6):2553-2560.

45. Chen YT, Nikulina K, Lazarev S, Bahrami AF, Noble LB, Gallup M, McNamara NA: **Interleukin-1 as a phenotypic immunomodulator in keratinizing squamous metaplasia of the ocular surface in Sjogren's syndrome.** *The American journal of pathology* 2010, **177**(3):1333-1343.
46. Chen YT, Lazarev S, Bahrami AF, Noble LB, Chen FY, Zhou D, Gallup M, Yadav M, McNamara NA: **Interleukin-1 receptor mediates the interplay between CD4(+) T cells and ocular resident cells to promote keratinizing squamous metaplasia in Sjogren's syndrome.** *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2012, **92**(4):556-570.
47. Bonnekoh B, Huerkamp C, Wevers A, Geisel J, Sebok B, Bange FC, Greenhalgh DA, Bottger EC, Krieg T, Mahrle G: **Up-regulation of keratin 17 expression in human HaCaT keratinocytes by interferon-gamma.** *The Journal of investigative dermatology* 1995, **104**(1):58-61.
48. Wei L, Debets R, Hegmans JJ, Benner R, Prens EP: **IL-1 beta and IFN-gamma induce the regenerative epidermal phenotype of psoriasis in the transwell skin organ culture system. IFN-gamma up-regulates the expression of keratin 17 and keratinocyte transglutaminase via endogenous IL-1 production.** *The Journal of pathology* 1999, **187**(3):358-364.
49. Komine M, Rao LS, Freedberg IM, Simon M, Milisavljevic V, Blumenberg M: **Interleukin-1 induces transcription of keratin K6 in human epidermal keratinocytes.** *The Journal of investigative dermatology* 2001, **116**(2):330-338.
50. Eller MS, Yaar M, Ostrom K, Harkness DD, Gilchrist BA: **A role for interleukin-1 in epidermal differentiation: regulation by expression of functional versus decoy receptors.** *Journal of cell science* 1995, **108** (Pt 8):2741-2746.

51. Yaar M, Eller MS, Bhawan J, Harkness DD, DiBenedetto PJ, Gilchrest BA: **In vivo and in vitro SPRR1 gene expression in normal and malignant keratinocytes.** *Experimental cell research* 1995, **217**(2):217-226.
52. Li S, Nikulina K, DeVoss J, Wu AJ, Strauss EC, Anderson MS, McNamara NA: **Small proline-rich protein 1B (SPRR1B) is a biomarker for squamous metaplasia in dry eye disease.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2008, **49**(1):34-41.
53. Li S, Gallup M, Chen YT, McNamara NA: **Molecular mechanism of proinflammatory cytokine-mediated squamous metaplasia in human corneal epithelial cells.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2010, **51**(5):2466-2475.
54. Iwasaka T, Hayashi Y, Yokoyama M, Hachisuga T, Sugimori H: **Interferon gamma treatment for cervical intraepithelial neoplasia.** *Gynecologic oncology* 1990, **37**(1):96-102.
55. Powell JM, Sonnenfeld G: **The effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on in vitro spleen cell proliferation and cytokine production.** *J Interferon Cytokine Res* 2006, **26**(1):34-39.
56. Khalkhali-Ellis Z, Handa RJ, Price RH, Jr., Adams BD, Callaghan JJ, Hendrix MJ: **Androgen receptors in human synoviocytes and androgen regulation of interleukin 1beta (IL-1beta) induced IL-6 production: a link between hypoandrogenicity and rheumatoid arthritis?** *The Journal of rheumatology* 2002, **29**(9):1843-1846.

57. Bellido T, Jilka RL, Boyce BF, Girasole G, Broxmeyer H, Dalrymple SA, Murray R, Manolagas SC: **Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgens. The role of the androgen receptor.** *The Journal of clinical investigation* 1995, **95**(6):2886-2895.
58. Parkar M, Tabona P, Newman H, Olsen I: **IL-6 expression by oral fibroblasts is regulated by androgen.** *Cytokine* 1998, **10**(8):613-619.
59. Cutolo M, Accardo S, Villaggio B, Barone A, Sulli A, Balleari E, Bason C, Felli L, Granata OM, Amodio R *et al*: **Androgen metabolism and inhibition of interleukin-1 synthesis in primary cultured human synovial macrophages.** *Mediators of inflammation* 1995, **4**(2):138-143.

9 PUBLIKATIONEN

Das Thema wurde bereits als Originalarbeit in der Zeitschrift „Der Ophthalmologe“ veröffentlicht.

F. Schirra¹, Z. Gazioufas¹, J. Scheidt¹ und B. Seitz¹ (**Testosteron reduziert die Expression Keratinisierung-fördernder Gene in der Meibom-Drüse der Maus**) Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft 2013, **110**(3):230-238.

10 DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Berthold Seitz für die Überlassung des Themas sowie für die Möglichkeit der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Besonders danken möchte ich meinem Betreuer Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Frank Schirra für die Stellung des Themas und seine Erlaubnis auf die Ergebnisse der von ihm durchgeführten Versuchsreihen zurückgreifen zu dürfen. Durch seine stetige Unterstützung durch zahlreiche Anregungen und klärende Gespräche und nicht zuletzt durch seine Hinweise beim Editieren und Formatieren der Dissertation hat er maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Danksagen möchte ich Herrn David A. Sullivan, Ph.D. vom Schepens Eye Research Institute, Boston, MA, USA für die großzügige Erlaubnis der Nutzung und Analyse der elektronischen Datenbanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner wundervollen Frau Jasmin für ihre unermüdliche Geduld ihre ausdauernde Motivation und ihre liebevolle Unterstützung.

Danken möchte ich meinen Eltern, die mir meine Ausbildung ermöglicht haben und auf deren Unterstützung ich mich immer uneingeschränkt verlassen konnte. Ihnen widme ich diese Arbeit.

