

Veränderte mRNA und miRNA Expression in kornealem Epithel und Stroma bei Keratokonus-Patienten

Tanja Stachon ¹, Mahsa Nastaranpour ¹, Berthold Seitz ², Eckart Meese ³, Lorenz Latta ¹, Suphi Taneri ⁴, Navid Ardjomand ⁵, Nóra Szentmáry ^{1,6}, Nicole Ludwig ³

¹ Dr. Rolf M. Schwiete Zentrum für Limbusstammzellforschung und kongenitale Aniridie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland; ² Klinik für Augenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes UKS, Homburg/Saar, Deutschland; ³ Department of Human Genetics, Saarland University, Homburg/Saar, Germany; Center for Human and Molecular Biology, Saarland University, Homburg/Saar, Germany; ⁴ Center for Refractive Surgery, Eye Department at St. Francis Hospital, Muenster, Germany; ⁵ Sehzentrum für Eye-Laser & Eye Surgery, Graz, Austria; ⁶ Department of Ophthalmology, Semmelweis University, Budapest, Hungary

Einleitung

Der Keratokonus (KC) ist eine Erkrankung der Hornhaut, deren Ursache bisher nicht geklärt ist. Ebenso ist bisher nicht geklärt, zu welchem Anteil die epithelialen Zellen und die Stromalen Zellen bei der Erkrankung betroffen sind. Es ist bekannt, dass zahlreichen metabolischen Prozesse verändert sind ^{1, 2} inwieweit Micro-RNAs eine Rolle spielen ist jedoch weitgehend unerforscht.

Das Ziel dieser Studie war die systematische Analyse von mRNAs und micro-RNAs (miRNAs) getrennt in epithelialen und Stromalen Zellen von Hornhäuten von KC-Patienten.

Material und Methoden

Epithel und Stroma von Hornhäuten von Patienten mit Keratokonus und Hornhäuten von gesunden Kontrollpersonen ohne Keratokonus (n=8) wurden getrennt untersucht. Die RNA wurde extrahiert und die mRNA- und miRNA-Analysen mit Hilfe von Microarrays durchgeführt. Es wurden differentiell exprimierte mRNAs und miRNAs (p<0.05; Fold change <-2 und >+2) in epithelialen und Stromalen Keratokonusproben im Vergleich zu gesunden Kontrollen analysiert. Die Darstellung der Probenvarianz erfolgte mit Morpheus online-software (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>). Zur Analyse von überlappenden deregulierten Genen (DEGs) in Epithel und Stroma wurde das Online Programm Venny verwendet (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>). Die Signalweg-Analyse wurde mittels Gene Trail (<https://genetrail.bioinf.uni-sb.de/>) durchgeführt.

Ergebnisse

In den KC-Proben wurden 170 epitheliale und 1498 stromale deregulierte proteinkodierende mRNAs analysiert. Darüber hinaus wurden in den Epithelproben 180 miRNAs und in Stromaproben 379 miRNAs im Vergleich zu den Kontrollen um mehr als das Zweifache dereguliert. **Abbildung 1** zeigt Heatmaps der differentiell exprimierten Gene (DEGs), einschließlich der 20 am stärksten hochregulierten und 20 am stärksten herunterregulierten mRNAs und miRNAs der Epithel- und Stromagruppe. Die Analyse der Signalwege ergab eine Anreicherung von metabolischen Stoffwechsel- und Axonführungswegen bei Epithelzellen und eine Anreicherung von metabolischen Stoffwechsel-, Mitogen-aktivierten Proteinkinase- (MAPK) und fokalen Adhäsionswegen bei Stromalen Zellen.

Der Überlapp der DEGs in Epithel und Stroma war relativ gering, während der Überlapp der deregulierten miRNAs in Epithel und Stroma prozentual deutlich höher war (**Abbildung 2**).

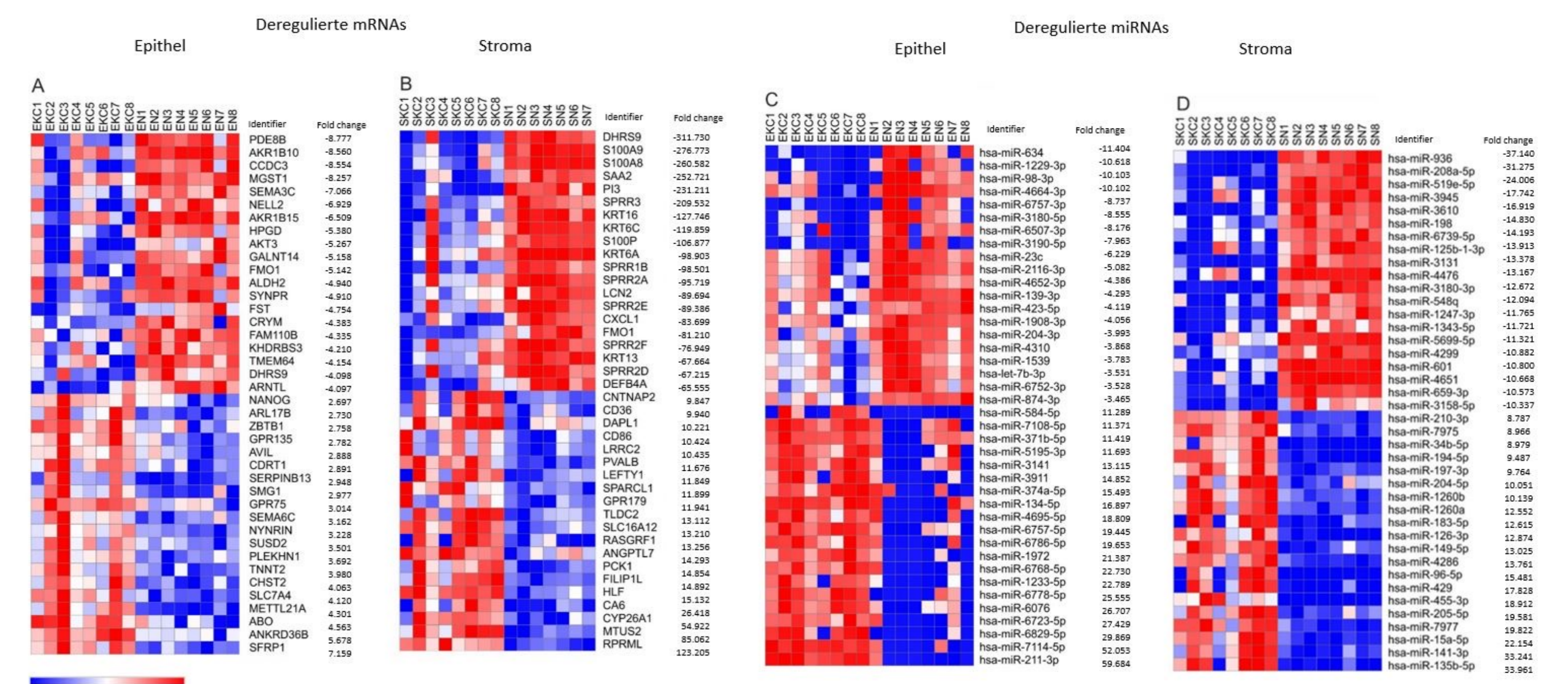


Abbildung 1: Heatmaps der differentiell exprimierten Gene (DEGs), einschließlich der 20 am stärksten hochregulierten und 20 am stärksten herunterregulierten Gene der Epithel- und Stromagruppe. (A) Heatmap der 40 am stärksten differentiell exprimierten Gene der Epithelgruppe (EKC vs. EN) und der Stromagruppe (SKC vs. SN) sowie der differentiell exprimierten miRNAs der Epithel- (C) (EKC vs. EN) und Stromaproben (D) (SKC vs. SN), einschließlich der 20 hochregulierten (rot) und 20 herunterregulierten (blau) Gen-Hubs. Die Zeilen sind durch Gennamen oder Namen von miRNAs gekennzeichnet und deren Fold changes. Die Intensität wird durch eine Farbskala dargestellt, die von rot (Höchstwert der Reihe) über weiß (Durchschnitt der Reihe) bis blau (Minimum der Reihe) reicht. Die Grafik wurde mit Morpheus Analysesoftware (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>) erstellt.

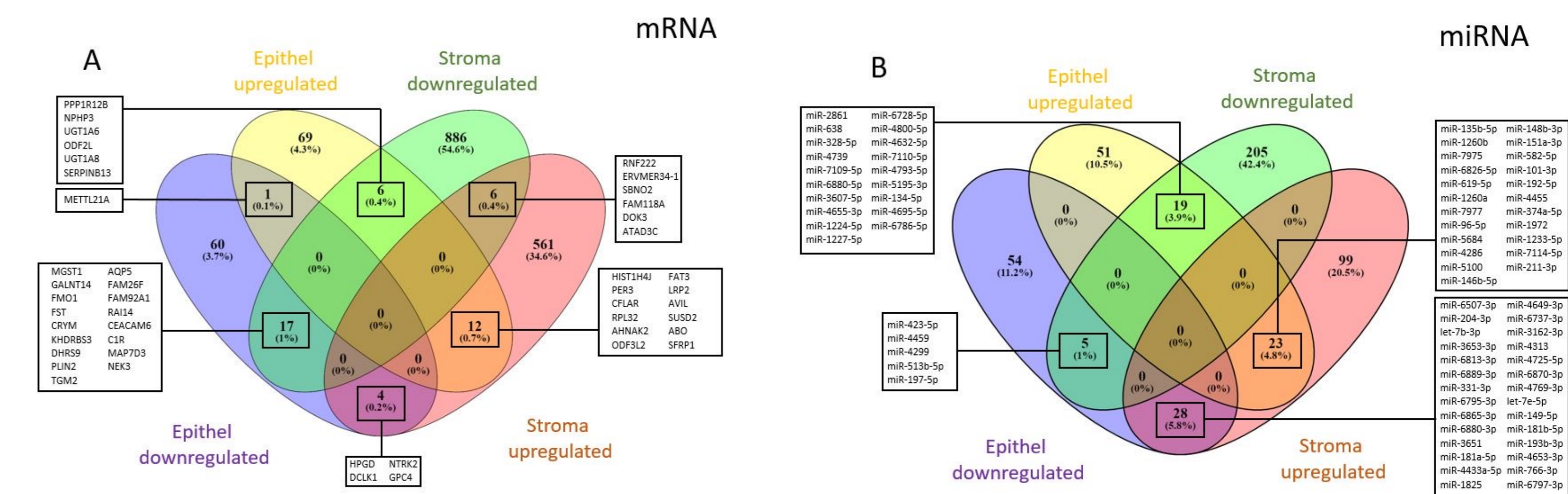


Abbildung 2: Überschneidung deregulierter mRNAs (A) und miRNAs (B) in Epithel- und Stromazellen von KC-Hornhäuten. Dargestellt ist Anzahl und Identität der überlappenden Gene (A) und miRNAs (B), mit einem Fold change ≥ 2 und einem p<0,05. Die Abbildung wurde mit Venny2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) erstellt. Im Vergleich zu mRNAs wird bei miRNAs ein höherer Prozentsatz an Überschneidungen beobachtet.

Zusammenfassung

Diese Studie zeigt signifikante Unterschiede in der Expression und Regulation von mRNAs und miRNAs in Epithel und Stroma von KC-Patienten. Außerdem konnten wir neben den bereits bekannten Zielkandidaten weitere neue Gene und miRNAs identifizieren, die möglicherweise mit Keratokonus in Verbindung stehen. In Epithel- und Stromazellen von Keratokonus-Patienten sind Signalwege betroffen, die Stoffwechselveränderungen und Zellkontakte beeinflussen und potentielle Ziele für Therapien bieten könnten ³.

Danksagung: Die Arbeit von Dr. Stachon, Frau Nastaranpour, Dr. Latta und Dr. Szentmáry am Dr. Rolf M. Schwiete Zentrum für Limbusstammzellforschung und kongenitale Aniridie wurde von der Dr. Rolf M. Schwiete Stiftung unterstützt.

1. McKay TB, Hjortdal J, Sejersen H, Asara JM, Wu J, Karamichos D. Endocrine and Metabolic Pathways linked to Keratoconus: Implication for the Role of Hormones in the Stromal Microenvironment. *Sci Rep.* 2016; 6:25534.
2. Stachon T, Latta L, Seitz B, Szentmáry N. Hypoxic stress increases NF- κ B and iNOS mRNA expression in normal, but not in keratoconus corneal fibroblasts. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2021; 259:449–58.
3. Stachon T, Nastaranpour M, Seitz B, Meese E, Latta L, Taneri S, Ardjomand N, Szentmáry N, Ludwig N. Altered Regulation of mRNA and miRNA Expression in Epithelial and Stromal Tissue of Keratoconus Corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2022;63(8):7.