

AUS DER AUGENKLINIK DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

DIREKTOR: PROF. DR. MED. DR. RER. NAT. THOMAS FUCHSLUGER FEBO, MSC, MHBA

GENOMWEITE ASSOZIATIONSSTUDIE BEI FUCHS-ENDOTHELDYSTROPHIE IN EINER DEUTSCHEN POPULATION

INAUGURALDISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOKTOR DER MEDIZIN
DER
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON JULIANE FECHNER, GEB. 18.11.1989 IN HAMBURG

ROSTOCK, 2025

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00005709

GUTACHTER

ERSTGUTACHTER:

PROF. DR. MED. TOBIAS BROCKMANN,

KLINIK UND POLIKLINIK FÜR AUGENHEILKUNDE DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

WEITERE GUTACHTER:

PROF. DR. MED. ANDREAS STAHL,

KLINIK UND POLIKLINIK FÜR AUGENHEILKUNDE DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN GREIFSWALD

PROF. DR. RER. NAT. DAGMAR-CHRISTIANE FISCHER,

KLINIK UND POLIKLINIK FÜR UNFALL-, HAND- UND WIEDERHERSTELLUNGSSCHIRURGIE DER
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

JAHR DER EINREICHUNG: 2025

JAHR DER VERTEIDIGUNG: 2026

INHALTSVERZEICHNIS

TABELLENVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

I.	VORWORT	1
II.	ZUSAMMENFASSUNG	2
III.	EINLEITUNG	4
3.1	KORNEA UND KORNEALES ENDOTHEL	4
3.2	FUCHS ENDOTHELDYSTROPHIE	7
3.2.1	ALLGEMEINES	7
3.2.2	BEFUNDE, KLINIK UND THERAPIE	8
3.2.3	ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE – STAND DER DINGE	9
3.2.4	GRUNDLAGEN GENETIK UND METHODIK	16
3.2.4.1	GRUNDLAGEN DER GENETIK	16
3.2.4.2	GENOMWEITE ASSOZIATIONSSTUDIE (GWAS)	16
3.2.4.3	SIGNALWEG-ANALYSE	17
IV.	ZIELE DER ARBEIT	19
V.	MATERIAL UND METHODEN	20
5.1	MATERIAL	20
5.2	STUDIENDESIGN	20
5.3	ETHIKSTATEMENT	21
5.4	PATIENTENPOPULATION	21
5.5	FALLZAHLSCHÄTZUNG	22
5.6	ABLAUF	22
5.7	LABORANALYSE	23
5.8	GEN-DATEN	25
5.9	STATISTISCHE ANALYSE	25
5.10	VERGLEICH DER ERGEBNISSE MIT BESTEHENDER LITERATUR	26
VI.	ERGEBNISSE	28
6.1	STUDIENPOPULATION	28

6.2	GWAS.....	29
6.3	PATHWAY ENRICHMENT ANALYSE	39
6.4	RISIKOBEWERTUNG.....	41
VII.	DISKUSSION.....	42
7.1	AUSWERTUNG DER GWAS-ERGEBNISSE	42
7.1.1	VARIANTEN MIT OR >1	42
7.1.2	SIGNIFIKANTE MARKER MIT OR <1	44
7.1.3	LONG NON-CODING RNAs (LNCRNAs).....	46
7.1.4	PATHWAY ENRICHMENT ANALYSE	47
7.1.5	EINSCHRÄNKUNGEN UND STÄRKEN DER DURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE.....	49
VIII.	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK.....	51
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	52
X.	DANKSAGUNG	65

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1 – MIT FECD ASSOZIIERTE LOCI AUS BISHERIGEN PUBLIKATIONEN.....	13
TABELLE 2 – ABSTAMMUNG DER PROBANDEN	28
TABELLE 3 – LISTE DER SIGNIFIKANT MIT FECD ASSOZIIERTEN MARKER.	31
TABELLE 4 – LINKAGE DISEQUILIBRIUM ZWISCHEN TOP-MARKER RS613872 UND BENACHBARTEN VARIANTEN.....	39

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1 – ERGEBNISSE DER GWAS ZU FECD.....	30
ABBILDUNG 2 – LINKAGE DISEQUILIBRIUM ZWISCHEN TOP MARKER RS613872 UND BENACHBARTEN MARKERN	38
ABBILDUNG 3 – PATHWAY ENRICHMENT ANALYSE ZU GENEN, DIE SIGNIFIKANT MIT FECD ASSOZIIERTE MARKER UMFASSEN.....	40
ABBILDUNG 4 – GENETISCHER RISIKO-SCORE.....	41

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

(g) DNA	(genomische) Desoxyribonukleinsäure
(lnc/nc/si) RNA	(long non-coding/non-coding/small interfering) Ribonukleinsäure
(m) PCR	(multiplex) Polymerase Chain Reaction
370K	370.000
AIC	Akaike-Informationskriterium
Alt	Alternatives Allel
bp	Basenpaare
CADD-Score	Combined Annotation Dependent Depletion Score
CEC	korneale Endothelzelle
CH	Corneal Hysteresis
Chr	Chromosom
CORUM	Comprehensive Resource of Mammalian protein complexes
CRF	Corneal Resistance Factor
CTG-TNR	Cytosin-Thymin-Guanin-Trinukleotid-Repeat
dbSNP	Single Nucleotide Polymorphism Database
DM	Descemet-Membran
DMEK	Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty
DSAEK	Descemet Stripping Anterior Endothelial Keratoplasty
EDTA	Ethylenediamintetraessigsäure
EMT	Endothelial-Mesenchymal-Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZM	Extrazellulärmatrix
FDR	False Discovery Rate
FECD	Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy
FIDUS	Funktionsübergreifende Integrierte Daten- und Unterstützungssysteme
G1-Phase	Gap1-Phase des Zellzyklus
GCC	GeneChip™ Command Console™
glm	generalisierte lineare Modelle
GO	Gene Ontology
GRCh38.p14	Genome Reference Consortium Human, 38. Version, Patch 14
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
hg38	Human Genome version 38
HGVS	Human Genome Variation Society
HPA	Human Protein Atlas
Indel	Insertion/Deletion

KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LD	linkage disequilibrium
log	Logarithmus
MA	Minor Allele
MAF	Minor Allele Frequency
Mb	Megabasen
MC-Instrument	Multi-Channel-Instrument
ml	Milliliter
mm/ μ m	Millimeter/Mikrometer
Mrd	Milliarden
MTA	medizinisch-technische Assistenzkraft
MVP	Million Veterans Programm
N./Nn.	Nervus/Nervi
Na ⁺ /K ⁺	Natrium/Kalium
NaCl	Natrium-Chlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nt	Nukleotide
OP	Operation
OR	Odds Ratio
ORA	Over-Representation Analysis
p-Wert	probability-Wert
PC	Principal Component
PCA	Principal Component Analysis
PLINK	PLatform for the analysis and INterrogation of Karyotypic Structural variants
PMDA	Precision Medicine Diversity Array
Pos	Position
R ²	Maß für das Kopplungsgleichgewicht
Ref	Referenzallel
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rsID	reference Single Nucleotide Polymorphism Identifier
SAP	Systeme, Anwendungen und Produkte in der Datenverarbeitung
SD	Standard Deviation
SIDAK_SD	Simultaneous Identity Differential Analysis with Kappa_step- down
SIDAK_SS	Simultaneous Identity Differential Analysis with Kappa_ single- step

SNP/SNV	Single Nucleotide Polymorphism/ Single Nucleotide Variant
t-Test	Student's Test
TRANSFAC	TRANScriptioN FACtor database
UACR	Urine Albumin-to-Creatinine Ratio
UAK-Data	Universitäts-Augenklinik-Data (Software)
UPR	Unfolded Protein Response
UV	Ultraviolett

I. VORWORT

Diese Dissertation entstand im Rahmen meines Promotionsvorhabens an der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Universitätsmedizin Rostock und basiert in wesentlichen Teilen auf der folgenden wissenschaftlichen Publikation:

Fechner J, Neumann GB, Murza F, Matthias L, Walckling M, Brockmann C, Fuchsluger TA, Brockmann T. Genome-wide association study of Fuchs' endothelial corneal dystrophy in the German population. Hum Genet. 2025 May 12. doi: 10.1007/s00439-025-02749-7. Epub ahead of print. PMID: 40353861.

Teile der Einleitung, der Methodenteil, die Ergebnisse sowie Teile der Diskussion dieser Arbeit beruhen inhaltlich auf der genannten Veröffentlichung, an der ich als Erstautorin maßgeblich beteiligt war. Die Inhalte wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation erweitert, kontextualisiert und an die formalen Anforderungen einer Monografie angepasst.

Aus Gründen der Lesbarkeit wird in dieser Arbeit in Bezug auf Patientinnen und Patienten das generische Maskulinum verwendet. Die gewählte Form gilt stellvertretend für alle Geschlechter.

II. ZUSAMMENFASSUNG

Die Fuchs'sche Endotheldystrophie gehört zu den häufigsten kornealen Erkrankungen weltweit und ist durch eine vorzeitige Alterung der Endothelzellen mit konsekutiver Einbuße der Pumpfunktion des kornealen Endothels sowie durch übermäßige Ablagerung extrazellulärer Matrix in Form von Guttae gekennzeichnet. Folgen sind zusammengefasst vermehrte Lichtstreuung, Sehverschlechterung und korneales Ödem (1).

Die komplexe multifaktorielle Ätiologie der Erkrankung ist trotz einer Vielzahl verschieden gearteter Studien zu diesem Thema in den letzten Jahrzehnten nach wie vor unzureichend geklärt. Neben krankheitsfördernden Umweltfaktoren, wie beispielsweise UV-Licht und oxidativem Stress, wurde eine Reihe von genetischen Polymorphismen und Mutationen in Assoziation mit FECD identifiziert. Von diesen nehmen diejenigen im *TCF4*-Gen eine besondere Stellung neben zahlreichen seltenen, teilweise nicht verifizierten Loci ein (2–5). Aufgrund der klinischen Relevanz und weil die FECD die führende Indikation für Hornhauttransplantationen in der westlichen Welt darstellt (6), ist weitere Forschung zu den zugrunde liegenden Ursachen, u.a. um neue therapeutische Konzepte zu entwickeln, unerlässlich.

Das Ziel dieser Arbeit war es, den genetischen Aspekt der FECD näher zu untersuchen. Zuvor identifizierte Kandidatengene sollten verifiziert und neue mit der Erkrankung assoziierte genetische Varianten in einer homogenen mitteleuropäischen Kohorte identifiziert werden. Dafür wurde – nach unserem Wissen erstmals in Deutschland – zu diesem Thema eine genomweite Assoziationsstudie durchgeführt. Es ließen sich 157 klinisch diagnostizierte Fälle mit Fuchs-Endotheldystrophie und 309 Kontrollen aus dem Patientengut der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Universitätsmedizin Rostock einschließen, deren Vollblutproben in einem externen Labor mittels SNP-Chip-Technologie unter Anwendung des Axiom™ Precision Medicine Diversity (PMD) Arrays analysiert wurden. Daraufhin wurden die Daten einer umfassenden bioinformatischen und statistischen Auswertung unterzogen, zu der auch eine Pathway Enrichment Analyse gehörte. Es konnte erfolgreich die genomweite Signifikanz des *TCF4*-Lokus bestätigt werden, wobei 84% der FECD-Fälle mindestens ein Risikoallel des Leit-SNPs rs613872 aufwiesen. Weiterhin konnte eine Reihe neuer signifikanter Varianten in unterschiedlichen Genen identifiziert werden. Einige zuvor identifizierte Loci wurden vom Array zwar erfasst, erreichten in dieser Studie jedoch keine genomweite Signifikanz. Andere bekannte Loci waren im PMD-Array nicht abgebildet. Unter den hier detektierten signifikanten Varianten befanden sich zahlreiche SNPs in langen nicht kodierenden RNAs (lncRNAs) sowie in interessanten Protein-kodierenden Genen, wie beispielsweise dem *SEMA6A*-Gen. Letzteres ist an apoptotischen Signalwegen und der Umgestaltung des Zytoskeletts beteiligt und macht es somit zu einem interessanten

Kandidatengen für weitere Untersuchungen. Die funktionelle Relevanz von lncRNAs, welche in den letzten Jahrzehnten im Kontext von physiologischer Gewebe-Entwicklung und diversen Erkrankungen zunehmend Beachtung erlangten, sollte zukünftig auch im Zusammenhang mit der Pathogenese der FECD in weiteren Studien näher beleuchtet werden, da sie mutmaßlich die Expression entscheidender krankheitsfördernder Gene beeinflussen. Unsere Ergebnisse liefern faszinierende neue Ansatzpunkte für beispielsweise Studien zu Expressionsleveln der signifikanten Protein-kodierenden Gene in kornealen Endothelzellen. Die Ergebnisse tragen weiterhin potenziell zur zukünftigen Entwicklung neuer Therapeutika im Rahmen von Gentherapien sowie zur Erstellung von individuellen Risikoprofilen der Patienten bei.

III. EINLEITUNG

3.1 KORNEA UND KORNEALES ENDOTHEL

Die menschliche Kornea (Hornhaut) als Teil der Tunica fibrosa bulbi (äußere Augenhaut), welche weiterhin aus Sklera (Lederhaut) und Konjunktiva (Bindehaut) besteht und den Augapfel nach außen hin begrenzt, bildet das transparente Fenster des Auges. Sie hat im Grundriss eine leicht ovale Form und ist wie ein Uhrglas mit höherer Wölbung in die Sklera eingelassen.

Der vertikale Durchmesser beträgt ca. 11,5 mm, der horizontale ca. 12 mm, die Dicke misst durchschnittlich ca. 540 µm, wobei sie nach peripher, hin zum Limbus, zunimmt.

Neben ihrer Funktion als am stärksten brechendes Medium im optischen Apparat Auge, hat sie eine Schutzfunktion zur Keimabwehr.

Aufgrund fehlender Vaskularisierung erfolgt die Ernährung der Hornhaut über Diffusion einerseits aus den konjunktivalen Blutgefäßen am Limbus, andererseits von anterior aus dem benetzenden Tränenfilm und von posterior aus dem umspülenden Kammerwasser (7,8).

Die Hornhaut ist eines der am dichtesten innervierten Gewebe des menschlichen Körpers. Ihre sensiblen Nervenendigungen entstammen dem ersten Ast des N. trigeminus (N. ophthalmicus) und verlaufen im N. nasociliaris durch die mediale Orbita sowie nachfolgend in den Nn. ciliares longi weiter zur Hornhaut. Dort teilen sie sich, vom Limbus ausstrahlend, als subbasaler Nervenplexus zwischen Basallamina und Bowman-Membran, parallel zur Hornhaut-Oberfläche in ein dichtes Nervengeflecht auf (9).

Die Hornhaut besteht histologisch betrachtet aus fünf Schichten. Außen liegt das **Epithel** als mehrschichtig unverhorntes Plattenepithel einer Basalmembran auf. Es ist aus ca. fünf bis sechs Schichten aufgebaut, die innen eher säulenförmig und nach außen hin flach sind und deren Zellen über „Desmosomen (zur Basallamina Hemidesmosomen), Adhärenz-Kontakte und Gap junctions verbunden“ sind (8). Die Oberflächenzellen vergrößern durch Mikrovilli und -plicae ihre Oberfläche und ermöglichen so ein Anhaften der Muzine des Tränenfilms. Tight Junctions fördern hier eine Diffusionsbarriere und dienen damit der Schutzfunktion des Epithels gegen das Eindringen von Krankheitserregern in die Hornhaut und das Auge. Das Epithel wird, ausgehend von den Basalzellen, innerhalb von sieben Tagen regeneriert, wofür die auf die Kornea migrierenden limbalen Stammzellen unerlässlich sind. Die abgestorbenen Oberflächenzellen werden in den Tränenfilm abgegeben.

Die unter dem Epithel liegende **Bowman-Membran** (Lamina fibroreticularis der epithelialen Basalmembran) ist eine aus Kollagenfibrillen bestehende zellfreie Schicht, die häufig dem Stroma zugeordnet wird.

Das **Stroma** selbst stellt 90 % der Hornhaut-Dicke und ist nicht regenerationsfähig. Seine Keratozyten (Fibroblasten) bilden und regulieren eine streng geordnete Extrazellulärmatrix, die aus abwechselnd ausgerichteten Lamellen dichter, parallel liegender Kollagenfibrillen, Proteoglykanen und dem von ihnen gebundenen Wasser besteht.

Während im Stroma der Kollagentyp I überwiegt, besteht die daran angrenzende und vom Endothel gebildete **Descemet-Membran** vorwiegend aus Kollagen VIII. Sie fungiert als Basalmembran des Endothels, ist zellfrei und relativ derb. (7,8). Mit einer Dicke von ca. 3 µm zum Zeitpunkt der Geburt und ca. 12 µm um das 60. Lebensjahr erfährt die Descemet-Membran ein ausgeprägtes Dickenwachstum (10), wobei man später zwei Zonen unterscheiden kann: Die vordere gestreifte Zone („anterior striated layer“) wird pränatal gebildet und enthält eine zunehmende Anzahl von Schichten (eine in der zwölften Gestationswoche, 30-40 um den Geburtszeitpunkt) aus Kollagenfilamenten IV und VIII (11,12); und die hintere homogene Zone („posterior nonstriated layer“), die postnatal gebildet wird und eher arm an Kollagen VIII ist, was eventuell auf die um den Geburtszeitpunkt herum nachlassende Proliferation der Endothelzellen zurückgeht (12). Weitere Komponenten umfassen Fibronektine, Laminin und Proteoglykane wie z.B. Heparansulfat und Keratansulfat (13,14).

Mit zunehmendem Alter bzw. bei bestimmten Erkrankungen wie z.B. der Fuchs'schen Endotheldystrophie kann es zur DM-Verdickung sowie im Bereich sogenannter Guttae zur Bildung von unregelmäßigen Lakunen mit Einschlüssen von „gestreifter“ Extrazellulärmatrix kommen, die eventuell auf den Verlust des postnatalen Differenzierungsstadiums der Endothelzellen zurückgeht (11,15).

Das **Endothel** haftet an der Descemet-Membran und bildet in Form einer einzigen Zelllage die Rückfläche der Hornhaut. Korneale Endothelzellen (CECs) entstammen der Neuralleiste und sind in der G1-Phase des Zellzyklus verblieben (13). Die polygonalen (6-eckigen), gleichmäßig angeordneten Zellen sind durch inkomplette Zonulae occludentes (undichte Tight Junctions) miteinander verknüpft und fungieren somit als schwache Diffusionsbarriere zwischen Stroma und Kammerwasser, welches die Nährstoffversorgung des Stromas gewährleistet (16). Eine weitere wesentliche Aufgabe der CECs ist das aktive Pumpen von Ionen aus dem Stroma bzw. der Extrazellulärmatrix in das Kammerwasser. Damit wird ein osmotischer Gradient erzeugt, dem Wasser folgt, und somit ein bestimmter Grad der

Entquellung aufrecht erhalten. Dieser ist für die Transparenz der Hornhaut von entscheidender Bedeutung und bei Unterschreiten einer kritischen Zellzahl (ca. 500 Zellen/mm²) nicht mehr zu gewährleisten, sodass es zum Hornhautödem mit Eintrübung des optischen Mediums kommt (7,8).

Während um den Geburtszeitpunkt herum eine Dichte von ca. 6.000 Endothelzellen/mm² vorhanden ist, nimmt diese innerhalb der ersten Lebensjahre rapide (ca. 3.000 Zellen/mm² im jungen Erwachsenenalter) und nach dem 20. Lebensjahr langsamer, aber kontinuierlich ab (schätzungsweise um 0,51 % pro Jahr). Dabei spielt bereits pränatal bis zum 2. Lebensjahr vor allem das Größenwachstum der Kornea mit relativer Abnahme der Endothelzell-Zahl, sowie eine geringe Mitoserate, danach auch die absolute Abnahme durch Zelluntergang eine Rolle. (11,17–20)

Die verbleibenden Endothelzellen sind durch kompensatorische Hypertrophie weiterhin in der Lage, die oben genannten Aufgaben (Barriere, Pumpe) zu erfüllen. Es entsteht im Lauf des Lebens aus einem sehr homogenen Erscheinungsbild des Endothels ein eher pleomorphes, unregelmäßiges.

Die Endothelzelle selbst ist 5 µm hoch, ca. 20 µm breit, hat einen großen Nucleus, zahlreiche Zellorganellen und unregelmäßig viele Mikrovilli an der posterioren Oberfläche. Zur Vorderkammer hin bestehen zwischen den Zellen Gap Junctions, die die interzelluläre Lücke von 30 µm auf 3 µm reduzieren. Apikal hingegen befinden sich fokale Tight Junctions, die jedoch mangels Kontinuität keine dichte Diffusionsbarriere darstellen (18).

Um das Gleichgewicht zwischen osmotischem Druck (verursacht durch die Glykosaminoglykane der stromalen Extrazellulärmatrix) und Dehydrierung und damit die Transparenz der Hornhaut aufrecht zu erhalten, bedarf es eines energetisch aufwendigen Ionen-Pumpenmechanismus‘ („Pump-Leak-Mechanismus“ nach Maurice) (21).

Die Energie wird in einem aeroben Stoffwechsel mit ATP-Produktion in den zahlreichen Mitochondrien der Endothelzellen bereitgestellt, der benötigte Sauerstoff hierfür durch Diffusion aus dem Kammerwasser entnommen (18).

Voraussetzung für den Pumpenmechanismus ist das Vorhandensein von Bicarbonat (HCO₃⁻) und Chlorid (Cl⁻), eine primär aktive Na⁺/K⁺-ATPase sowie sekundäre membranständige Ionen-Transporter (u.a. solute carrier family 4 member 11 (*SCL4A11*), Natriumbicarbonat-Transporter-1, Na⁺/2HCO₃⁻-(*pNBCe1*), Na⁺/K⁺/2Cl⁻-Cotransporter (*NKCC1*), Cl⁻/HCO₃⁻-Austauscher (*AE2*), Natrium-Protonen-Austauscher-1, Na⁺/H⁺ (*NHE1*) und die Isoformen der Monocarboxylat-Transporter (*MCT*) 1,2 und 4) (1,21).

3.2 FUCHS ENDOTHELDYSTROPHIE

3.2.1 ALLGEMEINES

Als der österreichische Augenarzt Ernst Fuchs (1851-1930) im Jahr 1910 eine Fallserie mit 13 Patienten beschrieb, nannte er deren Erkrankung „dystrophia epithelialis“ – aufgrund der vesikulär aufgerauten Erscheinung des Hornhautepithels (22). In den Jahrzehnten darauf war es mit der Erfindung und Einführung der Spaltlampenmikroskopie in der Augenheilkunde möglich, das korneale Endothel genauer zu untersuchen, wobei mit der „dystrophia epithelialis“ bzw. dem Hornhautödem einhergehende Veränderungen zunächst 1920 durch Kraupa als kristall-ähnliche Erscheinungen und 1921 durch Alfred Vogt als Guttæ – „tropfenähnliche endotheliale Prominenzen“ erwähnt wurden (1,23). Erst 1924/25 stellten Graves und Friedenwalds fest, dass es sich bei den o.g. endothelialen Veränderungen und der „dystrophia epithelialis Fuchs“ um dieselbe Entität handelt sowie dass die Erkrankung bilateral und chronisch verläuft, mit zentralen endothelialen Guttæ beginnt und die epithelialen Vakuolen erst mit Fortschreiten der Erkrankung auftreten (24,25). Es erfolgte die Umbenennung der Erkrankung in Fuchs-Endotheldystrophie.

Die Prävalenz der Fuchs'schen Endotheldystrophie (FECD) stellt sich zahlreichen Studien zufolge geografisch sehr inhomogen dar, je nach Ethnie wurden Prävalenzen zwischen 3,7-11 % ermittelt. Für die USA liegt die Prävalenz beispielsweise bei 4 % (Ausnahme: Tangier Island 11 % (26)), für Japan bei 3,3-4,1 % und für Island bei 9,2 % (1). Eine kürzlich erschienene Meta-Analyse zeigte eine zusammengefasste Prävalenz von 7,33 % bzw. geschätzt 300 Millionen aktuelle FECD-Fälle bei Personen über dem 30. Lebensjahr (27). Zu Häufigkeiten in Deutschland existiert bisher keine aussagekräftige Studie, jedoch ist die FECD inzwischen die häufigste Indikation zur lamellaren Hornhaut-Transplantation (46 % im Jahr 2016) (6).

Es wird beobachtet, dass Frauen in einem Verhältnis von 1,5-4 : 1 deutlich häufiger betroffen sind als Männer und dass sich die Erkrankung in der weitaus häufigeren Late-onset-Form typischerweise nach dem 50. Lebensjahr manifestiert. Die Early-onset-Form macht nur einen Bruchteil der Fälle aus, beginnt bereits im Jugendalter und wird meistens zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr diagnostiziert (28).

Die beiden Formen unterscheiden sich nicht nur im Alter des Auftretens, sondern auch – bisherigen Erkenntnissen zufolge – in der Ätiologie. Hierauf wird in Kapitel 3.2.3 detaillierter eingegangen.

3.2.2 BEFUNDE, KLINIK UND THERAPIE

Im Anfangsstadium verläuft die Fuchs Endotheldystrophie oft asymptomatisch. Bei Progression der Erkrankung beginnen die ein- oder beidseitig möglichen Symptome häufig mit verschwommenem Sehen besonders in den Morgenstunden, welches sich im Tagesverlauf bessern kann. Hinzu kommen Halos um Lichtquellen, verstärktes Blendempfinden, später eine durchgehende Visusabnahme bis hin zu Schmerzen. Zu erklären sind die Symptome zunächst durch vermehrte Lichtstreuung im Rahmen der endothelialen Guttæ und nachfolgend der durch das Stromaödem hervorgerufenen Störung der Kollagenordnung. Nimmt das Ödem weiter zu, so kommt es zur Epiphora (Tränenträufeln) und Trübung der Hornhaut, welche dauerhaft (nicht nur morgens) die Sehkraft beeinträchtigt. Entsteht ein Epithelödem, so treten zumeist stechende Augenschmerzen auf, einreißende Bullæ können zur Ulzeration und Narbenbildung führen (1,29).

In der Spaltlampen-Biomikroskopie zeigen sich folgende Befunde:

Zunächst erscheinen zentrale Guttæ, d.h. tropfenartige, einer Betauung ähnliche Prominenzien bzw. Warzen der Descemet-Membran, die sich im Verlauf nach peripher ausbreiten und später den Eindruck gehämmerten Metalls erwecken. Pigmentierung, ebenso wie Konfluenz der Guttæ können vorkommen. Dies lässt sich besonders gut in Retroillumination bei erweiterter Pupille darstellen.

Das im Verlauf hinzukommende Hornhautödem präsentiert sich biomikroskopisch mit Flauigkeit und zunehmender Trübung und kann im Rahmen einer Pachymetrie (sonografisch oder durch Non-contact-Methoden, z.B. mit der auf dem Prinzip der Scheimpflug-Kamera basierenden Pentacam) quantifiziert, sowie im Verlauf beurteilt werden.

Die der Erkrankung zugrundeliegende Endotheldysfunktion lässt sich anhand der *in vivo* Endothelmikroskopie verdeutlichen. Diese vermag die Morphologie der Endothelzellen abzubilden und daraus Analyseparameter über z.B. die Zelldichte zu entnehmen. Morphologisch verändern sich die ursprünglich überwiegend hexagonal und in ihrer Fläche regelmäßigen Endothelzellen im Krankheitsverlauf hin zu ausgesprochener Unregelmäßigkeit in Form und Größe (Pleomorphismus und Polymegathismus genannt). Zusätzlich zur im normalen Alterungsprozess und durch unspezifische Umwelteinflüsse ohnehin abnehmenden absoluten Endothelzellzahl kommt es aufgrund des fehlenden Regenerationspotenzials des Endothels im Krankheitsverlauf der FECD zur dramatischen Abnahme der Endothelzellzahl mit konsekutiv deutlich verringerter Zelldichte (30).

Die Diagnose wird klinisch anhand des vorliegenden Spaltlampenbefundes gestellt und „basiert auf beidseitigen, zentralen Guttæ und fehlenden Zeichen einer Entzündung“ (31).

Eine Schweregradeinteilung kann einerseits anhand der modifizierten Einteilung nach Krachmer mit Hinblick auf Anzahl, Fläche und Konfluenz der Guttae, sowie Vorliegen eines Hornhautödems in Grad 1 bis 6 erfolgen; andererseits sollten „morphologische/anatomische Veränderungen der Hornhaut, Veränderungen der optischen Eigenschaften der Hornhaut und subjektive Beeinträchtigungen“ (31) mit einbezogen werden. Letztgenannte Faktoren sind wesentliche Voraussetzung zur Therapieentscheidung.

Die Therapie der Fuchs Endotheldystrophie bestand lange Zeit – neben konservativen Ansätzen aus z.B. hyperosmolaren Augentropfen und „Trockenföhnung“ zur Beschleunigung der Dehydrierung – operativ aus der perforierenden Keratoplastik mit Verpflanzung eines von einem menschlichen Verstorbenen gespendeten Hornhaut-Scheibchens, welches alle Schichten der Hornhaut enthält. Dieser Eingriff wurde häufig erst im späten Krankheitsstadium bei niedrigem Visus und schmerzhaften epithelialen Bullae vorgenommen, ist invasiv, zeitaufwendig und mit langen Rekonvaleszenzphasen, sowie häufig begrenzten Visusergebnissen verknüpft. Mit Erstbeschreibung der Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty (DMEK) durch Gerrit Melles 2006 begann eine Revolution der FECD-Therapie. Diese posteriore lamellare Keratoplastik erreichte aufgrund ihrer guten und vergleichsweise kurzen Visusrehabilitation sowie der Minimal-Invasivität in den vergangenen Jahren die Rangspitze der durchgeführten Keratoplastik-Techniken. Weiterhin kam es durch diese OP-Technik zu einer deutlichen Zunahme der absoluten Zahlen operierter Keratoplastiken (nach Einführung der DMEK in Deutschland 2009 nahezu eine Verdopplung der Anzahl an Hornhauttransplantationen), was auch auf den vorgezogenen Interventionszeitpunkt besonders bei Fuchs-Endotheldystrophie zurückgeht. Diese stellt bei Betrachtung der Keratoplastik-Zahlen den Großteil der Indikationen (46 % in Deutschland im Jahr 2016, 39 % weltweit im Jahr 2013) dar (6,32–36).

Weitere etablierte therapeutische Optionen bestehen operativ in der DS(A)EK (Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty) und der nicht-kurativen Bindehautlappen-Aufnähung bzw. Amnionmembran-Transplantation. Medikamentös kann neben den o.g. hyperosmolaren Lokaltherapeutika (meist fünfprozentige NaCl-Lösung) bei Epitheldefekten mit Antibiotikasalbe, Lubrikanzen und Zyklopletika behandelt werden (7).

3.2.3 ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE – STAND DER DINGE

Die Pathogenese der Fuchs Endotheldystrophie ist Forschungsthema zahlreicher Studien und bisherigen Erkenntnissen zufolge ein komplexer multifaktorieller Prozess mit genetischen Prädispositionen, sowie befördernden biologischen und Umwelteinflüssen.

Etablierte Risikofaktoren sind Alter und weibliches Geschlecht sowie eine positive Familienanamnese. Der Einfluss von UV-Licht und Rauchen, sowie hormonellen Faktoren (z.B. Östrogen-Metabolismus) wurde in mehreren Studien untersucht.

Oxidativer Stress mit einer daraufhin gestörten Reaktion der Endothelzellen ist wesentlicher Bestandteil der Pathogenese. Hierbei kommt es zur Akkumulation geschädigter DNA und Zelluntergang. Durch ihre hohe metabolische Aktivität und dementsprechend hohen Sauerstoffverbrauch im Rahmen ihrer Pumpfunktion sind die Endothelzellen besonders anfällig für oxidativen Stress, der aufgrund einer Imbalance zwischen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Antioxidantien entstehen kann (37). Sofern die Balance durch angepasste Transkription entsprechender Gene (für Enzyme, z.B. Peroxidasen und Antioxidantien) nicht wiederhergestellt werden kann, ist die Schädigung nukleärer und mitochondrialer DNA unvermeidlich. Jurkunas et al. konnten diesbezüglich beispielsweise eine Herabregulierung der Peroxidasen Prx-2, -3 und -5 in FECD-Proben nachweisen (38). Des Weiteren konnte eine Defizienz in der *Nrf2-DJ-1*-regulierten Transkription von Antioxidantien-Response-Elementen bei FECD aufgedeckt werden. Zu weiteren Details hierzu sei auf die Veröffentlichungen von Bitar et al. und Liu et al. verwiesen (39,40). Besonders die mitochondrialen DNA-Schäden durch oxidativen Stress scheinen an der vorzeitigen Degeneration der CECs bei FECD beteiligt und für diese spezifisch zu sein (37). Es konnten bei FECD-Patienten in verschiedenen Komplexen der mitochondrialen Elektronentransport-Kette reduzierte Aktivitätslevel aufgezeigt werden (41-43). Dabei entwickelt sich ein Teufelskreis: Je dysfunktionaler die mitochondriale Atmungskette, desto mehr ROS entstehen und mit ihnen fällt wiederum mehr oxidativer Stress an. An dieser Stelle sei der Risikofaktor „Rauchen“ mit Steigerung freier Radikale und Absenkung von Antioxidantien auch in Geweben des Auges erwähnt (44). Ebenso hat sich die lebenslange UV-Licht-Exposition der Kornea mit ROS-förderndem UV-A und DNA-schädigendem UV-B als krankheitsfördernd herausgestellt (45).

Weiterhin spielt die Aktivierung einer sogenannten Endothel-zu-Mesenchym-Transition (EMT) als pathologische Stressreaktion eine Rolle. Sie ist gekennzeichnet durch den Verlust von interzellulären Kontakten und Zellpolarität sowie zunehmend Fibroblasten-artigen Eigenschaften der CECs mit exzessiver Produktion von kollagenreicher Extrazellulärmatrix (EZM) (46,47). Letztere wird durch TGF β -Signalwege induziert und führt zur Überladung des Endoplasmatischen Retikulums mit EZM-Proteinen. Diese lösen daraufhin als ungefaltete Proteine die sogenannte Unfolded Protein Response (UPR) aus, welche Caspasen-vermittelt in Apoptose endet (48,49). Ob jedoch die gesteigerte EZM-Deposition in Form von Guttæ die Endothelzellen degenerieren lässt oder ob sie Folge einer Zellschädigung ist, bleibt bisher nicht vollständig geklärt (1). Etabliert ist jedoch, dass die Kollagenablagerungen (Guttæ) im

Verlauf der Erkrankung an Zahl zunehmen, schließlich konfluieren und zu einer substanziellen Verdickung der Descemet-Membran führen. Dies wiederum führt zu weiterem zellulärem Stress auf die Endothelzellen, zu deren Apoptose und damit einhergehender Störung der Barrierefunktion des Endothels sowie Veränderungen in der kornealen Biomechanik und zentralen Korneadicke (50,51). Ong Tone et al. beschreiben dies als Teufelskreis (1).

Den genannten dysfunktionalen Reaktionen der Endothelzellen liegen jedoch bisher noch unzureichend geklärte genetische Prädispositionen zugrunde. Schon in den 1950er Jahren wurde von der Erbllichkeit der Erkrankung berichtet, in den 70ern nach verschiedenen Untersuchungen von betroffenen Familien der „autosomal dominante Erbgang mit einem hohen Grad an Penetranz und variabler Expressivität mit generell verstärkter Ausprägung bei Frauen“ postuliert (52,53). Sporadische Fälle existieren jedoch ebenso.

Die Komplexität der genetischen Determinanten hat sich ab den frühen 2000er Jahren zunehmend verdeutlicht. Erste Linkage-Analysen konnten eine Verbindung zwischen der raren Early-onset-Form der FECD und seltenen Punktmutationen im *COL8A2*-Gen auf Chromosom 1 darlegen, weitere führten zur Entdeckung von Varianten in *LOXHD1*, *AGBL1* und *ZEB1(TCF8)* bei der Late-onset-Erkrankung (54–58).

Die Durchführung von GWAS ergab ab dem Jahr 2010 Entdeckungen in *TCF4*, *KANK4*, *LAMC1* und *ATP1B1*, sowie kürzlich in *SSBP3*, *THSD7A*, *LAMB1*, *CD151/PIDD1*, *RORA*, *HS3ST3B1*, *LAMA5* und *COL18A1* (3–5).

Viele dieser überwiegend sehr wenig verbreiteten Genloci wurden hernach Gegenstand von Kandidatengen- und Finemapping-Studien. Die Sanger-Sequenzierung konnte einzelne Varianten in Replikationsstudien genotypisieren bzw. neue Varianten identifizieren, wird jedoch zunehmend von der Hochdurchsatz-Technologie und Kosteneffektivität des Next-Generation-Sequencing ersetzt.

Während sich Assoziationen zu einigen Loci in anderen Kohorten nicht replizieren ließen bzw. die Varianten lediglich einen sehr geringen Anteil der der Erkrankung zugrundeliegenden Mutationslast ausmachten, kristallisierte sich *TCF4* in den vergangenen Jahren zunehmend als ein Schlüsselgen heraus.

Aus diesem Grund sei *TCF4* hier ein eigener Absatz gewidmet, während die anderen bis dato mit FECD assoziierten Loci und Varianten in gekürzter tabellarischer Form mit Verweisen zu entsprechenden Publikationen in Tabelle 1 aufgeführt werden.

TCF4

Das *TCF4*-Gen kodiert den Transkriptionsfaktor 4, welcher meist als E2-2 („Ephrussi 2-2“), aber auch als ITF2 („Immunglobulin Transkriptionsfaktor 2“) oder SEF2 („SL3-3 Enhancer Faktor 2“) bekannt ist. Es ist lokalisiert auf dem kurzen Arm des Chromosom 18 (Region

18q21.2). Das zugehörige Protein selbst gehört zur Familie der basic helix-loop-helix Transkriptionsfaktoren, welche in Form von Hetero- oder Homodimeren als Regulatoren in Zellwachstum und -differenzierung involviert sind (59). *TCF4* beteiligt sich über Genregulierung (Bindung an Enhancer-Box-Sequenzen von Promotern und Enhancern bestimmter Gene) am TGF β -Signalweg („transforming growth factor beta“) sowie am NF κ B-Signalweg („nuclear factor kappa B“) an mesenchymaler Transition und Apoptose, welche zum Endothelzellverlust bei Fuchs'scher Endotheldystrophie beiträgt. E2-2 kann die Expression des Zell-Adhäsionsproteins E-Cadherin unterdrücken, sodass es zum Verlust von Zellpolarität und Zell-Zell-Kontakten kommt (60,61).

In der ersten GWAS zu FECD durch Baratz et al. (3) an einer amerikanischen, europäisch-stämmigen Population stellten sich vier SNPs innerhalb des dritten Introns von *TCF4* mit genomweit signifikanter Assoziation zu FECD heraus. Der SNP mit höchster Signifikanz (rs613872) erhöhte bei Homozygotie das Risiko für FECD um das 30-fache und ließ sich in nachfolgenden Studien multipel bestätigen. Zwei weitere, bezogen auf die Studienpopulation deutlich umfangreichere, GWAS' durch Afshari et al. und Gorman et al. (4,5) identifizierten anhand von Meta-Analysen ebenfalls führende SNPs im nicht-codierenden Teil des *TCF4*-Locus (rs784257 und rs11659764) mit ausgeprägter Signifikanz und deutlich erhöhter Odds Ratio. Bei Afshari et al. ließen sich 21,9 % der Alteration in der Studienpopulation auf rs784257 zurückführen. Alle genannten SNPs stehen in engem Kopplungsgleichgewicht (Linkage Disequilibrium) zueinander.

Neben der herausragenden Assoziation der SNPs im dritten Intron spielen in der Entstehung der Erkrankung nach derzeitigem Wissensstand außerdem CTG-Trinukleotid-Expansionen (Cytosin-Thymin-Guanin, CTG 18.1) eine entscheidende Rolle. 2012 berichteten Wieben et al. (2) erstmals von einer signifikanten Assoziation zu FECD, indem bei 79% der Fälle eine Trinukleotid-Repeat-Expansionslänge von >50 nachweisbar war (3% in der Kontrollgruppe). Auch diese Assoziation ließ sich unabhängig reproduzieren (62), wobei bezüglich der Pathogenität vergleichbar mit anderen neurodegenerativen Trinukleotid-Expansions-Erkrankungen wie bspw. Chorea Huntington von einer RNA-Toxizität ausgegangen wird (63). Es zeigten sich jedoch große ethnische Unterschiede im Auftreten der Trinukleotid-Expansionen: Ein deutlich höherer Anteil von FECD-Patienten europäischer Herkunft wies die CTG-Repeat Expansions auf als diejenigen Patienten asiatischer und afro-amerikanischer Herkunft (64–66). Weiterhin ergaben sich Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Länge der Expansionen und Schweregrad der Erkrankung, jedoch bestand kein Zusammenhang zum Zeitpunkt der Krankheitsmanifestation (67).

Foja et al. konstatieren ein reduziertes Expressionslevel von *TCF4* in kornealen Endothelzellen von FECD-Patienten mit möglicherweise bestehender Funktionseinbuße, wohingegen sich

dies in anderen Studien nicht bestätigte bzw. sich sogar ein erhöhtes Expressionslevel in von FECD betroffenen Endothelzellen identifizieren ließ (68,69).

In Zusammenschau lässt sich *TCF4* bisher eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der Fuchs Endotheldystrophie zuschreiben, die konkrete Rolle der für das Protein nicht codierenden Variationen bleibt jedoch ungeklärt. Einen Erklärungsansatz zur TNR-Expansion bietet die Veröffentlichung von Fautsch et al. (70).

TABELLE 1 – Mit FECD ASSOZIIERTE LOCI AUS BISHERIGEN PUBLIKATIONEN

Gen (Chr-Nr)	Kodierendes Protein Hauptfunktion	Mutation/SNP	Publikation
COL8A2 (Chr 1)	-Kollagen 8 Untereinheit $\alpha 2$ -Hauptbestandteil der ABL d. DM	Q455K R155Q L450W und 10 weitere	(54,71) (54,71–74) (55,71) (54,71,73–76)
AGBL1 (Chr 15)	-ATP/GTP binding protein like 1 -zytosol. Glutamat-Decarboxylase, in CEC exprimiert, Interaktion mit TCF4 möglich -Assoziation mit FECD fragwürdig (77)	R1028X R748H Arg1028* C990S	(78) (78) (56) (56)
TCF4 (Chr 18)	-Transkriptionsfaktor 4 -Funktion s.o.	CTG-Repeat im 3. Intron rs784257 rs613872 rs11659764 und 12 weitere	(2,79) (4) (3,72,74,75,79,80) (3,5) (3,74,80–83)
ZEB1 (Chr 10)	- zinc finger E-Box binding homebox 1 -Transkriptionsrepressor von Interleukin 2, COL1A2 -induziert EMT -Repression von E-Cadherin Promoter	G840P S234S rs77516068 D64D und 23 weitere	(58,72) (72) (72) (71,72,84) (58,71,72,84,85)
LOXHD1 (Chr 18)	-lipoxygenase homology domain-containing protein 1 -involviert in die Ausrichtung von Proteinen zur Plasmamembran -besteht aus PLAT (polycystin/lipoxygenase/alpha-toxin)-Domänen	c.159T>G c.242G>A c.469C>T c.1570C>T und 16 weitere	(57) (57) (57) (57) (57,74,85)

KANK4 (Chr1)	-KN motif- and ankyrin repeat domain-containing protein 4 -involviert in Regulation der Actinfilament-Polymerisation	rs79742895	(4)
LAMC1 (Chr 1)	-laminin subunit gamma 1 -vermittelt Zellmigration, -verbindungen, -organisation als Teil der Extrazellulärmatrix von Basalmembranen	rs3768617 R490W rs2093985	(4,86) (87) (5)
LINC00970/ ATP1B1 (Chr 1)	-β-Untereinheit der Na ⁺ -K ⁺ -ATPase -involviert in den Flüssigkeitstransport	rs1200114 rs1200108	(4,88) (88)
CLU (Chr 8)	-Clusterin -involviert in Zell-EZM-Interaktionen, Chaperone	rs17466684	(83)
SLC4A11 (Chr 20)	- solute carrier family 4 member 11 -weit verbreiteter Ionentransporter in CECs -wichtig für den Pumpmechanismus	G834S T754M G709E E399K und 10 weitere	(89) (90) (90) (90,91) (89–91)
RAD51 (Chr 15)	-RAD51 Recombinase -involviert in homologe Rekombination und DNA-Reparatur bei Doppelstrangbrüchen	rs1801321 rs1801320	(92) (92)
FEN1 (Chr 11)	-Flap Endonuclease 1 -involviert in DNA-Replikation und -Reparatur	rs4246215	(93)
FAS (Chr 10)	-Fas Cell Surface Death Receptor -Regulation von Apoptose	rs1800682	(94)
LIG3 (Chr 17)	- DNA Ligase 3 -DNA-Reparatur	rs1052536 rs1003918	(95) (95)
COL18A1 (Chr 21)	-Collagen Type XVIII Alpha 1 Chain -Teil von EZM -Spaltprodukt bildet Endostatin (Anti-Angiogenese)	rs114065856	(5)
LAMA5 (Chr 20)	- Laminin Subunit Alpha 5 -im Laminin 10 Komponente von Basalmembranen	rs141208202	(5)
HS3ST3B1 (Chr 17)	-Heparan Sulfate-Glucosamine 3-Sulfotransferase 3B1 -Katalysator bei Heparansulfat-Bearbeitung	rs9303111	(5)
RORA (Chr 15)	- retinoic acid related orphan receptor A -kann Genexpression modulieren -in Photorezeptor-Entwicklung involviert u.v.m.	rs12439253	(5)
CD151/PID1 (Chr 11)	-CD151 molecule (raph blood group) -Zelladhäsion	rs1138714	(5)

	-P53-Induced Death Domain Protein 1 -evtl. In Zelltod-/Apoptose-Signalwege involviert		
LAMB1 (Chr 7)	-laminin subunit beta 1 -im Laminin 10 stabilisierende Komponente von Basalmembranen	rs150990106	(5)
THSD7A (Chr 7)	-thrombospondin type 1 domain containing 7A -in Interaktion mit $\alpha V\beta 3$ -Integrin und Paxillin Inhibition von endothelialer Zellmigration	rs74882680	(5)
SSBP3 (Chr 1)	-single stranded DNA binding protein 3 -ermöglicht Einzelstrang-DNA-Bindungsaktivität -involviert in Transkriptionsregulation von $\alpha 2$ -Kollagen I	rs11590557	(5)
NEIL1 (Chr 15)	-Nei endonuclease VIII-like 1 -DNA-Reparatur	g.46438521G>C	(96)
XRCC1 (Chr 19)	-X-ray repair cross complementing group 1 -DNA-Reparatur	c.1196A>G	(96)
DMPK (Chr 19)	-dystrophia myotonica protein kinase -essentiell für die Aufrechterhaltung der Skelettmuskelstruktur und -Funktion	CTG-Repeat innerhalb der 3' UTR (untranslated region)	(97,98)
PTPRG (Chr 3)	-protein tyrosine phosphatase receptor type G -Signalmolekül, das u.a. Zellwachstum und -Differenzierung reguliert	rs7640737 rs 10490775	(3) (3)
PITX2 (Chr 4)	-paired like homeodomain 2 -Transkriptionsfaktor für die Procollagen-Lysyl -Hydroxylase-Genexpression -beteiligt an der Embryogenese von okulären Strukturen	G137V	(99)
TGFBI (Chr 5)	-transforming growth factor, β -induced -Protein der EZM, das über Interaktion mit Proteinen der Descemet-Membran/Kollagenen Zell-Adhäsion vermittelt	TAAAT haplotype	(83)

3.2.4 GRUNDLAGEN GENETIK UND METHODIK

3.2.4.1 GRUNDLAGEN DER GENETIK

Die Gesamtheit der in einem Organismus befindlichen genetischen Information wird als Genom bezeichnet. Sie befindet sich im Menschen verteilt auf ein gonosomales und 22 autosomale Chromosomenpaare, welche sich im Zellkern befinden und aus kondensierter doppelsträngiger DNA (Desoxyribonukleinsäure) bestehen. Die DNA wiederum setzt sich im Normalzustand aus einer Doppelhelix aus ca. drei Mrd. Nukleotiden zusammen. Diese bilden in ihrer Abfolge als sogenannte Tripletts sowohl für Proteine kodierende als auch nicht-kodierende, oftmals regulatorische Sequenzen, die Gene. Korrelierende Abschnitte der homologen Chromosomen des Menschen beherbergen die gleichen Gene. Es kann jedoch innerhalb dieser Gene zu lokalen Varianten (Allelen), deren örtliche Position als genetischer Locus bezeichnet wird, kommen. Befindet sich auf beiden Chromosomen das identische Allel spricht man von Homozygotie, unterscheiden sie sich so liegt eine Heterozygotie vor. Allele können u.a. die Herkunft von Mutter oder Vater verraten oder auch krankheitsverursachend sein. Die individuelle Kombination von DNA-Sequenzen an einem Locus wird als Genotyp bezeichnet, wohingegen der Phänotyp die entsprechende Erscheinungsform darstellt.

Sofern ein einzelnes Basenpaar innerhalb der DNA variiert, spricht man von Single Nucleotid Polymorphism – kurz SNP – oder auch von Single Nucleotid Variant (SNV), wobei sich ein SNP nur auf Varianten mit einer Frequenz von >1 % des selteneren Allels innerhalb einer Population bezieht. Varianten machen Individuen aus, können Phänotyp-entscheidend sein und über ihre Position (z.B. Exon oder Intron, Promoterregion, regulatorische Elemente, intergenisch) und Art (z.B. missense/ nonsense) die funktionelle Auswirkung auf das zu kodierende Protein entscheiden. Ist eine Variante krankheitsauslösend, wird sie meist Mutation genannt (100,101)

3.2.4.2 GENOMWEITE ASSOZIATIONSSTUDIE (GWAS)

Die bereits beschriebenen selteneren Mutationen im Kontext der Fuchs Endotheldystrophie wurden vielfach im Rahmen von Kandidatengen- und Linkage-Studien untersucht. Seit Anfang der 2000er Jahre hat sich ein neuer genetischer Studienansatz etabliert – die genomweite Assoziationsstudie. Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) ermöglichen auf Grundlage der SNP-Chip-Hochdurchsatztechnologie die effiziente Bestimmung von über das vollständige Genom verteilten SNPs eines Individuums und den Vergleich der Allelfrequenz der Genvarianten zwischen Fall- und Kontrollgruppen. Die verwendeten SNP-Chips, die häufig nicht größer als 2 cm² sind, beherbergen große Mengen allelspezifischer Sonden, die mit der

DNA-Probe hybridisiert werden. Für jeden SNP werden zwei Sonden vorgehalten – je nachdem ob ein homozygoter oder heterozygoter Polymorphismus vorliegt, bindet die DNA allelselektiv an nur eine oder beide Sonden. Der Einsatz von Fluoreszenzmarkierungen macht ein Auslesen der Signale mit Hochleistungsscannern möglich.

Die SNP-Träger können mit hunderttausenden SNP-Sonden versehen sein, wobei es Chips mit zufälligen, über das Genom gleichmäßig verteilt ausgewählten SNPs gibt und solche, die funktionelle Aspekte und Linkage-Disequilibrium-Strukturen berücksichtigen (102). Dabei wird eine Balance zwischen ökonomischen und forschersischen Interessen angestrebt, sodass von den über vier Millionen validierten humanen SNPs nur ein Bruchteil innerhalb eines Chips getestet wird und ein für die jeweilige Population geeigneter Chip Verwendung finden sollte. Neben kommerziell erhältlichen Chips (z.B. dem in unserer GWAS verwendeten Axiom™ Precision Medicine Diversity Array) gibt es auch kundenspezifische, z.B. das MVP 1.0 Custom Axiom Array, das sowohl die Multi-Ethnizität der Kohorte des Million-Veteran-Programms als auch Krankheiten in deren besonderem Interesse berücksichtigt (103).

GWAS bieten sich an zur Untersuchung genetisch komplexer Phänotypen ohne bekannte Kandidatengene oder mit widersprüchlichen Kandidatengenen. Sie können einzelne Varianten entdecken, die erst in Kombination mit anderen Varianten im Rahmen polygener Vererbung ihre Auswirkung auf die Krankheitsentstehung zeigen. Dabei geht es in der Regel um die Identifikation verbreiteter Varianten (Minor Allele Frequency / MAF > 0,5 %).

Aufgrund der multiplen Tests sind genügend große Stichproben für eine ausreichende Teststärke vonnöten, ggf. können mehrere GWAS in einer Meta-Analyse ausgewertet werden (s. (5)). Die Ergebnisse einer GWAS können u.a. dazu verwendet werden, genetische Risikoprofile zu erstellen, um ggf. individuelle Risikovorhersagen zu treffen.

Die Assoziation signifikanter Varianten mit multiplen anderen Merkmalen und die Korrelation von kausalen und nicht-kausalen Varianten, die aufgrund von Kopplungsungleichgewichten physisch nah beieinander liegen, machen die Interpretation und biologische sowie kausale Schlussfolgerungen einer GWAS mitunter kompliziert (104).

3.2.4.3 SIGNALWEG-ANALYSE

Eine Möglichkeit zur Einordnung der Ergebnisse von Hochdurchsatztechnologien, die häufig lange Listen an scheinbar zusammenhanglosen Genen darstellen, bietet die sogenannte Signalweg-Analyse (Pathway Analysis, Functional Enrichment Analysis). Bei dieser Vorgehensweise werden mithilfe von Signalweg-Datenbanken Gruppierungen (Anreicherungen – Enrichment) der signifikanten Gene in biologischen Signalwegen gesucht oder in sogenannten Gen-Sets ihnen gemeinsame biologische Themen zugeordnet. Verbildlicht: Aus funktionellen Modulen („pathways“) werden über biologische Verbindungen

funktionelle Netzwerke geknüpft, in denen die Knotenpunkte „pathway components“ – Signalweg-Komponenten darstellen, die, je nach zellulärem Kontext, in verschiedenen Signalwegen involviert sein können (105,106).

Die Signalweg-Analyse wird durch die Verknüpfung vorhandenen biologischen Wissens aus Datenbanken mit statistischen Tests, mathematischen Analysen und algorithmischen Berechnungen erreicht (107). Aus den angereicherten Themen, Begriffen oder Signalwegen ist es u.a. möglich, neue Hypothesen und Forschungsansätze zu generieren.

Die Tatsache, dass die zahlreichen zur Verfügung stehenden Analyse-Programme vielfältige Ansätze nutzen, ihren Fokus auf verschiedene Kategorien (z.B. Metabolismus, Genregulierung oder Protein-Protein-Interaktionen) legen und darüber hinaus unterschiedlich oft aktualisiert werden, kann die Vergleichbarkeit der Resultate erschweren (s. García-Campos et al., 2015).

IV. ZIELE DER ARBEIT

Unter dem Aspekt unserer zunehmend alternden mitteleuropäischen Bevölkerung ist zukünftig mit einem Anstieg des Bedarfs an Hornhaut-Transplantaten im Rahmen der FECD-Therapie zu rechnen, dessen Deckung bereits jetzt begrenzt möglich ist. Hinzu kommen Risiken operativer Komplikationen, der Transplantat-Abstoßung und des Transplantat-Versagens sowie die Therapielast (108). Letztere ist gekennzeichnet durch mehrtägige konsequente Rückenlagerung des Patienten zum Andrücken des Descemet-Endotheltransplantats an das hintere Stroma mittels einer Luft- oder Gasblase sowie langfristige, täglich mehrfache Augentropfen-Applikationen. Dies stellt für einen nicht zu vernachlässigenden Teil der älteren FECD-Patienten eine Herausforderung dar, sodass es trotz der insgesamt sehr guten Therapieergebnisse nahelegt, auf die Entwicklung und Sondierung weiterer therapeutischer Optionen hinzuarbeiten. Hierzu gehören derzeit im experimentellen Rahmen neben Antioxidantien, Nrf2-Agonisten und TGF β -Inhibitoren auch gentherapeutische Ansätze mit CRISPR/Cas9, die anstreben, durch gezieltes Herausschneiden von Genomsequenzen mit anschließenden DNA-Reparaturmechanismen krankheitsfördernde Genfoci zu bearbeiten (109).

Hierfür ist die hinlängliche Kenntnis der FECD-spezifischen Genetik unabdingbar.

Die Möglichkeit zur Kenntnis eines genetischen Risikoprofils könnte für Patienten die Chance bieten, Endothel-störende Einflüsse gezielt zu minimieren. Weiterhin gewinnt das Wissen um die individuelle genetische Prädisposition bei Vorliegen erblicher Erkrankungen in der Familie zunehmend an Bedeutung.

Während bereits drei Veröffentlichungen über die Genotypisierung des TCF4-Locus von deutschen FECD-Patienten bestehen, wurde eine GWAS in dieser Population bisher nicht durchgeführt. Zur Behebung dieses Defizits zielte die Studie nicht nur darauf ab, zuvor identifizierte Loci zu verifizieren, sondern auch potenziell neue genetische Determinanten der FECD zu identifizieren. Letzteres wurde auch durch die Verwendung des Axiom™ Precision Medicine Diversity Arrays angestrebt, das eine breite Abdeckung klinisch relevanter genetischer Varianten bietet und nach jetzigem Stand in der Forschung zur FECD bisher keinen Einsatz fand.

V. MATERIAL UND METHODEN

5.1 MATERIAL

Handschuhe Firma Hartmann Peha-soft nitrile

Butterfly-Kanüle 21G Safety Multifly-Kanüle

EDTA-Röhrchen 2,6 ml Sarstedt Monovette

Desinfektionsmittel Firma Schülke Octeniderm

Stauschlauch

Tupfer, Pflaster

Handelsüblicher durchsichtiger Klebestreifen

Wasserfester dünner Filzstift

Gefrierschrank (-80°C)

Versandmaterial:

Trockeneis, verschleißbare Klarsichtfolien

Untersuchungsmaterial:

Haag Streit Spalllampe

Oculus Pentacam HR

Specular Microscope EM-4000 (Firma Tomey)

Material ATLAS-Biolab:

s. Axiom™ 2.0 Plus Assay 96-Array Format Automated Workflow User Guide (110)

5.2 STUDIENDESIGN

In der dieser Arbeit zugrundeliegenden genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) im Sinne einer Fall-Kontroll-Studie wurden über einen Zeitraum von 41 Monaten (zwischen März 2021 und August 2023) insgesamt 159 Probanden als Fallgruppe und 315 Patienten als Kontrollgruppe rekrutiert. Sie erfüllten die Einschlusskriterien des vollendeten 18. Lebensjahres und der Diagnose einer Fuchs'schen Endotheldystrophie, wobei auch Fälle eingeschlossen wurden, bei denen bereits eine therapeutische Operation i.S. einer Keratoplastik (DMEK oder DS(A)EK, bzw. perforierende Keratoplastik) erfolgte, deren Diagnose der FECD jedoch in der Historie bekannt war. Als Kontrollgruppe dienten Patienten ohne Fuchs-Endotheldystrophie, die ebenfalls in der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde

der Universitätsmedizin Rostock rekrutiert wurden. Patienten ohne Volljährigkeit, Patienten mit lebensbedrohlicher Systemerkrankung und schwerer Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes, sowie Patienten, bei denen aus systemischen oder psychiatrischen Gründen eine Blutentnahme nicht vertretbar gewesen wäre, wurden von der Studienteilnahme ausgeschlossen.

5.3 ETHIKSTATEMENT

Es wurde am 05.03.2021 bei der Ethikkommission der Universitätsmedizin Rostock ein positives Ethikvotum (Registriernummer A 2021-0048, einschließlich des Amendments vom 11.01.2023) eingeholt und die Durchführung der Studie als bedenkenlos eingestuft.

Die Richtlinien der Deklaration von Helsinki wurden zu jedem Zeitpunkt der Studie eingehalten und die teilnehmenden Patienten über Inhalt und Ablauf der Studie informiert. Nach Aufklärung des Teilnehmers/der Teilnehmerin über das Recht, jederzeit ohne Angabe von Gründen das Einverständnis für die Analyse seiner/ihrer Proben zurückzuziehen, wurde eine schriftliche Einwilligung eingeholt.

5.4 PATIENTENPOPULATION

Die Probanden mit der entsprechenden Diagnose wurden über drei verschiedene Wege gefunden: aus der klinikinternen Sprechstundensoftware (SAP) wurden regelmäßig zum wöchentlichen Hornhaut-Sprechtag die Termine der ambulanten Patienten mit FECD in einer „Terminliste“ erfasst; stationäre Patienten mit entsprechenden Einschlusskriterien wurden auf gleichem Wege rekrutiert und neu-vorstellige Patienten nach hausinterner Diagnosestellung/-bestätigung durch Rücksprache mit den jeweiligen ärztlichen Kollegen identifiziert. Die Diagnosen der vorbekannten Patienten waren in der hausinternen Patientenkartei hinterlegt (UAK Data bzw. FIDUS). Alle potenziell einzuschließenden Patienten wurden unverzüglich zu ihrem jeweiligen Termin/stationären Aufenthalt bezüglich der Bereitschaft zur Studienteilnahme befragt und ggf. inkludiert. Es wurden keine Einbestellungen lediglich zur Studienteilnahme vorgenommen. Dabei erfolgte keine weitere Schweregradeinteilung der Erkrankung (z.B. nach Krachmer), der FECD-bezogene Therapie-Status wurde zwar erfasst, spielte aber keine entscheidende Rolle hinsichtlich Inklusion/Exklusion.

Jedem Studienteilnehmer wurde zur Anonymisierung ein sechs-stelliger Code aus je drei Buchstaben und drei Zahlen zugeordnet, dessen Korrelat lediglich den Studienärzten bekannt war.

5.5 FALLZAHLSCHÄTZUNG

Um eine statistische Power von 80 % und ein Quotenverhältnis von 2,5 für Heterozygote zu erreichen, gingen wir davon aus, 140 Probanden pro Gruppe zu benötigen, einschließlich einer Standardrate von 5 %, s. auch Hong & Park (111). Dies entspricht auch in etwa der Einschlusszahl von Baratz et. al 2010 (3).

5.6 ABLAUF

Die Diagnose wurde fachärztlich, in typischer Weise klinisch an der Spaltlampe, durch Identifikation beidseitiger Hornhaut-Guttæ und nach Ausschluss anderer Ursachen gestellt bzw. bestätigt. Bei operierten Patienten mit vorbekannter FECD wurden das Transplantat und der Hornhautstatus befundet. Weiterhin erfolgte hinsichtlich der FECD eine Hornhautdickenmessung zur Beurteilung eines möglicherweise vorliegenden Hornhautödems an der Pentacam HR (Firma Oculus).

Je nach terminbezogener Fragestellung fanden weitere Untersuchungen zu den Grunduntersuchungen (Visus, Augeninnendruck, Vorder- und Hinterabschnittsbefund) statt. Es folgte nach Einholen des schriftlichen Einverständnisses zunächst die venöse Punktion mittels Butterfly-Kanüle zur Blutentnahme von ca. 2 ml Vollblut im EDTA-Röhrchen entsprechend üblicher Vorgehensweisen (Stauung, zweifache Haut-Desinfektion, Punktion, Füllung der Monovette, Entstauung, Entfernen der Kanüle, Kompression). Die Monovette wurde sodann mit dem dem Patienten entsprechenden Code wasserfest beschriftet, die Beschriftung mit handelsüblichem Klebestreifen isoliert und das Blut bei -80°C in einem verschlossenen Gefrierschrank bis zum nächsten Versand ins Labor gelagert.

Die Einverständniserklärungen zur Teilnahme an der Studie wurden in einem Ordner an einem sicheren Ort aufbewahrt, die gewünschten Untersuchungsparameter aus der Patientenvorstellung in einer entsprechenden Excel-Tabelle erfasst.

Diese umfassten: Alter zum Diagnose- bzw. OP-Zeitpunkt, sofern dies eruierbar war, Alter zum Datum des Studieneinschlusses, Geschlecht, Ethnie des Patienten/der Patientin und seiner/ihrer Eltern, Diagnosen betreffend die Augen und den Gesamtorganismus, Hornhautdicke, Transplantations- und Phakiestatus.

Sofern 95 Blutproben von Probanden vorhanden waren, wurde der Spezialversand an ATLAS-Biolabs GmbH, Berlin durchgeführt. Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit dem klinikeigenen Gewebelabor auf Trockeneis.

5.7 LABORANALYSE

Die DNA-Extraktion aus Vollblut wurde unter Nutzung des Axiom™ 2.0 Plus Reagent Kit 96F durchgeführt. Daraufhin erfolgte die Genotypisierung der Proben mit dem Axiom™ Precision Medicine Diversity Array, welches eine Gesamtzahl von 868.337 Markern umfasst (823.505 SNPs und 44.832 Indels), im GeneTitan™ MC Instrument. Die ausführliche Laborbeschreibung befindet sich im Axiom™ 2.0 Plus Assay 96-Array Format Automated Workflow

USER GUIDE for use with: Axiom™ Precision Medicine Diversity Research Array Plate, Axiom™ 2.0 Plus Reagent Kit 96F, Applied Biosystems™ NIMBUS™ Target Preparation Instrument, Catalog Numbers 951958 and 951960, Publication Number MAN0018331, Revision C.0..

Es folgt die stichpunktartige Zusammenfassung der Arbeitsschritte und Funktionsweise des Axiom™ 2.0 Plus Reagent Kit 96F und Axiom™ Precision Medicine Diversity Arrays:

1. PROBENVORBEREITUNG/DNA-EXTRAKTION:

- Grundvoraussetzungen der Blutprobe sind Doppelsträngigkeit der enthaltenen DNA, ein hoher Reinheitsgrad ohne z.B. DNA-Polymerase-Inhibitoren sowie nicht-denaturierte DNA
- Qualitätsevaluierung der genomischen DNA mit einprozentigem Agarose-Gel, ggf. zusätzliche Reinigung
- Quantifizierung und Verdünnung der genomischen DNA, dann Aufteilung der Proben und Kontrollen auf 96-Mikrotiter-Platten zum Zentrifugieren
- Anlegen eines GeneTitan™ Array Plate Registration-Ordnern
- Vorbereitung des Applied Biosystems™ NIMBUS™ Target Preparation Instruments/der multiplex PCR (Platten-Zentrifuge; 96-Mulden PCR-Platte, Pipetten etc. z.B. enthalten im Axiom™ 96 Consumables Kit for Applied Biosystems™ NIMBUS™ 2.0 und Reagenzien u.a. aus dem Axiom™ 2.0 Plus Reagent Kit 96F; Anordnung/Deck Setup der Pipettiergeräte, Probenplatten, Reagenzien, Laborgeschirre, Barcodescanner, Dichtungen und Abdeckungen und des Thermocyclers)
- Durchführen der multiplex PCR (mPCR) nach dem „Axiom 2.0 Plus mPCR thermal cycler protocol“
- gDNA-Amplifizierung und Inkubierung
- DNA-Fragmentierung und Präzipitierung
- Zentrifugieren und Trocknen der DNA-Pellets
- Resuspension mittels Axiom™ Resusp Buffer und Vorbereitung der Hybridisierung durch Hybridization Master Mix

-
- 2 Qualitätskontrollen der Proben (1. mittels Gel zur Verifizierung der Fragmentation und 2. eine Optical-Density-Quantifizierung jeder resuspendierten Probe mittels Spectrophotometer)
 - Vorbereitung der Hybridisierungs-Platten, Vorbereitung des GeneTitan™ MC Instrument, Denaturierung der Proben und Vorbereitung der GeneTitan™ Reagenzien-Platten (Ligations-, verschiedene Färbe-, Stabilisierungs-, Scan-Platten)

2. ARRAY-HYBRIDISIERUNG IM GENETITAN™ MC INSTRUMENT:

- vorher muss ein GeneTitan™ Array Plate Registration-Ordner mit der GeneChip™ Command Console™ (GCC) Software für die Zuordnung der Ergebnisse zu den einzelnen Proben hochgeladen werden
- Das Axiom™ 2.0 Plus Reagent Kit 96F ermöglicht im GeneTitan™ MC Instrument die Hybridisierung der vorbereiteten DNA-Proben mit einem speziellen Genotypisierungsarray, in diesem Fall dem „Axiom™ Precision Medicine Diversity Research Array“, das auf einem festen Trägermaterial angebracht ist.

3. MARKIERUNG DER DNA MITTELS LIGATION:

- Nach der Hybridisierung werden die DNA-Proben durch Markierungstechnologie sichtbar gemacht. Dies bedeutet, dass die genetischen Varianten an den Markern auf dem Array detektiert werden können.

4. WASCHEN UND FÄRBEN:

- Nach der Markierung erfolgt eine sorgfältige Reinigung, um ungebundene oder nicht spezifisch gebundene Materialien zu entfernen.

5. ARRAY-SCANNING:

- Das Array wird gescannt, um die resultierenden Signale der markierten DNA zu erfassen. Die Scandaten geben Aufschluss über die Genotypen der untersuchten genetischen Varianten für jeden Probanden.

Schritte 2. bis 5. erfolgten alle im GeneTitan™ MC Instrument, einem automatisierten Instrument der Firma Thermo Fisher Scientific, das eine große Anzahl von DNA-Proben im Hochdurchsatzformat in sogenannten Hyb-Wash-Scan-Durchläufen verarbeiten kann. Die Automatisierung des Prozesses trägt zur Reduzierung von experimentellen Variabilitäten bei, was zu zuverlässigen und reproduzierbaren Ergebnissen führt.

Die Scan-Daten wurden in Ordnern im Kundenportal von ATLAS-Biolabs zur weiteren Datenanalyse zur autorisierten Verfügung gestellt.

5.8 GEN-DATEN

Die Bestimmung von Chromosom, exakter Position, Referenz- sowie alternativer Allele erfolgte auf Grundlage der human GRCh38.p14 Referenzgenom-Version. Marker mit einer „Minor Allele Frequency“ (MAF) $< 0,05$, einer Call Rate $< 90\%$ und Marker, die den Hardy-Weinberg Exakt-Test nicht bestanden, wurden systematisch ausgeschlossen.

Weitergehend wurden nur Marker in die Analyse einbezogen, bei denen jede der drei Genotypgruppen (AA, AB, und BB) mindestens 5-mal in den Daten beobachtet wurde.

Letztendlich konnten 247.015 Marker für die anschließende Analyse weiterverwendet werden.

5.9 STATISTISCHE ANALYSE

Die bioinformatische Aufarbeitung der genetischen Daten erfolgte durch einen externen Bioinformatiker. Eine logistische Regressionsanalyse wurde unter Verwendung von PLINK v2.00a4 mit der `-glm`-Funktion durchgeführt. Geschlechtschromosomen wurden ebenfalls in die Analyse einbezogen, wobei X sowohl für Frauen als auch für Männer als diploid kodiert wurde (`--xchr-model 2`), unter Berücksichtigung der menschlichen pseudoautosomalen Regionen (`--split-par hg38`), und Y als haploid kodiert wurde. Die Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis/ PCA), geschätzt mit der sklearn v1.3.0-Bibliothek in Python, zeigte keine offensichtliche Populationsstratifizierung sowohl innerhalb als auch zwischen FECD-Fällen und Kontrollen. Geschlecht und Alter bei Diagnose oder Alter zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses wurden als Kovariablen im Modell berücksichtigt, da sie im Vergleich zu einem Nullmodell ohne Kovariablen ein verbessertes Akaike-Informationskriterium (AIC) zeigten. Das Hinzufügen der ersten Hauptkomponente (Principal Component/ PC) zum Modell zeigte keine Verbesserung im AIC und wurde daher nicht berücksichtigt. Signifikante Assoziationen mit FECD wurden für Marker identifiziert, deren p-Wert unterhalb der Schwelle von 5×10^{-8} lag (oder $-\log_{10}(\text{p-Wert}) = 7,3$ überschritt), unter Berücksichtigung der Korrektur für multiple Tests (Bonferroni, Holm, Sidak single-step (SIDAK_SS) und Sidak step-down (SIDAK_SD), False Discovery Rate (FDR_BH und FDR_BY)). Der insgesamt genomische Inflationsfaktor λ wurde auf 1,02 geschätzt. Aus diesem Grund wurden keine Anpassungen für genomische Kontrolle vorgenommen. Das Linkage Disequilibrium zwischen signifikanten Markern wurde als R^2 unter Verwendung von PLINK v1.7 geschätzt. Zusätzlich wurden statistische Unterschiede zwischen Genotypgruppen der signifikanten Marker mittels t-Test für unabhängige Stichproben in der scipy v1.10.1-Bibliothek in Python verglichen.

Gesondert wurde ein Abgleich mit in anderen Publikationen erwähnten SNPs angestellt, erstens ob diese von dem hier verwendeten Array erfasst wurden und zweitens inwiefern eine statistische Signifikanz bei diesen vorlag.

PATHWAY ENRICHMENT ANALYSE:

Die die signifikanten Marker einschließenden Gene wurden mithilfe des Variant Effect Predictor, Ensembl Release 110 annotiert. Dieses ist ein kostenloses, quelloffenes Software-Instrumentarium mit systematischem Ansatz zur automatischen Annotation und Priorisierung von Varianten (112).

Die Pathway Enrichment Analyse wurde für diese Gene unter Verwendung von g:Profiler ve110_eg57_p18_4b54a898 durchgeführt (113). G:Profiler arbeitet mit dem am weitesten verbreiteten Ansatz zur Überrepräsentationsanalyse (Over-Representation Analysis, ORA), der den hypergeometrischen Test verwendet, um die Signifikanz von funktionellen Begriffen in der Eingangs-Genliste zu messen. Hauptquelle der Informationen zu Genen, Kennzeichnungen und GO-Begriffen sowie Assoziationen ist die Ensembl Datenbank. Weitere Quellen von g:Profiler umfassen KEGG, Reactome, WikiPathways, TRANSFAC (regulatorische Motive der DNA), Human Protein Atlas, CORUM (Proteinkomplexe) und Human Phenotype Ontology (113).

GENETISCHER RISIKOSCORE:

Der genetische Risikoscore pro Individuum wurde berechnet, indem der Logarithmus des Quotenverhältnisses (Odds Ratio) jedes signifikanten Markers mit der jeweiligen Allelzählung für das Individuum multipliziert und diese Produkte über alle signifikanten Marker summiert wurden, ähnlich wie in Wray et al. 2018 (114).

5.10 VERGLEICH DER ERGEBNISSE MIT BESTEHENDER LITERATUR

Im Vorfeld der Studie erfolgte eine allgemeine PubMed-Recherche zu FECD-bezogener Genetik. Identifizierte SNPs und Gene wurden den entsprechenden Publikationen in einer Excel-Tabelle zugeordnet und in gekürzter Fassung der Einleitung beigelegt. Die Bezeichnung der SNPs erfolgte sowohl in Form der rsID (Reference Single Nucleotide Polymorphism Identifier) aus der dbSNP als auch in der HGVS (Human Genome Variation Society)-Nomenklatur, die die detaillierte Sequenzänderung beschreibt.

Alle in dieser GWAS detektierten signifikanten Gene und Varianten wurden auf bestehende Publikationen und Assoziationen zu Phänotypen hin untersucht. Dies erfolgte über NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Stand 01.02.2024), GWAS Catalog

(<https://www.ebi.ac.uk/gwas>; Stand 01.02.2024), GeneCards (<https://www.genecards.org>; Stand 01.02.2024) und Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>; Stand 29.03.2024). Ergaben sich in den genannten Datenbanken Informationen über die konkrete Funktion der Gene sowie Hinweise auf relevante Zusammenhänge mit der Fuchs'schen Endotheldystrophie, wurde in den entsprechenden Publikationen kontextbezogen recherchiert. Hierfür wurde die Suchfunktion unter Eingabe der entsprechenden Varianten, Gene, Funktionen und der Begriffe FECD bzw. „Fuchs“, Kornea und Endothel angewandt. Hornhaut-betreffende Assoziationen sowie - bei multiplen Assoziationen - diejenigen mit dem höchsten p-Wert wurden tabellarisch erfasst.

VI. ERGEBNISSE

6.1 STUDIENPOPULATION

In den 41 Monaten der Patientenrekrutierung für Fall- und Kontrollgruppe konnten insgesamt 474 Patienten der Studie zugeführt werden. 159 Patienten mit klinisch gesicherter Fuchs-Endotheldystrophie ließen sich der Fallgruppe und 315 Patienten aus parallel laufenden Studien zu Steroidresponse-Syndrom, postoperativem zystischem Makulaödem bzw. Makulaforamen der Kontrollgruppe zuordnen. Aus der Fallgruppe erfüllten zwei Blutproben nicht die qualitativen Anforderungen des Labors, sodass in der Fallgruppe letztendlich 157 Patienten der Analyse zugeführt werden konnten. Aus der Kontrollgruppe entfielen zwei Probanden aufgrund von im Nachhinein dokumentierter unklarer Hornhautbefunde und vier wegen versehentlich doppeltem Studieneinschluss. Mit einer endgültigen Einschlusszahl von 309 Kontroll-Subjekten war die Kontrollgruppe annähernd doppelt so groß wie die Fallgruppe. In beiden Gruppen zusammengekommen befanden sich 256 Frauen und 210 Männer.

Nahezu alle Probanden gaben eine mitteleuropäische, davon überwiegend deutsche Abstammung an. 13 Probanden enthielten sich der Angaben zur Abstammung, 11 führten diese als ost-europäisch/kasachisch an (s. Tabelle 2).

TABELLE 2 – ABSTAMMUNG DER PROBANDEN

Abstammung	Anzahl Fallgruppe	Anzahl Kontrollgruppe
Mitteleuropäisch (deutsch, österreichisch, schlesisch, polnisch)	155	287
Osteuropäisch (rumänisch, ukrainisch, moldawisch, russisch), Kasachisch	1	10
Keine Angabe	1	12

Unsere Fallgruppe reproduzierte gut die klinisch zu beobachtende Geschlechts- und Altersverteilung. 75% der Patienten der Studiengruppe waren 66 Jahre oder älter und umfasste sowohl operierte als auch nicht operierte FECD-Fälle.

Der Alters-Median zum Zeitpunkt der Studieneinschreibung lag bei 72 Jahren, rangierend zwischen 40 und 91 Jahren (Durchschnittsalter von 71,1 Jahren, SD 9,36), wobei der Frauenanteil bei 62% lag.

Die Kontrollgruppe zeigte sich etwas jünger mit einem Altersmedian von 68 Jahren, rangierend von 19 bis 89 Jahren (Durchschnittsalter von 66,9 Jahren, SD 12,02) und einer nahezu gleichmäßigen Geschlechtsverteilung (männlich 49%, weiblich 51%).

6.2 GWAS

Alle 466 Blutproben, die den Qualitätsansprüchen des Labors entsprachen, durchliefen auch erfolgreich die Genotypisierung und konnten anschließend statistisch analysiert werden.

Es ergaben sich in der statistischen Analyse 41 SNPs, die bei einem vorausgesetzten p-Wert von unter 5×10^{-8} (bzw. größer als $-\log_{10}(\text{p-Wert}) = 7.3$) eine signifikante Assoziation mit der Fuchs-Endotheldystrophie zeigten. Von diesen wiesen 14 eine Odds Ratio von >1 auf und erhöhten demnach das Risiko für die Erkrankung. Für die verbleibenden 27 SNPs ergab sich jeweils eine Odds Ratio von <1 und damit ein protektiver Effekt (s. Tabelle 3).

Die signifikantesten SNPs in unserer GWAS befanden sich vorwiegend innerhalb des Chromosom 18 (s. Abbildung 1a), insbesondere in der das etablierte TCF4-Gen (Transkriptionsfaktor 4) umfassenden Region. Die höchste Signifikanz dabei zeigte der in diesem Zusammenhang bekannte SNP rs613872 im dritten Intron des TCF4-Gens, der bei Vorliegen des G-Allels außerdem die höchste OR ergab und das Krankheitsrisiko um das 8,6-fache erhöhte. Insgesamt wiesen 84% der Fallgruppe diesbezüglich mindestens ein Risikoallel auf. Da sich zwischen Individuen mit heterozygotem TG- und homozygotem GG-Genotyp kein statistisch signifikanter Unterschied im Verhältnis ergab, gehen wir von einem dominanten Effekt des G-Allels aus (s. Abbildung 1b).

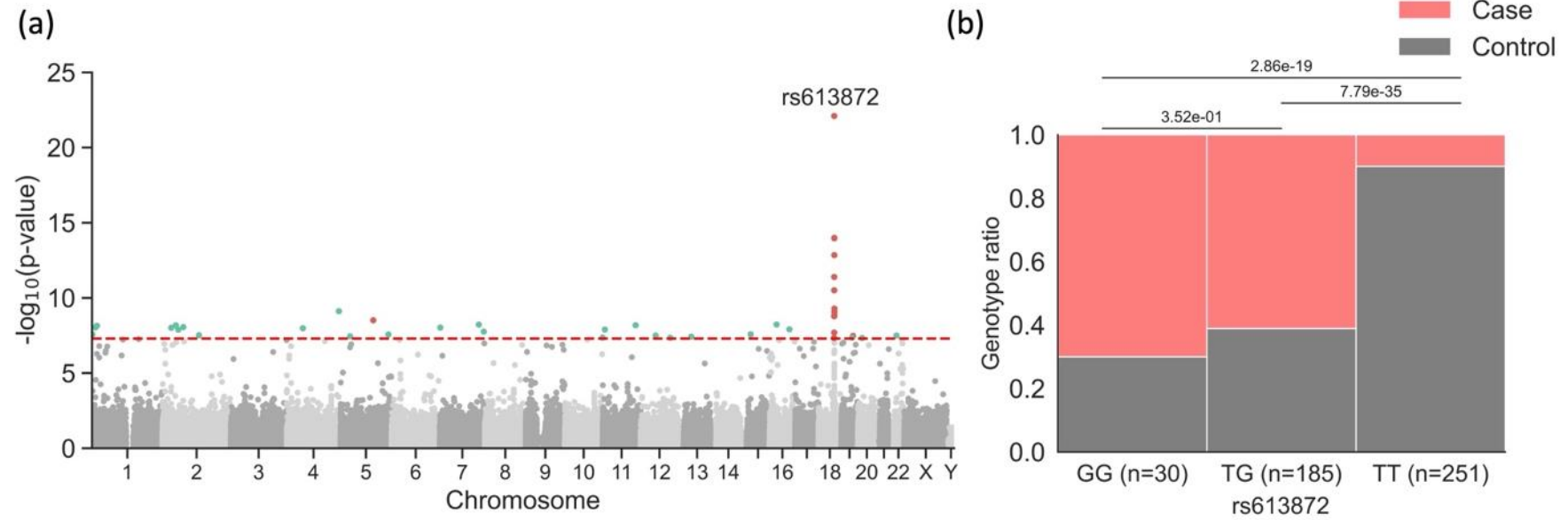


ABBILDUNG 1 – **ERGEBNISSE DER GWAS ZU FECD**

(A) MANHATTAN PLOT DER SIGNIFIKANTEN MARKER. DIE ROTE LINIE SYMBOLISIERT DIE SIGNIFIKANZSCHWELLE VON 7.3. ROTE PUNKTE REPRÄSENTIEREN EINE ODDS RATIO > 1 WÄHREND GRÜNE PUNKTE EINE ODDS RATIO < 1 ZEIGEN. (B) VERHÄLTNIS VON FÄLLEN ZU KONTROLLEN IN DEN UNTERSCHIEDLICHEN GENOTYP-GRUPPEN FÜR DEN SNP rs613872 (AUS FECHNER ET AL. 2025 (115))

TABELLE 3 – LISTE DER SIGNIFIKANT MIT FECD ASSOZIIERTEN MARKER.

CHR = CHROMOSOM, REF = REFERENZALLEL, ALT = ALTERNATIVES ALLEL, MA = MINOR ALLEL, MAF = MINOR ALLELE FREQUENCY, OR = ODDS RATIO, RSID = MARKER-IDENTIFIKATOR. ROT HERVORGEHOBEN SIND PROTEIN-KODIERENDE GENE (ERWEITERT AUS FECHNER ET AL. 2025 (115)).

Chr	Pos	Ref	Alt	MA	MAF	OR	P-Wert	rsID	Gen	Konsequenz	Genassoziationen
18	55,543,071	G	T	G	0.26	8.60	8.0x10 ⁻²³	rs613872	<i>TCF4</i>	intron_variant	FECD, Corneal resistance factor, corneal hysteresis, unipolar depression, Schizophrenie etc.
18	55,750,408	A	G	A	0.24	4.06	1.0x10 ⁻¹⁴	rs796743	<i>ENSG00000267284</i> , <i>LOC105372130</i>	intron_variant, intron_variant	- -
18	55,915,845	T	TCC	TCC	0.25	3.97	1.1x10 ⁻¹⁴	rs139805436	<i>LINC01416</i> , <i>ENSG00000267327</i>	intron_variant, intron_variant	Schizophrenie, Corneal resistance factor etc. -
19	41,638,282	G	A	A	0.11	3.61	3.3x10 ⁻⁰⁸	rs62117964	<i>DNAJC19P3</i> , <i>ENSG00000269354</i> , <i>LOC105372405</i>	downstream_gene_varia nt, downstream_gene_varia nt, downstream_gene_varia nt	- - -
18	55,919,359	G	A	A	0.26	3.59	1.4x10 ⁻¹³	rs35248721	<i>LINC01416</i> , <i>ENSG00000267327</i>	intron_variant, intron_variant	Schizophrenie, Corneal resistance factor etc. -
18	55,994,381	T	C	C	0.17	3.33	8.5x10 ⁻¹⁰	rs117550450	<i>ENSG00000267327</i> ,	upstream_gene_variant,	-

									<i>LINC01416,</i> <i>LOC107985164</i>	intron_variant, upstream_gene_variant	Schizophrenie, Corneal resistance factor etc. -
18	55,359,126	G	A	A	0.44	3.06	4.1x10 ⁻¹²	rs1631486	<i>TCF4</i>	intron_variant	FECD, Corneal resistance factor, corneal hysteresis, unipolar depression, Schizophrenie etc.
18	55,251,269	G	A	A	0.46	2.89	3.1x10 ⁻¹¹	rs1893431	<i>TCF4</i>	intron_variant, regulatory_region_variant	FECD, Corneal resistance factor, corneal hysteresis, unipolar depression, Schizophrenie etc.
5	116,504,511	C	T	C	0.27	2.75	3.1x10 ⁻⁰⁹	rs153643	<i>SEMA6A,</i> <i>ENSG00000248445</i>	intron_variant, intron_variant	Glycerophospholipid measurement, brain measurement etc. Amyloid-β- & Cytokin-measurement etc.
18	55,528,657	T	C	T	0.42	2.60	1.7x10 ⁻⁰⁹	rs4801158	<i>TCF4</i>	intron_variant	FECD, Corneal resistance factor, corneal hysteresis, unipolar depression, Schizophrenie etc.
18	56,029,905	T	C	C	0.36	2.60	5.2x10 ⁻¹⁰	rs764595	<i>LINC03069,</i> <i>ENSG00000287248,</i> <i>LINC01905,</i>	intron_variant, downstream_gene_variant, upstream_gene_variant,	Körpergröße, Corneal resistance factor, smoking initiation etc. - Corneal resistance factor, smoking initiation etc.

									LOC642484, LOC107985164	intron_variant, downstream_gene_variant	- -
18	55,893,939	G	A	G	0.37	2.53	1.4x10 ⁻⁰⁹	rs9962249	LINC01416, ENSG00000267327	intron_variant, intron_variant	Schizophrenie, Corneal resistance factor etc. -
18	55,419,224	C	T	T	0.31	2.41	2.0x10 ⁻⁰⁸	rs1440477	TCF4	intron_variant	FECD, Corneal resistance factor, corneal hysteresis, unipolar depression, Schizophrenie etc.
18	55,207,168	G	A	A	0.46	2.26	4.7x10 ⁻⁰⁸	rs8084537		regulatory_region_variant	-
2	56,297,258	G	A	A	0.27	0.34	1.3x10 ⁻⁰⁸	rs62167331	CCDC85A	intron_variant	BMI, Reaktionszeitmessung, Alter zur Menarche etc.
1	1,189,840	C	T	T	0.18	0.26	2.7x10 ⁻⁰⁸	rs12065129	TTLL10	downstream_gene_variant, regulatory_region_variant	Ovarial-Karzinom, Körpergröße, Offenwinkelglaukom etc.
16	24,576,889	C	A	A	0.20	0.26	5.9x10 ⁻⁰⁹	rs9933532	RBBP6	downstream_gene_variant, regulatory_region_variant	Körpergröße, BMI, Farbsehstörung
12	104,710,684	G	A	A	0.17	0.25	4.5x10 ⁻⁰⁸	rs61558853	CHST11	intron_variant, regulatory_region_variant	Carbohydrat-Sulfotransferase 11-Messung, Körpergröße etc.

5	170,328,134	C	T	T	0.15	0.21	2.7x10 ⁻⁰⁸		LINC01366	upstream_gene_variant	Farbsehstörung, COPD, Schizophrenie
4	184,858,106	C	T	T	0.18	0.21	7.7x10 ⁻¹⁰	rs73873106	MIR3945HG, ENSG00000289139	upstream_gene_variant, downstream_gene_variant	Blutplättchen-Volumen, Phosphatidylcholin-Messung etc. -
2	31,305,043	G	A	A	0.16	0.20	9.7x10 ⁻⁰⁹	rs11124257	LOC124907751	non_coding_transcript_exon_variant, regulatory_region_variant	-
11	117,204,850	C	T	T	0.16	0.20	6.6x10 ⁻⁰⁹	rs508487	TAGLN, PCSK7, ENSG00000280143, LOC100652768	downstream_gene_variant, 3_prime_UTR_variant, upstream_gene_variant, upstream_gene_variant	Triglycerid-/HDL-/Fettsäure-Messung etc. - -
11	8,227,467	G	C	C	0.15	0.20	1.3x10 ⁻⁰⁸	rs111887198	LMO1, LOC105376536	intron_variant, upstream_gene_variant, regulatory_region_variant	Körpergröße, Glutamin-& Alanin-Messung, Blutglucose etc. -
1	17,623,067	C	T	T	0.15	0.19	7.1x10 ⁻⁰⁹	rs55693639	ARHGEF10L	upstream_gene_variant	Körpergröße, AML, Neurotizismus-Messung etc.
19	38,385,834	C	T	T	0.13	0.19	4.4x10 ⁻⁰⁸	rs183192050	PSMD8, GGN, SPRED3, ENSG00000267090	downstream_gene_variant, synonymous_variant, upstream_gene_variant, intron_variant	HDL-Cholesterol-Messung - - -

7	155,811,405	A	G	A	0.15	0.18	1.7x10 ⁻⁰⁸	rs756884	<i>SHH</i>	intron_variant	Glomeruläre Filtrationsrate, Creatinin-Messung, Körpergröße etc.
7	138,361,050	G	A	A	0.15	0.18	6.0x10 ⁻⁰⁹	rs79872067		intergenic_variant	-
2	74,047,202	C	T	T	0.14	0.18	8.8x10 ⁻⁰⁹	rs61741171	<i>TET3</i>	missense_variant	Alkoholkonsum, Risikoverhalten, Eosinophile etc.
22	26,031,882	C	T	T	0.13	0.18	3.2x10 ⁻⁰⁸	rs5752257	<i>MYO18B</i>	downstream_gene_variant	EKG, AML, Vorhofflimmern etc.
11	203,788	C	T	T	0.13	0.17	4.4x10 ⁻⁰⁸	rs2280543	<i>ODF3,</i> <i>BET1L,</i> <i>RIC8A,</i> <i>ENSG00000254559</i>	downstream_gene_variant, 3_prime_UTR_variant, upstream_gene_variant, non_coding_transcript_exon_variant	- Hirnaneurysma, Plättchenzahl, Katarakt etc. Uterusmyom, Katarakt, Hämoglobin etc. - -
2	129,896,833	G	A	A	0.13	0.17	3.0x10 ⁻⁰⁸	rs10205980	<i>PLAC9P1</i>	intron_variant	Kardio-embolischer Schlaganfall, Proteinmessung etc.
12	53,079,461	TG	T	T	0.13	0.17	3.2x10 ⁻⁰⁸	rs28372672	<i>SPRYD3</i>	upstream_gene_variant, regulatory_region_variant	Körpergröße, Typ-I-Diabetes, Hüftumfang etc.
7	1,971,792	C	T	T	0.14	0.15	9.4x10 ⁻⁰⁹	rs117106123	<i>MAD1L1</i>	intron_variant	Rauchbeginn, Bildungsniveau, Schizophrenie etc.
5	34,769,268	C	T	T	0.12	0.15	3.5x10 ⁻⁰⁸	rs115801393	<i>RAI14</i>	intron_variant	Glomeruläre Filtrationsrate, Hämatokrit, COVID19 etc.

15	34,803,806	C	T	T	0.12	0.14	2.6x10 ⁻⁰⁸	rs56403318	ENSG00000250007, LOC107984776	intron_variant, upstream_gene_variant	Prostata-Karzinom, Suizidverhalten, etc. -
16	70,157,320	G	A	A	0.12	0.14	1.2x10 ⁻⁰⁸		PDPR, ENSG00000247228, LOC400541	3_prime_UTR_variant, downstream_gene_varia nt, intron_variant	Neuroimaging Measurement, Pulsdruck, Laktatmessung - -
2	47,938,517	C	T	T	0.13	0.12	6.7x10 ⁻⁰⁹	rs62139957	PPIAP62, ENSG00000230773, LOC105374591, LOC105374592	downstream_gene_varia nt, downstream_gene_varia nt, downstream_gene_varia nt, downstream_gene_varia nt	PR- & QT-Intervall, Alkoholkonsum, unipolare Depression etc. - - -
20	15,743,996	G	A	A	0.12	0.11	4.7x10 ⁻⁰⁸	rs62194112	MACROD2	intron_variant	Leucine-rich repeat transmembrane protein FLRT3 levels, BMI, Rauch-& Trinkverhalten etc.
1	12,203,460	C	A	A	0.12	0.10	9.2x10 ⁻⁰⁹	rs17884378	TNFRSF1B	intron_variant, regulatory_region_variant	Tumonekrose-Faktor-II-Messung, Eosinophilenzahl, Hypothyreodismus etc.

13	45,680,614	C	T	T	0.11	0.09	3.8x10 ⁻⁰⁸	rs113604798	LINC01055	non_coding_transcript_exon_variant, regulatory_region_variant	Messung des Darmmikrobioms, Bildungsniveau
4	57,405,854	C	A	A	0.12	0.08	1.0x10 ⁻⁰⁸	rs75611110		intergenic_variant	-

Innerhalb von jeweils 1 Mb (Megabasen) auf- und abwärts von rs613872 befanden sich ebenfalls einige signifikant assoziierte SNPs in Bereichen langer nicht-Protein-kodierender RNAs (lncRNA), wie beispielsweise *LINC01416*, *LINC03069* und *LOC105372130* (s. Tabelle 3). Deren Varianten ergaben in PLINK v1.7 moderate Kopplungsgleichgewichte (Linkage Disequilibrium, LD) mit R^2 zwischen 0,2 und 0,6 (s. Tabelle 4 und Abbildung 2). Die stärkste Verknüpfung wies dabei die Variante rs796743 auf ($R^2=0,56$). Eine einzelne Variante (rs8090270) mit moderater Kopplung erreichte keine genomweite Signifikanz.

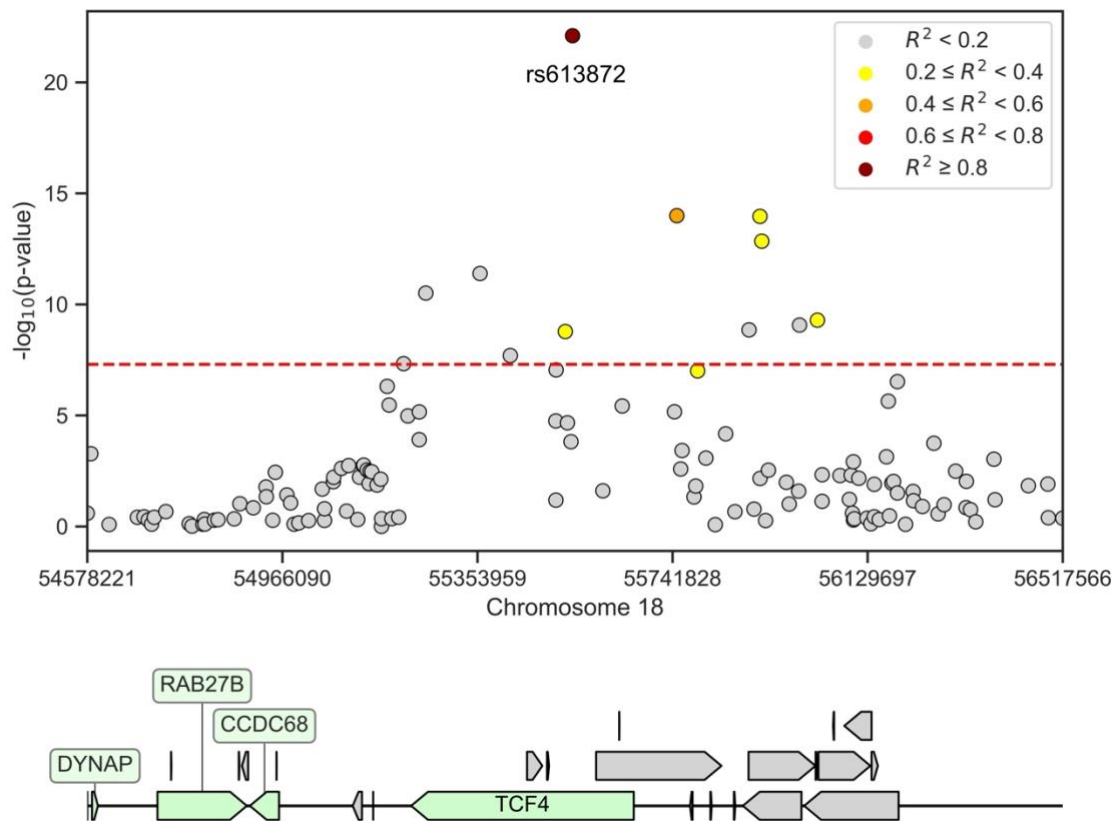


ABBILDUNG 2 – LINKAGE DISEQUILIBRIUM ZWISCHEN TOP MARKER RS613872 UND BENACHBARTEN MARKERN INNERHALB VON 1 MB AUF- UND ABWÄRTS.

DIE FARBEN REPRÄSENTIEREN DAS KOPPLUNGSNIVEAU (R^2), DAS SICH ZWISCHEN 0 UND 1 BEFINDET. GENE, DIE DIE REGION UMFASSEN SIND UNTEN ABGEBILDET - PROTEIN-KODIERENDE GENE IN GRÜN, LONG NON-CODING RNAs UND PSEUDO-GENE IN GRAU (EINSCHLIEßLICH *ENSG00000267311*, *ENSG00000267284*, *MAP1LC3P*, *LINC01416*, *ENSG00000287944*, *ENSG00000267112*, *RPSAP57*, *ENSG00000267327*, *ENSG00000267732*, *LINC01905*, *LINC01539*, *ENSG00000267399*, *ENSG00000287248*, *LINC03069*, *SNORA73*, *LINC01929*, *RNA5SP459*, *TCF4-AS1*, *MIR4529*, *TCF4-AS2*, *RPL21P126*, *LINC01415*, *ENSG00000267172* UND *DYNAPP3*)

(AUS FECHNER ET AL. 2025 (115)).

TABELLE 4 – LINKAGE DISEQUILIBRIUM ZWISCHEN TOP-MARKER rs613872 UND BENACHBARTEN VARIANTEN
ENTSPRECHEND ABB.2. R² IST DAS KOPPLUNGSNIVEAU.

rsID	R ²	p-Wert
rs4801158	0,27	1.7x10 ⁻⁰⁹
rs796743	0,56	1.0x10 ⁻¹⁴
rs8090270	0,23	9,9x10 ⁻⁸
rs139805436	0,3	1.1x10 ⁻¹⁴
rs35248721	0,26	1.4x10 ⁻¹³
rs764595	0,22	5.2x10 ⁻¹⁰

Weitere signifikante Marker mit einer Odds Ratio >1 befanden sich auf Chromosom 19 als Downstream-Variante des Pseudogens *DNAJC19P3* und einer ncRNA (OR = 3,61) und auf Chromosom 5 in einem Intron des *SEMA6A*-Gens bzw. seines Anti-Sense-Gens, einer lncRNA (OR = 2,75).

Die weiteren signifikanten SNPs, welche Tabelle 3 zu entnehmen sind, wiesen eine Odds Ratio unterhalb von 1 auf und deuten damit einen protektiven Effekt gegen die Erkrankung an FECD an. Sie befinden sich verteilt auf diversen Chromosomen (1, 2, 4, 5, 7, 11, 12, 13, 15, 16 und 22).

Nahezu alle als signifikant detektierten SNPs befinden sich in Gen-regulierenden Sequenzen, Introns oder intergenischen Loci sowie in Up- oder Downstream-Varianten, jedoch lediglich zwei in kodierenden Exons. Letztere wurden als benigne eingestuft.

Im Abgleich mit bereits in anderen Studien identifizierten SNPs stellte sich eine Übereinstimmung von acht Varianten heraus. Diese betrafen auf Chr.1 *LAMC1* (rs3768617) und *KANK4* (rs79742895), auf Chr. 10 *ACTA2/FAS* (rs1800682), auf Chr. 11 *TMEM258/FEN1* (rs174538) und *FEN1* (rs4246215), auf Chr. 18 *TCF4* (rs1452787, rs613872) und auf Chr. 21 *ZEB1* (rs2839654). Bezogen auf diese Übereinstimmungen ergab nur unser Leit-SNP rs613872 eine statistische Signifikanz.

6.3 PATHWAY ENRICHMENT ANALYSE

Gene, die signifikante Marker umfassen, waren zu vielfältigen Signalwegen angereichert, einschließlich GO-Elementen für T-Zell-Proliferation und Regulierung der Proliferation von T-

Zellen¹, Lymphozyten und mononukleären Zellen. Auch allgemeinere GO-Begriffe wie Entwicklungsprozess und Proteinbindung waren signifikant angereichert. Interessanterweise war der Signalweg aus dem Human Protein Atlas (HPA) (116) für Colon und periphere Nerven/Ganglion signifikant, zusammen mit einigen anderen angereicherten Elementen aus den TRANSCRIPTION FACTOR (TRANSFAC)- und CORUM-Datenbanken (117,118), darunter die Transkriptionsfaktoren ZBTB5 (zinc finger and BTB domain containing 5), Kaiso (zinc finger and BTB domain containing 33), PAX-4 (paired box gene 4) und AP-2alpha (activating enhancer binding protein 2 alpha), sowie das MAD1L1-Homodimer, MAD1L1-MAD2L und SNARE (RINT1, ZW10, p31)-Komplexe.

Abbildung 3 stellt dies grafisch dar.

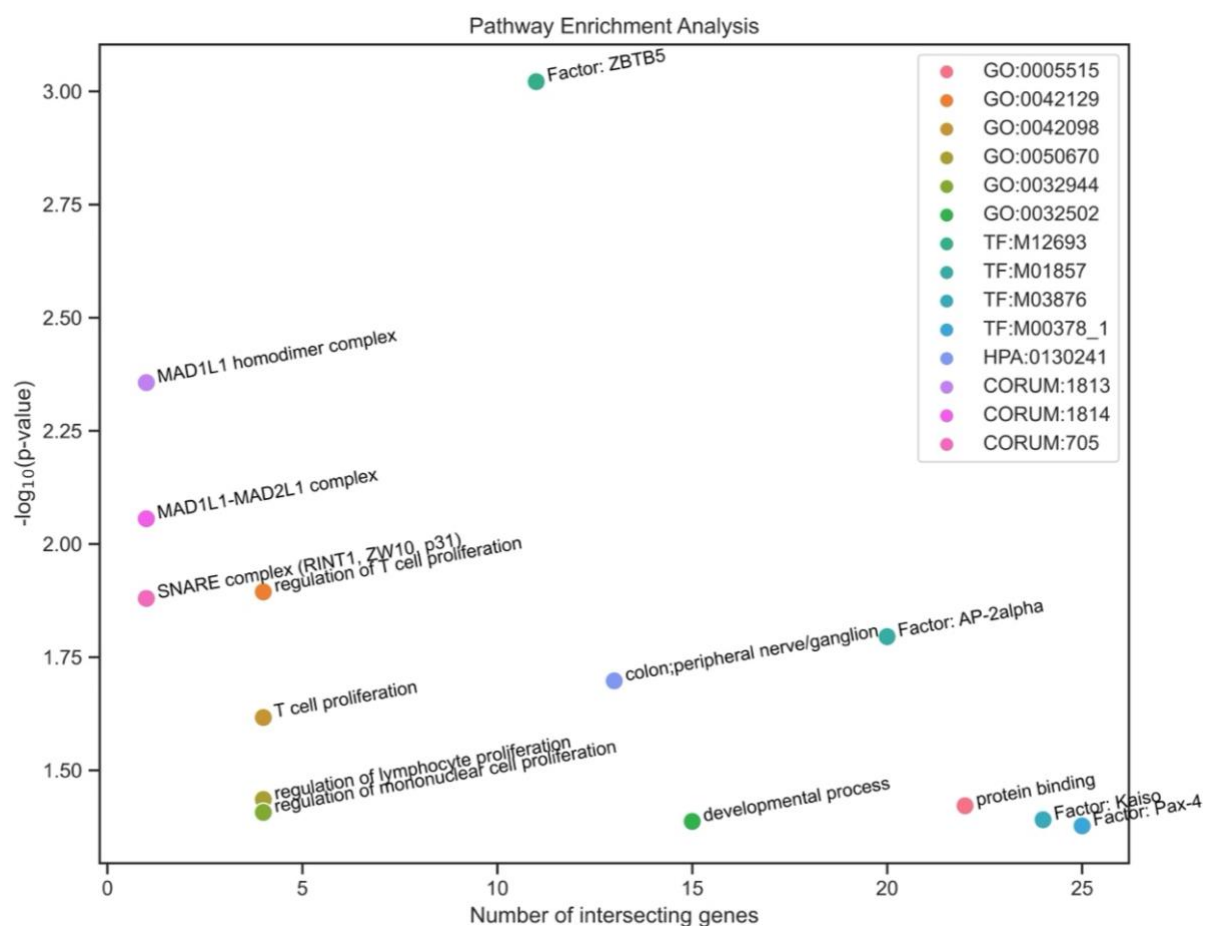


ABBILDUNG 3 – **PATHWAY ENRICHMENT ANALYSE ZU GENEN, DIE SIGNIFIKANT MIT FECD ASSOZIIERTE MARKER UMFASSEN**
SIGNALWEGE ABGELEITET AUS VERSCHIEDENEN QUELLEN: GENE ONTOLOGY (GO), TRANSFAC (TF), HUMAN PROTEIN ATLAS (HPA) UND CORUM (AUS FECHNER ET AL. 2025 (115)).

¹ Im Thymus gereifte Zellen des Immunsystems

6.4 RISIKOBEWERTUNG

Auf der Grundlage der signifikant mit FECD assoziierten Odds Ratios (OR) wurden genetische Risikowerte für alle untersuchten Personen geschätzt. Die Werte reichten von -55 bis 27. Es wurden keine klaren Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Probanden beobachtet. Generell gilt: Je höher der Wert, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, an FECD zu erkranken. Dennoch stellt dies lediglich eine Veranlagung dar. Das wird deutlich am Beispiel einer Kontrollperson, die einen Wert von 20 aufwies und einer erkrankten Person mit einem Wert von -5, wie in Abbildung 4 ersichtlich.

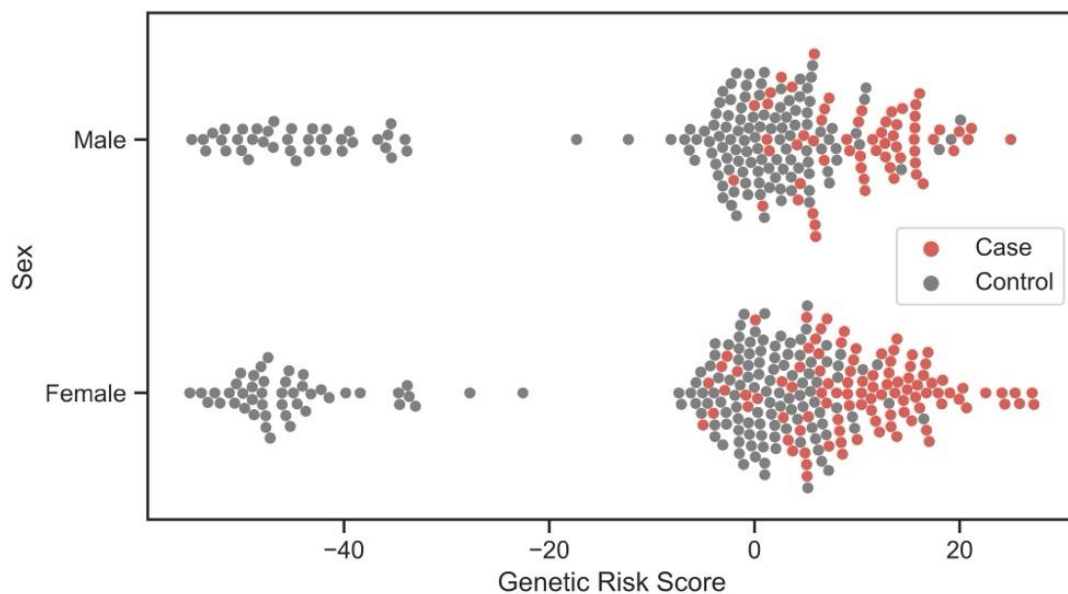


ABBILDUNG 4 – **GENETISCHER RISIKO-SCORE**
SCHÄTZUNG AUF GRUNDLAGE DER SIGNIFIKANT MIT FECD ASSOZIIERTEN MARKER (AUS FECHNER ET AL. 2025 (115)).

VII. DISKUSSION

Primäres Ziel dieser Arbeit war die Entdeckung neuer und die Validierung bekannter genetischer Varianten bei Patienten mit Fuchs'scher Endotheldystrophie. Dieses Ziel wurde an einer erstmals deutschen Population mit überwiegend mitteleuropäischen Wurzeln erreicht. Dazu wurden über einen Zeitraum von ca. 3,5 Jahren 157 klinisch diagnostizierte FECD-Fälle und 309 Kontrollen aus dem klinischen Alltag einer Universitätsaugenklinik in die Studie eingeschlossen. Die entnommenen Blutproben wurden in einem externen Labor mittels SNP-Chip-Technologie einer genomweiten Assoziationsanalyse unterzogen und die Ergebnisse anschließend bioinformatisch und statistisch untersucht. Hierbei konnten signifikante Assoziationen einzelner Varianten festgestellt sowie unter Anwendung eines sogenannten Pathway-Enrichment-Analyse-Tools die Anreicherung dieser im biologischen Kontext hergeleitet werden. Im Folgenden soll eine Auswertung der Ergebnisse unter Einbeziehung vorhandener Literatur und spezialisierter Datenbanken sowie eine kontextbezogene Einordnung ausgewählter Gene in ihre biologischen Funktionen erfolgen. Schlussendlich wird auf die Limitationen und Stärken sowohl der Methode als auch der Vergleichbarkeit mit anderen ähnlich gearteten Studien kritisch eingegangen.

7.1 AUSWERTUNG DER GWAS-ERGEBNISSE

Die dieser Arbeit zugrundeliegende genomweite Assoziationsstudie zur FECD konnte bei einem GWAS-üblichen Signifikanzniveau von 5×10^{-8} eine genomweit signifikante Assoziation von 41 SNPs feststellen. Diese befanden sich verteilt auf 15 Chromosomen und zahlreichen Genen und wiesen sowohl protektive Effekte bei einer Odds Ratio (OR) <1 als auch krankheitsfördernde Effekte bei einer OR >1 auf. Im Rahmen der Überlegung, unsere Daten im Hinblick auf therapeutische Targets zu analysieren, wird im Folgenden diesbezüglich unterschieden.

7.1.1 VARIANTEN MIT OR >1

Es war in dieser Arbeit möglich, die signifikante Bedeutung des Chromosoms 18 und im Speziellen des TCF4-Locus' zu bestätigen. Bemerkenswert ist weiterhin die Häufung an Signifikanzen in sogenannten neuartigen Transkripten („novel transcripts“) und langen nicht-kodierenden RNAs (lncRNAs), auf deren Rolle bei der Entstehung von Krankheiten noch im Gesonderten eingegangen werden soll.

Es soll nunmehr der TCF4-Locus näher beleuchtet werden. TCF4 wird in mehr als 20 Geweben exprimiert und spielt möglicherweise eine Schlüsselrolle in der Entwicklung des Nervensystems. Neben der Assoziation mit FECD ist es auch mit dem Pitt-Hopkins-Syndrom verbunden, welches durch geistige Retardierung und Gesichtsanomalien charakterisiert ist. Bezüglich weiterer allgemeiner Informationen zu diesem Gen s. auch Einleitung Kapitel 3.2.3. Der bereits mehrfach validierte SNP rs613872 ($p=8.0 \times 10^{-23}$, OR= 8.6) im dritten Intron des TCF4-Gens ließ sich auch in dieser Studie replizieren. Er wies die beste Signifikanz auf und bestätigt damit die Erkenntnisse der ersten GWAS zur FECD aus dem Jahr 2010 von Baratz et al. (3). Die mit rs613872 in Verbindung gebrachten Merkmale sind mannigfaltig, die höchste Signifikanz erreicht neben FECD jedoch u.a. die zentrale korneale Dicke (119).

Korrelierend zu den Erkenntnissen von Krachmer et al. und Rosenblum, Stark und Maumenee stellten wir weiterhin den dominanten Effekt des G-Allels fest (52,53).

Vier weitere Varianten innerhalb des TCF4-Gens wiesen eine genomweite Signifikanz auf, sie alle befanden sich in intronischen Sequenzen. Rs4801158 ergab ein Kopplungsgleichgewicht von $R^2 = 0,27$ und steht damit in moderater Kopplung zum Leit-SNP.

Rs1893431 wies in einer Studie eine Assoziation mit verringerten Negativ-Symptomen bei Schizophrenie auf (120).

Obwohl die Häufigkeit von CTG18.1 TNR-Extensionen im TCF4-Gen in unseren Proben nicht bekannt ist, lässt sich angesichts der hohen Kopplungsungleichgewichte mit rs613872 (62) sowie vorangegangener Studien in der deutschen Population (69) davon ausgehen, dass es sich um die primäre kausale Variante für FECD handelt.

Rs796743 in *LOC105372130* ($p=1,0 \times 10^{-14}$, OR=4,06) befindet sich nur 80.000 bp entfernt von dem zuvor von Afshari et al. und Gorman et al. identifizierten Leit-SNP rs11659764 (4,5), der nicht in der aktuellen Version des Axiom™ Precision Medicine Diversity Array enthalten ist. *LOC105372130*, eine lncRNA, ist über rs11659764 mit der kornealen Hysterese (CH) und dem Hornhautwiderstandsfaktor (CRF, „corneal resistance factor“), dem Augeninnendruck und dem Verhältnis von Harnalbumin zu Kreatinin (UACR) assoziiert (121–124). Die Assoziation mit biomechanischen Eigenschaften, d.h. CH und CRF, die bei FECD signifikant niedriger sind als in normalen Augen (50), macht *LOC105372130* zu einem interessanten Kandidatengen für FECD, da es anzunehmender Weise die Expression von TCF4 beeinflusst.

LINC01416 und *ENSG00000267327* (rs9962249, rs139805436, rs35248721, rs117550450) sind weitere lncRNAs. Verschiedene Varianten in *LINC01416* sind phänotypisch mit der zentralen Hornhautdicke und des Hornwiderstandsfaktors sowie endothelialer Zelldichte und endothelialer Zellform (Hexagonalität) assoziiert (119,125,126).

LINC03069 (rs764595), ebenfalls eine lncRNA, ist unter anderem mit Verhalten und Schizophrenie verbunden und mit zentraler Hornhautdicke sowie Messung der Hornhautendothelzellen assoziiert (125,127).

Darüber hinaus wurden zwei genetische Loci auf den Chromosomen 19 und 5 mit genomweiter Signifikanz und einer OR >1 identifiziert.

Zunächst zu rs153643: Diese Variante befindet sich in einem Intron des *SEMA6A*-Gens auf Chr. 5 ($p=3,1 \times 10^{-09}$, OR=2,75). Das Gen *SEMA6A*, welches für das Protein Semaphorin6A kodiert, ist mit der TUBBIII-Expression² und der Modifikation des Aktin-Zytoskeletts durch Beeinflussung der Anordnung von Aktinfilamenten und der Dynamik von Mikrotubuli verbunden (128,129). Als Klasse-6-Semaphorin hat das Transmembranmolekül die längste zytoplasmatische Domäne und ist eines von 20 Semaphorinen beim Menschen. Ihre Rezeptoren umfassen die Mitglieder der Plexin-Familie, die eine RasGTPase-aktivierende Protein-Domäne mit einer eingefügten Rho-GTPase-Bindungsdomäne aufweisen (130). Bei Zebrafischen ist *SEMA6A* in Verbindung mit PlexinA2 entscheidend, um die Integration von Zellen im Epithel während der Entwicklung des Augenbläschens aufrechtzuerhalten (131). Die Krebsforschung hat gezeigt, dass das Level der *SEMA6A*-Proteinexpression bei BRAF-mutierten Melanompatienten prognostische Bedeutung hat, indem es den Umbau des Aktinzytoskeletts über einen *SEMA6A*-RhoA-YAP-Weg³ reguliert (132). Darüber hinaus spielt es eine Schlüsselrolle bei der Zytosol-induzierten Apoptose in Lungenkrebszellen (133).

Trotz der unklaren funktionellen Relevanz der intronischen Variante sind die interessanten Eigenschaften des beherbergenden Gens *SEMA6A* vielversprechende Ausgangspunkte für weitere Untersuchungen bezüglich seiner Rolle bei der Entwicklung der FECD. Da sowohl Apoptose als auch der Umbau des Zytoskeletts wesentliche Faktoren im Krankheitsverlauf darstellen, könnten zum Beispiel die Expressionslevel von Semaphorin 6a in Hornhautendothelzellen gemessen werden.

Die Variante rs62117964 auf Chr. 19 befindet sich im *DNAJC19P3*-Gen, einem Pseudogen, von dem bisher keine Funktionen bekannt sind.

7.1.2 SIGNIFIKANTE MARKER MIT OR <1

Es zeigen sich weiterhin eine Reihe von signifikanten Markern mit einer Odds Ratio unter 1, die auf eine protektive Wirkung in der Kontrollgruppe hindeutet. Beispielfhaft soll im Folgenden auf die drei markantesten Loci genauer eingegangen werden.

² Klasse III β -Tubulin

³ Semaphorin6A-Rho-GTPaseA-Yes-Associated Protein

Einer davon ist rs55693639 in *ARHGEF10L* auf Chr. 1. Das Gen kodiert für den Rho-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor 10 Like, der zur RhoGEF⁴-Unterfamilie der RhoGTPasen gehört. Diese Proteine sind an Zellmigration, -Adhäsion und Veränderungen des Aktinzytoskeletts sowie der Dynamik von Mikrotubuli beteiligt. ARHGEF10L wirkt als RhoGEF für RhoA, RhoB und RhoC, wobei RhoA möglicherweise für die Differenzierung von Hornhautendothelzellen in Mäusaugen erforderlich (134) und Teil des p120-Kaiso-RhoA-ROCK-Signalwegs⁵ ist. Ortega et al. beobachteten außerdem, dass eine Exposition des Endothels gegenüber hyperosmotischem Stress zu einer verstärkten Aktinpolymerisation und zur Stimulierung der Aktivität der Rho-GTPasen Rac1 und RhoA führte. Die Hemmung der von Rac1 und RhoA vermittelten Signalwege hatte einen geringfügigen Einfluss auf die Störung der Endothelbarriere, verzögerte jedoch deutlich die Wiederherstellung der Barriere nach Entfernung des (hyperosmotischen) Stressors. Umgekehrt verstärkte die Aktivierung von Rac1 und RhoA nicht nur die intrinsische Funktion der endothelialen Barriere, sondern beschleunigte auch den Reparaturprozess derselben. Der RhoA-ROCK-Signalweg kann mit dem klassischen TGF β -Signalweg gekoppelt sein (135).

Die Parallele zu TCF4, welches an E-Box-Sequenzen von Promotoren und Enhancern spezifischer Gene bindet, besteht in der Beteiligung an der Genregulation in den TGF- β - und NF- κ B-Signalwegen sowie an der mesenchymalen Transition und Apoptose. Somit könnte nicht nur TCF4, sondern auch ARHGEF10L zum Verlust von Endothelzellen bei FECD beitragen.

Auch rs17884378 im TNFRSF1B-Gen auf dem Chromosom 1 stellt eine neu mit FECD assoziierte Variante dar. TNFRSF1B ist ein Synonym zu TNFR2 (Tumornekrosefaktor Superfamily 1B = Tumor Necrose Factor Receptor 2), welcher pro- und anti-inflammatorische Effekte aufweist.

Ligand des TNFR2 ist das Zytokin TNF α (Tumornekrosefaktor α), welches auch in der Vorderkammer des Auges vorkommt. Shivanna et al. zeigten in diesem Zusammenhang auf, dass die Bindung von TNF α an seine Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 eine Vielzahl von Effekten hervorruft, u.a. die Induktion des Verlustes der Barrierefunktion kornealer Endothelzellen und Apoptose sowie die Störung des Zytoskeletts (136).

Auf der anderen Seite kann die Expression von TNFR2 in kornealen Zellen einen protektiven Effekt auf die Abstoßung eines allogenen Transplantats nach Hornhaut-Transplantation haben

⁴ Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor

⁵ Protein120-Kaiso-RhoA-Rho-Associated Protein Kinase

(137). Es verbleibt jedoch Unklarheit über die konkrete Auswirkung der intronischen Variante auf die Expression von TNFR2.

Auf Chromosom 2 ergab sich eine genomweite Signifikanz für den SNP rs62167331 auf dem CCDC85A-Gen (Coiled-Coil Domain Containing 85A). Das Protein, welches hierdurch codiert wird, aktiviert sowohl Zellmigration als auch -invasion. Des Weiteren fördert es zelleigene Abwehrmechanismen (die sogenannte UPR = Unfolded Protein Response) gegenüber Endoplasmatischem Retikulum-Stress. ER-Stress, ausgelöst durch die Anhäufung ungefalteter Proteine im ER, wird durch im ER befindliche transmembranöse Proteine initiiert. Zusätzlich wird die Expression von ATF4 (Activating Transcription Factor 4), einem Schlüsselspieler in der UPR über die sogenannte PERK-eIF2 α -Achse⁶, durch CCDC85A verstärkt. ATF4 schützt Zellen vor ER-Stress, indem es autophagische Prozesse einleitet. Gleichzeitig kann es auch die Expression von proapoptotischen Genen (z.B. *CHOP*⁷) bewirken, sofern der ER-Stress nicht gemildert wird (138). Im Zusammenhang mit FECD ist bekannt, dass die UPR Teil ihrer Pathophysiologie ist, die zu übermäßiger Ablagerung von Extrazellulärmatrix, Apoptose und vorzeitiger Alterung der Endothelzellen führt (1). Somit wäre auch dieses Gen ein idealer Kandidat für weitere Untersuchungen.

7.1.3 LONG NON-CODING RNAs (LNCRNAs)

Neben der Vielfalt an unterschiedlichen codierenden Genen mit signifikanten Varianten ist auffällig, dass 14 signifikante SNPs in lncRNAs liegen (u.a. *LINC01416*, *LINC03069*, *LINC01905*, *LINC01366*, *LINC01055* und 7 neuartige Transkripte). Long non-coding RNAs werden über ihre Länge von >200 Nukleotiden definiert und gehören zur großen Gruppe der non-coding RNAs. Diese erlangten in den letzten zwei Dekaden zunehmend an Bedeutung als sich herausstellte, dass nur etwa 2 % des menschlichen Genoms für Proteine kodieren, aber 70 % des Genoms transkribiert werden (139). Obwohl insgesamt ein niedriger Konservierungsgrad der lncRNAs zwischen den Spezies besteht und sie schneller evolvieren, kann man ihnen inzwischen vielfältige Rollen zuschreiben (140). Dazu gehört die epigenetische Regulation von Genexpression z.B. durch Chromatinorganisation und Veränderung der Zugänglichkeit von Genen für Transkriptionsfaktoren, Disruption der Translation, Einfluss auf die mRNA-Stabilität etc.. Für nähere Erläuterungen zur Funktion von lncRNAs wird auf die Veröffentlichungen von Kung et al. und Angrand et al. verwiesen (139,141).

⁶ Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase - Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha

⁷ CCAAT/Enhancer-binding Protein-homologues Protein

Im Hinblick auf humane Krankheitsbilder konnte lncRNAs eine Verantwortung u.a. bei Entwicklungsstörungen wie dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom und dem Silver-Russell-Syndrom sowie bei der Krebsentstehung zugeschrieben werden (139), aber auch Studien über die endothelial-mesenchymale Transition (EMT) bei Lungenfibrose, diabetischer Kardiomyopathie und proliferativer Vitreoretinopathie ergaben entscheidende Beteiligungen von lncRNAs am Prozess (142–144). Die Involvierung von lncRNAs in der EMT bei Fuchs'scher Endotheldystrophie wurde unseres Wissens hingegen noch nicht postuliert. Wir stellen auf Grundlage der in dieser Studie identifizierten Signifikanzen (besonders derjenigen in moderater Kopplung mit dem Leit-SNP rs613872 im TCF4-Gen) die These auf, dass lncRNAs im Prozess der endothelial-mesenchymalen Transition bei FECD involviert sind. Wenn ein lncRNA-Gen in einem moderaten Kopplungsgleichgewicht mit einem Protein-codierenden Gen steht, deutet dies darauf hin, dass Veränderungen in der Expression des lncRNA-Gens mit Veränderungen in der Expression des Protein-codierenden Gens einhergehen könnten. Auch wenn die intronische Variante in *TCF4* keine erkennbare direkte Auswirkung auf seine Genexpression hat, so könnten Veränderungen in den umgebenden lncRNAs die Expression von *TCF4* und über dieses das EMT-induzierende ZEB1 beeinflussen. Einschränkend diesbezüglich ist allerdings das widersprüchliche Expressionslevel von *TCF4* in verschiedenen Studien (68,69,145), welches jedoch unter Einbeziehung der von uns identifizierten lncRNAs weitergehend untersucht werden könnte. Interessanterweise zeigten Wang et al. 2022 am Mausmodell auf, dass die Expression der lncRNA *NEAT1*⁸ in UVA-induzierter FECD herunterreguliert ist und im Gegenzug der CRISPR-bedingte Funktionszugewinn von *NEAT1* protektiv auf die UVA-induzierte FECD wirkte (146). Weiterhin ließ sich kürzlich ebenfalls am Mausmodell anhand von Expressionsmustern eine Dysregulation von lncRNAs und deren Anreicherung in FECD-zugrundeliegenden biologischen Funktionen, besonders in der Apoptose, identifizieren (147). Die gleiche Arbeitsgruppe konstatierte vorher die Möglichkeit, dass verschiedene lncRNAs diverse Funktionen der kornealen Endothelzellen unter oxidativem Stress regulieren (148).

7.1.4 PATHWAY ENRICHMENT ANALYSE

Die Gene, die die signifikanten Marker umfassten, wurden unter anderem für den Kairo (Zinkfinger und BTB-Domäne⁹ enthaltend 33) -Weg angereichert, einen Transkriptionsfaktor, der an zahlreichen biologischen Prozessen wie epithelial-mesenchymaler Transition (EMT) und Apoptose beteiligt ist. Er spielt u.a. eine Rolle bei der Ausbreitung menschlicher

⁸ Nuclear Enriched Abundant Transcript 1

⁹ Broad-Complex, Tramtrack and Bric-a-brac-Domäne

Hornhautendothelzellen (durch p120-Kaiso-RhoA-ROCK-Signalgebung nach Knockdown von p120-Kaiso) und es konnte die Möglichkeit gezeigt werden, humane korneale Endothelzellen durch p120-Kaiso siRNA-Knockdown in den Progenitorstatus zurück zu programmieren (149,150).

Darüber hinaus gab es eine Anreicherung für AP-2alpha, ein Mitglied der Transkriptionsfaktoren der Activating Protein-2-Familie. Dies ist an der Differenzierung von geschichteten Epithelien, einschließlich der Augenoberfläche, beteiligt, indem es die Expression von Cadherin induziert (151,152).

ZBTB5 (Zinkfinger und BTB-Domäne enthaltend 5) ist ein Transkriptionsfaktor und Proto-Onkogen, der in Anwesenheit von Tumorsuppressor-Protein 53 (p53) die Zellproliferation stimuliert, bei Abwesenheit von p53 jedoch die Apoptose fördert (153). Es wurde weiterhin gezeigt, dass die Expression von im Zellkern befindlichem ZBTB5 in Retinoblastom- und Muskelkrebsgeweben höher ist. Es konkurriert dabei mit p53 um die Besetzung von p53-Bindeelementen und unterdrückt die Transkription des Zellzyklusarrestgens *p21* (Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1) (154). Darüber hinaus ist ZBTB5 an Prozessen beteiligt, die die Cisplatin-Resistenz bei nicht-kleinzelligem Lungenkrebs über eine lncRNA (*LINC00221*) fördern (155).

Ein weiterer angereicherter Begriff war MAD1L1 (Mitotic Arrest Deficient 1 Like 1), ein Bestandteil des mitotischen Spindel-Assemblierungskontrollpunktes, der den Beginn der Anaphase verhindert, bis alle Chromosomen ordnungsgemäß an der Metaphasenplatte ausgerichtet sind. MAD1L1 funktioniert als Homodimer und interagiert mit MAD2L1. MAD1L1 kann eine Rolle bei der Zellzyklussteuerung und der Tumorsuppression spielen. Der Verlust von MAD1 (laut NCBI, Synonym für MAD1L1) kann, indem die Sekretion von $\alpha 5$ -Integrin gestört wird, zu Defiziten in der zellulären Anheftung, Adhäsion und Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) führen. Darüber hinaus hemmt MAD1 die Zellbewegung oder beschleunigt alternativ die gerichtete Zellmigration, korrelierend mit seinem Expressionslevel (156). Juang et al. stellten fest, dass ein niedrigerer Expressionsgrad von E-Cadherin aufgrund einer verringerten MAD1-Expression dazu führt, dass die Migrationsfähigkeit von Brustkrebszellen erhöht wird (157). Während in Hornhautendothelzellen deutscher Patienten in einer Studie von Foja et al. E-Cadherin nicht nachgewiesen werden konnte, war N-Cadherin sowohl in den Kontrollen als auch in betroffenen Endothelzellen darstellbar (69). N-Cadherin ist ein Induktor der endothelial-mesenchymalen Transition, die Teil der Pathogenese von FECD ist, und seine Expression in der Umgebung von Guttae-umgebenden Endothelzellen erhöht (158).

In unserer Studie zeigte sich eine neuartige Variante (rs117106123) in *MAD1L1* signifikant mit FECD assoziiert (OR 0,15; $p=9,4 \times 10^{-09}$). Die Variante ist intronisch, und ihre Konsequenz noch unklar. Eine weiterführende Analyse der E-Cadherin-Expression in Endothelzellen wäre jedoch ein interessanter weiterer Ansatzpunkt.

7.1.5 EINSCHRÄNKUNGEN UND STÄRKEN DER DURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE

Unsere GWAS-Analyse weist Limitationen und Stärken auf, auf die hier näher eingegangen werden soll. Ganz generell bietet eine GWAS den Vorteil, weitgehend unvoreingenommen nach mit einer Krankheit assoziierten Markern zu suchen – und zwar genomweit. Sie kann eine Grundlage für die daran anknüpfende Hypothesengenerierung und für funktionale Studien bilden. Sie berücksichtigt jedoch weder nicht-genetische Einflüsse auf die Erkrankung, wie Umweltfaktoren, noch sind die Ergebnisse ohne weiteres auf die verschiedenen ethnischen Gruppen übertragbar.

Die Kohortengröße in unserer Studie ist begrenzt, ähnlich der ersten GWAS zu diesem Thema durch Baratz et al. (3), aber deutlich kleiner als die nachfolgenden Genomweiten Assoziationsstudien (4,5). Die bisher umfangreichste GWAS durch Gorman et al. konnte allerdings durch eine Meta-Analyse mit den Daten von Afshari et al. die Fall- und Kontrollzahlen deutlich erhöhen und rekrutierte die Teilnehmer lediglich über bestehende Datenbanken des Million Veterans Programms und nicht nach direkter klinischer Beurteilung. Im Gegensatz zu früheren GWAS zu FECD profitiert unsere Studie von phänotypisch scharf beschriebenen Fällen und einer ethnisch homogenen Studiengruppe. Letzteres minimiert potenzielle genetische Störvariablen und erhöht die Aussagekraft der Ergebnisse. Zwar basierten frühere Studien ebenfalls auf Probanden europäischer Herkunft, jedoch wurde bislang keine Untersuchung ausschließlich an einer deutschen Population durchgeführt. Da alle Patienten und Patientinnen in derselben Klinik rekrutiert wurden, gehen wir nicht nur von hereditärer, sondern auch von umweltbedingter Homogenität im Hinblick auf Lebensgewohnheiten und kulturelle Einflüsse aus.

Die limitierte Probandenzahl ist möglicherweise der Grund zwar signifikanter, aber weit über das Genom verteilter Einzel-SNPs ohne Bildung prominenter Assoziationspeaks außerhalb des TCF4-Locus. Dass diese bis auf unseren Leit-SNP (rs613872) die in vorigen GWAS identifizierten Varianten bzw. Loci nicht widerspiegeln, könnte mitunter dem Fakt geschuldet sein, dass das von uns verwendete Axiom™ Precision Medicine Diversity Array nur eine geringe Überlappung mit den in vorigen Studien verwendeten Arrays Illumina 370K und HumanOmni 2.5 zeigt (159). Die von Afshari et al. 2017 als genomweit signifikant identifizierten Varianten in *KANK4* und *LAMC1* wurden durch unser Array zwar erfasst, erwiesen sich aber als nicht signifikant. Die eingeschränkte Überlappung der getesteten SNPs beeinflusst

zweifelsohne den Vergleich mit den bisherigen GWAS-Studien hinsichtlich Übereinstimmung und Entdeckung von assoziierten Markern. Sie birgt aber den großen Vorteil neue Varianten identifizieren zu können.

Aufgrund der begrenzten Stichprobengröße sowie des damit unverhältnismäßig hohen Kosten- und Datenverarbeitungsaufwands wurde auf eine Imputation zusätzlicher Varianten verzichtet. Zudem kann Imputationsunsicherheit bei der Berechnung polygenetischer Risikoscores in kleinen Stichproben durch die Summation zahlreicher potenziell instabil geschätzter Effekte die Varianz der Scores erhöhen und dadurch die Gefahr einer Effektüberschätzung weiter verstärken.

Das hier verwendete SNP-Array hat sich als besonders geeignet erwiesen einen Risiko-Score zu erheben. Des Weiteren weist das PMDA-Array eine hohe Zahl an SNPs mit einem höheren CADD-Score (Combined Annotation Dependent Depletion Score) auf, der einen Hinweis auf die Wahrscheinlichkeit einer Variante, pathogen zu sein, liefert (159). Schlussendlich ist das PMDA durch seine Vielzahl an klinisch und insbesondere Immunsystem-relevanten Varianten, seine Aktualität und seine Kosten insgesamt ein sehr geeignetes Array für diese Studie.

Die Pathway Enrichment Analyse ermöglicht es, biologisch relevante Zusammenhänge in umfangreichen Genomdatensätzen zu erkennen, indem sie überrepräsentierte Signalwege und funktionelle Gen-Gruppen identifiziert. Dadurch trägt sie wesentlich zur Interpretation komplexer Datensätze bei. Sie kann Schlüsselmechanismen aufzeigen, ebenfalls zur Hypothesenbildung beitragen und bietet einen ganzheitlichen Ansatz (160). Nachteilig sind jedoch die Abhängigkeit – sowohl von der Qualität der genutzten Datenbanken als auch von der Qualität der zugrundeliegenden Studien-Datensätze. Schlussendlich übersieht sie unter Umständen die Vielschichtigkeit von Genaktivitäten in einem Signalweg und führt eventuell zu „falscher Vereinfachung“ (161).

Um die Robustheit unserer Ergebnisse zu verbessern, wäre eine Studie zur Replikation der identifizierten SNPs mit einer unabhängigen Versuchsgruppe wünschenswert. Darüber hinaus könnte die Anwendung von Imputation (also die statistische Vorhersage nicht direkt genotypisierter SNPs auf Basis bekannter Haplotypstrukturen) die Anzahl der vorhergesagten SNPs erhöhen(162). Bei gleichzeitiger Erstellung eines individuellen Risiko-Scores sollte dies aus ethischer Sicht jedoch kritisch betrachtet werden, da auf Grundlage von geschätzten Daten eine prädiktive Aussage getroffen würde.

VIII. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Das Ziel der Studie, neue Varianten in Assoziation zur Fuchs'schen Endotheldystrophie zu identifizieren und vorige Varianten zu verifizieren, wurde erreicht. Mit unseren Ergebnissen liefern wir neue Ansatzpunkte in der Erforschung der komplexen Pathogenese der FECD, einerseits durch die Identifikation signifikanter Protein-kodierender Gene, aber auch durch den augenscheinlichen Stellenwert insbesondere langer nicht-kodierender RNAs. Es gelang aber auch, mit der Bestätigung des TCF4-Locus und eines seiner Leit-SNPs (rs613872) sowie mit der Identifizierung von lncRNAs in moderater Kopplung zu *TCF4* die herausragende Bedeutung von Chromosom 18 in diesem Zusammenhang zu untermauern. Mehrere über das Genom verteilte SNPs stellten sich ebenfalls als signifikant heraus, bildeten jedoch keine Assoziationspeaks, was eventuell der limitierten Probengröße zuzuschreiben ist. Sie lagen einerseits in neuartigen Transkripten ohne bisher bekannte Funktion sowie andererseits in Introns von Loci, deren Proteine eine Rolle in mannigfaltigen biologischen Signalwegen spielen.

Sowohl eine funktionale Validierung der lncRNAs und der Introne als auch Studien zur Untersuchung der Expressionslevel der kodierten Proteine in Hornhaut-Endothelzellen sind eine spannende Perspektive.

In die Zukunft blickend und hypothetisch könnten für Patienten durch die Etablierung von individuellen genetischen Risikoprofilen Aussagen über die jeweilige Wahrscheinlichkeit zur Entwicklung einer FECD bzw. deren Progress getroffen werden. Letztendlich bietet die Entschlüsselung des genetischen Aspektes der Pathogenese die Chance, neue Therapiekonzepte wie z.B. die vektorgestützte oder CRISPR-Cas9¹⁰-vermittelte Gentherapie zur gezielten Ausschaltung oder Korrektur kausaler Gene zu entwickeln. Dies beträfe sowohl das Vorbeugen der FECD-Entstehung als auch die Progressionsprävention.

¹⁰ Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats -CRISPR-associated Protein 9

IX. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ong Tone S, Kocaba V, Böhm M, Wylegala A, White TL, Jurkunas U v. Fuchs endothelial corneal dystrophy: The vicious cycle of Fuchs pathogenesis. Vol. 80, Progress in Retinal and Eye Research. Elsevier Ltd; 2021.
 2. Wieben ED, Aleff RA, Tosakulwong N, Butz ML, Highsmith WE, Edwards AO, et al. A Common Trinucleotide Repeat Expansion within the Transcription Factor 4 (TCF4, E2-2) Gene Predicts Fuchs Corneal Dystrophy. PLoS One. 2012 Nov 21;7(11):e49083.
 3. Baratz KH, Tosakulwong N, Ryu E, Brown WL, Branham K, Chen W, et al. E2-2 Protein and Fuchs's Corneal Dystrophy. New England Journal of Medicine. 2010 Sep 9;363(11):1016–24.
 4. Afshari NA, Igo RP, Morris NJ, Stambolian D, Sharma S, Pulagam VL, et al. Genome-wide association study identifies three novel loci in Fuchs endothelial corneal dystrophy. Nat Commun. 2017 Apr 30;8(1):14898.
 5. Gorman BR, Francis M, Nealon CL, Halladay CW, Duro N, Markianos K, et al. A multi-ancestry GWAS of Fuchs corneal dystrophy highlights the contributions of laminins, collagen, and endothelial cell regulation. Commun Biol [Internet]. 2024 Apr 6;7(1):418. Available from: <https://www.nature.com/articles/s42003-024-06046-3>
 6. Flockerzi E, Maier P, Böhringer D, Reinshagen H, Kruse F, Cursiefen C, et al. Trends in Corneal Transplantation from 2001 to 2016 in Germany: A Report of the DOG–Section Cornea and its Keratoplasty Registry. Am J Ophthalmol. 2018 Apr;188:91–8.
 7. Bowling B. KANSKIs Klinische Ophthalmologie . Ein systematischer Ansatz. 8. Auflage. Elsevier GmbH Deutschland, editor. München: Urban&Fischer; 2017. 165 p.
 8. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie . 3. Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag KG; 2009. 575–577 p.
 9. Yang AY, Chow J, Liu J. Corneal Innervation and Sensation: The Eye and Beyond. Vol. 91, Yale Journal Of Biology And Medicine. 2018.
 10. Murphy C, Alvarado J, Juster R, Maglio M. Prenatal and postnatal cellularity of the human corneal endothelium. A quantitative histologic study. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1984 Mar;25(3).
 11. Murphy C, Alvarado J, Juster R. Prenatal and Postnatal Growth of the Human Descemet's Membrane. 1984;1402–15.
 12. Kabosova A, Azar DT, Bannikov GA, Campbell KP, Durbeej M, Ghohestani RF, et al. Compositional Differences between Infant and Adult Human Corneal Basement Membranes. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2007 Nov 1;48(11).
 13. Joyce N. Proliferative capacity of the corneal endothelium. Prog Retin Eye Res. 2003 May;22(3):359–89.
-

-
14. LeBleu VS, MacDonald B, Kalluri R. Structure and Function of Basement Membranes. *Exp Biol Med*. 2007 Oct 26;232(9):1121–9.
 15. Ali M, Raghunathan VK, Li JY, Murphy CJ, Thomasy SM. Biomechanical relationships between the corneal endothelium and Descemet's membrane. Vol. 152, *Experimental Eye Research*. Academic Press; 2016. p. 57–70.
 16. Bourne WM. Biology of the corneal endothelium in health and disease. *Eye*. 2003 Nov 20;17(8):912–8.
 17. Augustin AJ. Diagnostische Verfahren bei Hornhauterkrankungen. In: *Augenheilkunde*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2001.
 18. Tuft SJ, Coster DJ. The corneal endothelium. *Eye*. 1990 May;4(3).
 19. Elbaz U, Mireskandari K, Tehrani N, Shen C, Khan MS, Williams S, et al. Corneal Endothelial Cell Density in Children: Normative Data From Birth to 5 Years Old. *Am J Ophthalmol*. 2017 Jan;173.
 20. Bahn CF, Glassman RM, MacCallum DK, Lillie JH, Meyer RF, Robinson BJ, et al. Postnatal development of corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1986 Jan;27(1):44–51.
 21. Bonanno JA. Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump. *Exp Eye Res*. 2012 Feb;95(1).
 22. Fuchs E. Dystrophia epithelialis corneae. *Albrecht Von Graefes Arch Ophthalmol*. 1910 Aug;76(3):478–508.
 23. Vogt A. Weitere Ergebnisse der Spaltlampenmikroskopie des vorderen Bulbusabschnittes. *Albrecht von Graæes Archiv für Ophthalmologie*. 1921 Aug;106(1–2):63–103.
 24. Friedenwald H, Friedenwald JS. Epithelial Dystrophy of the Cornea. *British Journal of Ophthalmology*. 1925 Jan 1;9(1):14–20.
 25. Graves B. Report to the lang clinical research committee, royal london ophthalmic hospital: a bilateral chronic affection of the endothelial face of the cornea of elderly persons with an account of the technical and clinical principles of its slit-lamp observation. *Br J Ophthalmol*. 1924;8:502–44.
 26. Eghrari AO, McGlumphy EJ, Iliff BW, Wang J, Emmert D, Riazuddin SA, et al. Prevalence and Severity of Fuchs Corneal Dystrophy in Tangier Island. *Am J Ophthalmol*. 2012 Jun;153(6).
 27. Aiello F, Gallo Afflitto G, Ceccarelli F, Cesareo M, Nucci C. Global Prevalence of Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy (FECD) in Adult Population: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Ophthalmol*. 2022 Apr 14;2022:1–7.
 28. Afshari NA. Clinical Study of Fuchs Corneal Endothelial Dystrophy Leading to Penetrating Keratoplasty. *Archives of Ophthalmology*. 2006 Jun 1;124(6):777.
-

-
29. Brockmann T, Walckling M, Brockmann C, Fuchsluger TMA, Pleyer U. [Corneal wound healing-Pathophysiology and principles]. *Ophthalmologe*. 2021 Nov;118(11):1167–77.
 30. Chaurasia S, Vanathi M. Specular microscopy in clinical practice. *Indian J Ophthalmol*. 2021;69(3):517.
 31. Wacker K, Reinhard T, Maier P. Pathogenese, Diagnose und Klinik der Fuchs-Endotheldystrophie. *Der Ophthalmologe*. 2019 Mar 6;116(3):221–7.
 32. Bachmann B, Schrittenlocher S, Matthaei M, Siebelmann S, Cursiefen C. „Descemet membrane endothelial keratoplasty“ in komplexen Augen. *Der Ophthalmologe*. 2019 Mar 26;116(3):228–35.
 33. Gain P, Jullienne R, He Z, Aldossary M, Acquart S, Cognasse F, et al. Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. *JAMA Ophthalmol*. 2016 Feb 1;134(2):167.
 34. Brockmann T, Brockmann C, Maier AKB, Schroeter J, Bertelmann E, Torun N. Primary Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty for Fuchs Endothelial Dystrophy versus Bullous Keratopathy: Histopathology and Clinical Results. *Curr Eye Res*. 2018 Oct;43(10):1221–7.
 35. Brockmann T, Pilger D, Brockmann C, Maier AKB, Bertelmann E, Torun N. Predictive Factors for Clinical Outcomes after Primary Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty for Fuchs' Endothelial Dystrophy. *Curr Eye Res*. 2019 Feb;44(2):147–53.
 36. Brockmann T, Brockmann C, Maier AK, Gundlach E, Schroeter J, Bertelmann E, et al. Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty for Graft Failure After Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty: Clinical Results and Histopathologic Findings. *JAMA Ophthalmol*. 2015 Jul;133(7):813–9.
 37. Jurkunas U V., Bitar MS, Funaki T, Azizi B. Evidence of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. *Am J Pathol*. 2010 Nov;177(5):2278–89.
 38. Jurkunas U V., Rawe I, Bitar MS, Zhu C, Harris DL, Colby K, et al. Decreased Expression of Peroxiredoxins in Fuchs' Endothelial Dystrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2008 Jul 1;49(7):2956.
 39. Bitar MS, Liu C, Ziaei A, Chen Y, Schmedt T, Jurkunas U V. Decline in DJ-1 and Decreased Nuclear Translocation of Nrf2 in Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2012 Aug 24;53(9):5806.
 40. Liu C, Chen Y, Kochevar IE, Jurkunas U V. Decreased DJ-1 Leads to Impaired Nrf2-Regulated Antioxidant Defense and Increased UV-A–Induced Apoptosis in Corneal Endothelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2014 Sep 3;55(9):5551.
 41. Benischke AS, Vasanth S, Miyai T, Katikireddy KR, White T, Chen Y, et al. Activation of mitophagy leads to decline in Mfn2 and loss of mitochondrial mass in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Sci Rep*. 2017 Jul 27;7(1):6656.
-

-
42. Tuberville AW, Wood TO, Mclaughlin BJ. Cytochrome oxidase activity of Fuchs' endothelial dystrophy. *Curr Eye Res.* 1986 Jan 2;5(12):939–47.
 43. Nita M, Grzybowski A. The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1–23.
 44. Cheng AC, Pang CP, Leung AT, Chua JK, Fan DS, Lam DS. The association between cigarette smoking and ocular diseases. *Hong Kong Med J.* 2000 Jun;6(2):195–202.
 45. Pourzand C, Tyrrell RM. Apoptosis, the role of oxidative stress and the example of solar UV radiation. *Photochem Photobiol.* 1999 Oct;70(4):380–90.
 46. Campbell K, Casanova J. A common framework for EMT and collective cell migration. *Development.* 2016 Dec 1;143(23):4291–300.
 47. Katikireddy KR, White TL, Miyajima T, Vasanth S, Raoof D, Chen Y, et al. NQO1 downregulation potentiates menadione-induced endothelial-mesenchymal transition during rosette formation in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Free Radic Biol Med.* 2018 Feb;116:19–30.
 48. Okumura N, Hashimoto K, Kitahara M, Okuda H, Ueda E, Watanabe K, et al. Activation of TGF- β signaling induces cell death via the unfolded protein response in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Sci Rep.* 2017 Jul 28;7(1):6801.
 49. Engler C, Kelliher C, Spitze AR, Speck CL, Eberhart CG, Jun AS. Unfolded Protein Response in Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy: A Unifying Pathogenic Pathway? *Am J Ophthalmol.* 2010 Feb;149(2):194-202.e2.
 50. del Buey MA, Cristo'bal JA, Ascaso FJ, Lavilla L, Lanchares E. Biomechanical Properties of the Cornea in Fuchs' Corneal Dystrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2009 Jul 1;50(7):3199.
 51. Kopplin LJ, Przepyszny K, Schmotzer B, Rudo K, Babineau DC, Patel S V, et al. Relationship of Fuchs endothelial corneal dystrophy severity to central corneal thickness. *Arch Ophthalmol.* 2012 Apr;130(4):433–9.
 52. Rosenblum P, Stark WJ, Maumenee IH, Hirst LW, Maumenee AE. Hereditary Fuchs' Dystrophy. *Am J Ophthalmol.* 1980 Oct;90(4):455–62.
 53. Krachmer JH, Purcell JJ Jr, Young CW, Bucher KD. Corneal endothelial dystrophy. A study of 64 families. *Arch Ophthalmol.* 1978 Nov;96(11):2036-9.
 54. Biswas S. Missense mutations in COL8A2, the gene encoding the alpha2 chain of type VIII collagen, cause two forms of corneal endothelial dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2001 Oct 1;10(21):2415–23.
-

-
55. Gottsch JD, Sundin OH, Liu SH, Jun AS, Broman KW, Stark WJ, et al. Inheritance of a Novel *COL8A2* Mutation Defines a Distinct Early-Onset Subtype of Fuchs Corneal Dystrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2005 Jun 1;46(6):1934.
 56. Riazuddin SA, Vasanth S, Katsanis N, Gottsch JD. Mutations in *AGBL1* Cause Dominant Late-Onset Fuchs Corneal Dystrophy and Alter Protein-Protein Interaction with *TCF4*. *The American Journal of Human Genetics*. 2013 Oct;93(4):758–64.
 57. Riazuddin SA, Parker DS, McGlumphy EJ, Oh EC, Iliff BW, Schmedt T, et al. Mutations in *LOXHD1*, a Recessive-Deafness Locus, Cause Dominant Late-Onset Fuchs Corneal Dystrophy. *The American Journal of Human Genetics*. 2012 Mar;90(3):533–9.
 58. Riazuddin SA, Zaghloul NA, Al-Saif A, Davey L, Diplas BH, Meadows DN, et al. Missense mutations in *TCF8* cause late-onset Fuchs corneal dystrophy and interact with *FCD4* on chromosome 9p. *Am J Hum Genet*. 2010 Jan;86(1):45–53.
 59. Murre C, Bain G, van Dijk MA, Engel I, Furnari BA, Massari ME, et al. Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1994 Jun 21;1218(2):129–35.
 60. Sobrado VR, Moreno-Bueno G, Cubillo E, Holt LJ, Nieto MA, Portillo F, et al. The class I bHLH factors E2-2A and E2-2B regulate EMT. *J Cell Sci*. 2009 Apr 1;122(7):1014–24.
 61. Forrest MP, Waite AJ, Martin-Rendon E, Blake DJ. Knockdown of Human *TCF4* Affects Multiple Signaling Pathways Involved in Cell Survival, Epithelial to Mesenchymal Transition and Neuronal Differentiation. *PLoS One*. 2013 Aug 23;8(8):e73169.
 62. Mootha VV, Gong X, Ku HC, Xing C. Association and Familial Segregation of CTG18.1 Trinucleotide Repeat Expansion of *TCF4* Gene in Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2014 Jan 2;55(1):33.
 63. Du J, Aleff RA, Soragni E, Kalari K, Nie J, Tang X, et al. RNA Toxicity and Missplicing in the Common Eye Disease Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. *Journal of Biological Chemistry*. 2015 Mar;290(10):5979–90.
 64. Eghrari AO, Vahedi S, Afshari NA, Riazuddin SA, Gottsch JD. CTG18.1 expansion in *TCF4* among African Americans with fuchs' corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017 Dec 1;58(14):6046–9.
 65. Xing C, Gong X, Hussain I, Khor CC, Tan DTH, Aung T, et al. Transethnic Replication of Association of CTG18.1 Repeat Expansion of *TCF4* Gene With Fuchs' Corneal Dystrophy in Chinese Implies Common Causal Variant. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2014 Nov 7;55(11):7073.
 66. Nakano M, Okumura N, Nakagawa H, Koizumi N, Ikeda Y, Ueno M, et al. Trinucleotide Repeat Expansion in the *TCF4* Gene in Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy in Japanese. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2015 Jul 25;56(8):4865.
-

-
67. Vasanth S, Eghrari AO, Gapsis BC, Wang J, Haller NF, Stark WJ, et al. Expansion of *CTG18.1* Trinucleotide Repeat in *TCF4* Is a Potent Driver of Fuchs' Corneal Dystrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2015 Jul 15;56(8):4531.
 68. Okumura N, Hayashi R, Nakano M, Yoshii K, Tashiro K, Sato T, et al. Effect of trinucleotide repeat expansion on the expression of *TCF4* mRNA in fuchs' endothelial corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2019 Feb 1;60(2):779–86.
 69. Foja S, Luther M, Hoffmann K, Rupprecht A, Gruenauer-Kloevekorn C. *CTG18.1* repeat expansion may reduce *TCF4* gene expression in corneal endothelial cells of German patients with Fuchs' dystrophy. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2017 Aug 1;255(8):1621–31.
 70. Fautsch MP, Wieben ED, Baratz KH, Bhattacharyya N, Sadan AN, Hafford-Tear NJ, et al. *TCF4*-mediated Fuchs endothelial corneal dystrophy: Insights into a common trinucleotide repeat-associated disease. *Prog Retin Eye Res*. 2021 Mar;81:100883.
 71. Minear MA, Li YJ, Rimmler J, Balajonda E, Watson S, Allingham RR, et al. Genetic screen of African Americans with Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Mol Vis*. 2013;19:2508–16.
 72. Gupta R, Kumawat BL, Paliwal P, Tandon R, Sharma N, Sen S, et al. Association of *ZEB1* and *TCF4* rs613872 changes with late onset Fuchs endothelial corneal dystrophy in patients from northern India. *Mol Vis*. 2015;21:1252–60.
 73. Mok JW, Kim HS, Joo CK. Q455V mutation in *COL8A2* is associated with Fuchs' corneal dystrophy in Korean patients. *Eye*. 2009 Apr 9;23(4):895–903.
 74. Tang H, Zhang W, Yan XM, Wang LP, Dong H, Shou T, et al. Analysis of *SLC4A11*, *ZEB1*, *LOXHD1*, *COL8A2* and *TCF4* gene sequences in a multi-generational family with late-onset Fuchs corneal dystrophy. *Int J Mol Med*. 2016 Jun;37(6):1487–500.
 75. Moschos MM, Diamantopoulou A, Gouliopoulos N, Droutsas K, Bagli E, Chatzistefanou K, et al. *TCF4* and *COL8A2* Gene Polymorphism Screening in a Greek Population of Late-onset Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. *In Vivo (Brooklyn)*. 2019 Apr 26;33(3):963–71.
 76. Kuot A, Mills R, Craig JE, Sharma S, Burdon KP. Screening of the *COL8A2* gene in an Australian family with early-onset Fuchs' endothelial corneal dystrophy. *Clin Exp Ophthalmol*. 2014 Mar 22;42(2):198–200.
 77. Tsedilina TR, Sharova E, Iakovets V, Skorodumova LO. Systematic review of *SLC4A11*, *ZEB1*, *LOXHD1*, and *AGBL1* variants in the development of Fuchs' endothelial corneal dystrophy. *Front Med (Lausanne)*. 2023 Jun 27;10.
 78. Zhang J, Wu D, Li Y, Fan Y, Chen H, Hong J, et al. Novel Mutations Associated With Various Types of Corneal Dystrophies in a Han Chinese Population. *Front Genet*. 2019 Aug 29;10.
-

-
79. Okumura N, Hayashi R, Nakano M, Tashiro K, Yoshii K, Aleff R, et al. Association of rs613872 and Trinucleotide Repeat Expansion in the TCF4 Gene of German Patients with Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. *Cornea*. 2019 Jul 1;38(7):799–805.
 80. Wieben ED, Aleff RA, Eckloff BW, Atkinson EJ, Baheti S, Middha S, et al. Comprehensive assessment of genetic variants within TCF4 in Fuchs' endothelial corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(9):6101–7.
 81. Thalamuthu A, Khor CC, Venkataraman D, Koh LW, Tan DTH, Aung T, et al. Association of *TCF4* Gene Polymorphisms with Fuchs' Corneal Dystrophy in the Chinese. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2011 Jul 27;52(8):5573.
 82. Nanda GG, Padhy B, Samal S, Das S, Alone DP. Genetic association of tcf4 intronic polymorphisms, ctg18.1 and rs17089887, with fuchs' endothelial corneal dystrophy in an Indian population. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(11):7674–80.
 83. Kuot A, Hewitt AW, Griggs K, Klebe S, Mills R, Jhanji V, et al. Association of TCF4 and CLU polymorphisms with Fuchs' endothelial dystrophy and implication of CLU and TGFBI proteins in the disease process. *European Journal of Human Genetics*. 2012 Jun 11;20(6):632–8.
 84. Mehta JS, Vithana EN, Tan DTH, Yong VHK, Yam GHF, Law RWK, et al. Analysis of the Posterior Polymorphous Corneal Dystrophy 3 Gene, *TCF8*, in Late-Onset Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2008 Jan 1;49(1):184.
 85. Rao BS, Ansar S, Arokiasamy T, Sudhir RR, Umashankar V, Rajagopal R, et al. Analysis of candidate genes *ZEB1* and *LOXHD1* in late-onset Fuchs' endothelial corneal dystrophy in an Indian cohort. *Ophthalmic Genet*. 2018 Jul 4;39(4):443–9.
 86. Chakraborty M, Das RK, Samal S, Das S, Alone DP. Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy associated risk variant, rs3768617 in LAMC1 shows allele specific binding of GFI1B. *Gene*. 2022 Apr;817:146179.
 87. Wieben ED, Aleff RA, Tang X, Kalari KR, Maguire LJ, Patel S V., et al. Gene expression in the corneal endothelium of Fuchs endothelial corneal dystrophy patients with and without expansion of a trinucleotide repeat in TCF4. *PLoS One*. 2018 Jul 2;13(7):e0200005.
 88. Chakraborty M, Jandhyam H, Basak SK, Das S, Alone DP. Intergenic variants, rs1200114 and rs1200108 are genetically associated along with a decreased ATP1B1 expression in Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. *Exp Eye Res*. 2023 Mar;228:109403.
 89. Riazuddin SA, Vithana EN, Seet LF, Liu Y, Al-Saif A, Koh LW, et al. Missense mutations in the sodium borate cotransporter SLC4A11 cause late-onset Fuchs corneal dystrophya. *Hum Mutat*. 2010 Nov;31(11):1261–8.
-

-
90. Vithana EN, Morgan PE, Ramprasad V, Tan DTH, Yong VHK, Venkataraman D, et al. SLC4A11 mutations in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2008 Mar 1;17(5):656–66.
 91. Soumitra N, Loganathan SK, Madhavan D, Ramprasad VL, Arokiasamy T, Sumathi S, et al. Biosynthetic and functional defects in newly identified SLC4A11 mutants and absence of COL8A2 mutations in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *J Hum Genet.* 2014 Aug 10;59(8):444–53.
 92. Synowiec E, Wojcik KA, Izdebska J, Binczyk E, Blasiak J, Szaflik J, et al. Polymorphisms of the Homologous Recombination Gene *RAD51* in Keratoconus and Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. *Dis Markers.* 2013;35:353–62.
 93. Wojcik K, Synowiec E, Polakowski P, Głowacki S, Izdebska J, Lloyd S, et al. Polymorphism of the Flap Endonuclease 1 Gene in Keratoconus and Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. *Int J Mol Sci.* 2014 Aug 22;15(8):14786–802.
 94. Synowiec E, Wojcik KA, Izdebska J, Blasiak J, Szaflik J, Szaflik JP. Polymorphisms of the Apoptosis-Related FAS and FAS Ligand Genes in Keratoconus and Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. *Tohoku J Exp Med.* 2014;234(1):17–27.
 95. Synowiec E, Wojcik KA, Izdebska J, Binczyk E, Szaflik J, Blasiak J, et al. Polymorphism of the LIG3 gene in keratoconus and Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2015 Mar 28;61(1):56–63.
 96. Wójcik KA, Synowiec E, Polakowski P, Błasiak J, Szaflik J, Szaflik JP. Variation in DNA Base Excision Repair Genes in Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. *Medical Science Monitor.* 2015;21:2809–27.
 97. Winkler NS, Milone M, Martinez-Thompson JM, Raja H, Aleff RA, Patel S V., et al. Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy in Patients With Myotonic Dystrophy, Type 1. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2018 Jun 15;59(7):3053.
 98. Mootha VV, Hansen B, Rong Z, Mammen PP, Zhou Z, Xing C, et al. Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy and RNA Foci in Patients With Myotonic Dystrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2017 Sep 8;58(11):4579.
 99. Kniestedt C, Taralczak M, Thiel MA, Stuermer J, Baumer A, Gloor BP. A Novel PITX2 Mutation and a Polymorphism in a 5-Generation Family with Axenfeld–Rieger Anomaly and Coexisting Fuchs' Endothelial Dystrophy. *Ophthalmology.* 2006 Oct;113(10):1791-1797.e2.
 100. Schaal S, Kunsch K, Kunsch S. *Der Mensch in Zahlen.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016.
 101. Schaaf CP, Zschocke J. *Basiswissen Humangenetik.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013.
-

-
102. Bickeböllner H, Fischer C. Einführung in die Genetische Epidemiologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007.
 103. Hunter-Zinck H, Shi Y, Li M, Gorman BR, Ji SG, Sun N, et al. Genotyping Array Design and Data Quality Control in the Million Veteran Program. *Am J Hum Genet.* 2020 Apr 2;106(4):535–48.
 104. Uffelmann E, Huang QQ, Munung NS, de Vries J, Okada Y, Martin AR, et al. Genome-wide association studies. *Nature Reviews Methods Primers.* 2021 Aug 26;1(1):59.
 105. Newman MEJ. The Structure and Function of Complex Networks. *SIAM Review.* 2003 Jan;45(2):167–256.
 106. Hartwell LH, Hopfield JJ, Leibler S, Murray AW. From molecular to modular cell biology. *Nature.* 1999 Dec;402(S6761):C47–52.
 107. García-Campos MA, Espinal-Enríquez J, Hernández-Lemus E. Pathway Analysis: State of the Art. *Front Physiol.* 2015 Dec 17;6.
 108. Brockmann T, Brockmann C, Maier AK, Schroeter J, Pleyer U, Bertelmann E, et al. Clinicopathology of graft detachment after Descemet's membrane endothelial keratoplasty. *Acta Ophthalmol.* 2014 Nov;92(7):e556-61.
 109. Zhu AY, Jaskula-Ranga V, Jun AS. Gene Editing as a Potential Therapeutic Solution for Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. *JAMA Ophthalmol.* 2018 Sep 1;136(9):969.
 110. Fisher Scientific T. Axiom 2.0 Plus Assay 96-Array Format Automated Workflow User Guide—Applied Biosystems NIMBUS Target Preparation Instrument (Pub. No. MAN0018331 C.0). 2021.
 111. Hong EP, Park JW. Sample Size and Statistical Power Calculation in Genetic Association Studies. *Genomics Inform.* 2012;10(2):117.
 112. McLaren W, Gil L, Hunt SE, Riat HS, Ritchie GRS, Thormann A, et al. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol.* 2016 Dec 6;17(1):122.
 113. Raudvere U, Kolberg L, Kuzmin I, Arak T, Adler P, Peterson H, et al. g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res.* 2019 Jul 2;47(W1):W191–8.
 114. Wray NR, Ripke S, Mattheisen M, Trzaskowski M, Byrne EM, Abdellaoui A, et al. Genome-wide association analyses identify 44 risk variants and refine the genetic architecture of major depression. *Nat Genet.* 2018 May 26;50(5):668–81.
 115. Fechner J, Neumann GB, Murza F, Matthias L, Walckling M, Brockmann C, et al. Genome-wide association study of Fuchs' endothelial corneal dystrophy in the German population. *Hum Genet.* 2025 May 12;
 116. Thul PJ, Lindskog C. The human protein atlas: A spatial map of the human proteome. *Protein Science.* 2018 Jan 10;27(1):233–44.
-

-
117. Tsitsiridis G, Steinkamp R, Giurgiu M, Brauner B, Fobo G, Frishman G, et al. CORUM: the comprehensive resource of mammalian protein complexes–2022. *Nucleic Acids Res.* 2023 Jan 6;51(D1):D539–45.
 118. Wingender E. TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jan 1;28(1):316–9.
 119. He W, Han X, Ong JS, Hewitt AW, Mackey DA, Gharahkhani P, et al. Association of Novel Loci With Keratoconus Susceptibility in a Multitrait Genome-Wide Association Study of the UK Biobank Database and Canadian Longitudinal Study on Aging. *JAMA Ophthalmol.* 2022 Jun 1;140(6):568.
 120. Wirgenes K V, Sønderby IE, Haukvik UK, Mattingdal M, Tesli M, Athanasios L, et al. TCF4 sequence variants and mRNA levels are associated with neurodevelopmental characteristics in psychotic disorders. *Transl Psychiatry.* 2012 May 8;2(5):e112–e112.
 121. Choquet H, Thai KK, Yin J, Hoffmann TJ, Kvale MN, Banda Y, et al. A large multi-ethnic genome-wide association study identifies novel genetic loci for intraocular pressure. *Nat Commun.* 2017 Dec 13;8(1):2108.
 122. Khawaja AP, Rojas Lopez KE, Hardcastle AJ, Hammond CJ, Liskova P, Davidson AE, et al. Genetic Variants Associated With Corneal Biomechanical Properties and Potentially Conferring Susceptibility to Keratoconus in a Genome-Wide Association Study. *JAMA Ophthalmol.* 2019 Sep 1;137(9):1005.
 123. Simcoe MJ, Khawaja AP, Hysi PG, Hammond CJ. Genome-wide association study of corneal biomechanical properties identifies over 200 loci providing insight into the genetic etiology of ocular diseases. *Hum Mol Genet.* 2020 Sep 15;29(18):3154–64.
 124. Teumer A, Li Y, Ghasemi S, Prins BP, Wuttke M, Hermle T, et al. Genome-wide association meta-analyses and fine-mapping elucidate pathways influencing albuminuria. *Nat Commun.* 2019 Sep 11;10(1):4130.
 125. Ivarsdottir E V, Benonisdottir S, Thorleifsson G, Sulem P, Oddsson A, Styrkarsdottir U, et al. Sequence variation at ANAPC1 accounts for 24% of the variability in corneal endothelial cell density. *Nat Commun.* 2019 Mar 20;10(1):1284.
 126. Jiang X, Dellepiane N, Pairo-Castineira E, Boutin T, Kumar Y, Bickmore WA, et al. Fine-mapping and cell-specific enrichment at corneal resistance factor loci prioritize candidate causal regulatory variants. *Commun Biol.* 2020 Dec 11;3(1):762.
 127. He W, Han X, Ong JS, Hewitt AW, Mackey DA, Gharahkhani P, et al. Association of Novel Loci With Keratoconus Susceptibility in a Multitrait Genome-Wide Association Study of the UK Biobank Database and Canadian Longitudinal Study on Aging. *JAMA Ophthalmol.* 2022 Jun 1;140(6):568–76.
-

-
128. Prislei S, Mozzetti S, Filippetti F, De Donato M, Raspaglio G, Cicchillitti L, et al. From plasma membrane to cytoskeleton: a novel function for semaphorin 6A. *Mol Cancer Ther.* 2008 Jan;7(1):233–41.
 129. Yazdani U, Terman JR. The semaphorins. *Genome Biol.* 2006;7(3):211.
 130. Gurrapu S, Tamagnone L. Transmembrane semaphorins: Multimodal signaling cues in development and cancer. *Cell Adh Migr.* 2016 Nov 13;10(6):675–91.
 131. Ebert AM, Childs SJ, Hehr CL, Cechmanek PB, McFarlane S. Sema6a and Plxn2 mediate spatially regulated repulsion within the developing eye to promote eye vesicle cohesion. *Development.* 2014 Jun 15;141(12):2473–82.
 132. Loria R, Laquintana V, Scalera S, Fraioli R, Caprara V, Falcone I, et al. SEMA6A/RhoA/YAP axis mediates tumor-stroma interactions and prevents response to dual BRAF/MEK inhibition in BRAF-mutant melanoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 2022 Dec 19;41(1):148.
 133. Shen CY, Chang YC, Chen LH, Lin WC, Lee YH, Yeh ST, et al. The extracellular SEMA domain attenuates intracellular apoptotic signaling of semaphorin 6A in lung cancer cells. *Oncogenesis.* 2018 Dec 5;7(12):95.
 134. Mitchell D.C. et al. Developmental expression of three small GTPases in the mouse eye. *Molecular Vision.* 2007;13:1144–53.
 135. Ortega MC, Santander-García D, Marcos-Ramiro B, Barroso S, Cox S, Jiménez-Alfaro I, et al. Activation of Rac1 and RhoA preserve corneal endothelial barrier function. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016 Nov 1;57(14):6210–22.
 136. Shivanna M, Rajashekhar G, Srinivas SP. Barrier dysfunction of the corneal endothelium in response to TNF- α : Role of p38 MAP kinase. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(3):1575–82.
 137. Niederkorn JY, Mayhew E, Mellon J, Hegde S. Role of tumor necrosis factor receptor expression in anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) and corneal allograft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004 Aug;45(8):2674–81.
 138. Takahashi S, Takagane K, Itoh G, Kuriyama S, Umakoshi M, Goto A, et al. CCDC85A is regulated by miR-224-3p and augments cancer cell resistance to endoplasmic reticulum stress. *Front Oncol.* 2023;13.
 139. Angrand PO, Vennin C, Le Bourhis X, Adriaenssens E. The role of long non-coding RNAs in genome formatting and expression. *Front Genet.* 2015;6:165.
 140. Pang KC, Frith MC, Mattick JS. Rapid evolution of noncoding RNAs: lack of conservation does not mean lack of function. *Trends in Genetics.* 2006 Jan;22(1):1–5.
 141. Kung JTY, Colognori D, Lee JT. Long Noncoding RNAs: Past, Present, and Future. *Genetics.* 2013 Mar 1;193(3):651–69.
-

-
142. Wang E, Chen S, Wang H, Chen T, Chakrabarti S. Non-coding RNA-mediated endothelial-to-mesenchymal transition in human diabetic cardiomyopathy, potential regulation by DNA methylation. *Cardiovasc Diabetol*. 2023 Nov 3;22(1):303.
 143. Yang S, Li H, Yao H, Zhang Y, Bao H, Wu L, et al. Long noncoding RNA ERLR mediates epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells and promotes experimental proliferative vitreoretinopathy. *Cell Death Differ*. 2021 Aug 4;28(8):2351–66.
 144. Yildirim M, Oztay F, Kayalar O, Tasci AE. Effect of long noncoding RNAs on epithelial–mesenchymal transition in A549 cells and fibrotic human lungs. *J Cell Biochem*. 2021 Aug 13;122(8):882–96.
 145. Ołdak M, Ruszkowska E, Udziela M, Oziębło D, Bińczyk E, Ścieżyńska A, et al. Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy: Strong Association with rs613872 Not Paralleled by Changes in Corneal Endothelial *TCF4* mRNA Level. *Biomed Res Int*. 2015;2015:1–6.
 146. Wang Q, Dou S, Zhang B, Jiang H, Qi X, Duan H, et al. Heterogeneity of human corneal endothelium implicates lncRNA NEAT1 in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2022 Mar;27:880–93.
 147. Qiu J, Gu R, Shi Q, Zhang X, Gu J, Xiang J, et al. Long noncoding RNA ZFAS1: A novel anti-apoptotic target in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Exp Eye Res*. 2024 Apr;241:109832.
 148. Shan K, Qiu J, Zhou R, Gu J, Zhang X, Zhang C, et al. RNA-seq identifies long non-coding RNAs as potential therapeutic targets for human corneal endothelial dysfunction under oxidative stress. *Exp Eye Res*. 2021 Dec;213:108820.
 149. Zhu YT, Chen HC, Chen SY, Tseng SCG. Nuclear p120 catenin unlocks mitotic block of contact-inhibited human corneal endothelial monolayers without disrupting adherent junctions. *J Cell Sci*. 2012 Aug 1;125(15):3636–48.
 150. Zhu Q, Zhu Y, Tighe S, Liu Y, Hu M. Engineering of Human Corneal Endothelial Cells *In Vitro*. *Int J Med Sci*. 2019;16(4):507–12.
 151. Dwivedi DJ, Pontoriero GF, Ashery-Padan R, Sullivan S, Williams T, West-Mays JA. Targeted Deletion of *AP-2 α* Leads to Disruption in Corneal Epithelial Cell Integrity and Defects in the Corneal Stroma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2005 Oct 1;46(10):3623.
 152. West-Mays JA, Sivak JM, Papagiotas SS, Kim J, Nottoli T, Williams T, et al. Positive influence of AP-2α transcription factor on cadherin gene expression and differentiation of the ocular surface. *Differentiation*. 2003 Apr;71(3):206–16.
 153. Choi SH, Koh DI, Ahn H, Kim JY, Kim Y, Hur MW. Cell fate decisions by c-Myc depend on ZBTB5 and p53. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020 Dec;533(4):1247–54.
-

-
154. Koh DI, Choi WI, Jeon BN, Lee CE, Yun CO, Hur MW. A Novel POK Family Transcription Factor, ZBTB5, Represses Transcription of p21CIP1 Gene. *Journal of Biological Chemistry*. 2009 Jul;284(30):19856–66.
 155. Tang H, Han X, Li M, Li T, Hao Y. Linc00221 modulates cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer via sponging miR-519a. *Biochimie*. 2019 Jul;162:134–43.
 156. Wan J, Zhu F, Zasadil LM, Yu J, Wang L, Johnson A, et al. A golgi-localized pool of the mitotic checkpoint component mad1 controls integrin secretion and cell migration. *Current Biology*. 2014;24(22):2687–92.
 157. Juang YL. The spindle checkpoint protein MAD1 regulates the expression of E-cadherin and prevents cell migration. *Oncol Rep*. 2011 Oct 24;
 158. Kocaba V, Katikireddy KR, Gipson I, Price MO, Price FW, Jurkunas U V. Association of the Gutta-Induced Microenvironment With Corneal Endothelial Cell Behavior and Demise in Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. *JAMA Ophthalmol*. 2018 Aug 1;136(8):886.
 159. Verlouw JAM, Clemens E, de Vries JH, Zolk O, Verkerk AJMH, am Zehnhoff-Dinnesen A, et al. A comparison of genotyping arrays. *European Journal of Human Genetics*. 2021 Nov 18;29(11):1611–24.
 160. Khatri P, Sirota M, Butte AJ. Ten Years of Pathway Analysis: Current Approaches and Outstanding Challenges. *PLoS Comput Biol*. 2012 Feb 23;8(2):e1002375.
 161. Nguyen TM, Shafi A, Nguyen T, Draghici S. Identifying significantly impacted pathways: a comprehensive review and assessment. *Genome Biol*. 2019 Dec 9;20(1):203.
 162. Marchini J, Howie B. Genotype imputation for genome-wide association studies. *Nat Rev Genet*. 2010 Jul 2;11(7):499–511.

X. DANKSAGUNG

Es gilt mein besonderer Dank folgenden Personen:

Prof. Dr. Tobias Brockmann für die Initiierung, Ermöglichung und Betreuung des Projektes

Fabia Murza und Leonard Matthias als Co-Doktoranden der parallel geführten Studien für die Zusammenarbeit und Bereitstellung der Kontrollproben

Dr. rer. nat. Guilherme Borba Neumann für seine herausragende bioinformatische und statistische Expertise sowie die Erstellung der Abbildungen

ATLAS-Biolabs mit Frau Moser und Herrn Dr. Rosecker für die zuverlässige Kommunikation, Laboration und bioinformatische Verarbeitung

Colette Leyh für die reibungslose Abwicklung des Proben-Versandes

Magdalena Sporkmann für das gründliche Lektorat

Prof. Dr. Dr. Thomas Fuchsluger für die Ermöglichung des Projektes als Direktor der Universitätsaugenklinik Rostock

Meiner Familie und meinen Freunden für motivierende Worte, Zeit und kritische Anmerkungen

Lebenslauf

Persönliche Daten

Juliane Fechner
Geb. 18.11.1989 in Hamburg

Berufserfahrung

Seit 01/2024 Ärztin in Weiterbildung für Augenheilkunde im MVZ Augenlinik Stralsund, Praxis Dr. med. M. Fechner

01/2023 – 01/2024 Ärztin in Weiterbildung für Augenheilkunde in der Universitätsmedizin Greifswald

01/2018 – 12/2022 Ärztin in Weiterbildung für Augenheilkunde in der Universitätsmedizin Rostock

Fortbildungen u.a. Wacker-Kurse, Schober-Kurs, DOG, AAD, Jackstädt-Kurs, Sonografie-Grund- & Aufbaukurs, Deutsch-Polnische Winterakademie, Baltic Eye Sea Conference, Sommerakademie Ophthalmochirurgie/Traumatologie des Auges

Forschung

Promotionsprojekt an der Universitätsaugenklinik Rostock
Thema: GWAS bei Fuchs-Endotheldystrophie
Betreuung: Prof. Dr. Tobias Brockmann

Publikation: Fechner J, Brockmann T.
Genome-wide association study of Fuchs' endothelial corneal dystrophy in the German population, Human Genetics. 2025 May 12.
doi:10.1007/s00439-025-02749-7. [Online ahead of print],
PMID: 40353861

Präsentation: Kongress der DOG 2024, Berlin, Session „DMEK & Fuchs“: Erste genomweite Assoziationsstudie zu Fuchs' endothelialer Hornhautdystrophie in Deutschland

Ausbildung

05/2017 M3 mit Note 2

05/2016 – 04/2017 Praktisches Jahr (Anästhesie, Chirurgie (Unfall- und Kinderchirurgie), Innere (Gastroenterologie und Hämato-Onkologie) im Universitätsklinikum Magdeburg)

04/2016 M2 mit Note 2

2013 – 2015	Famulaturen (Kinderchirurgische Praxis Stralsund, Kardiologie Stralsund, Augenklinik Jena, Notaufnahme Wien, Allgemeinklinik Nepal, Gynäkologie Stralsund, Kinderarztpraxis Magdeburg, Neurologie Lübeck)
09/2012	M1 mit Note 2
10/2010 – 05/2017	Medizinstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
2007 – 2009	Abitur mit der Note 1,2, Hansa-Gymnasium Stralsund
2006 – 2007	Samuel-Marsden-Collegiate School, Wellington, Neuseeland
2000 – 2006	Hansa-Gymnasium Stralsund
1996 - 2000	Grundschule Ernst-Moritz-Arndt Stralsund