

**Die Bedeutung von TGC-Repeats im Intron 2 des *TCF4*-Gens
für die Fuchs-Hornhautendotheldystrophie**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Mirjam Christine Liebsch, geb. Luther

Betreuerin:

Prof. Dr. med. Katrin Hoffmann

Gutachter:

Prof. Dr. med. Hagen Thieme, Magdeburg

PD Dr. med. Lothar Krause, Dessau

Datum der Verteidigung:

15. Oktober 2025

Referat

Die Fuchs-Hornhautendotheldystrophie (FECD) ist eine heterogene Augenerkrankung. Neben verschiedenen genetischen Loci und Veränderungen in diversen Genen wurde die FECD mit Veränderungen im *TCF4*-Gen assoziiert. Hervorzuheben sind hierbei eine Trinukleotidrepeat-expansion (TGC) im Intron 2 und ein SNP rs613872 im Intron 3 des *TCF4*-Gens.

In meiner Arbeit konnte ich den Zusammenhang beider genannter Veränderungen mit der FECD bestätigen. Dabei wurden 61 nicht verwandte Patienten mit FECD und 113 nicht verwandte Kontrollprobanden untersucht. Da sehr stark expandierte Allele nicht mit einer PCR mit zwei flankierenden Primern dargestellt werden können, wurde eine triplet-primed PCR (TP-PCR) etabliert.

Von den untersuchten Patienten tragen 77% ein expandiertes TGC-Repeatallel (> 50 TGC-Repeats) im Intron 2 des *TCF4*-Gens. In der Kontrollgruppe sind dies nur 11,5%. Die errechnete Odds Ratio beträgt 26. 85% zeigen mindestens ein - als Risikoallel gewertetes - Allel G an Stelle des beschriebenen SNPs im Intron 3 des *TCF4*-Gens. In der Kontrollgruppe sind dies nur 32%. Die errechnete Odds Ratio beträgt 12,5.

Die Ergebnisse zeigen, dass auch in unserem geographischen Gebiet die genannten genetischen Veränderungen im *TCF4*-Gen eine Assoziation zur FECD darstellen und die Wahrscheinlichkeit, an der FECD zu erkranken, bei Tragen des beschriebenen expandierten TGC-Repeatallels im Gegensatz zum Tragen eines nicht expandierten TGC-Repeatallels 26-fach erhöht ist. Im Gegensatz zum Tragen des Genotyps homozygot TT an Stelle des SNPs rs613872 ist die Wahrscheinlichkeit zu erkranken beim Tragen des beschriebenen Risikoallels G 12,5-fach erhöht.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----|---|----|
| 1. | Einleitung und Zielstellung | 1 |
| 1.1 | Fuchs-Hornhautendotheldystrophie | 1 |
| 1.2 | <i>TCF4</i> -Gen | 2 |
| 1.3 | Experimentelle Vorgehensweise und triplet-primed PCR (TP-PCR) | 3 |
| 2. | Diskussion | 7 |
| 2.1 | Ergebniszusammenfassung | 7 |
| 2.2 | Fuchs-Hornhautendotheldystrophie als Trinukleotiderkrankung | 10 |
| 2.3 | Schlussfolgerungen und Ausblick | 10 |
| 3. | Literaturverzeichnis | 13 |
| 4. | Thesen | 18 |
| | Publikationsteil | 19 |
| | Erklärungen | |

1. Einleitung und Zielstellung

Die vorliegende kumulative Dissertation basiert auf zwei Fachartikeln, die im Rahmen meiner experimentellen Doktorarbeit veröffentlicht wurden. Diese befassen sich mit verschiedenen genetischen Veränderungen, die mit dem Krankheitsbild der Fuchs-Hornhautendotheldystrophie (engl. Fuchs endothelial corneal dystrophy, kurz FECD) assoziiert sind.

1.1 Fuchs-Hornhautendotheldystrophie

Die Fuchs-Hornhautendotheldystrophie (FECD) [MIM 136800, 610158, 613267, 613268, 613269, 613270, 613271, 615523] ist eine genetisch bedingte beidseitig auftretende Erkrankung der Cornea (Grehn 2012). Erstmals wurde sie 1910 vom österreichischen Augenarzt Ernst Fuchs beschrieben (Fuchs 1910; Vedana et al. 2016).

Die Erkrankung betrifft vorrangig das Corneaendothel, die innerste Schicht der Cornea. Dieses verfügt im gesunden Zustand über einen aktiven metabolischen Pumpmechanismus, welcher die ständige Dehydratation des Corneastromas gewährleistet (Naumann et al. 1980). Es kommt bei FECD zum Untergang der Corneaendothelzellen (Schmedt et al. 2012; Grehn 2012).

Histologisch ist bei der FECD die Descemetsche Membran warzenförmig verdickt (Guttatae) (Schmedt et al. 2012; Vedana et al. 2016), die Corneaendothelzellen sind degeneriert und verlaufen gestreckt über den warzenförmigen Veränderungen. Die Endothelzellen enthalten teilweise Pigmentgranula und sind vakuolisiert (Naumann et al. 1980).

Kann das Corneaendothel aufgrund des Zellunterganges seine Pumpfunktion nicht aufrechterhalten, entsteht das Bild einer endothelialen Dekompensation mit Corneastroma- und -epithelödem. Die Transparenz der Cornea wird herabgesetzt, was die Sehschärfe stark vermindert (Naumann et al. 1980; Grehn 2012).

Bei langbestehendem Corneastroma- und -epithelödem aufgrund einer Dekompensation der Corneaendothelfunktion ist die Folge eine „Keratopathia bullosa“. Hierbei hebt sich die Basalepithelzellschicht durch die Flüssigkeitsansammlung von der Bowmanschen Membran ab. Wenn die so gebildeten Bullae platzen, führt dies zu starken Schmerzen, da die sensiblen Nerven im Bereich des Corneaepithels bloßliegen. Histologisch bilden sich zusätzlich Falten, Verdickungen und Reduplikaturen der Basalmembran der Cornea aus. Später treten zwischen Corneaepithel und Bowmanscher Membran Kollagenfasern auf, ohne Gefäße und ohne entzündliche Zeichen, was als „degenerativer Pannus“ bezeichnet wird (Naumann et al. 1980). Vor der Dekompensation der Cornea kann man bereits eine Cornea guttata als Vorstufe der FECD erkennen (Grehn 2012; Dahlmann 2020). Hierbei erscheint die Rückfläche der Cornea an der Spaltlampe durch die warzenförmigen Verdickungen der Descemetschen Membran wie gehämmert (Naumann et al. 1980).

Die einzige zur vollständigen Heilung führende Therapie ist momentan die Hornhauttransplantation (Keratoplastik). Diese sollte aufgrund besserer postoperativer Ergebnisse nicht als perforierende, sondern als lamelläre Keratoplastik durchgeführt werden. Hierzu zählt beispielsweise die Descemet's membrane endothelial keratoplasty (DMEK), bei der vom Spendergewebe lediglich Endothel und Descemet-Membran transplantiert werden (Ang et al. 2016).

Nach Manifestationsalter können zwei verschiedene Unterformen der FECD unterschieden werden.

Es gibt eine frühe Form der Erkrankung (FECD 1 [MIM 136800]), welche sich bereits im ersten Lebensjahrzehnt manifestiert. Hier werden in der Literatur lediglich Mitglieder aus neun Familien und sehr wenige sporadische Fälle beschrieben, die eine pathologische Mutation im *COL8A2*-Gen [MIM 120252] aufweisen (Biswas et al. 2001; Gottsch et al. 2005; Liskova et al. 2007; Mok et al. 2009).

Die viel häufiger auftretenden späten Formen (FECD 2-8 [MIM 610158, 613267, 613268, 613269, 613270, 613271, 615523]) manifestieren sich hingegen erst ab dem 40. Lebensjahr. Etwa 4% der US-amerikanischen Bevölkerung über 40 Jahren leiden an einer späten Form der FECD (Schmedt et al. 2012). Hier werden diverse genetische Veränderungen in einem chromosomalen Locus im Genom (FCD1 (13pter-q12.13)[MIM 610158], FCD2 (18q21.2-q21.32) [MIM 613267], FCD3 (5q33.1-q35.2) [MIM 613269], FCD4 (9p22.1-p24.1) [MIM 613271]) oder in einem Gen beschrieben (*SLC4A11* [MIM 610206, 20p13], *LOXHD1* [MIM 613072, 18q21.1], *TCF8* [MIM 189909; 10p11.22], *AGBL1* [MIM 615496, 15q25.3]), welche bis zum Beginn meiner Untersuchungen lediglich in relativ kleinen Kohorten oder einzelnen Familien dargelegt wurden (Riazuddin et al. 2009; Riazuddin et al. 2012; Riazuddin et al. 2013; Riazuddin et al. 2010b; Sundin et al. 2006a; Vithana et al. 2008; Sundin et al. 2006b; Riazuddin et al. 2010a).

1.2 TCF4-Gen

Das *TCF4*-Gen [Transcription Factor 4, auch Immunoglobulin Transcription Factor 2; *ITF2*, *SEF2-1B*, *SEF2*, *E2-2*, MIM 602272] wurde 2010 erstmals in einer genomweiten Assoziationsstudie von Baratz et al. mit der FECD in Verbindung gebracht. Neben anderen SNPs, welche unabhängig mit FECD assoziiert waren (rs17595731, rs9954153, and rs2286812), hatte die in Intron 3 liegende Variante rs613872 (c.145+42209C>A, fw-Strang) die höchste Assoziation zur FECD (Baratz et al. 2010). Mehrere Forschungsgruppen bestätigten, dass das als Risikoallel beschriebene Allel G,

entweder im Genotyp homozygot GG oder heterozygot TG, häufiger bei Patienten mit FECD vorliegt als bei Kontrollprobanden (Riazuddin et al. 2011; Li et al. 2011).

Auf der Suche nach Kandidatengenen für bipolare Störungen beschrieb eine Forschungsgruppe um Breschel 1997 erstmals eine CTG-Repeatexpansion auf Chromosom 18 (CTG18.1) (Breschel et al. 1997). 2012 wurde diese Veränderung von Wieben et al. nun TGC-Repeatexpansion genannt und als mit der FECD krankheitsassoziiert bewertet. Sie liegt ebenfalls intronisch im *TCF4*-Gen (Intron 2) (c.72+815....c.73-694). Die Referenzsequenz zeigt 25 Kopien der TGC-Repeats. Die Forschungsgruppe bewertete ein expandiertes Allel mit mehr als 50 TGC-Repeats als mit FECD krankheitsassoziiert (Wieben et al. 2012).

TCF4 liegt auf Chromosom 18 und kodiert für das E2-2-Protein. Das Transkript umfasst 20 kodierende Exons. Verschiedene Mutationen (heterozygote de novo Mutationen, welche zu Haploinsuffizienz führen und im Bereich einer de novo Mikrodeletion liegen) wurden bereits mit dem Pitt-Hopkins-Syndrom [MIM 610954] beschrieben, wobei es sich um eine seltene Entwicklungsstörung handelt, die durch schwere motorische und geistige Störungen mit typischen fazialen Dysmorphien und abnormer Atmung charakterisiert ist (Amiel et al. 2007; Zweier et al. 2007).

Sepp et al. präsentierten multiple *TCF4*-Isoformen. Die Expression wurde hierbei in unterschiedlichen Geweben untersucht, was zur Annahme führte, dass eine Gewebespezifität vorliegt (Sepp et al. 2011; Eghrari et al. 2018). Zuletzt wurde auch eine Isoform im Corneaendothel analysiert, welche bisher nicht bekannt war (Eghrari et al. 2018). Das E2-2-Protein gehört zur Familie der Klasse I basic Helix-Loop-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren. Es kann mit vielen Transkriptionsregulatoren interagieren und direkt DNA über die bHLH-Domäne binden. Es spielt eine wichtige Rolle bei Entwicklungsprozessen, unter anderem bei epithelial zu mesenchymaler Transition (Forrest et al. 2014).

1.3 Experimentelle Vorgehensweise und triplet-primed PCR (TP-PCR)

Bis zum Zeitpunkt des Beginns meiner Untersuchungen war der Zusammenhang der TGC-Repeatexpansion in Intron 2 des *TCF4*-Gens und der FECD soweit ersichtlich lediglich von einer Forschungsgruppe beschrieben worden (Wieben et al. 2012).

Vor diesem Hintergrund hatte es meine Arbeit zum Ziel, zu untersuchen, ob die beschriebene TGC-Repeatexpansion auch in der deutschen Bevölkerung als mit FECD krankheitsassoziiert bewertet werden kann und ob somit auch die genannte Assoziation bestätigt werden kann. Zudem untersuchte ich die intronische Variante rs613872, welche bis Anfang 2013 insgesamt die höchste beschriebene Assoziation mit FECD hatte (Riazuddin et al. 2011; Li et al. 2011; Baratz

et al. 2010). Hierdurch möchte ich darlegen, ob die Untersuchung auf eine der Veränderungen als diagnostischer Marker eingesetzt werden kann und sollte.

Zur Untersuchung der TGC-Repeatexpansion nutzte ich die Etablierung einer triplet-primed PCR (TP-PCR), da große expandierte Allele nicht mit einer PCR mit zwei flankierenden Primern amplifiziert werden können. Die triplet-primed PCR (TP-PCR) war zuvor lediglich für andere Trinukleotiderkrankungen beschrieben worden, unter anderem Myotone Dystrophie Typ 1 [MIM 160900] und Friedreich-Ataxie [MIM 229300] (Kakourou et al. 2010; Xunclà et al. 2010).

Ich untersuchte 61 nicht verwandte Patienten mit FECD und 113 nicht verwandte Kontrollprobanden in Bezug auf den SNP rs613872 in Intron 3 und die TGC-Repeatexpansion in Intron 2 des *TCF4*-Gens. Die Untersuchung der genannten molekulargenetischen Veränderungen erfolgte anhand DNA, isoliert aus EDTA-Blut.

Mittels Sanger-Sequenzierung wurde der Polymorphismus rs613872 im Intron 3 des *TCF4*-Gens untersucht. Da stark expandierte Allele nicht mit der herkömmlichen PCR mit zwei flankierenden Primern amplifiziert werden können, etablierten wir nach dem Vorbild von Warner et al. eine triplet-primed PCR (TP-PCR) (Warner et al. 1996).

Im Rahmen der Untersuchungen ist die genannte TGC-Repeatexpansion mittels folgendem Stufenschema analysiert worden: Zunächst erfolgte eine spezifische PCR mit zwei flankierenden Primern für alle Probanden. In der Agarosegelelektrophorese wurden die PCR-Produkte ihrer Länge nach aufgetrennt. Hatten Probanden zwei Banden im Bereich <380 bp (entsprechend weniger als 50 TGC-Repeats), wiesen die Probanden zwei Allele jeweils unter 50 TGC-Repeats auf und hatten somit einen heterozygoten Genotyp ohne TGC-Repeatexpansion. War im Gelbild hingegen nur eine Bande sichtbar, war eine Homozygotie für ein Allel <380 bp des Probanden möglich. Allerdings bestand ebenfalls die Möglichkeit, dass der Proband neben einem Wildtyp-Allel <380 bp über ein sehr großes Allel verfügt (expandiertes TGC-Repeatallel), welches nicht regelrecht amplifiziert werden konnte. Daher wurde bei den Probanden, die nur eine Bande im Gelbild zeigten, eine TP-PCR angeschlossen (Luther et al. 2016).

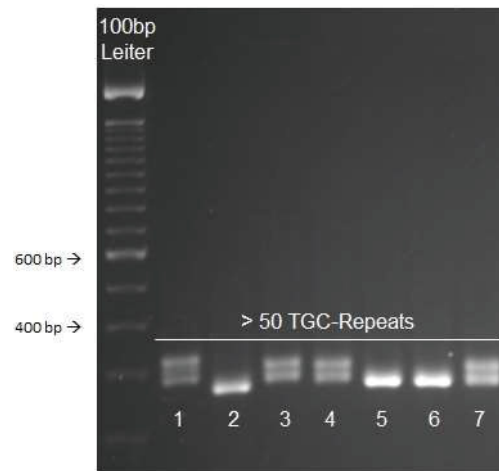


Abbildung 1: Agarosegelbild: Spuren 1,3,4,7: Heterozygotie <50 TGC-Repeats, somit Ausschluss einer TGC-Repeatexpansion im Intron 2 des *TCF4*-Gens; Spuren 2,5,6: Scheinbare Homozygotie, ein expandiertes Allel kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Eine TP-PCR wurde angeschlossen (aus Luther et al. 2016)

Die TP-PCR ist erstmals von Warner et al. 1996 zur Detektion großer CAG-Trinukleotidexpansionen im Zusammenhang mit der Diagnostik von Trinukleotiderkrankungen beschrieben worden (Warner et al. 1996).

Anders als bei der herkömmlichen PCR, bei der zwei flankierende Primer genutzt werden, kommen dabei drei verschiedene Primer zum Einsatz. Es gibt eine forward und eine reverse Reaktion, bei denen jeweils ein Primer außerhalb der Repeats, ein zweiter Primer innerhalb der Repeats und ein dritter Primer an einen nicht an das Template gebundenen Tail des zweiten Primers bindet.



Abbildung 2: TP-PCR Reaktionsübersicht. Die dicke graue Linie stellt die TGC-Repeats dar. P1 ist ein die TGC-Repeats flankierender Primer, welcher Fluoreszenz-markiert (F) ist. P2 besteht aus zwei Komponenten. Er bindet einerseits an die TGC-Repeats und besitzt andererseits noch einen nicht an die DNA bindenden Bereich (Tail). P3 ist komplementär zur Tail-Sequenz von P2 und ist dabei weder komplementär zu den TGC-Repeats noch zu einer anderen bekannten Sequenz im humanen Genom (aus Luther et al. 2016 nach Sermon et al. 2001)

Der Verlauf der PCR lässt sich wie folgt beschreiben: Zuerst binden die beiden zum Genom komplementären Primer P1 und P2. Das trinukleotidrepeat-spezifische Ende von P2 bindet in den frühen Amplifizierungsrunden zufällig an vielen Stellen innerhalb der TGC-Repeats, was zu einem Mix verschieden langer Produkte führt. P2 ist anfangs schnell aufgebraucht, da er in 10-fach geringerer Konzentration in den PCR-Ansatz gegeben wird als P1 und P3. In einem zweiten Schritt werden die gewonnenen Produkte mithilfe von P3, der komplementär zum Tail von P2 ist, weiter amplifiziert. Für nicht expandierte Allele ist die Summe der so entstandenen PCR-Produkte begrenzt, da nur eine bestimmte Menge von Repeats des amplifizierten Locus zum Binden des Primers P2 zur Verfügung steht. Bei einem expandierten Allel sind die Summe und Länge der PCR-Produkte sehr viel höher. Die anschließende Fragmentanalyse erfolgte auf dem Sequenzer und die Auswertung der Fragmentanalysen der TP-PCR mittels Zuhilfenahme der Peak Scanner Software.

Die Methode der TP-PCR wurde bisher zur Diagnostik von Myotoner Dystrophie Typ 1 [MIM 160900], Friedreich-Ataxie [MIM 229300], Chorea Huntington [MIM 143100] und Fragilem-X-Syndrom [MIM 300624] eingesetzt (Ciotti et al. 2004; Kakourou et al. 2010; Orpana et al. 2013; Sermon et al. 2001; Warner et al. 1996; Xunclà et al. 2010). Bis zum Beginn der Etablierung in unserem Institut, war sie nicht im Zusammenhang mit der FECD beschrieben worden. Mootha et al. haben schließlich im November 2013 als erste Forschungsgruppe Ergebnisse mittels TP-PCR in Zusammenhang mit der Fuchs-Hornhautendotheldystrophie veröffentlicht (Mootha et al. 2014).

Insgesamt wurden in die Untersuchung der genannten genetischen Veränderungen 61 Patienten mit Fuchs-Hornhautendotheldystrophie und 113 Kontrollprobanden eingeschlossen (Foja et al. 2017).

2. Diskussion

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der Laborarbeit zusammengefasst und im Anschluss mit bereits erfolgter Datenerhebung diskutiert.

2.1 Ergebniszusammenfassung

Je nach ausgeprägtem Genotyp des Probanden zeigt sich ein spezifisches Sequenz-Bild. Jeder Peak in der graphischen Darstellung der Sequenz nach TP-PCR stimmt mit einem fluoreszenzmarkierten TGC-Repeat überein. Der erste Peak entspricht 5 TGC-Repeats, da der zu den Repeats komplementäre Primer P2 aus 5 hintereinanderliegenden Repeats besteht und komplementär an das Genom bindet. Durch die Visualisierung der Repeats mittels Fam-markiertem Primer bekommt jedes weitere TGC-Repeat einen Peak. Durch Zählen der Peaks ist eine genaue Längenangabe möglich, wenn keine Expansion vorliegt. Weist der Proband eine Repeatexpansion auf, kann die genaue Länge der TGC-Repeatexpansion hingegen nicht exakt bestimmt werden.

Die Abszisse in der graphischen Darstellung entspricht der ungefähren bp-Länge der Fragmente. Ein Längenmarker lief mit. Auf der Ordinate ist die Signalintensität dargestellt.

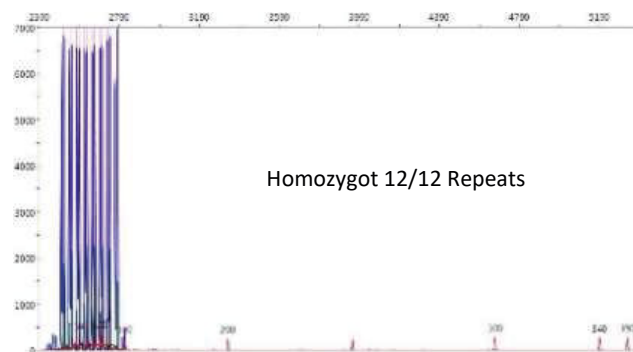


Abbildung 3: Kontrollproband ohne TGC-Repeatexpansion, homozygot 12 Repeats: Bleiben die Peaks in der Darstellung auf etwa derselben Höhe, ist von einem homozygoten Genotyp auszugehen. (aus Luther et al. 2016)

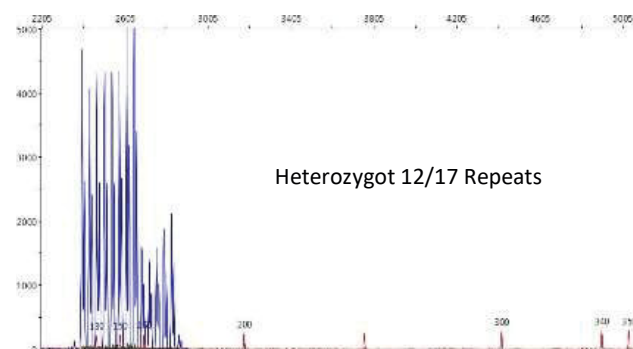


Abbildung 4: Kontrollproband ohne TGC-Repeatexpansion, heterozygot 12/17 Repeats: Gibt es in der Darstellung einen Abfall der Peakhöhe, ist der Genotyp des Probanden als heterozygot anzusehen. Das erste Allel entspricht der Anzahl an höheren Peaks und das zweite Allel der fortlaufenden Anzahl an niedrigeren Peaks (aus Luther et al. 2016)

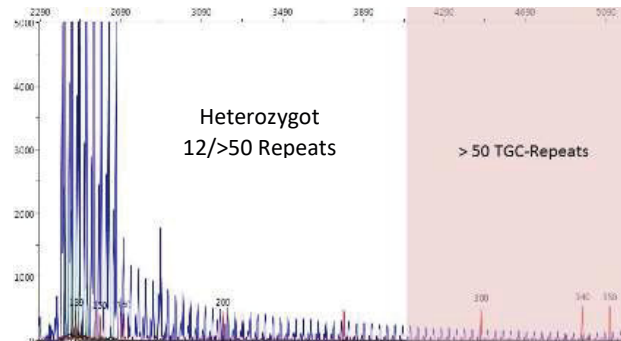


Abbildung 5: Patient mit TGC-Repeatexpansion auf einem Allel, heterozygot 12/>50 Repeats: Die ersten Peaks erscheinen hoch, dies entspricht dem ersten Allel. Daraufhin folgt ein starker Abfall der Peakhöhe, was dem zweiten Allel entspricht, welches expandiert ist. Die nun folgenden Peaks werden kontinuierlich kleiner (aus Luther et al. 2016)

Von den 61 untersuchten Patienten mit FECD wiesen 47 (77%) ein expandiertes (>50 TGC-Repeats) Allel auf. Aus der Gruppe der Kontrollprobanden konnte ein expandiertes Allel nur bei 13 von 113 Probanden (11,5%) nachgewiesen werden. So ergab sich eine Odds Ratio von 26. Das heißt, dass Personen, die ein expandiertes TGC-Repeat-Allel aufweisen, ein 26-fach höheres Risiko haben, an der FECD zu erkranken, im Vergleich zu Personen ohne expandiertes Allel.

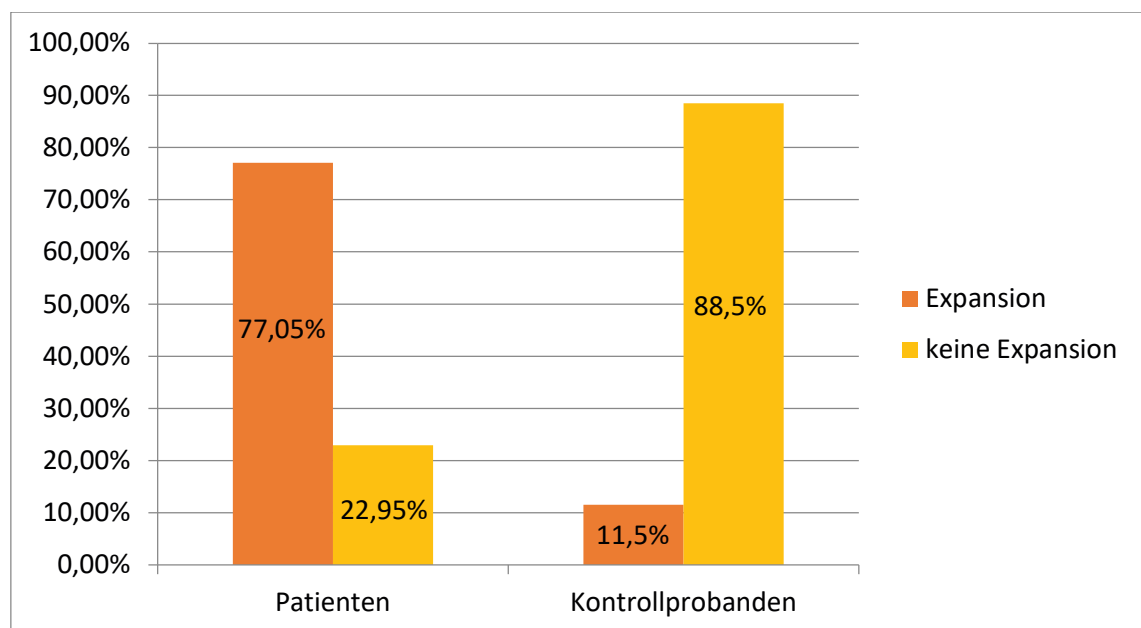


Abbildung 6: Ergebnisse der Untersuchung der TGC-Repeatexpansion im Intron 2 des *TCF4*-Gens bei Patienten und Kontrollprobanden (adaptiert aus Luther et al. 2016)

Nach Sanger-Sequenzierung des den SNP rs613872 umspannenden Genabschnittes im Intron 3 des *TCF4*-Gens wertete ich die Ergebnisse mit Hilfe der SeqPilot Software aus.

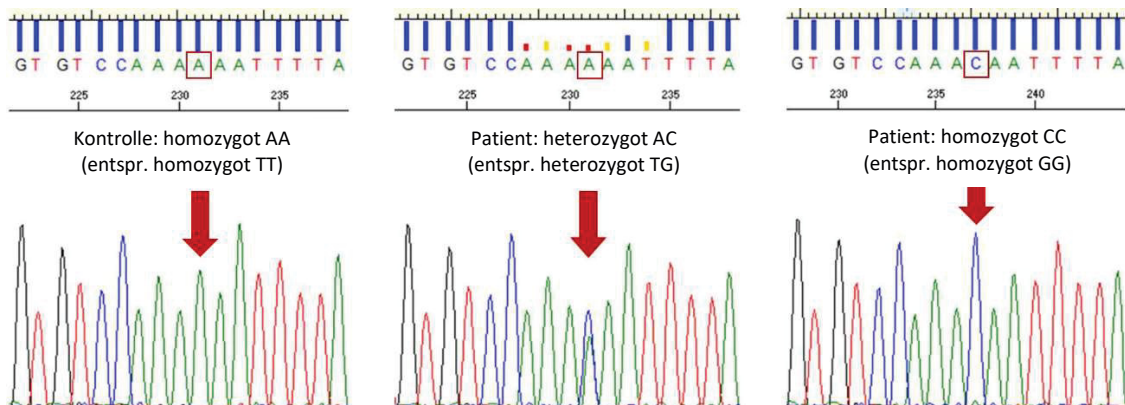


Abbildung 7: Darstellung des den SNP rs613872 umspannenden Genabschnitt vom Intron 3 des *TCF4*-Gens. Dargestellt ist jeweils die Vorwärtsreaktion. Ist in dieser Darstellung das Allel A oder C dargestellt, entspricht es dem Allel T oder G, welche in der Literatur verwendet werden (adaptiert aus Luther et al. 2016)

Nach entsprechender Auswertung des SNP rs613872 zeigten 77 von 113 Kontrollprobanden (68%) den Genotyp TT. In der Patientengruppe wurde der Genotyp GG in 13% und GT in 72% nachgewiesen. Die errechnete Odds Ratio ist 12,5. Dies entspricht bei Tragen des Risikoallels G einem 12,5-fach höheren Risiko an der FECD zu erkranken, im Gegensatz zu Personen, die kein Risikoallel G tragen (Foja et al. 2017).

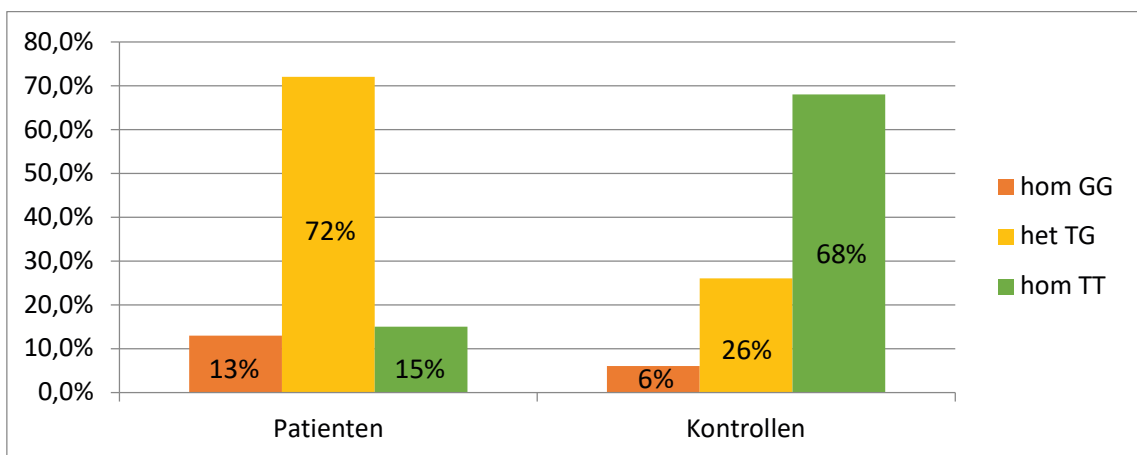


Abbildung 8: Ergebnisdarstellung der Untersuchung des Polymorphismus rs613872 im Intron 3 des *TCF4*-Gens: 44 der untersuchten Patienten (72%) sind heterozygot TG und 8 Patienten (13%) sind homozygot GG. Somit tragen 85% der Patienten zumindest 1 als Risikoallel beschriebenes Allel G. Von der Kontrollgruppe sind 7 von 113 untersuchten Patienten homozygot GG (6%) und nur 29 heterozygot TG (26%). Außerdem weisen 77 Kontrollpersonen (68%) den Genotyp TT auf.

Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen die Assoziation der FECD mit den genannten genetischen Veränderungen im *TCF4*-Gen. Das Risiko an FECD zu erkranken, ist bei Tragen eines Risikoallels G an Stelle des SNPs rs613872 im Intron 3 oder eines expandierten TGC-Repeatallels im Intron 2 signifikant höher als ohne die genannte Veränderung.

2.2 Fuchs-Hornhautendotheldystrophie als Trinukleotiderkrankung

Pathogene Trinukleotidexpansionen wurden zuvor in einigen neurodegenerativen oder neuromuskulären Erkrankungen beschrieben (beispielsweise Friedreich-Ataxie, Myotone Dystrophie Typ 1). FECD ist die erste Augenerkrankung, welche mit einer Trinukleotidexpansion assoziiert wurde (Kuot et al. 2017). Das häufige Auftreten und die gravierenden Folgen bis zum Verlust des Sehvermögens rückt die FECD als Trinukleotiderkrankung in einen besonderen Fokus.

Meiner Meinung nach ist das Prüfen auf Vorliegen eines expandierten TGC-Repeatallels insgesamt ein besserer diagnostischer Marker für die FECD. Das ergibt sich aus dem höheren Risiko und der Tatsache, dass auch in den mittlerweile vorliegenden Veröffentlichungen anderer Forschungsgruppen überwiegend ein TGC-Repeatallel eher mit der Erkrankung assoziiert ist als der SNP rs613872. Bei Betrachtung von verschiedenen Populationen wurde die Assoziation inzwischen bestätigt (USA, Australien, Russland (europäischer Teil), China, Deutschland, Schweden) (Vasanth et al. 2015; Skorodumova et al. 2018; Xing et al. 2014; Mootha et al. 2014; Kuot et al. 2017; Okumura et al. 2019; Viberg et al. 2022). Dennoch ist und bleibt die FECD eine heterogene Erkrankung. In der indischen und japanischen Bevölkerung trägt nur eine Minderheit der betroffenen Patienten ein expandiertes Allel, was zur Annahme beiträgt, dass auch andere Varianten für die FECD kausal sein müssen (Nakano et al. 2015; Nanda et al. 2014). Auch bezüglich des SNP rs613872 werden populationsspezifische Ausprägungen beschrieben und eine Signifikanz für die chinesische und indische Bevölkerung konnte nicht nachgewiesen werden (Nanda et al. 2014; Thalamuthu et al. 2011). Eine 2017 veröffentlichte genomweite Assoziationsstudie identifizierte drei neue Loci, welche bisher noch nicht mit der FECD in Verbindung gebracht worden waren (*KANK4*, *LAMC1* und *LINC00970/ATP1B1*) (Afshari et al. 2017).

2.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

Ein expandiertes TGC-Repeatallel ist bei der eurasischen Bevölkerung mit einem erhöhten Risiko assoziiert, an der FECD zu erkranken. Hieran gemessen gilt es zu untersuchen, durch welchen Mechanismus ein expandiertes Allel zur Krankheitsentstehung beiträgt. Verschiedene

Pathomechanismen wie Apoptose, oxidativer Stress, epithelial zu mesenchymale Transition und die Antwort auf ungefaltete Proteine werden schon seit längerem für die FECD diskutiert (Matthaei et al. 2019).

2015 fanden Du et al. heraus, dass Korneaendothelzellen von FECD-Patienten mit expandiertem TGC-Repeatallel poly(CUG)_nRNA beherbergen, die als RNA-Foci sichtbar gemacht werden kann. Ähnlich wie bei Myotoner Dystrophie Typ 1 (DM1) spielt die RNA-Toxizität und das Fehlspllicing eine wichtige Rolle (Du et al. 2015; Okumura et al. 2018). Unabhängig davon beschrieb eine Forschungsgruppe um Mootha et al. ebenfalls den Zusammenhang von RNA-Foci in Endothelzellen von FECD-Patienten mit expandiertem TGC-Repeatallel (Mootha et al. 2015). Soragni et al. berichteten Repeat-assoziierte non-ATG Translation bei der FECD, welche ebenfalls zuvor bei DM1 beschrieben wurde. Die expandierten TGC-Repeats werden durch non-ATG Aktivierung transkribiert und translatiert (Soragni et al. 2018).

Wieben et al. beschrieben, dass sich das mRNA Splicing-Muster in Endothelzellen von FECD-Patienten mit expandiertem TGC-Repeatallel im *TCF4*-Gen von Endothelzellen bei nicht expandiertem Allel unterscheidet. Die anders gespleißten Gene kodieren für Proteine, die am Zellkortex lokalisiert sind und zytoskelettale Proteine oder Zelladhäsionsproteine binden. Schon zuvor wurde beschrieben, dass Proteine, assoziiert mit der Zellverankerung und extrazellulärer Matrixorganisation, in FECD verändert sind (Wieben et al. 2017; Wieben et al. 2018).

Den Zusammenhang zwischen FECD (Mutation im *TCF4*-Gen, lokalisiert 18.q21.2) und DM1 (Mutation in *DMPK*-Gen, lokalisiert 19q13.32) untersuchten Winkler et al. und schlussfolgerten, dass die beiden Erkrankungen in DM1-Familien kosegregierten. Die beschriebene TGC-Repeatexpansion im *TCF4*-Gen fehlte allerdings bei DM1-Familien, was die Hypothese stützt, dass eine *DMPK*-Trinukleotidrepeatexpansion (krankheitsverursachend bei DM1) auch zur klinischen Ausprägung der FECD bei DM1 führt (Winkler et al. 2018).

Die Testung auf ein expandiertes TGC-Repeatallel im Intron 2 des *TCF4*-Gens ist wichtig für Diagnostik und Therapie der FECD. Es wurde eine Therapiemöglichkeit mit Antisense Oligonucleotides (ASOs) beschrieben. Im ex vivo-Model von FECD-Korneas wurden die RNA-Foci effektiv gehemmt und pathologische Splicingveränderungen waren reversibel (Hu et al. 2018). Da der Nachweis eines expandierten TGC-Repeatallels im Korneaendothel und peripheren Blut vergleichbar ist, sollten Hornhautspender auf Vorliegen einer *TCF4*-Repeatexpansion getestet werden, um das Risiko zu verringern, Corneas von potenziell FECD-betroffenen Spendern zu transplantieren (Foja et al. 2017).

Ob die Krankheit einen schwereren Verlauf bei Vorliegen eines expandierten TGC-Repeatallels gegenüber FECD ohne vorliegende TGC-Repeatexpansion nimmt, ist nicht abschließend geklärt.

Diverse Forschungsgruppen lieferten unterschiedliche Ergebnisse. So beschrieben Okumura et al., dass in ihrer Studie mit 398 FECD-Erkrankten und 58 Kontrollprobanden keine Assoziation zwischen der TGC-Repeatallel-Länge und der Schwere der Erkrankung bestünde, was einen Schwellenwert der Repeatlänge zur Krankheitsentstehung nahelegt (Okumura et al. 2019). Auch Skorodumova et al. fanden keine Assoziation zwischen FECD-Erkrankungsschwere und TGC-Repeat-Expansions-Status (100 FECD-Patienten und 100 Kontrollprobanden) (Skorodumova et al. 2018). Soliman et al. hingegen postulierten in einer Studie mit 139 FECD-Patienten, dass Patienten mit vorliegendem expandierten TGC-Repeatallel im Gegensatz zu Patienten ohne Vorliegen einer TGC-Repeatexpansion schwerer von der Erkrankung betroffen waren. Zudem schien die Repeatlänge mit der Erkrankungsschwere zu korrelieren, da die Keratoplastikrate mit höheren TGC-Repeatlängen anstieg (Soliman et al. 2015). Auch Vasanth et al. beschrieben einen Zusammenhang von Erkrankungsschwere und TGC-Repeatexpansion. So schien in der Patientengruppe eine monoallelische TGC-Repeatexpansion und eine biallelische TGC-Repeatexpansion eine schwerere Krankheitsausprägung hervorzurufen als ein Genotyp ohne expandiertes TGC-Repeatallel (Vasanth et al. 2015). In einer prospektiven Kohortenstudie von Soh et al. wurden 51 FECD-Patienten eingeschlossen und in eine Gruppe mit dem Vorliegen einer TGC-Repeatallelänge mindestens eines Allels von 40 oder mehr Repeats und eine Gruppe, in welcher zwei Allele mit einer TGC-Repeatlänge <40 Repeats vorlagen, eingeteilt. Lag ein expandiertes Allel vor, schien das klinische Voranschreiten von FECD in den ersten 5 Jahren des Begutachtungszeitraumes schneller. Jedoch war dieser Unterschied nur nach 5 Jahren statistisch relevant, später wurde der Unterschied kleiner und war nach 8 Jahren nicht mehr statistisch signifikant (Soh et al. 2019). Mehr Studien mit zusätzlichen klinischen Parametern wie Schnelligkeit des Erkrankungsvoranschreiten und Erkrankungsschwere, beispielsweise mittels Ausbildung von Guttae beurteilt, sind notwendig, um zu beurteilen, ob es einen Zusammenhang zwischen TGC-Repeatlänge und Erkrankungsschwere oder einen bestimmten Schwellenwert gibt, nachdem Patienten gleichstark betroffen erscheinen.

3. Literaturverzeichnis

- Afshari, N. A.; Igo, R. P.; Morris, N. J.; Stambolian, D.; Sharma, S.; Pulagam, V. L. et al. (2017): Genome-wide association study identifies three novel loci in Fuchs endothelial corneal dystrophy. In *Nature communications* 8, p. 14898. DOI: 10.1038/ncomms14898.
- Amiel, J.; Rio, M.; Pontual, L. de; Redon, R.; Malan, V.; Boddaert, N. et al. (2007): Mutations in TCF4, encoding a class I basic helix-loop-helix transcription factor, are responsible for Pitt-Hopkins syndrome, a severe epileptic encephalopathy associated with autonomic dysfunction. In *American journal of human genetics* 80 (5), pp. 988–993. DOI: 10.1086/515582.
- Ang, M.; Wilkins, M. R.; Mehta, J. S.; Tan, D. (2016): Descemet membrane endothelial keratoplasty. In *The British journal of ophthalmology* 100 (1), pp. 15–21. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2015-306837.
- Baratz, K. H.; Tosakulwong, N.; Ryu, E.; Brown, W. L.; Branham, K.; Chen, W. et al. (2010): E2-2 protein and Fuchs's corneal dystrophy. In *The New England journal of medicine* 363 (11), pp. 1016–1024. DOI: 10.1056/NEJMoa1007064.
- Biswas, S.; Munier, F. L.; Yardley, J.; Hart-Holden, N.; Perveen, R.; Cousin, P. et al. (2001): Missense mutations in COL8A2, the gene encoding the alpha2 chain of type VIII collagen, cause two forms of corneal endothelial dystrophy. In *Human molecular genetics* 10 (21), pp. 2415–2423. DOI: 10.1093/hmg/10.21.2415.
- Breschel, T. S.; McInnis, M. G.; Margolis, R. L.; Sirugo, G.; Corneliussen, B.; Simpson, S. G. et al. (1997): A novel, heritable, expanding CTG repeat in an intron of the SEF2-1 gene on chromosome 18q21.1. In *Human molecular genetics* 6 (11), pp. 1855–1863. DOI: 10.1093/hmg/6.11.1855.
- Ciotti, P.; Di Maria, E.; Bellone, E.; Ajmar, F.; Mandich, P. (2004): Triplet repeat primed PCR (TP PCR) in molecular diagnostic testing for Friedreich ataxia. In *J Mol Diagn* 6 (4), pp. 285–289. DOI: 10.1016/S1525-1578(10)60523-5.
- Dahlmann, C. (2020): BASICS Augenheilkunde. 5. Auflage (Basics).
- Du, J.; Aleff, R. A.; Soragni, E.; Kalari, K.; Nie, J.; Tang, X. et al. (2015): RNA toxicity and missplicing in the common eye disease fuchs endothelial corneal dystrophy. In *The Journal of biological chemistry* 290 (10), pp. 5979–5990. DOI: 10.1074/jbc.M114.621607.
- Eghrari, A. O.; Vasanth, S.; Gapsis, B. C.; Bison, H.; Jurkunas, U.; Riazuddin, S. A.; Gottsch, J. D. (2018): Identification of a Novel TCF4 Isoform in the Human Corneal Endothelium. In *Cornea* 37 (7), pp. 899–903. DOI: 10.1097/ICO.0000000000001521.
- Foja, S.; Luther, M.; Hoffmann, K.; Rupprecht, A.; Gruenauer-Kloevekorn, C. (2017): CTG18.1 repeat expansion may reduce TCF4 gene expression in corneal endothelial cells of German patients with Fuchs' dystrophy. In *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie* 255 (8), pp. 1621–1631. DOI: 10.1007/s00417-017-3697-7.
- Forrest, M. P.; Hill, M. J.; Quantock, A. J.; Martin-Rendon, E.; Blake, D. J. (2014): The emerging roles of TCF4 in disease and development. In *Trends in molecular medicine* 20 (6), pp. 322–331. DOI: 10.1016/j.molmed.2014.01.010.
- Fuchs, E. (1910): Dystrophia epithelialis corneae. In *Graefes Arhiv für Ophthalmologie* 76 (3), pp. 478–508. DOI: 10.1007/BF01986362.
- Gottsch, J. D.; Sundin, O. H.; Liu, S. H.; Jun, A. S.; Broman, K. W.; Stark, W. J. et al. (2005): Inheritance of a novel COL8A2 mutation defines a distinct early-onset subtype of fuchs corneal

- dystrophy. In *Investigative ophthalmology & visual science* 46 (6), pp. 1934–1939. DOI: 10.1167/iovs.04-0937.
- Grehn, F. (2012): Augenheilkunde. 31. überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch). Available online at <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-11333-8>.
- Hu, J.; Rong, Z.; Gong, X.; Zhou, Z.; Sharma, V. K.; Xing, C. et al. (2018): Oligonucleotides targeting TCF4 triplet repeat expansion inhibit RNA foci and mis-splicing in Fuchs' dystrophy. In *Human molecular genetics* 27 (6), pp. 1015–1026. DOI: 10.1093/hmg/ddy018.
- Kakourou, G.; Dhanjal, S.; Mamas, T.; Serhal, P.; Delhanty, J. D.; SenGupta, S. B. (2010): Modification of the triplet repeat primed polymerase chain reaction method for detection of the CTG repeat expansion in myotonic dystrophy type 1: application in preimplantation genetic diagnosis. In *Fertil. Steril.* 94 (5), pp. 1674–1679. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.10.050.
- Kuot, A.; Hewitt, A. W.; Snibson, G. R.; Souzeau, E.; Mills, R.; Craig, J. E. et al. (2017): TGC repeat expansion in the TCF4 gene increases the risk of Fuchs' endothelial corneal dystrophy in Australian cases. In *PloS one* 12 (8), e0183719. DOI: 10.1371/journal.pone.0183719.
- Li, Y.; Minear, M. A.; Rimmmler, J.; Zhao, B.; Balajonda, E.; Hauser, M. A. et al. (2011): Replication of TCF4 through association and linkage studies in late-onset Fuchs endothelial corneal dystrophy. In *PloS one* 6 (4), e18044. DOI: 10.1371/journal.pone.0018044.
- Liskova, P.; Prescott, Q.; Bhattacharya, S. S.; Tuft, S. J. (2007): British family with early-onset Fuchs' endothelial corneal dystrophy associated with p.L450W mutation in the COL8A2 gene. In *The British journal of ophthalmology* 91 (12), pp. 1717–1718. DOI: 10.1136/bjo.2007.115154.
- Luther, M.; Grünauer-Kloevekorn, C.; Weidle, E.; Passarge, E.; Rupprecht, A.; Hoffmann, K.; Foja, S. (2016): TGC-Repeats im Intron 2 des TCF4-Gens haben eine große Vorhersagekraft bezüglich Fuchs-Hornhautendotheldystrophie. In *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 233 (2), pp. 187–194. DOI: 10.1055/s-0035-1546138.
- Matthaei, M.; Hribek, A.; Clahsen, T.; Bachmann, B.; Cursiefen, C.; Jun, A. S. (2019): Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy: Clinical, Genetic, Pathophysiologic, and Therapeutic Aspects. In *Annual review of vision science* 5, pp. 151–175. DOI: 10.1146/annurev-vision-091718-014852.
- Mok, J.; Kim, H.; Joo, C. (2009): Q455V mutation in COL8A2 is associated with Fuchs' corneal dystrophy in Korean patients. In *Eye (London, England)* 23 (4), pp. 895–903. DOI: 10.1038/eye.2008.116.
- Mootha, V. V.; Gong, X.; Ku, H.; Xing, C. (2014): Association and familial segregation of CTG18.1 trinucleotide repeat expansion of TCF4 gene in Fuchs' endothelial corneal dystrophy. In *Investigative ophthalmology & visual science* 55 (1), pp. 33–42. DOI: 10.1167/iovs.13-12611.
- Mootha, V. V.; Hussain, I.; Cunnusamy, K.; Graham, E.; Gong, X.; Neelam, S. et al. (2015): TCF4 Triplet Repeat Expansion and Nuclear RNA Foci in Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy. In *Investigative ophthalmology & visual science* 56 (3), pp. 2003–2011. DOI: 10.1167/iovs.14-16222.
- Nakano, M.; Okumura, N.; Nakagawa, H.; Koizumi, N.; Ikeda, Y.; Ueno, M. et al. (2015): Trinucleotide Repeat Expansion in the TCF4 Gene in Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy in Japanese. In *Investigative ophthalmology & visual science* 56 (8), pp. 4865–4869. DOI: 10.1167/iovs.15-17082.
- Nanda, G. G.; Padhy, B.; Samal, S.; Das, S.; Alone, D. P. (2014): Genetic association of TCF4 intronic polymorphisms, CTG18.1 and rs17089887, with Fuchs' endothelial corneal dystrophy in an Indian population. In *Investigative ophthalmology & visual science* 55 (11), pp. 7674–7680. DOI: 10.1167/iovs.14-15297.

- Naumann, G. O. H.; Apple, D. J.; Doerr, W.; Uehlinger, E.; Seifert, G.; Domarus, D. von et al. (1980): Pathologie des Auges. With assistance of Hans Sautter. Berlin: Springer-Verlag (Spezielle pathologische Anatomie, ein Lehr- und Nachschlagewerk / herausgegeben von Wilhelm Doerr ...; Bd. 12).
- Okumura, N.; Hayashi, R.; Koizumi, N. (2018): Perspective of Future Potent Therapies for Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. In *The open ophthalmology journal* 12, pp. 154–163. DOI: 10.2174/1874364101812010154.
- Okumura, N.; Hayashi, R.; Nakano, M.; Tashiro, K.; Yoshii, K.; Aleff, R. et al. (2019): Association of rs613872 and Trinucleotide Repeat Expansion in the TCF4 Gene of German Patients With Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. In *Cornea* 38 (7), pp. 799–805. DOI: 10.1097/ICO.0000000000001952.
- Orpana, A. K.; Ho, T. H.; Alagrund, K.; Ridanpää, M.; Aittomäki, K.; Stenman, J. (2013): Novel heat pulse extension-PCR-based method for detection of large CTG-repeat expansions in myotonic dystrophy type 1. In *J Mol Diagn* 15 (1), pp. 110–115. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2012.07.004.
- Riazuddin, S. A.; Eghrari, A. O.; Al-Saif, A.; Davey, L.; Meadows, D. N.; Katsanis, N.; Gottsch, J. D. (2009): Linkage of a mild late-onset phenotype of Fuchs corneal dystrophy to a novel locus at 5q33.1-q35.2. In *Investigative ophthalmology & visual science* 50 (12), pp. 5667–5671. DOI: 10.1167/iovs.09-3764.
- Riazuddin, S. A.; McGlumphy, E. J.; Yeo, W. S.; Wang, J.; Katsanis, N.; Gottsch, J. D. (2011): Replication of the TCF4 intronic variant in late-onset Fuchs corneal dystrophy and evidence of independence from the FCD2 locus. In *Investigative ophthalmology & visual science* 52 (5), pp. 2825–2829. DOI: 10.1167/iovs.10-6497.
- Riazuddin, S. A.; Parker, D. S.; McGlumphy, E. J.; Oh, E. C.; Iliff, B. W.; Schmedt, T. et al. (2012): Mutations in LOXHD1, a recessive-deafness locus, cause dominant late-onset Fuchs corneal dystrophy. In *American journal of human genetics* 90 (3), pp. 533–539. DOI: 10.1016/j.ajhg.2012.01.013.
- Riazuddin, S. A.; Vasanth, S.; Katsanis, N.; Gottsch, J. D. (2013): Mutations in AGBL1 cause dominant late-onset Fuchs corneal dystrophy and alter protein-protein interaction with TCF4. In *American journal of human genetics* 93 (4), pp. 758–764. DOI: 10.1016/j.ajhg.2013.08.010.
- Riazuddin, S. A.; Vithana, E. N.; Seet, L.; Liu, Y.; Al-Saif, A.; Koh, L. W. et al. (2010a): Missense mutations in the sodium borate cotransporter SLC4A11 cause late-onset Fuchs corneal dystrophy. In *Human mutation* 31 (11), pp. 1261–1268. DOI: 10.1002/humu.21356.
- Riazuddin, S. A.; Zaghloul, N. A.; Al-Saif, A.; Davey, L.; Diplas, B. H.; Meadows, D. N. et al. (2010b): Missense mutations in TCF8 cause late-onset Fuchs corneal dystrophy and interact with FCD4 on chromosome 9p. In *American journal of human genetics* 86 (1), pp. 45–53. DOI: 10.1016/j.ajhg.2009.12.001.
- Schmedt, T.; Silva, M. M.; Ziaei, A.; Jurkunas, U. (2012): Molecular bases of corneal endothelial dystrophies. In *Experimental eye research* 95 (1), pp. 24–34. DOI: 10.1016/j.exer.2011.08.002.
- Sepp, M.; Kannike, K.; Eesmaa, A.; Urb, M.; Timmusk, T. (2011): Functional diversity of human basic helix-loop-helix transcription factor TCF4 isoforms generated by alternative 5' exon usage and splicing. In *PloS one* 6 (7), e22138. DOI: 10.1371/journal.pone.0022138.
- Sermon, K.; Seneca, S.; Rycke, M. de; Goossens, V.; van de Velde, H.; Vos, A. de et al. (2001): PGD in the lab for triplet repeat diseases - myotonic dystrophy, Huntington's disease and Fragile-X syndrome. In *Molecular and cellular endocrinology* 183 Suppl 1, S77-85. DOI: 10.1016/S0303-7207(01)00572-x.

- Skorodumova, L. O.; Belodedova, A. V.; Antonova, O. P.; Sharova, E. I.; Akopian, T. A.; Selezneva, O. V. et al. (2018): CTG18.1 Expansion is the Best Classifier of Late-Onset Fuchs' Corneal Dystrophy Among 10 Biomarkers in a Cohort From the European Part of Russia. In *Investigative ophthalmology & visual science* 59 (11), pp. 4748–4754. DOI: 10.1167/iovs.18-24590.
- Soh, Y. Q.; Peh Swee Lim, G.; Htoon, H. M.; Gong, X.; Mootha, V. V.; Vithana, E. N. et al. (2019): Trinucleotide repeat expansion length as a predictor of the clinical progression of Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy. In *PloS one* 14 (1), e0210996. DOI: 10.1371/journal.pone.0210996.
- Soliman, A. Z.; Xing, C.; Radwan, S. H.; Gong, X.; Mootha, V. V. (2015): Correlation of Severity of Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy With Triplet Repeat Expansion in TCF4. In *JAMA ophthalmology* 133 (12), pp. 1386–1391. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2015.3430.
- Soragni, E.; Petrosyan, L.; Rinkoski, T. A.; Wieben, E. D.; Baratz, K. H.; Fautsch, M. P.; Gottesfeld, J. M. (2018): Repeat-Associated Non-ATG (RAN) Translation in Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy. In *Investigative ophthalmology & visual science* 59 (5), pp. 1888–1896. DOI: 10.1167/iovs.17-23265.
- Sundin, O. H.; Broman, K. W.; Chang, H. H.; Vito, E. C. L.; Stark, W. J.; Gottsch, J. D. (2006a): A common locus for late-onset Fuchs corneal dystrophy maps to 18q21.2-q21.32. In *Investigative ophthalmology & visual science* 47 (9), pp. 3919–3926. DOI: 10.1167/iovs.05-1619.
- Sundin, O. H.; Jun, A. S.; Broman, K. W.; Liu, S. H.; Sheehan, S. E.; Vito, E. C. L. et al. (2006b): Linkage of late-onset Fuchs corneal dystrophy to a novel locus at 13pTel-13q12.13. In *Investigative ophthalmology & visual science* 47 (1), pp. 140–145. DOI: 10.1167/iovs.05-0578.
- Thalamuthu, A.; Khor, C. C.; Venkataraman, D.; Koh, L. W.; Tan, D. T. H.; Aung, T. et al. (2011): Association of TCF4 gene polymorphisms with Fuchs' corneal dystrophy in the Chinese. In *Investigative ophthalmology & visual science* 52 (8), pp. 5573–5578. DOI: 10.1167/iovs.11-7568.
- Vasanth, S.; Eghrari, A. O.; Gapsis, B. C.; Wang, J.; Haller, N. F.; Stark, W. J. et al. (2015): Expansion of CTG18.1 Trinucleotide Repeat in TCF4 Is a Potent Driver of Fuchs' Corneal Dystrophy. In *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56 (8), p. 4531. DOI: 10.1167/iovs.14-16122.
- Vedana, G.; Villarreal, G.; Jun, A. S. (2016): Fuchs endothelial corneal dystrophy: current perspectives. In *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)* 10, pp. 321–330. DOI: 10.2147/OPHTH.S83467.
- Viberg, A.; Westin, I. M.; Golovleva, I.; Byström, B. (2022): TCF4 trinucleotide repeat expansion in Swedish cases with Fuchs' endothelial corneal dystrophy. In *Acta ophthalmologica* 100 (5), pp. 541–548. DOI: 10.1111/aos.15032.
- Vithana, E. N.; Morgan, P. E.; Ramprasad, V.; Tan, D. T. H.; Yong, V. H. K.; Venkataraman, D. et al. (2008): SLC4A11 mutations in Fuchs endothelial corneal dystrophy. In *Human molecular genetics* 17 (5), pp. 656–666. DOI: 10.1093/hmg/ddm337.
- Warner, J. P.; Barron, L. H.; Goudie, D.; Kelly, K.; Dow, D.; Fitzpatrick, D. R.; Brock, D. J. (1996): A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR. In *Journal of medical genetics* 33 (12), pp. 1022–1026. DOI: 10.1136/jmg.33.12.1022.
- Wieben, E. D.; Aleff, R. A.; Tang, X.; Butz, M. L.; Kalari, K. R.; Highsmith, E. W. et al. (2017): Trinucleotide Repeat Expansion in the Transcription Factor 4 (TCF4) Gene Leads to Widespread mRNA Splicing Changes in Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy. In *Investigative ophthalmology & visual science* 58 (1), pp. 343–352. DOI: 10.1167/iovs.16-20900.

- Wieben, E. D.; Aleff, R. A.; Tang, X.; Kalari, K. R.; Maguire, L. J.; Patel, S. V. et al. (2018): Gene expression in the corneal endothelium of Fuchs endothelial corneal dystrophy patients with and without expansion of a trinucleotide repeat in TCF4. In *PloS one* 13 (7), e0200005. DOI: 10.1371/journal.pone.0200005.
- Wieben, E. D.; Aleff, R. A.; Tosakulwong, N.; Butz, M. L.; Highsmith, W. E.; Edwards, A. O.; Baratz, K. H. (2012): A common trinucleotide repeat expansion within the transcription factor 4 (TCF4, E2-2) gene predicts Fuchs corneal dystrophy. In *PloS one* 7 (11), e49083. DOI: 10.1371/journal.pone.0049083.
- Winkler, N. S.; Milone, M.; Martinez-Thompson, J. M.; Raja, H.; Aleff, R. A.; Patel, S. V. et al. (2018): Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy in Patients With Myotonic Dystrophy, Type 1. In *Investigative ophthalmology & visual science* 59 (7), pp. 3053–3057. DOI: 10.1167/iovs.17-23160.
- Xing, C.; Gong, X.; Hussain, I.; Khor, C.; Tan, D. T. H.; Aung, T. et al. (2014): Transethnic replication of association of CTG18.1 repeat expansion of TCF4 gene with Fuchs' corneal dystrophy in Chinese implies common causal variant. In *Investigative ophthalmology & visual science* 55 (11), pp. 7073–7078. DOI: 10.1167/iovs.14-15390.
- Xunclà, M.; Rodríguez-Revenga, L.; Madrigal, I.; Jiménez, D.; Milà, M.; Badenas, C. (2010): Protocol proposal for Friedreich ataxia molecular diagnosis using fluorescent and triplet repeat primed polymerase chain reaction. In *Transl Res* 156 (5), pp. 309–314. DOI: 10.1016/j.trsl.2010.08.001.
- Zweier, C.; Peippo, M. M.; Hoyer, J.; Sousa, S.; Bottani, A.; Clayton-Smith, J. et al. (2007): Haploinsufficiency of TCF4 causes syndromal mental retardation with intermittent hyperventilation (Pitt-Hopkins syndrome). In *American journal of human genetics* 80 (5), pp. 994–1001. DOI: 10.1086/515583.

4. Thesen der Dissertation

1. Ein expandiertes TGC-Repeatallel im Intron 2 des *TCF4*-Gens und die Ausprägung des Risikoallels G an Stelle des SNP rs613872 im Intron 3 des *TCF4*-Gens sind mit der FECD assoziiert.
2. Bei Ausprägung der unter 1. beschriebenen Veränderungen ist das Risiko an der FECD zu erkranken signifikant erhöht.
3. Der Nachweis eines expandierten TGC-Repeatallels ist ein besserer diagnostischer Marker zur FECD-Erkennung als die Ausprägung des Risikoallels G an der Stelle des SNP rs613872.
4. Patienten, bei denen die TGC-Repeatexpansion in Leukozyten nachgewiesen wurde, zeigen auch bei der Untersuchung des Hornhautendothels ein expandiertes TGC-Repeatallel, was für die Testung auf die Veränderung von potenziellen Hornhautspendern spricht.
5. Die Untersuchung auf ein expandiertes TGC-Repeatallel ist auch im Hinblick auf neue Therapieoptionen wichtig.

Publikationsteil

Folgende Publikationen sind Bestandteil der vorliegenden Dissertation:

I. Originalarbeiten in Zeitschriften mit Gutachterverfahren

1. Luther, M.; Grünauer-Kloevekorn, C.; Weidle, E.; Passarge, E.; Rupprecht, A.; Hoffmann, K.; Foja, S. (2016): TGC-Repeats im Intron 2 des TCF4-Gens haben eine große Vorhersagekraft bezüglich Fuchs-Hornhautendotheldystrophie, veröffentlicht in *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 233 (2), pp. 187–194. DOI: 10.1055/s-0035-1546138

Die Genehmigung für Abdruck und Veröffentlichung im Rahmen der vorliegenden Dissertation liegt von der Thieme Verlag KG per E-Mail vom 04. September 2024 mit Verweis auf Thiemes Veröffentlichungsrichtlinien vor.

2. Foja, S.; Luther, M.; Hoffmann, K.; Rupprecht, A.; Gruenauer-Kloevekorn, C. (2017): CTG18.1 repeat expansion may reduce TCF4 gene expression in corneal endothelial cells of German patients with Fuchs' dystrophy. veröffentlicht in *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology* 255 (8), pp. 1621–1631. DOI: 10.1007/s00417-017-3697-7

Die Genehmigung für Abdruck und Veröffentlichung im Rahmen der vorliegenden Dissertation liegt vom Verlag SpringerNature per E-Mail vom 13. September 2024 vor.

II. Posterpräsentationen im Peer-Review-Verfahren

1. Gruenauer-Kloevekorn, C.; Rupprecht, A.; Foja, S.; Luther, M.; Hoffmann, K.
Veränderungen im *TCF4* Gen als prädiktiver Marker bei der Fuchs'schen Hornhautdystrophie
112. Tagung der DOG, September 2014, Leipzig
2. Foja, S.; Hoffmann, K.; Luther, M.; Gruenauer-Kloevekorn, C.
Mutationsanalyse im *TCF4* Gen nach komplizierter DMEK – welche Rolle spielt das Spendergewebe?
113. Tagung der DOG; September 2015, Berlin
3. Gruenauer-Kloevekorn, C.; Hoffmann, K.; Luther, M.; Foja, S.
Untersuchungen im *TCF4* Gen und im Operationsverlauf als prädiktiver Marker für Komplikationen nach DMEK
113. Tagung der DOG; September 2015, Berlin
4. Luther, M.; Foja, S.; Hoffmann, K.; Gruenauer-Kloevekorn, C.
TGC-Repeats im Intron 2 des *TCF4* Gens haben eine große Vorhersagekraft bezüglich Fuchs'scher Hornhautendotheldystrophie
113. Tagung der DOG; September 2015, Berlin

TGC-Repeats im Intron 2 des TCF4-Gens haben eine große Vorhersagekraft bezüglich Fuchs-Hornhautendotheldystrophie

TGC Repeats in Intron 2 of the TCF4 Gene have a Good Predictive Power Regarding to Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy

Autoren

M. Luther¹, C. Grünauer-Kloeveborn², E. Weidle³, E. Passarge⁴, A. Rupprecht², K. Hoffmann¹, S. Foja¹

Institute

¹ Institut für Humangenetik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

² Augenärzte am Markt, Praxisklinik Halle

³ Augenklinik, Katharinenhospital Stuttgart

⁴ Institut für Humangenetik, Universität Leipzig

Schlüsselwörter

- TCF4-Gen
- LOXHD1-Gen
- Fuchs-Hornhautendotheldystrophie
- Repeat-Expansion
- TP-PCR

Key words

- TCF4 gene
- LOXHD1 gene
- Fuchs endothelial corneal dystrophy
- repeat expansion
- TP-PCR

eingereicht 10. 3. 2015
akzeptiert 3. 5. 2015

Bibliografie

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1546138>
Online-publiziert 17.8.2015
Klin Monatsbl Augenheilkd 2016; 233: 187–194 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York · ISSN 0023-2165

Korrespondenzadresse

Mirjam Luther
Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
Institut für Humangenetik
Magdeburger Straße 2
06112 Halle
Tel.: + 49/(0)345/557 42 92
Fax: + 49/(0)345/557 42 93
mirjam.410@online.de

Zusammenfassung

Hintergrund: Als molekulargenetische Ursache der Fuchs-Hornhautendotheldystrophie (FECD), eine der häufigsten Indikationen für eine Keratoplastik, wurde sowohl eine TGC-Trinukleotid-Repeat-Expansion im Intron 2 des TCF4-Gens als auch das Allel G des Polymorphismus rs613872 im Intron 3 desselben Gens in verschiedenen Arbeiten beschrieben. Unser Ziel war es, die molekulargenetische Ursache in der deutschen Bevölkerung zu untersuchen und das Odds Ratio als Indikator für die Chance zu erkranken zu berechnen.

Material und Methoden: Wir untersuchten 42 nicht verwandte Patienten mit FECD, 93 nicht verwandte Kontrollprobanden und 17 Mitglieder einer Familie mit 4 betroffenen Patienten auf beide beschriebene Veränderungen im TCF4-Gen. Die TGC-Repeats wurden mit spezifischer PCR amplifiziert, die gewonnenen Produkte elektrophoretisch aufgetrennt und mit einer Triplet-primed PCR untersucht. Die Untersuchung des Polymorphismus rs613872 erfolgte durch Sanger-Sequenzierung. Alle codierenden Exons der benachbarten Gene TCF4 und LOXHD1 wurden bei 6 Patienten nach Sanger sequenziert, um eventuelle Mutationen in diesen Genen als Krankheitsursache auszuschließen.

Ergebnisse: Von den 42 untersuchten nicht verwandten Patienten hatten 33 (79%) eine TGC-Repeat-Expansion (> 50 TGC-Repeats) im Intron 2 des TCF4-Gens. Bei 93 Kontrollprobanden waren dies nur 10 (10,8%). Für den Polymorphismus rs613872 im Intron 3 des TCF4-Gens zeigten sich 33 der 42 nicht verwandten Patienten (78,6%) heterozygot TG und 4 homozygot GG (9,5%). Von der Kontrollgruppe zeigten sich 65 der untersuchten 93 Probanden homozygot TT (69,9%) und nur 21 heterozygot TG (22,6%). Bei der Sequenzierung der codierenden Exons von TCF4 und LOXHD1 konnte keine mit der Erkrankung beschriebene

Abstract

Background: Fuchs endothelial corneal dystrophy (FECD) is one of the most common indications for corneal transplants. FECD is associated with various genes, e.g., COL8A2 or SLC4A11. Among other things a TGC trinucleotide repeat expansion in intron 2 of the TCF4 gene has been characterised in FECD patients and the allele G of the polymorphism rs613872 in intron 3 of the same gene has been associated with this disease. Our intention was to investigate sources in molecular genetics in the German population and to calculate the odds ratio as indicator for the chance to suffer from FECD.

Patients and Method: 42 unrelated FECD patients, 93 unrelated controls and 17 members of a family with four FECD affected patients have been examined for the described changes in the TCF4 gene. After amplification of the TGC repeats with specific PCR the obtained products were electrophoretically divided according to their length and investigated with a triplet-primed PCR. Polymorphism rs613872 was analysed by Sanger sequencing. All coding exons of the adjacent genes TCF4 and LOXHD1 were sequenced in six patients in order to exclude potential disease associated mutations.

Results: 33 out of 42 unrelated analysed patients (79%) had a TGC repeat expansion (> 50 TGC repeats) in intron 2 of the TCF4 gene. Out of 93 controls only 10 (10.8%) showed an expanded allele. In the family the four diseased and four healthy subjects of the 17 examined family members had an expanded allele. Analysis of the polymorphism rs613872 in intron 3 of the TCF4 gene exhibited 33 of 42 unrelated patients (78.6%) heterozygous TG and four homozygous GG (9.5%). 65 of 93 controls were homozygous TT (69.9%) and only 21 heterozygous TG (22.6%). Of the 17 family members nine had the genotype TG, including the four FECD patients. Sequencing of the coding exons of

Variante gezeigt werden. Das Odds Ratio als Maßzahl, von der Erkrankung betroffen zu sein, ist in unseren Daten bei expandiertem TGC-Repeat-Allel 30. Die Chance, von der FECD betroffen zu sein, ist so 30-fach erhöht. Für Träger des Risikoallels G besteht eine 16,5-fach erhöhte Chance.

Diskussion: Auch bei Patienten aus unserem geografischen Gebiet stellt ein expandiertes Allel mit mehr als 50 TGC-Repeats im Intron 2 und das beschriebene Risikoallel G des Polymorphismus rs613872 im Intron 3 des TCF4-Gens eine Assoziation mit einer bis zu 30-fach höheren Chance dar, an der FECD zu erkranken. Durch die Molekulargenetik können somit auch Spender mit noch nicht klinisch erfasster FECD detektiert werden.

Einführung

Die Fuchs-Hornhautendotheldystrophie (FECD) ist eine Endothelzellschwäche der Kornea. Wie alle Hornhautdystrophien ist sie eine beidseits auftretende, progrediente Erkrankung der Hornhaut [1]. Bei der Fuchs-Hornhautendotheldystrophie steht klinisch die Veränderung des Endothels mit Schädigung und Verlust der Endothelzellen im Vordergrund. Durch eine Abnahme des Flüssigkeitstransports kommt es zu einem visusbeeinträchtigenden Stromaödem, das bis zum Epithel voranschreiten und dort zu blasenförmigen Abhebungen führen kann [2]. Histologisch werden eine dickere Descemet-Membran und Ablagerungen aus Extrazellulärmatrix auf dieser, sog. Guttae, im Lichtmikroskop sichtbar [3,4]. Die Frühform der Fuchs-Hornhautendotheldystrophie mit Veränderungen des Endothels (dickere Descemet-Membran und Guttae) vor der Dekompensation der Hornhaut wird als Cornea guttata bezeichnet.

In der Datenbank OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) sind bisher 8 verschiedene Varianten (FECD1–8) der Erkrankung beschrieben, wobei jeweils verschiedene Assoziationen zu Veränderungen in einem chromosomalen Locus im Genom oder in einem Gen geschildert werden. Darunter ist auch eine frühe Form der Fuchs-Hornhautendotheldystrophie (FECD1; OMIM # 136800), die sich bereits im 1. Lebensjahrzehnt manifestiert [4]. Hier sind Mutationen im COL8A2-Gen (OMIM # 120252) [5, 6] mit der Erkrankung beschrieben. Die viel häufiger auftretende späte Form (FECD2–8; OMIM # 610158; 613267; 613268; 613269; 613270; 613271; 615523) wird erst im 4. Lebensjahrzehnt oder später manifest. Etwa 4% der US-amerikanischen Bevölkerung über 40 Jahren sind von der späten Form der Fuchs-Hornhautendotheldystrophie betroffen [4]. Mittlerweile sind durch Kopplungsanalysen und Assoziationsstudien Veränderungen in einigen chromosomalen Loci (FCD 1–4) und Genen wie SLC4A11 (OMIM # 610206), TCF8 (OMIM # 189909), LOXHD1 (OMIM # 613072) oder AGBL1 (OMIM # 615496) im Zusammenhang mit der späten Form der Fuchs-Hornhautdystrophie beschrieben worden [7–13]. Jedoch konnten die Veränderungen in den genannten Genen bisher nur in kleinen Kohorten oder einzelnen Familien beschrieben werden.

2012 wurde erstmals von Wieben et al. der Zusammenhang einer TGC-Repeat-Expansion im Intron 2 des TCF4-Gens (OMIM # 602272) mit der Fuchs-Hornhautendotheldystrophie beschrieben [14]. Auch der Polymorphismus rs613872 ist von verschiedenen Forschungsgruppen im Zusammenhang mit der Erkrankung geschildert worden [15–18].

In den USA ist die Fuchs-Hornhautendotheldystrophie die häufigste bekannte Indikation für eine Keratoplastik mit 14200 von ungefähr 66300 durchgeführten Keratoplastiken in 2013 [19].

TCF4 and LOXHD1 in six patients showed no variant described with FECD. The odds ratio as indicator for being affected by FECD in our data for the expanded TGC allele is 30. The chance of being affected is thus 30 times higher when someone exhibits the expanded allele. For a carrier of the risk allele G the chance is 16.5 times higher.

Discussion: An expanded TGC allele with more than 50 TGC repeats in intron 2 and the described risk allele G of the polymorphism rs613872 in intron 3 of the TCF4 gene appear as an association to FECD. The chance to be affected by FECD is up to 30 times higher. With molecular genetics also donors with clinically unknown FECD may be detected.

Die Keratoplastik stellt langfristig die einzige Therapiemöglichkeit dar [20]. Häufig wird im Gegensatz zur perforierenden eine lamelläre Keratoplastik angewendet. Diese durchlief im letzten Jahrzehnt eine Entwicklung von verschiedenen Schritten, zunächst als DLEK (deep lamellar endothelial keratoplasty) über DSAEK (Descemet's automated stripping endothelial keratoplasty) bis hin zur DMEK (Descemet's membrane endothelial keratoplasty). Anders als bei der DLEK und der DSAEK, bei der neben Endothel und Descemet-Membran auch eine dünne Stromalamelle transplantiert wird, besteht das Spendergewebe bei einer DMEK einzig aus Hornhautendothel mit Descemet-Membran. Trotz der schwierigeren technischen Herausforderungen dieser Methode stellt sie heute die Methode der Wahl dar, da die Abstoßungsrate durch den minimalen Gewebeaustausch viel geringer ist und der Seherfolg rascher eintritt als bei einer perforierenden oder einer anderen Variante der lamellären Keratoplastik [21].

In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden beschriebenen Veränderungen im TCF4-Gen bei Patienten und Kontrollprobanden aus Deutschland untersucht. Dafür ist als Methode eine Triplet-primed PCR (TP-PCR) entwickelt worden, mit der expandierte Allele gut dargestellt werden können. Diese zeigte sich nach Studien genauso sensitiv wie der Southern Blot, um expandierte Allele (> 50 Repeats) darzustellen. Eine genaue Länge der Expansion kann mit dieser Methode jedoch nicht angegeben werden [22,23]. Des Weiteren sequenzierten wir bei 6 Patienten, von denen 3 ein expandiertes TGC-Allel aufwiesen und 3 nicht, sämtliche codierende Exons des TCF4- und des nah benachbarten LOXHD1-Gens, um bei Kopplungsungleichgewicht dieser benachbarten Gene mögliche Mutationen in diesen Genen als Krankheitsursache auszuschließen.

Patienten und Methoden



Patienten und klinische Befunde

Alle Patienten wurden nach der klinischen Untersuchung mit der Spaltlampe klassifiziert. Auch die Kontrollprobanden befanden sich in ophthalmologischer Behandlung, wobei eine Hornhautdystrophie ausgeschlossen wurde. Die Durchführung der genannten Untersuchungen wurde von der Ethikkommission genehmigt. Eine Einverständniserklärung ist gemäß der Auflage der Ethikkommission von jedem Probanden unterzeichnet worden.

Patienten- und Kontrollkollektiv nicht verwandter Probanden

42 nicht verwandte Patienten und 93 Kontrollprobanden aus der deutschen Bevölkerung sind auf die beschriebenen Veränderungen im TCF4-Gen untersucht worden.

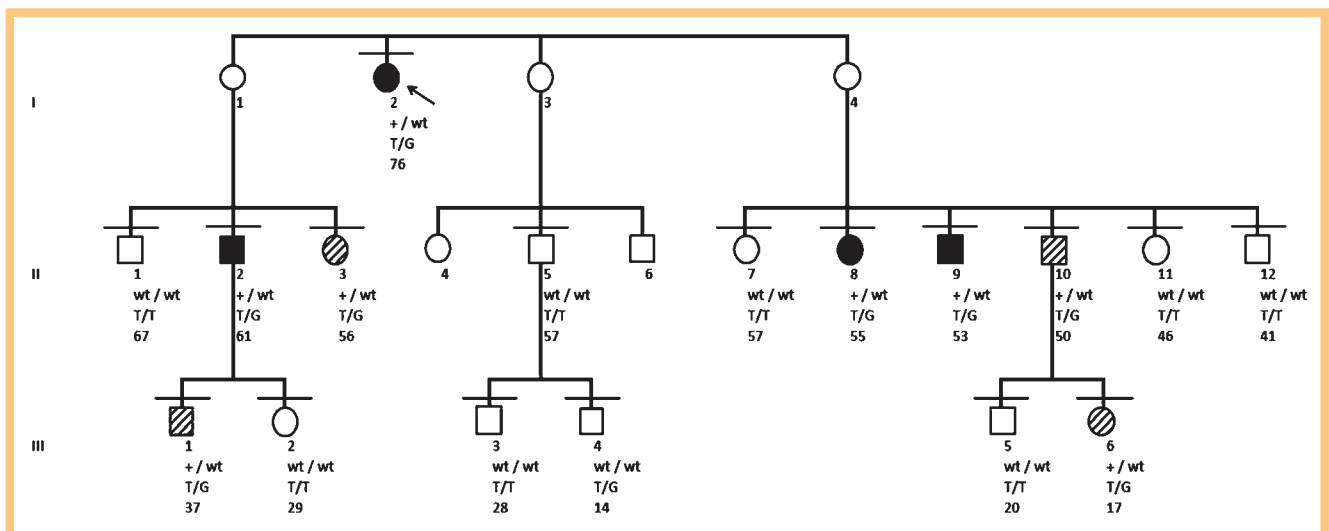


Abb. 1 Stammbaum der untersuchten Familie, Quadrat = männlich, Kreis = weiblich. Die Indexpatientin ist mit einem Pfeil markiert. Die betroffenen Familienmitglieder sind mit schwarz ausgefüllten Symbolen gekennzeichnet. Die untersuchten Mitglieder wurden mit einer Linie oberhalb des Kreises bzw. des Kastens gekennzeichnet. Familienmitglieder, die zum Untersuchungszeitpunkt nicht betroffen waren, aber ein expandiertes TGC-Allel aufwiesen,

sind gestreift. Des Weiteren sind unter den Symbolen Angaben zum jeweiligen Genotyp gemacht worden: + bezeichnet ein expandiertes TGC-Allel in Intron 2 des TCF4-Gens und wt ein Allel, welches < 50 TGC-Repeats hat. Der Genotyp des Polymorphismus rs613872 in Intron 3 des TCF4-Gens ist darunter mit den Allelen T und G angegeben. Das Alter zum Untersuchungszeitpunkt ist weiterhin unter den Symbolen vermerkt.

Familie

Die untersuchte Familie (Abb. 1) besteht aus 22 Mitgliedern, von denen bei 17 DNA-Proben vorlagen und die genotypisiert werden konnten. Von den 17 untersuchten Familienmitgliedern waren 4 von der Fuchs-Hornhautendotheldystrophie betroffen, darunter die Indexpatientin I/2 (Abb. 1), welche keine Nachkommen hat, und 3 von deren Nichten und Neffen.

Molekulargenetische Untersuchung

Die DNA wurde gemäß Standardprotokoll aus peripheren Lymphozyten nach Blutabnahme in EDTA-Röhrchen gewonnen.

Spezifische PCR und elektrophoretische Auftrennung der Produkte

Die Untersuchung der TGC-Repeats in Intron 2 des TCF4-Gens erfolgte nach einem Stufenschema. Zur PCR-Amplifizierung des die TGC-Repeats umspannenden Genabschnitts des Introns 2 vom TCF4-Gen wurden die folgenden Primer verwendet: Intron 2 fw 5'-CAG ATG AGT TTG GTG TAA GAT G-3'; Intron 2 rev 5'-ACA AGC AGA AAG GGG GCT GCA A-3'. In einem 25-µl-PCR-Ansatz wurden 12,5 µl Go-Mastermix von Promega (Madison, USA), jeweils 10 pmol Primer und 50 ng DNA eingesetzt und mit Wasser aufgefüllt. PCR-Bedingungen: 2 min bei 95 °C; danach 35 Zyklen: 30 s bei 95 °C, 30 s bei 62 °C und 1 min bei 72 °C; 5 min bei 72 °C. Die elektrophoretische Auftrennung der Produkte mit Agarosegelelektrophorese zeigte im Agarosegelbild entweder 2 Bänder oder 1 Bande. Wiesen Probanden 2 Bänder auf, die nach Vergleich mit einem Größenstandard in Basenpaarbereichen der Länge unter 50 TGC-Repeats lagen, ist ein expandiertes Allel mit > 50 TGC-Repeats ausgeschlossen worden. War dagegen nur 1 Bande im Agarosegelbild sichtbar, konnte ein zusätzliches expandiertes Allel vorliegen, welches mit der spezifischen PCR nicht korrekt amplifiziert werden konnte. So wurde bei scheinbarer Homozygotie, Hemizygotie und Heterozygotie mit 1 Bande in

Basenpaarbereichen > 50 TGC-Repeats eine TP-PCR angeschlossen.

Triplet-primed PCR (TP-PCR)

Da sehr stark expandierte Allele nicht mit einer einfachen PCR mit 2 flankierenden Primern dargestellt werden können, wurde als Methode die TP-PCR (triplet-primed PCR) verwendet. Sie ist erstmals 1996 von Warner et al. zur Detektion großer CAG-Trinukleotidexpansionen im Zusammenhang mit der Diagnostik von Trinukleotiderkrankungen beschrieben worden. Anders als bei der herkömmlichen PCR, bei der 2 flankierende Primer genutzt werden, kommen hier 3 verschiedene Primer zum Einsatz. Es gibt eine Forward- und eine Reverse-Reaktion, bei denen jeweils 1 Primer außerhalb der Repeats, ein 2. innerhalb der Repeats und ein 3. an einen nicht an das Template gebundenen Tail des 2. Primers bindet (Abb. 2). Zur Untersuchung der TGC-Repeats ist jeweils 1 der beiden Reaktionen genutzt worden.

Der Verlauf der PCR lässt sich wie folgt beschreiben: Zuerst binden die beiden zum Genom komplementären Primer 1 und 2. In einem 2. Schritt werden die gewonnenen Produkte mithilfe des Primers 3, also des Tails, weiter amplifiziert. Primer 2, welcher komplementär zu den Repeats ist, bindet zufällig an verschiedene Stellen der Expansion. Es entstehen PCR-Produkte mit Triplet-Repeats von verschiedener Länge. Für gesunde Allele ist die Summe der so entstandenen PCR-Produkte begrenzt, da nur eine bestimmte Menge von Repeats im Genom zum Binden des Primers zur Verfügung steht. Bei einem expandierten Allel ist die Summe und Länge der PCR-Produkte sehr viel höher.

Verwendet wurde das Expand Long Template PCR System von Roche (Basel, Schweiz). Für die Forward-Reaktion wurde 1,75 mM MgCl₂ und für die Reverse-Reaktion 2,75 mM MgCl₂ genutzt. Es erfolgte die Amplifizierung von 150 ng DNA in einem 25-µl-PCR-Ansatz (2,5 µl Puffer, 0,7 mM dNTPs, 1 M Betain, 3,75 U Polymerase); PCR-Bedingungen Forward: 94 °C 5 min (94 °C 15 s; 60 °C 30 s; 68 °C 5 min) × 10; (94 °C 14 s; 60 °C 30 s; 68 °C 5 min + 20 elong.) × 25; 68 °C 7 min; 10 °C hold; PCR-Bedingungen Re-

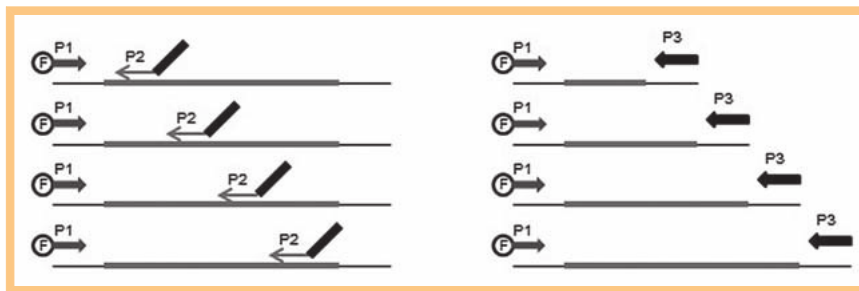


Abb. 2 Darstellung der Forward-Reaktion einer TP-PCR nach Sermon et al. [27]. Die dicke Linie verdeutlicht die TGC-Repeats. Primer 1 flankiert die TGC-Repeats und ist fluoreszenzmarkiert. Primer 2 bindet einerseits an die TGC-Repeats und besitzt andererseits noch einen, nicht an die DNA bindenden Bereich, den sog. Tail. Primer 3 besteht nur aus der Tail-Sequenz und bindet gar nicht an die DNA.

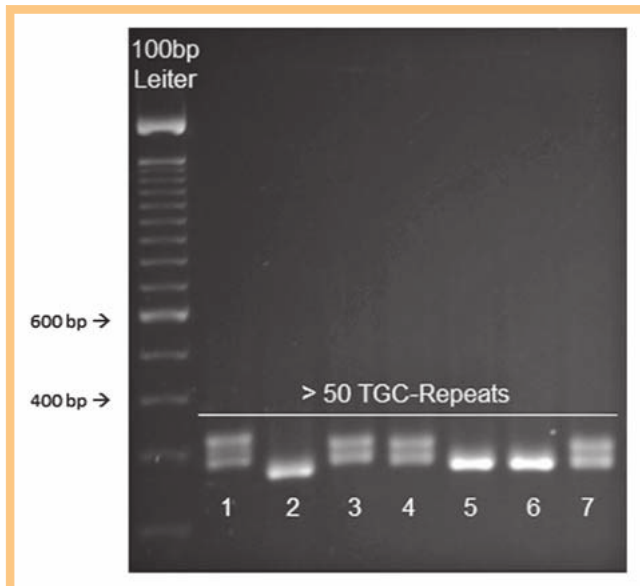


Abb. 3 Agarosegelbild: Spuren 1, 3, 4, 7: Heterozygotie unter 50 TGC-Repeats, somit Ausschluss einer TGC-Trinukleotid-Repeat-Expansion im Intron 2 des TCF4-Gens; Spuren 2, 5, 6: Scheinbare Homozygotie, ein expandiertes Allel kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Eine TP-PCR wird angeschlossen.

verse: 94 °C 5 min (94 °C 15 s; 58 °C 30 s; 68 °C 5 min) × 10; (94 °C 15 s; 58 °C 30 s; 68 °C 5 min + 20 elong.) × 25; 68 °C 7 min; 10 °C hold. Die Primer 1 und 3 wurden zu 8 pmol, Primer 2 zur 0,8 pmol in der Forward-Reaktion eingesetzt, die Primer 4 und 3 zu 7 pmol, Primer 5 zu 0,7 pmol in der Reverse-Reaktion (Primer 1 5'-Fam-CCA GAT GAG TTT GGT GTA AGA TG-3', Primer 2 5'-TAC GCA TCC CAG TTT GAG ACG GCA GCA GCA GCA GCA-3', Primer 3 5'-TAC GCA TCC CAG TTT GAG ACG-3', Primer 4 5'-Fam-ACA AGC AGA AAG GGG GCT GCA A-3', Primer 5 5'-TAC GCA TCC CAG TTT GAG ACG TGC TGC TGC TGC TGC-3'). Die Fragmentanalyse erfolgte auf dem ABI-3130xl Genetic Analyzer (Foster City, USA).

Direkte Sequenzierung

Zur Untersuchung des Polymorphismus rs613842 wurde nach Sanger sequenziert. Zur PCR-Amplifizierung des den Polymorphismus umspannenden Genabschnitts des Introns 3 vom TCF4-Gen wurden die folgenden Primer verwendet: Intron 3 fw 5'-TTC ATT TAA TCC CCA ACC-3'; Intron 3 rev 5'-CCG TTT TAA ATT TAC AGG CAC A-3'. In einem 25-µl-PCR-Ansatz wurden 12,5 µl Go-Mastermix von Promega (Madison, USA), jeweils 10 pmol Primer und 50 ng DNA eingesetzt und mit Wasser aufgefüllt. PCR-Bedingungen: 5 min bei 95 °C; danach 34 Zyklen: 30 s bei 95 °C, 45 s bei 58 °C und 1 min bei 72 °C; 10 min bei 72 °C.

Die codierenden Exons und flankierenden Intronabschnitte von TCF4 und LOXHD1 sind ebenfalls nach Sanger sequenziert worden. Dafür wurden jeweils 1 Exon umspannende Primer verwendet. Die Amplifizierung von 50 ng DNA erfolgte hier ebenfalls im 25-µl-PCR-Ansatz (5 µl 5× FIREPol Master Mix [7,5 mM MgCl₂] von Solis BioDyne, jeweils 10 pmol Primer Forward und Reverse für jedes Exon, eventuell 1 mM Betain; PCR-Bedingung: 5 min bei 95 °C; danach 35 Zyklen: 30 s bei 95 °C, 45 s bei 60 °C, 58 °C oder 56 °C und 1 min bei 72 °C; 5 min bei 72 °C). Nach Aufreinigung der Produkte mittels SeqLab-Aufreinigungs-kit über Filtersäulchen und Darstellung und Quantifizierung der nun aufgereinigten Produkte auf einem 2%-Agarosegel ist der Sequenzieransatz mit dem Big-Dye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems (Bedingungen: 1 min bei 96 °C; danach 35 Zyklen: 10 s bei 96 °C, 5 s bei 50 °C und 4 min bei 60 °C) mit dem Dye Ex 2.0 Spin Kit von Qiagen aufgereinigt worden. Die Sequenzieransätze wurden auf dem ABI-3130xl Genetic Analyzer nach Herstellerangaben aufgetragen und ausgewertet.

Ergebnisse

Zur Untersuchung der TGC-Repeats im Intron 2 des TCF4-Gens wurde bei folgenden Probanden eine TP-PCR durchgeführt:

1. Bei Probanden, die nach elektrophoretischer Auftrennung der Produkte der spezifischen PCR im Agarosegelbild 2 Banden zeigten und 1 Bande in Basenpaarbereichen > 50 TGC-Repeats lag (Abb. 3 und 4).
2. Bei Probanden, die im Agarosegelbild nur 1 Bande zeigten. Diese erschienen homozygot. Jedoch kann ein mit konventioneller PCR nicht amplifizierbares expandiertes TGC-Allel erst mit der TP-PCR ausgeschlossen oder nachgewiesen werden (Abb. 3 und 4).

Bei 33 von 42 (79%) Patienten wiesen wir durch die Fragmentanalyse mittels TP-PCR eine Expansion von einem TGC-Repeat-Allel nach (Abb. 5). Von den 93 Kontrollprobanden hatten nur 10 (10,8%) ein expandiertes Allel. Neun von 42 Patienten (21%) wiesen keine Expansion auf, in der Kontrollgruppe waren es 83 von 93 (89,2%).

Die Darstellung des den Polymorphismus rs613872 umspannenden Genabschnitts in Intron 3 ist in Abb. 6 dargestellt. Die Datenbank „Ensembl“ gibt das von Baratz et al. beschriebene Risikoallel G als Wildtypallel an. Die Allelfrequenz von T wird mit 82% und von G mit 12% angegeben. Bei der Untersuchung des Polymorphismus rs613872 zeigten sich 33 der 42 Patienten (78,6%) als heterozygot TG. Vier Patienten waren homozygot GG (9,5%) und 5 Patienten homozygot TT (11,9%). Somit trugen 88,1% der Patienten zumindest 1 als Risikoallel beschriebenes Allel G. Von der Kontrollgruppe waren 65 der untersuchten 93 Proben homozygot TT (69,9%) und nur 21 heterozygot TG (22,6%) (Abb. 7).

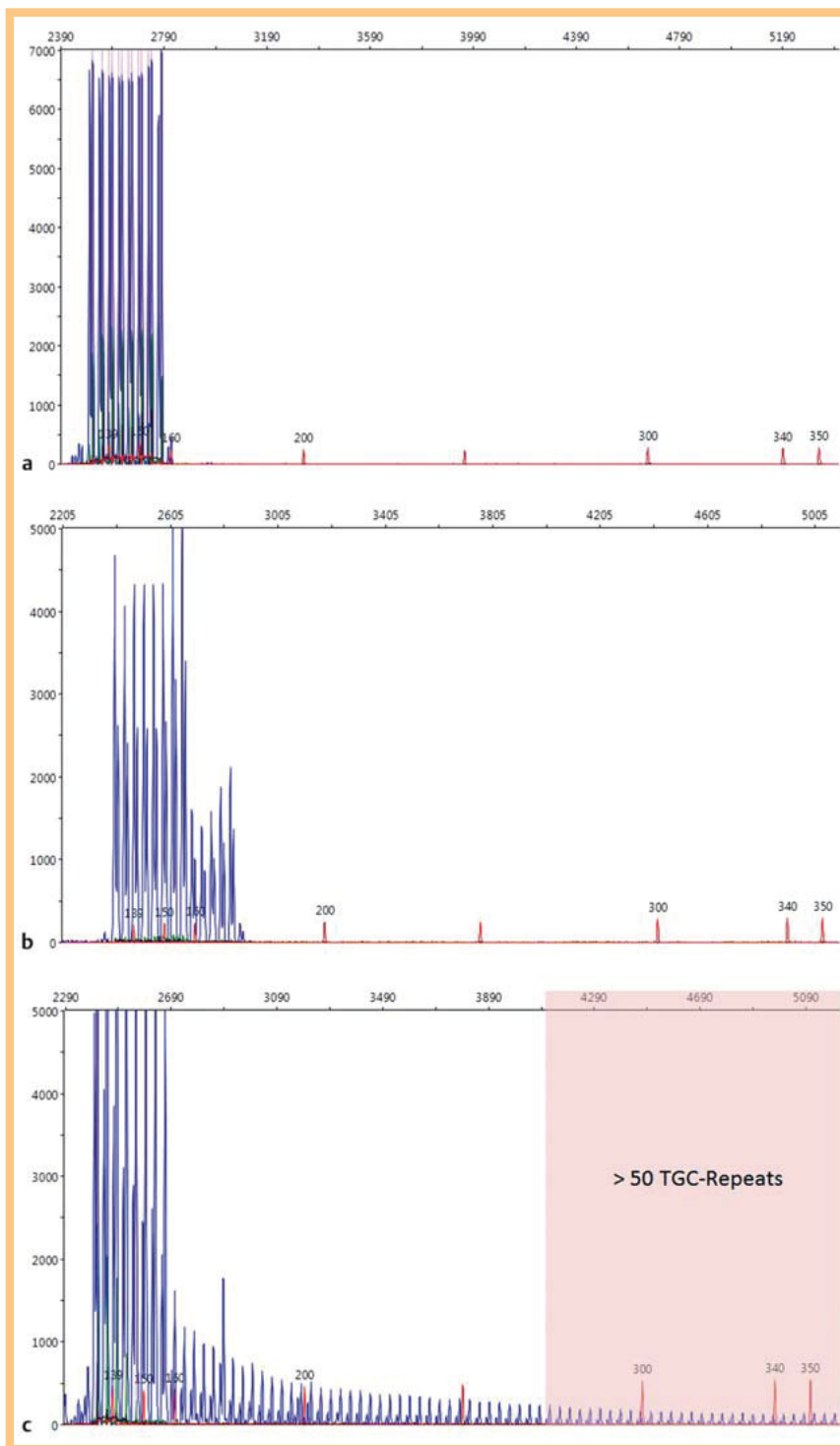


Abb. 4 Darstellung der Ergebnisse der TP-PCR:
a Kontrollproband ohne TGC-Repeat-Expansion, homozygot 12 Repeats. **b** Kontrollproband ohne TGC-Repeat-Expansion, heterozygot 12/17 Repeats. **c** Patient mit TGC-Repeat-Expansion auf einem Allel heterozygot 12/>50 Repeats.

Bei Vergleich des Genotyps vom Polymorphismus rs613872 sämtlicher Probanden mit deren jeweiligem TGC-Repeat-Genotyp fiel Folgendes auf: Von den 93 Kontrollen hatten 7 den Genotyp GG, 4 davon hatten ein expandiertes Allel in Intron 2, die 3 anderen nicht. Von den 4 Patienten mit GG wiesen alle eine TGC-Repeat-Expansion auf. Somit waren 72% aller Probanden (8 von 11) mit Genotyp GG Träger einer Repeat-Expansion in Intron 2. Jede Person mit einer Repeat-Expansion hatte für den Polymorphismus rs613872 mindestens 1 G-Allel. Die Kombination einer Expansion im Intron 2 und der Genotyp TT vom Polymorphismus rs613872 kam bei keinem Probanden vor.

Familie mit mehreren betroffenen Mitgliedern

Der Stammbaum der untersuchten Familie ist in **Abb. 1** verdeutlicht. Von 5 nicht betroffenen Familienmitgliedern lag keine DNA vor (I/1, I/3, I/4, II/4, II/6). So konnten die beschriebenen Veränderungen im TCF4-Gen nicht untersucht werden. Vier Mitglieder dieser Familie sind an der Fuchs-Hornhautendotheldystrophie erkrankt (I/2, II/2, II/8, II/9). Alle 4 erkrankten Probanden wiesen eine TGC-Repeat-Expansion im Intron 2 des TCF4-Gens auf und waren heterozygot TG an Stelle des Polymorphismus rs613872. Von den nicht betroffenen Mitgliedern der Familie wiesen 5 den Genotyp heterozygot TG auf, wobei 4 davon eine

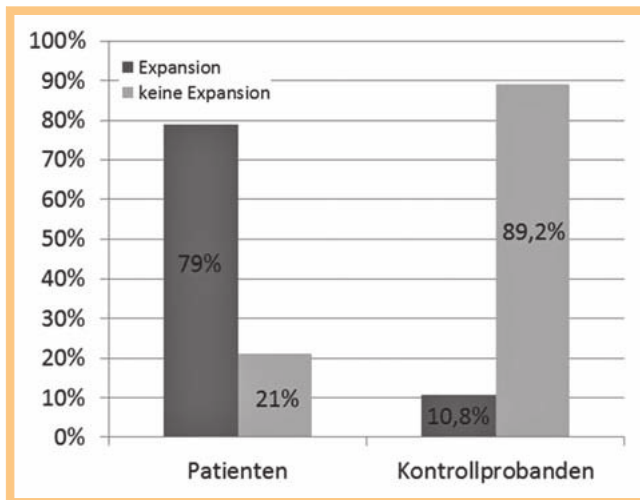


Abb. 5 Ergebnisse der Untersuchung der TGC-Repeat-Expansion im Intron 2 des TCF4-Gens.

Expansion im Intron 2 aufwiesen (II/3, II/10, III/1, III/6). Nur 1 Proband der Familie mit Genotyp TG an Stelle des Polymorphismus rs613872 hatte kein expandiertes Allel im Intron 2 (III/4). Die restlichen 9 Probanden dieses Stammbaums waren nicht von der Fuchs-Hornhautendotheldystrophie betroffen und wiesen keine TGC-Repeat-Expansion auf. Sie zeigten alle den Genotyp TT anstelle des Polymorphismus rs613872.

Sequenzierung TCF4 und LOXHD1

Um auszuschließen, dass die Repeat-Expansion und das G-Allel des Polymorphismus rs613872 in Kopplung mit einer Veränderung in codierenden Abschnitten des TCF4-Gens bzw. des ebenfalls nahe der untersuchten genetischen Region liegenden LOXHD1-Gens (das bei Riazuddin et al. [12] verändert ist) stehen, sequenzierten wir für einige Patienten die gesamten codierenden

Abschnitte mit angrenzenden Intronbereichen des TCF4- und des LOXHD1-Gens. Bei der Sequenzierung der codierenden Exons von TCF4 und LOXHD1 der 6 Patienten wurde eine heterozygote Veränderung einer unklassifizierten Variante (rs147445499) im Exon 12 des TCF4-Gens, die zu einem Aminosäureaustausch p. Ala315Val führt, bei einem einzelnen Patienten mit einem expandierten TGC-Repeat-Allel gefunden (Abb. 8). Diese wurde jedoch noch nicht im Zusammenhang mit der Fuchs-Hornhautendotheldystrophie beschrieben. Auch die Sequenzierung von 20 weiteren Patienten konnte diese Veränderung nicht noch einmal aufzeigen.

Berechnung des Odds Ratio

Die Berechnung des Odds Ratio für unsere Patientenkontrollgruppe ergibt nach den oben beschriebenen Daten folgende Ergebnisse: Bei Vorliegen des Risikoallels G des Polymorphismus rs613872 ist das Odds Ratio 16,5, bei Vorliegen der TGC-Repeat-Expansion 30.

Diskussion

Auch bei Patienten aus unserem geografischen Gebiet stellt ein expandiertes Allel mit mehr als 50 TGC-Repeats im Intron 2 und das beschriebene Risikoallel G des Polymorphismus rs613872 im Intron 3 des TCF4-Gens eine Assoziation zur Fuchs-Hornhautendotheldystrophie dar. Die TGC-Repeat-Expansion ist mittlerweile als Assoziation zu der Erkrankung schon von verschiedenen Forschungsgruppen beschrieben worden [14,24,25]. Auch der Polymorphismus rs613872 ist mehrfach mit der Fuchs-Hornhautendotheldystrophie in Zusammenhang gebracht worden [15–18, 24,25]. Die Assoziation der Variante ist allerdings vom ethnischen Hintergrund abhängig, was die geringe Assoziation zur Fuchs-Hornhautendotheldystrophie in der chinesischen Bevölkerung zeigt [26]. Wir konnten den Zusammenhang in der europäischen Bevölkerung bestätigen.

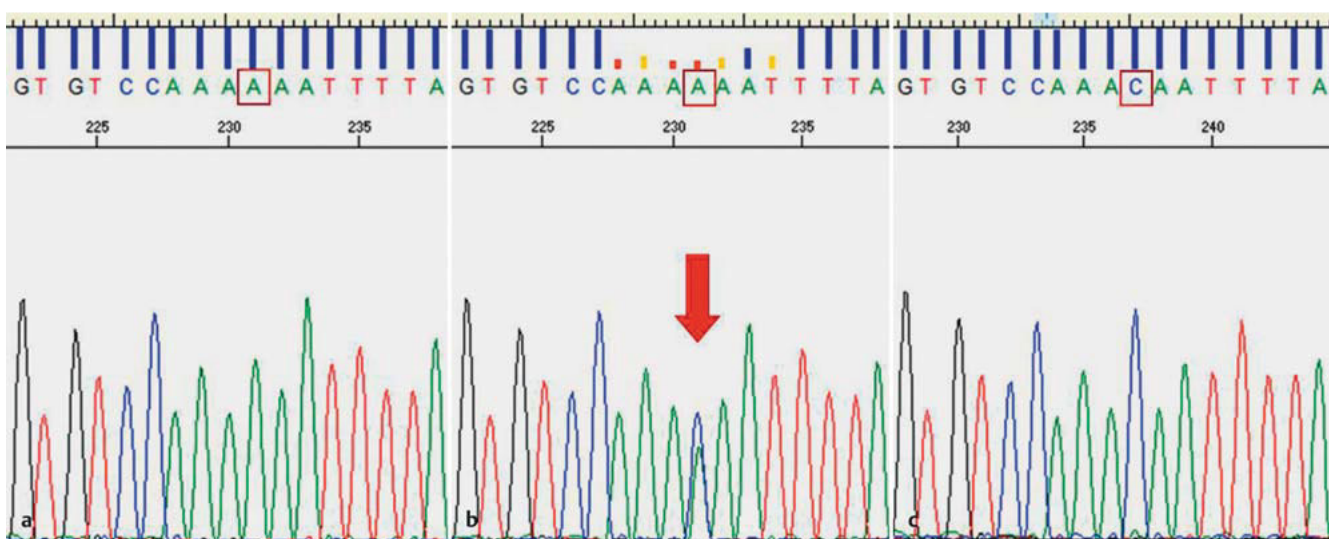


Abb. 6 Darstellung des den Polymorphismus rs613872 umspannenden Genabschnitts vom Intron 3 des TCF4-Gens. Dargestellt ist jeweils die Vorwärtsreaktion, die zur Angabe der Datenbanken komplementär ist. Ist in dieser Darstellung das Allel A oder C dargestellt, entspricht es dem Allel T oder G. Sind auf den beiden Allelen verschiedene Basen zu finden (Heterozygotie),

findet sich in der unteren Kurve die übereinandergelagerte Darstellung beider gefundener Aminosäuren (roter Pfeil). **a** Veränderung hom.c.145+42209C>A in der Vorwärtsreaktion eines gesunden Kontrollprobanden. **b** Veränderung het.c.145+42209A>C in der Vorwärtsreaktion; AC entspricht TG. **c** Wildtyp laut Standardsequenz bei einem Patienten.

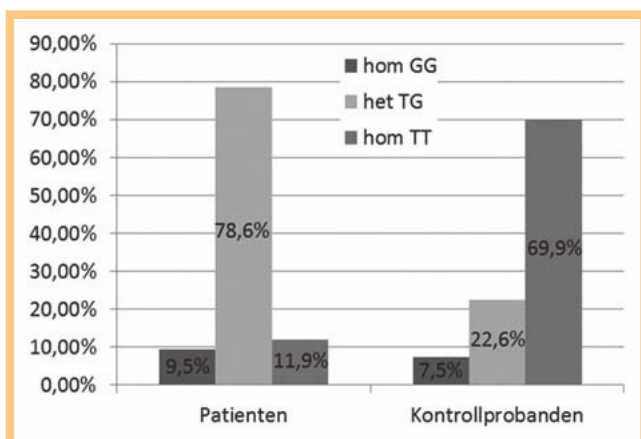


Abb. 7 Ergebnisse der Untersuchung des Polymorphismus rs613872 im Intron 3 des TCF4-Gens.

Unsere Studie weist einen Zusammenhang zwischen dem Risikoallel G (Genotyp TG und GG) des Polymorphismus rs613872, einer TGC-Repeat-Expansion und der Fuchs-Hornhautendotheldystrophie auf. Patienten sowie Kontrollen, die eine TGC-Repeat-Expansion im Intron 2 hatten, zeigten immer das beschriebene Risikoallel G für den Polymorphismus rs613872 in Intron 3 des TCF4-Gens. Der Genotyp TT des Polymorphismus zusammen mit einer TGC-Repeat-Expansion kam somit bei unseren Probanden nicht vor.

Bei Testung auf eine TGC-Repeat-Expansion in Intron 2 des TCF4-Gens ergeben sich eine Sensitivität von 79% und eine Spezifität von 89%. Wird der Polymorphismus rs613872 in Intron 3 des TCF4-Gens genetisch untersucht und das Risikoallel G in homozygoter oder heterozygoter Form festgestellt, besteht eine Sensitivität von 88% und eine Spezifität von 70%. Da alle Probanden mit expandiertem TGC-Repeat-Allel auch das Risikoallel G aufwiesen, ist die Sensitivität und Spezifität bei Betrachtung von beiden Untersuchungen zugleich genauso sensitiv und spezifisch wie die Betrachtung der TGC-Repeats alleine.

Somit ist laut unserer Studie die Untersuchung auf den Polymorphismus rs613872 sensitiver als die Untersuchung auf ein expandiertes TGC-Repeat-Allel. Ist eine Person an der Fuchs-Hornhautendotheldystrophie erkrankt, wird sie mit diesem Test mit höherer Wahrscheinlichkeit auffindig gemacht (88 vs. 79%). Die Spe-

zifität allerdings ist bei Betrachtung der TGC-Repeats höher (89 vs. 70%). Aus diesem Grund empfehlen wir zur sicheren Begutachtung immer die Untersuchung beider Faktoren.

Das Odds Ratio, mit dem die Chance von der Erkrankung betroffen zu sein, berechnet wird, ist in unseren Daten bei Ausprägung eines expandierten TGC-Repeat-Allels 30. Also ist die Chance von der FECD bei Vorhandensein eines expandierten Allels 30-fach erhöht. Zusätzlich dazu besteht für Träger des Risikoallels G eine 16,5-fach erhöhte Chance, von der Fuchs-Hornhautendotheldystrophie betroffen zu sein im Gegensatz zu Personen, die kein Risikoallel tragen.

Bei der Sequenzierung der codierenden Exons von TCF4 und LOXHD1 von 6 Patienten wurde keine Mutation nachgewiesen. Die gefundenen Polymorphismen stehen nicht im Kopplungsungleichgewicht zueinander oder zur Repeat-Verlängerung. Die Frage nach der Auswirkung eines expandierten TGC-Repeat-Allels ist noch zu klären. So ist möglicherweise die Expression durch unterschiedliche Länge des Allels und das Splice-Verhalten verändert.

Die Prävalenz der Fuchs-Hornhautendotheldystrophie wird von Schmedt et al. [4] mit 4% der US-amerikanischen Bevölkerung über 40 Jahren angegeben. Die Abschätzung der Prävalenz ist insgesamt schwierig. Die späte Form der Erkrankung manifestiert sich erst im höheren Lebensalter. Eine Ausprägung der TGC-Repeat-Expansion in gesunden Probanden ist bei Betrachtung nicht betroffener Familienmitglieder mit expandiertem Allel so möglicherweise erklärbar. Zwei der von einer TGC-Repeat-Expansion betroffenen Familienmitglieder waren jünger als 40 Jahre (III/1 37 Jahre und III/6 17 Jahre). Ein Ausbruch der Krankheit im höheren Alter kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden. Eine Betrachtung der Familie auf längeren Zeitraum würde dieses klären können.

Ein expandiertes TGC-Allel in Intron 2 und die Ausprägung des Risikoallels G im Polymorphismus rs 613872 in Intron 3 des TCF4-Gens ist nach unseren Ergebnissen ein relevanter zusätzlicher Marker für die Fuchs-Hornhautendotheldystrophie, die Therapie derselben und die OP-Planung. So kann die passende Operationstechnik korrekt ausgewählt werden und die Erfolge bei Hornhautoperationen erheblich verbessert werden. Interessant ist die molekulargenetische Diagnostik sicher auch bei jüngeren Spendern, um zu vermeiden, dass die Transplantation einer Membran von einem Spender mit noch nicht klinisch erfasster Fuchs-Hornhautendotheldystrophie erfolgt.

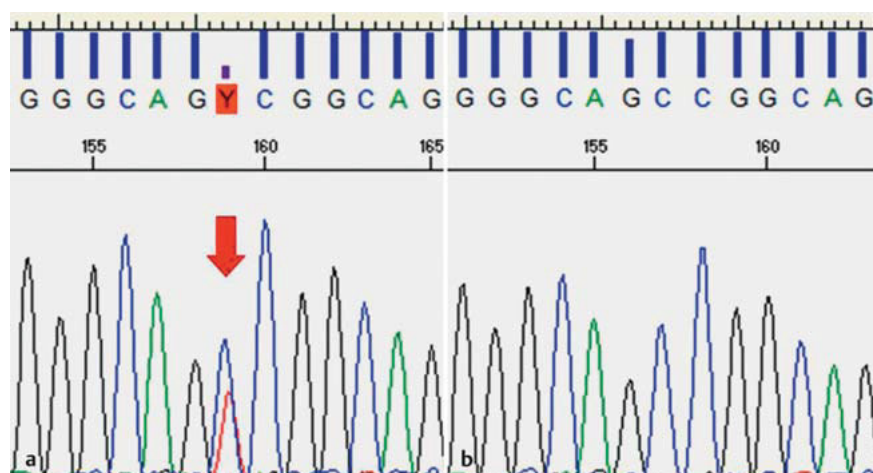


Abb. 8 Darstellung des den Polymorphismus rs147445499 umspannenden Genabschnitts nach direkter Sequenzierung: **a** Veränderung het. c.944C>T in der Vorwärtsreaktion eines Patienten mit TGC-Repeat-Expansion im Intron 2 des TCF4-Gens. **b** Wildtyp.

Interessenkonflikt



Nein.

Literatur

- 1 Weiss JS, Møller HU, Lisch W *et al.* The IC3D classification of the corneal dystrophies. *Cornea* 2008; 27 (Suppl. 2): S1–S83
- 2 Elhalis H, Azizi B, Jurkunas UV *et al.* Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Ocul Surf* 2010; 8: 173–184
- 3 Waring GO, Bourne WM, Edelhauser HF *et al.* The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology* 1982; 89: 531–590
- 4 Schmedt T, Silva MM, Ziaei A *et al.* Molecular bases of corneal endothelial dystrophies. *Exp Eye Res* 2012; 95: 24–34
- 5 Biswas S, Munier FL, Yardley J *et al.* Missense mutations in COL8A2, the gene encoding the alpha2 chain of type VII collagen, cause two forms of corneal endothelial dystrophy. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 2415–2423
- 6 Gottsch JD, Sundin OH, Liu SH *et al.* Inheritance of a novel COL8A2 mutation defines a distinct early-onset subtype of fuchs corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46: 1934–1939
- 7 Sundin OH, Jun AS, Broman KW *et al.* Linkage of late-onset Fuchs corneal dystrophy to a novel locus at 13pTel-13q12.13. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 140–145
- 8 Sundin OH, Broman KW, Chang HH *et al.* A common locus for late-onset Fuchs corneal dystrophy maps to 18q21.2–q21.32. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 3919–3926
- 9 Riazuddin SA, Eghrari AO, Al-Saif A *et al.* Linkage of a mild late-onset phenotype of Fuchs corneal dystrophy to a novel locus at 5q33.1–q35.2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 5667–5671
- 10 Riazuddin SA, Zaghoul NA, Al-Saif A *et al.* Missense mutations in TCF8 cause late-onset Fuchs corneal dystrophy and interact with FCD4 on chromosome 9p. *Am J Hum Genet* 2010; 86: 45–53
- 11 Vithana EN, Morgan PE, Ramprasad V *et al.* SLC4A11 mutations in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 656–666
- 12 Riazuddin SA, Parker DS, McGlumphy EJ *et al.* Mutations in LOXHD1, a recessive-deafness locus, cause dominant late-onset Fuchs corneal dystrophy. *Am J Hum Genet* 2012; 90: 533–539
- 13 Riazuddin SA, Vasanth S, Katsanis N *et al.* Mutations in AGBL1 cause dominant late-onset Fuchs corneal dystrophy and alter protein-protein interaction with TCF4. *Am J Hum Genet* 2013; 93: 758–764
- 14 Wieben ED, Aleff RA, Tosakulwong N *et al.* A common trinucleotide repeat expansion within the transcription factor 4 (TCF4, E2-2) gene predicts Fuchs corneal dystrophy. *PloS One* 2012; 7: e49083
- 15 Baratz KH, Tosakulwong N, Ryu E *et al.* E2-2 protein and Fuchs's corneal dystrophy. *N Engl J Med* 2010; 363: 1016–1024
- 16 Riazuddin SA, McGlumphy EJ, Yeo WS *et al.* Replication of the TCF4 intronic variant in late-onset Fuchs corneal dystrophy and evidence of independence from the FCD2 locus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52: 2825–2829
- 17 Li YJ, Minear MA, Rimmner J *et al.* Replication of TCF4 through association and linkage studies in late-onset Fuchs endothelial corneal dystrophy. *PloS One* 2011; 6: e18044
- 18 Stamler JF, Roos BR, Wagoner MD *et al.* Confirmation of the association between the TCF4 risk allele and Fuchs endothelial corneal dystrophy in patients from the Midwestern United States. *Ophthalmic Genet* 2013; 34: 32–34
- 19 Eye Bank Association of America. 2013 Eye Banking Statistical Report. Im Internet: www.restoreight.org/wp-content/uploads/2014/04/2013_Statistical_Report-FINAL.pdf, Stand: 06.03.2015
- 20 Price MO, Gorovoy M, Benetz BA *et al.* Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty outcomes compared with penetrating keratoplasty from the Cornea Donor Study. *Ophthalmology* 2010; 117: 438–444
- 21 Price MO, Price FW. Descemet's membrane endothelial keratoplasty surgery: update on the evidence and hurdles to acceptance. *Curr Opin Ophthalmol* 2013; 24: 329–335
- 22 Warner JP, Barron LH, Goudie D *et al.* A general method for the detection of large CAG repeat expansion by fluorescent PCR. *J Med Genet* 1996; 33: 1022–1026
- 23 Kakourou G, Dhanjal S, Mamas T *et al.* Modification of the triplet repeat primed polymerase chain reaction method for detection of the CTG repeat expansion in myotonic dystrophy type 1: application in preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril* 2010; 94: 1674–1679
- 24 Mootha VV, Gong X, Ku HC *et al.* Association and familial segregation of CTG18.1 trinucleotide repeat expansion of TCF4 gene in Fuchs' endothelial corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 55: 33–42
- 25 Wieben ED, Aleff RA, Eckloff BW *et al.* Comprehensive Assessment of Genetic Variants within TCF4 in Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 55: 6101–6107
- 26 Thalamuthu A, Khor CC, Venkataraman D *et al.* Association of TCF4 gene polymorphisms with Fuchs' corneal dystrophy in the Chinese. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52: 5573–5578
- 27 Sermon K, Seneca S, De Rycke M *et al.* PGD in the lab for triplet repeat diseases – myotonic dystrophy, Huntington's disease and Fragile-X syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 183 (Suppl. 1): S77–S85

CTG18.1 repeat expansion may reduce *TCF4* gene expression in corneal endothelial cells of German patients with Fuchs' dystrophy

Sabine Foja¹  · Mirjam Luther¹ · Katrin Hoffmann¹ · Andreas Rupprecht² · Claudia Gruenauer-Kloevekorn²

Received: 6 December 2016 / Revised: 28 April 2017 / Accepted: 15 May 2017 / Published online: 12 June 2017
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

Abstract

Purpose It was the aim of this investigation to elucidate the functional effects of CTG18.1 trinucleotide repeat expansion and the polymorphism rs613872 in the transcription factor 4 (*TCF4*) in corneas of patients affected by Fuchs' endothelial corneal dystrophy (FECD).

Methods Sixty-one unrelated German patients with FECD and 113 unaffected controls were investigated and genotyped for the CTG18.1 locus by triplet primed PCR (TP-PCR) and the rs613872 polymorphism via Sanger sequencing and by employing genomic DNA from peripheral blood leucocytes. DNA and RNA retrieved from human corneal endothelial explants were examined for alterations in the gene expression of *TCF4*, *ZEB1*, *E-cadherin*, *N-cadherin*, as well as the CTG18.1 locus.

Results The CTG18.1 trinucleotide repeat expansion (>50 repeats) was detected in the peripheral blood in 77% of affected FECD patients and 11.5% of the healthy volunteers. Applying the TP-PCR method, the length of CTG18.1 repeat expansions correlates in the blood and corneal cells. We noted that the CTG18.1 trinucleotide repeat expansion was associated with reduced *TCF4* and *ZEB1* gene expression, especially in the explanted corneal endothelial cells. While *E-cadherin* gene expression was not detected in any corneal endothelial

cells, expression of *CDH2* (*N-cadherin*) was detected in FECD-affected endothelium and in our controls.

Conclusions The CTG18.1 repeat expansion may reduce gene expression of *TCF4* and *ZEB1*, suggesting that a mechanism triggering a loss of function may contribute to FECD. The correlation of CTG18.1 repeat expansion from blood and the cornea may represent the first step toward investigating the potential relevance of testing the blood of cornea donors to minimize the risk of transplanting grafts potentially affected with FECD.

Keywords CTG18.1 repeat expansion · Fuchs' dystrophy · Reduced *TCF4* expression

Introduction

Fuchs' endothelial corneal dystrophy (FECD) is an age-related bilateral disorder affecting the cornea's internal endothelial cell monolayer [1]. This progressive disorder is the most frequent indication for corneal transplantation in the USA and affects nearly 4% of its population over the age of 40 years [2]. Microscopic collagenous excrescences of the endothelial basement membrane, so called guttae, are FECD's clinical hallmark [3]. Its disease course is marked by the growing density of guttae and gradual thickening of Descemet's membrane, the basement membrane of the corneal endothelium. The endothelium's loss of cell density, the loss of normal hexagonal cell patterns, and the deficient fluid pumping function are typical of premature senescence of the corneal endothelial layer in FECD patients.

Allogenic corneal transplantation is currently the only validated therapy for treating visual loss in FECD patients [4, 5]. Over the last decade, novel surgical techniques such as DLEK (deep lamellar endothelial keratoplasty), DSAEK (Descemet's

✉ Sabine Foja
sabine.foja@uk-halle.de

¹ Department of Human Genetics, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Magdeburger Str. 2, 06112 Halle, Germany

² Ophthalmic Surgery, Augenärzte am Markt, Halle; in affiliation with Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Halle, Germany

automated stripping endothelial keratoplasty), as well as DMEK (Descemet's membrane endothelial keratoplasty) have been established and optimized. While part of the corneal stroma is included during DLEK and DSAEK in the transplantation process, during DMEK only the cornea's endothelium and Descemet's layer are used, and anatomically exact replacement of the dysfunctional host's endothelium is thus possible. This surgically challenging method results in an important and rapid improvement in vision combined with the low risk of immunological rejection [6].

The influence of certain genetic factors on FECD development has been repeatedly acknowledged. One subtype associated with *COL8A2* mutations results in earlier-onset FECD and is clinically distinct from the much more common late-onset subtype [7]. Late-onset subtypes may be caused by mutations in *SLC4A11* [8], *AGBL1* [9], *ZEB1* (*TCF8*) [10], and *LOXHD1* [11] genes, but mutations affecting these genes have been identified in only a minority of patients. Several publications suggest an influence of the transcription factor 4 (*TCF4*) gene [9, 12, 13]. So, the frequency of the allele G for single nucleotide polymorphism (SNP) rs613872 in intron 3 of *TCF4* with the risk genotype GT and GG is significantly higher in FECD patients than in control subjects, as the rs613872 genotypes GT and GG were detected in 64% to 71.9% of FECD patients versus 26% to 30% in healthy volunteers according to several studies [12, 14–16].

Furthermore, trinucleotide repeats at the CTG18.1 locus in intron 2 of the *TCF4* gene seem to be more strongly associated with FECD than rs613872 and other variants [17–20].

In addition to other possible mechanisms [21], a speculative model for the implication of an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) mechanism in FECD pathogenesis suggests a pathway by increasing the *TCF4* expression resulting in altered *ZEB1*, a down-regulation of *E-cadherin* (*CDH1*) gene expression and a reduction in the EMT in peripheral cornea stem cells. Reduced EMT will result in less migration and proliferation of progenitor cells, the loss of corneal endothelial cells and ultimately FECD [22–25].

The aims of our study are to investigate the CGT18.1 repeat expansion in the first German group of FECD patients and the CTG18.1 region on the *TCF4* gene via direct examination of the affected endothelial cell layer of the corneas of three FECD patients to compare those results with DNA from their peripheral blood using TP-PCR. Further we examined the postulated epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) mechanism pathway in FECD.

We could demonstrate a tendency between CTG18.1 repeat expansions in the human cornea and a decrease in *TCF4* and *ZEB1* gene expression. *E-cadherin*, as suggested, is not involved in the pathogenesis of FECD.

Methods

Patients

Patient identification and specimen collection

This study was approved by the ethics commission of the Medical Faculty of Martin-Luther University Halle-Wittenberg and adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki. After obtaining informed consent from all patients, 61 unrelated subjects were investigated and recruited by clinical examination [slit lamp biomicroscopy, ocular coherence tomography of the anterior segment (AS-OCT)] based on the presence of guttae and corneal edema measured by determining the corneal thickness. Corneal thickness in all affected patients was >600 μm (mean 643 μm , range 601–843 μm) and the presence of endothelial guttae was observed and documented by chart and slit lamp photography.

As central corneal thickness was increased >600 μm due to a corneal edema in all patients, documented by AS-OCT, we classified all of them by Krachmer scale Grade 5.

Confluent central cornea guttae >5 mm in horizontal width were observed in 54 out of 61 patients (88.5%), in seven out of 61 patients (11.5%) corneal central guttae 2–5 mm in horizontal width were observed. An additional alteration of the corneal epithelium, such as alteration of the epithelial layers or intraepithelial bullae could be detected in four out of 61 patients (6.6%).

Controls and affected subjects were matched by age and sex.

One hundred and thirteen unrelated unaffected healthy volunteers were recruited to serve as controls. Written informed consent was obtained from all participants. Peripheral blood samples were collected from affected patients and unaffected volunteers.

Six patients with visual impairment following corneal edema underwent the DMEK procedure, during which the corneal endothelial cell layer and Descemet's membrane were explanted and preserved in RNAlater (Qiagen, Hilden, Germany) immediately after explantation.

DNA and RNA isolation

From blood samples

Genomic DNA from leucocytes was extracted from 300 μL peripheral blood via standard protocols (Maxwell Systems, Promega, Mannheim, Germany).

From the corneal endothelial layer

To investigate the CTG18.1 trinucleotide repeat expansion and any alteration in gene expression that may be involved

in the postulated mechanism leading to FECD we isolated DNA and RNA from the endothelial layers from control corneas (DGFG, Hannover, Germany) and after DMEK (stripped Descemet's membrane with endothelial cells) from affected FECD patients.

The controls were between 77 and 86 years of age. Their corneas were explanted within 36 h after death and stored first in biochrome and then in biochrome and 5% dextrane for transportation.

Affected endothelial samples were obtained during the surgical procedure and stored immediately in RNeasy (Qiagen, Hilden, Germany). The rigid endothelial cells were lysed via six cycles of repeated flash-freezing in N₂ and vortexing for 5 min at 1400 rpm at 25 °C using a thermomixer (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Germany) interrupted with full speed vortexing using a vortexer (Scientific Industries, Karlsruhe, Germany). After that, lysed cells were placed on QIAshredder columns (Qiagen) and centrifuged for 2 min at full speed. The nucleic acids were extracted using an AllPrep DNA/RNA Micro Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions for "simultaneous purification of genomic DNA and total RNA from animal and human tissues" and "purification of total RNA containing small RNA from cells".

Genotyping the CTG18.1 expansion

From blood samples

Triplet primed PCR (TP-PCR) was performed to confirm the presence of an expanded allele in the *TCF4* gene. The P1 and P4 primers are fluorescent primers designed specific for a region upstream from the CTG18.1 allele. The tails of primers P2 and P5 and the "common" flag primer P3 share no homology with human sequence [19]. We used the forward reaction primers for P1, P2, P3, whereas P3, P4, P5 primers were applied to confirm the results in the reverse reaction. Primer sequences for TP-PCR are provided in Table 1.

The forward reaction of the PCR took place via the Expand Long Template PCR System (Roche, Mannheim, Germany) in a 25 µL volume under the following conditions: 150 ng of genomic DNA, 1.75 mM MgCl₂, 0.7 mM dNTPs, 1 M Betaine (Sigma-Aldrich, Hamburg, Germany) and 3.75 U Polymerase. A concentration of 0.32 µM of each primer 1 and 3 was used, whereas primer 2 was applied with 0.032 µM. The PCR parameter was initially denatured for 5 min at 94 °C, followed by 10 cycles at 94 °C for 15 s, 60 °C for 30 s, and 68 °C for 5 min, and then 25 cycles at 94 °C for 15 s, 60 °C for 30 s, and 68 °C for 5 min with a 20-s extension at each cycle. The final extension step took place at 68 °C for 7 min and was stored at 10 °C.

For the reverse reaction, we used primer P4 and the tail P3 at a concentration of 0.28 µM, whereas the primer P5 was applied with 0.028 µM. In the reverse reaction,

2.75 mM MgCl₂ were used. All the other components were handled as in the forward TP-reaction. The cycling conditions for the reverse reaction were: initial denaturation of 5 min at 94 °C, followed by 10 cycles at 94 °C for 15 s, 58 °C for 30 s, and 68 °C for 5 min, and then 25 cycles at 94 °C for 15 s, 58 °C for 30 s, and 68 °C for 5 min with a 20 s extension at each cycle. The final extension step occurred at 68 °C for 7 min and at a storage temperature of 10 °C.

TP-PCR products were visualized in 2% agarose gel. Depending on the intensity of the TP-PCR product, 1–2 µL DNA were denatured in a 10 µL reaction volume for 3 min at 95 °C with Hi-Di-Formamide (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) and 0.2 µL ROX500 (Applied Biosystems) and cooled down immediately at 4 °C.

The TP-PCR products were analyzed on the AB 3130XL DNA Analyzer (Applied Biosystems).

From cornea

The DNA isolation method was conducted as described above. To amplify the repeat specific region, we used primer pair TCF4–2 (Table 1). PCR was done to determine the TP-PCR's condition. We thus used the Expand Long Template PCR System (Roche) in a 25 µL volume under the following conditions: 5 µL (15–30 ng) of genomic DNA from cornea, 1.75 mM MgCl₂, 0.75 mM dNTPs, 1 M Betaine (Sigma-Aldrich), 0.32 µM of each primer and 3.75 U Polymerase. The PCR cycling condition was equal to that described under TP-PCR from blood samples. After specific amplification of the CTG18.1 region, TP-PCR with 5 µL of the first PCR product followed up as described above.

Genotyping rs613872

From blood samples

Polymerase chain reaction (PCR) was performed in 25-µL volumes using GoTaq Polymerase Master Mix (Promega, Mannheim, Germany), 50 ng DNA and 10 pmol of each of the primer TCF4-In3-fw and TCF4-In3-rev (Table 1) in a thermocycler (Eppendorf). The cycling parameters were a 5-min incubation at 95 °C, followed by 34 cycles of 30 s at 95 °C, annealing at 58 °C for 45 s, and elongation for 1 min at 72 °C, with a final elongation step of 10 min at 72 °C, and a storage temperature of 10 °C.

PCR products were purified with the PCR Cleanup Kit (Seqlab, Goettingen, Germany), cycle sequenced with the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit 1.1 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) and purified with the Dye Ex 2.0 Spin Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Sequencing was done using the AB 3500 sequencer (Applied Biosystems).

Table 1 Primers used in investigations

| Application | Primer name | Sequence, 5'-3' | 5' labeling |
|--|-----------------|---|-------------|
| Amplification of CTG 18.1 region in cornea - first PCR | TCF4-fw-2 | ATC CCT TTG CTT CCT TTT CC | |
| | TCF4-rev-2 | GGA ACG AAT GGA GAA AGT GC | |
| | TP-PCR fw | CCA GAT GAG TTT GGT GTAA GAT G | 6-Fam |
| | TCF4-TP-rev-P2 | TAC GCA TCC CAG TTT GAG ACG GCA GCA GCA GCA | |
| TP-PCR rev | TCF4-TP-tail-P3 | TAC GCA TCC CAG TTT GAG ACG | |
| | TCF4-TP-rev-P4 | ACA AGC AGA AAG GGG GCT GCA A | 6-Fam |
| | TCF4-TP-fw-P5 | TAC GCA TCC CAG TTT GAG ACG TGC TGC TGC TGC | |
| | TCF4-In3-fw | TTC ATT TAA TCC TCC CCA ACC | |
| Genotyping rs613872 | TCF4-In3-rev | CCG TTT TAA ATT TAC AGG CAC A | |

From corneal endothelial layer

For the genotyping of SNP rs613872 25 ng genomic endothelium DNA were amplified using the REPLI-g Mini-Kit (Qiagen), a method used to achieve accurate genome amplification from small quantities of isolated target DNA. Amplification was done according to the manufacturer's instructions. REPLI-g amplified DNA was diluted 1:20 with water and 3 µL were used for PCR and sequence analysis with the same procedure as described above under genotyping from blood samples.

Expression analysis from the corneal endothelial layer using real time PCR

A 25-ng sample of RNA from the corneal endothelial cells was amplified using the QuantiTect Whole Transcriptome Kit (Qiagen) according to standard operation procedure. For the amplification step, we chose high-yield reaction with an incubation time of 8 h at 30 °C.

Amplified cDNA was stored undiluted. For real time amplification, cDNA was diluted 1:60 in water. Two microliters of cDNA was subjected to real-time PCR using the Universal Master Mix, no UNG (Applied Biosystems) and TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems) on a Step One Plus Cycler (Applied Biosystems). Differential expressions of individual transcripts were analyzed using TaqMan assays TCF4-Hs00971339_m1 (exon overspanning and covering CTG18.1 region), ZEB1-Hs00232783_m1, CDH1-Hs01023894_m1 (*E-cadherin*), CDH2-Hs00354988_m1 (*N-cadherin*), ACTB-Hs99999903_m1 and HPRT1-Hs02800695_m1 were used as housekeeping genes. The target gene expression was normalized according to beta-actin expression. PCR was done in triplicates using cycling conditions of 95 °C for 10 min, 40 cycles at 95 °C for 15 s, and 60 °C for 1 min. PCR was repeated twice and up to three times. A no template control indicated no contamination with DNA. Human-reference heart and kidney mRNA was

obtained from Stratagene (Darmstadt, Germany) as a reference for *E-cadherin* expression.

Results

Association between CTG18.1 trinucleotide repeat expansion and risk allele G in German population

We enrolled 61 unrelated German patients with FECD and 113 unaffected control persons in our study (Table 2). The age of the control subjects and patients was between 68 and 76 years at baseline. There were 56% females in the control group and 65% females among the patients.

In our German population we identified a correlation between CTG18.1 trinucleotide repeat expansion of >50 CTG repeats in 77% of the FECD cases; only 11.5% of the control cohort exhibited this repeat expansion (odds-ratio: 26-fold higher risk of being affected). In line with prior studies [12, 14–16], we also detected the polymorphism rs613872 TT in 68% of healthy controls. The polymorphism with GG alleles was found in 13% and GT alleles in 72% of the patients affected by the FECD phenotype (Table 2).

CTG18.1 trinucleotide repeat expansion in corneal endothelial cells correlates blood parameters

In addition to determining the CTG18.1 trinucleotide repeat expansion from peripheral DNA, we also examined the DMEK-explanted corneal endothelial layer originating from FECD patients regarding the CTG18.1 locus. We compared the CTG18.1 trinucleotide repeat expansion in the endothelial cell layer of FECD patients (Fig. 1a) with the TP-PCR results from the blood (Fig. 1b) of those FECD patients. We identified the CTG18.1 repeat expansion in very few corneal endothelial tissues cells. These results correlated with the TP-PCR findings from peripheral blood leucocytes. We observed neither disruption in long DNA fragments during the lysis

Table 2 Distribution of CTG18.1 repeat length and polymorphism rs613872 in the *TCF4* gene in German FECD patients and controls

| Subjects | n | Mean age years (+/-SD) | Sex | CTG18.1 repeat length | | OR = 26.95% CI = 11.25–59.26 | Polymorphism rs613872 | | | OR = 12.5 95% CI = 5.49–27.20 |
|----------|-----|--|----------------------|-----------------------|-------------|---------------------------------|-----------------------|----------|----------|----------------------------------|
| | | | | >50 repeats | <50 repeats | | GG | GT | TT | |
| FECD | 61 | F: 74.77 (+/-10.15) M: 76.42 (+/- 5.32) | F: 65.5% M: 34.5% | 47 (77.05%) | 14 (22.95%) | | 8 (13%) | 44 (72%) | 9 (15%) | |
| Controls | 113 | F: 71.17 (+/- 10.94) M: 68.68 (+/-9.06) | F: 56.2% M: 43.8% | 13 (11.5%) | 100 (88.5%) | | 7 (6%) | 29 (26%) | 77 (68%) | |

OR odds ratio, CI confidence interval

procedure nor an extension of CTG18.1 repeats in corneal tissue and in blood via the TP-PCR method.

Differential gene expression in corneal endothelial cells

To elucidate the regulation cascade of *TCF4* and *ZEB1* and the influence of *E-cadherin* on the possible pathogenic mechanism of FECD, we examined the expression of *TCF4*, *ZEB1*, *E-cadherin*, and *N-cadherin* in the endothelia of six FECD patients and five non-affected donor corneas (Figs. 2 and 3).

We noted reduced *TCF4* gene expression in the affected endothelial layer of the FECD patients' corneas compared to the endothelial layer of transplantation donors (Fig. 2a and d). In all the FECD patients who are carriers of CTG18.1 repeat expansions, we detected the lower *TCF4* expression level associated with a TG allele in the polymorphism rs613872. In the controls without CTG18.1 repeat expansions, we detected higher *TCF4* expression level, but we detected different alleles in the polymorphism rs613872 in that group (TG three out of five, TT one out of five and GG one out of five; Fig. 2b).

We also observed reduced *ZEB1* expression, a gene regulated by *TCF4* (Fig. 2c and e).

As postulated, the expression of *E-cadherin* should be altered though *TCF4* and *ZEB* in FECD patients [18, 22–24]. In our investigation, *E-cadherin* was not expressed in the human endothelial cell layer and Descemet's membrane (Fig. 3a). *N-cadherin* is expressed in this cell layers. We observed no alteration in this gene's expression (Fig. 3b).

Discussion

FECD is described as a genetically heterogeneous disease of the endothelial cells in the cornea. Two subtypes of FECD are clinically distinguished. The rare early onset form of FECD starts in the first decade of life and proceeds through the second and third decades [26]. Initial clinical signs of FECD's more frequent late-onset form appear around the fifth decade of life [15, 17].

The genetic mechanisms leading to FECD have not been elucidated. Recent publications focused on the role of the transcription factor 4 (*TCF4*) gene in the development of FECD with an association between polymorphism rs613872 in intron 3 and CTG18.1 trinucleotide repeat expansion in intron 2 of this gene [12, 17, 19].

The *TCF4* gene, also known as *ITF2*, *SEF2*, *E2-2* is located on chromosome 18. It encodes a transcription factor expressed in the cornea and increases the expression level of *ZEB1*, another gene already associated with FECD, under healthy conditions [15, 22, 27–30]. It is suggested that *TCF4* increases the risk for FECD by changing the expression of *ZEB* [18]. Furthermore, *TCF4* and *ZEB1* may promote a process known as EMT, whereby the loss of cellular interaction and the replacement of damaged corneal endothelial cells are possible [18, 23, 24, 28–30] [Fig. 4].

All these data reveal *TCF4* as a key partner of mutated genes in FECD pathogenesis. To confirm and elucidate the genetic basis of FECD in a German cohort, we investigated 61 unrelated patients and 113 control subjects for the reported association with intronic CTG18.1 trinucleotide repeat expansion and intronic polymorphism rs613872 in the *TCF4* gene.

We detected an CTG18.1 repeat expansion of >50 TGC in 77% of our FECD patients [31].

We have thus confirmed recently reported associations between CTG18.1 trinucleotide repeat expansion and FECD in 66.5% to 79% of the USA population and in the Chinese; FECD appears to be a major risk in the German population as well [17–20].

Furthermore, we detected the polymorphism rs613872 with the risk allele G presenting with the genotypes GT and GG in 85% of our affected FECD patients (Table 2).

Prior studies demonstrate that the genotypes GG and GT are more common in FECD patients, too [12, 15, 16, 32].

To the best of our knowledge, we are the first to investigate the CTG18.1 region on the *TCF4* gene via direct examination of the affected endothelial cell layer of the corneas of three FECD patients and by comparing those results with DNA from their peripheral blood using TP-PCR.

Using TP-PCR, we noted that our peripheral-blood findings correlated with TP-PCR results from the affected corneas

(Fig. 1), we found no signs of repeat instability in the corneal endothelial cell layer compared to blood (as suggested by Du et al. 2015) [33].

These results may be the first step toward deeper investigations of the potential relevance of testing the blood of cornea donors to minimize the risk to transplant grafts possibly affected by FECD.

Several hypotheses have dealt with molecular mechanisms and the influence of the *TCF4* gene in the pathogenesis of FECD, such as the dysregulation of pathways involving oxidative stress, apoptosis, miRNA mitochondrial genes, unfolded protein, and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) [27, 28, 33–36]. In our study we investigated the hypothesis of the *TCF4* gene's influence in the development of FECD via alteration of the EMT mechanism (Fig. 4) [12, 18, 22–25]. EMT is a complex process in which cells lose cell-to-cell interactivity, potentially revealing a shared pathogenetic pathway for endothelial disease. Impaired EMT causes the

defective migration of endothelial cells and may explain why guttae first appear in the central cornea [27].

We were able to demonstrate a down-regulation of the *TCF4* gene in endothelial cells in the corneas of FECD patients compared with healthy donor corneal endothelium. This effect was detected in correlation with the CTG18.1 repeat expansion. As our control group shows, *TCF4*'s transcription level seems to be independent of the polymorphism, due to the presence of alleles TG, TT, and GG in the group without repeat expansions.

Recently, Oldak et al. 2015 [16] described unaltered *TCF4* expression in corneal FECD. They used real-time PCR primer for the *TCF4* gene expression analysis very close to the activation domain 2 (AD2). Nevertheless, we need to consider that the *TCF4* gene is a transcription factor with many isoforms differing in their amino-terminal region; what their cell lineage-specific functions and all their isoforms have in common is that they contain this transcription activation domain

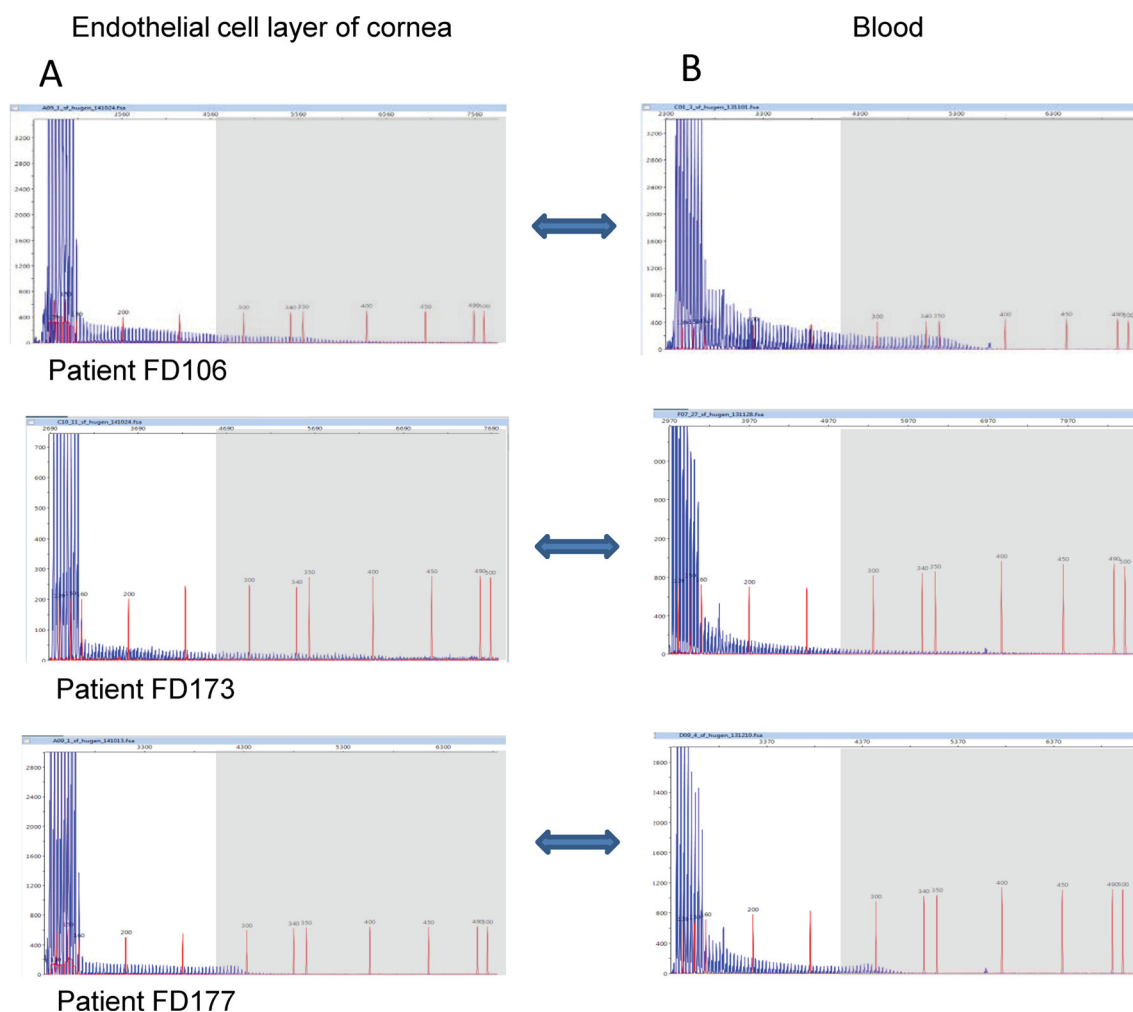


Fig. 1 Comparison of CTG18.1 trinucleotide repeat expansion in cells obtained from the endothelial layer of the cornea vs. blood investigations. TP-PCR from corneal endothelial layer after DMEK operation of FECD

patients **a** compared to blood analysis of the same patients. **b** The gray boxes indicate the border >50 CTG18.1 repeats

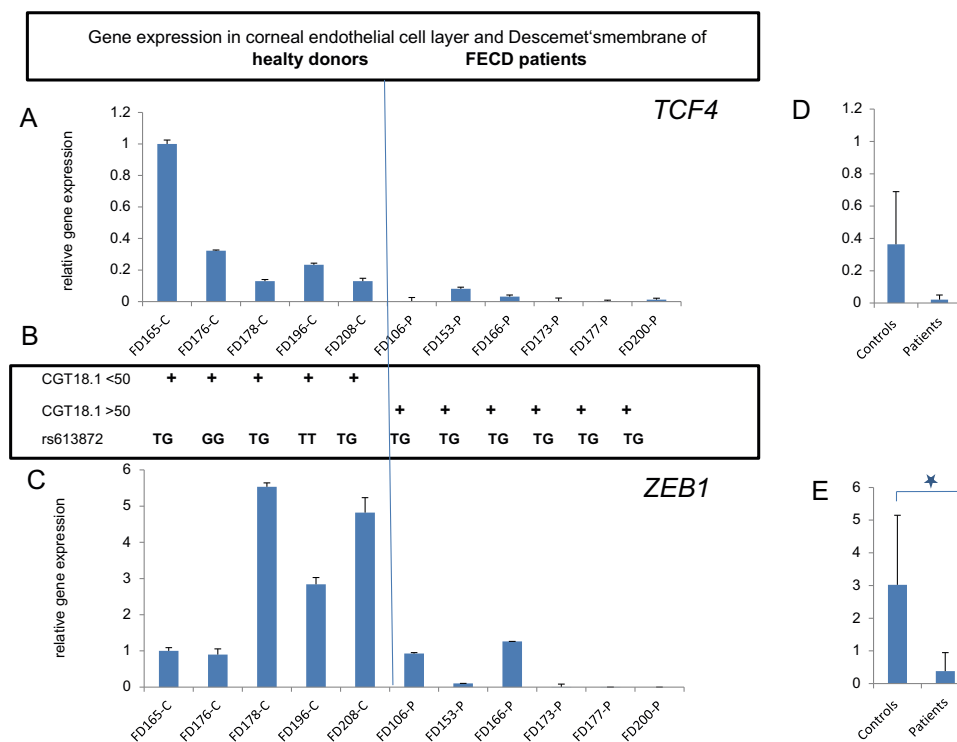


Fig. 2 Alteration of gene expression in correlation with CTG18.1 trinucleotide repeat expansion and polymorphism rs613872. **a** real-time analysis of *TCF4* gene expression normalized to beta-actin in the endothelium of FECD patients and healthy endothelial cells of cornea donors. **b** Demonstration of the presence or absence of CTG18.1 trinucleotide repeat expansion and demonstration of the genotype for the polymorphism rs613872. **c** real-time analysis of *ZEB1* gene expression in

endothelial cell layer of the cornea from FECD patients and healthy endothelial cells of cornea donors. **d** summary of relative gene expression of *TCF4* in endothelium of FECD patients ($n = 6$) and healthy endothelial cells of cornea donors ($n = 5$). Data are mean \pm SD, $p = 0.1$. **e** summary of relative gene expression of *ZEB1* in endothelium of FECD patients ($n = 5$) and healthy endothelial cells of cornea donors ($n = 6$). Data are mean \pm SD, $p < 0.05$

(AD2- exon 14–16) [37], the region analyzed by Oldak et al. [16]. Our TaqMan probe bonded specifically only to *TCF4* isoforms overspanning the FECD associated CTG18.1 region (reference sequence: NM_001112432.26 binding exon 3–4; NM_001083962.1; NM_001243228.1, NM_003199.2: binding exon 2–3). Therefore, the primer's different loci may be why we obtained different amplification results in *TCF4* expression.

Furthermore, due to different surgical techniques, the cell layers we investigated differed. Oldak et al. 2015 [16] investigated material after DSAEK that also included parts of the corneal stroma, whereas we analyzed only the FECD-affected endothelium and Descemet's layer of the cornea after DMEK. However, different storage conditions in our study (FECD corneal material stored immediately in RNAlater versus previously cultivated donor corneal material) can alter the gene expression. Otherwise, as all donor corneas that are meant to be transplanted are stored that way, we can rule out a serious loss of function as they usually function with no difficulty.

Mootha et al. summarized the expression levels from all isoforms of *TCF4* [34]. Although RT-PCR is not quantitative, FECD-associated *TCF4* isoforms containing the CTG18.1 region revealed a lower expression level. Thus, after indicating

CTG18.1 carrying *TCF4* isoforms, their data and ours correlate strongly.

ZEB1 expression has been demonstrated in the corneal endothelium, as well as on *ZEB1* binding sites in the promoter region of various collagen genes [27, 38]. *TCF4* is known to up-regulate *ZEB1* in healthy corneas and *ZEB1*'s loss of function mutation is also linked to late-onset FECD [12, 15, 22]. We detected a down-regulation of *ZEB1* in FECD patients (Fig. 2c and e). Further experiments will have to be conducted of this aspect and of *ZEB1* regulation pathways [27, 39–41].

Different studies describe that corneal epithelium reveals *E-cadherin* expression while *N-cadherin* is expressed from corneal endothelial cells. Thus, *E(pithelial)-cadherin* is a prototype molecule for non-neuronal cadherins and is expressed by all types of epithelial cells. *N(euronal)-cadherin* is a prototype molecule for neuronal cadherins. Corneal endothelium originates from neural crest cells and migrates over the corneal stroma during embryogenesis. Corneal endothelial precursor cells have the characteristics of multipotent neural crest-derived stem cells. Functional corneal endothelium can be induced from such cells [42–49].

In line with the aforementioned studies but contrary to the currently-postulated model of FECD pathogenesis [12,

Fig. 3 Expression of *E-cadherin* and *N-cadherin* in the human endothelial cell layer and Descemet's membrane. **a** relative gene expression of *E-cadherin* in FECD patients and healthy donor cornea endothelial cell layer. Human reference tissues indicate the functionality of TaqMan assay. **b** analysis of *N-cadherin* expression in endothelial cell layer including Descemet's membrane using TaqMan assays. Data are mean \pm SD

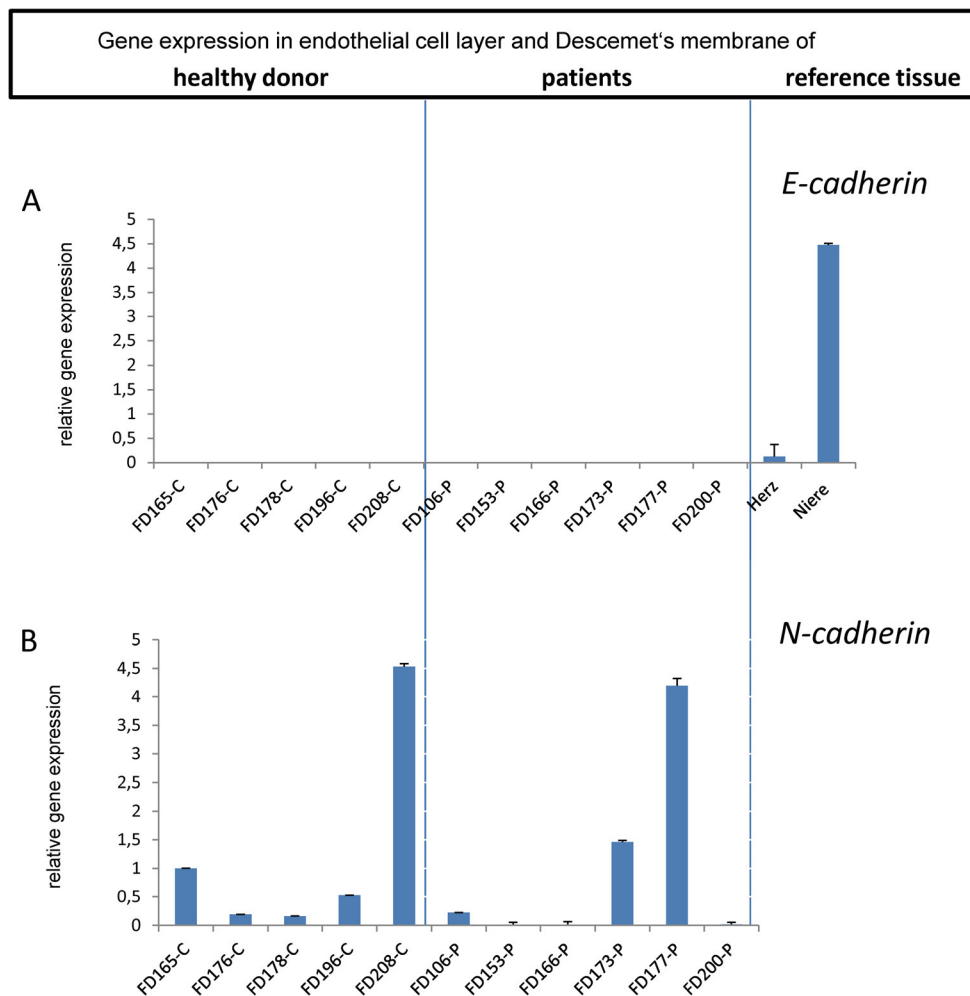
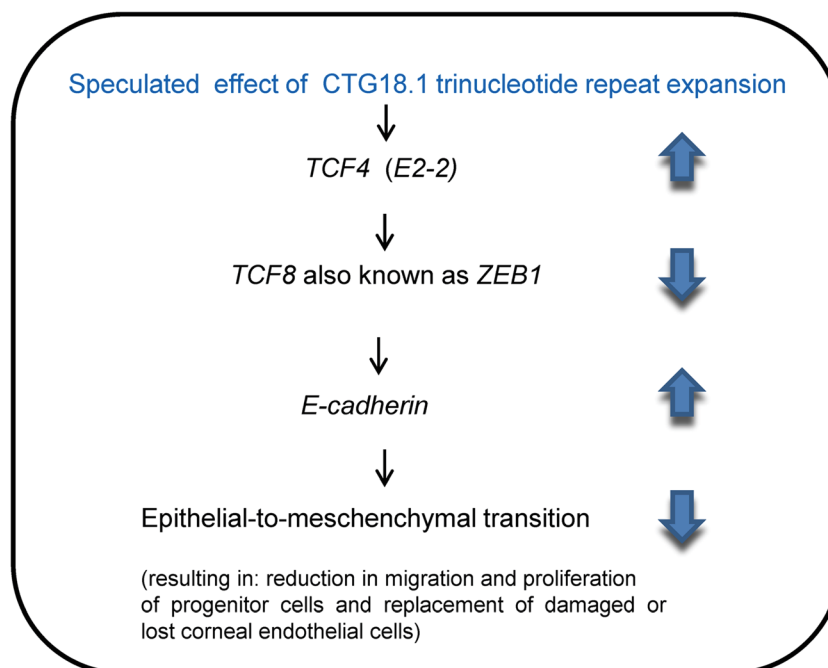


Fig. 4 Hypothesis for the pathogenic mechanism in the development of FECD by changing the EMT mechanism. This speculated pathway was modified according to the publication by Sobrado et al. 2009, Baratz et al. 2010, Wieben et al. 2014, and Wright et al. 2010



22–25, 28], we failed to identify *E-cadherin* gene expression via specific TaqMan assay in the endothelial cell layer with adhered Descemet's membrane (Fig. 3a). We observed expression of *CDH2* (*N-cadherin*) in controls and in FECD-affected corneal endothelium (Fig. 3b).

Descemet's membrane (examined at the same time for reasons of surgical convenience) is of neuronal origin [47, 49] as are the cornea's endothelial cells. It is in this context that it is logical that we detected the expression of neuronal *N-cadherin* in Descemet's cells, and not the expression of (hypothetical) E(pithelial)-cadherin.

Taken together, our data provide suggestive evidence for the involvement of *TCF4* in FECD pathogenesis. Our results provide evidence for the molecular mechanism of the CTG18.1 repeat expansion effect trending in reduced expression of *TCF4* and *ZEB1*.

Furthermore, we demonstrate that *E-cadherin* is not involved in the pathogenic mechanism of FECD as previously postulated. *N-cadherin* is expressed in the corneal endothelial cell layer and Descemet's membrane, the affected regions in the cornea leading to the FECD phenotype.

The detection of the CTG18.1 repeat expansion in the cornea and blood may be a first step toward discussing the potential relevance of testing the blood of cornea donors to minimize the risk of transplanting grafts potentially affected by FECD.

Compliance with ethical standards

Funding No- funding was received for this research.

Conflict of interest All authors certify that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest (such as honoraria, educational grants, participation in speakers' bureaus; membership, employment, consultancies, stock ownership, or other equity interest; and expert testimony or patent-licensing arrangements), or non-financial interest (such as personal or professional relationships, affiliations, knowledge or beliefs) in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

- Wilson SE, Bourne WM (1988) Fuchs' dystrophy. *Cornea* 7:2–18
- Eye Bank Association of America (2015) Eye banking statistical report. EBAA, Washington, DC
- Chi HH, Teng CC, Katzin HM (1958) Histopathology of primary endothelial-epithelial dystrophy of the cornea. *Am J Ophthalmol* 45:518–535
- Tan JC, Holland SP, Dubord PJ, Moloney G, McCarthy M, Yeung SN (2014) Evolving indications for and trends in keratoplasty in British Columbia, Canada, from 2002 to 2011: a 10-year review. *Cornea* 33:252–256. doi:10.1097/ICO.0000000000000066
- Keenan TD, Jones MN, Rushton S, Carley FM (2012) Trends in the indications for corneal graft surgery in the United Kingdom: 1999 through 2009. *Arch Ophthalmol* 130:621–628. doi:10.1001/archophthalmol.2011.2585
- Price MO, Price FW Jr (2013) Descemet's membrane endothelial keratoplasty surgery: update on the evidence and hurdles to acceptance. *Curr Opin Ophthalmol* 24:329–335. doi:10.1097/ICU.0b013e32836229ab
- Gottsch JD, Sundin OH, Liu SH, Broman KW, Stark WJ, Vito EC, Narang AK, Thompson JM (2005) Inheritance of a novel COL8A2 mutation defines a distinct early-onset subtype of Fuchs corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:1934–1939. doi:10.1167/iovs.04-0937
- Vithana EN, Morgan P, Sundaresan P, Ebenezer ND, Tan DT, Mohamed MD, Anand S, Khine KO, Venkataraman D, Yong VH, Salto-Tellez M, Venkatraman A, Guo K, Hemadevi B, Srinivasan M, Prajna V, Khine M, Casey JR, Inglehearn CF, Aung T (2006) Mutations in sodium-borate cotransporter SLC4A11 cause recessive congenital hereditary endothelial dystrophy (CHED2). *Nat Genet* 38:755–757. doi:10.1038/ng1824
- Riazuddin SA, Vasanth S, Katsanis N, Gottsch JD (2013) Mutations in *AGBL1* cause dominant late-onset Fuchs corneal dystrophy and alter protein-protein interaction with *TCF4*. *Am J Hum Genet* 93:758–764. doi:10.1016/j.ajhg.2013.08.010
- Riazuddin SA, Zaghoul NA, Al-Saif A, Davey L, Diplas BH, Meadows DN, Eghrari AO, Minear MA, Li YJ, Klintworth GK, Afshari N, Gregory SG, Gottsch JD, Katsanis N (2010) Missense mutations in *TCF8* cause late-onset Fuchs corneal dystrophy and interact with *FCD4* on chromosome 9p. *Am J Hum Genet* 86:45–53. doi:10.1016/j.ajhg.2009.12.001
- Riazuddin SA, Parker DS, McGlumphy EJ, Oh EC, Iliff BW, Schmedt T, Jurkunas U, Schleif R, Katsanis N, Gottsch JD (2012) Mutations in *LOXHD1*, a recessive-deafness locus, cause dominant late-onset Fuchs corneal dystrophy. *Am J Hum Genet* 90:533–539. doi:10.1016/j.ajhg.2012.01.013
- Baratz KH, Tosakulwong N, Ryu E, Brown WL, Branham K, Chen W, Tran KD, Schmid-Kubista KE, Heckenlively JR, Swaroop A, Abecasis G, Bailey KR, Edwards AO (2010) E2-2 protein and Fuchs's corneal dystrophy. *N Engl J Med* 363:1016–1024. doi:10.1056/NEJMoa1007064
- Igo RP Jr, Kopplin LJ, Joseph P, Truitt B, Fondran J, Bardenstein D, Aldave AJ, Croasdale CR, Price MO, Rosenwasser M, Lass JH, Iyengar SK (2012) FECD genetics multi-center study group. Differing roles for *TCF4* and *COL8A2* in central corneal thickness and fuchs endothelial corneal dystrophy. *PLoS One* 7:e46742. doi:10.1371/journal.pone.0046742
- Li YJ, Minear MA, Rimmmler J, Zhao B, Balajonda E, Hauser MA, Allingham RR, Eghrari AO, Riazuddin SA, Katsanis N, Gottsch JD, Gregory SG, Klintworth GK, Afshari NA (2011) Replication of *TCF4* through association and linkage studies in late-onset Fuchs endothelial corneal dystrophy. *PLoS One* 6:e18044. doi:10.1371/journal.pone.0018044
- Stamler JF, Roos BR, Wagoner MD, Goins KM, Kitzmann AS, Riley JB, Stone EM, Fingert JH (2013) Confirmation of the association between the *TCF4* risk allele and Fuchs endothelial corneal dystrophy in patients from the Midwestern United States. *Ophthalmic Genet* 34:32–34. doi:10.3109/13816810.2012.726396
- Oldak M, Ruskowska E, Udziela M, Oziębło D, Bińczyk E, Ścieżyńska A, Płoski R, Szaflik JP (2015) Fuchs endothelial

- corneal dystrophy: strong association with rs613872 not paralleled by changes in corneal endothelial TCF4 mRNA level. *Biomed Res Int* 2015:640234. doi:[10.1155/2015/640234](https://doi.org/10.1155/2015/640234)
17. Wieben ED, Aleff RA, Tosakulwong N, Butz ML, Highsmith WE, Edwards AO, Baratz KH (2012) A common trinucleotide repeat expansion within the transcription factor 4 (TCF4, E2-2) gene predicts Fuchs corneal dystrophy. *PLoS One* 7:e49083. doi:[10.1371/journal.pone.0049083](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049083)
 18. Wieben ED, Aleff RA, Eckloff BW, Atkinson EJ, Baheti S, Middha S, Brown WL, Patel SV, Kocher JP, Baratz KH (2014) Comprehensive assessment of genetic variants within TCF4 in Fuchs' endothelial corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55(6101–7):6101–6107. doi:[10.1167/iops.14-14958](https://doi.org/10.1167/iops.14-14958)
 19. Mootha VV, Gong X, Ku HC, Xing C (2014) Association and familial segregation of CTG18.1 trinucleotide repeat expansion of TCF4 gene in Fuchs' endothelial corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55:33–42. doi:[10.1167/iops.13-12611](https://doi.org/10.1167/iops.13-12611)
 20. Xing C, Gong X, Hussain I, Khor CC, Tan DT, Aung T, Mehta JS, Vithana EN, Mootha VV (2014) Transethnic replication of association of CTG18.1 repeat expansion of TCF4 gene with Fuchs' corneal dystrophy in Chinese implies common causal variant. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55:7073–7078. doi:[10.1167/iops.14-15390](https://doi.org/10.1167/iops.14-15390)
 21. Jalimarada SS, Ogando DG, Bonanno JA (2014) Loss of ion transporters and increased unfolded protein response in Fuchs' dystrophy. *Mol Vis* 20:1668–1679
 22. Sobrado VR, Moreno-Bueno G, Cubillo E, Holt LJ, Nieto MA, Portillo F, Cano A (2009) The class I bHLH factors E2-2A and E2-2B regulate EMT. *J Cell Sci* 122:1014–1024. doi:[10.1242/jcs.028241](https://doi.org/10.1242/jcs.028241)
 23. Forrest MP, Waite AJ, Martin-Rendon E, Blake DJ (2013) Knockdown of human TCF4 affects multiple signaling pathways involved in cell survival, epithelial to mesenchymal transition and neuronal differentiation. *PLoS One* 8:e73169. doi:[10.1371/journal.pone.0073169](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073169)
 24. Lamouille S, Xu J, Derynck R (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:178–196. doi:[10.1038/nrm3758](https://doi.org/10.1038/nrm3758)
 25. Wright AF, Dhillon B (2010) Major progress in Fuchs's corneal dystrophy. *N Engl J Med* 363:1072–1075. doi:[10.1056/NEJMe1007495](https://doi.org/10.1056/NEJMe1007495)
 26. Gottsch JD, Zhang C, Sundin OH, Bell WR, Stark WJ, Green WR (2005) Fuchs corneal dystrophy: aberrant collagen distribution in an L450W mutant of the COL8A2 gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:4504–4511. doi:[10.1167/iops.05-0497](https://doi.org/10.1167/iops.05-0497)
 27. Schmedt T, Silva MM, Ziaei A, Jurkunas U (2012) Molecular bases of corneal endothelial dystrophies. *Exp Eye Res* 95:24–34. doi:[10.1016/j.exer.2011.08.002](https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.08.002)
 28. Iliff BW, Riazuddin SA, Gottsch JD (2012) The genetics of Fuchs' corneal dystrophy. *Expert Rev Ophthalmol* 7:363–375. doi:[10.1586/eop.12.39](https://doi.org/10.1586/eop.12.39)
 29. Cano A, Portillo F (2010) An emerging role for class I bHLH E2-2 proteins in EMT regulation and tumour progression. *Cell Adhes Migr* 4:528–544
 30. Gupta R, Kumawat BL, Paliwal P, Tandon R, Sharma N, Sen S, Kashyap S, Nag TC, Vajpayee RB, Sharma A (2015) Association of ZEB1 and TCF4 rs613872 changes with late onset Fuchs endothelial corneal dystrophy in patients from northern India. *Mol Vis* 21:1252–1260
 31. Luther M, Grünauer-Kloevekorn C, Weidle E, Passarge E, Rupprecht A, Hoffmann K, Foja S (2016) TGC repeats in intron 2 of the TCF4 Gene have a good predictive power regarding to Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 233:187–194. doi:[10.1055/s-0035-1546138](https://doi.org/10.1055/s-0035-1546138)
 32. Riazuddin SA, McGlumphy EJ, Yeo WS, Wang J, Katsanis N, Gottsch JD (2011) Replication of the TCF4 intronic variant in late-onset Fuchs corneal dystrophy and evidence of independence from the FCD2 locus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:2825–2829. doi:[10.1167/iops.10-6497](https://doi.org/10.1167/iops.10-6497)
 33. Du J, Aleff RA, Soragni E, Kalari K, Nie J, Tang X, Davila J, Kocher JP, Patel SV, Gottesfeld JM, Baratz KH, Wieben ED (2015) RNA toxicity and Missplicing in the common eye disease Fuchs endothelial corneal dystrophy. *J Biol Chem* 290:5979–5990. doi:[10.1074/jbc.M114.621607](https://doi.org/10.1074/jbc.M114.621607)
 34. Mootha VV, Hussain I, Cunnusamy K, Graham E, Gong X, Neelam S, Xing C, Kittler R, Petroll WM (2015) TCF4 triplet repeat expansion and nuclear RNA foci in Fuchs' endothelial corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56:2003–2011. doi:[10.1167/iops.14-16222](https://doi.org/10.1167/iops.14-16222)
 35. Matthaie M, Zhu AY, Kallay L, Eberhart CG, Cursiefen C, Jun AS (2014) Transcript profile of cellular senescence-related genes in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Exp Eye Res* 129:13–17. doi:[10.1016/j.exer.2014.10.011](https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.10.011)
 36. Aldave AJ, Han J, Frausto RF (2013) Genetics of the corneal endothelial dystrophies: an evidence-based review. *Clin Genet* 84:109–119. doi:[10.1111/cge.12191](https://doi.org/10.1111/cge.12191)
 37. Sepp M, Kannike K, Eesmaa A, Urb M, Timmusk T (2011) Functional diversity of human basic helix-loop-helix transcription factor TCF4 isoforms generated by alternative 5' exon usage and splicing. *PLoS One* 6:e22138. doi:[10.1371/journal.pone.0022138](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022138)
 38. Krafchak CM, Pawar H, Moroi SE, Sugar A, Lichter PR, Mackey DA, Mian S, Nairus T, Elner V, Schteingart MT, Downs CA, Kijek TG, Johnson JM, Trager EH, Rozsa FW, Mandal MN, Epstein MP, Vollrath D, Ayyagari R, Boehnke M, Richards JE (2005) Mutations in TCF8 cause posterior polymorphous corneal dystrophy and ectopic expression of COL4A3 by corneal endothelial cells. *Am J Hum Genet* 77:694–708. doi:[10.1086/497348](https://doi.org/10.1086/497348)
 39. Qu J, Li M, An J, Zhao B, Zhong W, Gu Q, Cao L, Yang H, Hu C (2015) MicroRNA-33b inhibits lung adenocarcinoma cell growth, invasion, and epithelial-mesenchymal transition by suppressing Wnt/ β -catenin/ZEB1 signaling. *Int J Oncol* 47:2141–2152. doi:[10.3892/ijo.2015.3187](https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3187)
 40. Li X, Gao D, Wang H, Li X, Yang J, Yan X, Liu Z, Ma Z (2015) Negative feedback loop between p66Shc and ZEB1 regulates fibrotic EMT response in lung cancer cells. *Cell Death Dis* 6:e1708. doi:[10.1038/cddis.2015.74](https://doi.org/10.1038/cddis.2015.74)
 41. Sánchez-Tilló E, de Barrios O, Siles L, Cuatrecasas M, Castells A, Postigo A (2011) β -catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:19204–19209. doi:[10.1073/pnas.1108977108](https://doi.org/10.1073/pnas.1108977108)
 42. Yu WY, Sheridan C, Grierson I, Mason S, Kearns V, Lo AC, Wong D (2011) Progenitors for the corneal endothelium and trabecular meshwork: a potential source for personalized stem cell therapy in corneal endothelial diseases and glaucoma. *Biomed Biotechnol* 2011:412743. doi:[10.1155/2011/412743](https://doi.org/10.1155/2011/412743)
 43. Van Aken E, Papeleu P, De Potter P, De Laey JJ, Mareel M (2000) Cadherin expression in the eye. *Bull Soc Belge Ophthalmol* 278:55–59
 44. Nollet F, Kools P, van Roy F (2000) Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol* 299:551–572. doi:[10.1006/jmbi.2000.3777](https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3777)
 45. Gerhardt H, Liebner S, Redies C, Wolburg H (1999) N-cadherin expression in endothelial cells during early angiogenesis in the eye

- and brain of the chicken: relation to blood-retina and blood-brain barrier development. *Eur J Neurosci* 11:1191–1201
46. Zhu AY, Eberhart CG, Jun AS (2014) Fuchs endothelial corneal dystrophy: a neurodegenerative disorder? *JAMA Ophthalmol* 132:377–378. doi:[10.1001/jamaophthalmol.2013.7993](https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2013.7993)
47. Johnston MC, Noden OM, Hazelton RO, Coulombre JL, Coulombre AJ (1979) Origins of avian ocular and periocular tissues. *Exp Eye Res* 29:27–43
48. Hatou S, Yoshida S, Higa K, Miyashita H, Inagaki E, Okano H, Tsubota K, Shimmura S (2013) Functional corneal endothelium derived from corneal stroma stem cells of neural crest origin by retinoic acid and Wnt/ β -catenin signaling. *Stem Cells Dev* 22: 828–839. doi:[10.1089/scd.2012.0286](https://doi.org/10.1089/scd.2012.0286)
49. McCartney ACE, Kirkness CM (1988) Comparison between posterior polymorphous dystrophy and congenital hereditary endothelial dystrophy of the cornea. *Eye* 2:63–70. doi:[10.1038/eye.1988.14](https://doi.org/10.1038/eye.1988.14)

Erklärungen

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), 09. Dezember 2024

Mirjam Liebsch