

Aus dem Zentrum für Augenheilkunde der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Augenheilkunde
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. C. Cursiefen

Expression der Zellzyklusinhibitoren p16 und p21 bei der Fuchs-Endotheldystrophie

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Manuel Schmidt

promoviert am 30. Juni 2025

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
Druckjahr 2025

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. phil. L. Heindl
2. Gutachter: Professor Dr. med. R. Widder

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Prof. Dr. med. Matthaei von mir selbst ausgeführt worden.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 30.10.2024

Unterschrift:

Danksagung

Im Folgenden möchte ich meinen ausserordentlichen Dank für die allzeit hervorragende und stets freundliche Unterstützung aussprechen. Insbesondere meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Heindl sowie meinem Tutor Prof. Dr. med. Matthaei für die tolle Betreuung, Anleitung und Hilfsbereitschaft. Weiter möchte ich mich beim Team des Cornea Lab unter der Leitung von Prof. Dr. Felix Bock für die Unterstützung vor allem in der experimentellen Phase meiner Doktorarbeit bedanken. Dank insbesondere in der konzeptionellen Phase der Doktorarbeit gilt den Mitgliedern der AG Heindl. Besonderer Dank im Rahmen der Auswertung der Ergebnisse gilt Agathe Hribek sowie Daniela Sary.

Meinen Freunden, meiner Familie und meiner Freundin möchte ich für die kontinuierliche und stetige Motivation in den letzten Jahren danken.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1. ZUSAMMENFASSUNG	8
2. EINLEITUNG	10
2.1 Physiologische Grundlagen und Anatomie	10
2.1.1 Aufbau der Cornea	10
2.1.2 Das gesunde corneale Endothel	11
2.2 Die Fuchs-Endotheldystrophie	12
2.3 Therapie der Fuchs-Endotheldystrophie	13
2.3.1 Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty (DMEK)	13
2.3.2 Descemetorhexis without endothelial Keratoplasty (DWEK)	15
2.4 Pathogenese der Fuchs-Endotheldystrophie	15
2.4.1 p16 und p21 in humanen cornealen Endothelzellen	16
2.4.2 Der G1/S Phasen-Übergang des Zellzyklus	17
2.4.3 p16 (Synonyme: CDKN2A/INK4a)	18
2.4.4 p21 (Synonym: CDKN1A/Cip1/WAF1/Sdi1/Cap20)	19
2.4.5 Seneszenz	19
2.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit	20
3. MATERIAL UND METHODEN	21
3.1 Material	21
3.1.1 Reagenzien	21
3.1.2 Primäre Antikörper	21
3.1.3 Sekundär-Antikörper:	21
3.2 Methoden	22
3.2.1 Ein- bzw. Ausschlusskriterien	22
3.2.2 Probengewinnung, Lagerung und Transport	23
3.2.3 Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung	23
3.2.4 Einbetten der Descemet Membran Endothel-Komplexe	24
3.2.5 Zellkultur	24

3.2.6	Positiv-/Negativ-Kontrolle	25
3.2.7	Autofluoreszenz	25
3.2.8	Kontrollgruppe	25
3.2.9	Bilderstellung	26
3.2.10	Bildanalyse	26
3.2.11	Kalibrierung	26
3.2.12	Bestimmung der Fläche der Descemet Membran Endothel-Komplexe	26
3.2.13	Bestimmung der Zelldichte	28
3.2.14	Ermittlung des Mittelpunktes der Descemet Membran Endothel-Komplexe	30
3.2.15	Qualitative Auswertung	31
3.2.16	Differenzierung Zentrum versus. Peripherie	32
3.2.17	Grading p16	33
3.2.18	p16 Grading: Beispiel p16 Grad 1	33
3.2.19	p16 Grading: Beispielbilder p16 Grad 2 bis Grad 4	34
3.2.20	Grading p21	35
3.2.21	p21 Grading: Beispielbilder Grad 1 bis Grad 3	36
3.2.22	Ermittlung der statistischen Werte	37
4.	ERGEBNISSE	38
4.1	Ein- und Ausschluss von Descemet Membran Endothel-Komplexen	38
4.2	Ermittelte Fläche der Descemet Membran Endothel-Komplexe	38
4.3	Empirische Daten	39
4.4	Globale und regionale Zelldichte	39
4.5	Zelldichte in Korrelation zum Alter	40
4.6	Ergebnisse der Kontroll-Untersuchungen	41
4.7	Ergebnisse der qualitativen Beurteilung	42
4.8	Ergebnisse der p16 Expressionsanalyse	42
4.9	Gegenüberstellung p16 Expression Zentrum versus Peripherie	44
4.10	Ergebnisse der p21 Expressionsanalyse	45
5.	DISKUSSION	46

5.1	DEK-Fläche und Präparation zum Flachpräparat	46
5.2	Zelldichte und altersabhängiger Zellverlust	46
5.3	Expressionsanalyse p16	47
5.4	Expressionsanalyse p21	48
5.5	Limitationen	49
5.6	Schlussfolgerung	50
6.	LITERATURVERZEICHNIS	51

Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovines Serum-Albumin
CDK	cyclin-dependent kinase (deutsch: Cyclin-abhängige Kinase)
CDKI	cyclin-dependent kinase inhibitor (deutsch: Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor)
CIP(KIP)	CDK interacting protein (Kinase inhibitory protein)
CUG	Cytosin Uracil Guanin
DAPI	(4',6-Diamidin-2-phenylindol)
DEK	Descemet-(Membran)-Endothel-Komplex
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
DMEK	Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty
DNS/DNA	Desoxyribonulkeinsäure/ deoxyribonucleic acid
DWEK	Descemetorhexis Without Endothelial Keratoplasty
E2F	Transkriptionsfaktor E2F
ETS	E26 transformation-specific oder E-twenty-sic family
FED	Fuchs-Endotheldystrophie
HCEC	Human corneal endothelial cells
HeLa	Henrietta Lacks
INK4	Inhibitor of CDK4
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia Hydrogenii
pRB/RB	Retinoblastom-Protein
ROI	Region of interest
TMA	Tissue Micro Array
UV	Ultraviolett (-strahlung)

1 Zusammenfassung

Die Fuchs-Endotheldystrophie (FED) ist eine bilaterale Erkrankung des Hornhautendothels. Sie stellt die häufigste Indikation zur Durchführung von Hornhaut-Transplantationen in Deutschland und weltweit dar. (Flockerzi et al., 2018; Heinzelmann, Böhringer, Eberwein, Reinhard, & Maier, 2016; Lang, Bischoff, Böhringer, Seitz, & Reinhard, 2014) Das gesunde Endothel besteht aus einer einlagigen Zellschicht hexagonaler Zellen. (Elhalis, Azizi, & Jurkunas, 2010) Eine Schlüsselfunktion des Endothels liegt im Erhalt des cornealen Hydratations-Gleichgewichtes und damit der Sicherstellung der optischen Transparenz der Cornea. Charakterisiert ist die FED durch den beschleunigten Verlust von (humanen) cornealen Endothelzellen (HCEC) und die vermehrte subendotheliale Ablagerung von extrazellulärer Matrix. (Hoppenreijds, Pels, Vrensen, Oosting, & Treffers, 1992; Laing, Sanstrom, Berrospi, & Leibowitz, 1976; Matsubara & Tanishima, 1983; C. Murphy, Alvarado, Juster, & Maglio, 1984) Die verbliebenen und gestressten HCEC sezernieren eine veränderte Matrix, welche zu Verdickungen der Descemet Membran mit Ausbildung tropfenförmiger Protrusionen, den sogenannten Guttae, führen. (Elhalis et al., 2010; G. O. Waring, 3rd, Rodrigues, & Laibson, 1978) Guttae stellen das pathognomonische Zeichen der FED dar. (Eghrari, Riazuddin, & Gottsch, 2015)

Minimalinvasive Hornhauttransplantationen, bei denen selektiv einzelne Schichten der Hornhaut ersetzt werden, sind aktuell die gängige Therapieoption zur Behandlung der FED. (Borkar, Veldman, & Colby, 2016) Bei FED-Patienten erfolgt in der Regel eine Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty (DMEK). (B. Bachmann, Schaub, & Cursiefen, 2016)

In Tissue Micro Array-Untersuchungen konnte in HCEC von FED-Patienten eine erhöhte Expression der Zellzyklusinhibitoren p16 (Synonym: CDKN2A/INK4a) und p21 (Synonym: CDKN1A/Cip1/WAF1/Sdi1/Cap20) festgestellt werden. (Matthaei et al., 2013) In dieser Arbeit wurde die Expression von p16 sowie p21 im Rahmen der FED näher untersucht. Die Untersuchung erfolgte an Descemet Membran Endothel-Komplexen (DEK), welche zu Flachpräparaten aufbereitet wurden. Es erfolgte eine indirekte Immunfluoreszenz-Färbung des gesamten DEK, sodass eine differenzierte Analyse der einzelnen Bereiche möglich war. Elementarer Bestandteil der Arbeit war die vergleichende Betrachtung des Zentrums im Vergleich zur Peripherie. Es wurde die Hypothese untersucht, ob eine erhöhte Expression von p16/p21 im FED-DEK

nachzuweisen war sowie ob diese erhöhten Expressionslevel im Zentrum der FED-DEK lagen.

Die Analyse der Immunlokalisation der p16-Expression zeigte bei den FED-DEK eine signifikant ($p < 0,0001$) häufigere stark ausgeprägte Expression im Zentrum, verglichen zur Peripherie. Die erhöhte Expression erscheint mit der Seneszenz im Rahmen der Pathogenese der FED vereinbar, wie dies auch durch Matthaei et al bereits beschrieben wurde. (Matthaei et al., 2013) Die starke Expression von p16 war vor allem im zytoplasmatischem Raum der HCEC zu finden. Die Immunlokalisation der p21 Expression zeigte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich des Zentrums zur Peripherie. In den FED-DEK konnte p21 in rein zytoplasmatischer Expression nachgewiesen werden.

Die Resultate dieser Arbeit geben weitere Hinweise darauf, dass die erhöhte Expression von p16 im Zentrum des DEK-Komplexes mit den pathologischen Veränderungen durch die FED einhergeht und die seneszenten Zellen bei der FED insbesondere im Zentrum des Endothels zu finden sind. Diese ersten Ergebnisse bedürfen weiterführender Untersuchungen in größeren Kollektiven.

2 Einleitung

2.1 Physiologische Grundlagen und Anatomie

2.1.1 Aufbau der Cornea

Die Hornhaut (Cornea) ist das „klare Fenster“ des Auges. Die durchschnittliche gesunde Cornea eines Erwachsenen hat einen horizontalen Durchmesser von 11,5 bis 12mm (Rufer, Schroder, & Erb, 2005) sowie einen vertikalen Durchmesser von circa 10mm. Die Dicke liegt bei circa 500µm im Zentrum und nimmt zum Rand hin zu. (DelMonte & Kim, 2011)

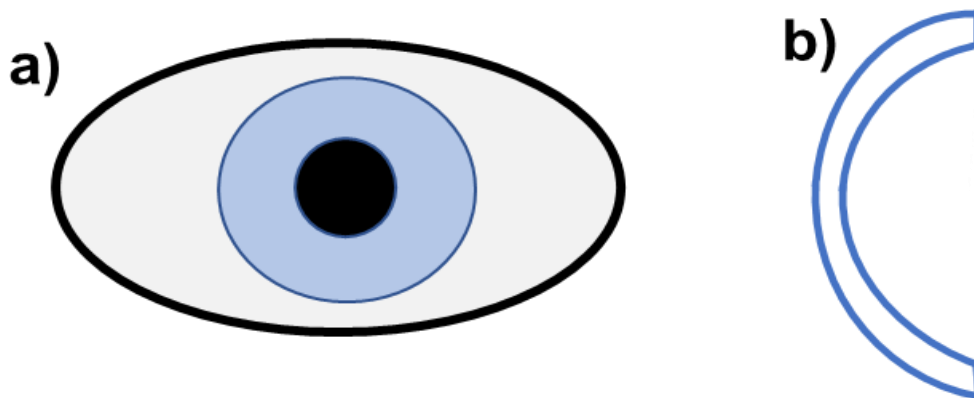


Abbildung 1) a) Schematische Frontalansicht auf das Auge b) Schematischer Querschnitt der Cornea

Die Cornea lässt sich in fünf Schichten untergliedern (Abbildung 2). Von anterior nach posterior betrachtet ist das Epithel mit einer Tiefe von 40 bis 50µm die erste Schicht. (Farjo, McDermott, & Soong, 2009) Die nächste abgrenzbare Struktur ist die Bowman-Membran. Diese ist keine Membran im eigentlichen Sinne, sondern ein zellfreies Kondensat, welches die vordere Begrenzung des nachfolgenden Stromas darstellt. Die durchschnittliche Tiefe beträgt circa 15µm. Die Bowman-Membran unterstützt bei der Formerhaltung der Cornea. Das Stroma bildet mit 400 bis 425µm Dicke die größte Schicht innerhalb der Cornea. Es setzt sich aus 200 bis 250 einzelnen Lamellen zusammen. (Maurice, 1970) Zum Auginneren schließt sich die circa 10µm dicke Descemet Membran an, welche als Basalmembran des abschließenden circa 4µm dicken Endothels fungiert. (DelMonte & Kim, 2011) Die Endothelfunktion wird nachfolgend ausführlich erläutert.

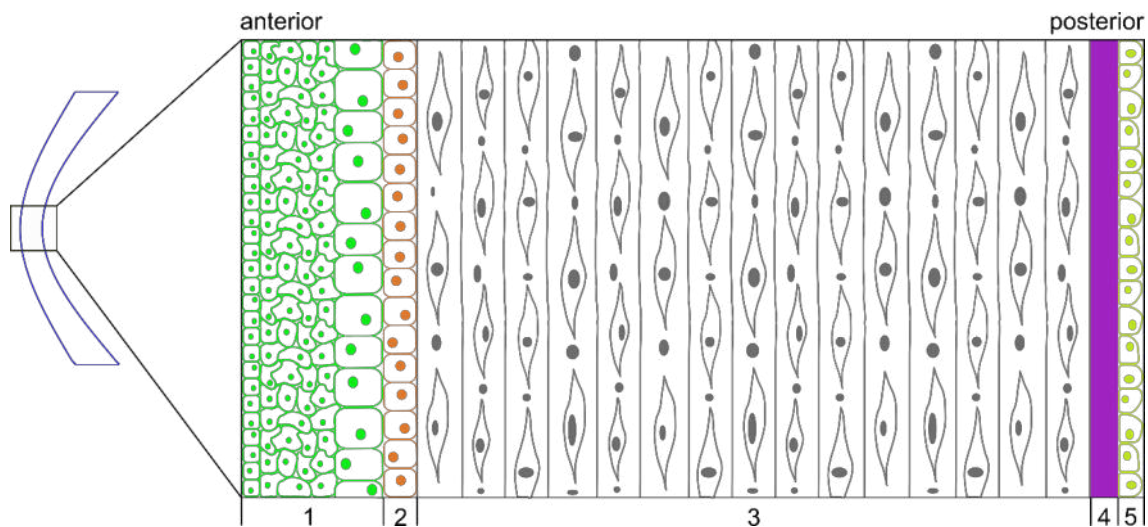


Abbildung 2) Querschnitt durch die Cornea mit Darstellung der einzelnen Schichten. (1) Epithel, (2) Bowman-Membran, (3) Stroma, (4) Descemet Membran, (5) Endothel.

2.1.2 Das gesunde corneale Endothel

Das gesunde Endothel besteht aus einer einlagigen Zellschicht hexagonaler Zellen (Abbildung 3). (Elhalis et al., 2010) Eine Schlüsselfunktion des Endothels liegt im Erhalt des cornealen Hydratations-Gleichgewichtes und damit der Sicherstellung der optischen Transparenz der Cornea. Dies gelingt über eine Barriere- und Pumpfunktion, (Barfort & Maurice, 1974; Maurice, 1972) bei der die (humanen) cornealen Endothelzellen (HCEC) Ionen bzw. eingedrungenes Wasser aktiv (via Na/K-ATPasen) zurück in die Vorderkammer des Auges transportieren. Auf diese Weise wird ein dynamisches Gleichgewicht zwischen einer relativen Dehydratation und Schwellung durch Ödem-Bildung aufrechterhalten. (Tuft & Coster, 1990) Die Endothelzellzahl nimmt unter physiologischen Bedingungen im Erwachsenenalter mit einer Rate von ungefähr 0,6% pro Jahr ab. (Bourne, Nelson, & Hodge, 1997; C. Murphy et al., 1984) Die Zelldichte liegt im 2. Lebensjahrzehnt bei circa 3000 bis 4000 Zellen/mm² und nimmt bis zum 8. Lebensjahrzehnt auf circa 2600 Zellen/mm² ab. (Yee, Matsuda, Schultz, & Edelhauser, 1985)

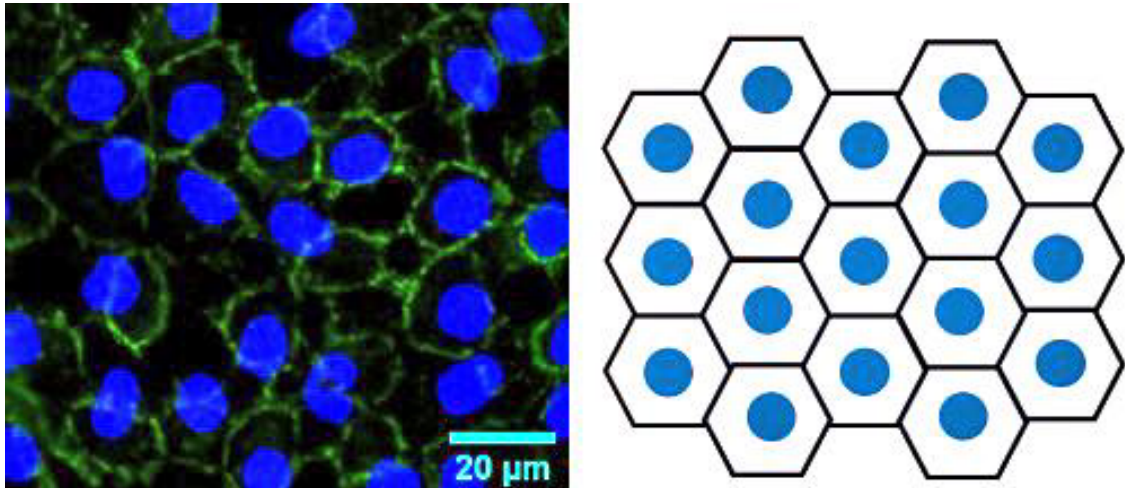


Abbildung 3) Hexagon-Struktur der Endothelzellen. Links: DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)- (Zellkern) und ZO-1-Färbung (Zellmembran). Rechts schematische Darstellung.

2.2 Die Fuchs-Endotheldystrophie

Die Fuchs-Endotheldystrophie (FED) ist eine bilaterale Erkrankung des Hornhautendothels. Sie wurde erstmals 1910 durch Ernst Fuchs beschrieben und nach ihm benannt. (Fuchs, 1910) Sie stellt die häufigste Indikation zur Durchführung von Hornhaut-Transplantationen in Deutschland und weltweit dar. (Flockerzi et al., 2018; Heinzelmann et al., 2016; Lang et al., 2014) Die FED betrifft in den frühen Stadien typischerweise die zentrale Cornea und breitet sich über die folgenden Jahrzehnte nach peripher aus. (Eghrari et al., 2015) Charakterisiert ist die FED durch den beschleunigten Verlust von HCEC und die vermehrte subendotheliale Ablagerung von extrazellulärer Matrix. Der durch den Verlust der HCEC freiwerdende Raum wird durch die Expansion benachbarter Zellen gefüllt (Hoppenreijns et al., 1992; Laing et al., 1976; Matsubara & Tanishima, 1983; C. Murphy et al., 1984) und führt zum Verlust der hexagonalen Zell-Morphologie sowie der einheitlichen Größe der Zellen (Abbildung 3). (Adamis, Filatov, Tripathi, & Tripathi, 1993; Iwamoto & Devoe, 1971; G. O. Waring, 3rd et al., 1978) Es zeigt sich nun stattdessen ein Pleomorphismus mit variabel geformten Zellen sowie ein Polymegathismus mit unterschiedlich großen Zellen. (Alomar, Al-Aqaba, Gray, Lowe, & Dua, 2011; Bourne, Johnson, & Campbell, 1982)

Die verbliebenen und gestressten HCEC sezernieren eine veränderte Matrix, welche zu Verdickungen der Descemet Membran mit Ausbildung tropfenförmiger Protrusionen, den sogenannten Guttae, führen. (Elhalis et al., 2010; G. O. Waring, 3rd et al., 1978) Guttae stellen das pathognomonische Zeichen der FED dar. (Eghrari et al., 2015) Die Präsenz von Guttae korreliert proportional mit dem Verlust und der Dysfunktion der HCEC. Die endotheliale Dysfunktion führt wiederum zur Entwicklung eines cornealen Ödems.

(Eghrari et al., 2015) Guttae treten zunächst zentral und erst im weiteren Verlauf der Erkrankung in der Peripherie auf. (Adamis et al., 1993)

Wenn die Anzahl der Endothelzellen unter die Schwelle von 300 bis 500 Zellen pro mm² (He et al., 2011) absinkt, schwillt die Cornea an. Durch einen zunehmenden Flüssigkeitseintritt kommt es zu einem Ödem mit Visus-Einschränkungen. (Elhalis et al., 2010; G. O. Waring, 3rd et al., 1978)

Der klinische Verlauf der FED erstreckt sich in der Regel über mehrere Jahrzehnte, wobei der Beginn der Erkrankung etwa im 2. Lebensjahrzehnt liegt und klinische Beschwerden meist im 4. bis 5. Lebensjahrzehnt auftreten. (Elhalis et al., 2010; G. O. Waring, 3rd et al., 1978) Initial klagen die Patienten über verschwommenes Sehen, vor allem in den Morgenstunden. Im weiteren Verlauf treten verstärkte Blendung durch Lichtquellen sowie Schmerzen auf. Bei weit fortgeschrittener Erkrankung kann diese bis zur Erblindung führen. (Elhalis et al., 2010; G. R. Waring, MM; Laibson, PR, 1984; Weisenthal, 1997)

2.3 Therapie der Fuchs-Endotheldystrophie

Bislang besteht die einzige etablierte kurative Therapie der FED in der Hornhaut-Transplantation (Keratoplastik). Bei der Keratoplastik wird das erkrankte Cornea-Gewebe entfernt und durch gesundes Gewebe von Organspendern ersetzt. Die erste erfolgreiche Keratoplastik am Menschen wurde im Jahr 1905 durch Konrad Eduard Zirm durchgeführt. (Zirm, 1906) Über die folgenden Jahrzehnte erfolgte die Hornhaut-Transplantation als perforierende Keratoplastik, bei der sämtliche Hornhautschichten transplantiert wurden. Minimalinvasive Hornhauttransplantationen, bei denen selektiv einzelne Schichten der Hornhaut ersetzt werden, sind aktuell die gängige Therapieoption zur Behandlung der FED. (Borkar et al., 2016) Bei FED-Patienten erfolgt in der Regel eine Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty (DMEK). (B. Bachmann, Schaub, & Cursiefen, 2016)

2.3.1 Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty (DMEK)

Bei der DMEK wird das erkrankte Endothel gemeinsam mit der angrenzenden Descemet Membran entfernt und durch gesundes Endothel und Descemet Membran von Organspendern ersetzt. (Cursiefen & Kruse, 2010; Melles, Wjdh, & Nieuwendaal, 2004) Das Transplantat aus Endothel und Descemet Membran hat eine Dicke von weniger als 20µm. (Matthaei, Bachmann, Siebelmann, & Cursiefen, 2018) Im Rahmen der Operation

wird das empfindliche Transplantat durch eine modifizierte „NO-TOUCH“-Technik berührungsarm behandelt. (Dapena et al., 2011; Kruse et al., 2011) Der erste Schritt der DMEK besteht in der Präparation des Transplantates. (Heindl et al., 2011) Hierbei wird in mehreren Schritten mittels Trepanation sowie sukzessiver Präparation mit 2 Pinzetten ein in der Regel 8mm durchmessendes Transplantat vorbereitet. Um die intraoperative Orientierung zu erleichtern und die Ausrichtung des Transplantates kontrollieren zu können, kann die Anlage von 3 randständigen Markierungen mittels kleinem Trepan erfolgen. (B. O. Bachmann, Laaser, Cursiefen, & Kruse, 2010) Das Transplantat formt spontan eine Rolle mit nach Außen weisendem Endothel. Das aufgerollte Transplantat wird nun in eine Kartusche eingeführt und anschließend in der Kartusche einliegend in einen Intraokularlinsen-Injektor überführt. Nun erfolgt die Anlage der operativen Zugänge zur Vorderkammer des Auges. Hierzu werden nasal und temporal jeweils Einschnitte (Parazentesen) in die seitliche Cornea vorgenommen sowie oben ein 2,5mm breiter Tunnelschnitt angelegt. Für den nächsten Schritt wird die Vorderkammer des Auges mit Luft gefüllt. Die Descemet Membran (des Patientenauges) wird mit einem speziellen Haken (Price-Haken) markiert und anschließend abgezogen. Das abgelöste Gewebe wird über den Tunnelschnitt aus dem Auge entfernt und anschließend auch die Luft aus der Vorderkammer des Auges abgelassen. Anschließend wird das Transplantat über den Tunnelschnitt mit dem Injektor in die Vorderkammer des Auges eingegeben. Um die Entfaltung des eingerollten Transplantates zu erleichtern, wird der Flüssigkeitsstand der Vorderkammer bei Bedarf variiert und ggf. eine kleine Luftblase zwischen Transplantat und Patienten-Cornea eingebracht. Anschließend kann das Transplantat in der Vorderkammer entfaltet werden. Dies erfolgt in der Regel durch vorsichtiges Klopfen mit einer Kanüle auf die äußere Hornhaut. Wenn die korrekte Lage des Transplantates bestätigt ist, wird eine Luftblase zwischen Empfänger-Iris und Spender-Endothel in die Vorderkammer eingebracht und das Transplantat (bei Rückenlage des Patienten) so an der Hornhaut-Rückseite des Empfängers fixiert. Final wird die Vorderkammer mit einem speziellen Gas (20% Schwefelhexafluorid (SF₆-Gas)) gefüllt und anschließend der Augeninnendruck mittels Tonometrie überprüft. Das beschriebene Vorgehen entspricht der bewährten Praxis am Zentrum für Augenheilkunde der Universitätsklinik Köln und in der Literatur sind zahlreiche Operateur- und Zentrum-spezifische Modifikationen des Verfahrens beschrieben. (Matthaei et al., 2018)

2.3.2 Descemetorhexis without endothelial Keratoplasty (DWEK)

Bei der in der klinischen Praxis wenig angewendeten und in der Klinik noch nicht vollends etablierten DWEK handelt es sich um eine Operation, bei der das pathologisch veränderte, zentrale Endothel entfernt wird, ohne dieses durch ein Transplantat zu ersetzen. Hierbei wird angenommen, dass nach Entfernung der zentralen HCEC, welche ihr proliferatives Potential verloren haben, der entstandene Defekt sukzessive durch periphere „gesunde“ HCEC mit möglicherweise teils noch eingeschränkt erhaltenem proliferativem Potenzial geschlossen wird. (Arbelaez, Price, & Price, 2014; Balachandran et al., 2009; Bleyen, Saelens, van Dooren, & van Rij, 2013; Borkar et al., 2016; Braunstein, Airiani, Chang, & Odrich, 2003; Dirisamer, Ham, Dapena, van Dijk, & Melles, 2012; Galvis, Tello, Berrospi, Cuadros, & Blanco, 2016; Iovieno, Neri, Soldani, Adani, & Fontana, 2017; Koenig, 2013, 2015; Moloney et al., 2015; Shah, Randleman, & Grossniklaus, 2012; Watson, Abiad, & Coroneo, 2006; Zafirakis, Kymionis, Grentzelos, & Livir-Rallatos, 2010; Ziaei, Barsam, & Mearza, 2013) Die Grundlage für die Entwicklung dieses Ansatzes beruht auf Beobachtungen über die Wiederherstellung der cornealen Transparenz, trotz fehlender Anlage eines Transplantates nach DMEK oder nach unbeabsichtigter Entfernung der Descemet Membran im Rahmen einer Katarakt-Operation. Es ist jedoch zu beachten, dass es nicht regelmäßig zur Wiederherstellung der cornealen Transparenz kommt, sondern es auch Fälle mit fehlendem Aufklaren der Cornea gibt. Welche Determinanten für das Ergebnis verantwortlich sind, ist aktuell noch unklar. (Balachandran et al., 2009; Davies, Jurkunas, & Pineda, 2018; Dirisamer et al., 2012; Droutsas et al., 2016; Lam, Bruinsma, & Melles, 2014; Moloney et al., 2015; Satue Palacian et al., 2014; Shah et al., 2012; Srivastava, Singh, & Chowdhary, 2010; Watson et al., 2006; Ziaei et al., 2013)

2.4 Pathogenese der Fuchs-Endotheldystrophie

Die Pathogenese der FED scheint multifaktoriell bedingt zu sein. Der Einfluss von Punktmutationen (Single Nukleotid Polymorphismen) auf diversen Genen wurde im Rahmen der FED beobachtet. (Riazuddin et al., 2012; Riazuddin, Vithana, et al., 2010; Riazuddin, Zaghoul, et al., 2010) Es wurde darüber hinaus gezeigt, dass RNA-Toxizität eine Rolle in der Entstehung der FED zu spielen scheint. Trinukleotid Repeat Expansionen im TCF4 Gen auf Chromosom 18 scheinen ein signifikantes Risiko für die Entstehung der FED darzustellen und Auswirkungen auf die Schwere der Krankheit zu haben. (Mootha, Gong, Ku, & Xing, 2014; Mootha et al., 2015; Soliman, Xing, Radwan,

Gong, & Mootha, 2015; Wieben et al., 2017; Wieben et al., 2012) Hierbei kommt es zur Bildung von ribonukleären Einschlüssen im Hornhautendothel. (Du et al., 2015) Die Ansammlung von RNA führt unter anderem zur Bindung an den Spleißfaktor „muscleblind-like 1“ (MBNL1) mit der Folge eines Fehlspleißens von MBNL-1 regulierten mRNA. (Du et al., 2015) Es kommt zur Bildung potentiell toxischer nukleärer und zytoplasmatischer Einschlüsse. (Soragni et al., 2018) Weiter spielt oxidativer Stress eine wichtige Rolle in der Pathogenese der FED. (Vedana, Villarreal, & Jun, 2016) Ausschlaggebend ist hier die fehlende Balance zwischen Oxidantien und Anti-Oxidantien. (Jurkunas, Bitar, Funaki, & Azizi, 2010) *In vitro* Versuche haben gezeigt, HCEC, welche längere Zeit oxidativem Stress ausgesetzt wurden, ihre proliferative Kapazität verloren haben und eine eingeschränkte Zellfunktion zeigten. (Joyce, Zhu, & Harris, 2009) Insbesondere die zentralen HCEC scheinen aufgrund ihrer Lage in der Sehachse sowie ihrer hohen metabolischen Aktivität anfälliger für oxidativen Stress zu sein. (Joyce, 2012) In Tissue Micro Array-Untersuchungen konnte in HCEC von Patienten mit FED eine erhöhte Expression der Zellzyklusinhibitoren p16 (Synonym: CDKN2A/INK4a) und p21 (Synonym: CDKN1A/Cip1/WAF1/Sdi1/Cap20) festgestellt werden. Matthaei et al sehen dies als möglichen Ausdruck der vorzeitigen Alterung durch Stress oder Krankheit (=prä-mature Seneszenz) der HCEC. (Matthaei et al., 2013) Die erhöhte Expression von p16 sowie seiner Transkriptionsaktivatoren ETS1 und ARHGAP18 (SENEX) bei gleichzeitig verringerter Expression seiner Inhibitoren (ID1), könnte ein Hinweis auf Seneszenz im Rahmen der FED sein. (Matthaei et al., 2014)

2.4.1 p16 und p21 in humanen cornealen Endothelzellen

HCEC befinden sich *in vivo* in der G1-Phase des Zellzyklus (Joyce, Meklir, Joyce, & Zieske, 1996; Joyce, Navon, Roy, & Zieske, 1996) und exprimieren Zyklin-abhängige Kinase-Inhibitoren (CDKI's) wie p16 und p21. (Joyce, Meklir, et al., 1996; Joyce, Navon, et al., 1996) Die Expression von p16 und p21 konnte nukleär bereits gezeigt werden. (Enomoto, Mimura, Harris, & Joyce, 2006) Western Blot-Untersuchungen konnten einen altersbedingten Anstieg der Expression von p16 und p21 in HCEC's nachweisen. (Enomoto et al., 2006) Die Autoren schließen aus den Ergebnissen, dass es eine altersabhängige Steigerung der negativen Regulation des Zellzyklus durch p16 und p21 gibt. Dieser altersassoziierte Anstieg der Expression wurde bei p16 unter anderem auch in menschlichen Nierenzellen beobachtet. (Famulski & Halloran, 2005; Sharpless, 2004) Hier beschreiben Famulski et al p16 als einen der besten Marker für die Abschätzung des chronologischen Alters sowie als Indikator für eine vorzeitige Alterung durch Stress

oder Krankheit. (Famulski & Halloran, 2005; Sharpless, 2004) Je nach Lage der HCEC innerhalb der Cornea konnten *in vitro* Unterschiede bzgl. der Replikationsfähigkeit gezeigt werden. Periphere HCEC scheinen diese altersunabhängig zu erhalten, wohingegen zentrale HCEC diese mit dem Alter anteilig einzubüßen scheinen. (Mimura & Joyce, 2006) Zusätzlich wurde beobachtet, dass die Replikationsfähigkeit negativ mit dem Vorhandensein von Seneszenz-Markern (wie p16 und p21) in den entsprechenden Zellen korrelierte. (Mimura & Joyce, 2006)

2.4.2 Der G1/S Phasen-Übergang des Zellzyklus

Entscheidend im G1/S-Phasen Übergang ist der Transkriptionsfaktor E2F (Retinoblastom-Bindungs-Protein), welcher für die notwendige Aktivierung der Gene während der späten G1 und S-Phase verantwortlich ist. Die E2F-Aktivität wird über den Tumor Suppressor „Retinoblastom-Protein“ (RB bzw. pRB) reguliert. (DeGregori, Leone, Miron, Jakoi, & Nevins, 1997) Die E2F-Aktivität ist der limitierende Faktor in der G1/S-

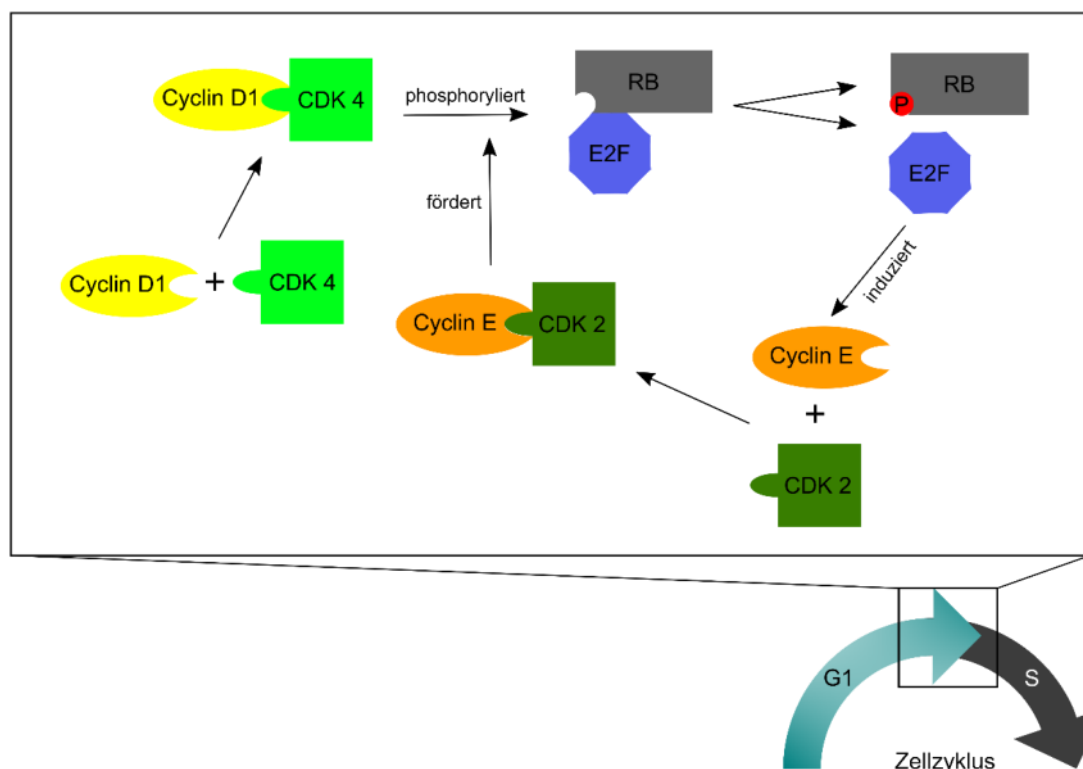


Abbildung 4) RB bindet fest an E2F und verhindert so dessen Aktivierung. Mitogene Stimulation induziert die Synthese von Cyclin D1, dieses bindet und aktiviert die Cyclin-abhängige Kinase 4 (CDK 4). (Sherr, 1993) Der Cyclin D1/CDK4-Komplex phosphoryliert RB zu pRB, was eine Änderung in der (p)RB-E2F-Interaktion bewirkt und E2F aktiviert. (Ewen et al.; Kato, 1993) E2F induziert das regulatorische Protein Cyclin E. Dieses bindet und aktiviert CDK 2. Der Cyclin E/CDK 2-Komplex fördert die weitere Phosphorylierung von RB und schafft auf diese Weise einen Autoregulations-Kreislauf, welcher den Eintritt in die S-Phase ermöglicht. (Lees, 1995)

Phasen-Progression. Sie ermöglicht den Eintritt in die S-Phase und überwindet die G1-Phasen-Inhibition. (Lukas, Petersen, Holm, Bartek, & Helin, 1996)

Die negative Regulation des Zellzyklus ist partiell vermittelt über die Aktivität von Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitoren, kurz CDKI's. Hiervon gibt es zwei große Familien (INK und CIP/KIP), die über verschiedene Wege die Aktivität der CDK's inhibieren. Die Mitglieder der INK-Familie, zu denen auch p16 zählt, binden freies CDK4. Dessen Bindung mit Cyclin D1 wird so verhindert und die CDK4-Aktivität inhibiert. Bereits bestehende Cyclin D1/CDK4-Komplexe können zusätzlich gelöst werden. (Lees, 1995) Die Mitglieder der CIP/KIP-Familie, zu der unter anderem p21 gehört, binden Komplexe aus Cyclin D1/CDK4, Cyclin E/CDK2 sowie weitere Kinase-Komplexe und verhindern so die Kinasen-Aktivierung. (Harper, Adami, Wei, Keyomarsi, & Elledge, 1993; Lee, Reynisdóttir, & Massagué, 1995; Polyak et al., 1994)

2.4.3 p16 (Synonyme: CDKN2A/INK4a)

Die Regulation der p16 Expression erfolgt über epigenetische sowie multiple Transkriptions-Faktoren. (Rayess, 2012) Inhibitorproteine der DNA-Bindung (kurz ID-Proteine) verhindern die p16 Expression (Rayess, 2012). In seneszenten Zellen sind diese ID-Proteine herunter reguliert. (E. Hara et al., 1994) ETS-Faktoren aktivieren die p16 Transkription. (Rayess, 2012) Zudem bestehen Wechselwirkungen mit dem RB. (Rayess, 2012) RB gibt im phosphorylierten Zustand den Transkriptionsfaktor E2F frei (siehe Abbildung 4), was die p16-Expression hochreguliert. (Rayess, 2012) Ebenso führen Zellalterung, ionisierende Strahlung sowie DNS-schädigende Noxen zu einer gesteigerten p16 Expression. (Rayess, 2012) Die mit der Seneszenz einhergehenden Veränderungen inaktivieren p16-Suppressor-Faktoren und führen so zu einer gesteigerten p16 Expression. (Rayess, 2012)

Studien auf molekularer Ebene haben eine Rolle von p16 in der Entwicklung der replikativen Seneszenz zeigen können. (Dai & Enders, 2000; Zindy, Quelle, Roussel, & Sherr, 1997) Bei Zellen in der frühen Phase des Zellzyklus führt die ektopische Expression von p16 dazu, dass diese in der G1 Phase verbleiben und einen Seneszenz-Phänotyp ausbilden. (McConnell, Starborg, Brookes, & Peters)

Neben Seneszenz-Markern wie Beta-Galaktosidase (Dimri et al., 1995) kann p16 als zusätzlicher, wichtiger Regulator der Seneszenz angesehen werden und wird auch zur Identifikation seneszenten Zellen genutzt. (Krishnamurthy et al., 2004)

2.4.4 p21 (Synonym: CDKN1A/Cip1/WAF1/Sdi1/Cap20)

Die Expression von p21 steigt an, wenn sich Zellen in einem für die Proliferation ungünstigen Umfeld, wie oxidativem Stress (Chen et al., 2004), Seneszenz (Noda, Ning, Venable, Pereira-Smith, & Smith, 1994) oder der Differenzierung befinden. (Halevy et al., 1995; Parker et al., 1995) Ebenso vermittelt p21 einen DNS-Schaden-bedingten, transienten Zellarrest. (J. Campisi & di Fagagna, 2007) Aus der Akkumulation von p21 Proteinen resultiert ein Wachstumsarrest in der G1 Phase des Zellzyklus. (LaBaer et al., 1997) Die p21 Expression kann p53 abhängig (Niculescu et al., 1998) oder unabhängig davon, über verschiedene Transkriptionsfaktoren induziert werden. (Gartel & Tyner, 1999) p21 ist Mediator der p53 abhängigen Seneszenz. (Brown, Wei, & Sedivy, 1997) Auch wenn p21 an der Einleitung der p53 abhängigen Apoptose beteiligt ist, so scheint es, als ob erhöhte Expressionslevel in der replikativen Seneszenz unabhängig von p53 sind und nicht zur Apoptose führen. (Katayose, Wersto, Cowan, & Seth, 1995) Die Inhibition der Apoptose scheint stark von der direkten p21-Protein-Interaktionen sowie von der p21-Lokalisation innerhalb der Zelle abhängig zu sein. (Karimian, Ahmadi, & Yousefi, 2016) Zytoplasmatisches p21 kann Proteine binden, welche an der Induktion der Apoptose beteiligt sind und so deren Aktivität inhibieren. (Abbas & Dutta, 2009; Zhou et al., 2001) Die Akkumulation von p21 im Zytoplasma fördert das Überleben der Zelle und unterdrückt die Apoptose. (Dehennaut, Loison, Boulay, Van Rechem, & Leprince, 2013)

2.4.5 Seneszenz

Seneszenz stellt einen Status des irreversiblen Zellarrestes mit diversen Veränderungen auf zellulärer Ebene dar. (Rayess, 2012) Im endoplasmatischen Retikulum kommt es zu einer Proteinaggregation und es zeigen sich vergrößerte, in der Funktion gestörte Mitochondrien. Zudem können funktionslose Lysosomen mit erhöhtem Beta-Galaktosidase-Level sowie ein Anstieg freier Radikale beobachtet werden. (Rayess, 2012) Senescente Zellen zeigen eine vermehrte Expression von p16 und p21. (Judith Campisi, 2001; J. Campisi & di Fagagna, 2007) Obgleich p16 und p21 nicht äquivalent sind, (Sherr & Roberts, 1999) sorgen beide dafür, dass RB in einem hypophosphorylierten Zustand bleibt (J. Campisi & di Fagagna, 2007) und so die Transkription verhindert wird. (Sherr & McCormick) Der Seneszenz-Wachstums-Arrest wird etabliert und aufrechterhalten durch den p53- und den p16-pRB Weg. Beide Wege

können interagieren oder unabhängig voneinander die Progression im Zellzyklus aufhalten. (J. Campisi & di Fagagna, 2007)

2.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Vorangegangene Studien zeigten eine erhöhte Expression von p16 und p21 in HCEC von FED-Patienten. (Matthaei et al., 2013) Bisher war jedoch unbekannt, in welchem Bereich des Hornhaut-Endothels diese Zellen genau lokalisiert sind. Da die pathologischen Veränderungen im Rahmen der FED im Zentrum der Cornea beginnen und sich im weiteren Verlauf in Richtung der Peripherie ausbreiten, (Eghrari et al., 2015) wurde in dieser Arbeit folgende Hypothese untersucht.

Hypothese: Die Zellzyklusinhibitoren p16/p21 sind im FED-Endothel vor allem in der zentralen Region 4mm um den Mittelpunkt herum in einer erhöhten Expression nachweisbar.

Zur Beantwortung der Fragestellung wurden DEK, welche im Rahmen einer DMEK gewonnen wurden, zu Flachpräparaten aufbereitet. Mittels indirekter Immunfluoreszenz-Färbung konnte die Lokalisation der p16 bzw. p21 positiven Zellen im endothelialen Zellverbund ermittelt werden. Es erfolgte dabei insbesondere eine differenzierte Betrachtung des Zentrums (zentrale 4 mm des DEK) im Vergleich zur Peripherie (>4 mm).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
Bovines Serum Albumin, (BSA) [Fraktion V]	VWR Chemicals, Leuven, Belgien
4',6-Diamidin-2-phenylindol, (DAPI)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TritonX100 [4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol solution]	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Paraformaldehyd, (PFA)	Affymetrix Inc., Cleveland, Ohio, USA
Phosphat-Buffered Saline, (PBS)	AppliChem Inc., Maryland Heights, Missouri, USA
GOAT Serum (normal) Code X0907	Dako, Glostrup, Dänemark
Dako Fluorescence Mounting Medium Code S3023	Dako, Carpinteria, CAL, USA

3.1.2 Primäre Antikörper

p16 Antikörper	
Zielstruktur:	Anti-CDKN2A/ p16INK4a
Hersteller:	ABCCAM (Bestellnummer: ab108349)
Wirtsorganismus/Reaktivität:	Kaninchen-Anti-Mensch (monoklonal)
Klon:	EPR 1473 IgG

p21 Antikörper	
Zielstruktur:	Anti-CDKN1A/ p21
Hersteller:	BioLegend 687402
Wirtsorganismus/Reaktivität:	Maus-Anti-Mensch (monoklonal)
Klon:	W15115A IgG1,K

3.1.3 Sekundär-Antikörper:

Alexa Fluor®488	
Zielstruktur:	Kaninchen Epitope
Hersteller:	Invitrogen A 11008
Wirtsorganismus/Reaktivität:	Ziege-Anti- Kaninchen (polyklonal)
Klon:	IgG

Alexa Fluor®594	
Zielstruktur:	Maus Epitope
Hersteller:	BioLegend 405326
Wirtsorganismus/Reaktivität:	Ziege-Anti-Maus (polyklonal)
Klon:	Poly4053 IgG

3.2 Methoden

3.2.1 Ein- bzw. Ausschlusskriterien

In dieser Studie wurden Descemet DEK von FED-Patienten sowie Kontroll-DEK eines Körperspenders verwendet. Die Genehmigung zur Durchführung dieser Studie wurde von der Ethikkommission der Universität zu Köln eingeholt (14-248). Die Teilnehmenden erklärten ihr schriftliches Einverständnis. Die Forschung entsprach den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki.

Bei dem DEK, bestehend aus Basalmembran und einlagiger Endothelschicht, handelt es sich um sehr fragiles Gewebe, sodass besondere Vorsicht im Umgang geboten war, um eine mechanische Beschädigung zu vermeiden. (B. Bachmann, Schaub, & Cursiefen, 2016) Die FED-DEK wiesen somit bereits post-DMEK bzgl. der Unversehrtheit eine gewisse Heterogenität auf. Neben völlig unversehrten FED-DEK zeigten sich andere bereits in mehrere Fragmente aufgeteilt oder mit aufeinander liegenden Anteilen. Die Präparation zum Flachpräparat war daher teilweise sehr anspruchsvoll und verlief vereinzelt auch frustan. Neben einer Rissbildung war zudem ein Abschilfern der Endothelzellen durch mechanische Manipulationen zu beobachten

Um die Fragestellung der Hypothese unter diesen Voraussetzungen adäquat zu beantworten wurden folgende Ein- bzw. Ausschlusskriterien definiert:

- 1) DEK-Fläche: Der DEK sollte mindestens 70% der zu erwartenden Fläche groß sein. Bei einem DEK-Durchmesser von 8mm waren Membranflächen von 50,3mm² zu erwarten. Somit wurde die minimal erforderliche DEK-Fläche bei 35,2 mm² festgelegt.
- 2) DEK-Konfiguration: Die DEK-Integrität sollte vollständig erhalten sein. Falls es zu einer Fragmentierung gekommen war, sollten die einzelnen Fragmente aufgrund ihrer Form eindeutig (u.U. auch virtuell) zur Ursprungsform zusammen zu setzen sein. Nach eventuell erforderlicher Rekonstruktion sollte eine eindeutige Zuordnung von Zentrum und Peripherie möglich sein. Zudem sollte die Integrität der Zellverbände erhalten sein.
- 3) Färbung: Die p16/p21-Färbung musste technisch erfolgreich durchgeführt worden sein, d.h. die Positiv- und Negativ-Kontrollen mussten regelrecht verlaufen sein.

3.2.2 Probengewinnung, Lagerung und Transport

Die DEK wurden jeweils im Rahmen einer DMEK am Zentrum für Augenheilkunde der Universitätsklinik Köln asserviert. Nach Entnahme der DEK wurden diese in 3% Paraformaldehyd (PFA) (Affymetrix Inc., Cleveland, Ohio, USA) in 2ml Eppendorf-Tubes® (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) für maximal 2 Stunden bei Raumtemperatur gelagert, bevor mit dem Färbeprozess begonnen wurde.

3.2.3 Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung

Die DEK wurden durch Umfüllen aus den 2ml Eppendorf-Tubes® (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) berührungsfrei in das Loch einer (24er) Mikrotiterplatte (Greiner bio-one Cellstar®, Kremsmünster, Österreich) umgelagert. Um Schäden durch vielfache Umlagerungen zu vermeiden, wurden die DEK bis zum Abschluss des Färbeprozesses in den jeweiligen Löchern belassen.

Zunächst wurden die DEK mehrfach in 0,3% Triton X-100, (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany) verdünnt mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) (AppliChem Inc., Maryland Heights, Missouri, USA) gewaschen. Hierdurch wurde das PFA entfernt und zudem die Zellmembran für die folgenden Schritte permeabilisiert. (Luttmann, 2014) Die Blockade unspezifischer Bindungsstellen (Luttmann, 2014) erfolgte mittels 2% bovinem Serum-Albumin (BSA, VWR Chemicals, Leuven, Belgien) gemischt mit 0,3% Triton X-100 in PBS und 10% Ziegen-Serum (Dako, Glostrup, Denmark) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die primären (unkonjugierten) Antikörper Anti-p16 (Kaninchen-Anti-Mensch; ABCAM, Cambridge, Großbritannien, originale Konzentration 1 µg/µl, hier in der Konzentration 1:100) sowie Anti-p21 (Maus-Anti-Mensch, BioLegend, San Diego, CA, USA, originale Konzentration 0,5µg/µl, hier in der Konzentration 1:200) wurden gemeinsam in 1% BSA, 0,3% Triton X-100 in PBS mit 10% Ziegen-Serum verdünnt über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die DEK mehrfach in 0,3% Triton X-100 verdünnt in PBS gewaschen. Alle sich anschließenden Schritte wurden unter Einhaltung von UV-Schutzmaßnahmen durchgeführt, um die Fluorochrome in den verwendeten Reagenzien nicht zu schädigen und ein Ausbleichen (Haus, 2014) zu vermeiden. Für die Konjugation bzw. Markierung der p16 Antikörper wurde der sekundäre Antikörper Alexa Fluor®488 (Ziege-Anti-Kaninchen, Invitrogen by Thermo Fisher, Rockford, IL, USA, originale Konzentration 2mg/ml, hier in der Konzentration 1:1000) verwendet. Der Nachweis des p21 Antikörpers erfolgte mit dem sekundären Antikörper Alexa Fluor®594 (Ziege-Anti-Maus IgG1k, Invitrogen by Thermo Fisher, Rockford, IL, USA, originale

Konzentration 0,5µl/ml, hier in der Konzentration 1:200). Beide sekundären Antikörper wurden gemeinsam mit 1% BSA, 0,3% Triton X-100 in PBS sowie 10% Ziegen-Serum gemischt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Um ungebundene Antikörper wieder zu entfernen, wurde anschließend mehrfach in 0,3% Triton X-100 verdünnt in PBS gewaschen. Die Markierung der Zellkerne erfolgte mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Farbstoff (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany) in der Konzentration 1:50.000, verdünnt in Aqua destillata und 0,3% Triton X-100 in PBS für 2 Minuten bei Raumtemperatur. Final erfolgte ein letzter Waschgang in 0,3% Triton X-100, verdünnt in PBS, um überschüssigen DAPI-Farbstoff zu entfernen.

3.2.4 Einbetten der Descemet Membran Endothel-Komplexe

Zur schonenden Bergung des DEK aus der Mikrotiterplatte, wurde vor Beginn des Färbevorgangs ein 12mm Deckglas (Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig) in das Loch eingelegt. Der frei in der Flüssigkeit schwimmende DEK formt in der Regel eine Rolle (Kruse et al., 2011; Melles, Ong, Ververs, & van der Wees, 2006) bei der sich das Endothel stets Außen und die Descemet Membran Innen befindet. (B. Bachmann et al., 2016; Melles et al., 2006) Durch sukzessives Abpipettieren des Flüssigkeitsspiegels kam der DEK auf dem Deckglas zum Liegen und konnte in der Folge, ohne direkten Kontakt geborgen werden. Anschließend wurde der DEK auf einem Objektträger platziert und unter mikroskopischer Sicht mit einer Pinzette zu einem Flachpräparat ausgebreitet. Die Versiegelung erfolgte mittels DAKO Abdeck-Medium (DAKO, Carpinteria, CA, USA), welches über Nacht bei 4°C aushärten musste.

3.2.5 Zellkultur

Kulturbedingungen: Die HeLa-Zelllinie wurde mit dem Nährmedium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, gibco® life technologies, Carlsbad, Cal, USA) sowie 1%-Penicillin Streptomycin SOL (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) in T-75 Zellkulturflaschen (Cellstar®, Greiner Bio-One, 72636 Frickenhausen, Germany) bei 37°C sowie 5% CO₂-Begasung im Inkubator kultiviert. (Patel et al., 2023) Sämtliche Tätigkeiten an der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen in einer Zellkulturbank (Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA) durchgeführt. Um das Wachstum der Zellen optimal zu fördern, erfolgte alle 2 Tage ein Wechsel des Nährmediums. Nach maximal 14 Tagen erfolgte die Passage in eine 24er Mikrotiterplatte zur weiteren Lagerung bzw. Verwendung innerhalb der Versuche.

Passage der Zellen: Nachdem eine circa 90%ige Konfluenz der Zellen in den Kulturflaschen erreicht war, wurden diese in eine 24er Mikrotiterplatte ausgesät. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 1ml Trypsin von der Kulturflasche abgelöst. Durch Zugabe von 5ml Kulturmedium wurde das Trypsin neutralisiert. Anschließend wurden die Zellzahl mithilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt und je 10.000 Zellen pro Loch einer 24er Mikrotiterplatte ausgesät.

Lagerung der Zellen: Um die Zellen bis zur weiteren Verwendung zu fixieren, wurden diese zunächst in 3% PFA mit DMEM-Medium (gemischt im Verhältnis 1:1) für 2 Minuten inkubiert. Nach mehrfachem Waschen mit PBS für jeweils 3 Minuten, erfolgte eine 15-minütige Fixierung der Zellen in 3% PFA. Ungebundene Rückstände wurden beim erneuten Waschen mit PBS entfernt. Zur Lagerung der Zellen bis zur Färbung wurden diese in PBS gemischt mit 0,1% BSA bei 4°C gelagert.

3.2.6 Positiv-/Negativ-Kontrolle

Zum Nachweis der spezifischen Bindung des Primärantikörpers wurden HeLa-Zellen (ATCC, Manassas, VA, USA) aus Cervix-Karzinomen verwendet. p16 ist in diesen Zellen bekanntermaßen überexprimiert. (Kwon et al., 2003; Martin & O’Leary, 2011) In Immunfluoreszenz-Färbungen wurde bereits sowohl eine nukleäre als auch zytoplasmatische Präsenz des p16 Proteins gezeigt. (Ostrowska et al., 2011) Die p21 Expression wird im Rahmen der terminalen Differenzierung induziert. (Halevy et al., 1995; Parker et al., 1995) Die p21 Expression in HeLa-Zellen ist ebenfalls bereits vorgeschrieben. (Patel et al., 2023) Zum Ausschluss einer unspezifischen Bindung der sekundären Antikörper erfolgte eine Negativ-Kontrolle durch Inkubation dieser, ohne vorherige Inkubation mit den Primärantikörpern.

3.2.7 Autofluoreszenz

Um eine potentiell vorhandene Autofluoreszenz (Burry, 2011) des DEK zu ermitteln, wurde das gesamte Färbeprotokoll ohne Verwendung von Antikörpern oder Zugabe von Farbstoffen durchgeführt.

3.2.8 Kontrollgruppe

Um nachzuweisen, dass die beobachteten Veränderungen im Zusammenhang mit der FED stehen, wurden zum Vergleich die DEK (beider Augen) eines gesunden Spenders nach dem gleichen Protokoll gefärbt und ausgewertet.

3.2.9 Bilderstellung

Die Erstellung der DEK-Aufnahmen erfolgte an einem (BX 53) Fluoreszenz-Mikroskop (Olympus® Shinjuku, Tokio, Japan) unter Nutzung der Software Cellsens™ Version 1.18 (Olympus Corporation, 2013). Hierbei wurden unter Nutzung der Multi-Image-Analysis (MIA) jeweils aus vielen Einzelbildern zusammengesetzte Übersichtsaufnahmen der gesamten Membran angefertigt. Je nach Membrankonfiguration wurde zusätzlich die Z-Funktion genutzt, bei der mehrere, vertikal übereinanderliegende Aufnahmen in der Z-Ebene erstellt und miteinander verschmolzen wurden. Hierdurch konnten Unebenheiten, welche zu unscharfen Bildanteilen geführt hätten, ausgeglichen werden.

3.2.10 Bildanalyse

Für die Bildanalyse wurde das Programm ImageJ (Rueden et al., 2017; Schindelin et al., 2012) genutzt. Die vorbereitende Bildbearbeitung erfolgte mithilfe des Programmes GNU Image Manipulation Program (GIMP). (<https://www.gimp.org/>)

3.2.11 Kalibrierung

Um eine originalgetreue Maßstabinformation für die nachfolgenden Analysen in ImageJ zu hinterlegen, erfolgte vor jeder Analyse die Ermittlung des Verhältnisses von Bildpixel zum Originalmaßstab. Hierzu wurde der bereits im Rahmen der Bilderstellung mit Cellsens™ in die Aufnahmen integrierte Maßstabbalken als Referenz für den Originalmaßstab genutzt.

3.2.12 Bestimmung der Fläche der Descemet Membran Endothel-Komplexe

Um eine möglichst exakte Analyse zu ermöglichen, wurde zunächst der Hintergrund, d.h. alle nicht zum DEK gehörenden Bildanteile, entfernt. Als nächstes wurden Präparationsartefakte, wie umgeschlagene oder stark gefaltete Bereiche identifiziert und ebenfalls entfernt. Da ImageJ nur Analysen an 8-Bit Bildern (255 Grauwerte) durchführen kann, wurden die Bilder in die Farb-Kanäle für Rot, Grün und Blau gesplittet. Für jeden Farbkanal wurde hierbei ein neues Grauwertbild erstellt. Die jeweilige Pixel-Signalintensität wurde hierbei, zur Vermeidung eines Informationsverlustes, automatisch an die Intensität der Originalaufnahme angepasst. Basierend auf dieser Signalintensität konnten nun Schwellenwerte für die Analyse definiert werden. Die Ergebnisse der

Messung wurden aufgrund der hinterlegten Maßstabinformation direkt in der gewünschten Maßeinheit μm^2 bzw. mm^2 angegeben.

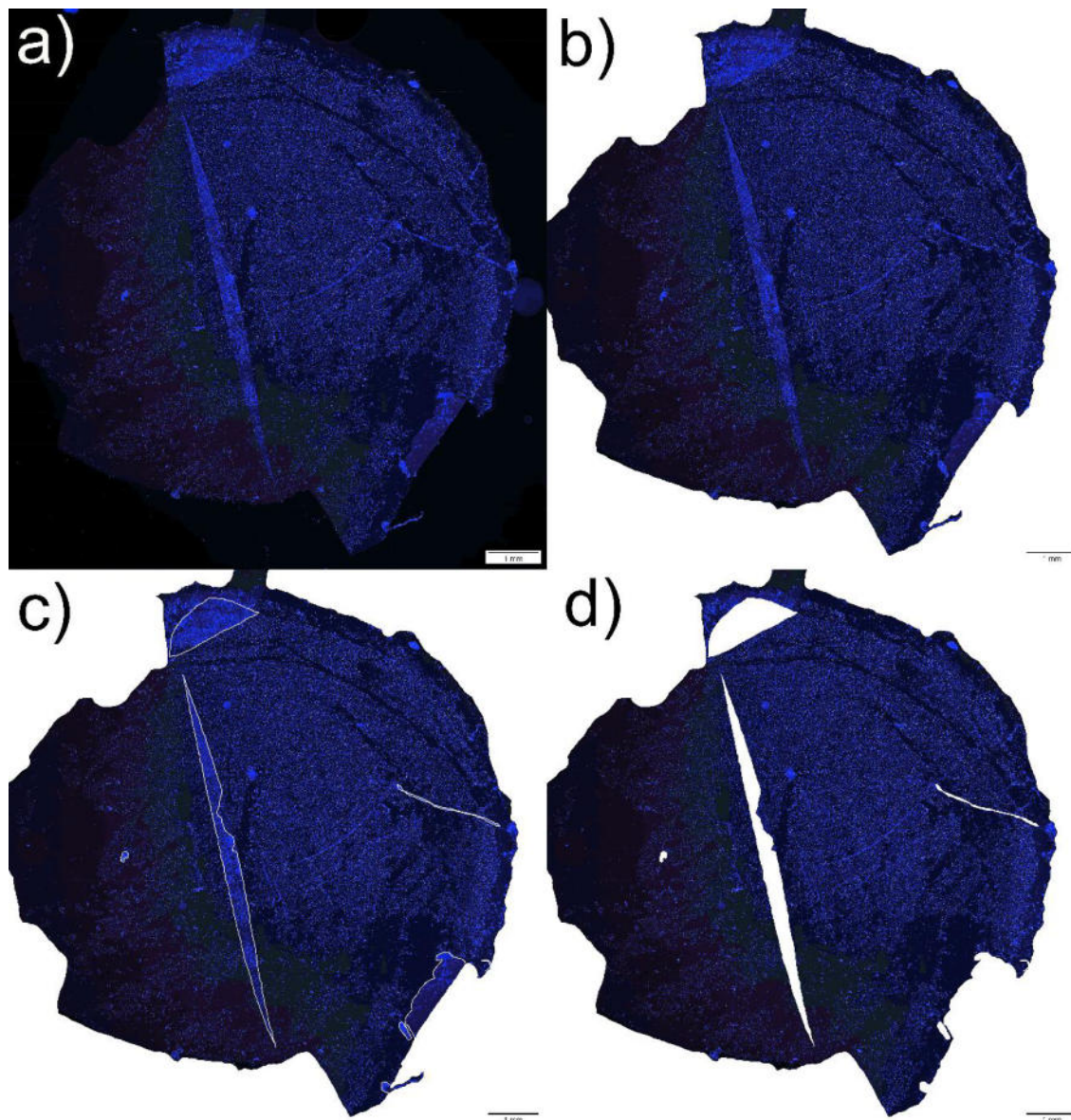


Abbildung 5) Darstellung der genannten Bearbeitungsschritte. a): Bild unverändert. b): Entfernung des Hintergrundes. c): Markierung von Artefakten. d): Entfernung der Artefakte

3.2.13 Bestimmung der Zelldichte

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte anhand der nachweisbaren Zellkernsignale. Diese waren in der Originalaufnahme als Folge der DAPI-Färbung blau eingefärbt. Die Analyse erfolgte daher am 8-bit (Grauwerte) Bild des (aus dem RGB-Bild) gesplitteten Blau-Kanal Bildes. Nach Festlegung der Schwellenwerte konnten die Zellkernsignale dargestellt werden.

In dem auf diese Weise erstellten Bild ergaben sich 2 Herausforderungen. Zum einen waren vereinzelt „solitäre Pixel“ nachweisbar. Da diese aufgrund der geringen Größe keinem Zellkern entsprechen konnten, war es erforderlich diese vor der Analyse zu entfernen. Hierzu wurden zwei, bereits in ImageJ enthaltene Funktionen (Plugins), genutzt. Zunächst wurde das „Erode“-Plugin, gefolgt vom „Dilate“-Plugin angewandt. (<http://imagej.nih.gov/ij/docs/guide>) Das „Erode“-Plugin entfernt gleichmäßig jeweils einen Pixel entlang des Randes eines Objektes. Beim „Dilate“-Plugin wird wiederum jeweils ein Pixel entlang des Randes eines Objektes ergänzt. Hierdurch sollte einem Größenverlust der Zellkernsignale durch die vorangegangene Anwendung des „Erode“-Plugin entgegengewirkt werden. Solitäre Pixel wurden auf diese Weise jedoch nachhaltig entfernt.

Die zweite Herausforderung stellten nah beieinander liegende Zellkernsignale dar, welche oftmals als miteinander verschmolzene Objekte dargestellt wurden. Um diese voneinander zu separieren wurde das Plugin „Watershed“ genutzt. (<http://imagej.nih.gov/ij/docs/guide>) Dieses führt eine automatische Trennung von Objekten, welche sich berühren durch. Zunächst wird hierbei eine euklidische Entfernungskarte berechnet und der ultimative erodierte Punkt ermittelt. Danach werden diese ermittelten Punkte solange dilatiert bis sie entweder die Originalgröße wieder erreicht haben oder sie an ein anderes Objekt heranreichen, ohne dieses jedoch zu berühren (siehe Abbildung 6).

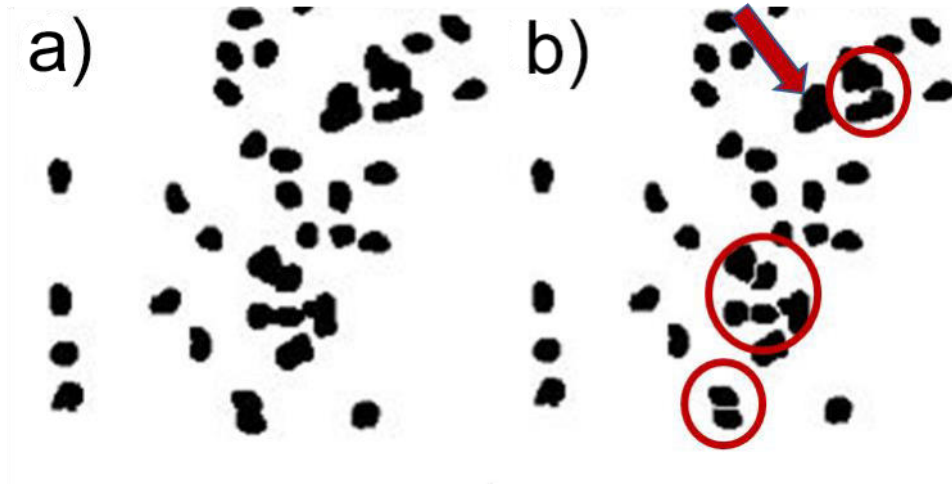


Abbildung 6) Darstellung des Effektes des Watershed-Plugins. a) Vor Watershed b) Nach Watershd (Kreise = gut getrennt; Pfeil = nicht getrennt)

Anschließend konnte die Zellzahl anhand der Zellkernsignale ermittelt werden. In einem nächsten Schritt wurden, orientiert am Zentrum des DEK, zwei Auswertebereiche [zentrale 4mm vs. restlichem DEK (= Peripherie)] definiert. In Kombination mit der jeweiligen DEK-Fläche konnte so die Zelldichte ermittelt werden. Zellkernsignale, welche sich auf den Grenzen des Auswertebereiches befanden, konnten unter Nutzung der Analyse-Option „exclude on edges“ optional ausgeschlossen werden. Um diese Zellkernsignale zu erfassen, ohne sie doppelt zu zählen, wurde diese Analyse-Option jeweils für die Peripherie gewählt (siehe Abbildung 7).

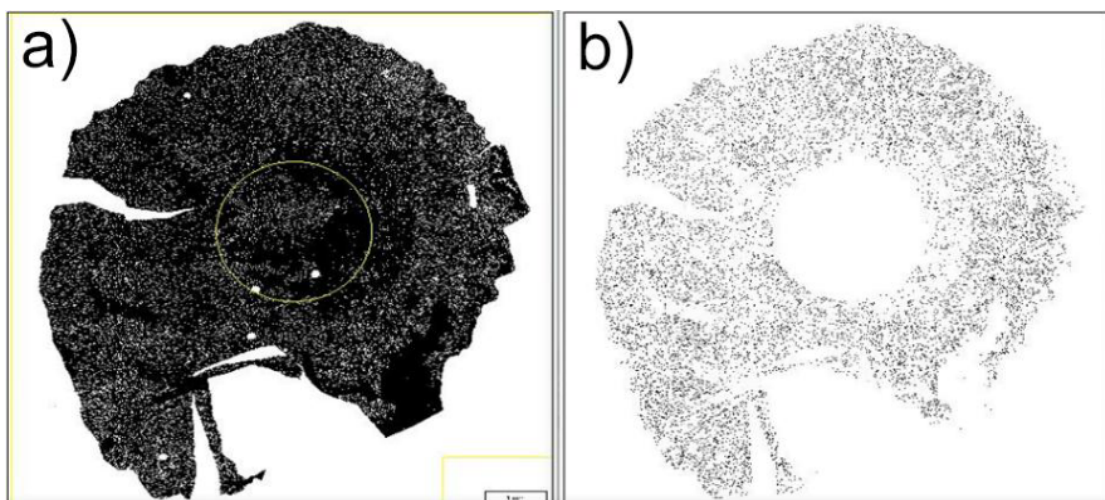


Abbildung 7) Ermittlung der Zelldichte mit ImageJ. Screenshot der ermittelten Zellkernsignale. a) mit Markierung der zentralen 4mm (Zellkerne weiß). B) nach Entfernung des Zentrums zur Bestimmung der Zellzahl der Peripherie (Zellkerne schwarz).

3.2.14 Ermittlung des Mittelpunktes der Descemet Membran Endothel-Komplexe

Der Mittelpunkt der einzelnen DEK wurde unter Anwendung einer digitalen (kreisrunden) Schablone ermittelt. Diese wurde mit dem DEK in Deckung gebracht, sodass der Mittelpunkt der Schablone annähernd dem tatsächlichen Mittelpunkt des DEK entsprach (Abbildung 8).

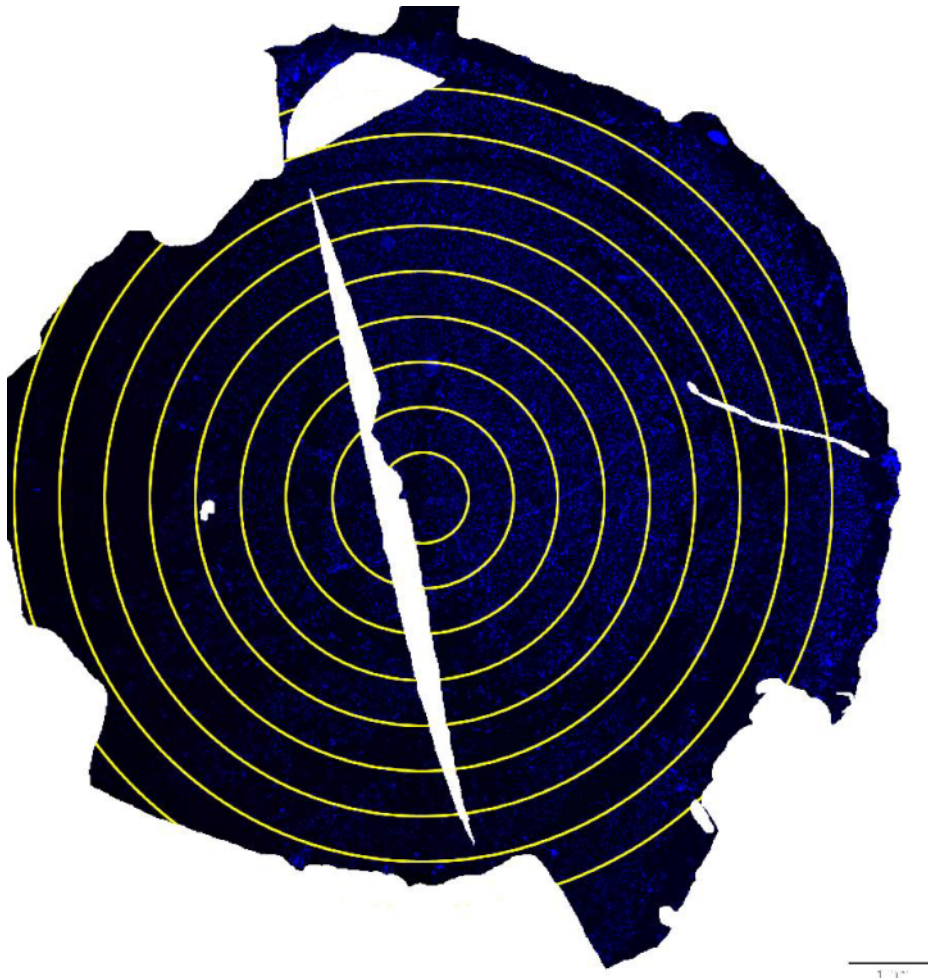


Abbildung 8) Ermittlung des Mittelpunktes unter Anwendung einer digitalen Schablone und in Deckung bringen dieser mit dem DEK.

3.2.15 Qualitative Auswertung

Für die qualitative Auswertung wurde die DEK-Aufnahme digital in 1x1mm große Einzelbilder zerlegt (siehe Abbildung 9). Diese Einzelbilder wurden nun auf ihre p16- sowie p21-Expression hin untersucht. Die Einstufung erfolgte anhand des jeweils höchsten Signals bzw. der stärksten Expression des jeweiligen Markers (p16/p21) im jeweiligen Einzelbild. Die Beurteilung erfolgte durch zwei unterschiedliche Prüfer [MS, AH]. In Fällen einer unterschiedlichen Einstufung durch die beiden Prüfer, wurden die entsprechenden Bilder erneut durch beide Prüfer gesichtet und beurteilt. Bei weiter bestehender Differenz in der Beurteilung wurde ein dritter Prüfer [DS] hinzugezogen und eine finale Beurteilung vorgenommen. Die quadratische Form sowie die neutrale Bezeichnung der Bilder mit Nummern wurden zur Verblindung gewählt. Hierdurch war bei der Auswertung kein Rückschluss auf die Lokalisation des Bildes innerhalb der Membran möglich. (Meyerholz & Beck, 2018) Als Grundlage der Beurteilung wurden die unten genannten Grading-Vorgaben (Tabelle 1 und 2) angewandt.

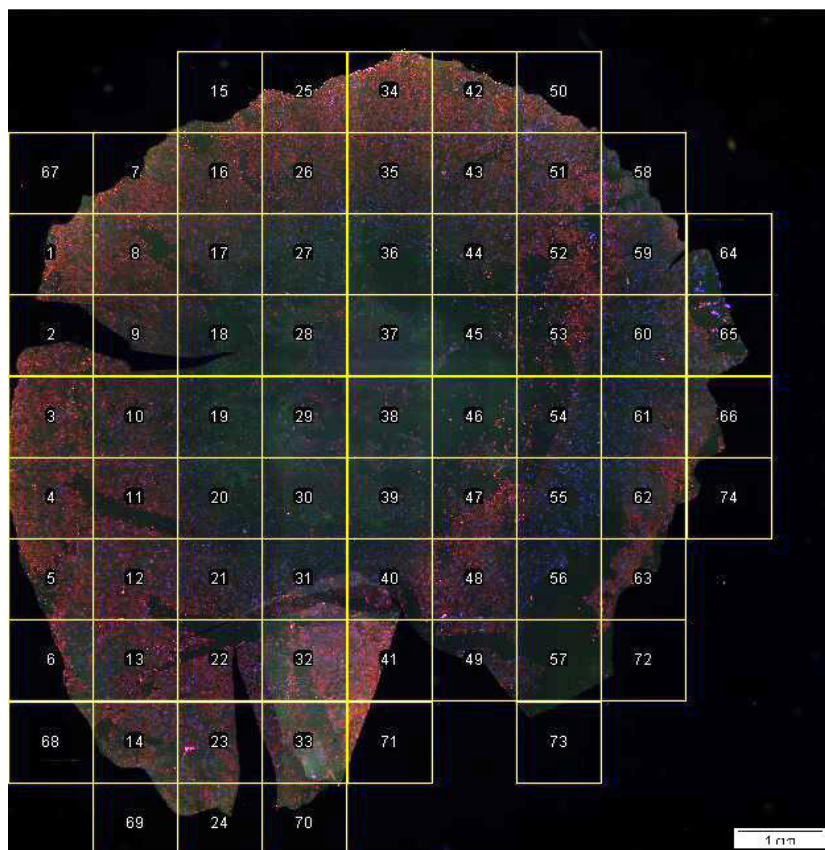


Abbildung 9) Übersichtsaufnahme eines DEK sowie Darstellung des verwendeten Auswerte-Rasters mit 1x1mm großen Bildbereichen. Das Raster wurde am ermittelten Mittelpunkt der Membran orientiert, welcher im Mittelpunkt des zentralen Einzelbildes liegt.

3.2.16 Differenzierung Zentrum versus. Peripherie

Für die differenzierte Analyse zwischen Zentrum und Peripherie des DEK bzgl. des Expressionsmusters wurden die Einzelbilder entsprechend ihrer Lokalisation innerhalb des DEK zugeordnet. Das oben dargestellte Analyseraster wurde am Mittelpunkt des DEK ausgerichtet und der Mittelpunkt des zentralen Einzelbildes ist deckungsgleich mit dem Mittelpunkt des DEK. Das zentrale Einzelbild sowie die unmittelbar angrenzenden Einzelbilder wurden in der qualitativen Auswertung als Zentrum definiert, die restlichen Bilder wurden der Peripherie zugeordnet (siehe Abbildung 10).

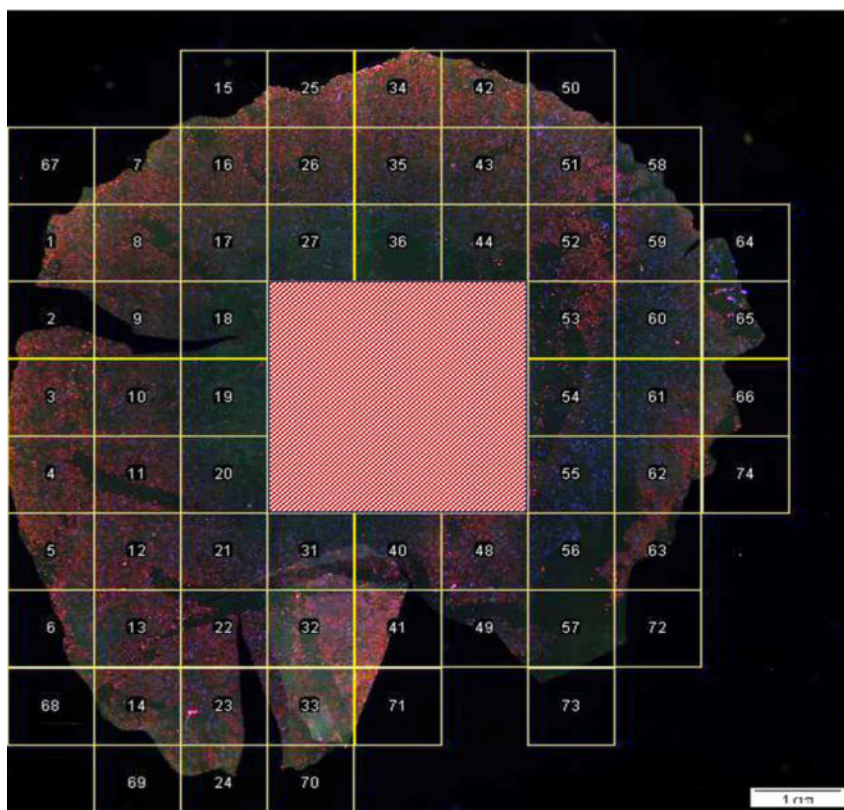


Abbildung 10) Übersichtsaufnahme DEK sowie Darstellung des verwendeten Auswerte-Rasters mit 1x1mm großen Bildbereichen. Zentrale 9 Bilder als Zentrum definiert (Hier durch schraffierten Bereich gekennzeichnet).

3.2.17 Grading p16

Die p16 Expression wurde anhand eines semiquantitativen 4-stufigen Schemas (Grad 1 bis 4) bewertet. Beurteilt wurden die p16-Expression im Zellkern, Zytoplasma sowie die jeweilige Signalintensität (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1) Grading der p16 Expression

p16	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4
Zellkerne positiv	Ja	Ja	Ja	Ja
Zytoplasma positiv	Nein	schwach	moderat	stark

3.2.18 p16 Grading: Beispiel p16 Grad 1

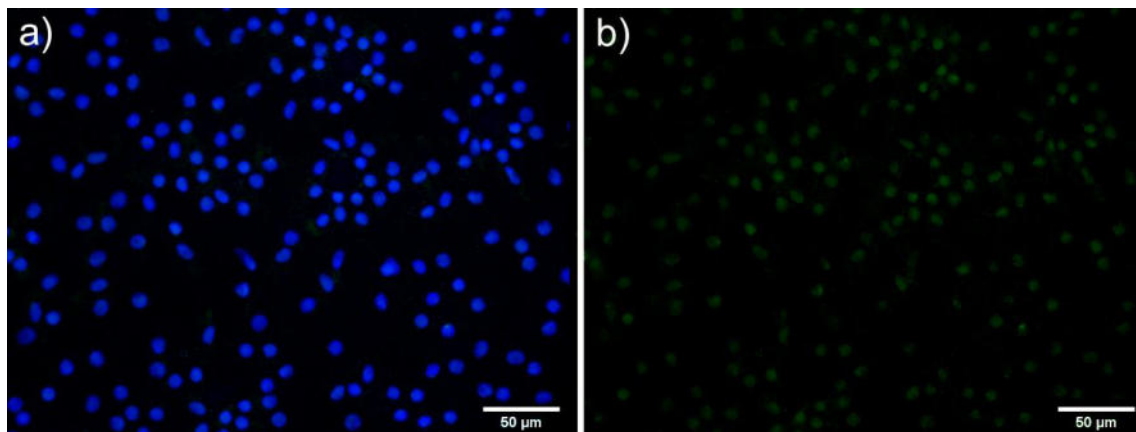


Abbildung 11) a) DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)- und p16-Färbung. b) p16 Färbung. Rein nukleäre Expression = Grad 1

3.2.19 p16 Grading: Beispielbilder p16 Grad 2 bis Grad 4

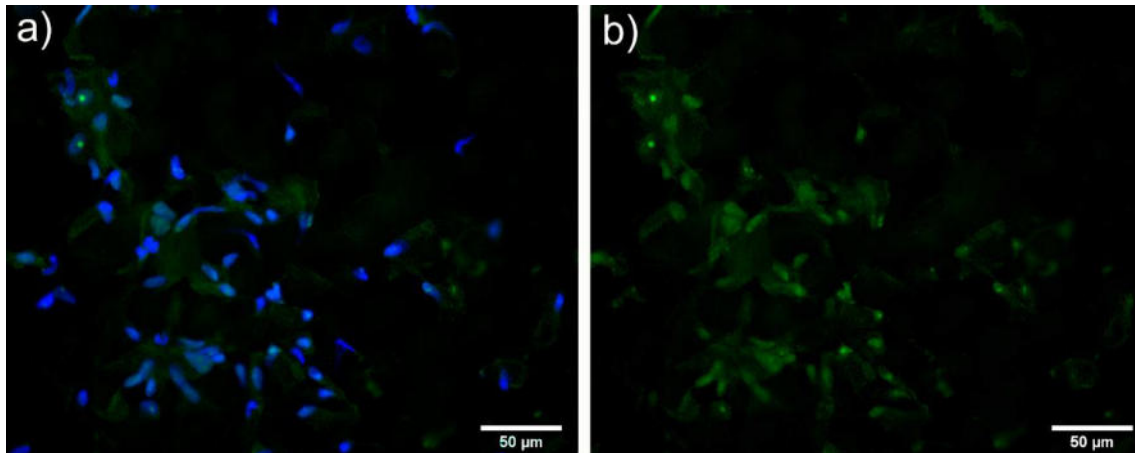


Abbildung 12) a) DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)- und p16-Färbung. b) p16 Färbung. Schwache aber eindeutig zytoplasmatische Färbung nachweisbar = Grad 2

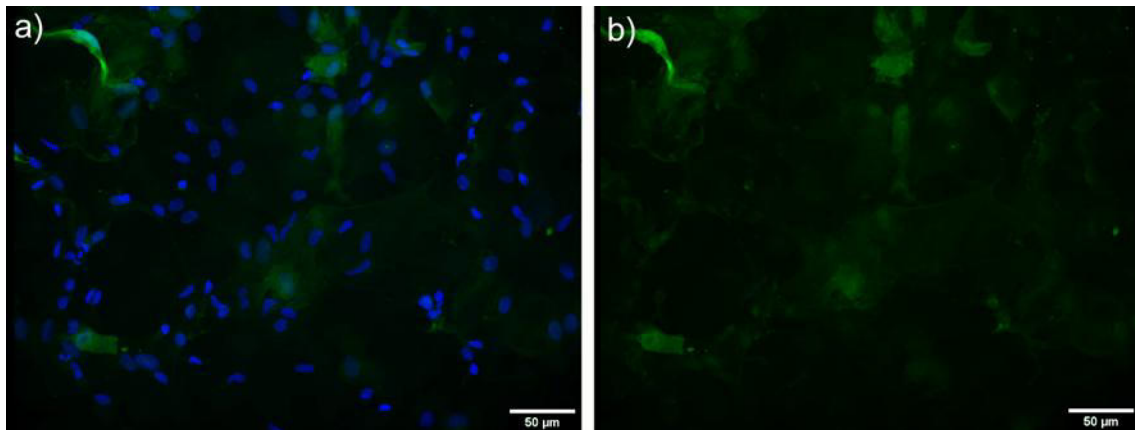


Abbildung 13) a) DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)- und p16-Färbung. b) p16 Färbung. moderate zytoplasmatische Färbung nachweisbar = Grad 3

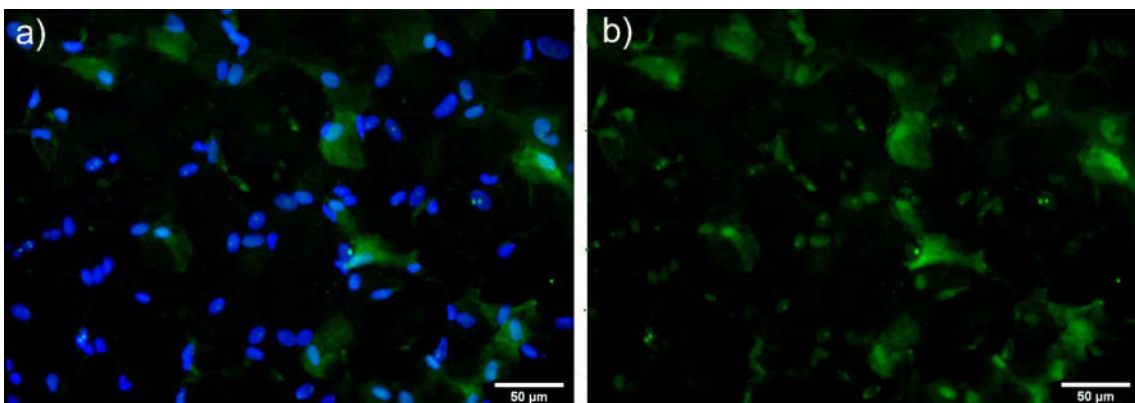


Abbildung 14) a) DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)- (BLAU) und p16-Färbung (GRÜN). b) starke zytoplasmatische Färbung (GRÜN) = Grad 4

3.2.20 Grading p21

Die Anwendung des oben genannten p16 Grading-Schemas war aufgrund des beobachteten Färbe- bzw. Expressionsmusters bei p21 nicht möglich. Es konnte lediglich eine zytoplasmatische und keine nukleäre Expression nachgewiesen werden (Abbildung 15). Daher wurde die p21 Expression anhand eines semiquantitativen 3-stufigen Schemas (Grad 1 bis 3) bewertet. Beurteilt wurde hierbei die Signalintensität (Tabelle 2).

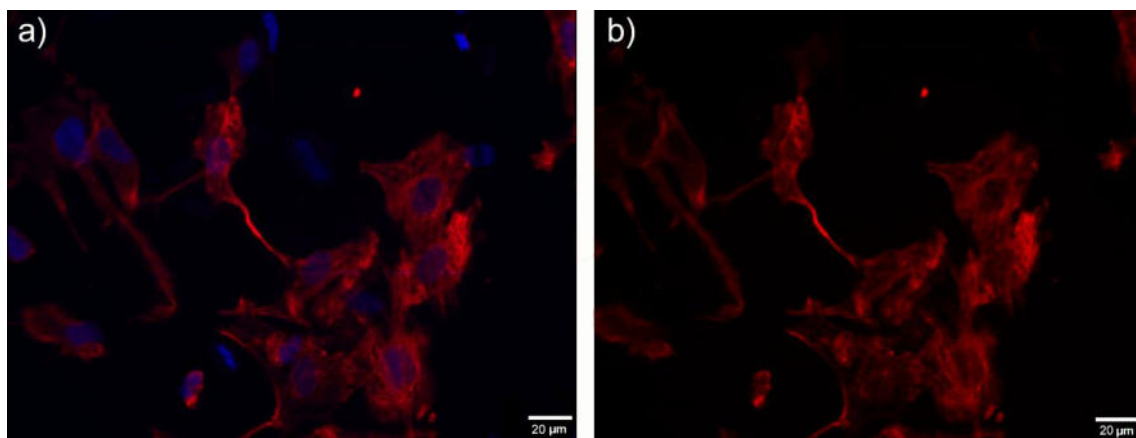
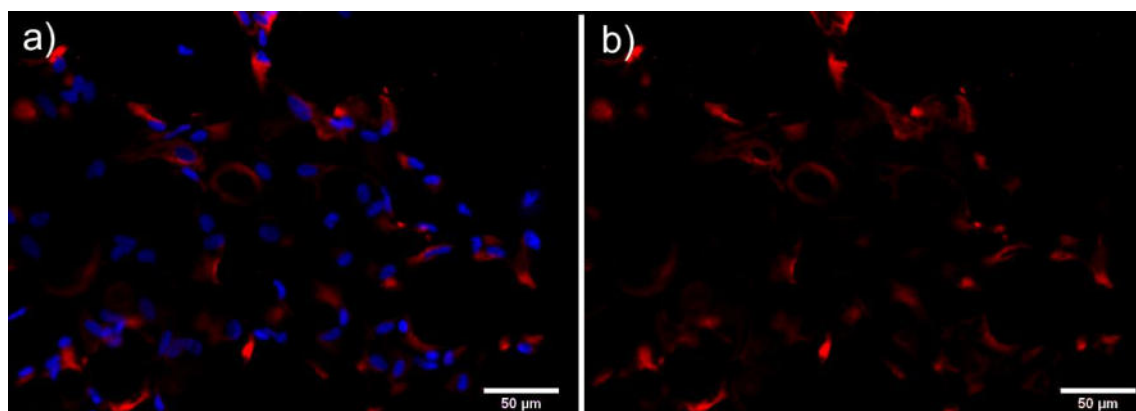
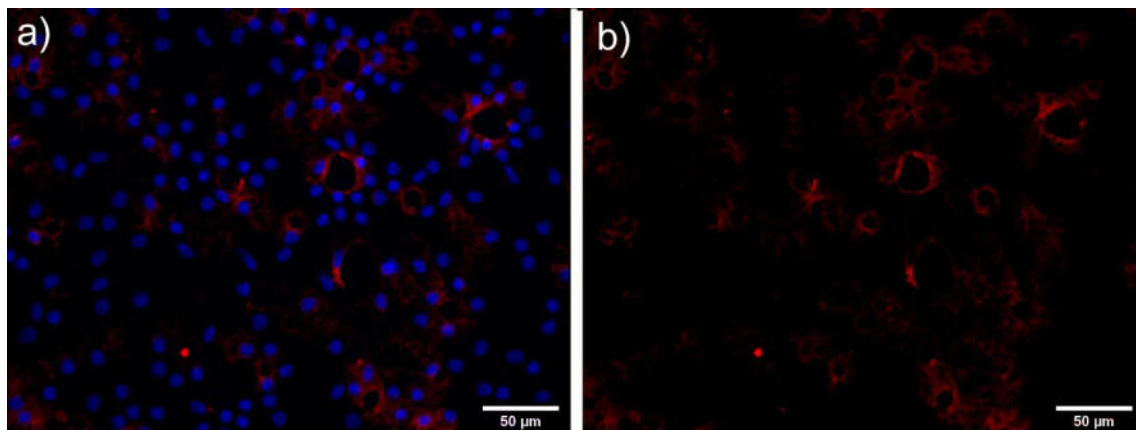
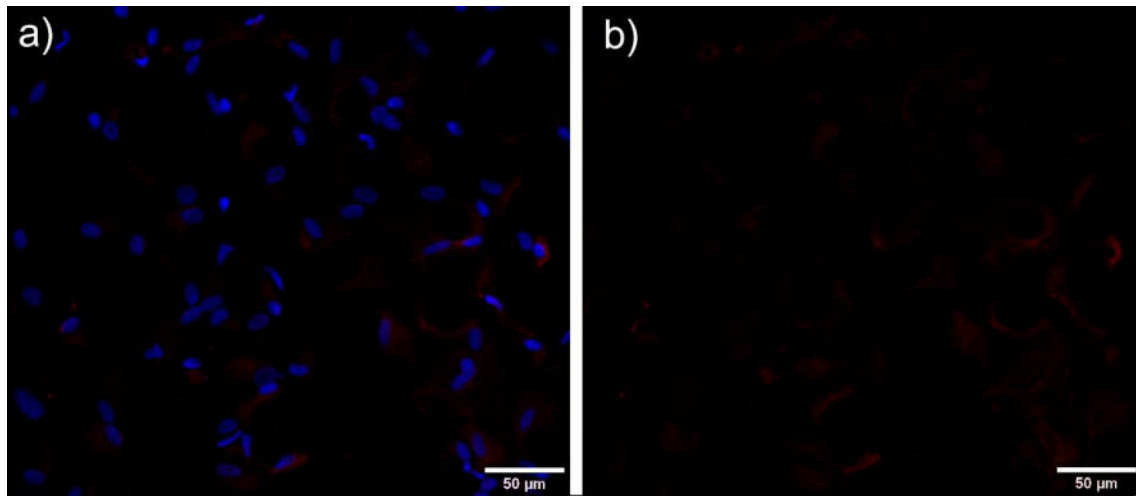


Abbildung 15) a) DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)- (BLAU) und p21-Färbung (ROT). b) p21-Färbung (ROT). Beides in 60x Vergrößerung. Es zeigte sich eine rein zytoplasmatische Färbung bei p21.

Tabelle 2) Grading der p21 Expression

p21	Grad 1	Grad 2	Grad 3
Signalintensität	Kein Signal oder sehr schwach	moderat	stark

3.2.21 p21 Grading: Beispielbilder Grad 1 bis Grad 3



3.2.22 Ermittlung der statistischen Werte

Zur statistischen Datenanalyse wurde die Software GraphPadPrism Version 10.2.3 für Windows (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA) verwendet. Die Gauß'sche Normalverteilung der Messwerte wurde mittels Shapiro Wilk Test überprüft. Die statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem ungepaartem Student t-Test (oder dem Mann-Whitney U t-Test für nicht normalverteilte Daten) berechnet (95% Konfidenzintervall). Die statistische Signifikanz unabhängiger Gruppen wurde mithilfe einer gewöhnlichen einseitigen Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) berechnet. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz von Datengruppen, bei denen der Einfluss von zwei Faktoren analysiert wurde, wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (Two-Way-ANOVA) mit anschließendem Tukey Multiple Comparison Test durchgeführt. Alle Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt ($p > 0,05$ nicht signifikant, $*$ $\leq 0,05$, $** \leq 0,01$, $*** \leq 0,001$, $**** \leq 0,0001$).

Die Korrelations-Analyse wurde mithilfe der two-tailed Pearson Korrelation im Fall von normalverteilten Daten bzw. der two-tailed Spearman Korrelation im Fall keiner Korrelation durchgeführt ($r=0$ bis 1 positive Korrelation, $r=0$ bis -1 negative Korrelation).

4 Ergebnisse

4.1 Ein- und Ausschluss von Descemet Membran Endothel-Komplexen

In dieser Studie konnten n=8 FED-DEK sowie 2 Kontroll-DEK von einem gesunden Organspender nach o.g. Protokoll gefärbt und vollumfänglich ausgewertet werden. Aufgrund der definierten Ausschlusskriterien mussten insgesamt 11 DEK [F5, F6, F7, F8, F10, F11, F12, F14, F16, F17, F18] von den weiteren Analyseschritten ausgeschlossen werden. Diese DEK haben teilweise mehrere der Ausschlusskriterien gleichzeitig erfüllt.

- 1) Ausschluss aufgrund zu geringer DEK-Fläche: F8, F14, F18
- 2) Ausschluss aufgrund DEK-Konfiguration F5, F8, F10, F11, F12, F14, F17, F18
- 3) Ausschluss aufgrund fehlgeschlagener Färbung: F6, F7, F8, F16

4.2 Ermittelte Fläche der Descemet Membran Endothel-Komplexe

Die durchschnittliche Fläche der FED-DEK lag bei 53,8mm² (SD +/- 11mm²), die der Kontroll-DEK bei 70,9mm² (SD +/- 7,5mm²).

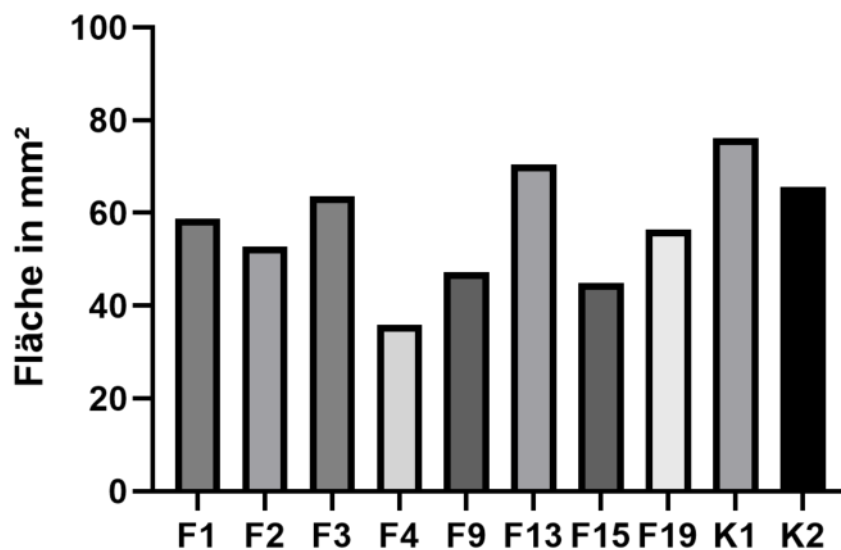


Abbildung 19) Übersicht der DEK-Fläche in mm². Die mit F bezeichneten DEK entsprechen FED-DEK, die mit K bezeichnen die Kontroll-DEK.

4.3 Empirische Daten

Das Verhältnis von weiblichen (n=3) zu männlichen (n=5) Patienten lag bei 1:1,7. Als Kontrolle wurden die DEK beider Augen eines 96-jährigen gesunden Spenders genutzt. Die Altersverteilung der Patienten lag zwischen 60 und 83 Jahren. Der Mittelwert lag bei 73,6 Jahren ((SD)+/-7,7Jahre).

4.4 Globale und regionale Zelldichte

Die durchschnittliche globale Zelldichte der FED-DEK lag bei 681,8 Zellen/mm² (SD +/- 214,4), bei den Kontroll-DEK bei 1133 Zellen/mm² (SD +/- 72,8). Im Zentrum waren bei den FED-DEK 544,3 Zellen/mm² (SD +/- 115,8) und bei den Kontroll-DEK 1444 Zellen/mm² (SD +/- 49,5) im Durchschnitt nachzuweisen. Die durchschnittliche Zelldichte in der Peripherie lag bei den FED-DEK bei 779,3 Zellen/mm² (SD +/- 345,6) und bei den Kontroll-DEK bei 1048 Zellen/mm² (SD +/- 90,5).

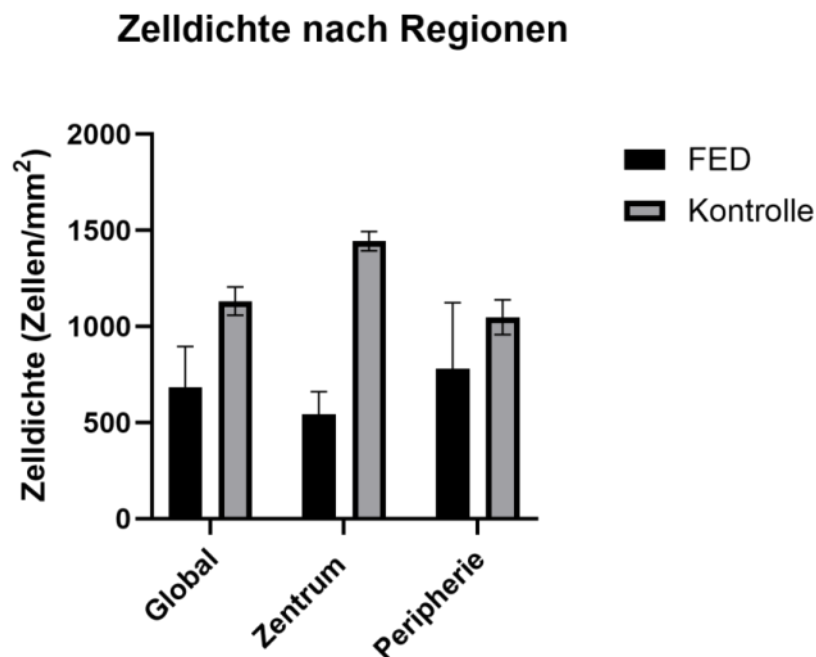


Abbildung 20) Darstellung der Zelldichte in Zellen/mm der FED-DEK sowie der Kontroll-DEK. Zudem differenzierte Betrachtung von Zentrum und Peripherie.

4.5 Zelldichte in Korrelation zum Alter

Die Analyse der Zelldichte unter Berücksichtigung des Alters der jeweiligen Patienten zum Zeitpunkt der DEK-Entnahme im Rahmen der DMEK zeigte eine statistisch signifikante ($p=0,0008$) negative Korrelation mit einem Pearson-Korrelationskoeffizienten von $r = -0,9290$.

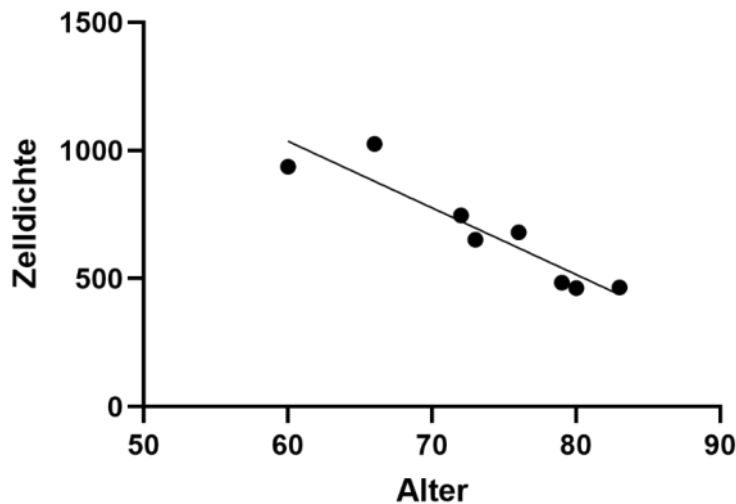


Abbildung 21) Darstellung der Zelldichte unter Berücksichtigung des Alters der jeweiligen Patienten zum OP-Zeitpunkt. Es zeigte sich eine statistisch signifikante ($p=0,0008$) negative Korrelation mit einem Pearson-Korrelationskoeffizienten von $R = -0,9290$.

4.6 Ergebnisse der Kontroll-Untersuchungen

In den als Positiv-Kontrolle gewählten HeLa-Zellen zeigte sich unter Verwendung der p16 und p21 Antikörpern das bereits vorbeschriebene Muster der Immunfluoreszenz-Färbung mit sowohl nukleärer als auch zytoplasmatischer Präsenz des p16 Proteins. (Ostrowska et al., 2011) Bei p21 zeigte sich überwiegend eine zytoplasmatische Präsenz des p21 Proteins. Die zytoplasmatische Lokalisation von p21 scheint eine Folge der bereits im Rahmen der Onkogenese bei anderen Karzinomen, wie z.B. Brustkrebs, beschriebenen Phosphorylierung zu sein. (Dehennaut et al., 2013; Karimian et al., 2016; Zhao et al., 2012)

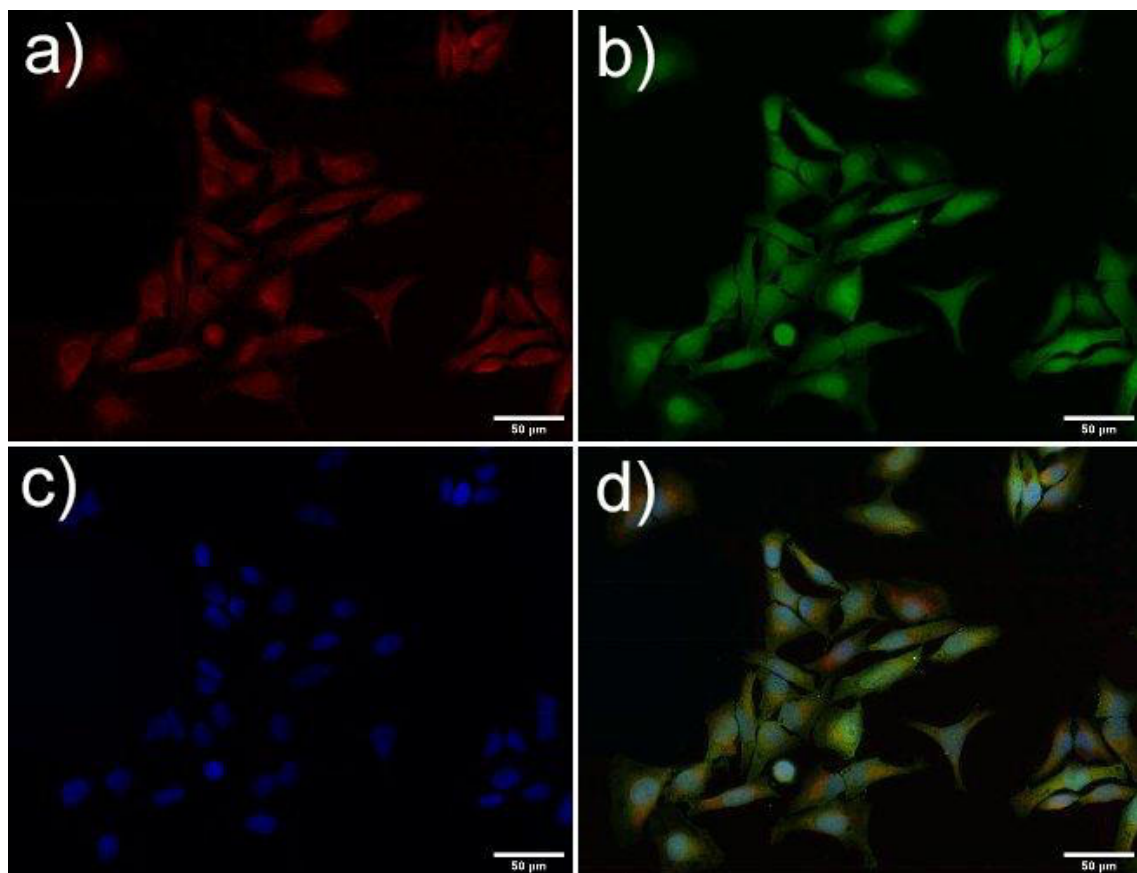


Abbildung 22) HeLa-Zellen: a) p21 Färbung (ROT) b) p16 Färbung (GRÜN) c) DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) -Färbung (Zellkerne) d) Kombinierte p21-p16 und DAPI-Färbung

Die Negativ-Kontrolle zeigte sich bei den verwendeten Antikörpern regelrecht und ohne Nachweis einer unspezifischen Bindung der sekundären Antikörper. In den genutzten Belichtungszeiten war keine Autofluoreszenz zu beobachten, sodass sich hieraus keine Einschränkungen für die Auswertung ergaben.

4.7 Ergebnisse der qualitativen Beurteilung

Sollten in einem Bildausschnitt keine Zellen mehr nachweisbar gewesen sein oder dieser durch Präparationsartefakte nicht adäquat auswertbar gewesen sein, wurden die entsprechenden Bilder nicht in der Auswertung berücksichtigt. Insgesamt wurden dadurch 77 von 736 Bildern (10,5%) ausgeschlossen.

4.8 Ergebnisse der p16 Expressionsanalyse

Die Auswertung der p16 Immunfluoreszenzfärbung zeigte in 19,6% (0% in der Kontroll-DEK) der Bilder Zellen im Grad 4, in 16,4% (43,5% in der Kontroll-DEK) der Bilder Zellen im Grad 3, in 47,2% (41,9% in der Kontroll-DEK) der Bilder Zellen im Grad 2 sowie in 16,7% (14,6% in der Kontroll-DEK) der Bilder Zellen im Grad 1 als stärkste nachweisbare Ausprägung im jeweiligen Einzelbild.

Im Zentrum zeigten sich in 60,5% (0% in der Kontroll-DEK) der Bilder Zellen im Grad 4, in 12,7% (27,8% in der Kontroll-DEK) der Bilder Zellen im Grad 3, in 21,6% (72,2% in der Kontroll-DEK) der Bilder Zellen im Grad 2 sowie in 5,3% (0% in der Kontroll-DEK) der Bilder Zellen im Grad 1 als stärkste nachweisbare Ausprägung im jeweiligen Einzelbild.

In der Peripherie zeigten sich in 12,8% (0% in der Kontroll-DEK) der Bilder Zellen im Grad 4, in 16,8% (45,4% der Kontroll-DEK) der Bilder Zellen im Grad 3, in 51,23% (38,2% in der Kontroll-DEK) der Bilder Zellen im Grad 2 sowie in 19,2% (16,4% der Kontroll-DEK) der Bilder Zellen im Grad 1 als stärkste nachweisbare Ausprägung im jeweiligen Einzelbild.

Es zeigte sich eine signifikant ($p < 0,0001$) höhere Grad 4 Expression von p16 im Zentrum verglichen zur Peripherie der FED-DEK. Weiterhin gab es einen hoch signifikanten ($p < 0,0001$) Unterschied der p16 Expression im FED (Zentrum) zwischen Grad 1 und Grad 4 Expression. ($p > 0,05$ nicht signifikant, $* \leq 0,05$, $** \leq 0,01$, $*** \leq 0,001$, $**** \leq 0,0001$).

p16 Expression nach Regionen

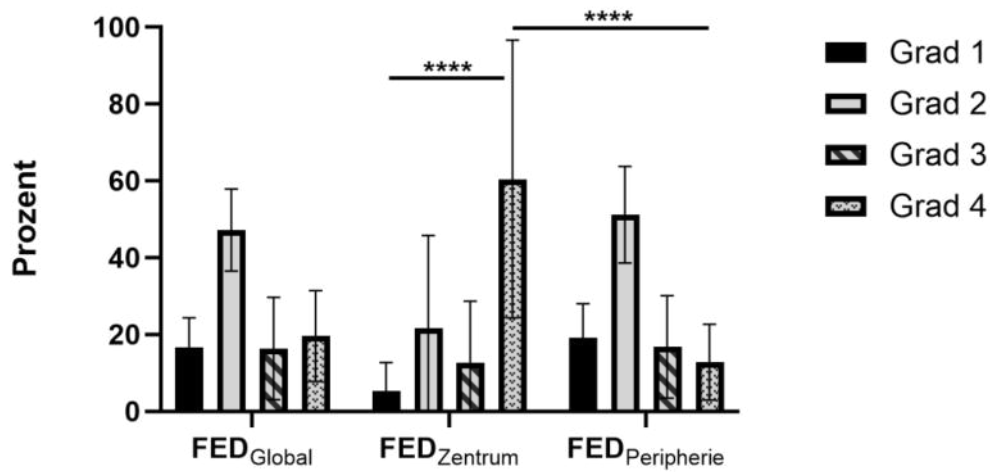


Abbildung 23) Auswertung der p16 Expression gem. beschriebenem Grading-Schema mit Darstellung der regionalen Unterschiede zwischen Zentrum und Peripherie sowie bei globaler Betrachtung. Es zeigte sich eine signifikant ($p < 0,0001$) höhere Grad 4 Expression von p16 im FED (Zentrum) im Vergleich zu FED (Peripherie). Weiter zeigte sich ein hoch signifikanter ($p < 0,0001$) Unterschied der p16 Expression im FED (Zentrum) zwischen Grad 1 und Grad 4 Expression. ($p > 0,05$ nicht signifikant, $* \leq 0,05$, $** \leq 0,01$, $*** \leq 0,001$, $**** \leq 0,0001$)

4.9 Gegenüberstellung p16 Expression Zentrum versus Peripherie

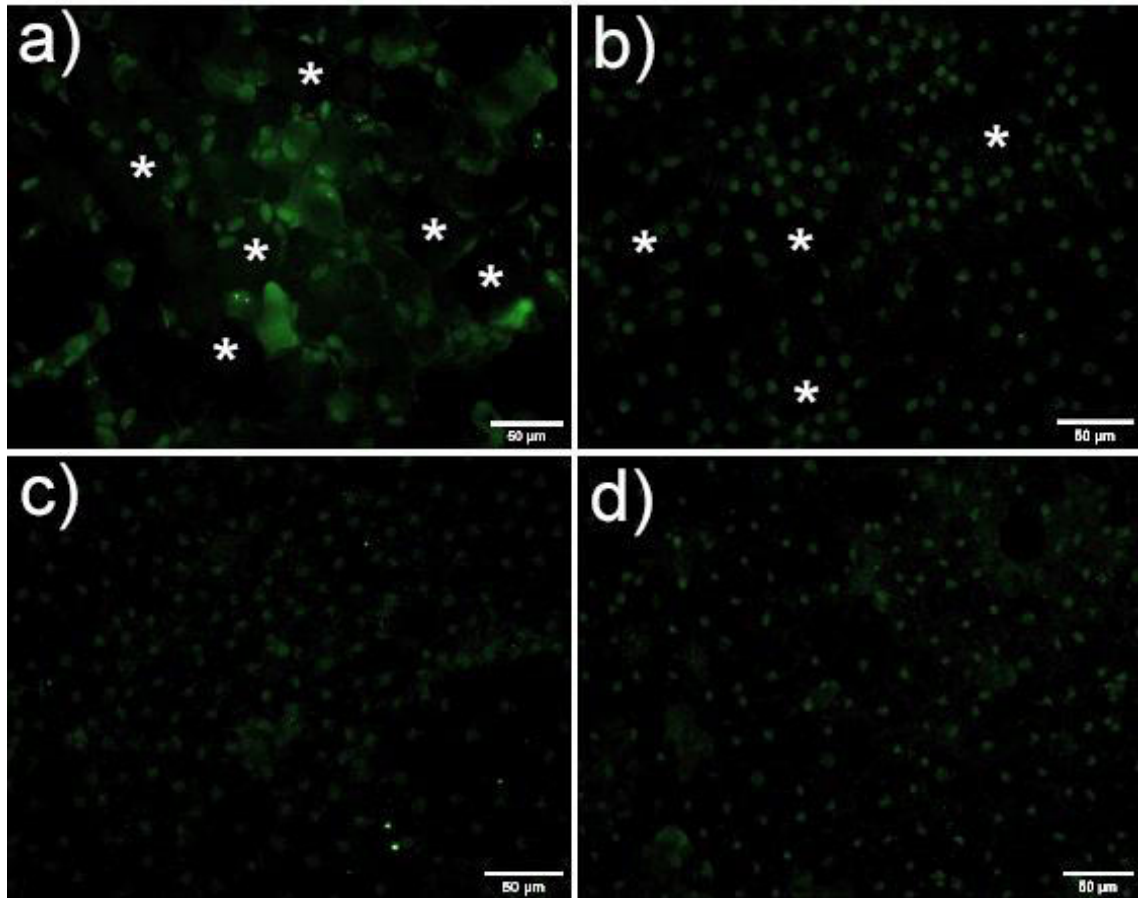


Abbildung 24) Gegenüberstellung der p16 Expression zwischen Zentrum a) und Peripherie b) der FED-DEK, im Vergleich zur gesunden Kontrolle im Zentrum c) und Peripherie d). Mit * wurden exemplarisch Guttiae markiert.

4.10 Ergebnisse der p21 Expressionsanalyse

Die Auswertung der p21 Immunfluoreszenzfärbung zeigte in 26,6% (0% in der Kontroll-DEK) der Bilder Zellen im Grad 3, in 38,6% (84,5% in der Kontroll-DEK) der Bilder Zellen im Grad 2 sowie in 35,3% (15,5% in der Kontroll-DEK) der Bilder Zellen im Grad 1 als stärkste nachweisbare Ausprägung im jeweiligen Einzelbild.

Im Zentrum zeigten sich in 25% (0% in der Kontroll-DEK) der Bilder Zellen im Grad 3, in 51,4% (50% in der Kontroll-DEK) der Bilder Zellen im Grad 2 sowie in 23,6% (50% in der Kontroll-DEK) der Bilder Zellen im Grad 1 als stärkste nachweisbare Ausprägung im jeweiligen Einzelbild.

In der Peripherie zeigten sich in 27% (0% in der Kontroll-DEK) der Bilder Zellen im Grad 3, in 36% (88% in der Kontroll-DEK) der Bilder Zellen im Grad 2 sowie in 37% (12% in der Kontroll-DEK) der Bilder Zellen im Grad 1 als stärkste nachweisbare Ausprägung im jeweiligen Einzelbild.

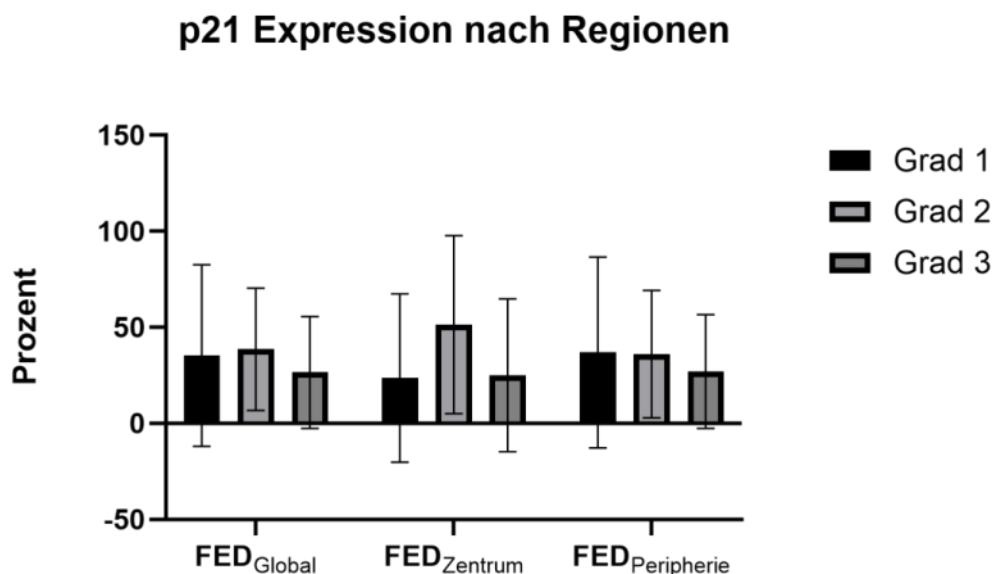


Abbildung 25) Auswertung der p21 Expression gem. beschriebenem Grading-Schema mit Darstellung der regionalen Unterschiede zwischen Zentrum und Peripherie sowie bei globaler Betrachtung. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Auffällig war jedoch, dass in der Kontrolle keinerlei Grad 3 Ausprägung nachweisbar war.

Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p = >0,9999$) in den Expressionmustern im Vergleich innerhalb der FED-DEK zwischen Zentrum und Peripherie. ($p: >0,05$ nicht signifikant, $*\leq 0,05$, $**\leq 0,01$, $***\leq 0,001$, $****\leq 0,0001$).

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Expression der Zellzyklusinhibitoren p16 sowie p21 im Rahmen der FED untersucht. Die Untersuchung erfolgte an DEK, welche zu Flachpräparaten aufbereitet wurden. Es erfolgte eine indirekte Immunfluoreszenz-Färbung des gesamten DEK, sodass eine differenzierte Analyse der einzelnen Bereiche möglich war. Elementarer Bestandteil der Arbeit war die vergleichende Betrachtung des Zentrums im Vergleich zur Peripherie. Es wurde die Hypothese untersucht, ob eine erhöhte Expression von p16/p21 im FED-Endothel nachzuweisen war sowie ob diese erhöhten Expressionslevel im Zentrum der FED-DEK lagen.

5.1 DEK-Fläche und Präparation zum Flachpräparat

Die verwendeten DEK wurden im Rahmen einer DMEK am Zentrum für Augenheilkunde der Universitätsklinik Köln gewonnen. Bei einer Descemetorhexis mit einem Durchmesser von 8mm wäre eine Fläche von mindestens 50,3mm² zu erwarten gewesen. Die durchschnittliche FED-DEK-Fläche in die Arbeit lag bei 52,4mm² (SD +/- 14mm²). Bis zum Zeitpunkt der Durchführung der hier beschriebenen Untersuchungen im Jahr 2017 war die Präparation der Hornhautendothele zu Flachpräparaten nur vereinzelt in Studien genutzt worden, stattdessen wurden zumeist Untersuchungen an histologischen Querschnittspräparaten durchgeführt. (Forest et al., 2015) Die Präparation als Flachpräparat sowie die nachfolgende vollständige Analyse der gesamten Oberfläche machte es möglich, die teilweise nur vereinzelt auftretenden Zellen mit starker Proteinexpression nachzuweisen sowie die Zellen im Zellverbund darzustellen. Dadurch bedingt erscheinen Flachpräparate von post-DMEK-DEK grundsätzlich für weitere Untersuchungen bzw. Studien gut geeignet zu sein.

5.2 Zelldichte und altersabhängiger Zellverlust

Die FED-DEK zeigten eine reduzierte Zelldichte im Zentrum, bei zudem allgemein deutlich reduzierter durchschnittlicher Zelldichte von 681,8 Zellen/mm² (SD +/- 214,4) im Vergleich zur Kontrolle (1133 Zellen/mm² (SD +/- 72,8)). Der im Zusammenhang mit der FED beobachtete Verlust an HCEC war auch in anderen Studien bereits beobachtet worden. (He et al., 2011)

Unter Berücksichtigung des Alters der Patienten (in dieser Studie zwischen 60 und 83 Jahren) zum Zeitpunkt der DMEK zeigte sich eine statistisch signifikante ($p=0,0008$) negative Korrelation ($r= -0,9290$) im Hinblick auf die Zelldichte. Der altersabhängige

Zellverlust wurde auch bereits in anderen Studien beobachtet. (Elhalis et al., 2010; He et al., 2011; G. O. Waring, 3rd et al., 1978; G. R. Waring, MM; Laibson, PR, 1984; Weisenthal, 1997) Für künftige Studien sollte daher stets auch das Alter der Patienten berücksichtigt werden, um die Ergebnisse adäquat einordnen zu können.

5.3 Expressionsanalyse p16

Die Analyse der Immunlokalisation der p16-Expression zeigte bei den FED-DEK eine signifikant ($p < 0,0001$) höhere (Grad 4) Expression im Zentrum, verglichen zur Peripherie. Die Ergebnisse unterstützen die aufgestellte Hypothese, dass die erhöhten Expressionslevel vor allem im Zentrum des DEK zu finden sind. Die erhöhte Expression der CDKI's erscheinen mit der Seneszenz im Rahmen der Pathogenese der FED vereinbar, wie dies auch durch Matthaei et al bereits beschrieben wurde. (Matthaei et al., 2013) Die grundsätzlich mit der Seneszenz einhergehende vermehrte Expression der Zellzyklusinhibitoren p16 (und p21) wurde bereits gezeigt. (Judith Campisi, 2001; J. Campisi & di Fagagna, 2007). Studien auf molekularer Ebene hatten eine Rolle von p16 in der Entwicklung der replikativen Seneszenz gezeigt. (Dai & Enders, 2000; Zindy et al., 1997) Die starke Expression von p16 war vor allem im zytoplasmatischem Raum der HCEC zu finden. Es war bereits vorbeschrieben, dass die ektopische bzw. zytoplasmatische Expression von p16 dazu führte, dass diese in der G1 Phase verblieben und einen Seneszenz-Phänotyp ausbildeten. (McConnell et al.) Die Präsenz von p16 im zytoplasmatischen Raum könnte das Resultat posttranskriptionaler Modifikationen oder einer Überexpression des Proteins sein, welche es zum Transfer ins Zytoplasma führte. (N. Murphy et al., 2003)

Die Ergebnisse geben Anhalt dafür, dass bei FED-Patienten die seneszenten Zellen vor allem im Zentrum des Endothels zu finden sind. Dies würde zudem mit der Lokalisation der bereits in den frühen Stadien der Erkrankung betroffenen Region im Zentrum korrelieren. (Eghrari, Riazuddin, & Gottsch, 2015) Zusätzlich würden dadurch die im Rahmen der DWEK gemachten Beobachtungen unterstützt. Hierbei wird angenommen, dass nach Entfernung der zentralen HCEC im Rahmen der DWEK, die peripheren HCEC mit erhaltenem proliferativem Potenzial den entstandenen Defekt sukzessive schließen. (Arbelaez et al., 2014; Balachandran et al., 2009; Bleyen et al., 2013; Borkar et al., 2016; Braunstein et al., 2003; Dirisamer et al., 2012; Galvis et al., 2016; Iovieno et al., 2017; Koenig, 2013, 2015; Moloney et al., 2015; Shah et al., 2012; Watson et al., 2006; Zafirakis et al., 2010; Ziaei et al., 2013) Es ist noch unbekannt, ob die Wiederbesiedlung der zentralen Region des Endothels nach Descemetorhexis bei FED-Patienten im

Rahmen von Migration oder Proliferation von patienteneigenen Endothelzellen erfolgt oder unter Umständen eine Kombination beider Mechanismen zugrunde liegt. (Borkar et al., 2016) Die Entfernung der erkrankten Descemet Membran könnte beispielsweise die Zell-Zell-Kontaktinhibition aufheben, auch wenn diese Stimulation der Endothelzell-Mitose bisher nur *in vitro* gezeigt werden konnte. (Senoo & Joyce, 2000). Bei den peripheren Endothelzellen konnte bereits gezeigt werden, dass sie bei gesunden Hornhäuten kontinuierlich in Richtung des Zentrums migrieren. (Borkar et al., 2016; He et al., 2012) Davies et al beobachteten, dass nach Descemetorhexis die Endothelzellzahlen mit der Zeit stetig zunahmen, selbst bei Hornhäuten die insgesamt nicht aufgeklärt waren. (Davies et al., 2018)

HCEC teilen sich *in vivo* normalerweise nicht und gelten als postmitotisch. (S. Hara et al., 2014) Sie konnten jedoch für eine begrenzte Anzahl an Passagen *in vitro* expandiert werden. Je nach Lage innerhalb der gesunden Cornea zeigten sich Unterschiede bzgl. der *in vitro* Replikationsfähigkeit. Periphere HCEC's schienen diese altersunabhängig zu erhalten, wohingegen zentrale HCEC's diese mit dem Alter anteilig eingebüßt hatten. (Mimura & Joyce, 2006) Zusätzlich wurde beobachtet, dass die Replikationsfähigkeit negativ mit dem Vorhandensein von Seneszenz-Markern (wie p16 und p21) in den entsprechenden Zellen korrelierte. (Mimura & Joyce, 2006)

5.4 Expressionsanalyse p21

Die Immunlokalisation der p21 Expression zeigte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich des Zentrums zur Peripherie. In den FED-DEK konnte p21 in rein zytoplasmatischer Expression nachgewiesen werden. Vorherige Studien hatten bereits eine allgemein erhöhte Expression beschrieben (Matthaei et al., 2013), ohne die genaue Lokalisation innerhalb der Zelle zu betrachten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Lokalisation von p21 innerhalb der Zelle dessen Funktion beeinflusst. So wirkt zytoplasmatisches p21 anti-apoptotisch und fördert so das Überleben der Zelle. (Abbas & Dutta, 2009; Dehennaut et al., 2013; Karimian et al., 2016; Zhou et al., 2001) Im Zusammenhang mit der FED wäre ein Einfluss der zytoplasmatischen Expression von p21 auf die Ausbildung des Seneszenz-Phänotyps denkbar. Diese Fragestellung sollte im Rahmen weiterer Studien näher untersucht werden.

5.5 Limitationen

Die DEK wiesen aufgrund der beschriebenen Fragilität (B. Bachmann et al., 2016) teilweise deutlich Schäden auf. Dies führte, trotz maximaler Standardisierung der Prozesse sowie schonendem Umgang, zum Ausschluss einiger DEK von der Analyse. Es blieb unklar, ob die detektierten Schäden intra- oder post-DMEK entstanden waren. Die anspruchsvolle Präparation der DEK stellt eine Limitation in der Anwendbarkeit dar bzw. macht eine große Erfahrung des Durchführenden erforderlich. Insbesondere da bekannt ist, dass es sich bei dem cornealen Endothel um sehr empfindliches Gewebe handelt und es schnell zur Rissbildung kommen kann. (B. Bachmann et al., 2016)

Vor der Bestimmung der Zelldichte war eine digitale Präprozessierung der Bilder erforderlich, um die adäquate Analyse zu ermöglichen. Weiterer limitierender Faktor waren ggf. (intra- oder post-DMEK) mechanisch entfernte Zellverbände mit ggf. daraus folgend reduzierter Zelldichte.

Auch wenn sich im direkten Vergleich zwischen den FED-DEK und den Kontrollen bereits deutliche Unterschiede mit erhöhten Expressionen von p16 zeigten, bleibt zu bedenken, dass dieser Unterschied bei Kontroll-DEK eines jüngeren, gesunden Spender-Auges unter Umständen noch weitaus stärker ausgefallen wäre. Der bereits durch Enoto et al in Zellkulturen von HCEC beobachtete, altersbedingte Anstieg der Proteinexpression von p16 und p21 (Enomoto et al., 2006) könnte in Teilen auch auf die Kontroll-DEK zutreffen, da diese von einem 96 Jahre alten Körperspender stammten. Weiter bleibt zu beachten, dass die tatsächliche Expression von p16 und p21 unter Umständen noch höher als hier nachgewiesen war. In Vergleichsstudien zwischen Querschnitt- („Cross-Section“) und Flach- („Flatmount“) Präparaten, unter Verwendung der jeweils gleichen Antikörper, konnte eine generell geringere Positivrate bei der Auswertung an Flachpräparaten gezeigt werden. (McGowan, Edelhauser, Pfister, & Whikehart, 2007). Grundsätzlich bleibt limitierend zu erwähnen, dass die Analyse der p16/p21-Expression nicht *in vivo* möglich ist.

Die geringe Fallzahl (n=2) bei den Kontroll-DEK ließ eine statistische Auswertung leider nicht zu, auch wenn qualitative Unterschiede in den Expressionsmustern nachweisbar waren. Allgemein muss zudem berücksichtigt werden, dass die erhobenen Ergebnisse auf einer kleinen Fallserie von n=8 FED-DEK beruhen und weitere Studien mit größerer Fallzahl zur Bestätigung notwendig sind.

5.6 Schlussfolgerung

Die Resultate dieser Arbeit geben weitere Hinweise darauf, dass die erhöhte Expression von p16 im Zentrum des DEK mit den pathologischen Veränderungen durch die FED einhergeht und die seneszenten Zellen bei der FED insbesondere im Zentrum des Endothels zu finden sind. Anhand der erhobenen Daten konnte kein Unterschied in der p21-Expression zwischen Zentrum und Peripherie beobachtet werden. Diese ersten Ergebnisse bedürfen weiterführender Untersuchungen in größeren Kollektiven.

Die Präparation der DEK zu Flachpräparaten ermöglicht eine Auswertung des gesamten Zellverbundes sowie den Nachweis von in Teilen nur vereinzelt vorkommenden Zellen. Die Arbeit an den DEK erfordert eine hohe Expertise beim Durchführenden, um Beschädigungen zu vermeiden. Die DEK zeigen sich jedoch grundsätzlich für weitere Studien als gut geeignet.

6 Literaturverzeichnis

- Abbas, T., & Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*, 9(6), 400-414. doi:10.1038/nrc2657
- Adamis, A. P., Filatov, V., Tripathi, B. J., & Tripathi, R. C. (1993). Fuchs' endothelial dystrophy of the cornea. *Surv Ophthalmol*, 38(2), 149-168. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8235998
- Alomar, T. S., Al-Aqaba, M., Gray, T., Lowe, J., & Dua, H. S. (2011). Histological and Confocal Microscopy Changes in Chronic Corneal Edema: Implications for Endothelial Transplantation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(11), 8193-8207. doi:10.1167/iovs.11-8047
- Arbelaez, J. G., Price, M. O., & Price, F. W., Jr. (2014). Long-term follow-up and complications of stripping descemet membrane without placement of graft in eyes with Fuchs endothelial dystrophy. *Cornea*, 33(12), 1295-1299. doi:10.1097/ico.0000000000000270
- Bachmann, B., Schaub, F., & Cursiefen, C. (2016). [Treatment of corneal endothelial disorders by DMEK and UT-DSAEK : Indications, complications, results and follow-up]. *Ophthalmologe*, 113(3), 196-203. doi:10.1007/s00347-016-0221-0
- Bachmann, B. O., Laaser, K., Cursiefen, C., & Kruse, F. E. (2010). A method to confirm correct orientation of descemet membrane during descemet membrane endothelial keratoplasty. *Am J Ophthalmol*, 149(6), 922-925.e922. doi:10.1016/j.ajo.2010.01.005
- Balachandran, C., Ham, L., Verschoor, C. A., Ong, T. S., van der Wees, J., & Melles, G. R. (2009). Spontaneous corneal clearance despite graft detachment in descemet membrane endothelial keratoplasty. *Am J Ophthalmol*, 148(2), 227-234.e221. doi:10.1016/j.ajo.2009.02.033
- Barfort, P., & Maurice, D. (1974). Electrical potential and fluid transport across the corneal endothelium. *Exp Eye Res*, 19(1), 11-19.
- Bleyen, I., Saelens, I. E., van Dooren, B. T., & van Rij, G. (2013). Spontaneous corneal clearing after Descemet's stripping. *Ophthalmology*, 120(1), 215. doi:10.1016/j.ophtha.2012.08.037
- Borkar, D. S., Veldman, P., & Colby, K. A. (2016). Treatment of Fuchs Endothelial Dystrophy by Descemet Stripping Without Endothelial Keratoplasty. *Cornea*, 35(10), 1267-1273. doi:10.1097/ico.0000000000000915

Keratoplasty. *Cornea*, 37(2), 137-140.
doi:10.1097/ico.0000000000001427

- DeGregori, J., Leone, G., Miron, A., Jakoi, L., & Nevins, J. R. (1997). Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(14), 7245-7250. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9207076
- Dehennaut, V., Loison, I., Boulay, G., Van Rechem, C., & Leprince, D. (2013). Identification of p21 (CIP1/WAF1) as a direct target gene of HIC1 (Hypermethylated In Cancer 1). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430(1), 49-53. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.11.045>
- DelMonte, D. W., & Kim, T. (2011). Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg*, 37(3), 588-598. doi:10.1016/j.jcrs.2010.12.037
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., . . . et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(20), 9363-9367. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7568133
- Dirisamer, M., Ham, L., Dapena, I., van Dijk, K., & Melles, G. R. (2012). Descemet Membrane Endothelial Transfer: "Free-Floating" Donor Descemet Implantation as a Potential Alternative to "Keratoplasty". *Cornea*, 31(2), 194-197. doi:10.1097/ICO.0b013e31821c9afc
- Droutsas, K., Lazaridis, A., Koutsandrea, C., Chatzistefanou, K. I., Moschos, M. M., & Sekundo, W. (2016). Spontaneous Corneal Clearance in the Presence of a Partially Detached Graft after Non-Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty. *Case reports in ophthalmology*, 7(2), 321-327. doi:10.1159/000443632
- Du, J., Aleff, R. A., Soragni, E., Kalari, K., Nie, J., Tang, X., . . . Wieben, E. D. (2015). RNA toxicity and missplicing in the common eye disease fuchs endothelial corneal dystrophy. *J Biol Chem*, 290(10), 5979-5990. doi:10.1074/jbc.M114.621607
- Eghrari, A. O., Riazuddin, S. A., & Gottsch, J. D. (2015). Fuchs Corneal Dystrophy. *Progress in molecular biology and translational science*, 134, 79-97. Retrieved from <Go to ISI>://MEDLINE:26310151
- Elhalis, H., Azizi, B., & Jurkunas, U. V. (2010). Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. *The ocular surface*, 8(4), 173-184. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3061348/>

- Enomoto, K., Mimura, T., Harris, D. L., & Joyce, N. C. (2006). Age differences in cyclin-dependent kinase inhibitor expression and rb hyperphosphorylation in human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(10), 4330-4340. doi:47/10/4330 [pii]
- 10.1167/iovs.05-1581
- Ewen, M. E., Sluss, H. K., Sherr, C. J., Matsushime, H., Kato, J.-y., & Livingston, D. M. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell*, 73(3), 487-497. doi:10.1016/0092-8674(93)90136-E
- Famulski, K. S., & Halloran, P. F. (2005). Molecular events in kidney ageing. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 14(3), 243-248.
- Farjo, A., McDermott, M. L., & Soong, H. (2009). *Corneal Anatomy, Physiology, and Wound Healing*.
- Flockerzi, E., Maier, P., Böhringer, D., Reinshagen, H., Kruse, F., Cursiefen, C., . . . Seitz, B. (2018). Trends in Corneal Transplantation from 2001 to 2016 in Germany: A Report of the DOG–Section Cornea and its Keratoplasty Registry. *American Journal of Ophthalmology*, 188, 91-98. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ajo.2018.01.018>
- Forest, F., Thuret, G., Gain, P., Dumollard, J. M., Peoc'h, M., Perrache, C., & He, Z. (2015). Optimization of immunostaining on flat-mounted human corneas. *Mol Vis*, 21, 1345-1356.
- Fuchs, E. (1910). Dystrophia epithelialis corneae. *Albr von Græfe's Arch für Ophthalmol*, 76(3), 478–508.
- Galvis, V., Tello, A., Berrospi, R. D., Cuadros, M. O., & Blanco, N. A. (2016). Descemetorhexis Without Endothelial Graft in Fuchs Dystrophy. *Cornea*, 35(9), e26-28. doi:10.1097/ico.0000000000000931
- Gartel, A. L., & Tyner, A. L. (1999). Transcriptional regulation of the p21(WAF1/CIP1) gene. *Exp Cell Res*, 246(2), 280-289. doi:10.1006/excr.1998.4319
- Halevy, O., Novitch, B. G., Spicer, D. B., Skapek, S. X., Rhee, J., Hannon, G. J., . . . Lassar, A. B. (1995). Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science*, 267(5200), 1018. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/267/5200/1018.abstract>
- Hara, E., Yamaguchi, T., Nojima, H., Ide, T., Campisi, J., Okayama, H., & Oda, K. (1994). Id-related genes encoding helix-loop-helix proteins are required for G1 progression and are repressed in senescent human fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 269(3), 2139-2145. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/269/3/2139.abstract>

- Hara, S., Hayashi, R., Soma, T., Kageyama, T., Duncan, T., Tsujikawa, M., & Nishida, K. (2014). Identification and potential application of human corneal endothelial progenitor cells. *Stem Cells Dev*, 23(18), 2190-2201. doi:10.1089/scd.2013.0387
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., & Elledge, S. J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, 75(4), 805-816. doi:0092-8674(93)90499-G [pii]
- Haus, J. (2014). *Optische Mikroskopie*. Weinheim: Wiley-VCH.
- He, Z., Campolmi, N., Gain, P., Ha Thi, B. M., Dumollard, J. M., Duband, S., . . . Thuret, G. (2012). Revisited microanatomy of the corneal endothelial periphery: new evidence for continuous centripetal migration of endothelial cells in humans. *Stem Cells*, 30(11), 2523-2534. doi:10.1002/stem.1212
- He, Z., Campolmi, N., Ha Thi, B. M., Dumollard, J. M., Peoc'h, M., Garraud, O., . . . Thuret, G. (2011). Optimization of immunolocalization of cell cycle proteins in human corneal endothelial cells. *Mol Vis*, 17, 3494-3511.
- Heindl, L. M., Riss, S., Laaser, K., Bachmann, B. O., Kruse, F. E., & Cursiefen, C. (2011). Split cornea transplantation for 2 recipients - review of the first 100 consecutive patients. *Am J Ophthalmol*, 152(4), 523-532 e522. doi:10.1016/j.ajo.2011.03.021
- Heinzelmann, S., Böhringer, D., Eberwein, P., Reinhard, T., & Maier, P. (2016). Outcomes of Descemet membrane endothelial keratoplasty, Descemet stripping automated endothelial keratoplasty and penetrating keratoplasty from a single centre study. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 254(3), 515-522. doi:10.1007/s00417-015-3248-z
- Hoppenreijts, V. P., Pels, E., Vrensen, G. F., Oosting, J., & Treffers, W. F. (1992). Effects of human epidermal growth factor on endothelial wound healing of human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 33(6), 1946-1957.
- Iovieno, A., Neri, A., Soldani, A. M., Adani, C., & Fontana, L. (2017). Descemetorhexis Without Graft Placement for the Treatment of Fuchs Endothelial Dystrophy: Preliminary Results and Review of the Literature. *Cornea*, 36(6), 637-641. doi:10.1097/ico.0000000000001202
- Iwamoto, T., & Devoe, A. G. (1971). Electron Microscopic Studies on Fuchs Combined Dystrophy .1. Posterior Portion of Cornea. *Investigative Ophthalmology*, 10(1), 9-&. Retrieved from <Go to ISI>://A1971I315700002
- Joyce, N. C. (2012). Proliferative capacity of corneal endothelial cells. *Experimental Eye Research*, 95(1), 16-23. doi:10.1016/J.Exer.2011.08.014

- Joyce, N. C., Meklir, B., Joyce, S. J., & Zieske, J. D. (1996). Cell cycle protein expression and proliferative status in human corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37(4), 645-655.
- Joyce, N. C., Navon, S. E., Roy, S., & Zieske, J. D. (1996). Expression of cell cycle-associated proteins in human and rabbit corneal endothelium in situ. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37(8), 1566-1575.
- Joyce, N. C., Zhu, C. C., & Harris, D. L. (2009). Relationship among oxidative stress, DNA damage, and proliferative capacity in human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50(5), 2116-2122. doi:iovs.08-3007 [pii]
- 10.1167/iovs.08-3007
- Jurkunas, U. V., Bitar, M. S., Funaki, T., & Azizi, B. (2010). Evidence of oxidative stress in the pathogenesis of fuchs endothelial corneal dystrophy. *Am J Pathol*, 177(5), 2278-2289. doi:S0002-9440(10)60281-7 [pii]
- 10.2353/ajpath.2010.100279
- Karimian, A., Ahmadi, Y., & Yousefi, B. (2016). Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair (Amst)*, 42, 63-71. doi:10.1016/j.dnarep.2016.04.008
- Katayose, D., Wersto, R., Cowan, K. H., & Seth, P. (1995). Effects of a recombinant adenovirus expressing WAF1/Cip1 on cell growth, cell cycle, and apoptosis. *Cell Growth Differ*, 6(10), 1207-1212.
- Kato, J.-y. (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes & Development*, 7(3), 331-342. Retrieved from <http://genesdev.cshlp.org/content/7/3/331.short>
- Koenig, S. B. (2013). Long-term corneal clarity after spontaneous repair of an iatrogenic descemetorhexis in a patient with Fuchs dystrophy. *Cornea*, 32(6), 886-888. doi:10.1097/ICO.0b013e3182886aaa
- Koenig, S. B. (2015). Planned Descemetorhexis Without Endothelial Keratoplasty in Eyes With Fuchs Corneal Endothelial Dystrophy. *Cornea*, 34(9), 1149-1151. doi:10.1097/ico.0000000000000531
- Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M. R., Kovalev, G. I., Al-Regaiey, K., Su, L., & Sharpless, N. E. (2004). Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest*, 114(9), 1299-1307. doi:10.1172/JCI22475
- Kruse, F. E., Laaser, K., Cursiefen, C., Heindl, L. M., Schlotzer-Schrehardt, U., Riss, S., & Bachmann, B. O. (2011). A stepwise approach to donor preparation and insertion increases safety and outcome of Descemet

- membrane endothelial keratoplasty. *Cornea*, 30(5), 580-587. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21598430>
- Kwon, J. Y., Jo, Y. S., Choi, Y. H., Chang, J. G., Ryu, K. S., Rha, J. G., & Han, K. T. (2003). Detection of p16(INK4A) in the Mixed Cell Populations of Normal Peripheral Blood Mononuclear Cells and Cervical Cancer Cell Lines. *Cancer Res Treat*, 35(3), 254-260. doi:10.4143/crt.2003.35.3.254
- LaBaer, J., Garrett, M. D., Stevenson, L. F., Slingerland, J. M., Sandhu, C., Chou, H. S., . . . Harlow, E. (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev*, 11(7), 847-862.
- Laing, R. A., Sanstrom, M. M., Berrospi, A. R., & Leibowitz, H. M. (1976). Changes in the corneal endothelium as a function of age. *Exp Eye Res*, 22(6), 587-594.
- Lam, F. C., Bruinsma, M., & Melles, G. R. (2014). Descemet membrane endothelial transfer. *Curr Opin Ophthalmol*, 25(4), 353-357. doi:10.1097/icu.0000000000000061
- Lang, S. J., Bischoff, M., Böhringer, D., Seitz, B., & Reinhard, T. (2014). Analysis of the changes in keratoplasty indications and preferred techniques. *PloS one*, 9(11), e112696-e112696. doi:10.1371/journal.pone.0112696
- Lee, M. H., Reynisdóttir, I., & Massagué, J. (1995). Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes & Development*, 9(6), 639-649. Retrieved from <http://genesdev.cshlp.org/content/9/6/639.abstract>
- Lees, E. (1995). Cyclin dependent kinase regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 7(6), 773-780. doi:[https://doi.org/10.1016/0955-0674\(95\)80060-3](https://doi.org/10.1016/0955-0674(95)80060-3)
- Lukas, J., Petersen, B. O., Holm, K., Bartek, J., & Helin, K. (1996). Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression. *Molecular and Cellular Biology*, 16(3), 1047-1057. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC231087/>
- Luttmann, W. B., K.; Küpper, M.; Myrtek, D. (2014). *Der Experimentator: Immunologie* (309 Ed. 4. Auflage ed.). Heidelberg: Springer Spektrum.
- Martin, C. M., & O'Leary, J. J. (2011). Histology of cervical intraepithelial neoplasia and the role of biomarkers. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 25(5), 605-615. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2011.04.005>
- Matsubara, M., & Tanishima, T. (1983). Wound-healing of corneal endothelium in monkey: an autoradiographic study. *Jpn J Ophthalmol*, 27(3), 444-450.

- Matthaei, M., Bachmann, B., Siebelmann, S., & Cursiefen, C. (2018). Technik der „Descemet membrane endothelial keratoplasty“ (DMEK). *Der Ophthalmologe*, 115(9), 778-784. doi:10.1007/s00347-018-0743-8
- Matthaei, M., Lackner, E. M., Meng, H., Hicks, J. L., Meeker, A. K., Eberhart, C. G., & Jun, A. S. (2013). Tissue Microarray Analysis of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors p21 and p16 in Fuchs Dystrophy. *Cornea*, 32(4), 473-478. doi:10.1097/ICO.0b013e31826f324e
- Matthaei, M., Zhu, A. Y., Kallay, L., Eberhart, C. G., Cursiefen, C., & Jun, A. S. (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
- Maurice, D. M. (1970). The transparency of the corneal stroma. *Vision Res*, 10(1), 107-108.
- Maurice, D. M. (1972). The location of the fluid pump in the cornea. *The Journal of Physiology*, 221(1), 43-54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1331318/>
- McConnell, B. B., Starborg, M., Brookes, S., & Peters, G. Inhibitors of cyclin-dependent kinases induce features of replicative senescence in early passage human diploid fibroblasts. *Current Biology*, 8(6), 351-354. doi:10.1016/S0960-9822(98)70137-X
- McGowan, S. L., Edelhauser, H. F., Pfister, R. R., & Whitehart, D. R. (2007). Stem cell markers in the human posterior limbus and corneal endothelium of unwounded and wounded corneas. *Mol Vis*, 13, 1984-2000.
- Melles, G. R., Ong, T. S., Ververs, B., & van der Wees, J. (2006). Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK). *Cornea*, 25(8), 987-990. doi:10.1097/01.ico.0000248385.16896.34
- Melles, G. R., Wijdh, R. H., & Nieuwendaal, C. P. (2004). A technique to excise the descemet membrane from a recipient cornea (descemetorhexis). *Cornea*, 23(3), 286-288. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15084862>
- Meyerholz, D. K., & Beck, A. P. (2018). Fundamental Concepts for Semiquantitative Tissue Scoring in Translational Research. *Ilar j*, 59(1), 13-17. doi:10.1093/ilar/ily025
- Mimura, T., & Joyce, N. C. (2006). Replication competence and senescence in central and peripheral human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(4), 1387-1396. doi:47/4/1387 [pii]
- 10.1167/iovs.05-1199

- Moloney, G., Chan, U. T., Hamilton, A., Zahidin, A. M., Grigg, J. R., & Devasahayam, R. N. (2015). Descemetorhexis for Fuchs' dystrophy. *Can J Ophthalmol*, 50(1), 68-72. doi:10.1016/j.jcjo.2014.10.014
- Mootha, V. V., Gong, X., Ku, H. C., & 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(1), 33-42. doi:10.1167/iovs.13-12611
- Mootha, V. V., Hussain, I., Cunnusamy, K., Graham, E., Gong, X., Neelam, S., . . . Petroll, W. M. (2015). TCF4 Triplet Repeat Expansion and Nuclear RNA Foci in Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 56(3), 2003-2011. doi:10.1167/iovs.14-16222
- Murphy, C., Alvarado, J., Juster, R., & Maglio, M. (1984). Prenatal and postnatal cellularity of the human corneal endothelium. A quantitative histologic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 25(3), 312-322.
- Murphy, N., Ring, M., Killalea, A. G., Uhlmann, V., O'Donovan, M., Mulcahy, F., . . . O'Leary, J. J. (2003). p16INK4A as a marker for cervical dysplasia: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. *J Clin Pathol*, 56(1), 56-63.
- Niculescu, A. B., 3rd, Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C., & Reed, S. I. (1998). Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol*, 18(1), 629-643.
- Noda, A., Ning, Y., Venable, S. F., Pereira-Smith, O. M., & Smith, J. R. (1994). Cloning of Senescent Cell-Derived Inhibitors of DNA Synthesis Using an Expression Screen. *Experimental Cell Research*, 211(1), 90-98. doi:<https://doi.org/10.1006/excr.1994.1063>
- Olympus Corporation, S., Tokio, Japan. (2013). Cellsens™ Version 1.18 Retrieved from <https://www.olympus-lifescience.com/de/support/downloads/#!/dlOpen=%2Fde%2Fdownloads%2Fdetail-iframe%2F%3F0%5Bdownloads%5D%5Bid%5D%3D847251321>
- Ostrowska, K. M., Garcia, A., Meade, A. D., Malkin, A., Okewumi, I., O'Leary, J. J., . . . Lyng, F. M. (2011). Correlation of p16(INK4A) expression and HPV copy number with cellular FTIR spectroscopic signatures of cervical cancer cells. *Analyst*, 136(7), 1365-1373. doi:10.1039/c0an00910e
- Parker, S. B., Eichele, G., Zhang, P., Rawls, A., Sands, A. T., Bradley, A., . . . Elledge, S. J. (1995). p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science*, 267(5200), 1024. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/267/5200/1024.abstract>

- Patel, L., Deng, Z., Zhu, Z., Lequio, M., Hough, J., Xiao, H., . . . Fang, Y. (2023). Olive: A Potential Suppressor for Cervical Cancer by Upregulation of P21. *Cureus*, 15(5), e38719. doi:10.7759/cureus.38719
- Polyak, K., Lee, M. H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J. M., Tempst, P., & Massague, J. (1994). Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell*, 78(1), 59-66.
- Rayess, H., Srivatsan E. S., Wang, M. B. (2012). Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *130*(8), 1715-1725. doi:10.1002/ijc.27316
- Riazuddin, S. A., Parker, D. S., McGlumphy, E. J., Oh, E. C., Iliff, B. W., Schmedt, T., . . . Gottsch, J. D. (2012). Mutations in LOXHD1, a recessive-deafness locus, cause dominant late-onset Fuchs corneal dystrophy. *Am J Hum Genet*, 90(3), 533-539. doi:S0002-9297(12)00047-X [pii]
- 10.1016/j.ajhg.2012.01.013
- Riazuddin, S. A., Vithana, E. N., Seet, L. F., Liu, Y., Al-Saif, A., Koh, L. W., . . . Katsanis, N. (2010). Missense mutations in the sodium borate cotransporter SLC4A11 cause late-onset Fuchs corneal dystrophy. *Hum Mutat*, 31(11), 1261-1268. doi:10.1002/humu.21356
- Riazuddin, S. A., Zaghoul, N. A., Al-Saif, A., Davey, L., Diplas, B. H., Meadows, D. N., . . . 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(1), 45-53. doi:S0002-9297(09)00562-X [pii]
- 10.1016/j.ajhg.2009.12.001
- Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T., & Eliceiri, K. W. (2017). ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*, 18(1), 529. doi:10.1186/s12859-017-1934-z
- Rufer, F., Schroder, A., & Erb, C. (2005). White-to-white corneal diameter: normal values in healthy humans obtained with the Orbscan II topography system. *Cornea*, 24(3), 259-261.
- Satue Palacian, M., Sanchez Perez, A., Idoipe Corta, M., Brito Suarez, C., Pablo Julvez, L. E., & Garcia Martin, E. (2014). [Descemetorhexis and corneal clearing: a new perspective on the treatment of endothelial diseases]. *Arch Soc Esp Oftalmol*, 89(1), 1-3. doi:10.1016/j.ofal.2013.09.009
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., . . . Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9(7), 676-682. doi:10.1038/nmeth.2019

- Senoo, T., & Joyce, N. C. (2000). Cell cycle kinetics in corneal endothelium from old and young donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(3), 660-667.
- Shah, R. D., Randleman, J. B., & Grossniklaus, H. E. (2012). Spontaneous corneal clearing after Descemet's stripping without endothelial replacement. *Ophthalmology*, 119(2), 256-260. doi:10.1016/j.ophtha.2011.07.032
- Sharpless, N. E. (2004). Ink4a/Arf links senescence and aging. *Exp Gerontol*, 39(11-12), 1751-1759. doi:10.1016/j.exger.2004.06.025
- Sherr, C. J. (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell*, 73(6), 1059-1065. doi:10.1016/0092-8674(93)90636-5
- Sherr, C. J., & McCormick, F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, 2(2), 103-112. doi:10.1016/S1535-6108(02)00102-2
- Sherr, C. J., & Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development*, 13(12), 1501-1512. Retrieved from <http://genesdev.cshlp.org/content/13/12/1501.short>
- 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. *JAMA Ophthalmol*, 133(12), 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. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 59(5), 1888-1896. doi:10.1167/iovs.17-23265
- Srivastava, V. K., Singh, A., & Chowdhary, R. (2010). Spontaneous Resolution of Corneal Oedema after Inadvertent Descemetorhexis during Cataract Surgery. *Medical journal, Armed Forces India*, 66(2), 177-179. doi:10.1016/S0377-1237(10)80142-X
- Tuft, S. J., & Coster, D. J. (1990). The corneal endothelium. *Eye (Lond)*, 4 (Pt 3), 389-424. doi:10.1038/eye.1990.53
- Vedana, G., Villarreal, G., & Jun, A. S. (2016). Fuchs endothelial corneal dystrophy: current perspectives. *Clinical Ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, 10, 321-330. doi:10.2147/OPTH.S83467
- Waring, G. O., 3rd, Rodrigues, M. M., & Laibson, P. R. (1978). Corneal dystrophies. II. Endothelial dystrophies. *Surv Ophthalmol*, 23(3), 147-168. doi:0039-6257(78)90151-0 [pii]
- Waring, G. R., MM; Laibson, PR. (1984). Corneal dystrophies. *Leibowitz editor;(Corneal disorders)*.

- Watson, S. L., Abiad, G., & Coroneo, M. T. (2006). Spontaneous resolution of corneal oedema following Descemet's detachment. *Clin Exp Ophthalmol*, 34(8), 797-799. doi:10.1111/j.1442-9071.2006.01319.x
- Weisenthal, R. S., BW. (1997). Posterior membrane dystrophies. *Krachmer, JH; Mannis, MH; Holland, EJ, editors. Cornea Volume II: Cornea and External Disease, Clinical Diagnosis and Management, St. Louis, MO: Mosby-Yearbook.*
- Wieben, E. D., Aleff, R. A., Tang, X., Butz, M. L., Kalari, K. R., Highsmith, E. W., . . . Fautsch, M. P. (2017). Trinucleotide Repeat Expansion in the Transcription Factor 4 (TCF4) Gene Leads to Widespread mRNA Splicing Changes in Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 58(1), 343-352. doi:10.1167/iov.16-20900
- 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. *PLoS One*, 7(11), e49083. doi:10.1371/journal.pone.0049083
- Yee, R. W., Matsuda, M., Schultz, R. O., & Edelhauser, H. F. (1985). Changes in the Normal Corneal Endothelial Cellular-Pattern as a Function of Age. *Current Eye Research*, 4(6), 671-678. doi:10.3109/02713688509017661
- Zafirakis, P., Kymionis, G. D., Grentzelos, M. A., & Livir-Rallatos, G. (2010). Corneal graft detachment without corneal edema after descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea*, 29(4), 456-458. doi:10.1097/ICO.0b013e3181b46bc2
- Zhao, F., Zhang, J. B., Cai, T. J., Liu, X. Q., Liu, M. C., Ke, T., . . . Luo, W. J. (2012). Manganese induces p21 expression in PC12 cells at the transcriptional level. *Neuroscience*, 215, 184-195. doi:<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.04.027>
- Zhou, B. P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M. H., & Hung, M. C. (2001). Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol*, 3(3), 245-252. doi:10.1038/35060032
- Ziaei, M., Barsam, A., & Mearza, A. A. (2013). Spontaneous corneal clearance despite graft removal in Descemet stripping endothelial keratoplasty in Fuchs endothelial dystrophy. *Cornea*, 32(7), e164-166. doi:10.1097/ICO.0b013e31828b75a1
- Zindy, F., Quelle, D. E., Roussel, M. F., & Sherr, C. J. (1997). Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during

mouse development and aging. *Oncogene*, 15, 203.
doi:10.1038/sj.onc.1201178

Zirm, E. (1906). Eine erfolgreiche totale Keratoplastik. *Albr von Græfe's Arch für Ophthalmol*, 54, 580-593.