

**Untersuchungen zur Kristallinverteilung in fetalen humanen Linsen
mittels hochauflösender 2D-Gelelektrophorese und
software-gestützter Bildanalyse**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

vorgelegt von
Sebastian Rafael Eduard Adrian Briesen
aus Hannover

2006

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Winrich Breipohl
2. Gutachter: Prof. Dr. B. Schmitz

Tag der mündlichen Prüfung: 22.5. 2006

Abteilung für Experimentelle Ophthalmologie,
Zentrum für Augenheilkunde
Medizinische Einrichtungen der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. med. Winrich Breipohl

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

Meinen Eltern in Liebe gewidmet
Carmen Briesen, geborene Sandino Castillo und
Dr. med. Dietmar P. Briesen

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Problemstellung	6
1.2	Ziel.....	7
1.3	Entwicklung, Struktur und Funktion der Augenlinse.....	8
1.4	Die Proteine der Augenlinse	10
1.4.1	Wasserunlösliche Proteine.....	11
1.4.2	Kristalline: Strukturproteine der Augenlinse	11
1.5	Quantitative und qualitative Veränderungen der Kristalline mit dem Alter	14
2	Methoden	15
2.1	Überblick über die angewandten Methoden.....	15
2.1.1	Elektrophorese.....	15
2.1.2	Polyacrylamid- Gelelektrophorese (PAGE).....	15
2.1.3	Prinzip der Isoelektrofokussierung.....	17
2.1.4	SDS-PAGE.....	18
2.1.5	Hochauflösende 2D-Elektrophorese	19
2.2	Versuchsdurchführung, Material und Methoden.....	20
2.2.1	Einteilung und Aufarbeitung der fetalen humanen Linsen	20
2.2.2	Topographische Teilung der senilen Linse	21
2.2.3	Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	22
2.2.4	2D-PAGE	25
2.3	Software-gestützte Auswertung mit dem „Melanie“-Programm.....	29
2.3.1	Auswertung der 2D-Elektrophorese-Gele	29
3	Ergebnisse	33
3.1	Fetale Proben	33
3.1.1	Korrelation der Gele untereinander	33
3.1.2	Quantitative Auswertung.....	37
3.1.3	Histographische Darstellung.....	40
3.2	Senile Linse	42
3.2.1	Darstellung der Schnitte 1-7.....	42
3.2.2	Korrelation der einzelnen Schnitte untereinander.....	45
3.2.3	Quantitative Auswertung.....	47
3.3	Vergleich.....	50
3.3.1	Projektion zweier 2D-PAGE-Gele von fetaler und seniler Linse.....	51
3.3.2	3-Dimensionale Darstellung.....	51
3.3.3	Quantitative Auswertung.....	53
4	Diskussion	56
4.1	Die fetale Linse	56
4.2	Aussagekraft und Vergleichbarkeit der ermittelten Kristallinverteilungen:.....	58
4.3	Vergleich der Proteinverteilung von fetaler und seniler Linse.....	59
4.3.1	Die Rindenregionen	60
4.3.2	Die Kernregionen.....	62
5	Zusammenfassung	63
6	Abkürzungsverzeichnis	65
7	Literaturverzeichnis	66
8	Danksagung	77

1 Einleitung

1.1 Problemstellung

Die Trübung der Augenlinse (Katarakt) führt zum allmählichen Abbau des normalen Sehvermögens. Weltweit ist sie die häufigste Ursache für Erblindung (Bull. WHO, Resnikoff et al. 2004). Über die genaue Pathogenese dieser Trübung der Augenlinse bestehen noch viele Unklarheiten, doch sind zahlreiche kataraktinduzierende Einflüsse bekannt. Bestimmte Medikamente (z. B. Kortikosteroide), UV-Strahlen, Röntgenstrahlen, Sauerstoffradikale oder aber auch systemische Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder erhöhte Blutserumwerte an Triglyzeriden können kataraktinduzierend wirken (Jedniziak et al. 1987). Allgemein nimmt man heute für die Mehrzahl der Katarakte eine multifaktorielle Genese an. Verschiedene Noxen führen zu Veränderungen in Struktur und Proteinverteilung der Linse, jedoch bewirkt in der Regel erst die Summation mehrerer unterschwelliger Reize letztendlich eine Katarakt (Varma et al. 1991).

Die Augenlinse besteht zu über 30% aus Proteinen, den sogenannten Linsenkrystallinen. Die optischen Eigenschaften der Augenlinse werden durch den physikalisch-chemischen Zustand dieser Kristalline bestimmt.

Während des Alterungsprozesses unterliegen sie einem ständigem oxidativem Stress und es kommt zu irreversiblen Modifikationen. Die Linsenkrystalline erfahren dabei ausgeprägte posttranslationale Veränderungen. Wasserlösliche Proteine aggregieren zu wasserunlöslichen Proteinaggregaten (Bloemendal et al. 1981). Je mehr Aggregate dieser Art sich bilden, desto mehr nimmt die Lichtstreuung der Linse zu und die Transparenz nimmt ab.

Besonders ein Protein der Augenlinse, das sogenannte alpha-Kristallin, spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Katarakten (Horwitz et al. 1992). Es scheint als molekulares Chaperon zu fungieren, das teilweise denaturierte Kristalline vom Typ beta und gamma zu binden vermag. Sie werden so vor einer weiteren Denaturierung geschützt und die Bildung von unlöslichen Aggregaten wird verhindert.

Der Anteil des alpha, beta und gamma-Kristallins am wasserlöslichen Gesamtlinsenprotein verändert sich im Laufe des Alterungsprozesses. Sowohl die β - als auch die γ -Kristalline werden mit zunehmendem Alter stetig und kontinuierlich in einen wasserunlöslichen α -Kristallin-Großkomplex eingebaut (Chaudhuri, 1998). In der fetalen Linse befinden sich die Kristalline in unmodifizierter Form. Zunehmend jedoch bilden sich hochmolekulare Proteinkomplexe, die posttranslational verändert wurden und in Masse und Struktur von den ursprünglichen abweichen.

1.2 Ziel

Katarakte kommen bei Neugeborenen und Kindern nur selten vor. Die Inzidenz einer Katarakt bei Neugeborenen bis zur Vollendung des 17ten Lebensjahrs variiert je nach Studie zwischen 12 und 136 Fällen pro 100.000 Kindern (Stewart-Brown et al. 1988, Stoll et al. 1992, Haargaard et al. 2004). Erst ab einem Alter von 55 Jahren steigt das Risiko signifikant an, an einer Katarakt zu erkranken (Vassileva und Jankova-Parvova, 1989). McCarty und Mitarbeiter geben in einer australischen Studie an, dass das Risiko für eine Katarakt an mindestens einem Auge kontinuierlich von ca. 7% in der Gruppe der 40-49jährigen bis auf über 70% in der Gruppe der über 80jährigen ansteigt (McCarty et al. 2003).

Die Therapie der Katarakt besteht in der operativen Entfernung der Linse und der anschließenden Implantation einer Kunstlinse. Eine medikamentöse Therapie gibt es bisher nicht. Dennoch ist die Kenntnis von der exakten Beschaffenheit der Linse von besonderem Interesse, da die Linse allgemein als ein hervorragendes Modell für die Proteinalterung gilt. Das lebenslange appositionelle Wachstum und die Tatsache, dass die linsenspezifischen Proteine keinem proteolytischen Abbau unterliegen, zeichnen die Augenlinse als ein ideales Modell zur Erforschung von altersabhängigen Protein-Protein Interaktionen aus (Ahrend 1987). In den letzten zehn Jahren sind verschiedene Untersuchungen mittels hochauflösender 2D-Gelelektrophorese durchgeführt worden, die zum Ziel hatten, genauere Aussagen über die Struktur der fetalen Linse zu treffen. Dabei ging es insbesondere auch um die Erstellung einer Landkarte der Kristalline und um Aussagen über die quantitative Verteilung des alpha, beta und gamma-Kristallins. (Bloemendal et al. 1997). Die 2D-Gel-Elektrophorese erwies sich hierbei als eine sehr genaue und zuverlässige analytische Methode (Trifonova et al. 2002).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mit Hilfe dieser Methode die bisher gewonnenen Aussagen über die Kristalline und deren Verteilung in der menschlichen fetalen Linse zu präzisieren. Hierzu wurden uns vom pharmazeutischen Institut in Sofia 14 Linsen überlassen. Die verwendeten Linsen zeigten keine Katarakt, sie stammten von Föten, die abgetrieben wurden oder kurz nach der Geburt verstarben.

Es soll eine quantitative Auswertung der fötalen Kristallinverteilung erfolgen. Hierzu wurden standardisierte 2D-Elektrophorese-Gels angefertigt und mit Hilfe der Bildanalyse-Software „Melanie“ ausgewertet. Die Arbeit soll Ausgangsbasis zu folgenden Untersuchungen zum Altern der Linse und zur Entstehung der Katarakt sein.

In einer zusätzlichen Untersuchung wurden daher 2D-SDS-Gele einer senilen Linse erstellt und diese mit den Ergebnissen der fetalen Linsen verglichen. Die senile Linse wurde mit einem am Institut für Experimenteller Ophthalmologie entwickeltem Verfahren in 7 Schnitte unterteilt. Es wurden sowohl ein Vergleich innerhalb der einzelnen Schnitte (intraspezifischer Vergleich) als auch ein Vergleich der Schnitte zu den fetalen Proben durchgeführt (interspezifischer Vergleich).

1.3 Entwicklung, Struktur und Funktion der Augenlinse

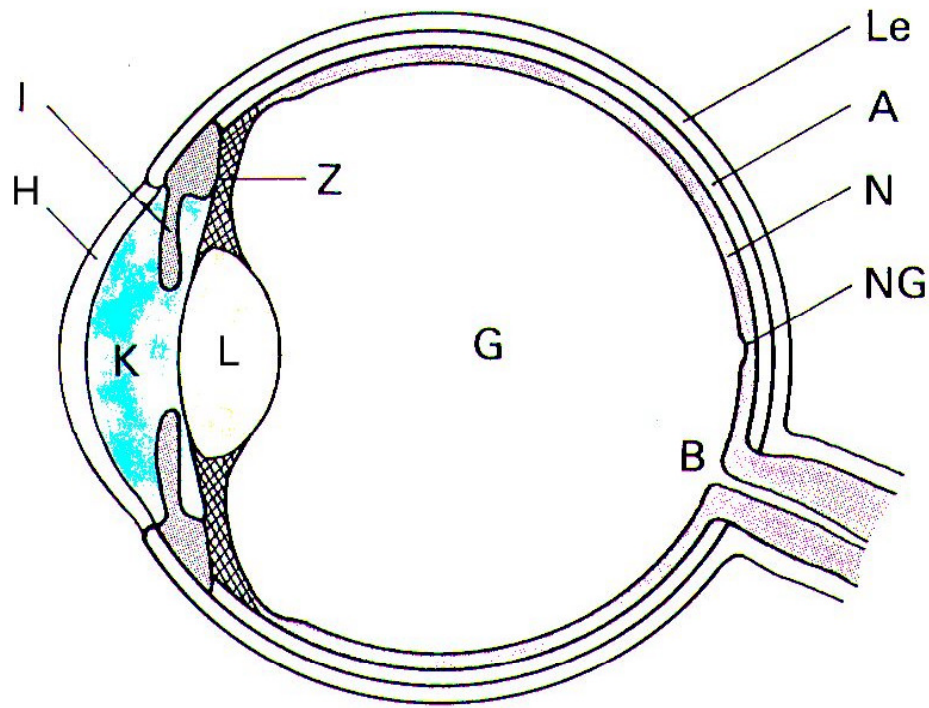


Abb. 1

Horizontalschnitt durch das menschliche Auge (Schmidt und Thews, 1985). Die **Hornhaut** H bildet die erste brechende Fläche; dahinter befindet sich das **Kammerwasser** K. Die Öffnung zur **Linse** L ist variabel (Pupillengröße) und begrenzt durch die **Iris** I. Die Linse ändert ihre Krümmung (Akkommodation), je nach Spannung der **Ziliarmuskulatur** Z. Hinter der Linse befindet sich der **Glaskörper** G. Die Sinneszellen (Zapfen, Stäbchen) sind in der **Netzhaut** N angeordnet. Den Außenkörper vom Auge bilden die **Lederhaut** Le und die **Aderhaut** A. Der Ausgang der Sehnerven befindet sich am 'blinden Fleck' B, die größte Dichte der Zapfen in der **Netzhautgruppe** NG (fovea), wo ein Bild am schärfsten wahrgenommen wird.

Die Vertebratenlinse ist neben Cornea, Kammerwasser und Glaskörper ein wichtiger Teil des optischen Apparates des Auges (Abb. 1). Sie stellt ein morphologisch und biochemisch hochgradig spezialisiertes Organ dar. Die Linse entsteht aus einer scheibenförmigen Verdickung des embryonalen Oberflächenektoderms, der Linsenplakode. Diese wölbt sich ein und schnürt sich zu einem Vesikel ab, von dessen hinteren Pol die Epithelzellen in das Vesikel hinein elongieren und zu primären Linsenfaserzellen ausdifferenzieren, die später den innersten Linsenkern bilden (Smelser 1965).

Die Zellen des vorderen Linsenpols bleiben als einschichtiges Linsenepithel erhalten, welches im adulten Organismus in der zentralen Zone nur geringe Teilungsraten aufweist, während nahe des Linsenäquators ein Bereich mit relativ hoher mitotischer Aktivität zu finden ist. Aus dieser geminativen Zone differenzieren sich sekundäre Linsenfaserzellen, die zum Äquator hin elongieren und sich den älteren Zellen im Kern zwiebelschalenförmig auflagern (Abb. 2). Ihre geometrische Anordnung ist ein entscheidender Faktor für das Refraktionsvermögen der Linse. Aus diesem appositionellen Wachstum ergibt sich eine altersabhängige Zunahme des Linsengewichts und -volumens, da alle einmal gebildeten Linsenfaserzellen zeitlebens erhalten bleiben.

Wegen zunehmender Packungsdichte im Kern, Proteinaggregation und Verschiebung des Phasengleichgewichtes Wasser/Protein zu höheren Proteinkonzentrationen hin erfolgen Gewichts- und Volumenzunahme nicht parallel. Das spezifische Gewicht der Linse steigt mit dem Alter (Hockwin et al. 1983).

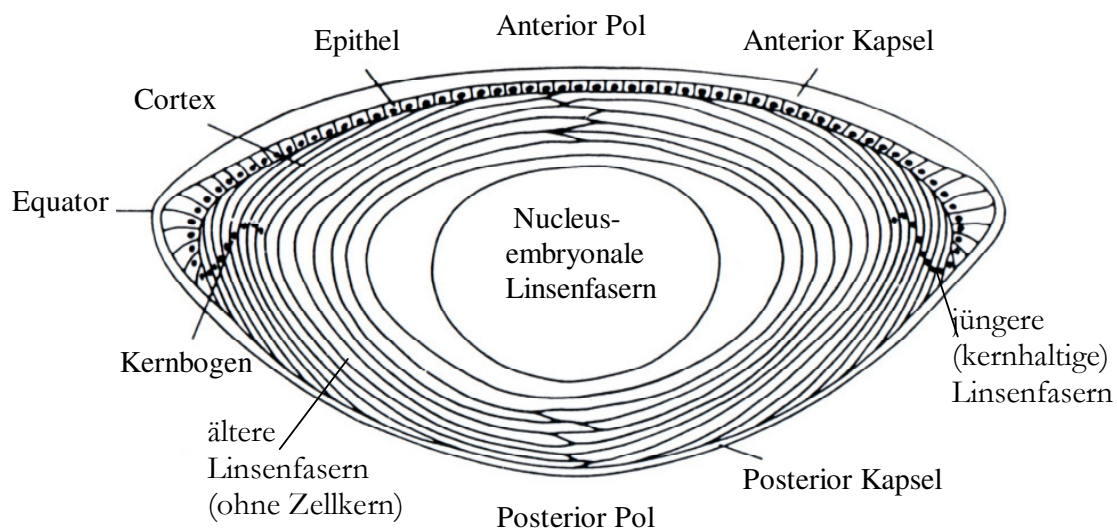


Abb. 2: Differenzierung der Epithelzellen zu Linsenfaserzellen (Arbeitsschema aus dem Institut für Exp. Ophthalmologie, Bonn)

Mit der Differenzierung der Epithel- zu Faserzellen geht ein Verlust der Zellkerne und Zellorganellen einher (Kuwabara und Imaizumi, 1975). Demzufolge verliert die ältere Faserzelle ihre Fähigkeit zur DNA-Transkription und Replikation. Allein bei den äußeren, das heißt jüngeren Faserzellen wurde eine sehr langlebige mRNA nachgewiesen, die diesen Zellen die Synthese spezifischer Strukturproteine, der Linsenkrystalline, ermöglicht. Im vollentwickelten Auge liegt die Linse als elastischer, transparenter Körper von ellipsoider, bikonvexer Form mit hoher optischer Brechkraft im vorderen Augenabschnitt. Sie stellt ein „autonomes“ Organ dar, da sie keine Verbindungen zum Gefäß- und Nervensystem besitzt.

Die Versorgung erfolgt durch Diffusion und aktiven Membrantransport aus dem Kammerwasser (Bloemendal, 1977; 1981). Die sie umhüllende Linsenkapsel besteht zu 70-80% aus Kollagen (Harding und Dilley, 1976). Ihre Funktion besteht in der elastischen Verformung der Linse, der Akkommodation. Über den Zug der Zonulafasern, die die Kapsel mit dem ringförmigen Ciliarmuskel verbinden, wird die Spannung der Linsenkapsel verändert, die so zu einer Abflachung bzw. Abkuglung der Linse und damit zur Veränderung der Brennweite führt. Darüber hinaus bietet die Kapsel der Linse mechanischen Schutz und aufgrund ihrer semipermeablen Eigenschaften ist sie ein Regulator des Stoffaustausches mit dem Kammerwasser.

1.4 Die Proteine der Augenlinse

Der Proteingehalt der Linse beträgt etwa 35% des Linsenfrischgewichtes. Sie ist damit das eiweißreichste Organ der Vertebraten (Hockwin, 1983). Die noch heute übliche grundlegende Klassifikation der Linsenproteine geht auf Arbeiten von Mörner (1894) zurück, der bei Rinderlinsen zwischen einem 10%-igen Anteil wasserunlöslichen sogenannten Albuminoids und einem Anteil von 90% an wasserlöslichen globulären Proteinen, den Kristallinen, unterschied, welche er anhand ihres Löslichkeitsverhaltens weiter in alpha-, beta- und gamma-Kristalline unterteilte.

Genauere analytische Methoden erlauben heute eine wesentlich breiter gefächerte Charakterisierung der Kristalline bezüglich ihrer chemischen und immunologischen Merkmale (Bours 1975; Rink et al. 1982; Lampi et al. 1997).

1.4.1 Wasserunlösliche Proteine

Der von Mörner als Albuminoid bezeichnete wasserunlösliche Proteinanteil der Linse, läßt sich in hohen Harnstoffkonzentrationen (6-8 mol/l) weiter in harnstofflösliche und harnstoffunlösliche Proteine differenzieren (Bloemendal, 1981).

Im harnstofflöslichen Teil findet man dabei überwiegend hochmolekulare Kristalline und Cytoskeletproteine, wobei insbesondere Actin erwähnenswert erscheint, da es möglicherweise eine Funktion bei der Akkommodation der Linse ausübt (Kibbelaar et al. 1980). Der Anteil unlöslicher Kristalline nimmt in den älteren Regionen der Linse stark zu. Er weist bei humanen und bovinen Linsen bezüglich der Aminosäurezusammensetzung und des immunologischen Verhaltens weitgehende Homologie mit den wasserlöslichen α -Kristallinen auf. In geringem Maße sind auch β - und γ -Kristalline vorhanden (Ruttenberg 1965; Chaudhuri 1998).

Der harnstoffunlösliche Teil setzt sich vorwiegend aus Membranproteinen zusammen (Bloemendal 1981). Das Main Intrinsic Polypeptide (MIP) mit einem Molekulargewicht von 26 kD, ein Teil der faserzellspezifischen gap junctions, ist dabei von herausragender Bedeutung, da es in mitotisch aktiven Linsenepithelzellen nicht vorkommt und damit ein geeignetes Markermolekül zur Untersuchung der Zelldifferenzierung darstellt (Rink 1982).

1.4.2 Kristalline: Strukturproteine der Augenlinse

Neben der Linsenform und der regelmäßigen Anordnung der Faserzellen sind Struktur, Konzentration und Löslichkeit der Kristallinmoleküle im Cytosol von entscheidender Bedeutung für Transparenz und Brechungsindex der Linse.

Wechselwirkungen zwischen den sphärisch angeordneten wasserlöslichen Kristallinen führen bei den hohen vorliegenden Proteinkonzentrationen zu einem solähnlichen, flüssigen Aggregatzustand mit vom Kern zum Cortex hin abnehmender Viskosität.

1.4.2.1 α -Kristalline

Die α -Kristalline sind eine heterogene Population von aggregierten Polypeptiden, die etwa ein Drittel des Linsenproteingehaltes ausmacht. Das durchschnittliche Molekulargewicht wird mit 850 kD angegeben (Harding und Dilley 1976; Bloemendal 1981).

α -Kristalline bestehen aus vier unterschiedlichen monomeren Untereinheiten, $\alpha A1$, $\alpha A2$, $\alpha B1$, $\alpha B2$ (MG zw. 19.500 und 22.500 Dalton), welche von nur zwei Genen, denen für $\alpha A2$ und $\alpha B2$, kodiert werden. Diese weisen untereinander eine Sequenzhomologie von 56% auf, die auf eine Genduplikation im Zuge der Evolution zurückgeführt wird (van der Ouderaa et al. 1973, 1974). $\alpha A1$ und $\alpha B1$ werden als Modifikationen der primären Genprodukte durch posttranslationale Deamidierung aufgefaßt (Palmer und Papaconstantinou 1968; Bloemendal et al. 1977; Delcour et Bouchet 1978; Piatigorsky 1984; Lubsen et al. 1988;). Die isoelektrischen Punkte der nativen polymeren α -Aggregate liegen unterhalb von pH 4.85 (Bours 1975, Lampi 1997).

Eine Sonderstellung nimmt das von Bours und Brahma (1973) beschriebene prä- α -Kristallin ein. Sein Molekulargewicht beträgt nur 43 kD, sein IEP liegt im Grenzbereich zwischen α - und β -Kristallinen. α -Kristalline lassen sich dank ihrer Besonderheiten - hohes Molekulargewicht, niedriger isoelektrischer Punkt und leichte Präzipitierbarkeit - relativ einfach von den anderen Linsenkristallinen abtrennen. Der Ertrag einer Präparation ist aufgrund des hohen Anteils dieser Kristallinklasse am Gesamtprotein der Linse im allgemeinen zufriedenstellend. Durch Lösen in Harnstoff (7 mol/l) erhält man die Untereinheiten der verschiedenen α -Kristallin-Aggregate (Bloemendal 1981).

Horwitz machte 1992 die Beobachtung, dass α -Kristallin als molekularer Chaperon fungieren kann und somit die Aggregation und Denaturierung anderer Polypeptide verhindert.

Die Chaperone sind eine Familie von Proteinen, die bei der oligomerischen Zusammensetzung von Proteinen, Translokation von Proteinen sowie Stabilisierung von nativen Proteininformationen vermitteln.

α -Kristallin zeigt eine 40%ige Sequenzähnlichkeit mit dem als Chaperon fungierenden „small heat-shock proteins“, dem hsp 27 (Ingolia und Craig 1982; Lindquist und Craig 1988; Bours 1996).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass das α -Kristallin in seiner protektiven Rolle bevorzugt auf teil-denaturierte β - und γ -Kristalline wirkt (Boyle 1994; Chaudhuri et al. 1998). Dieser Mechanismus stellt eine Stabilisierung für die sonst im Alterungsprozess unlöslich werdenden Kristalline dar, die zur Kataraktogenese beitragen.

1.4.2.2 β -Kristalline

Untersuchungen an β -Kristallinen führten zu einer Vielfalt von biochemisch charakterisierten Komponenten dieser Kristallinklasse. Diese umfaßt Monomere, Dimere und Polymere mit

Molekulargewichten zwischen 19 und 210 kD und iso-elektrischen Punkten zwischen pH 5.3 und 7.0 (Bours 1975; Harding und Dilley 1976). Sie stellen den mengenmäßig größten Anteil der wasserlöslichen Linsenproteine dar. Die ausgeprägte Heterogenität rührt einerseits von Prozessen auf genetischer Ebene wie Genduplikation und unterschiedlichen Initiationspunkten bei der Transkription, andererseits von postsynthetischen Veränderungen der primär exprimierten Polypeptide her (Lubsen et al. 1988). Letzteren liegen 6-7 bisher untersuchte Gene (Dodemont et al. 1981) mit einer Sequenzhomologie von 50-60% zugrunde. Sowohl in hoch- als auch in niedermolekularen Aggregaten findet sich eine als β -Basic-principal (β Bp) bezeichnete Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 25 kD, die den Hauptanteil der β -Kristalline darstellt (Bloemendal 1981).

Die Nomenklatur der β -Kristalline orientiert sich an den gelchromatographisch trennbaren Molekülgrößen. Die Bezeichnungen β -high steht für polymere Kristalline (MG ca. 210 kD) und β -low für Dimere (MG 42-62 kD). Sie werden durch Einteilungen nach Säure/Base Eigenschaften der einzelnen Polypeptidketten ergänzt. Die Bezeichnungen β -A3/A1, β -A2, β A4 und β B1, β B2, β B3, berücksichtigen dabei grundlegende Differenzen in der Aminosäuresequenz (Berbers et al. 1984; Lubsen et al. 1988).

Eine Ausnahmestellung nimmt das β s-Kristallin (s=slow) ein. Aufgrund seines acetylierten N-Terminus wird es den β -Kristallinen zugeordnet, ist monomer und liegt mit einem IEP von pH 7.0 an der Grenze zwischen β - und γ -Kristallinen (van Dam 1966; Bours 1991).

1.4.2.3 γ -Kristalline

Als γ -Kristalline wird eine Gruppe ausnahmslos monomerer Kristalline bezeichnet, deren IEP definitionsgemäß über pH 7.0 liegt (Bours 1973). Das Molekulargewicht liegt um 20 kD. Die Anzahl der für γ -Kristalline kodierenden Gene wird auf mindestens 6-7 geschätzt, wobei z.B. beim Menschen nicht alle Gene transkribiert werden (Meakin et al. 1985 und 1987). Dabei handelt es sich um eine Genfamilie mit 50-60%-iger Sequenzhomologie. Deren gemeinsames Strukturelement ist eine vierfache Wiederholung eines bestimmten Sequenzmusters. Es wurde auch bei den β -Kristallinen nachgewiesen und ist für die Konformation der Proteine verantwortlich (Driessen et al. 1981; Inana et al. 1983; Summers et al. 1986; Chirgadze et al. 1987).

Das Vorkommen solch "konservativer" Muster sowohl in β -Kristallingenen als auch in γ -Kristallingenen deutet auf ein Urgen, das sich nach zweifacher Genduplikation und Fusion (Wistow

et al. 1988) im Laufe der Evolution diversifiziert hat, weshalb man auch beide Gruppen zu einer " β - γ -superfamily" zusammenfaßt (Quax-Jeuken et al. 1985; Lubsen et al. 1988; Wistow et al. 1988).

1.5 Quantitative und qualitative Veränderungen der Kristalline mit dem Alter

Für Veränderungen der Linsenproteine kommen zwei grundsätzlich verschiedene Ursachen in Betracht:

- Prozesse auf der Ebene der Proteinsynthese: Das sind z. B. eine veränderte Transkription der DNA im Zuge der Zelldifferenzierung und translationsassoziierte Vorgänge, wie alternatives "Splicing" der m-RNA und Einbau falscher Aminosäuren.
- postsynthetische Veränderungen wie Aggregation, Ausbildung von kovalenten Bindungen, Deamidierung, Degradation des Carboxylterminus, Oxidation und Glycosylierung (Harding und Dille 1976; Hoenders und Bloemendal 1983; Rink 1989).

Aufgrund des lebenslangen, appositionellen Wachstums der Linse manifestieren sich solche Veränderungen in der unterschiedlichen Proteinzusammensetzung der verschiedenen Linsenbereiche. So wurde z.B. eine auffällige Abnahme der γ -Kristalline im Cortex von sehr alten Rinderlinsen festgestellt. Die γ -Kristalline finden sich vornehmlich im Kern. Ihre Abnahme erklärt sich durch die verringerte Syntheseleistung während des Alterns. Der Anteil an β -Kristallinen steigt dagegen mit dem Alter an (Bours et al., 1977). Der auffälligste Prozess ist jedoch die Aggregation bereits synthetisierter Kristalline zu hochmolekularen (bis zu 50×10^6 D) Komplexen (Harding und Dille 1976). Er wurde sowohl für α -, als auch für β -Kristalline nachgewiesen (Bessemers et al. 1990).

Da die Linse über keine proteolytische Aktivität verfügt, führt besonders im Kern diese Art der "Entsorgung" alter Proteinmoleküle zur Bildung unlöslicher Aggregate und damit zu Transparenzverlusten, wenn die Komplexe eine kritische Größe und Packungsdichte überschreiten (Rink 1982). Die natürlichen Alterungsvorgänge in der Linse stehen in engem Zusammenhang mit pathologischen Erscheinungen, wie der Cataracta senilis, deren Entstehung neben der Disposition zur Kristallin-Aggregation durch andere Einflüsse begünstigt wird, wobei der Verlust reduzierender Enzymaktivitäten, Veränderungen des Wasser- und Elektrolythaushaltes und mangelnde Energieversorgung im Mittelpunkt der Betrachtungen stehen (Ma et al, 1998).

2 Methoden

2.1 Überblick über die angewandten Methoden

2.1.1 Elektrophorese

Proteine besitzen aufgrund ihrer Aminosäurezusammensetzung positive und negative Ladungen. Glutamin- und Asparaginsäure bilden dabei positive, die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin negative Ladungen. Wichtig ist hierbei die Gesamtladung des Proteins. Wird ein geladenes Protein mit der Gesamtladung q einem elektrischen Feld ausgesetzt, so wirkt auf dieses Protein eine Kraft F . Die Kraft hängt von der Ladung q und der Stärke des angelegten Feldes ab (Cann 1966).

$$F = E \times d^{-1} \times q$$

E ist die Potentialdifferenz zwischen den Elektroden und d der Abstand der Elektroden zueinander. Die Feldstärke wird durch den Quotienten E/d definiert. Die Kraft des elektrischen Feldes und die Reibung zwischen den wandernden Proteinen wirken dem Bestreben des Proteins, sich auf die Elektrode zuzubewegen, entgegen. Sowohl Größe und Form des Proteins als auch die Viskosität der zu durchwandernden Trennmatrix ist bestimmend für die Reibung. Die Geschwindigkeit des Proteins ist proportional der Ladung des Proteins und der Feldstärke, jedoch umgekehrt proportional der Größe des Proteins und der Viskosität der Trennmatrix.

Da sich die Proteine in ihren Ladungen und Größen voneinander unterscheiden, wandern sie bei angelegtem Feld in einer bestimmten Zeit unterschiedlich weit. Theoretisch könnte ein Proteingemisch sich in schmale einzelne Banden voneinander trennen, wenn die Struktur des Trenngeles, welche die Viskosität bestimmt, dem nicht entgegen wirken würde.

2.1.2 Polyacrylamid- Gelelektrophorese (PAGE)

Folgende Kriterien muß ein Trennmedium für die exakte Trennung von Proteinmischungen erfüllen:

- 1) Herabsetzung der Durchmischung
- 2) keine Interaktion mit dem Protein und dadurch keine Behinderung der Beweglichkeit (Laemmli 1970).

Acrylamid, N,N'-Methylen-bisacrylamid und Tetramethyldiamin in ihrer polymerisierten Form erfüllen diese Kriterien. Als Polymerisationsstarter dient Ammoniumperoxosulfat (APS). In Wasser gelöst bildet APS freie Radikale, die das Acrylamid aktivieren. Das aktivierte Acrylamid reagiert unter Bildung von langen Ketten weiter. Die Quervernetzung durch N,N'-Methylen-bisacrylamid führt zu einem Gel mit einem dreidimensionalen Gitter. Die Porengröße des Gitters wird durch die Konzentrationen der Acrylamide und N,N'-Methylen-bisacrylamide bestimmt.

Die Porengröße läßt sich durch die Totalacrylamid-Konzentration T und den Vernetzungsgrad C exakt und reproduzierbar definieren:

$$T = [(a + b) \times 100] \times V^{-1} \quad [\%] \qquad C = (b \times 100) \times (a + b)^{-1} \quad [\%]$$

Dabei ist

a	Masse Acrylamid in g
b	Masse des Methylen-bisacrylamid in g
V	Volumen in ml

Die Porengröße wird bei konstantem C und steigendem T kleiner. Bei konstantem T und steigendem C folgt die Porengröße einer parabolischen Funktion: bei hohen und niedrigen C -Werten erhält man große Poren, wobei das Minimum bei $C = 4\%$ liegt (Righetti 1983).

Der PAGE-Puffer dient der Aufrechterhaltung des pH-Wertes innerhalb des Geles und als Elektrolyt für die Stromleitung innerhalb des elektrischen Feldes im Gel. Bei der Wahl des Puffers müssen folgende Bedingungen beachtet werden:

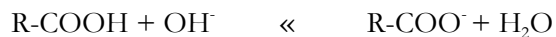
- 1) keine Wechselwirkung mit den Proteinen
- 2) der pH-Wert sollte so gewählt sein, dass die Proteine zwar geladen sind, jedoch nicht denaturiert werden

Die Ionenstärke des Puffers hat ebenfalls einen Einfluß auf die Wanderungseigenschaften und die Trennschärfe (scharfe Trennzonen). Eine geringe Konzentration führt dazu, dass die Proteine den Strom selber weiterleiten. Dies beeinflusst die Trennschärfe in Form diffuser Trennzonen. Dagegen führt eine zu hohe Elektrolytkonzentration zu einer Zunahme der Stromstärke bei gleichzeitiger Verminderung der Spannung. Die Folge ist eine Verlangsamung der Wanderung und dadurch verstärkte Wärmebildung, die ihrerseits eine Proteindenaturierung nach sich ziehen kann.

2.1.3 Prinzip der Isoelektrofokussierung

Die Anwendung der IEF ist auf die Trennung von Molekülen beschränkt, die nach außen positiv oder negativ geladen sein können (amphoterer Charakter). Die Gesamtladung eines Proteins setzt sich aus der Summe der negativen und positiven Ladungen zusammen, wobei diese abhängig vom pH-Wert in der Umgebung ist (Vesterberg und Svensson, 1966). Die Nettoladung eines Proteins ergibt sich aus der Summe aller Ladungen der Aminosäureseitengruppen. Dabei spielt die dreidimensionale Konfiguration des Proteins eine Rolle.

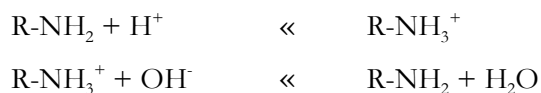
In einem alkalischen Milieu sind die Carboxylgruppen der Aminosäuren (AS) negativ geladen.



In einer sauren Umgebung sind die Säurerestgruppen neutral.



Arginin, Histidin und Lysin sind die Hauptquellen für die positiven Ladungen der Proteine. Diese AS besitzen freie Aminogruppen, die in einem sauren Milieu ein Proton aufnehmen können, wodurch sie eine positive Ladung erhalten. In einer alkalischen Umgebung hingegen spaltet sich ein Proton ab. Dabei verliert die charakteristische Aminogruppe ihre Ladung.



Als isoelektrischen Punkt (IEP) bezeichnet man denjenigen pH-Wert eines Proteins, bei dem die positiven und negativen Ladungen gleich sind, d.h. die Gesamtladung des Proteins gleich Null ist. Dieser IEP ist spezifisch für jedes Protein und bedingt sich durch die Reihenfolge und die Anzahl der Aminosäuren in der Primärstruktur.

Durch Beimischung von Ampholyten (besitzen amphotere Eigenschaften) zur Trennmatrix wird nach Anlegung eines elektrischen Feldes ein stabiler pH-Gradient ausgebildet. Gemäß ihrer Ladung wandern die Proteine vom Punkt des Probenauftrags in Richtung Anode bzw. Kathode bis zu der Stelle im pH-Gradienten, der ihrem IEP entspricht. Dort besitzen die Proteine keine Ladung mehr. Somit unterbleibt eine weitere Wanderung der Proteine im elektrischen Feld.

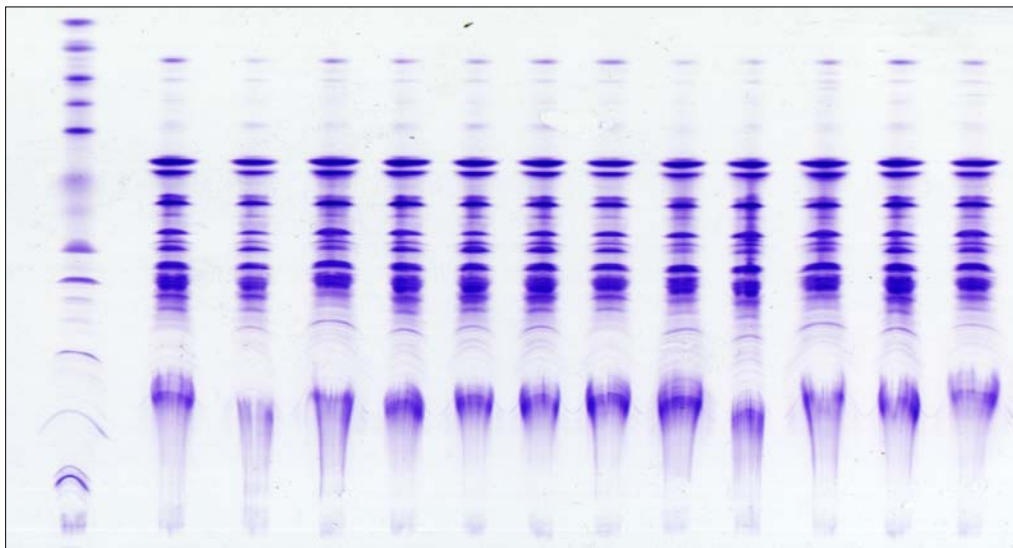


Abb. 3: Isoelektrische Fokussierung von 12 Proben. Links Markerstreifen. Gefärbt mit Coomassie-Blue.

2.1.4 SDS-PAGE

Die Beweglichkeit eines Proteins im Acrylamid-Gel ist sowohl von seiner Gesamtladung als auch von seiner Größe abhängig. Zwei Proteine können sich trotz unterschiedlicher Molekülgrößen mit derselben Geschwindigkeit im Gel trennen, wenn ein Ladungsaustausch stattfindet. Räumlich eng beieinander liegende, jedoch nicht kovalent gebundene Proteine werden in der Regel durch die PAGE nicht voneinander getrennt. Sharpira umging 1967 diese Schwierigkeit, indem er Proteine in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS) elektrophoretisch auftrennte.

1969 zeigten Osborn und Weber, dass die Beweglichkeit der Proteine eine lineare Funktion der Logarithmen ihrer Molekulargewichte ist.

SDS bindet sich an die hydrophoben Regionen des Proteins, wodurch die meisten Proteine in ihre Untereinheiten dissoziieren. Durch die Bindung des SDS erhält das Protein eine negative Ladung.

Durch Behandlung mit Dithiothreitol (DTT) können die durch Disulfidbrücken zusammengehaltenen Untereinheiten getrennt werden. Eine Alkylierung der reduzierten S-S Brücken wird durch Behandlung mit Jodacetamid verhindert (Weber und Osborn 1969).

2.1.5 Hochauflösende 2D-Elektrophorese

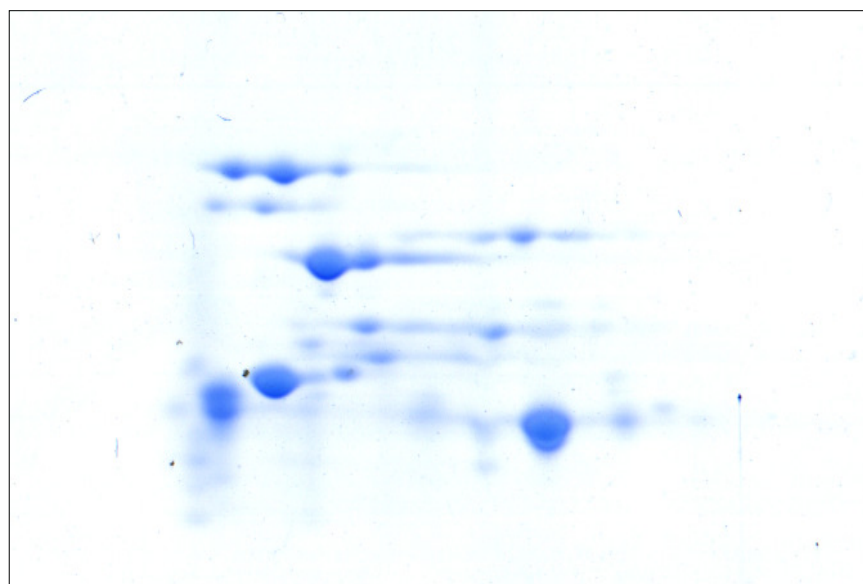
Bei dieser Technik führt man die erste Dimension in individuellen Rund-Gelen oder Gelstreifen durch und überträgt diese auf das Gel der zweiten Dimension.

Bei der „Hochauflösenden 2D-Elektrophorese“ nach O'Farrell und nach Klose besteht die erste Dimension aus einer isoelektrischen Fokussierung in Gegenwart von 7-molaren Harnstoff, die zweite Dimension aus einer SDS-Elektrophorese. Der Trennparameter der ersten Dimension, der pI, ist unabhängig vom Molekulargewicht, dem Trennparameter der zweiten Dimension.

Als Trennergebnis erhält man ein Fleckenmuster (Abb. 4) Bei ihrer Darstellung bedeutet von links nach rechts: abnehmender pI; von unten nach oben: zunehmendes Molekulargewicht.

Solche Zweidimensional-Proteinkarten haben das höchste Auflösungsvermögen aller derzeit bekannten elektrophoretischen Protein-Analysemethoden.

Abb. 4:
Hochauflösende
vertikale 2D-
Elektrophorese,
gefärbt mit
Coomassie-Blue.



2.2 Versuchsdurchführung, Material und Methoden

2.2.1 Einteilung und Aufarbeitung der fetalen humanen Linsen

Das pharmazeutische Institut in Sofia (Bulgarien) stellte im Rahmen eines gemeinsamen Forschungsprojekts 14 fetale Linsen für diese Arbeit zur Verfügung. Diese Linsen wurden von den bulgarischen Wissenschaftlern präpariert und gereinigt und lagen bei Ankunft in pulverförmiger Form vor.

Die folgende Liste gibt das Alter der Spender an sowie Größe und Gewicht (soweit bekannt):

Fetale Linsen

1. 5. Monat, 35cm, 1050 g
2. 5. Monat, 39 cm,
3. 5. Monat
4. 6. Monat
5. 4. Monat
6. 5. Monat, 32 cm, 950 g
7. 8. Monat, 41 cm, 2000 g
8. 6. Monat, 37 cm, 1250 g
9. 9. Monat
10. 8. Monat, 51 cm, 2450 g
11. 5. Monat
12. 6. Monat
13. 7. Monat, 42 cm, 1150 g
14. 4. Monat, 37 cm, 700 g

Zu Beginn der Untersuchungen wurden die Proben erneut aufbereitet. Hierzu wurde zu dem in pulverförmiger Form vorliegenden Protein Aqua bidest. zugegeben. Die dabei entstehenden Homogenate wurden in Zentrifugenröhrchen überführt und bei 30.000 g eine Stunde lang zentrifugiert. Der Überstand, welcher die wasserlöslichen Bestandteile der jeweiligen Fraktion enthielt, wurde in andere Eppendorf-Gefäße überführt. Dieses Verfahren wurde anschließend wiederholt, indem zu dem verbliebenen Sediment Aqua bidest. gegeben und erneut zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde mit dem aus dem vorhergegangenen Mal vermischt.

Im nächsten Schritt wurde dem Homogenat in einer Vakuumzentrifuge über Nacht das Wasser wieder entzogen, so dass flockiges Protein übrig blieb.

Nun wurden kleine Mengen des Proteins in Aqua bidest. gelöst. Zu ungefähr 1 mg pro Probe wurde soviel Aqua bidest. zugefügt, dass eine 0,5%ige Lösung entstand.

Die Lösungen wurden portioniert und bei -20 Grad eingefroren.

Im Weiteren wurden Teilmengen der einzelnen Proben aufgetaut und für die einzelnen Untersuchungen verwendet.

Eine Aufteilung der fetalen Linsen in morphologische Regionen war aufgrund der geringen Größe nicht möglich. Die Untersuchungen an den fetalen Linsen gehen daher immer von der Linse als Gesamtheit aus. Im Gegensatz dazu war es möglich, innerhalb der verwendeten senilen Linse weiter zu differenzieren.

2.2.2 Topographische Teilung der senilen Linse

Mit Hilfe einer Schneidemaschine ist es möglich, Augenlinsen jeder Spezies in unterschiedliche morphologische Regionen aufzuteilen, die dem Wachstum der Linse entsprechen. Damit ist die Möglichkeit gegeben, unterschiedliche Altersregionen zu isolieren, die dann biochemisch untersucht werden können.

Die auf dem vorderen Pol aufliegende gefrorene Linse (-20°C) wurde mit einem Trepan (\varnothing 80% des Linsendurchmessers) vom vorderen bis zum hinteren Pol durchstanzt. Daraus ergaben sich zunächst zwei Teile:

-der Linsenäquator

-der innere Zylinder der Linse, im Innern des Trepanns

Anschließend wurde der Trepan so in die auf -8°C gekühlte Schneidevorrichtung eingeführt, dass der vordere Pol der Linse zur Schneidefläche hin orientiert war. Dieser innere Zylinder wurde nun mittels eines Metallbolzens, der dem Durchmesser des Trepans entsprach, von unten in 1 mm Schritten nach oben geschoben, so dass der Zylinder um diesen Abstand aus der Schneidefläche hervorragte. Dieser Teil wurde mit einem Messer abgetrennt. Dabei ergab sich folgende Reihenfolge der Schnitte: vordere subkapsuläre und äußere Rindenregion, tiefe vordere Rindenregion, Kernbereich, tiefe hintere Rindenregion, hintere subkapsuläre und äußere Rindenregion. Die Linsenschnitte wurden gewogen, um das Linsenteilfrischgewicht (LTFG) zu ermitteln. Anschließend wurden die Proben bei -20°C eingefroren.

2.2.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Zu Beginn der Untersuchung wurden von jeder Probe zwei IEF angefertigt. Die erste IEF wurde unter nativen Bedingungen durchgeführt, die zweite mit Protein, welches in 7-molaren Harnstoff gelöst war.

Bau einer Gießkassette

Die Gießkassette bestimmt Form und Volumen des Gels. Sie besteht im Einzelnen aus:

- zwei Glasplatten (B 12,5 x L 26,5 cm)
- einer Gelbondfolie in den Maßen der Glasplatten
- einem U-förmigen Gummi ($d = 0,5 \text{ mm}$)
- acht Klammern.

Die Glasplatten wurden mit Repel-Silane silikonisiert. Eine Glasplatte wurde auf einem nivellierten Tisch mit einer geringen Menge Aqua bidest benetzt, die Gelbondfolie blasenfrei bündig zu den Rändern aufgelegt und überschüssiges Wasser abgesogen.

Der U-förmige Gummi wurde auf der Gelbondfolie so orientiert, dass die Öffnung des Gummis nach vorne zeigte. Die zweite Glasplatte wurde auf den U-förmigen Gummi aufgelegt und mit Hilfe der Klammern fixiert.

Herstellung der Gellösung

Für 1 Gel:

4ml Acrylamid

16ml Aqua bidest

10 µl TEMED

20µl APS

Gießen eines IEF-Gels

Die Gießkassette wurde auf einen Nivelliertisch gestellt und die Gellösung eingefüllt (bis ca. 0,5 cm unter dem oberen Rand).

Um ein gleichmäßiges Polymerisieren zu gewährleisten, wurde die Gellösung mit 0,5 ml Isopropanol (60%ig) überschüttet.

Nach zweistündiger Polymerisation wurden die Glasplatten entfernt.

Das auf der Folie haftende Gel wurde dreimal 10 min in Aqua bidest gewaschen und anschließend für 30 min in eine 1%ige Glycerinlösung gegeben. Danach wurde das Gel bei Raumtemperatur getrocknet.

Rehydratisierung des Gels

Das getrocknete Gel konnte je nach Fragestellung als natives bzw. denaturierendes Gel (Harnstoffgel) rehydratisiert werden. Die Rehydratisierungszeit betrug 2 h für Harnstoff-Gele und 1 h für native Gele.

Für native Gele war die Rehydratisierungslösung wie folgt:

2 g Sorbitol

1 ml Ampholine

auf 20 ml mit Aqua bidest aufgefüllt.

Für Harnstoff-Gele:

8,4 g Harnstoff

2 g Sorbitol

1 ml Ampholine

auf 20 ml mit Aqua bidest aufgefüllt.

Als Ampholine wurden je nach Fragestellung folgende Präparate verwendet:

-Pharmalyte pI 5-8 for IEF Nr.: 17-0453-01 Pharmacia Biotech AG

-Servalyt 4-9T, conc. 40% Nr.: 42910 Serva GmbH

-Servalyt 3-10 Iso-Dalt, conc. 40% Nr.:42951 Serva GmbH

Probenauftrag

Es wurden je 5 µl der Proteinlösung auf Filterpapierplättchen (5 x 10 mm) 1,5 cm von der Anode entfernt aufgetragen.

Nach 15 min wurde die Trennung kurz unterbrochen, um die Probeplättchen zu entfernen. Die gesamte Trenndauer betrug 90 min.

Trennbedingungen:

Spannung 2000 V

Strom 14 mA

Leistung 14 W

Anschließend wurde die Gelplatte 15 min in TCA (20%ig) fixiert und 3 x 10 min in Aqua dest. unter Rühren bei Raumtemperatur gewaschen.

Färbelösung

Als Färbelösung wurde für IEF-Gele Coomassie-Blue CBR R 250 verwendet:

Stammlösung: 1 g CBR R250 auf 1 l mit Methanol aufgefüllt, anschliessend verrührt und gefiltert.

Färbelösung: 100 ml Stammlösung + 100ml Essigsäure (20%ig)

Die Färbung erfolgte für 30 min bei 60°C.

Entfärbung

Als Entfärber wurde verwendet:

300 ml Methanol

100 ml Essigsäure

600 ml Aqua bidest.

Entfärbt wurde solange, bis der Hintergrund des Gels klar war. In der Regel dauerte dies auf dem Schwenktisch etwa einen Tag.

Abschließend wurden die Gele mit 1,5%iger Glycerinlösung gewaschen und getrocknet gelassen.

2.2.4 2D-PAGE

Als das eigentliche Kernstück der Arbeit wurden von den 14 vorhandenen fetalen Proben und von den 7 Schnitten der senilen Linse hochauflösende 2D-Gele angefertigt. Wie bereits oben erwähnt bestand die erste Dimension aus einer Isoelektrischen Fokussierung, die zweite Dimension aus einer 2D-PAGE.

1. Dimension: IEF

Zuerst wurden 3 denaturierende IEF-Gele nach oben beschriebenen Prozedere hergestellt. Dabei wurden beim ersten Gel die Proben 1-8 der fetalen Linsen zweifach aufgetragen. Das Gel Nr. 2 enthielt die Proben 9-14 der fetalen Linsen und Gel 3 die Schnitte 1-7 der senilen Linse in doppelter Auftragung

Bei den drei Gelen wurde die eine Hälfte im Anschluß gefärbt und als Kontrolle verwendet, die andere identische Hälfte wurde für die 2. Dimension weiter verwendet.

Hierzu wurden die Streifen auf dem Gel, die nun das aufgetrennte Protein enthielten, einzeln ausgeschnitten. Sie wurden markiert und bei -60 Grad eingefroren.

Verwendete Ampholine: Servalyt 3-10 Iso-Dalt, conc. 40% Nr.:42951 Serva GmbH

2. Dimension: SDS-PAGE

Nachdem die Proteine der einzelnen Proben in der 1. Dimension nach den isoelektrischen Punkten getrennt worden waren, schloss sich nunmehr die Anfertigung der SDS-Gele der 2. Dimension an.

Diese wurde nach demselben Verfahren einzeln für alle 14 vorhandenen Probestreifen angefertigt.

2.2.4.1 Vorbereiten und Giessen der Gele für die SDS-Page

Für die SDS-Page wurden vertikale Kammern der Firma Biometra verwendet. Die Gele bestanden aus einem unteren Trenngel und dem darüber liegenden Sammelgel.

Sammelgel:

6 ml Aqua bidest

1,5 ml Acrylamid-Stammlösung

2,5 ml Sammelgel-Puffer

20 μ l TEMED

60 μ l APS (10%)

Trenngel:

10 ml Aqua bidest

12,5 ml Acrylamid-Stammlösung

7,5 ml Trenngel-Puffer

15 μ l TEMED

150 μ l APS (10%)

Stammlösungen: **Acrylamid-Stammlösung :**

Acrylamid 30%

Bisacrylamid 0,8%

Sammelgelpuffer:

6,06 g Tris (121,14 g/mol)

4 ml SDS (10%)

auf 100 ml Aqua bidest auffüllen

pH-Wert mit HCl auf 6,8 titrieren

Trenngelpuffer:

18,17 g Tris (121,14 g/mol)

4 ml SDS (10%)

auf 100 ml Aqua bidest auffüllen

pH-Wert mit HCl auf 8,8 titrieren

Nach Zumischen von 150 μ l APS wurde das Trenngel bis 2,5 cm unterhalb des oberen Randes der Kassette gegossen.

Das Gel wurde über Nacht bei 4° C. stehen gelassen und mit Isopropanol (70%) überschichtet. Bis zum nächsten Morgen war das Gel polymerisiert. Nach Zumischen von 60 μ l APS wurde nun das Sammelgel bis 0,5 cm unterhalb des oberen Randes auf das Trenngel gegossen. Dieses polymerisierte innerhalb weniger Minuten.

2.2.4.2 Vorbereiten der IEF-Streifen

Die eingefrorenen IEF-Streifen mussten vor der Verwendung in der SDS-Page equilibriert werden.

Equilibrierungsstammlösung:

42 g Harnstoff (7 M)

4 mg EDTA (0,1 M)

10 mg Bromphenol Blue (0,01%)

3,5 ml Tris HCl pH 8.8 (1,5 M)

35 ml Glycerin (87%)

mit Aqua bidest auf 100 ml auffüllen

Equilibrierungslösung 1:

10 ml Stammlösung

200 mg SDS

100 mg DTT

Equilibrierungslösung 2:

10 ml Stammlösung

200 mg SDS

480 mg Jodacetamid

Die Streifen wurden 10 Min. in jeweils 2,5 ml der Stammlösung auf dem Schwenktisch gewaschen. Anschliessend wurde die Stammlösung abgesaugt und Equilibrierungslösung 1 hinzugegeben. Nach 15 Min. wurde diese dann abgesaugt und es wurde für weitere 15 Min. Equilibrierungslösung 2 hinzugegeben.

Die so präparierten Streifen wurden auf die fertig gegossenen SDS-Gele gegeben und mit 0,5%iger Agarose überschüttet. Links und rechts des IEF-Streifens wurde 1 µl Roti-Mark Standard Marker hinzugegeben.

Die in der Kassette befindlichen Gele wurden mit dem Laufpuffer überschüttet.

Laufpuffer:

30,28 g Tris (121,14 g/mol)

10 g SDS

144,2 g Glycin

auf 1000 ml Aqua bidest auffüllen

nicht titrieren!

Abschließend wurden die Kassetten abgedeckt und mit dem Gleichstromgerät verbunden.

Die Elektrophorese wurde mit 15 mA pro Gel solange gefahren, bis die Front des Bromphenolblaus die Trenngelschicht erreichte. Danach wurde die Amperezahl auf 25 mA pro Gel erhöht und die Elektrophorese solange laufen gelassen, bis die Front 1 cm oberhalb des unteren Randes der Kassette stand.

Die Gele wurden nun aus der Kassette genommen und mit Aqua dest. gewaschen.

Auf dem Schwenktisch wurden die Gele über Nacht gefärbt.

Färbelösung

Als Färbelösung wurde für die 2D-PAGE-Gele Coomassie-Blue CBR R 250 verwendet:

Stammlösung: 1 g CBR R250 auf 1 l mit Methanol aufgefüllt, anschliessend verrührt und gefiltert.

Färbelösung: 100 ml Stammlösung + 100ml Essigsäure (20%ig)

Die Färbung erfolgte für 30 min bei 60°C.

Entfärbung

Als Entfärber wurde verwendet:

300 ml Methanol

100 ml Essigsäure

600 ml Aqua bidest

Entfärbt wurde solange, bis der Hintergrund des Gels klar war. In der Regel dauerte dies auf dem Schwenktisch etwa einen Tag.

Abschließend wurden die Gele gescannt und mit der Melanie Software bearbeitet.

2.3 Software-gestützte Auswertung mit dem „Melanie“-Programm

2.3.1 Auswertung der 2D-Elektrophorese-Gele

Für die Auswertung der angefertigten 2D-Gele wurde die Software „Melanie“ Version 4 der Schweizer Firma Genebio verwendet.

Sie findet die Proteinhäufungen (kurz: spots) automatisch, korrigiert den Hintergrund und erlaubt eine qualitative und quantitative Bewertung des Proteins. Mit Hilfe dieser Software konnten einzelne Gele ausgewertet und mit anderen verglichen werden.

Die Möglichkeiten des Programms fassen ein weites analytisches Spektrum, von denen die wichtigsten sind:

- Editieren der einzelnen spots, d. h. also Erkennen und Nummerieren der spots
- Quantifizierung der spots durch Interpolieren von Fläche und Farbintensität
- Erstellen eines pI- und Molekulargewichtsrasters
- Übereinanderprojektion zweier Gele mit Farbmarkierungen der Überschneidungszonen
- Vergleiche mehrerer Gele mit Zuordnung gleicher spots und Bildung von Gruppen (groups)
- Statistische Auswertung der groups mit Durchschnittswert, Varianz und Standardabweichung
- Erstellen eines idealisierten Gels aus mehreren vergleichbaren Gelen
- 3D-Darstellung der spots eines Gels

Zu Beginn der Arbeit mit dem Melanie-Programm stand die Auswertung der einzelnen Gele. Die einzelnen spots wurden editiert und quantifiziert. Mit Hilfe des auf die Proben aufgetragenen Markers wurde ein pI- und Molekulargewichts-Koordinatensystem erstellt.

Die nun nach Größe, pI und Gewicht definierten spots konnten anschließend in die Gruppen der α -, β - und γ -Kristalline eingeordnet werden.

Als weiterer Schritt erfolgte der Vergleich der Gele untereinander. Aus mehreren spots konnten groups gebildet und diese dann statistisch ausgewertet werden.

2.3.1.1 Vorgehensweise

Anhand eines ausgewählten Gels, dem Gel Nr. 7, soll die Vorgehensweise bei der Auswertung der Gele verdeutlicht werden.

Abb. 5 zeigt das unbearbeitete Gel. Deutlich sind die für die 2D-Gel-Elektrophorese charakteristischen Proteinanhäufungen, die sogenannte spots, in der Mitte zu erkennen. Links und rechts befindet sich der aufgetragene Molekulargewichts-Marker, es handelt sich um Roti-Mark Standard der Firma Roti. Oberhalb der spots erkennt man eine Reihe kleinerer Punkte. Hierbei handelt es sich um den in der 1. Dimension aufgetragenen pI-Marker, die Kreatinphosphokinase.

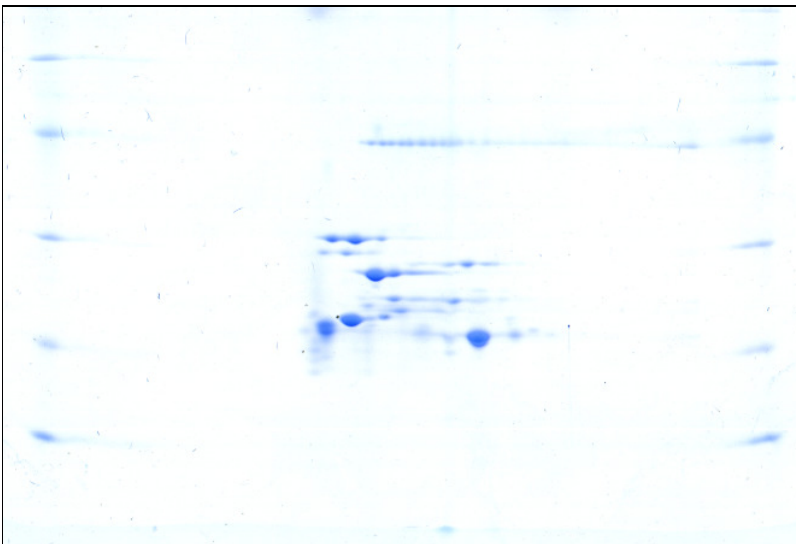


Abb. 5: Unbearbeitetes Gel der Probe 7

Als nächster Schritt folgte die Zuordnung der Markerpunkte. Es wurden die vom Hersteller angegebenen Molekulargewichte und pH-Werte in das digitalisierte Gel eingegeben. Mit Hilfe des Melanie-Programms war es möglich, ein pI-, Molekulargewichtsraster zu erstellen (Abb. 6).

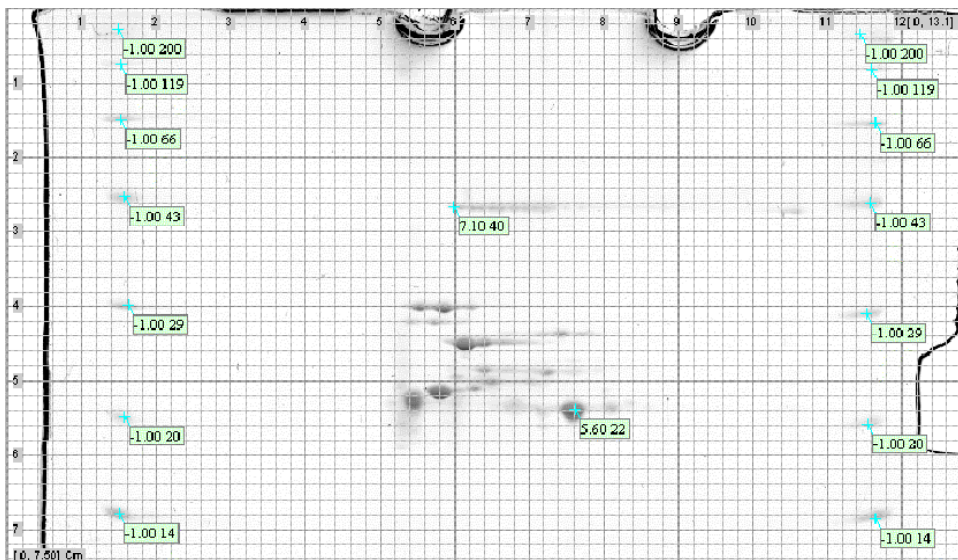


Abb. 6: Markiertes Gel mit Raster

Jedem beliebigen Punkt innerhalb des Gels kann so exakt ein pI und ein Molekulargewicht zugeordnet werden.

Der folgende Schritt war die Editierung der spots. Abb 7. zeigt ein bereits editiertes Gel. Alle rot umrandeten spots sind editiert worden.

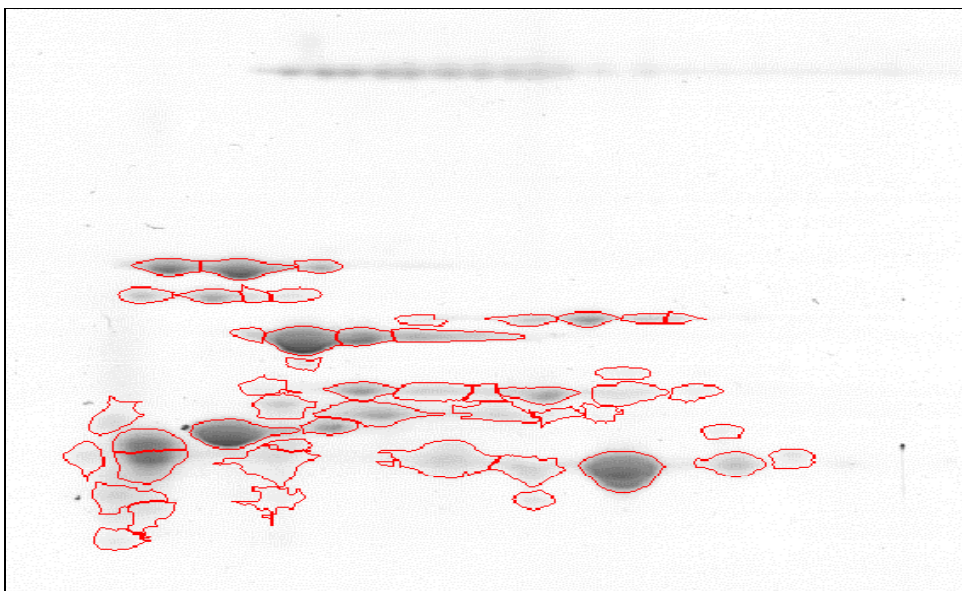


Abb. 7: Editiertes Gel

Im editierten Gel konnten manuell Veränderungen vorgenommen werden. So konnten einzelne spots gelöscht werden. Dies war z. B. dann nötig, wenn es sich eindeutig um Fremdkörper wie Schmutz handelte, die jedoch vom Programm als spots dedektiert wurden. Spots konnten zusammengefasst oder deren Fläche vergrößert bzw. verkleinert werden. Das Programm berechnete dann für die editierten spots anhand der Fläche und der Farbintensität ihr Volumen.

Das so editierte Gel war Ausgangsbasis für alle weiteren Untersuchungen. Die gewonnenen Ergebnisse sind Thema des folgenden Kapitels.

3 Ergebnisse

3.1 Fetale Proben

3.1.1 Korrelation der Gele untereinander

Eine wichtige Frage in der vorliegenden Arbeit war, ob die Proteinverteilungen der untersuchten Linsen auf den 2D-PAGE-Gelen übereinstimmten oder ob signifikante Abweichungen bestanden.

Diese Auswertung erfolgte Software-gestützt. Nachdem die Gele der 14 Linsen gescannt und editiert worden waren, konnten sie mit dem Melanie-Programm verglichen werden.

Hierbei zeigte sich, dass die Übereinstimmung der Gele im Bereich von 0,674 Bis 0,981 lag. Der Mittelwert der Korrelationen betrug 0,88 mit einer Standardabweichung von 0,07.

Auf die Aussagekraft der ermittelten Korrelationen und deren Bedeutung für die Auswertung wird im Kapitel 4 – Diskussion ausführlich eingegangen.

Gel	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0,951	0,865	0,802	0,903	0,906	0,923	0,91	0,904	0,859	0,959	0,898	0,862	0,779
2		0,674	0,773	0,973	0,899	0,843	0,898	0,841	0,812	0,901	0,905	0,845	0,749
3			0,849	0,92	0,905	0,819	0,849	0,845	0,871	0,88	0,832	0,743	0,849
4				0,867	0,858	0,744	0,696	0,739	0,791	0,781	0,77	0,705	0,676
5					0,948	0,894	0,829	0,869	0,871	0,924	0,89	0,792	0,843
6						0,917	0,915	0,927	0,953	0,952	0,941	0,89	0,881
7							0,89	0,949	0,892	0,972	0,958	0,898	0,844
8								0,919	0,917	0,944	0,901	0,917	0,859
9									0,96	0,978	0,981	0,971	0,85
10										0,945	0,957	0,937	0,852
11											0,977	0,944	0,906
12												0,957	0,852
13													0,878

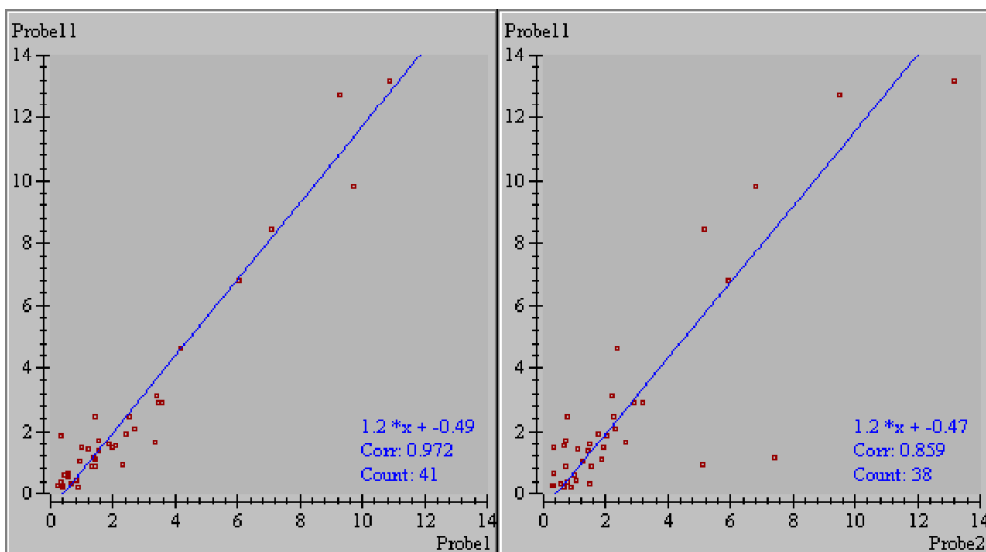
Tab.1: Korrelation der Proteinstrukturen der 2D-PAGE-Gele

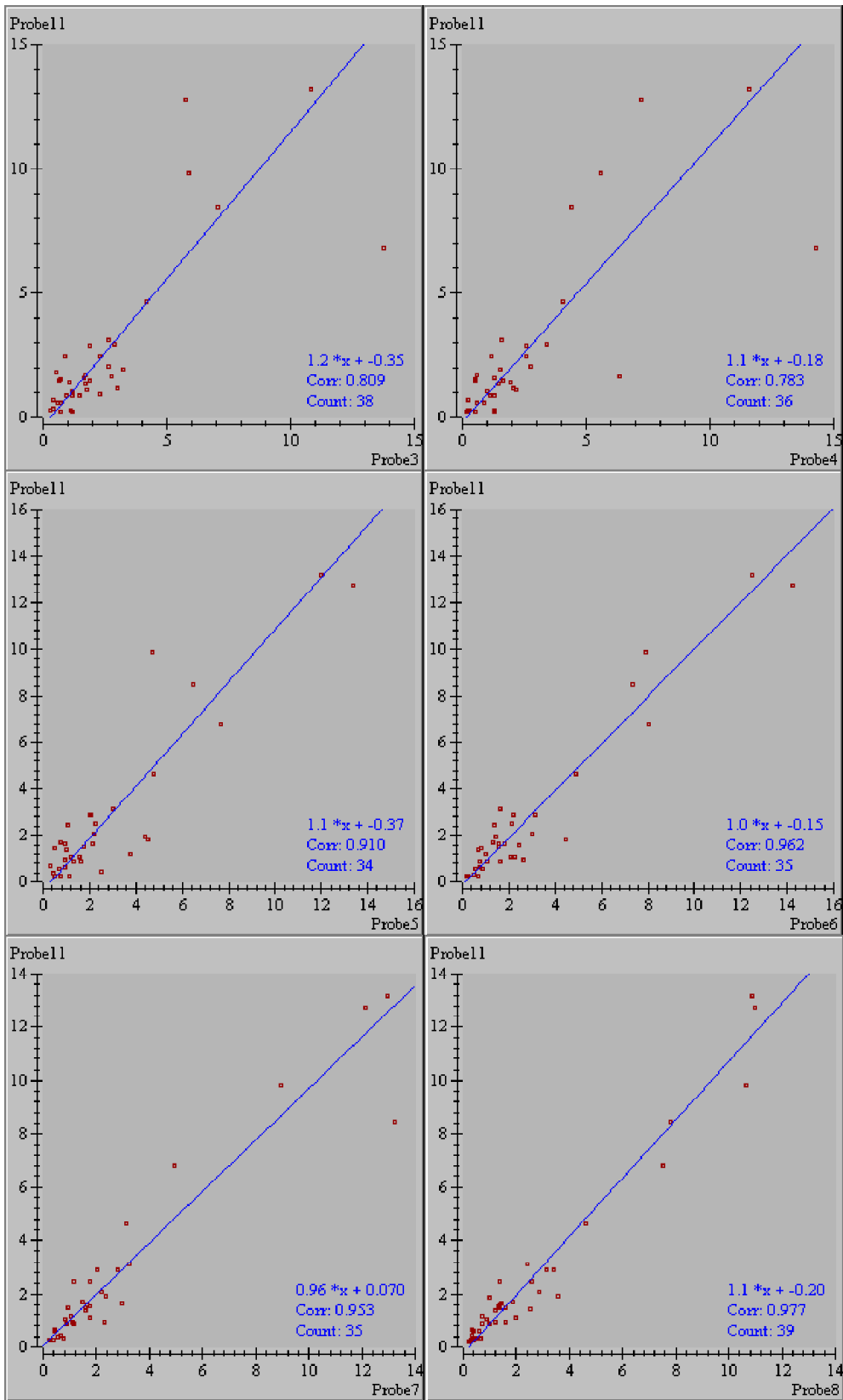
Mittelwert: 0,88 Standardabweichung: 0,07

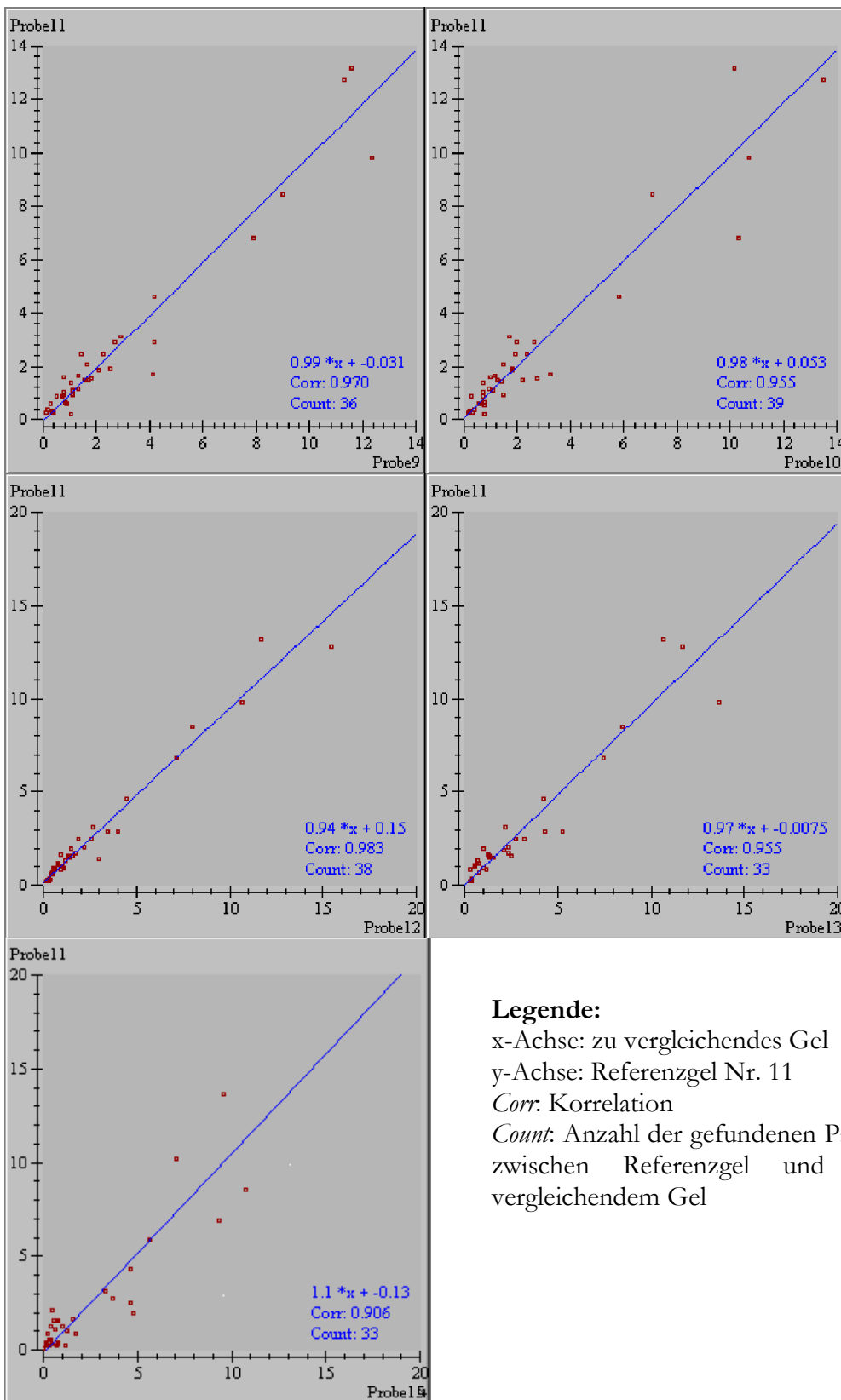
Es zeigte sich weiter, dass die Korrelation des Gels 11 zu allen anderen besonders hoch war. Es wurde als Referenz-Gel für die weiteren Untersuchungen gewählt. Aus den folgenden Diagrammen geht die Korrelation der einzelnen Gele zum gewählten Referenz-Gel Nummer 11 hervor.

Hierbei gibt *count* die Anzahl der gefundenen Paare an. Paare bestehen aus gleichartigen spots auf den zu vergleichenden Gelen. Die Einheit der Skalierung ist Vol-%. Ein roter Punkt steht für ein gefundenes Paar. Aus den Diagrammen wird deutlich, dass eine hohe Übereinstimmung erreicht wurde. Sie lag in Bezug zum Referenz-Gel im Bereich von 0,783 bis 0,983.

Abbildung 8: Korrelation der einzelnen Gele zum Referenzgel Numer 11:







Legende:

x-Achse: zu vergleichendes Gel

y-Achse: Referenzgel Nr. 11

Corr: Korrelation

Count: Anzahl der gefundenen Paare zwischen Referenzgel und zu vergleichendem Gel

3.1.2 Quantitative Auswertung

Der Vergleich aller Gele untereinander ergab die Zuordbarkeit von 476 spots zu insgesamt 42 Gruppen. Eine Gruppe besteht hierbei aus den korrespondierenden spots auf den zu vergleichenden Gelen. Maximal konnten bei den 14 untersuchten Gelen 14 spots zu einer Gruppe zusammengefasst werden, nämlich genau dann, wenn der spot auf jedem der Gele vorhanden war. Kleinere Kristallinkomponenten waren häufig nicht auf allen Gelen sichtbar, so dass hier die Gruppen aus weniger als 14 spots bestanden. Die 42 Gruppen sind in der Abb. 8 mit Nummern von 3 bis 53 (Nummerierung nicht durchgängig) gekennzeichnet. Für die Darstellung wurde stellvertretend für alle 14 Gele das Referenz-Gel Nummer 11 gewählt. Die Volumenverteilung der einzelnen spots gibt Tab. 1 an. Aufgeführt ist hierbei weiterhin die Gruppennummer, entsprechend den Nummern der spots auf Abb. 3, der Durchschnittswert aus den Vol% der spots der einzelnen Gruppen, die Standardabweichung, der isoelektrische Punkt, das Molekulargewicht und die Zuordnung der einzelnen Gruppen. Mit Hilfe der pH-Werte sowie des Molekulargewichts konnte für 35 der 42 spots eine Zuordnung zu den Gruppen der α , β und γ -Kristalline erfolgen. 7 Gruppen konnten nicht klassifiziert werden. Es handelte sich dabei um quantitativ kleine spots, die in der Gesamtheit der Proteine weniger als 10 % ausmachten (nicht aufgeführt).

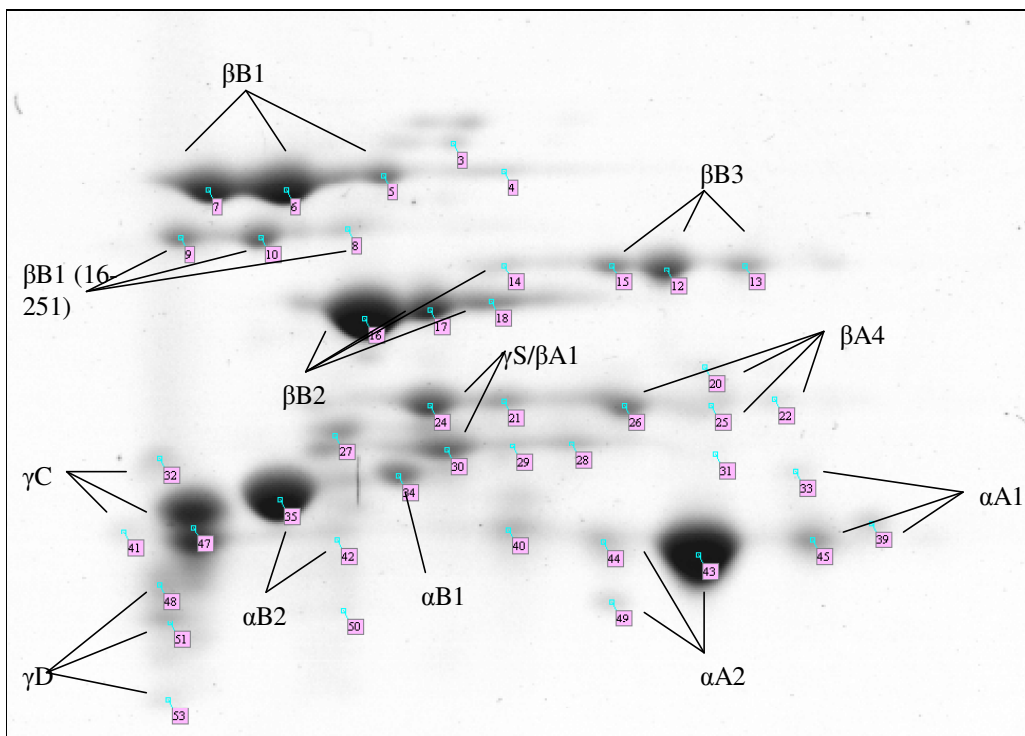


Abb. 9 : Gel Nr. 11; die spots sind mit Nummern von 3 bis 53 versehen. Die Orientierung ist wie folgt: von links nach rechts = abnehmender pH ; von oben nach unten = abnehmendes MG

GROUP ID	MEAN (100%)	M.S.D	MW	PI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	15
5	2,1465	1,8604	29	6,7671	1,1771	1,3875	7,3952	2,9885	3,7401	1,0145	1,0626	0,7106	1,3143	0,9343	2,1329	0,8201	0,8000	4,5735
6	8,4712	2,7572	29	7,1400	6,7966	6,0482	5,9361	13,7737	7,6491	8,0293	4,9440	7,5263	7,9264	10,3406	14,7022	7,1436	7,4277	10,3531
7	3,9828	1,3000	29	7,4741	4,6280	4,1541	2,3489	4,1749	4,7397	4,9236	3,1313	4,6252	4,1857	5,8010	4,1691	4,4525	4,2176	0,2074
βB1	14,6005	3,2535			12,6017	11,5898	15,6802	20,9372	16,1290	13,9874	9,1379	12,8620	13,4265	17,0759	21,0042	12,4162	12,4453	15,1340
8	0,4675	0,2296	28	6,9012	0,5431	0,3164	0,4072	0,2160	0,3212	0,0000	0,4303	0,3285	0,8201	0,7722	0,6858	0,4402	0,8086	0,4551
9	1,0426	0,5395	28	7,5865	0,9712	0,3188	0,6247	0,5352	0,5012	0,8451	0,9339	1,3868	1,5388	2,1984	1,4688	1,4157	1,5299	0,3279
10	1,7598	0,9250	28	7,2513	1,5592	0,6976	1,7002	0,6094	0,7735	1,3127	1,4993	1,8608	4,1106	3,2604	1,7245	1,7629	2,3428	1,4236
βB1(16-251)	3,2699	1,5731			3,0735	1,3328	2,7321	1,3606	1,5960	2,1577	2,8636	3,5760	6,4695	6,2309	3,8790	3,6188	4,6812	2,2066
14	0,5460	0,3212	27	6,3260	0,5593	0,9886	0,7271	0,6084	0,9359	0,7328		0,5877	0,8602	0,6239	0,6142	0,4066		
16	8,9969	2,5052	26	6,8368	9,7218	6,7898	5,8629	5,7424	4,6760	7,9010	8,9337	10,6528	12,3401	10,6835	9,8423	10,6899	13,6409	8,4788
17	2,5780	0,6125	26	6,5969	3,3952	2,2086	2,6556	1,6211	3,0076	1,6152	3,2439	2,3908	2,9129	1,7291	3,1432	2,6460	2,1651	3,3579
18	2,1090	1,0709	27	6,3724	2,3894	1,7664	3,2265	1,5778	4,4026	1,4477	2,3584	3,5910	2,5523	1,7900	1,9414	1,4564	1,0259	
βB2	14,2299	2,4872			16,0657	11,7534	12,4721	9,5497	13,0221	11,6966	14,5359	17,2222	18,6655	14,8265	15,5412	15,1988	16,8319	11,8368
12	2,5480	0,5735	27	5,7300	2,5495	2,2726	2,3161	2,6444	2,2638	2,1311	1,7360	2,6071	2,2346	2,3572	2,4866	2,6082	3,1847	4,2803
13	1,0704	0,2950	27	5,4303	1,3141	1,5293	1,4563	1,3430	1,3382	1,0771	0,8703	0,7199	0,7289	0,6970	0,8685	0,6637	1,2001	1,1787
15	1,0743	0,3699	27	5,9312	0,9281	1,2737	1,1795	1,0531	1,5794	2,0502	0,8321	0,8799	0,7853	0,7206	1,0418	1,0089	0,5163	1,1916
βB3	4,6927	0,7828			4,7917	5,0756	4,9519	5,0405	5,1813	5,2584	3,4384	4,2070	3,7489	3,7749	4,3970	4,2807	4,9011	6,6506
20	0,2992	0,2493	25	5,5788	0,6508	0,5420	0,4230			0,5083		0,4788		0,2080	0,3399	0,3731		0,6641
22	0,2357	0,1271	25	5,2929	0,4076	0,2840	0,3161	0,2242	0,4841	0,2743	0,2307	0,2592		0,1442	0,2720	0,1818	0,2209	
25	0,8987	0,3815	25	5,5553	1,4060	0,7311	1,1824	1,1380	1,6441	0,7521	1,1634	0,9925	0,4946	0,2493	0,8572	0,9414	0,3210	0,7090
26	2,4938	0,6842	25	5,8848	2,6810	2,3266	2,6243	2,8493	2,1668	3,0329	2,1863	2,8360	1,6715	1,4905	2,0690	2,2050	2,3387	4,4346
βA4	3,9273	1,0116			5,1455	3,8838	4,5458	4,2115	4,2950	4,5676	3,5803	4,5666	2,1661	2,0920	3,5381	3,7013	2,8806	5,8077
24	3,0395	0,5723	25	6,5969	3,4325	2,8993	2,8720	3,4964	2,1019	3,1469	2,0303	3,1492	2,6661	2,6215	2,9156	3,4366	4,2873	3,4968
30	2,9141	1,1018	24	6,5349	3,5576	3,1803	1,8890	2,6656	2,0216	2,1886	2,7796	3,4199	4,1590	1,9911	2,8980	4,0017	5,2804	0,7655
γS/βA1	5,9536	1,2300			6,9901	6,0796	5,4887	6,1620	4,1235	5,3355	4,8098	6,5691	6,8251	4,6125	5,8136	7,4383	9,5677	4,2623

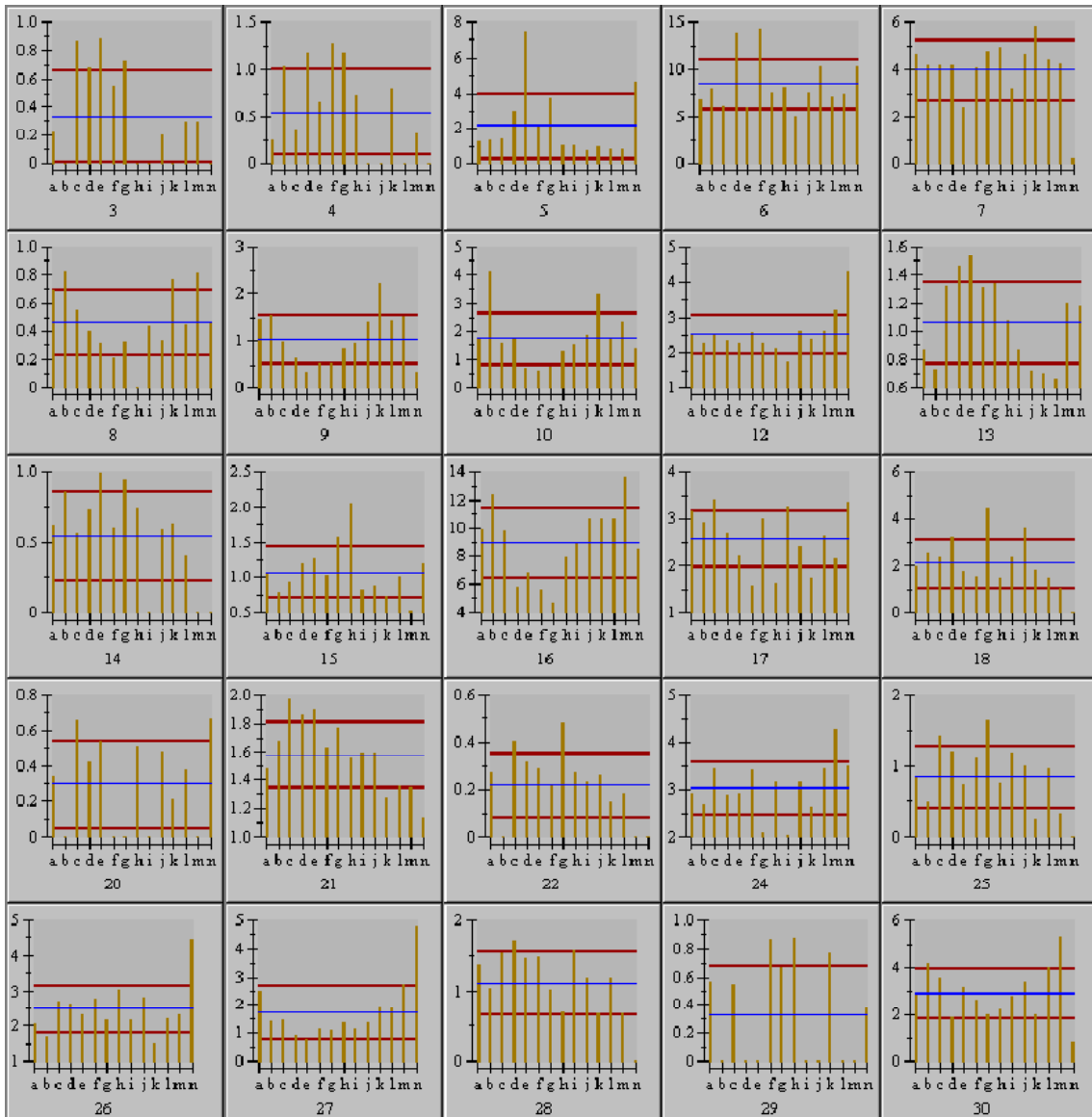
35	7,8921	2,1108	23	7,1800	7,0840	5,1694	7,0556	4,5068	6,4352	7,3591	13,2364	7,8082	9,0057	7,0751	8,4420	8,0162	8,4681	10,8279		
42	1,4894	1,3384	22	6,9424	2,3266	5,1169	2,2670		0,9336	2,6283	2,2861	1,5683	0,7673	1,4705	0,9393	0,5474				
αB2	9,3815	2,2546			9,4106	10,2863	9,3226	4,5068	7,3688	9,9875	15,5225	9,3765	9,7730	8,5455	9,3812	8,5636	8,4681	10,8279		
32	1,0328	0,5129	24	7,9400	0,7303		0,9344	1,3071		1,6620	1,1152	1,2255	1,0888	1,4938	0,9060	1,0863	1,0419	1,8683		
41	0,5479	0,4825	23	8,1667	0,6496	1,4792	1,0979	1,3449			0,7559	0,6571	0,3435		0,3193	0,2984		0,7249		
47	11,3933	2,5598	23	7,5346	9,3026	9,5170	5,7712	7,4093	13,3874	14,2304	12,1562	10,9643	11,3004	13,5143	12,7612	15,4822	11,7005	12,0090		
γC	12,9740	2,3494			10,6825	10,9962	7,8034	10,0613	13,3874	15,8924	14,0273	12,8469	12,7328	15,0081	13,9865	16,8669	12,7424	14,6022		
48	0,9721	0,9833	21	7,9400	1,1870	1,0753	1,0304	1,9933				2,5468		1,4090	1,4237	2,9440				
51	1,6616	1,4374	21	7,8733	0,3460	2,0238	0,5543		4,5105	4,4484		0,9686	2,1118	1,8078	1,8453		2,1497	2,4965		
53	0,2942	0,2266	19	7,8867	0,3327	0,7903			0,4425		0,5301		0,1834	0,3827	0,3888	0,3260	0,4245	0,3181		
γD	2,9280	1,1612			1,8658	3,8893	1,5847	1,9933	4,9530	4,4484	0,5301	3,5154	2,2951	3,5995	3,6578	3,2700	2,5743	2,8146		
43	11,5184	1,1927	22	5,6022	10,8452	13,1491	10,8494	11,8980	12,0142	12,4956	12,9382	10,8545	11,6107	10,1781	13,1885	11,7212	10,6833	8,8311		
44	1,4167	0,5500	22	5,9622	1,4242	1,8905	1,7433	2,2308	1,2210	2,2774	1,7547	1,9955	1,0798	1,1190	1,0974	0,7692	0,5689	0,6616		
49	0,2793	0,1270	21	5,9312	0,4002	0,3085	0,3100	0,2885			0,3666	0,4062	0,3711	0,3517	0,2927	0,2743	0,3582	0,1818		
αA2	13,2143	1,5088			12,6696	15,3480	12,9026	14,4173	13,2352	14,7730	15,0595	13,2562	13,0615	11,6488	14,5785	12,7647	11,6104	9,6745		
33	0,1710	0,1239	24	5,2071	0,2352			0,2097		0,2192	0,2838	0,3516	0,1199	0,1748	0,2526	0,1889	0,3583			
39	0,3154	0,2486	23	4,8986	0,4329		0,6140			0,5925	0,4446	0,3880	0,3018	0,5606	0,5891	0,4916				
45	1,4106	0,3877	22	5,1386	1,8773	1,5085	1,6448	1,3304	2,1455	1,5702	1,6600	1,3546	0,7420	0,9791	1,6048	1,3002	1,3234	0,7077		
αA1	1,8970	0,5174			2,5454	1,5085	2,2588	1,5401	2,1455	2,3819	2,3883	2,0943	1,1637	1,7145	2,4464	1,9808	1,6817	0,7077		
βA3(23-215)	27	1,7512	0,9981	24	6,9506	1,4503	0,7434	0,8986	1,2124	1,0945	1,3728	1,1715	1,3755	1,4247	1,9208	2,4729	1,8816	2,7194	4,7778	
αB1	34	1,4715	0,7959	24	6,7130	2,0831	0,6343	0,7277	0,5416		2,4774	1,7339	1,2979	1,8012	2,7214	1,5392	1,5605	2,5382	0,9443	
Summe	90,2913																			

Tab. 2: quantitative Zuordnung der Proteine in den fetalen Linsen

3.1.3 Histogrammische Darstellung

Die nachfolgenden Histogramme geben die Daten aus der oben angeführten Tabelle in anschaulicher Form wieder. Hierbei sind die Gele mit Buchstaben von **a** bis **n** bezeichnet. Hierbei entspricht **a** dem Referenzgel 11 und **b** bis **n** den Gelen 2 bis 14.

Die Bezeichnung der Gele mit Buchstaben wurde durch das Melanie-Programm vorgegeben.



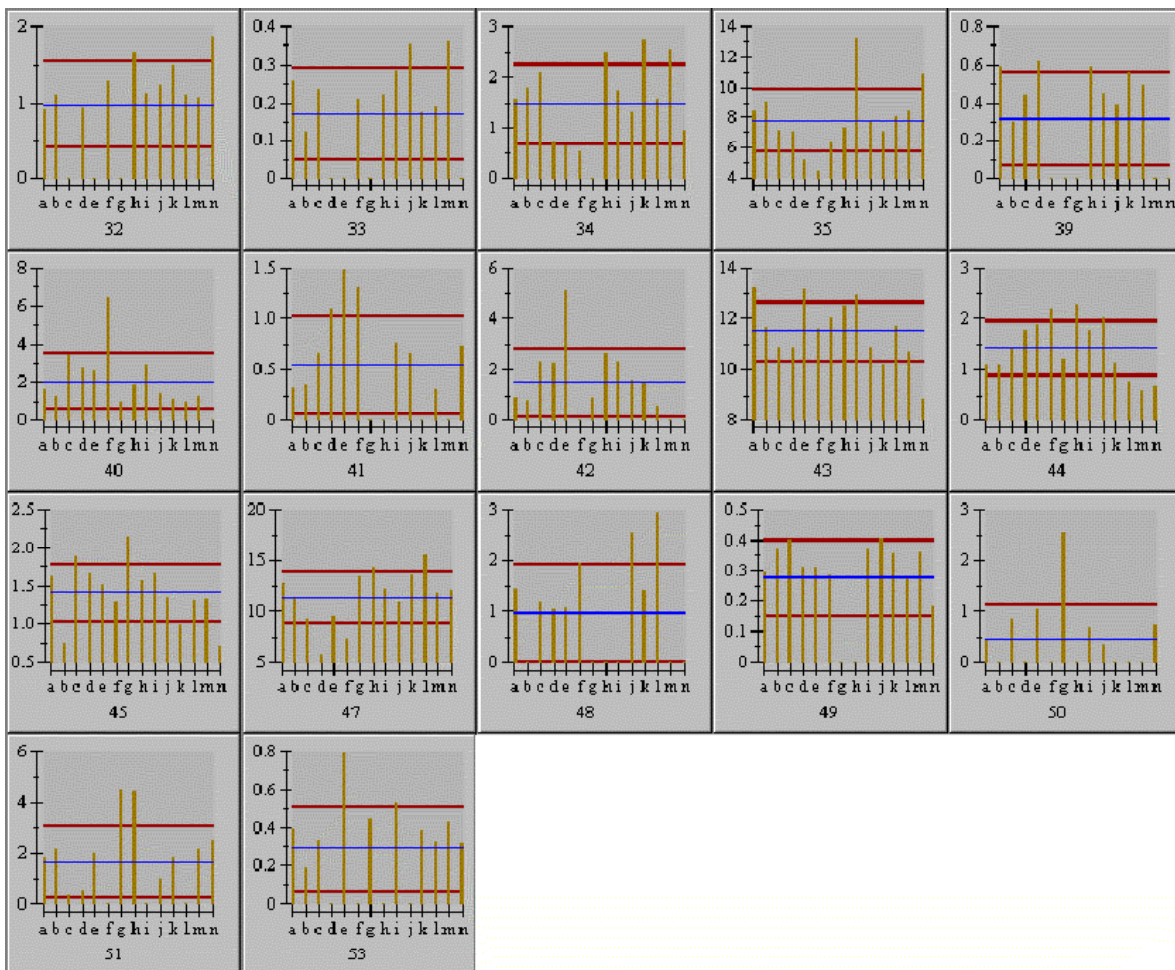


Abb. 10: Histogrammische Darstellung

Bei den hier aufgeführten Histogrammen gibt die Skaleneinteilung den prozentuellen Anteil des spots an der Gesamtheit aller dedektierten spots an. Die blaue Linie kennzeichnet den Mittelwert, die beiden roten die Standardabweichung.

3.2 Senile Linse

3.2.1 Darstellung der Schnitte 1-7

Für die Untersuchung wurde die Linse eines 71 Jahre alten Spenders verwendet. Nach der bereits vorgestellten Methode wurde die Linse in 7 Schichten geschnitten. Von jeder Schicht wurden 2 2D-PAGE Gele angefertigt.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Schnitte 1-7. Die Schnittführung wurde so gewählt, dass Schnitt 1 die anteriore Region der Linse darstellt, Schnitt 7 die posteriore Region. Schnitte 3 bis 5 enthalten das Protein des Kerns, der ältesten Region innerhalb der Linse.

Die Proteinverteilung der mittleren Schnitte weicht erheblich von der der fetalen Linse ab. Die Mehrheit der hierauf abgebildeten spots konnte nicht in die einzelnen Kristallinfraction klassifiziert werden. Es muss gefolgert werden, dass es sich hierbei um modifizierte Proteinkomplexe handelt, die im Laufe des Alterungsprozesses entstanden sind. Die Schnitte der jüngeren anterioren Region waren den Gelen der fetalen Proben ähnlich. Bei ihnen zeigte sich eine weitgehend mit den fetalen Proben vergleichbare α B-, α A-, β B1- und β B2-Fraktion.

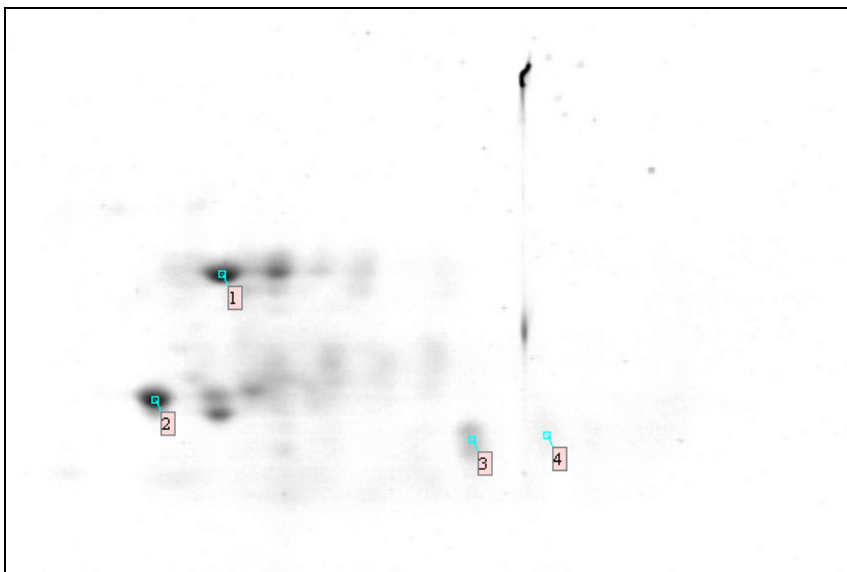


Abb. 11: 2D-PAGE von Schnitt 1 der senilen Linse. Die mit Nummern versehenen spots sind:

1: β B2 2: α B2 3: α A2 4: α A1

Die Orientierung ist wie folgt:

von links nach rechts = abnehmender pH

von oben nach unten = abnehmendes Molekulargewicht

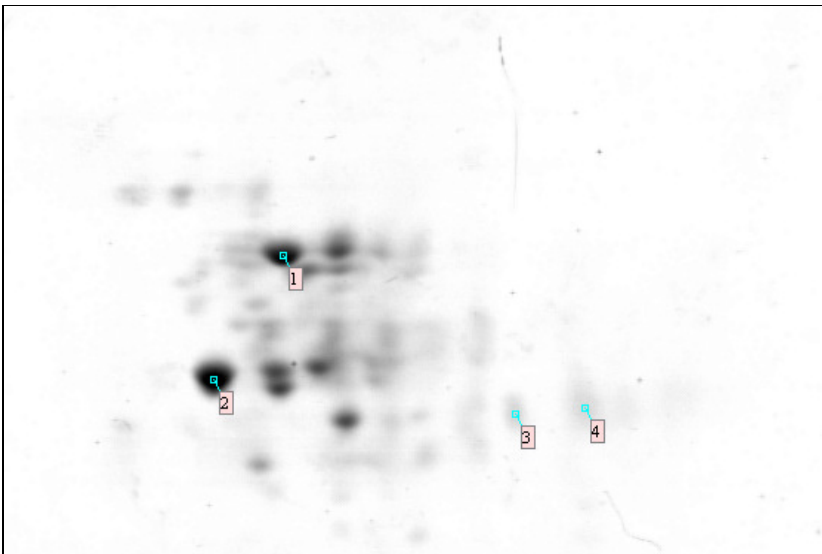


Abb. 12: 2D-PAGE von Schnitt 2 der senilen Linse. Nummerierung und Orientierung wie bei Abb. 9.

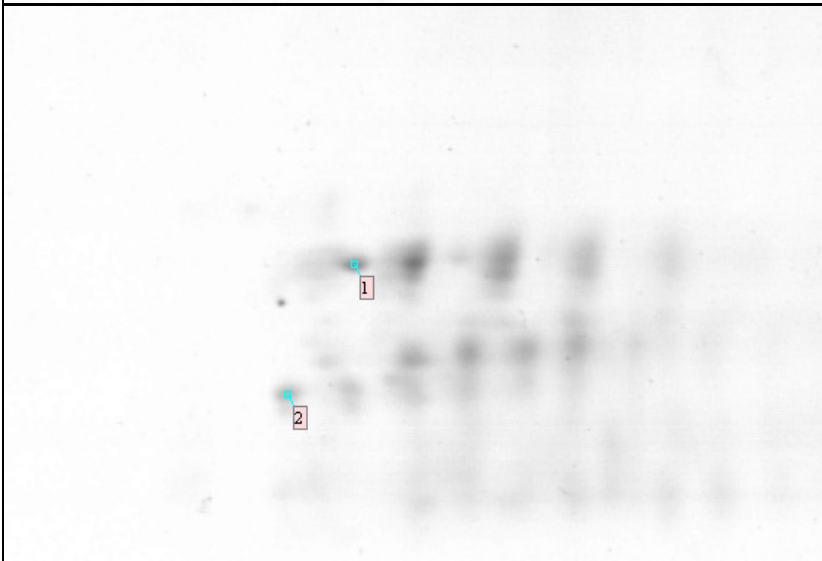


Abb. 13: 2D-PAGE von Schnitt 3 der senilen Linse. Nummerierung und Orientierung wie bei Abb. 9

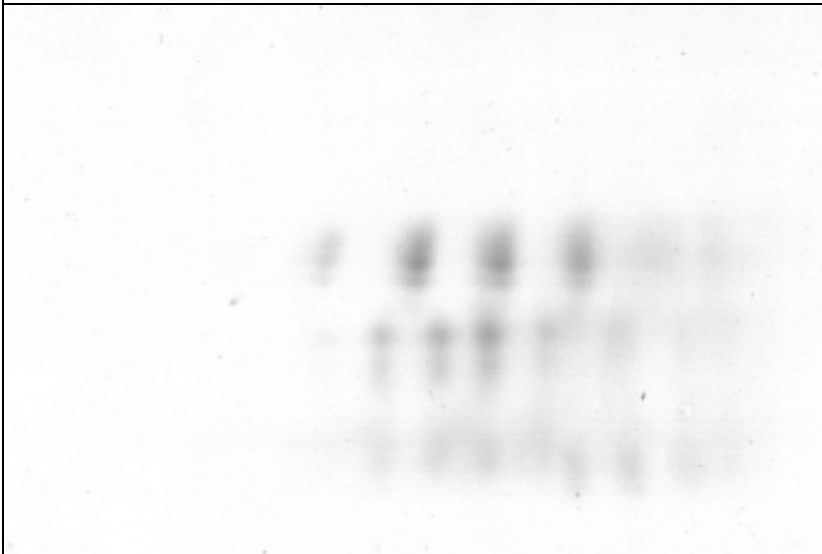


Abb. 14: 2D-PAGE von Schnitt 4 der senilen Linse. Orientierung wie bei Abb. 9

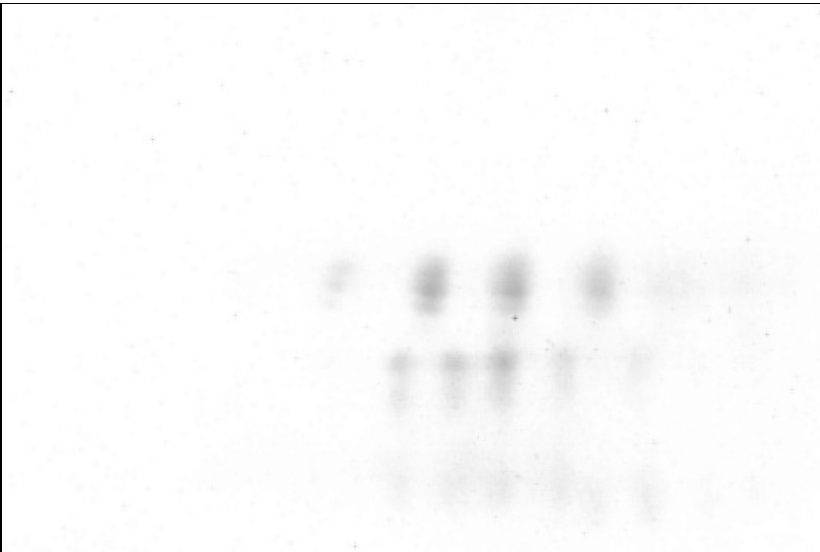


Abb. 15: 2D-PAGE von Schnitt 5 der senilen Linse. Orientierung wie bei Abb. 9

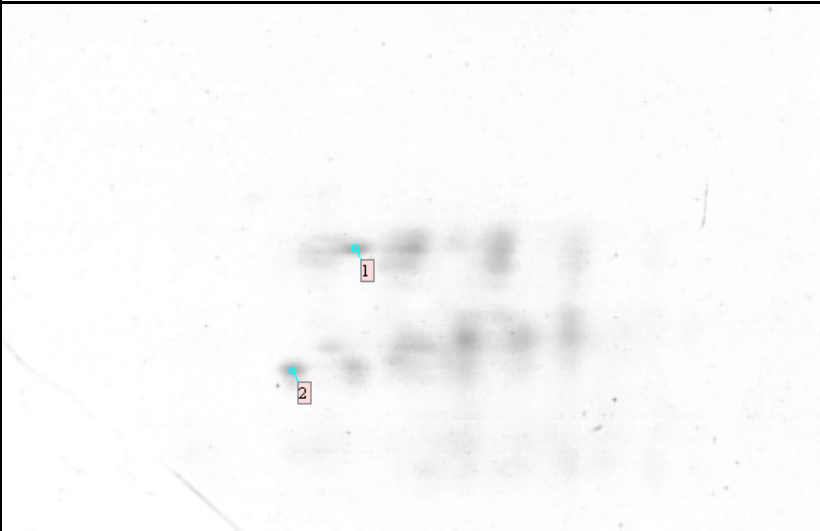


Abb. 16: 2D-PAGE von Schnitt 6 der senilen Linse. Nummerierung und Orientierung wie bei Abb. 9

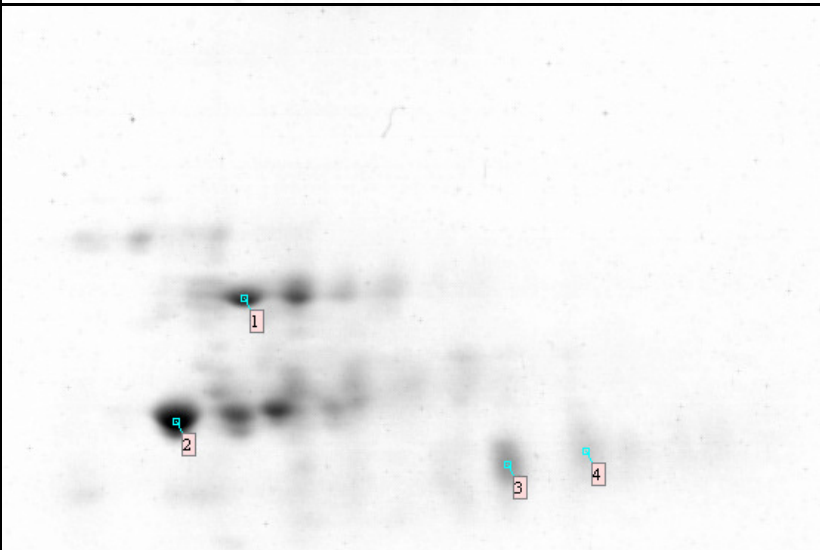


Abb. 17: 2D-PAGE von Schnitt 7 der senilen Linse. Nummerierung und Orientierung wie bei Abb. 9

3.2.2 Korrelation der einzelnen Schnitte untereinander

Die intraspezifischen Alterungsprozesse lassen sich verdeutlichen, indem man unterschiedliche Regionen der selben Linse miteinander vergleicht. Das 2D-PAGE-Gel Schnitt 7 zeigte eine ähnliche Verteilung der einzelnen Kristallin-subunits, wie sie in den Gelen der fetalen Linsen erkennbar waren. Es wurde als Referenzgel für den Vergleich gewählt. Aus den folgenden Diagrammen geht die Korrelation der einzelnen Schnitte zum gewählten Referenz-Gel Schnitt 7 (posteriore Region) hervor.

Hierbei gibt *count* die Anzahl der gefundenen Paare an. Die Einheit der Skalierung ist Vol-%. Ein roter Punkt steht für ein gefundenes Paar. Aus den Diagrammen wird deutlich, dass die Regionen neueren Ursprungs, also die vordere subkapsuläre und äußere vordere Rindenregion (Schnitte 1 und 2) und die äußere hintere Rindenregion (Schnitt 7) relativ gut übereinstimmen (Korrelation: 0,852 bzw 0,875). Die tiefe vordere Rindenregion und der Kernbereich (Schnitte 3 und 4) weisen nur eine sehr geringe Korrelation zur äußeren hinteren Rindenregion (Schnitt 7) auf (Korrelation: 0,209; 0,145). Die tiefe hintere Kernregion (Schnitt 5) fällt mit einer Korrelation von -1 völlig raus. Die hintere subkapsuläre Region (Schnitt 6) nimmt eine gewisse Sonderstellung ein. Obwohl sie eher zu den Regionen neueren Ursprungs zählt, korreliert sie weit weniger mit Schnitt 7 als die anterioren Regionen (Korrelation: 0,209). Von den Kernregionen hebt sie sich jedoch deutlich mit mehr gebildeten pairs und besserer Korrelation als diese ab.

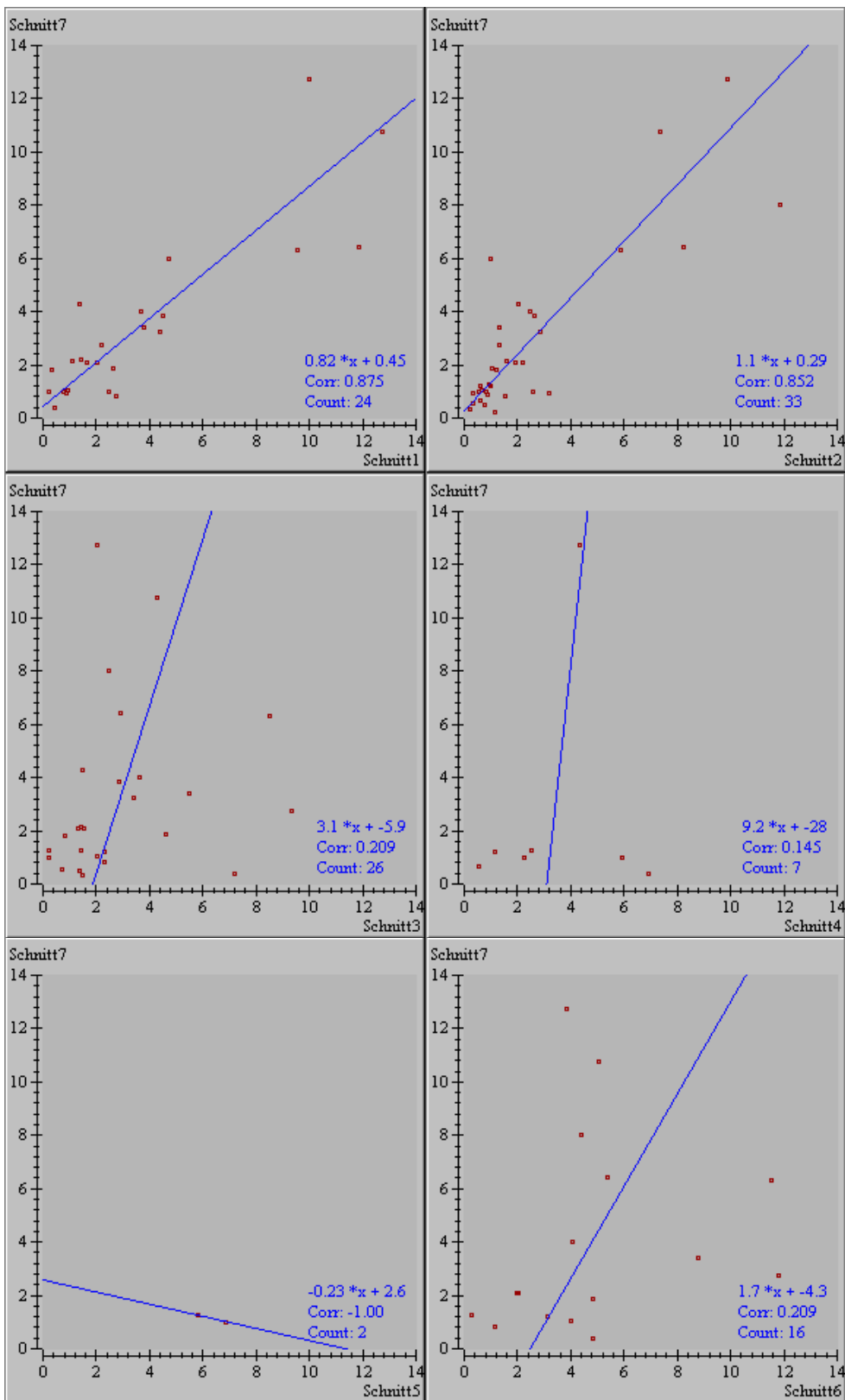


Abb. 18: Korrelation der einzelnen Schnitte zum Schnitt 7 (posteriore Region).

3.2.3 Quantitative Auswertung

Die 7 Schnitte der senilen Linse wurden mit Hilfe des Melanie-Programms quantitativ ausgewertet. Wie unter „Methoden“ erläutert wurden die einzelnen spots dedektiert und anschließend überarbeitet. Bereits an den Korrelationen der einzelnen Schnitte wurde deutlich, dass erhebliche Unterschiede zwischen den neueren und älteren Anteilen der Linse bestehen. Im Folgenden wird ein Gel der neueren Region und ein Gel der älteren Region dargestellt. Es handelt sich hierbei um das Gel „Schnitt 7“, die äußere hintere Rindenregion, und um das Gel „Schnitt 4“, die innere Kernregion.

Abb. 19 zeigt das editierte Gel „Schnitt 7“.

Tab. 3 gibt die Zuordnung, spot-Nr., pI sowie Molekulargewicht an.

3.2.3.1 Die äußere hintere Rindenregion

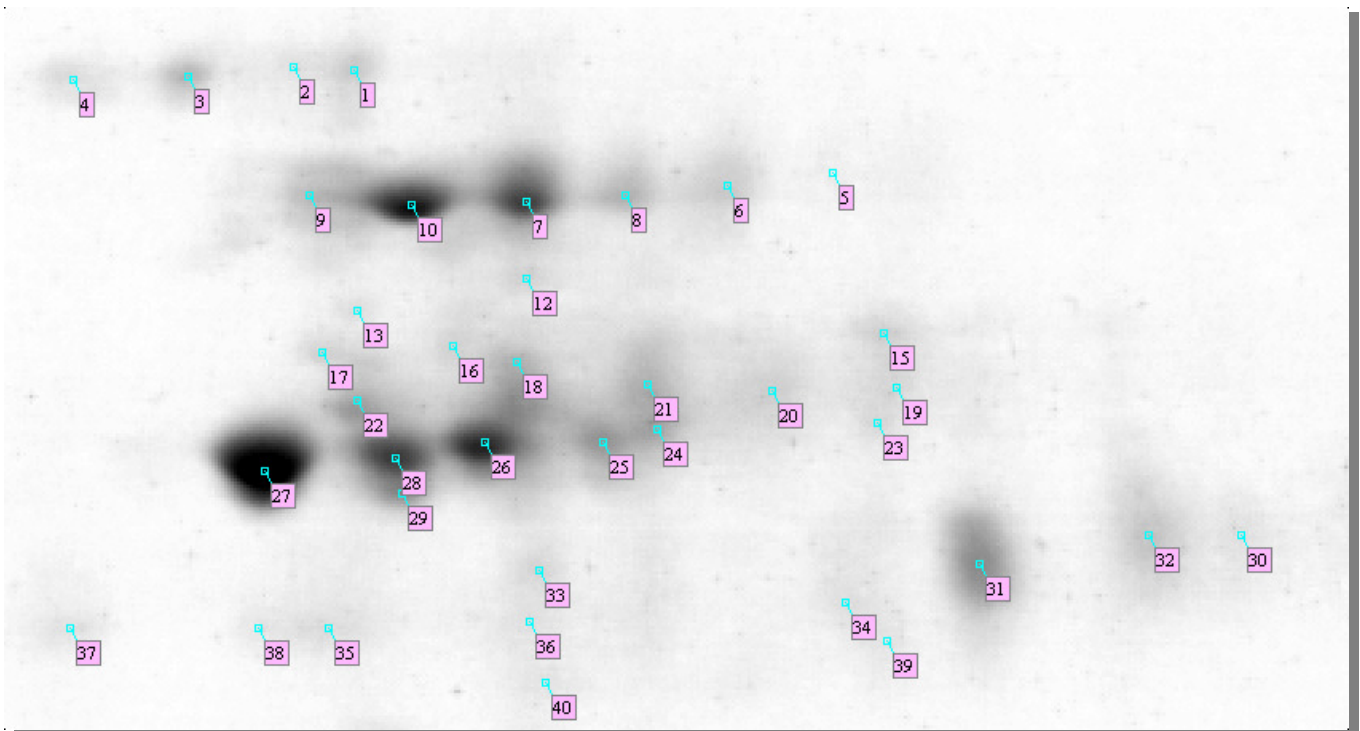


Abb.19: Schnitt 7 der senilen Probe. Die Orientierung ist wie folgt: von links nach rechts = abnehmender pH ; von oben nach unten = abnehmendes Molekulargewicht

SpotID	Pi	Mw	Area	Vol	%Vol	Zuordnung
1	7.00000	28	4.97494	43.2548	1.69529	β B1
2	7.13571	28	3.80647	21.1193	0.827730	β B1
3	7.37143	28	3.07529	34.1305	1.33768	β B1
4	7.62857	28	3.96418	25.4714	0.998301	β B1
5	5.92857	27	4.33694	10.6572	0.417689	
6	6.16429	26	8.49467	78.6235	3.08149	
7	6.61429	26	5.79932	174.723	6.84791	β B2
8	6.39286	26	5.65595	72.9882	2.86063	
9	7.10000	26	5.87100	83.2390	3.26239	β B2
10	6.87143	26	4.49465	178.237	6.98565	β B2
12	6.61429	25	2.46596	12.8969	0.505468	
13	6.99286	25	1.48388	5.48214	0.214862	
15	5.81429	25	3.93551	31.0515	1.21700	
16	6.77857	24	3.43371	26.9009	1.05433	
17	7.07143	24	2.94625	27.2623	1.06849	
18	6.63571	24	3.34052	37.0170	1.45081	
19	5.78571	24	4.89609	31.9948	1.25397	
20	6.06429	24	10.7958	96.9215	3.79865	
21	6.34286	24	3.74196	46.5540	1.82459	
22	6.99286	24	4.02153	59.8057	2.34397	
23	5.82857	-	2.48030	14.4932	0.568031	
24	6.32143	-	3.60576	62.3907	2.44528	
25	6.44286	-	3.11113	41.3934	1.62233	
26	6.70714	-	8.53052	285.611	11.1940	
27	7.20000	-	5.55559	362.654	14.2135	α B2
28	6.90714	-	3.62009	124.711	4.88780	
29	6.89286	23	2.13621	52.8063	2.06964	
30	5.01429	22	6.07889	28.0581	1.09968	α A1

31	5.60000	-	7.08248	158.000	6.19250	$\alpha\Lambda 2$
32	5.22143	22	11.0610	105.449	4.13287	$\alpha\Lambda 1$
33	6.58571	-	4.24375	26.5871	1.04203	
34	5.90000	-	5.46240	29.3691	1.15106	$\alpha\Lambda 2$
35	7.05714	-	10.0001	51.9552	2.03628	
36	6.60714	-	5.71329	31.7030	1.24254	
37	7.63571	-	6.03588	24.4149	0.956893	
38	7.21429	-	3.10396	14.2726	0.559385	
39	5.80714	21	3.33335	15.0644	0.590419	$\alpha\Lambda 2$
40	6.57143	21	5.38354	24.2099	0.948859	

Tab. 3: Auswertung der Probe Schnitt 7 der senilen Linse. Mw in kDA.

3.2.3.2 Die innere Kernregion

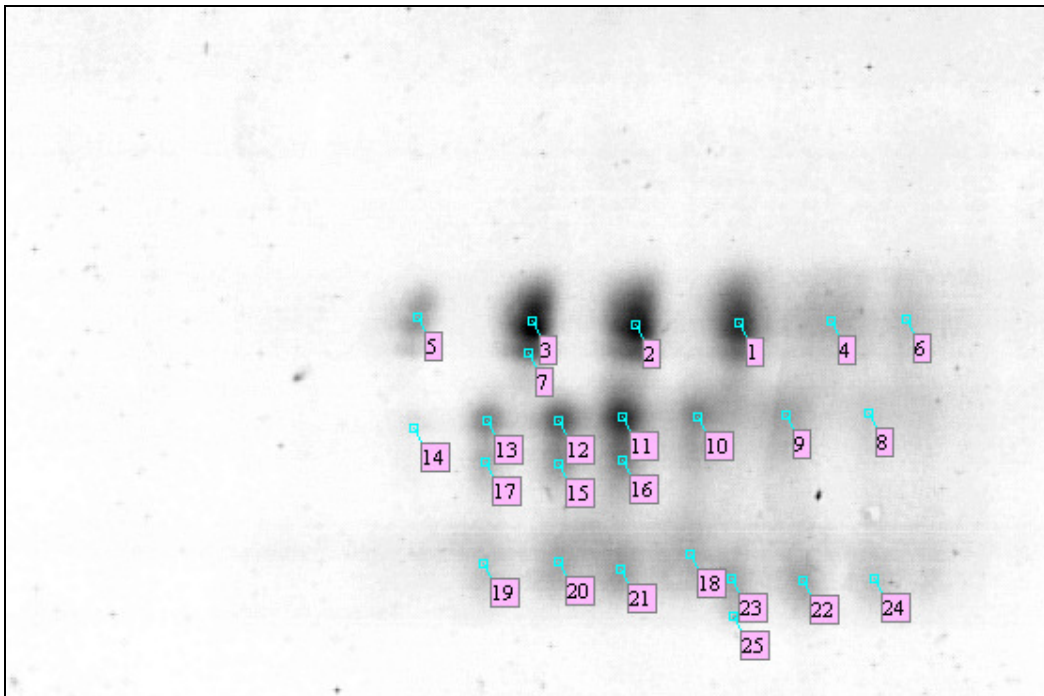


Abb. 20: Schnitt 4 der senilen Linse

Die Orientierung ist wie folgt: von links nach rechts = abnehmender pH ; von oben nach unten = abnehmendes Molekulargewicht

SpotID	Pi	Mw	Area	Vol	%Vol
1	4,98	26	13,4553	196,565	9,08556
2	5,47542	26	11,1327	212,914	9,84127
3	6,01	26	6,68104	146,921	6,79092
4	4,51789	26	20,6453	150,219	6,94339
5	6,6029	26	7,0323	54,8614	2,53579
6	4,10737	26	11,19	41,6103	1,9233
7	6,02944	25	3,19715	42,9538	1,9854
8	4,31263	23	8,65238	25,4895	1,17817
9	4,76421	23	14,1936	74,4954	3,4433
10	5,15467	23	15,5556	122,604	5,66699
11	5,54346	23	8,26528	127,865	5,91014
12	5,87393	23	5,71329	77,1541	3,5662
13	6,24327	23	5,6201	51,1494	2,36421
14	6,62234	23	7,62728	12,1264	0,560504
15	5,87393	22	5,56992	48,2799	2,23158
16	5,54346	22	5,80649	53,6697	2,4807
17	6,25299	22	5,66312	32,8385	1,51785
18	5,19355	19	18,5736	141,933	6,56038
19	6,26271	19	14,4445	67,5629	3,12287
20	5,87393	19	11,4338	94,1736	4,35287
21	5,55318	19	12,9463	138,528	6,40299
22	4,67184	19	15,2044	99,2154	4,58591
23	4,97972	19	6,9176	51,5842	2,38431
24	4,28184	19	19,5628	89,002	4,11382
25	4,97	18	1,96417	9,76982	0,451578

Tab. 4: Die Nummerierung der spots folgt der oben stehenden Abb. 17.

Die spots liegen im pH-Bereich von 6,62 bis 4,11. Sie sind im Gegensatz zu den Regionen des Cortex (Schnitte 1,2,6 und 7) um ca. 1 pH-Wert ins saure verschoben. Eine Zuordnung einzelner spots zu Kristallin-subunits war nicht möglich.

3.3 Vergleich

Für den Vergleich zwischen fetaler Linse und seniler Linse wurden zum einen die Ergebnisse der fetalen Versuchsreihe, zum anderen die Ergebnisse verwendet, die aus den Untersuchungen der wasserlöslichen Proteinfraction der senilen Linse stammten.

3.3.1 Projektion zweier 2D-PAGE-Gele von fetaler und seniler Linse

Die unten stehende Abbildung zeigt die Projektion zweier Gele. Bei dem blauen Gel handelt es sich um das Referenzgel der fetalen Reihe Gel 11, bei dem roten um Schnitt 2 der senilen Probe. Die Überlagerung der spots ist durch eine Dunkelfärbung sichtbar gemacht.

Zu erkennen ist, dass die α B2-Fraktion und die β B2-Fraktion weitgehend übereinstimmen. Die β B1-, β A1-, β A4-, γ C- sowie die γ D-Fraktion sind in der senilen Linse entweder gar nicht mehr oder nur gering vertreten. Bei der α A-Fraktion besteht eine graduelle Übereinstimmung.

Weiterhin lässt sich die Zunahme von Kristallinkomponenten in der senilen Linse verzeichnen, die in einem Bereich von I_p 6,4-6,6 und einem Molekulargewicht von 23 kDa liegen. Sie sind in der Grafik mit x gekennzeichnet.

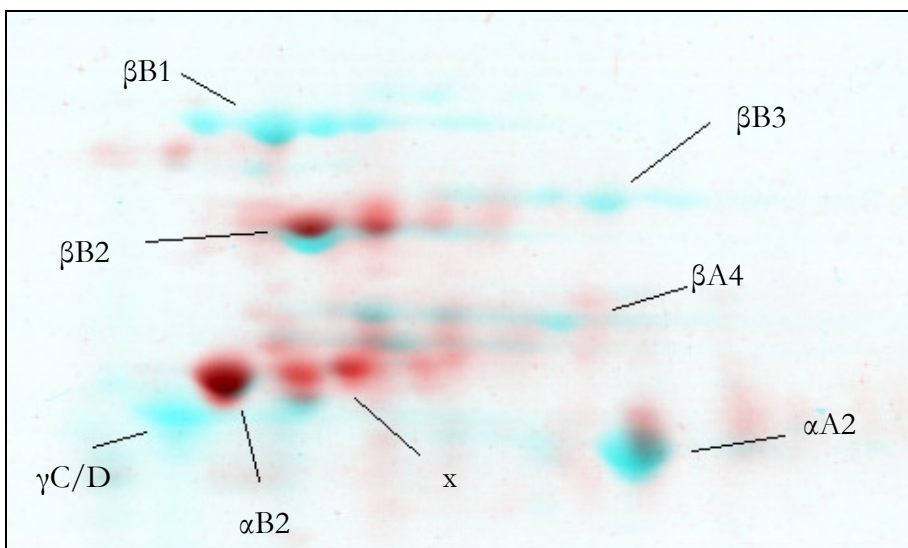


Abb. 21: Übereinanderprojektion von fetalem Gel (blau) und senilem Gel (rot). Die Überschneidungen sind dunkel gefärbt.

3.3.2 3-Dimensionale Darstellung

Mit Hilfe des Melanie-Programms war es möglich, 3-D-Modelle der Gele zu entwerfen.

Abb. 22 zeigt das Gel der senilen Probe „Schnitt 7“ und Abb. 23 das Gel der fetalen Probe 7. Die bereits oben diskutierten Veränderungen stellen sich hier sehr schön bildlich dar.

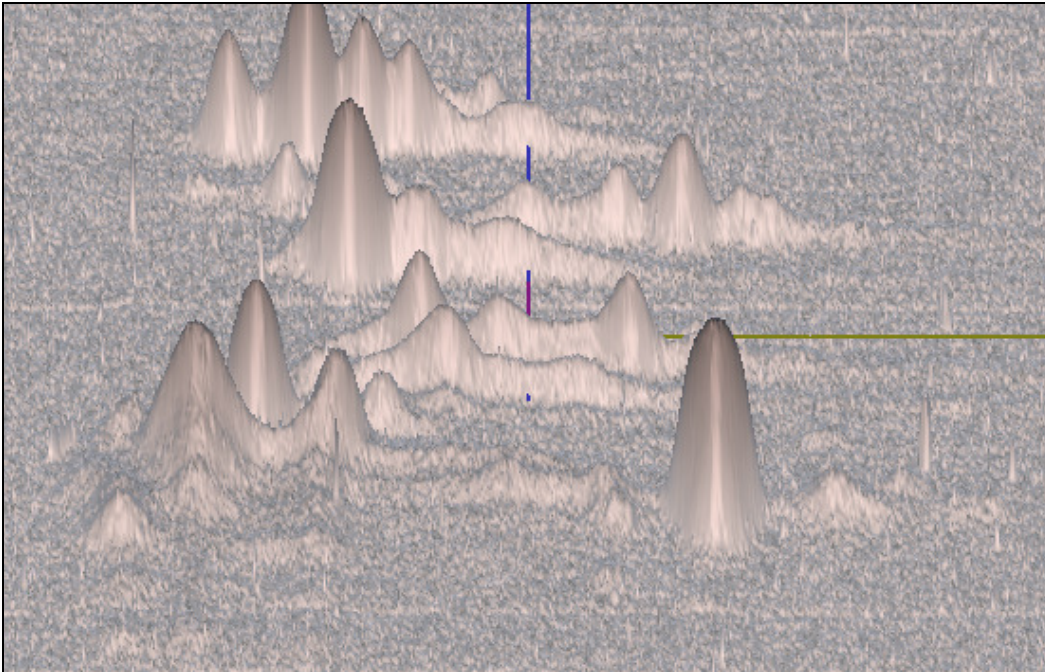


Abb. 22: 3D-Darstellung der fetalen Probe 2. Die Orientierung ist wie folgt: von links nach rechts = abnehmender pI ; von oben nach unten = abnehmendes Molekulargewicht

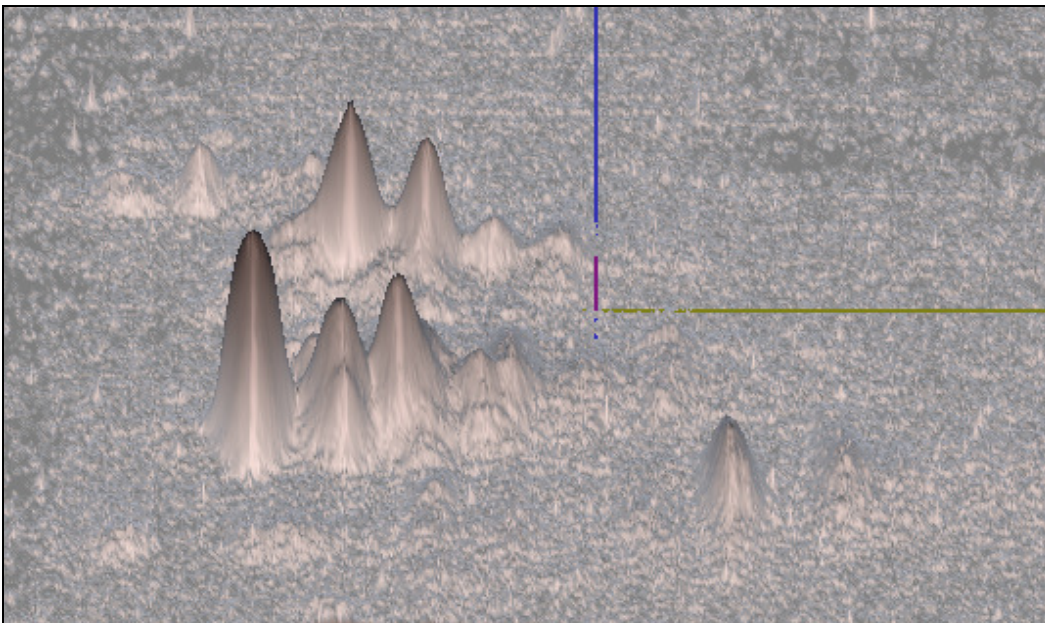
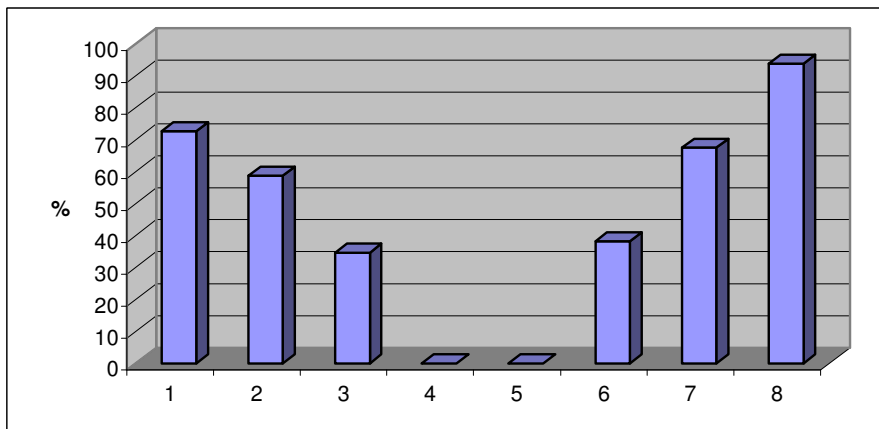


Abb. 23: 3D-Darstellung der senilen Probe Schnitt 7. Deutlich erkennbar sind die α A- und α B-Fraktion rechts bzw. links unten und die β 2-Fraktion im Mittelteil. Orientierung wie oben.

3.3.3 Quantitative Auswertung

Die Kristalline der fetalen Linse ermöglichen aufgrund ihrer charakteristischen pH-Werte und Molekulargewichte die Klassifizierung zu den bekannten Kristallin-Untereinheiten. Nur etwa 10 % aller spots sind posttranslational verändert und unklassifizierbar. Bei den ältesten Regionen der Linse (Schnitte 3-5) sind die Kristallin-Proteinstrukturen bereits so stark modifiziert, dass in den Gelen ein komplett verändertes Proteinmuster vorliegt. Die spots innerhalb des Proteinmusters waren nicht zuordbar. Bei den Schnitten der neueren Regionen, der anterioren und posterioren Rindenregion, sind die altersabhängigen Modifizierungen weit geringer ausgeprägt und es ist eine bessere Zuordnung erreichbar. Die posttranslationalen Veränderungen im Kern der senilen Linse machen eine Klassifizierung der Kristalline durch die 2D-Gelelektrophorese unmöglich. Zu einer weiteren Unterscheidung gelänge man durch eine Aminosäuresequenzbestimmung oder durch Immunfluoreszenz-Elektrophorese. Diese Methoden ermöglichen eine genauere Bestimmung der einzelnen Proteine, jedoch ist deren Durchführung sehr teuer.



Tab. 5: prozentualer Anteil des unmodifizierten Kristallins, 1-7 entsprechen den Schnitten 1 bis 7; 8 entspricht dem Referenzgel der fetalen Reihe Gel 11.

Die quantitativen Veränderungen der senilen Linsenkristalline gehen auch aus Tab. 6 hervor. Hierbei wird deutlich, dass bei den Schnitten der jüngeren Regionen (anteriore Region Schnitt 1,2 und 3 und posteriore Region Schnitt 6 und 7) insbesondere die β B1, β B3 und β A4 und die γ C- und γ D-Fraktion kaum oder überhaupt nicht mehr vorhanden waren.

Group ID	M_w	P_i	Probe 11	Schnitt 1	Schnitt 2	Schnitt 3	Schnitt 4	Schnitt 5	Schnitt 6	Schnitt 7
	529	6,7671	1,1771							
	629	7,1400	6,7966							0,1142
	729	7,4741	4,6280							
βB1			12,6017	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1142
	828	6,9012	0,6858		1,1921	0,8273				1,7875
	928	7,5865	1,4688							0,8974
	1028	7,2513	1,7245		0,9328	0,2019			0,3001	1,2755
βB1(16-251)			3,8790	0,0000	2,1250	1,0292	0,0000	0,0000	0,3001	3,9604
	1427	6,3260	0,6142							
	1626	6,8368	9,8423	11,8372	8,2579	2,8983			5,3807	6,4096
	1726	6,5969	3,1432	9,5634	5,8801	8,4903			11,5350	6,3194
	1827	6,3724	1,9414	2,0264	2,1926	1,5629			2,0581	2,0908
βB2			15,5412	23,4270	16,3306	12,9515	0,0000	0,0000	18,9738	14,8198
	1227	5,7300	2,4866							
	1327	5,4303	0,8685	0,4121						
	1527	5,9312	1,0418	2,2082					4,8126	0,3787
βB3			4,3970	2,6203	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	4,8126	0,3787
	2025	5,5788	0,3399							
	2225	5,2929	0,2720							0,3199
	2525	5,5553	0,8572							
	2625	5,8848	2,0690							
βA4			3,5381	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,3199
	2425	6,5969	2,9156	2,4861	2,5990	3,9886				1,0023
	3024	6,5349	2,8980	12,7171	7,3707	4,3004				10,7488
γS/βA1			5,8136	15,2032	9,9697	8,2890	0,0000	0,0000	0,0000	11,7511
	3523	7,1800	8,4420	10,0133	9,8819	2,0471			3,8386	12,7168
	4222	6,9424	0,9393	1,1174	0,7257					
αB2			9,3812	11,1307	10,6075	2,0471	0,0000	0,0000	3,8386	12,7168
	3224	7,9400	0,9060							
	4123	8,1667	0,3193							
	4723	7,5346	12,7612		0,4109					
ΓC			13,9865	0,0000	0,4109	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

	48	21	7,9400	1,4237	0,2322	0,5314					0,9823
	51	21	7,8733	1,8453			0,1989				
	53	19	7,8867	0,3888							
ΓD				3,6578	0,2322	0,5314	0,1989	0,0000	0,0000	0,0000	0,9823
	43	22	5,6022	13,1885	4,7278	0,9696	3,0365				5,9676
	44	22	5,9622	1,0974		0,3915					0,9323
	49	21	5,9312	0,2927	0,9299	1,0075				4,0030	
AA2				14,5785	5,6578	2,3685	3,0365	0,0000	0,0000	4,0030	6,8998
	33	24	5,2071	0,2526							
	39	23	4,8986	0,5891		0,6271	1,0603				1,2259
	45	22	5,1386	1,6048	1,3537	2,0466	2,2685				4,2908
AA1				2,4464	1,3537	2,6737	3,3288	0,0000	0,0000	0,0000	5,5166
βA3(23-215)	27	24	6,9506	2,4729	1,6318	1,9249	1,3014	0,0000	0,0000	1,9794	2,0634
AB1	34	24	6,7130	1,5392	11,4101	11,8802	2,4701			4,3776	8,0055
Summe				93,8331	72,6668	58,8224	34,6525	0,0000	0,0000	38,2851	67,5285

Tab. 6: : Auswertung der einzelnen Schnitte der senilen Linse im Vergleich zu Probe 11 der fetalen Linsen. Mw in kDA.

4 Diskussion

4.1 Die fetale Linse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe der hochauflösenden 2D-Gelelektrophorese zu neuen Erkenntnissen über die Kristalline und deren Verteilung in der menschlichen fetalen Linse zu gelangen. Hierzu wurden insgesamt 14 fetale Linsen untersucht. Die verwendeten Linsen zeigten keine Katarakt, sie stammten von Föten, die abgetrieben wurden oder kurz nach der Geburt verstarben. Ein weiteres Ziel der Arbeit war es darzustellen, welche neuen Möglichkeiten sich durch die Verwendung eines Software-gestützten Analyseprogramms in der Auswertung und im Vergleich von Proteinmustern ergeben.

Voraussetzung für die Funktionalität der Linse ist eine komplexe morphologische und biochemische Organisation. Auf molekularer Ebene sind die α -, β - und γ -Kristalline in Form von gerichteten Kristallininteraktionen ein wesentlicher Faktor für die Stabilität und die Transparenz der Linse. Die Unterteilung der Kristalline in die α -, β - und γ -Fraktion geht bereits auf Arbeiten von Mörner zurück, der diese Ende des 19ten Jahrhunderts auf Grund ihres Löslichkeitsverhaltens unterteilte. Viele Arbeiten sind seitdem angefertigt worden, die sich mit Form und Funktion der Kristalline beschäftigen. Ein besonderes Interesse galt hierbei stets den Veränderungen während des Alterns.

Man ist sich heute allgemein einig, dass die Modifikationen, denen die Kristalline im Laufe des Alterns unterworfen sind, einen erheblichen Einfluss auf die physikalischen Eigenschaften der Linse haben. Modifikationen entstehen durch postsynthetische Veränderungen wie Aggregation, Ausbildung von kovalenten Bindungen, Deamidierung, Degradation des Carboxyterminus, Oxidation oder Glycosylierung. Es konnte auch gezeigt werden, dass fehlerhafte Prozesse auf der Ebene der Proteinsynthese, wie veränderte Transkription der DNA und translationsassoziierte Vorgänge, wie alternatives "Splicing" der m-RNA und Einbau falscher Aminosäuren während des Alterns der Linse zunehmen.

Die Untersuchung der Proteinstrukturen der Linse wurde über einen langen Zeitraum hauptsächlich mit eindimensionalen elektrophoretischen Methoden geführt. Mitte der 70iger Jahre ging man hiervon über zu 2-dimensionalen Verfahren, die eine viel genauere Aufteilung erlaubten (Kibbelaar and Bloemendahl, 1975). Man beschäftigte sich zunehmend mit der Topographie der Linsenproteine auf 2-dimensionalen Gelen und erreichte eine immer genauere Unterteilung der großen Fraktionen α , β und γ in kleinere Kristallin-subunits. Die Position der meisten subunits auf 2-dimensionalen Gelen

ist inzwischen bekannt. Dies ist im Besonderen den Arbeiten von Datiles et al. 1992 und Bloemendahl et al. 1997 zu verdanken.

In der vorliegenden Arbeit wurden 14 fetale humane Linsen und eine senile Linse mittels 2D-Gelelektrophorese untersucht. Die hochauflösende 2D-Gelelektrophorese ist das derzeit genaueste Trennverfahren in der elektrophoretisch geführten Proteinanalyse. Mit der computergestützten Bildanalyse-Software „Melanie“ wurden die 2D-Gele ausgewertet und miteinander verglichen.

K. Lampi identifizierte 1997 die maßgeblichen Kristalline in der fetalen Linse als αA , αB , $\beta A1$, $\beta A3$, $\beta A4$, $\beta B1$, $\beta B2$, $\beta B3$, γS , γC und γD . Diese 11 Kristallin-subunits machen in der fetalen Linse über 90 % des Gesamtkristallins aus. Die Molekulargewichte, isoelektrischen Punkte wie auch die Aminosäuresequenz aller 11 Kristalline sind bekannt. Man kann also sagen, dass der Schritt hin zu einer Landkarte der Kristalline in jüngster Zeit vollzogen wurde.

Basierend auf diesen Informationen wurde mit der vorliegenden Arbeit der Versuch unternommen, die quantitativen Aussagen über die Kristalline in den vorhergegangenen Arbeiten näher zu beleuchten.

Aus der Gesamtheit der 14 untersuchten fetalen Linsen ergibt sich eine Verteilung des α -, β - und γ -Kristallin von 26%; 42,4% und 21,2%. Diese Angaben korrespondieren mit früheren Ergebnissen.

Lampi et al. (1997) beziffern bei ihren Untersuchungen an einer einzelnen fetalen Linse die Beträge auf 27,7% , 42,5% und 27,5%. Die Zuordnung der einzelnen Kristallin-spots zu den Gruppen der α , β und γ -Kristallinen erfolgte aus Angaben der Literatur. Insbesondere die Arbeiten von Lampi et al. (1997,1998) und von Bloemendahl et al. (1997) wurden für die Identifizierung herangezogen. Die Möglichkeit einer Aminosäure-Sequenzierung der einzelnen spots war im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht möglich. Es muß zu bedenken gegeben werden, dass mit Hilfe dieser Methode noch eine weitaus genauere Unterscheidung der Kristallin-subunits möglich ist.

Im Durchschnitt konnten 90,3 % der Kristallin-spots den 11 bekannten Kristallinsubunits zugeordnet werden. 9,7 % der editierten spots auf den 2D-Gelen waren nicht klassifizierbar.

Hierbei handelt es sich um posttranslational veränderte oder degenerierte Kristalline. Es konnte gezeigt werden, dass deren Anteil mit zunehmenden Alter der Linse stetig steigt.

Für die Verteilung der einzelnen Kristallin-subunits wurden folgende Werte gefunden:

Kristallin-subunit	%	M.S.D
α B2	9,38	2,25
α A2	13,21	1,51
α A1	1,90	0,52
α B1	1,47	0,80
β B1	14,60	3,25
β B1(16-251)	3,27	1,57
β B2	14,23	2,49
β B3	4,69	0,78
β A4	3,93	1,01
β A3(23-215)	1,75	1,00
γ S/ β A1	5,95	1,23
YC	12,97	2,35
YD	2,93	1,16
Total	90,29	

Tabelle 7: Prozentuale Verteilung der Kristallin-subunits
 N=14; die verbleibenden 9,71 % des Gesamtproteins konnten nicht identifiziert werden. Es handelte sich um spots mit einem jeweiligen Prozentvolumen unter 0,5.

4.2 Aussagekraft und Vergleichbarkeit der ermittelten Kristallinverteilungen:

Statistische Untersuchungen zur Vergleichbarkeit von Gelen aus humanen fetalen Linsen unterschiedlicher Spender lagen bisher nicht vor. Mit dieser Arbeit wurde erstmalig der Versuch unternommen, mit Hilfe von Reihenuntersuchungen (n=14) zu statistischen Aussagen über die Verteilung der Linsenkristallin-subunits in 2D-Gelen zu gelangen.

Bei der Untersuchung der Linsen wurde besonderer Wert auf eine systematische Versuchsdurchführung gelegt. Die 2-dimensionalen Gele wurden nach dem stets gleichbleibenden Verfahren hergestellt, um Versuchsfehler so gering wie möglich zu halten. Die statistische Auswertung wurde mit der „Melanie“-Software der Firma Genebio durchgeführt. Eine im Jahre 2000 angefertigte Studie beschäftigte sich mit der Vergleichbarkeit von 2D-Elektrophorese-Gelen mit Hilfe der Melanie-Software. Die Autoren fertigten 49 2D-Gele parallel von einer gemeinsamen Probe an (Voss et Haberl 2000).

Vergleichbar zu der vorliegenden Arbeit wurden pro Gel 20-40 spots als Landmarken, besonders markante Kristallin-spots, die als Parameter für den Vergleich von unterschiedlichen Gelen dienen, markiert. Ein Gel wurde als Standard-Gel definiert. Die durchschnittliche Korrelation dieser Gele betrug zum Standard-Gel 0,89 (Standardabweichung 0,04). Eine Erhöhung der verwendeten Landmarken brachte keine Verbesserung der Korrelation. Es konnte gezeigt werden, dass von durchschnittlich 2170 spots pro Gel lediglich 8,9% der spots zu Gruppen zusammengefasst werden konnten, die auf jedem der 49 Gele vorkamen. Weiter zeigte sich bei 20 % aller spots, vorwiegend kleineren spots, eine Abweichung in ihren Farbintensitäten von einem Faktor von mehr als 2.

Diese Studie zeigt die Grenzen der Software-gestützten Auswertung von 2D-Gelen auf und macht deutlich, dass bei komplexen Proteinmustern eine 100%ige Übereinstimmung zweier Gele bei gleichem Probenmaterial nicht erreicht werden kann. Eigene Untersuchungen am hiesigen Institut zur Vergleichbarkeit ergaben ähnliche Ergebnisse. Verglichen wurden 8 Gele einer identischen Probe. Die Korrelation der einzelnen Gele betrug zwischen 0,78 bis 0,94 (Ergebnisse nicht dargestellt). Die 14 humanen fetalen Linsen im Alter zwischen 4 und 9 Monaten zeigten in den 2D-PAGE-Gelen eine Korrelation in den Proteinmustern zwischen 0,674 und 0,981 bei einem Mittelwert von 0,88 (Standardabweichung 0,07).

Dieser Wert lässt den Rückschluss zu, dass eine hohe Homogenität in der quantitativen und qualitativen Verteilung der Proteine in den humanen fetalen Linsen bestand. Sie trägt den besonderen Anforderungen der Linse an Stabilität und Lichttransparenz Rechnung. Die Zusammensetzung der einzelnen Kristalline scheint genau determiniert zu sein. Die Kristallininteraktionen, die sich hieraus ergeben, sowohl physiologischer als auch pathologischer Art, führen zu einer räumlich gerichteten Vernetzung der Kristalline. Hierbei spricht man von einem funktionellen Kristallincluster (Ahrend 2005).

4.3 Vergleich der Proteinverteilung von fetaler und seniler Linse

In der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin eine senile Linse untersucht und mit den Ergebnissen aus der fetalen Untersuchung verglichen.

Diese Linse stammte von einem 71 Jahre alten Spender. Sie zeigte keine Anzeichen einer Katarakt. Die Linse wurde in insgesamt 7 Schnitte geteilt. Diese Schnitttechnik erlaubte zusätzlich zum Vergleich der senilen Linse mit den fetalen Linsen (interspezifisches Altern) ein Vergleich der einzelnen Schichten der Linse untereinander (intraspezifisches Altern). Ein Vergleich dieser Schnitte

ergab eine hohe Divergenz der Kernschnitte zu den Schnitten der äußeren Regionen. Alle Kristallin-subunits nahmen quantitativ in der wasserlöslichen Fraktion mit zunehmendem Alter ab. Sie wurden in das altersabhängige wasserunlösliche Produkt inkorporiert (Bours et al. 1989). Die Zuordbarkeit der im Gel vorhandenen spots reichte von etwa 73 % bei Schnitt 1 bis zu einem Minimum von 0 % bei Schnitt 4. Die Abnahme der Zuordbarkeit liegt begründet in der posttranslationalen Modifikation der Linsenproteine. Diese ist in den ältesten Regionen der Linse am stärksten ausgeprägt (Bours et al. 1991). Im Verlauf des Alterungsprozesses nimmt der Anteil an posttranslational veränderten Proteinen stetig zu. Dies konnte an den einzelnen Schnitten der senilen Linse gezeigt werden. Im Gegensatz zu den Gelen der fetalen Linse, wo die einzelnen Kristallin-subunits gut über ihre Masse und den pH-Wert einzuordnen waren, wiesen die Gele der Kernregionen keine klar definierten spots auf (Kristallin-inhomogenität). Die spots waren zu einem niedrigeren pH-Wert hin verschoben.

4.3.1 Die Rindenregionen

Absolut betrachtet nehmen im Laufe des Alterungsprozesses alle Kristallin-subunits innerhalb der wasserlöslichen Fraktion einer Linse ab (Bours et al. 1977, Srivastava et al. 1999, 2003). Hierbei läuft der Übergang in die wasserunlösliche Fraktion je nach Kristallin-subunit verschieden schnell ab. Sie besitzen eine unterschiedliche Aktivität zur Aggregationsbildung (Ahrend 2005). In der wasserlöslichen Fraktion der senilen Linse zeigte sich prozentual im Vergleich zu den fetalen Linsen eine deutliche Abnahme des hochmolekularen β B1 und β B3 sowie des β A4, γ C, γ D und des α A. Eine prozentuelle Zunahme zeigte sich bei der β B2- und α B-Fraktion. Auffällig war weiterhin eine Zunahme von Kristallinkomponenten im Bereich von Ip 6,4 bis 6,6 mit einem Molekulargewicht von 23 kDa. Hierbei scheint es sich um γ S-Kristallin zu handeln.

Bours et al. (1991) berichteten über ein Sinken des pH-Werts bei den γ -Kristallinen durch posttranslationale Modifikation und über die Zunahme des γ S-Kristallins. Das γ S-Kristallin macht mengenmässig den größten Anteil an γ -Kristallinen in den älteren Teilen der senilen Linse aus.

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass in der senilen Linse über 80 % des vorhandenen γ -Kristallins auf das γ S-Kristallin entfallen (Siezen et al. 1983, Augusteyn 1987, Lampi et al. 1997). Ein Großteil des γ -Kristallins ist im Laufe des Alterungsprozesses in den wasserunlöslichen Proteinkomplex integriert worden. Von Bedeutung scheint hierbei insbesondere eine Inkorporation in den α -Kristallin-Großkomplex zu sein (Chaudhuri, 1998). Die γ C- und γ D-Fraktion sind in der senilen Linse kaum noch vorhanden. Das γ S-Kristallin scheint eine geringe

Tendenz zur Vernetzung zu besitzen. Dies liegt wahrscheinlich an seiner posttranslationalen Modifikation (Bours et al. 1991).

Auch die Abnahme des α A und die Zunahme des α B wurden bereits dokumentiert (Swamy and Abraham, 1991). Die α -Kristalline zählen zu den am genauesten untersuchten Kristallinen. Ihre quantitative Verteilung variiert jedoch je nach Studie. Swamy et al. (1991) beziffern die Verteilung bei einer postnatalen Linse auf 23 % für das α B und 69 % für das α A (Die restlichen 8 % entfallen auf modifiziertes α -Kristallin). Lampi et al. (1997) geben eine vergleichbare Verteilung von 23 % für das α B und 77 % für das α A an. Die Verteilung in der vorliegenden Arbeit beträgt in der fetalen Linse 42 % für das α B- und 58 % für das α A-Kristallin. Im Verlauf des Alterns kommt es zu einer relativen Abnahme des α A- und zu einer relativen Zunahme des α B- Kristallins. Die prozentuelle Verteilung von α A und α B an der Gesamtheit des zuzuordnenden Proteins in den einzelnen Gelen stellt sich wie folgt dar:

	Fetale Linse	Schnitt 1	Schnitt 2	Schnitt 6	Schnitt7
α B2	9,3815	11,1307	10,6075	3,8386	12,7168
α B1	1,4715	11,4101	11,8802	4,3776	8,0055
gesamt	10,8530	22,5408	22,4877	8,2162	20,7223
α A2	13,2143	5,6578	2,3685	4,003	6,8998
α A1	1,8970	1,3537	2,6737	0	5,5166
gesamt	15,1113	7,0115	5,0422	4,003	12,4164

Tab. 8: Prozentuale Verteilung der α -Kristallin subunits in den einzelnen Gelen.

Die α -Kristalline spielen eine wichtige Rolle bei der gerichteten Vernetzung zu hochmolekularen Kristallinkomplexen (Ahrend 2005). Das α A-Kristallin scheint eine höhere Aktivität bei der Aggregationsbildung zu besitzen als das α B-Kristallin. Es bildet schneller hochmolekulare Kristallinkomplexe, die in die wasserstoffunlösliche Fraktion überwechseln. Die Gründe hierfür sind weitestgehend unbekannt. Es wird postuliert, dass die höhere Glycolisierung des α A-Kristallins hierbei eine Rolle spielt (Swamy and Abraham, 1991).

4.3.2 Die Kernregionen

Die Kernregion setzt sich aus den Schnitten 4 und 5 zusammen.

In den Kernschnitten konnten keine spots in die bekannten Kristallingruppen klassifiziert werden. Auffällig war die Verschiebung des Proteinspektrums hin zu saureren pI's und niedrigeren Molekulargewichten. Die spots lagen im pH-Bereich von 6,62 bis 4,11. Sie waren im Gegensatz zu den Regionen des Cortex (Schnitte 1,2,6 und 7) um ca. 1 pH-Wert ins Saure verschoben. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit bisherigen Forschungsarbeiten (Bours 1980, Bindels et al. 1983, Alcalá et al. 1988, Datiles et al. 1992, Lampi et al. 1997) . Es handelt sich um akkumulierende Proteinkomplexe, die durch Deaminierungsprozesse im Zuge der Alterung entstanden sind. Bei vorherigen Arbeiten zeigten sich ebenfalls ein Verlust von höhermolekularen Kristallinkomponenten wie dem β B1 und eine Zunahme von niedermolekularen Strukturen (Lampi et al. 1998; Srivastava 2003). Die Zunahme von niedermolekularen, modifizierten β -Kristallinen und eine Verschiebung zu saureren Ip wurde bereits von Datiles et al. (1992) berichtet. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Wie deutlich wurde, haben insbesondere im Kern der senilen Linse die Kristalline eine starke posttranslationale Modifikation erfahren. Es ist bekannt, dass es im Laufe des Alterns zu einer Vernetzung von Kristallinen kommt (Chaudhuri 1997, Ahrend 2005). Dem α -Kristallin scheint hierbei eine besondere Rolle bei der Aggregation zuzukommen. Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der Anteil der α A-Kristallin-subunit im Vergleich zu der α B-Kristallin-subunit im nicht vernetzten wasserlöslichen Teil mit dem Alter sinkt. Dies spricht für die bereits beobachtete Eigenschaft des α A-Kristallins als Aggregationsbildner.

Durch die hier gewonnenen Erkenntnisse über die exakte Verteilung der Kristalline in der fetalen Linse und der Vergleich mit einer senilen Linse, lassen sich die Theorien zur Kataraktogenese und zum Alterungsprozess der Proteine, die diese Geschehnisse als Ergebnis von posttranslationalen Veränderungen, gerichteter und ungerichteter Vernetzung ansehen, stützen und bestätigen.

Die Kataraktogenese ist ein multifaktorielles Geschehen (Hockwin 1983). Die Kristalline als Strukturproteine tragen maßgeblich zur Funktionalität der Linse und zu ihrer Lichttransparenz bei. An der Regulation sind jedoch auch noch zahlreiche weitere Systeme, wie z. B. das Phosphofruktokinase- oder das Glutathionsystem beteiligt. Auf deren Einfluss konnte in der vorliegenden Arbeit nicht eingegangen werden. Es ist anzunehmen, dass protektive Enzymsysteme einen positiven Einfluss auf die Integrität der Kristallinstrukturen ausüben. Dieses spezielle Thema gäbe Anlass zu weiteren Forschungsarbeiten.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden 14 fetale humane Linsen mittels 2D-Gelelektrophorese untersucht. Die hochauflösende 2D-Gelelektrophorese ist das derzeit genaueste Trennverfahren in der elektrophoretisch geführten Proteinanalyse. Mit der Software Melanie wurden diese Gele ausgewertet und miteinander verglichen. Es zeigte sich eine hohe Übereinstimmung in den Proteinmustern aller untersuchter Linsen. Dies wurde deutlich in der ermittelten Korrelation der Gele zueinander von 0,88. In der Diskussion wurde ausführlich auf die statistische Verwertbarkeit dieser Korrelation eingegangen. Das Gel der fetalen Probe 11 wurde als Referenzgel festgelegt. Zu diesem wiesen die übrigen Gele eine Korrelation zwischen 0,783 und 0,983 auf. Die Zuordnung der Proteine auf den 2D-Gelen erfolgte anhand der pH-Werte und Molekulargewichte. Mit Hilfe von speziellen Markern, die bei der Elektrophorese mitliefen, war es möglich, ein pH-Wert/Molekulargewichts-Raster zu erstellen. So konnten jedem Protein genau ein pH-Wert und ein Molekulargewicht zugeordnet werden. Die Proteinmuster wurden weiterhin mit vergleichbaren 2D-Gelen aus bereits publizierten wissenschaftlichen Studien verglichen und die darin vorgeschlagene Einteilung der Kristalline wurde übernommen. Die quantitative Verteilung betrug im Mittel 26 % für das α -, 42,4 % für das β - und 21,2 % für das γ -Kristallin in der humanen fetalen Linse. Etwa 10 % der Proteine konnten nicht zugeordnet werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit bereits veröffentlichten Ergebnissen an einzelnen fetalen Linsen. Mit Hilfe von standardisiert durchgeführten Reihenuntersuchungen konnten diese Ergebnisse erstmals nachhaltig statistisch präzisiert werden. Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine senile Linse mit denselben Versuchsmethoden analysiert. Diese Linse wurde in 7 Schichten eingeteilt. Es konnten somit sowohl Vergleiche zwischen den einzelnen Schichten der senilen Linse als auch Vergleiche der Schichten zu den fetalen Linsen geführt werden.

Es zeigte sich eine hohe Inhomogenität in den einzelnen Schichten der Linse. In dem älteren Teil der Linse, dem Nucleus, war es nicht möglich, Proteine ohne weiterführende immunfluoreszente Verfahren oder mittels Aminosäuresequenzbestimmung den Kristallingruppen zuzuordnen. Auffällig war die Verschiebung des Proteinspektrums hin zu saureren pI's und niedrigeren Molekulargewichten. Die spots lagen im pH-Bereich von 6,62 bis 4,11. Sie waren im Gegensatz zu den Regionen des Cortex um ca. 1 pH-Wert ins Saure verschoben.

In den jüngeren Schichten, dem anterioren und posterioren Kortex, konnten ein Großteil der Proteine aufgrund des pH-Werts und der Molekulargewichte in die Fraktionen des α -, β - und γ -Kristallin eingeteilt werden. Maximal konnten 72,6 % der Proteinstrukturen zugeordnet werden.

Prozentual zeigte sich eine deutliche Abnahme des hochmolekularen β B1 und β B3 sowie der Fraktionen des β A4, γ C, γ D und des α A. Eine Zunahme zeigte sich bei der β B2- und α B-Fraktion. Auffällig war weiterhin eine Zunahme von Kristallinkomponenten im Bereich von Ip 6,4 bis 6,6 mit einem Molekulargewicht von 23 kDa; hierbei handelt es sich vermutlich um γ S-Kristallin. Die γ C- und γ D-Fraktion sind in der senilen Linse kaum noch vorhanden.

Die vorliegende Arbeit zeigt die Möglichkeiten auf, die sich durch die Kombination der 2D-Gelelektrophorese mit einer softwaregestützten Bildanalyse ergeben. Kataraktinduzierende Faktoren wie Strahlung oder bestimmte Medikamente führen zu einer Trübung der Linse, welche sich auch im Proteinmuster widerspiegelt. Unter der Voraussetzung der gleichbleibenden Versuchsdurchführung ließen sich selbst geringfügige Veränderungen im Proteinmuster mit der verwendeten Software signifikant darstellen. Zahlreiche Anwendungsgebiete sind für das in dieser Arbeit vorgestellte Verfahren denkbar. So ließen sich z. B. in einer nachfolgenden Studie Veränderungen in der Verteilung posttranslational modifizierter Proteine, verursacht durch eine erhöhte Glucosekonzentration, wie sie beim Diabetes Mellitus auftreten, mit Hilfe der vorgestellten Methodik darstellen (Ahrend et al. 2004). Mit 14 untersuchten Linsen aus menschlichen Föten im Alter von drei bis neun Monaten haben wir den bislang größten Stichprobenumfang an standardisiert durchgeführten 2-D-Elektrophorese-Gelen für dieses Gewebe erreicht. Die Kombination von 2D-Gelelektrophorese mit computergestützter Bildanalyse bietet eine Grundlage für weitere Analyseverfahren. Vor allem die Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) und die Aminosäuresequenzbestimmung ließen sich weiterführend anwenden. Diese Verfahren bieten die Möglichkeit, posttranslationale Veränderungen durch die Bestimmung der Molekülmasse exakt zu bestimmen (Harrington et al. 2004).

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb. = Abbildung

Aq. = Aqua = Wasser

Bidest. = Bidestilliert = zweifach destilliert

D = Dalton

Dest. = destilliert

HM = hochmolekulares α -Kristallin

IEF = Isoelektrische Fokussierung

IP = IEP = pI = isoelektrischer Punkt

kD = kiloDalton

LTFG = Linsnteilfrischgewicht

MG = Molekulargewicht

Min. = Minute

Nr. = Nummer

SDS = Natriumdodecylsulfat

U = Urea = Harnstoff

2D-PAGE = zweidimensionale PolyAcrylamid-Gelelektrophorese

7 Literaturverzeichnis

Ahrend MHJ, Bours J, Fodisch H J.

Water-soluble and -insoluble crystallins of the developing human fetal lens, analysed by agarose/polyacrylamide thin-layer isoelectric focusing.

Ophthalmic Res 1987; 19: 150-156

Ahrend MHJ.

Gerichtete Vernetzung bei Linsenkrystallinen: Modelle für funktionserhaltendes Altern.

Diss Med Fak Bonn 2005; Seite 58 ff.; noch unveröffentlicht

Alcala J, Katar M, Rudner G, Maisel H.

Human beta crystallins: regional and age related changes.

Curr Eye Res 1988; 7:353-359

Augusteyn R, Koretz J.

A possible structure for alpha-crystallin.

FEBS Letters 1987; 222: 1-5

Bhadra Chaudhuri I.

Charakterisierung des wasserlöslichen Alpha-Kristallin-Großkomplexes der Rinderlinse in Abhängigkeit vom Lebensalter.

Diss Med Fak Bonn 1998; Seite 55 ff.

Berbers GA, Hoekman WA, Bloemendal H, de Jong WW, Kleinschmidt T,

Braunitzer G.

Homology between the primary structures of the major bovine beta-crystallin chains.

Eur J Biochem 1984; 15:467-479

Bessems GHJ, Bours J, Hofmann D, Födisch HJ.

Molecular mass distribution of water-soluble crystallins from the human foetal lens during development.

J Chromatogr 1990; 529: 277-286

Bindels JG, Bours J, Hoenders HJ.

Age-dependent variations in the distribution of rat lens water-soluble crystallins. Size fractionation and molecular weight determination.

Mech Ageing Dev 1983; 21: 1-13

Bloemendal H, Van de gaer K, Benedetti EL, Dunia I, Steely HT.

Towards a human crystallin map. Two-dimensional gel electrophoresis and computer analysis of water-soluble crystallins from normal and cataractous human lenses.

Ophthalmic Res 1997; 29:177-90

Bloemendal H.

The vertebrate eye lens.

Science 1977; 197: 127-138

Bloemendal H.

The lens proteins.

In: Bloemendal H, Hrsg. Molecular and cellular biology of the eye lens.

New York-Chichester-Brisbane-Toronto: Wiley and Sons; 1981: 1-47

Bours J.

Isoelectric focusing of lens crystallins in thin layer polyacrylanride gels. A method for detection of soluble proteins in eye lens extract.

J Chromatogr 1971; 60: 225-233

Bours J, Brahma SK.

Isoelectric focusing of embryonic cow lens crystallins.

Exp Eye Res 1973; 16: 131-42

Bours J.

Isoelectric focusing of lens crystallins.

In: Righetti PG, Hrsg. Progress in isoelectric focusing and isotachophoresis.

Amsterdam: North Holland Publ Co. 1975: 235-256

Bours J, Hockwin O.

Charakterisierung der wasserlöslichen Proteine der Linse mittels Immunologie und Isoelektrofokussierung und ihre Beziehung zum Alterungsprozess.

Klin Mbl Augenheilk 1977; 170:51-59

Bours J.

Species specificity of the crystallins and the albuminoid of the ageing lens.

Comp Biochem Physiol 1980; 65 B: 215-222

Bours J, Hofmann D, Fodisch HJ, Hockwin O.

Crystallin profiles of human foetal and adult lens microsections and of young compared to adult whole lens, analyzed by agarose isoelectric focusing.

Ophthalmic Res 1989; 21: 326-327

Bours J, Ahrend MHJ, Breipohl W.

The presence of beta-, beta s- and gamma-crystallins in the water-insoluble crystallin complex of the ageing bovine lens- In: Vrensen GFJM, Clauwaert J, Hrsg. Eye lens membranes and ageing.

Enrage 1991; 15: 341-349

Bours J.

Calf lens alpha-crystallin, a molecular chaperon, builds stable complexes with beta s- and gamma-crystallins.

Ophthalmic Res 1996; 28 (suppl I): 23-31

Boyle D, Takemoto L.

Characterisation of the alpha-gamma and alpha-beta complex:

Evidence for an in vivo functional role of alpha-crystallin as a molecular chaperon.

Exp Eye Res 1994; 58: 9-16

Cann JR.

Multiple electrophoretic zones arising from protein-buffer interaction.

Biochemistry 1966; 5: 1108-1112

Chirgadze IuN, Nevskaia NA, Sergeev IuV, Fomenkova NP.

Evolutionary conservatism of the molecular structure of gamma-crystallins of vertebrates.
Mol Biol (Mosk) 1987; 21: 368-376

Datiles MB, Schumer DJ, Zigler JS Jr., Russell P, Andersen L, Garland D.

Two-dimensional gel electrophoretic analysis of human lens proteins.
Curr Eye Res 1992; 11: 669-677

Delcour J, Bouchet H.

Evidence for a post-translational origin of subunit alphas1 in the bovine lens alpha-crystallin.
Exp Eye Res 1978; 26: 191-195

Dodemont HJ, Andreoli PM, Moormann RJ, Ramaekers FC, Schoenmakers JG, Bloemendal H.

Molecular cloning of mRNA sequences encoding rat lens crystallins.
Proc Natl Acad Sci U S A 1981; 78: 5320-5324

Driessen HP, Herbrink P, Bloemendal H, de Jong WW.

Primary structure of the bovine beta-crystallin Bp chain. Internal duplication and homology with gamma-crystallin.
Eur J Biochem 1981; 121: 83-91

Harding JJ, Dilley KJ.

Structural proteins of the mammalian Lens: A review with emphasis on changes in development, ageing and cataract.
Exp Eye Res 1976; 22: 1-73

Haargaard B, Wohlfahrt J, Fledelius HC, Rosenberg T, Melbye M.

Incidence and cumulative risk of childhood cataract in a cohort of 2.6 million Danish children.
Invest Ophthalmol Vis Sci 2004; 45:1316-1320

Harrington V, McCall S, Huynh S, Srivastava K, Srivastava OP.

Crystallins in water soluble-high molecular weight protein fractions and water insoluble protein fractions in aging and cataractous human lenses.

Mol Vis 2004; 10:476-489

Hockwin O.

Trübungen der Augenlinse.

Spektrum der Wissenschaft 1983; 9: 8-37

Horwitz J.

Alpha-Crystallin can function as a molecular chaperon.

Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 10449-10453

Horwitz J, Emmons T, Takemoto L.

The ability of alpha-crystallin to protect against heat induced aggregation is age-dependent.

Curr Eye Res 1992; 11: 817-822

Inana G, Piatigorsky J, Norman B, Slingsby C, Blundell T.

Gene and protein structure of a beta-crystallin polypeptide in murine lens: relationship of exons and structural motifs.

Nature 1983; 302: 310-315

Ingolia TD, Craig EA.

Four small Drosophila heat shock proteins are related to each other and to mammalian alpha-crystallin.

Proc Natl Acad Sci U S A 1982; 79: 2360-2364

Jedziniak JA, Arredondo M, Andley K.

Oxidative damage to human lens enzymes.

Curr Eye Res 1987; 6: 345-351

Kibbelaar MA, Bloemendal H.

Fractionation of the water-soluble proteins from calf lens.

Exp Eye Res 1979; 29: 679-688

Kuwabara T.

The maturation of the lens cell. A morphologic study.

Exp Eye Res 1975; 20:427-443

Lampi KJ, Ma Z, Shih M, Shearer TR, Smith JB, Smith DL, David LL.

Sequence analysis of betaA3, betaB3, and betaA4 crystallins completes the identification of the major proteins in young human lens.

J Biol Chem 1997; 272 :2268-2275

Lampi KJ, Ma Z, Hanson SR, Azuma M, Shih M, Shearer TR, Smith DL, Smith JB, David LL.

Age-related changes in human lens crystallins identified by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry.

Exp Eye Res 1998; 67: 31-43

Lindquist S, Craig EA.

The heat shock proteins.

Annual Rev Genet 1988; 22: 631-677

Lubsen NH, Aarts HJ, Schoenmakers JG.

The evolution of lenticular proteins: the beta- and gamma-crystallin super gene family.

Prog Biophys Mol Biol 1988; 51: 47-76

Ma Z, Hanson SR, Lampi KJ, David LL, Smith DL, Smith JB.

Age-related changes in human lens crystallins identified by HPLC and mass spectrometry.

Exp Eye Res 1998; 67: 21-30

McCarty CA, Mukesh BN, Dimitrov PN, Taylor HR.

Incidence and progression of cataract in the Melbourne Visual Impairment Project.
Am J Ophthalmol 2003; 136: 10-17

Meakin P, Sander LM.

Comment on "Active zone of growing clusters: Diffusion-limited aggregation and the Eden model".
Phys Rev Lett 1985; 54: 2053

Meakin P, Family F.

Structure and dynamics of reaction-limited aggregation.
Phys Rev A 1987; 36: 5498-5501

Mörner CT.

Untersuchung der Proteinsubstanzen in den lichtbrechenden Medien des Auges.
Z Physiol Chem 1894; 18: 61-106

Ohrloff C, Hockwin O, Holstege A.

Proceedings: Glycogen metabolism in bovine lenses.
Exp Eye Res 1973; 17: 401

Palmer WG, Papaconstantinou J.

Increase in the complexity of alpha-crystallins during differentiation of lens cells.
Nature 1968; 219: 170-172

Palmer WG, Papaconstantinou J.

Aging of alpha-crystallins during development of the lens.
Proc Natl Acad Sci U S A 1969; 64: 404-410

Piatigorsky J.

Lens crystallins and their gene families.
Cell 1984; 38: 620-621

Quax-Jeuken Y, Driessen H, Leunissen J, Quax W, Jong WW de, Bloemendal H.

Beta s-crystallin: structure and evolution of a distinct member of the beta gamma-superfamily.
EMBO J 1985; 4: 2597-2602

Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, Kocur I, Pararajasegaram R, Pokharel GP, Mariotti SP.

Global data on visual impairment in the year 2002.
Bull World Health Organ 2004; 82: 844-851

Righetti PG.

Preparative isoelectric focusing.
Separation and Purification Methods 1975; 4: 23-72

Rink H, Bours J, Hoenders HJ.

Guidelines for the classification of lenses and the characterisation of lens proteins.
Ophthalmic Res 1982; 14: 284-291

Ruttenberg G.

The insoluble proteins of bovine crystalline lens.
Exp Eye Res 1965; 159: 18-23

Schmidt R, Thews G. (Hrsg.)

Physiologie des Menschen.
Heidelberg: Springer, 1985: Seite 254

Shapira AL, Vinuela E, Maizel JV.

Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.
Biochim Biophys Res Commun 1967; 28: 815-822

Siezen RJ, Owen EA, Kubota Y, Ooi T.

Structural homology of lens crystallins. II. Homology expressed by correlation coefficients and hydrophathy profiles.

Biochim Biophys Acta 1983; 748: 48-55

Smelser GK.

Embryology and morphology of the lens.

Invest Ophthalmol 1965; 44: 398-410

Srivastava OP, Srivastava K.

BetaB2-crystallin undergoes extensive truncation during aging in human lenses.

Biochem Biophys Res Commun 2003; 301: 44-49

Srivastava OP, Srivastava K, Harrington V.

Age-related degradation of betaA3/A1-crystallin in human lenses.

Biochem Biophys Res Commun 1999; 258: 632-638

Summers LJ, Slingsby C, Blundell TL, den Dunnen JT, Moormann RJ, Schoenmakers JG.

Structural variation in mammalian gamma-crystallins based on computer graphics analyses of human, rat and calf sequences. 1. Core packing and surface properties.

Exp Eye Res 1986; 43: 77-92

Stewart-Brown SL, Haslum MN.

Partial sight and blindness in children of the 1970 birth cohort at 10 years of age.

J Epidemiol Community Health 1988; 42: 17-23

Stoll C, Alembik Y, Dott B, Roth MP.

Epidemiology of congenital eye malformations in 131,760 consecutive births.

Ophthalmic Paediatr Genet 1992; 13: 179-186

Swamy MS, Abraham EC.

Reverse-phase HPLC analysis of human alpha crystallin.

Curr Eye Res 1991; 10: 213-220

Trifonova N, Kalaydjiev S, Stamenova M, Trifonova R, Breipohl W.

Porcine eye lens crystallins: antigenic similarity with human crystallins and tool for the detection of anti-crystallin antibodies.

Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2002; 240: 777-781

van Dam AF.

Purification and composition of beta-s-crystallin.

Exp Eye Res 1966; 5: 255-266

van der Ouderaa FJ, de Jong WW, Bloemendal H.

The amino-acid sequence of the alphaA2 chain of bovine alpha-crystallin.

Eur J Biochem 1973; 39: 207-222

Varma SD, Devamanoharan PS, Morris S.

Oxygen and light as risk factors in senile cataract development: Experimental studies-In: Sasaki K, Hockwin O, Hrsg. Distribution of cataracts in the population and influencing factors.

Dev Ophthalmol; Karger, Basel, 1991; 21:162-169

Vassileva P, Jankova-Parvova T.

Clinical study on cataractogenic risk factors

In: Hockwin O, Sasaki K, Leske MC, Hrsg. Risk factors for cataract development.

Dev Ophthalmol; Karger, Basel, 1989; 17:101-105

Vesterberg O, Svensson H.

Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH gradients. IV. Further studies on the resolving power in connection with separation of myoglobins.

Acta Chem Scand 1966; 20: 820-834

Voss T, Haberl P.

Observations on the reproducibility and matching efficiency of two-dimensional electrophoresis gels: consequences for comprehensive data analysis.

Electrophoresis 2000; 21: 3345-3350

Weber K, Osborn M.

The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

J Biol Chem 1969; 244: 4406-4412

Wistow GJ, Piatigorsky J.

Lens crystallins: the evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue.

Annu Rev Biochem 1988; 57: 479-504

8 Danksagung

Danken möchte ich allen, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertationsschrift unterstützt haben.

Herrn Prof. Winrich Breipohl danke ich für die Überlassung des Themas und die Zurverfügungstellung der benötigten Mittel. Ich danke Herrn Prof. Winrich Breipohl auch für die jederzeit freundliche und hilfreiche Unterstützung. Sein Engagement beschränkte sich nicht nur auf die Anfertigung dieser Dissertationsschrift, sondern ging weit darüber hinaus.

Besonderen Dank möchte ich Herrn Michael Ahrend aussprechen, der mich geduldig und stets freundlich in die Grundlagen der experimentellen Methoden einführte und mir bei allen Fragen zur Verfügung stand.

Für die lebenswürdige Bereitschaft zur Durchsicht der Arbeit möchte ich Frau Anneliese Kotschmar ganz herzlich danken.