

Das Altern von Augenlinsenkrystallinen als  
Grundlage für die Hypothese der  
Quintärstruktur von Proteinen.

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades (Dr.rer.nat)  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von  
Dipl.Biol. Michael H.J. Ahrend  
aus Siegburg

März 2006

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Rheinischen-Friedrich Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Professor Dr. med. Winrich Breipohl
2. Referent: Professor Dr. rer.nat. Wolfgang Alt

Tag der Promotion: 10. Juli 2006

Müset im Naturbetrachten  
Immer eins wie alles achten:  
Nichts ist drinnen, nichts ist draußen;  
Denn was innen, das ist außen.  
So ergreift ohne Säumnis  
Heilig öffentlich Geheimnis.

Freuet euch des wahren Scheins,  
Euch des ernstesten Spieles;  
Kein Lebendiges ist Eins,  
Immer ist's ein Vieles.

Goethe 1819, Epigramm

# Inhaltsangabe

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Ziel.....	1
1.2	Die Linse.....	2
1.3	Entwicklung der Augenlinse .....	3
1.4	Anatomische Besonderheiten des Teleostierauges im Vergleich zum Säugetierauge .....	4
1.5	Struktur von Proteinen und Proteinfaltung .....	6
1.5.1	Sekundärstrukturelemente .....	7
1.5.2	Supersekundärstrukturelemente .....	8
1.5.3	Domänen, Tertiär- und Quartärstruktur.....	8
1.5.4	Proteinfaltung.....	8
1.6	Chaperone und Heat-shock-proteine .....	8
1.7	Biochemische Zusammensetzung der Linse.....	10
1.8	Die Kristalline der Augenlinse .....	11
1.8.1	$\alpha$ -Kristallin.....	11
1.8.2	$\beta$ - Kristalline .....	14
1.8.3	$\beta$ <sub>S</sub> / $\gamma$ <sub>S</sub> -Kristallin.....	14
1.8.4	$\gamma$ -Kristalline.....	14
1.8.5	Bi- funktionale Kristalline.....	15
1.8.6	Das wasserunlösliche Kristallin (Albuminoid).....	16
1.9	Altersbedingte Veränderungen der Linsenproteine .....	16
1.10	Die Katarakt.....	18
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
2.1	Herkunft der Proben.....	19
2.2	Präparation .....	19
2.3	Regionale Teilung von Linsen .....	19
2.3.1	Bonner Schneidetechnik.....	19
2.3.2	Konzentrisches Rühren .....	20
2.4	Gewinnung von wasserlöslichen Kristallinen und Albuminoid .....	20
2.5	Isolierung des $\alpha$ - Kristallin aus den Linsen von Kälber und Lachsen .....	20
2.6	Proteinbiochemische Analyseverfahren für Linsen Kristalline .....	21
2.6.1	Elektrophorese.....	21
2.6.1.1	Polyacrylamid- Gelelektrophorese (PAGE).....	21
2.6.1.2	Prinzip der Isoelektrofokussierung (IEF).....	22
2.6.1.3	SDS-PAGE .....	23
2.6.1.4	Zweidimensionale Elektrophorese .....	23
2.6.2	Ionenaustauschchromatographie .....	24
2.6.3	Gelfiltrations- Chromatographie .....	24
2.6.4	Immunelektrophorese.....	25
2.7	Einfluß von Harnstoff auf die Linsen Kristalline.....	25
2.8	Einfluß der Temperatur auf das Verhalten der Linsen Kristalline .....	26
2.8.1	Inkubationsversuch I 37°C 24h.....	26
2.8.2	Inkubationsversuch II 0°C.....	26
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>27</b>

<b>3.1</b>	<b>Verteilung biochemischer Linseninhaltsstoffe.....</b>	<b>28</b>
3.1.1	Altersabhängige Verteilung von Protein und Wasser bei Rinderlinsen.....	28
3.1.2	Verteilung von Protein und Wasser bei Lachslinsen.....	29
3.1.3	Verteilung von Protein und Wasser in Sepialinsen .....	30
3.1.4	Verteilung von wasserlöslichem- und wasserunlöslichem Protein in Lachslinsen.....	31
3.1.5	Verteilung von wasserlöslichem- und wasserunlöslichem Protein in Sepialinsen .....	32
<b>3.2</b>	<b>Artspezifische Verteilung der wasserlöslichen Kristalline .....</b>	<b>33</b>
<b>3.3</b>	<b>Die Zusammensetzung des wasserlöslichen Kristallins der Lachslinse.....</b>	<b>35</b>
3.3.1	Native Kristallinverteilung der Linse des Lachses während des Alterns .....	35
3.3.2	Linsenregionale Verteilung der nativen Kristalline des Lachses.....	36
3.3.3	Altersabhängige Polypeptidverteilung der wasserlöslichen Kristalline des Lachses .....	37
3.3.4	2D- Elektrophorese der Rinderlinsen kristalline in Abhängigkeit vom Altern .....	38
3.3.5	2D- Elektrophorese der Kristalline des Lachses in Abhängigkeit vom Altern.....	39
<b>3.4</b>	<b>Gelfiltration (SEC).....</b>	<b>40</b>
3.4.1	Vergleich der Kristallinverteilung bei Farmlachsen und Rindern .....	40
3.4.1.1	Kristallinverteilung bei Lachsen nach Gelfiltration mit Sephacryl S-300 .....	41
3.4.2	Kristallinzusammensetzung nach Trennung mit Sephacryl S-300.....	42
3.4.2.1	Native Isoelektrische Fokussierung der Kristalline .....	42
3.4.2.2	Polypeptidverteilung der chromatographisch getrennten Lachskristalline .....	43
<b>3.5</b>	<b>Alterungsprozeß der wasserlöslichen Kristalline.....</b>	<b>44</b>
3.5.1	Verteilung der wasserlöslichen Kristalline der Lachslinse nach Trennung mit HPLC .....	44
3.5.2	Vergleich der wasserlöslichen- und wasserunlöslichen Kristalline nach Trennung mit IEF.....	45
3.5.3	2- dimensionale IEF .....	46
<b>3.6</b>	<b>2D Page des <math>\alpha</math>-Kristallins vom Kalb und seines Analogons im Farmlachs.....</b>	<b>47</b>
<b>3.7</b>	<b>Einfluß von Urea auf den Faltungsprozeß der Linsen kristalline des Kalbes und Farmlachses.....</b>	<b>49</b>
<b>3.8</b>	<b>Einfluß der Temperatur auf das Verhalten von Kristallinen der Lachslinse.....</b>	<b>51</b>
3.8.1	Harnstoff IEF der temperaturabhängigen Aggregationsprodukte .....	51
3.8.2	Einfluß der Temperatur (4°C) auf isolierte Kristalline der Lachslinse.....	52
<b>3.9</b>	<b>Schutzfunktion des <math>\alpha</math>- Kristallin des Kalbes.....</b>	<b>54</b>
<b>3.10</b>	<b>Immunologische Charakterisierung der Linsen kristalline des Lachses.....</b>	<b>56</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>58</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>Rezepturen.....</b>	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>Chemikalien .....</b>	<b>76</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>78</b>
<b>10</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>80</b>
<b>11</b>	<b>Danksagungen .....</b>	<b>90</b>
<b>12</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>91</b>



## 1 Einleitung

In den neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts ist die bis dahin klassische Biochemie der Augenlinse auf Grund der sich durchsetzenden Molekularbiologie und Genetik stark vernachlässigt worden. Als gegen Ende des Jahrhunderts die Katarakte bei Farmlachsen im Norden Europas dramatisch anstiegen (Ersdal et al. 2001), führte dieses Phänomen dazu, das Thema “ Charakterisierung von Augenlinsen kristallinen“ und die Frage des “Alterns von Linsen kristallinen“ neu zu diskutieren (Ahrend et al. 1999).

Die einzigartige morphologische und biochemische Organisation der Augenlinse macht sie zum idealen Modell zur Erforschung von gerichteten Proteininteraktionen. Diese Proteininteraktionen führen zeitlebens zu sich Selbstorganisierenden hochmolekularen Proteinkomplexen aus Linsen kristallinen, die während des Alterns zu wasserunlöslichen Kristallinkomplexen aggregieren. Eine lebenslange gerichtete und somit funktionale Vernetzung der Kristalline innerhalb des Komplexes führt zu einer sich ständig ändernden räumlichen Struktur. Die Aufgabe des “Faltungskeimes“ bei der Bildung des altersabhängigen Komplexes (Kristallincluster) übernimmt das native  $\alpha$ - Kristallin.

Offen bleibt die Frage, wie es zu der funktionellen Anordnung der Kristalline kommt, welche als Grundlage für die hohe Transparenz der Linse und deren optischen Leistung vorhanden sein muss. Ebenso bleibt es ungeklärt, warum eine hohe Proteinkonzentration, wie sie in der Linse vorliegt, nur im intakten Organ durchsichtig, eine gleichgeartete Proteinlösung im Reagenzglas jedoch trübe ist.

### 1.1 Ziel

Ziel dieser Arbeit ist es, anhand von vergleichenden Untersuchungen der Linseninhaltsstoffe des Lachses und des Rindes, Mechanismen des Alterungsprozesses der Linsen kristalline zu charakterisieren. Am Beispiel der Clusterbildung von Linsen kristallinen soll die Hypothese der “quintären Struktur“ eines Proteins aufgestellt werden.

## 1.2 Die Linse

Die Funktion der Linse liegt in der Fokussierung des Lichtes, so dass ein scharfes Bild der „äußeren Welt“ auf die Retina projiziert werden kann. Die Linse ist aufgrund ihrer funktionellen Spezialisierung ein glasklarer und, je nach Spezies, bikonvexes (Rind) bzw. rundes Organ (Salmoniden). In Bezug auf ihre optische Achse ist sie ein völlig zylometrischer Rotationskörper. Voraussetzung für den Prozess des Fokussierens ist die Transparenz der Linse, welche durch ihre Avaskularität und das Fehlen von Nerven- und Lymphgefäßen gegeben ist. Auf molekularer Ebene bildet das Zusammenspiel von linsenspezifischen Proteinen, den so genannten Kristallinen, die Voraussetzung für die Transparenz der Linse.

Die Linse ist von einer elastischen, überwiegend aus Kollagenen bestehenden Kapsel umgeben. Die am Linsenäquator ansetzenden Zonularfasern verbinden sie mit dem ringförmig verlaufenden Ciliarmuskel. Durch Kontraktion des Ciliarmuskels nimmt die Linse eine kugelähnliche Gestalt an, wodurch ihre optische Brechkraft zunimmt. Eine optimale Nährstoffversorgung der Linse bietet das sie umfließende Kammerwasser (Goodenough 1980). Die metabolischen Voraussetzungen für die lebenslange Transparenz der Linse gewährleistet der überwiegend glykolytisch ablaufende Kohlehydratmetabolismus (Koch et al. 1976).

Die Linse ist ein Organ, das während des ganzen Lebens ständig weiterwächst (s. Abb. 1). Dieses Wachstum ist appositionell (d.h. Anlagerung sich Neubildender Faserzellen an bereits vorhandene). Dies bedingt eine Besonderheit der Linse. Im Zentrum der Linse befinden sich Proteine, welche bereits während des embryonalen Stadiums gebildet wurden und seit diesem Zeitpunkt altern. In der Peripherie sind gegenwärtig synthetisierte Proteine zu finden. Die Linsenproteine unterliegen keinem „turn-over“, sondern ständigen posttranslationalen Modifikationen. Dieser Vorgang ist einzigartig (Bloemendal und Hoenders 1990).

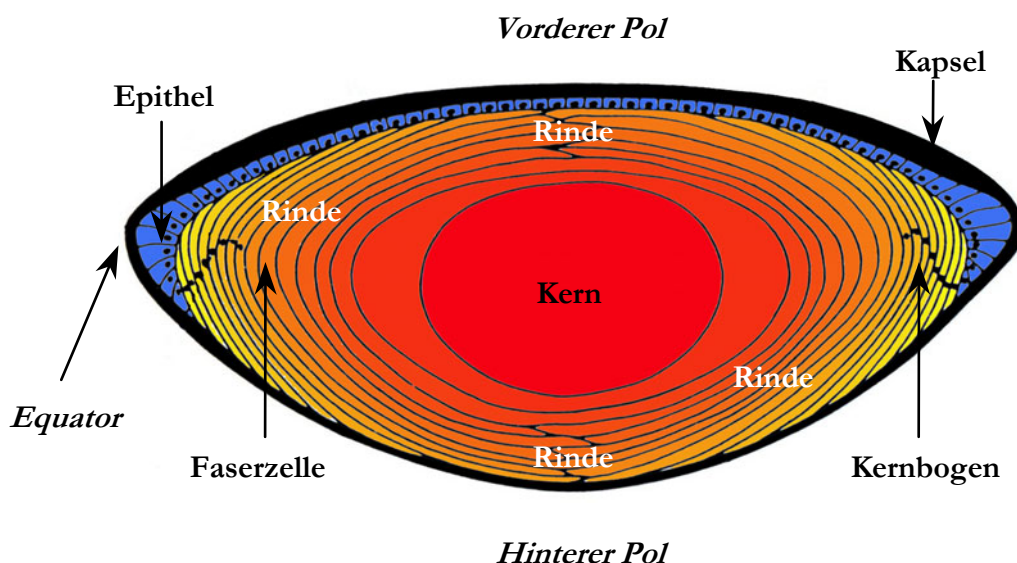


Abbildung 1. Schematischer Querschnitt einer Säugerlinse (Rind)



### 1.3 Entwicklung der Augenlinse

Die Linse der Vertebraten ist ektodermalen Ursprungs und bildet sich durch Einstülpung des Kopfektoderms in den embryonalen Augenbecher (s. Abb. 2). Es kommt zur Abschnürung eines Linsenbläschens, bei dem ein zentraler Hohlraum von einem einschichtigen Epithel umgeben ist. Das über dem Linsenbläschen befindliche Oberflächenektoderm entwickelt sich zur durchsichtigen Hornhaut weiter. An der Hinterwand des Linsenbläschens elongieren die Zellen zu den primären Linsenfasern und füllen zunehmend das Lumen des Linsenbläschens aus. Die Zellen der Vorderwand bleiben als einschichtiges Epithel erhalten und zeichnen sich im Gegensatz zu den Faserzellen durch ihre Teilungsfähigkeit aus. Im Laufe der Entwicklung beschränkt sich deren Proliferation auf die peripheren prä-äquatorialen Zellen des Linsenepithels.

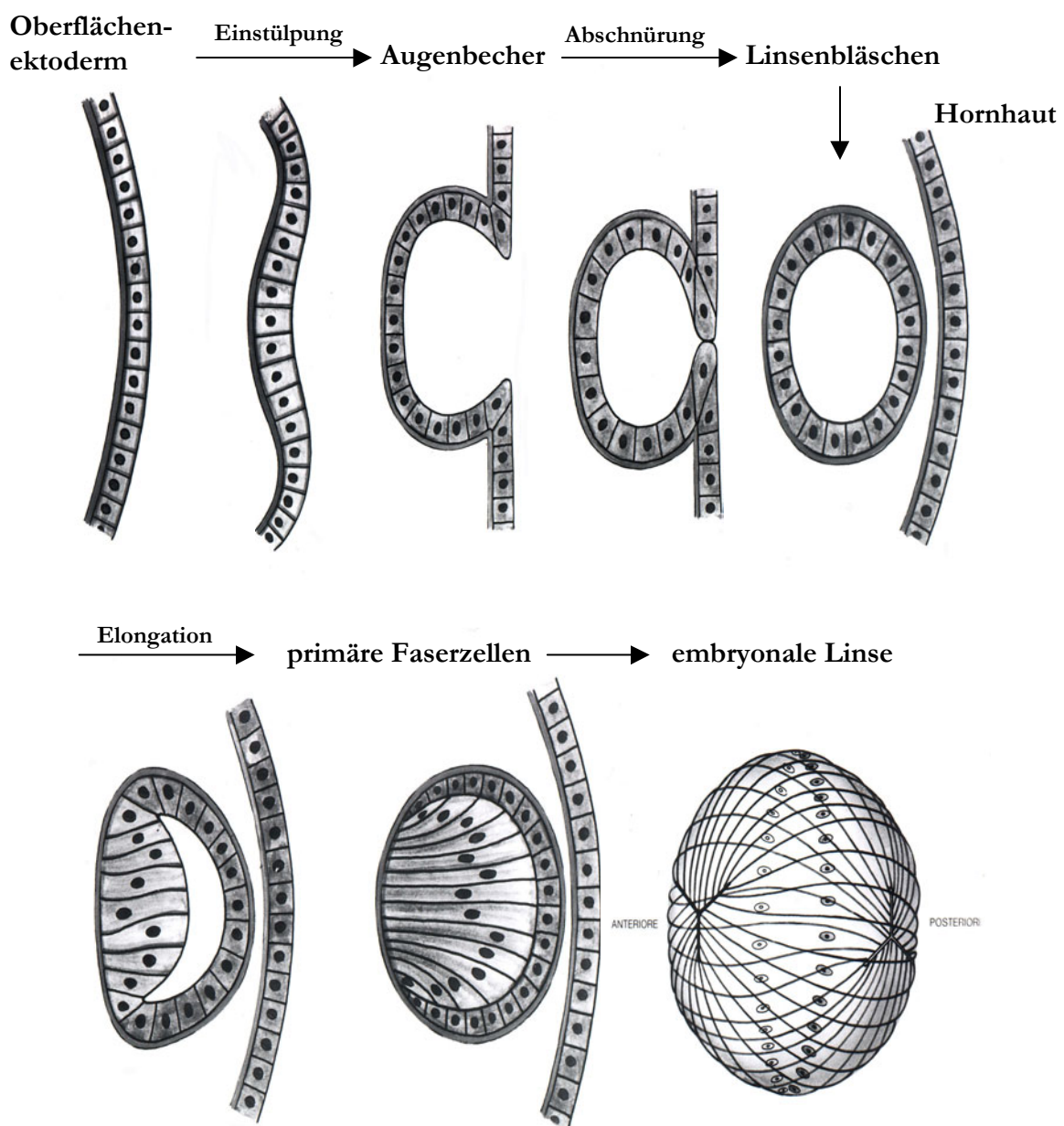


Abbildung 2 Embryonalentwicklung einer Säugeraugenlinse (Oppel 1906)

Nach ein bis zwei Teilungszyklen unterliegen die Zellen dieser germinativen Zone einer morphologischen und biochemischen Differenzierung, bei der die sekundären Linsenfasern entstehen. Hierbei wendet sich die apikale Region der ursprünglichen Epithelzellen dem vorderen Linsenpol zu und die basale Region dem hinteren Pol.

Mit weiterer Elongierung bilden sich die Linsenfasern aus, deren Kerne in einem konvexen Bogen, dem so genannten Kernbogen, aufgereiht sind und mit fortschreitendem Alter, gemeinsam mit anderen Zellorganellen, ihre Funktion und ihren Habitus verlieren. Die sich ständig Neubildenden Faserzellen bilden die Linsenrinde. Sie legen sich, den Jahresringen eines Baumes vergleichbar, um den älteren Linsenkern, wobei die Faserenden jeweils am vorderen und hinteren Pol in Form eines Nahtsystems aufeinander treffen (Harding und Dilley 1976; Koch et al. 1976).

#### **1.4 Anatomische Besonderheiten des Teleostierauges im Vergleich zum Säugetierauge**

In der Systematik der Fische ist das Teleostierauge das höchst entwickelte (s. Abb. 3) (Duke-Elder 1958). Je nach ökologischer Nische gibt es besondere Anpassungen an den Lebensraum Wasser mit seinen speziellen Licht-, Druck-, Temperatur und Widerstandsverhältnissen.

Den Fischen fehlen sowohl Augenlider als auch Tränendrüsen (Millichamp 1991). Die äußeren Augenmuskeln sind rudimentär (Millichamp 1991) und lassen nur unwillkürliche Bewegungen zu, weswegen Fische zum Sehen ihre Körperposition verändern (Duke-Elder 1958; Willcock und Dukes 1989). Die Cornea ist stark abgeflacht, mehrschichtig und nimmt zum Rand hin als Ligamentum anulare an Dichte zu (Millichamp 1991). Die Pupille ist weit geöffnet und wegen rudimentärer Muskeln (Mm. Sphincter und dilator pupillae) nahezu unbeweglich (Millichamp 1991; Bjerkas und Bjerkas 1996). Zum Ausgleich für die fehlende Möglichkeit der Lichtadaptation der Linse besitzen Fische in der Retina ein migrationsfähiges Pigment (retinal melanosomes), welches sich bei vermehrtem Lichteinfall protektiv ausbreitet, bzw. sich bei wenig Licht zurückzieht (Duke-Elder 1958; Millichamp 1991).

Eine Besonderheit des Fischauges stellt der Processus falciformis dar, der in der Nähe der Pappilla nervi optici entspringt und als gefäßreiche Ausstülpung der Chorioidea ventral in den Glaskörper hineinragt. Seine Funktion liegt in der Ernährung der avaskulären Retina via Diffusion. Bei Reptilien übernimmt der Conus, bei Vögeln der Pecten dieselbe Aufgabe. In der Sklera sind Knorpel, bei manchen Arten auch Knochenplatten eingelagert, um dem Auge bei verschiedenen Druckverhältnissen Stabilität zu gewährleisten. Bei Salmoniden verläuft zirkulär ein schmaler Knorpelring (Duke-Elder 1958).

Die Retina der Fische mit ihren Stäbchen und Zapfen steht in ihrem Differenzierungsgrad denen der hoch entwickelten Säuger bemerkenswert nahe. Die silbrig reflektierende äußere Schicht der Aderhaut bezeichnet man als Argenta. Ihre Guaninkristalle enthaltenden Zellen können bis auf die Vorderseite der Iris reichen und dort zusammen mit dem Irispigment zu starker Farbentwicklung führen (Willcock und Dukes 1989; Millichamp 1991).

Der Aufhängeapparat der Fischlinse wird gebildet von dem Ligamentum suspensorium und dem Musculus retractor lentis. Im Gegensatz zur symmetrischen Aufhängung der

Linse der Säugetiere inseriert der Aufhängeapparat an der Fischlinse leicht asymmetrisch nämlich anterior des Äquators (Willcock und Dukes 1989; Millichamp 1991).

Bei Entspannung des Muskulus retractor lentis ist der Fisch kurzsichtig; eine Kontraktion des Muskels bewirkt eine Akkommodation auf Weitsicht. Dabei wird die Linse entlang der optischen Achse (proximo-temporal) verschoben. Diese Lageveränderung ändert den Abstand zwischen Retina und Linse. Die Linsenform (rund) bleibt aufgrund ihrer Größe, der fehlenden, bzw. rudimentären Ciliarmuskeln, v.a. aber wegen ihrer festen, unelastischen Konsistenz unverändert (Duke-Elder 1958).

Bei der Mehrzahl der Säugetiere ist das Auge dagegen in Ruhe auf Weitsicht eingestellt und erst die Akkommodation bewirkt eine Naheinstellung. Hierzu kontrahiert sich der zirkulär verlaufende Musculus ciliaris, reduziert so den Zug der Zonularfasern (Aufhängeapparat) und verursacht damit dank der Elastizität der Linse eine Abrundung der meist bikonvexen Linse. Dieser Vorgang geht mit einer Erhöhung der Brechkraft der Linse einher (Samuelson 1991).

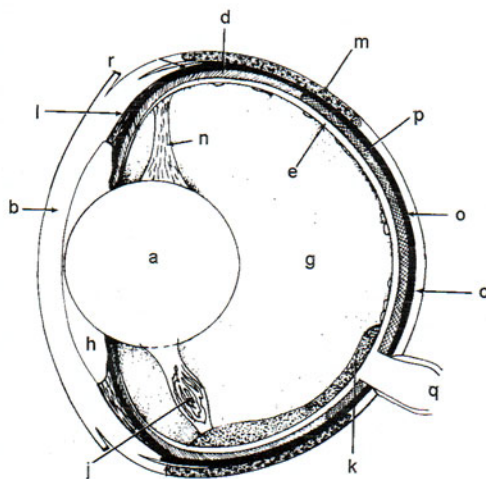


Abbildung 3a

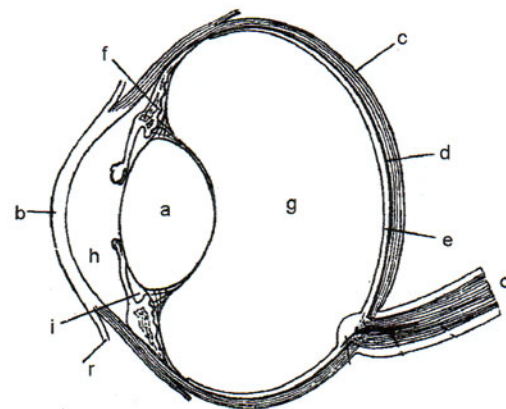


Abbildung 3b

Abbildung 3a. Teleostierauge nach Millichamp 1991; Abbildung 3b. Säugetierauge am Beispiel Pferd (nach Ellenberger-Baum 1974). a = Linse, b = Kornea, c = Sklera, d = Chorioidea, e = Retina, f = Ziliarkörper, g = Glaskörper, h = vordere Augenkammer, i = hintere Augenkammer, j = Musculus retractor lentis, k = Processus falciformis, l = Ligamentum anulare, m = Knorpel der Sklera, n = Ligamentum suspensorium, o = Argenta, p = glandula chorioidea, q = Nervus opticus, r = Konjunktiva

## 1.5 Struktur von Proteinen und Proteinfaltung

Proteine sind lineare Biopolymere aus Aminosäuren. Sie besitzen eine außerordentliche strukturelle Heterogenität, die ihre vielfältigen Funktionen in der Zelle in Form von Strukturelementen, Signalmolekülen, Enzymen, Regulatoren und Rezeptoren bestimmen. Des Weiteren bilden die Proteine so genannte Antikörper, die gegen Strukturen mit fremder genetischer Information gerichtet sind.

Ein Kennzeichen von Proteinen ist ihre definierte dreidimensionale Struktur. Die Funktion ergibt sich aus der Konformation (dreidimensionale Anordnung der Atome in einer Struktur), die durch Aminosäuresequenzen bestimmt wird. Die Peptidbindung (Carbonyl-C-Atom/ Stickstoffatom) besitzt partiellen Doppelbindungscharakter und ist infolgedessen starr und planar. Hingegen zeigt die Einfachbindung des  $\alpha$ -Kohlenstoffatoms ( $C\alpha$ ) mit dem Carbonylsauerstoffatom und dem Stickstoffatom eine große Rotationsfreiheit (s. Abb.4).

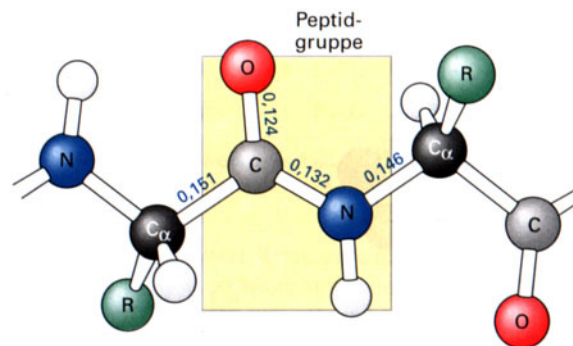


Abbildung 4. Anordnung der Atome eines Dipeptides (Stryer 1996).

Die Reihenfolge der Aminosäuren einer Polypeptidkette bestimmt die Primärstruktur eines Proteins (s. Abb. 5). Verschiedene Regionen der Primärstruktur bilden lokale reguläre Sekundärstrukturelemente, wie alpha Helices oder beta Faltblätter. Solche strukturellen Elemente formen die Tertiärstruktur, indem sie sich zu Einheiten (Domänen) zusammenlagern. Mehrere Tertiärstrukturen arrangieren sich als natives Protein zu einer quarternären Struktur (Branden und Tooze 1999).

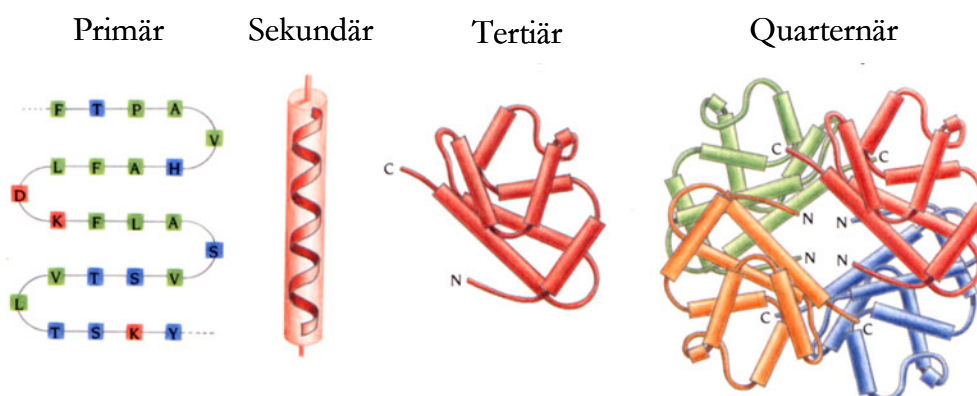


Abbildung 5. Schematische Darstellung der Strukturen eines Proteins (Branden und Tooze 1999).

### 1.5.1 Sekundärstrukturelemente

Die wichtigsten regulären Sekundärstrukturelemente in Proteinen sind die  $\alpha$ - Helix, das parallele und das antiparallele  $\beta$ - Faltblatt.

Die  $\alpha$ - Helix beschreibt eine rechtshändige Spirale, wobei der Carbonylsauerstoff der Aminosäuren eine Wasserstoffbrücke mit der Hauptketten-Amidgruppe der Aminosäure  $n+4$  eingeht (s. Abb. 6) Eine komprimierte Form der  $\alpha$ - Helix bildet die  $3_{10}$ - Helix. Ihr Vorkommen beschränkt sich auf kurze Abschnitte am Ende einer Helix. Hierbei wird die Wasserstoffbrücke zwischen  $n$  und  $n+3$  gebildet.

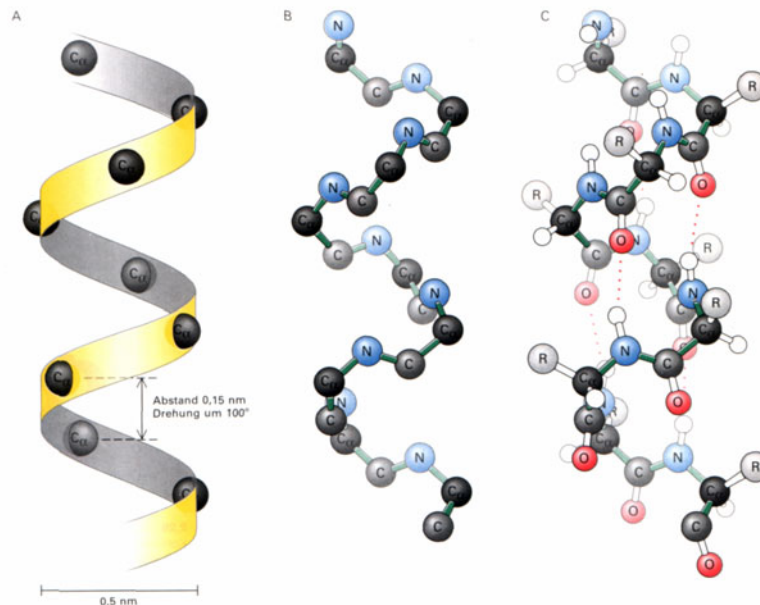


Abbildung 6. Modell einer rechtshändigen  $\alpha$ - Helix (Stryer 1996).

Die  $\beta$ - Faltblätter zeigen in der gestreckten Konformation ihrer Polypeptidkette, dass aufeinander folgende Seitenketten sich gegenüberstehen und Peptidbindungen in der Ebene des Faltblattes liegen (s. Abb. 7) In antiparallelen Faltblättern sind die Wasserstoffbrücken gestreckt; in parallelen Faltblättern hingegen gewinkelt. Die in der Regel an der Oberfläche eines Proteins lokalisierten "Loops" verbinden die Sekundärstrukturelemente miteinander.

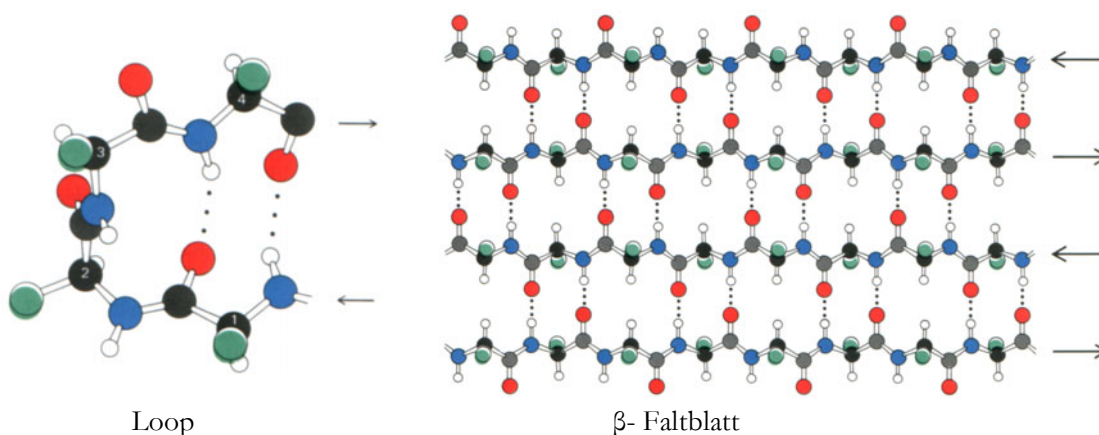


Abbildung 7 Atomarer Aufbau einer  $\beta$ - Schleife (Loop) und eines antiparallelen  $\beta$ - Faltblattes (Stryer 1996).



### 1.5.2 Supersekundärstrukturelemente

Die Supersekundärstrukturelemente (Motive) sind in Proteinen häufig auftretende Aufeinanderfolgen mehrerer regulärer Sekundärstrukturelemente, wobei hauptsächlich drei Motive unterschieden werden: das Helix-Turn-Helix Motiv, das hairpin- $\beta$  Motiv bzw. "greek key" Motiv (s. Abb. 11) und das  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - Motiv.

### 1.5.3 Domänen, Tertiär- und Quartärstruktur

Unter Domänen versteht man kompakte und räumlich abgrenzbare Einheiten innerhalb eines Proteins, die in der Lage sind, sich autonom zu falten. Die gesamte dreidimensionale Struktur einer monomeren Polypeptidkette bildet die Tertiärstruktur.

Ist ein Protein aus mehreren identischen oder verschiedenen Polypeptiden aufgebaut so spricht man von Quarternärstruktur. In den meisten Fällen geht eine vollständige Faltung der einzelnen Untereinheiten deren Assoziation zur intakten Quarternärstruktur voraus.

### 1.5.4 Proteinfaltung

Die Ausbildung der nativen, dreidimensionalen Struktur einer neu synthetisierten Polypeptidkette ist der letzte Schritt bei der Proteinbiosynthese. Diesen Prozess bezeichnet man als Proteinfaltung. Ausgehend von der *in vitro* entfalteten Polypeptidkette kann die Renaturierung (Faltung) des nativen, funktionellen Proteins als autonomer Prozess imitiert werden, wobei die dreidimensionale Struktur des renaturierten Proteins identisch mit dem des Ausgangsmaterials ist. Damit ist die dreidimensionale Struktur (Funktion) von Proteinen eindeutig durch deren Aminosäuresequenz (Primärstruktur) definiert (Anfinsen 1961, 1973).

Der Prozess der Proteinfaltung läuft in wässriger Lösung spontan ab. Infolgedessen ist die biologisch aktive dreidimensionale Struktur eines Proteins energetisch günstiger als der entfaltete Zustand. Während der Faltung des Proteins bilden Sekundärstrukturen aus 10 bis 15 Aminosäuren Faltungskeime, die die Faltung des Polypeptides zielgerichtet hin zum nativen Protein steuern.

## 1.6 Chaperone und Heat-shock-proteine

Der Ort der Proteinfaltung ist das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums mit einer Proteinkonzentration von ca. 200 mg/ml. Dadurch bestünden viele Möglichkeiten für neu gebildete Polypeptidketten, Wechselwirkungen einzugehen, die sie bei ihrer Faltung behindern. Neue Polypeptidketten im Lumen des ER falten sich nicht sofort, sondern binden sich an spezifische Proteine, die Chaperone, die die Polypeptidketten für die Dauer ihrer Faltung schützen. Sie vermindern den intramolekularen Kontakt zwischen den Polypeptidketten und verhindern somit die Aggregation der Proteine. Bereits fehlerhaft gebildete Proteinaggregate können durch Chaperone wieder aufgelöst werden. Chaperone sind langsame ATPasen. Sie ziehen ihre Energie aus der Hydrolyse des ATP. Der ADP-Chaperonkomplex hat eine hohe Affinität gegenüber ungefalteten Proteinen, jedoch keine Affinität gegenüber nativen Proteinen. Die Bindung eines entfalteten Polypeptidsegmentes führt zur Freisetzung von ADP und zum Eintritt von ATP in das aktive Zentrum des Chaperons. Der ATP-Chaperonkomplex setzt das Polypeptidsegment

frei. Die anschließende Hydrolyse des gebundenen ATP versetzt das Chaperon wieder in die Lage, ein ungefaltetes Polypeptidsegment zu binden.

Sowohl prokaryotische als auch eukaryontische Zellen reagieren auf einen Temperaturanstieg mit der Neusynthese der Heat-shock Proteine (Hsp). Gemeinsamer Nenner bei der Induktion der Hsp's ist eine hohe Konzentration ungefalteter Proteinketten. Unter Normalbedingungen sind in allen zellulären Kompartimenten Proteine aus dieser Gruppe vorhanden (Gething und Sambrook 1992; Hendrik und Hartel 1993; Welch und Georgopoulos 1993; Buchner 1996).

### 1.7 Biochemische Zusammensetzung der Linse

Der Gesamtproteinanteil des proteinreichsten Organs der Vertebraten, der Augenlinse, beträgt, bezogen auf sein Frischgewicht, 35%. Dieser Proteinanteil setzt sich aus linsenspezifischen Proteinen (Kristallinen) zusammen. 1894 unterschied Mörner zwischen wasserlöslichen- und wasserunlöslichen Kristallinen. Des Weiteren besteht die Linse in Abhängigkeit vom Lebensalter aus 60-65 % Wasser und 1-2 % anorganischen Bestandteilen (s. Abb. 8) (Hockwin 1983).

Die wasserlöslichen Kristalline (WS) werden nach ihrer Molekülgröße, elektrischen Ladung und ihren immunologischen Eigenschaften in drei Hauptgruppen eingeteilt:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Kristalline (Rink et al. 1982). Mit bis zu 90 % bilden die wasserlöslichen Proteine, abhängig von der morphologischen Region der Linse, den Hauptbestandteil des Linsengesamtproteins. Die wasserlöslichen Kristalline setzen sich aus geordneten Strukturproteinen und 1-2 % Enzymproteinen zusammen (Hoenders und Bloemendal 1982; Bours 1983).

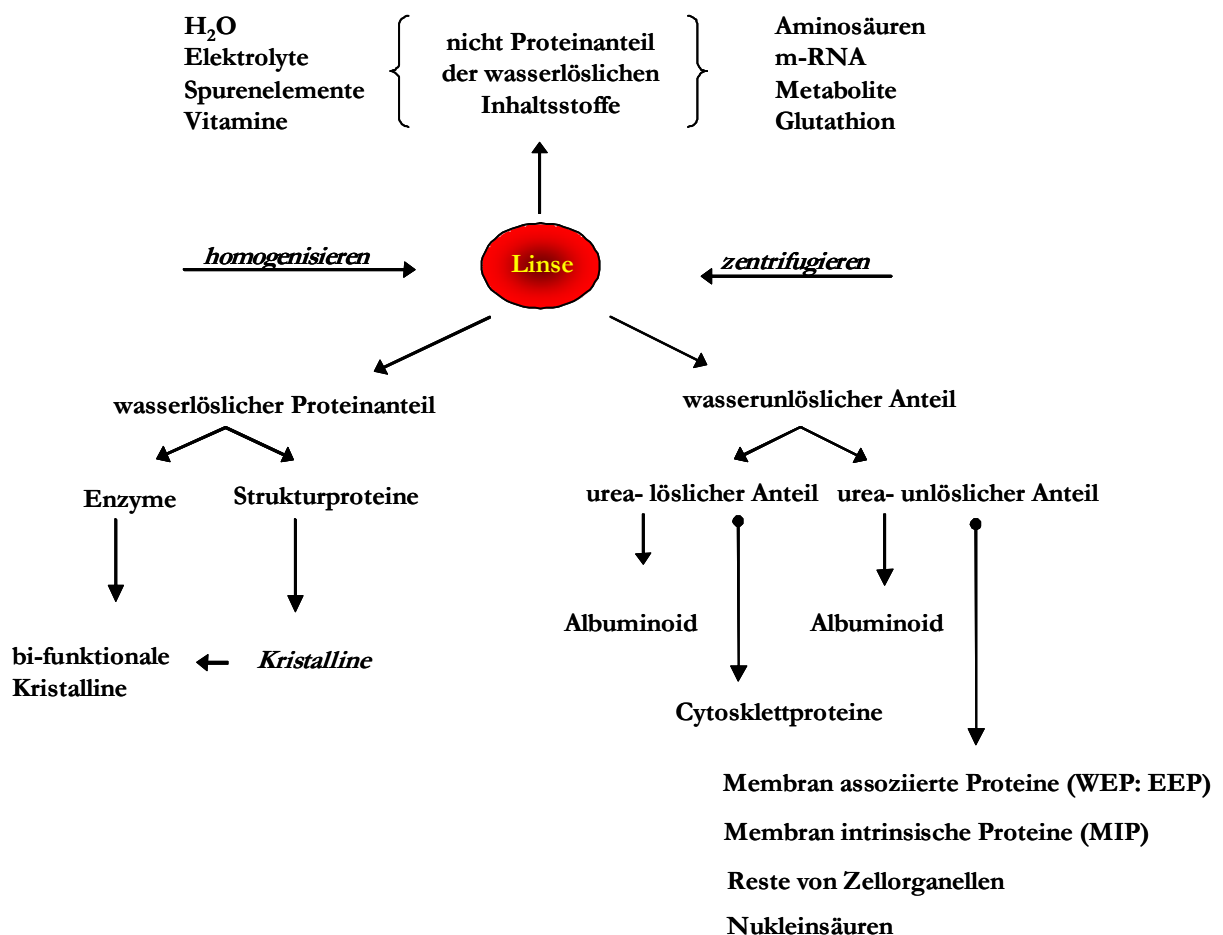


Abbildung 8. Biochemische Zusammensetzung der Augenlinse

Der wasserunlösliche Anteil der Säugerlinse, mit einem im Alter ansteigenden Anteil am Linsengesamtprotein (Ahrend et al. 1987), differenziert sich in eine harnstofflösliche und harnstoffunlösliche Fraktion. Die harnstofflösliche Fraktion enthält neben den linsen-



typischen wasserunlöslichen Kristallinen, dem so genannten Albuminoid, die in allen Zellen vorkommenden Cytoskelettproteine. Letztere bilden ein Netzwerk kontraktiler Elemente der Linsenfaserzellen (Hoenders und Bloemendal 1985). Die harnstoffunlösliche Fraktion des wasserunlöslichen Anteils enthält kovalent vernetztes Albuminoid, Membranbruchstücke mit intrinsischen- und assoziierten Proteinen, des weiteren Reste von Zellorganellen und Nukleinsäuren (Broekhuysen und Kuhlmann 1978).

## 1.8 Die Kristalline der Augenlinse

### 1.8.1 $\alpha$ -Kristallin

Das  $\alpha$ -Kristallin ist eines der Hauptstrukturelemente in der komplexen Proteinmatrix, von der die Transparenz und die Refraktion der Linse abhängen.

$\alpha$ -Kristallin liegt als Aggregat in seiner quaternären Struktur aus zwei Polypeptiden  $\alpha A$  und  $\alpha B$ . Sein Gewichtsanteil beträgt ca. 40% der wasserlöslichen Linsenkristalline (Bloemendal, 1981). Das native  $\alpha$ - Kristallin besitzt einen isoelektrischen Punkt zwischen 4.00 bis 4.85 (Bours 1984a, 1985) und eine hohe elektrophoretische Mobilität. Chromatographisch lassen sich die  $\alpha$ -Kristalline in drei Gruppen mit unterschiedlichen Molekulargewichten (MG) trennen (Spector et al. 1971; Carver et al. 1996):

$\alpha$ -Low	MG 600 - 900 kDa
$\alpha$ -High	MG 900 - 4000 kDa
$\alpha$ -HM	MG >10000 kDa

Die Elektrophorese in 7M Harnstoff zeigt, daß alle drei  $\alpha$ -Kristalline aus jeweils vier identischen Untereinheiten mit einem MG zwischen 19.500 und 22.500 Dalton bestehen (Van Kamp et al. 1971):

$\alpha A1$ , $\alpha A2$	(saure Polypeptidketten)
$\alpha B1$ , $\alpha B2$	(basische Polypeptidketten)

Während die Untereinheiten  $\alpha A1$  und  $\alpha B1$  keine genetische Codierung zeigen, konnten Bloemendal et al. [1985] für die Untereinheit  $\alpha A2$  eine 14S m-RNA und für  $\alpha B2$  eine 10S m-RNA nachweisen. Die ersten beiden Untereinheiten ( $\alpha A1$  und  $\alpha B1$ ) sind im embryonalen Linsengewebe nicht nachweisbar, treten jedoch während der weiteren Entwicklung der Linse als postsynthetische Deamidierungsprodukte der  $\alpha A2$  und  $\alpha B2$  Polypeptide auf (Harding und Dilley 1976; Bloemendal 1985).

Von verschiedenen Modellen, die für die quaternäre Struktur des  $\alpha$ - Kristallins diskutiert werden, scheint sich die von Singh et al. [1995] vorgeschlagene (s. Abb. 9) "open dynamic micellar quaternary structure" des  $\alpha$ - Kristallins zu bestätigen. In diesem in vitro Modell bilden die Untereinheiten des  $\alpha$ - Kristallin eine micellenförmige Struktur aus. Dabei nehmen die Untereinheiten nur  $\sim 30\%$  des Volumen eines 840 kDa  $\alpha A$  Aggregates ein und  $\sim 40\%$  der Oberfläche werden von der C-terminalen Domäne besetzt, daraus resultiert ein Radius von 100 Å für die Micelle und 25Å für die Cavität. Diese Geometrie ergibt zwischen den Untereinheiten einen beachtlichen molekularen „Freiraum“ (Farnsworth et al. 1998).

Die zur Cavität hin orientierten N- terminalen Reste der Untereinheiten  $\alpha A$  und  $\alpha B$  weisen zwei ungewöhnliche „Self complementary motifs“ **SCM** auf (Farnsworth und Singh 2000). Diese Motive besitzen strukturelle Ähnlichkeit mit Motiven im Hsp 70, der Immunglobulin Superfamilie und Zoutin, einem Hefeprotein, welches links-orientierte Z-DNA bindet (Zhang 1992). Vergleichbar mit einer Amyloidproteinstruktur bilden SCMs spontan mikroskopische Membranen aus  $\beta$ - Flattblättern, die unzugänglich für Säure, Basen, Urea ect. und stabil gegenüber proteolytischen Enzymen sind (Zhang et al. 1993). Kristallographische und 2D NMR spektroskopische Untersuchungen der Untereinheiten des  $\alpha$ -Kristallin charakterisieren in einem 3D Computermodell die Organisation von Micellen. Die homopolymere Micelle des  $\alpha A$  besteht aus 62 Untereinheiten mit einer Masse von 1240 kDa, die des  $\alpha B$  aus 42 Untereinheiten mit einer Masse von 840 kDa. Das heteropolymere Produkt (840 kDa) aus 42 Untereinheiten  $\alpha A$  und  $\alpha B$  im Verhältnis 3:1 zeigt, dass der Austausch von Untereinheiten weitere charakteristische Micellen hervorbringen kann.

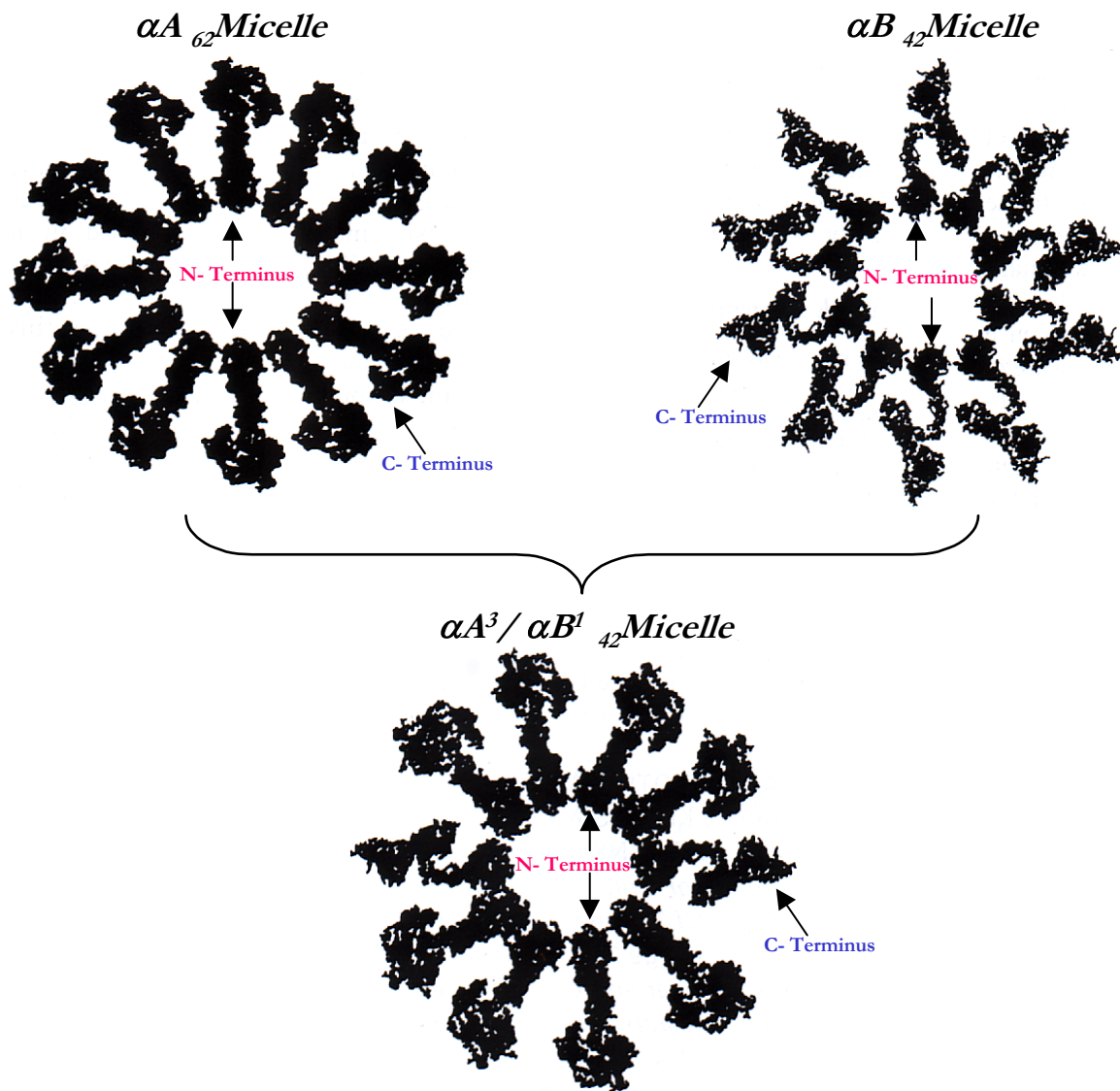


Abbildung 9. Querschnitt durch die zentrale Achse von Micellen der  $\alpha$ - Kristallin Subunits (Farnsworth et al. 1998)

$\alpha$ -Kristallin besitzt eine erstaunliche Hitzestabilität und denaturiert selbst bei einer Temperatur von 100°C nicht (Maiti et al. 1988). Horwitz zeigte 1992, daß  $\alpha$ -Kristallin als "molekulares Chaperon" fungieren kann. Dies könnte einen Hinweis auf den Schutz von Polypeptiden vor Denaturierung darstellen.  $\alpha$ -Kristallin zeigt eine 40%ige Sequenzähnlichkeit mit dem als Chaperon fungierenden "small heat shock protein", dem hsp 27 (Ingolia und Craig 1982; Lindquist und Craig 1988). Weitere Untersuchungen zeigten, daß sich  $\alpha$ -Kristallin in seiner protektiven Rolle als Chaperon bevorzugt an teildenaturierte Proteine bindet (Rao et al. 1993). Horwitz [1992] beschrieb die Bindung von "teilweise denaturierten"  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kristallinen an das  $\alpha$ -Kristallin. In einem Versuch von Boyle et al. [1993] konnte gezeigt werden, daß ungefaltetes  $\gamma$ -Kristallin im "zentralen Hohlraum" des  $\alpha$ -Kristallins gebunden wird. Groth-Vasselli et al. gelang es 1995 den Prozess der Bindung von  $\gamma$ B- Kristallin in den molekularen „Freiraum“ einer in vitro  $\alpha$ A Micelle zu visualisieren (s. Abb. 10).

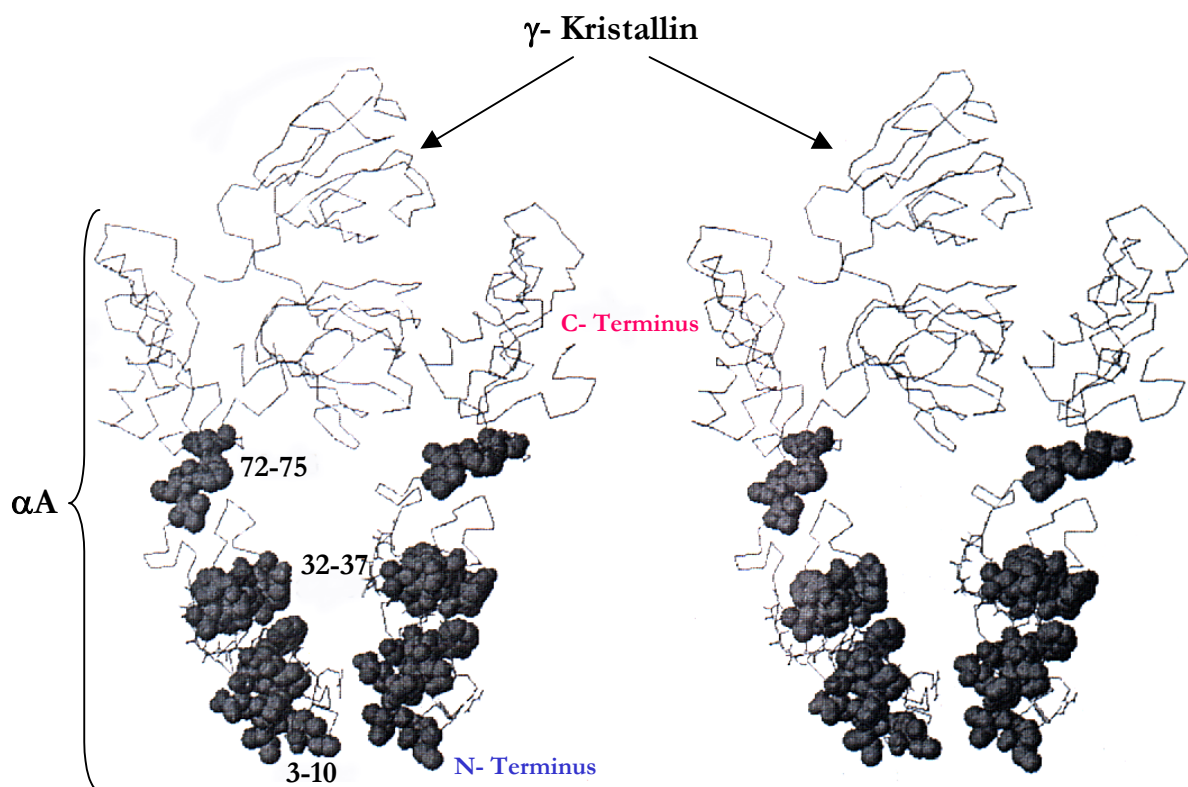


Abbildung 10. Ausschnitt der sphärischen Quaternärstruktur einer  $\alpha$ A- Kristallin Micelle (Groth-Vasselli et al. 1995)

Die Polypeptide  $\alpha$ A und  $\alpha$ B sind nicht linsenspezifisch.  $\alpha$ A wurde unter anderem auch in Milz und Thymus (Kato et al. 1991; Srinivasan et al. 1992),  $\alpha$ B in Herz-, Gehirn- und Milzgewebe nachgewiesen (Klemenz 1991). In den letzten Jahren werden die Untereinheiten des  $\alpha$ -Kristallin im Zusammenhang mit neurodegenerativen- und kardiovaskulären Erkrankungen diskutiert (Iwaki et al. 1989).

### 1.8.2 $\beta$ - Kristalline

Die heterogenste Gruppe unter den wasserlöslichen Proteinen bilden die  $\beta$ -Kristalline (Bloemendal 1981). Ähnlich dem  $\alpha$ -Kristallin bilden sie polymere native Aggregate. Die Chromatographie trennt die  $\beta$ -Kristalline in folgende Gruppen (van Kleef 1975, Bloemendal et al. 1990).

$\beta$ -Low ( $\beta_L$ )	MG	40-90 kDa	IEP	6.70-6.92
$\beta$ -High ( $\beta_H$ )	MG	100-200 kDa	IEP	5.70-6.45

Die Isoelektrische Fokussierung (IEF) differenziert hochmolekulare  $\beta_{1-8}$  Kristalline und niedermolekulare  $\beta_{9-12}$  Kristalline (Bours und Hockwin 1977; Bloemendal 1981). Die 2D-Gelelektrophorese ordnet den nativen  $\beta$ -Kristalline acht Polypeptide zu (Slingsby und Bateman 1989)

<u>saure Polypeptide</u>	<u>basische Polypeptide</u>
$\beta A1$ 23 kDa	$\beta B1a$ 32 kDa
$\beta A2$ 23 kDa	$\beta B1b$ 31 kDa
$\beta A3$ 25 kDa	$\beta B2$ 26 kDa
$\beta A4$ 23 kDa	$\beta B3$ 27 kDa

$\beta B1a$  und  $\beta B1b$  Untereinheiten lassen sich nur in den hochmolekularen  $\beta$ -Kristallinen detektieren.

Die  $\beta$ -Kristalline sind unter den Linsenkristallinen diejenigen mit der größten Hitzelabilität. Denaturiert man  $\beta$ -Kristalline in Abwesenheit von  $\alpha$ -Kristallin, bildet es kein lösliches hochmolekulares Protein, sondern aggregiert schnell in eine unlösliche Form (Rao et al. 1995).

### 1.8.3 $\beta_s/\gamma_s$ -Kristallin

Das  $\gamma_s/\beta_s$ - Kristallin mit einem MG von ca. 28.000 D und einem IP von 6.85-7.00 verhält sich immunologisch nach Trennung in der IEF und der Elektrophorese wie ein  $\beta$ -Kristallin, hingegen zeigt die Chromatographie keine vollständige Trennung von den  $\gamma$ -Kristallinen (van Dam 1966; Bessems 1985; Bessems et al. 1986). Aufgrund seiner Aminosäuresequenz und seiner Tertiärstruktur weist dieses Kristallin eine größere Übereinstimmung mit den monomeren  $\gamma$ -Kristallinen als mit den oligomeren  $\beta$ -Kristallinen auf. In wässrigen Lösungen vermögen die  $\gamma$ -Kristalline über ihre Thiolgruppen in vitro „Megamere“ zu formen, die durch Anwesenheit von  $\gamma_s$ -Kristallin signifikant unterdrückt werden können (Liu et al. 1998).

### 1.8.4 $\gamma$ -Kristalline

Die kleinste Gruppe der wasserlöslichen Kristalline stellen die monomeren  $\gamma$ -Kristalline, die während der fötalen Entwicklung der Linse als prädominante Proteine synthetisiert werden (Papaconstantinou 1965). Ihre Synthese in den elongierenden Faserzellen nimmt im Laufe des Lebens ab (Bours und Hockwin 1976).

$\gamma$ - Kristalline MG: 20 - 24 kDa IEP: 7.1-8.1

Die  $\gamma$ - Kristalline weisen in der 2D Antigen/Antikörperkreuzelektrophorese eine geringere elektrophoretische Mobilität als  $\beta$ -Kristalline auf und werden nach Trennung in der Chromatographie und IEF in  $\gamma_{1-4}$  aufgetrennt (Björk 1961, 1964; Van Dam 1966; Bours und Hockwin 1977; Slingsby und Miller 1983).

Strukturelles Grundelement der  $\gamma$ - Kristalline bilden die  $\beta$ - Faltblätter ( $\beta_{1-4}$ ). Sie charakterisieren in ihrer antiparallelen Orientierung ein "Greek- Motiv". Zwei solcher Motive (Supersekundärstrukturelemente) bilden eine Domäne ( $\beta_{1-8}$ ). Zwei sich autonom faltende identische Domänen formen in ihrer räumlichen Orientierung das native  $\gamma$ - Kristallin in seiner Tertiärstruktur (s. Abb. 11).

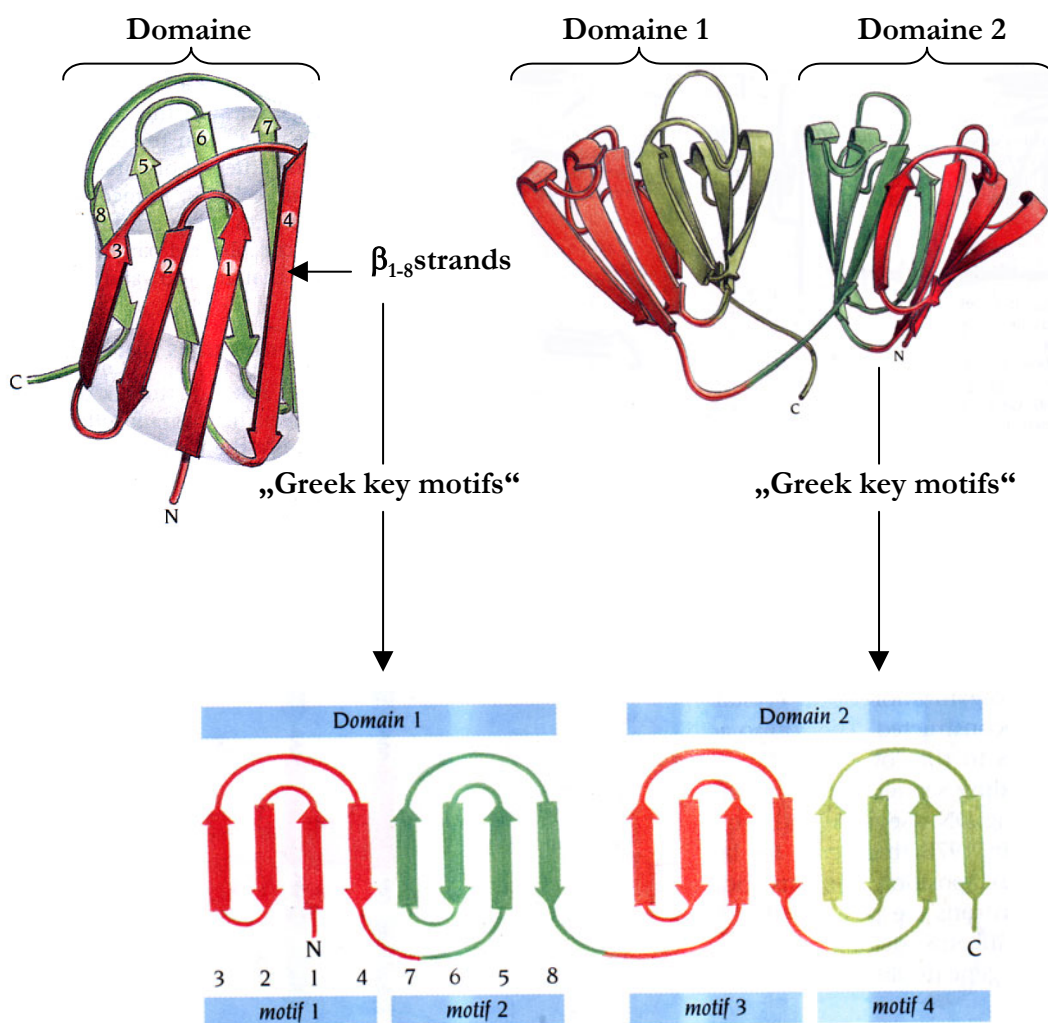


Abbildung 11. Proteindomänen und ihre Motive eines  $\gamma$ -Kristallin Moleküls (Branden und Tooze, 1999).

### 1.8.5 Bifunktionale Kristalline

Die bifunktionalen- bzw. Enzymkristalline sind keine linsenspezifischen Kristalline. Außerhalb der Linse üben sie lebenswichtige katalytische Funktionen aus. Isoliertes  $\delta$ -Kristallin aus Vogel- oder Reptilienlinsen weist eine hohe Argininosuccinatlyase Aktivität auf;  $\varepsilon$ -Kristallin aus Entenlinsen ist identisch mit der Laktatdehydrogenase des Entenherzens;  $\zeta$ -Kristallin der Meerschweinchenlinse ist eine Alkoholdehydrogenase;  $\tau$ -

Kristallin zeigt identische Funktionen der  $\alpha$ -Enolase. Oft zeigen die Enzymkristalline gegenüber den funktional identischen Enzymen außerhalb der Linse eine reduzierte Aktivität, welche sich durch die posttranslationalen Modifikationen während des Alterns der Linse erklären lässt (Williams et al. 1982; Piatigorsky und Horwitz 1995; Jaenicke 1994, Chuang et al. 1999; Chang et al. 2000).

#### 1.8.6 Das wasserunlösliche Kristallin (Albuminoid)

Ein Bestandteil der wasserunlöslichen Fraktion ist das wasserunlösliche Kristallin (Albuminoid). Dieses wird aus Kristallinen gebildet, die sich während des Alterns in Form von Superaggregaten organisieren (Tan 1972). Bereits im foetalen Stadium der Augenlinse beginnt der Vernetzungsproß der Linsenkristalline innerhalb der sich ständig Neubildenden Faserzellen (Ahrend et al. 1987). Je älter eine Linsenfaserzelle ist, desto größer ist der wasserunlösliche Komplex aus Kristallinen ( $>5 \times 10^7$  Da.). Die molekularen Superaggregate beeinträchtigen die Transparenz der Linse nicht, dagegen steht die nicht altersgemäße quantitative Zunahme des wasserunlöslichen Kristallins in direkter Korrelation zu bestimmten Formen der Katarakt (Bours et al. 1995). Hauptbestandteil des wasserunlöslichen Kristallins bildet das native  $\alpha$ -Kristallin, wobei während des Alterns der Anteil der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kristalline zunimmt (Bours et al. 1995).

Immunologisch verhält sich das native Albuminoid wie ein  $\alpha$ -Kristallin. Unter denaturierenden Bedingungen lassen sich außerdem  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kristalline immunologisch nachweisen (Bours 1981).

### 1.9 Altersbedingte Veränderungen der Linsenproteine

Im Verlauf des Lebens einer Linse nimmt die Konzentration der wasserlöslichen Kristalline in dem Maße ab wie die Konzentration des wasserunlöslichen Protein zunimmt. Im Vergleich zum Äquator liegt im Kern eine höhere Konzentration an wasserunlöslichem und eine geringere Menge an wasserlöslichem Protein vor. In Linsen junger Tiere zeigt sich mehr wasserlösliches Protein, wohingegen in Linsen alter Tiere der Anteil an wasserunlöslichem Protein erhöht ist. Ursache ist die Umwandlung der wasserlöslichen Kristalline in wasserunlösliche hochmolekulare Proteinaggregate (Hoenders und Bloemendal 1981; 1982; Bours 1984b).

Es konnte gezeigt werden, dass eine große Ähnlichkeit zwischen den wasserunlöslichen, harnstofflöslichen Proteinen und den hochmolekularen Proteinen in Bezug auf ihre Polypeptidzusammensetzung besteht. Die wasserlöslichen Kristalline lagern sich zu hochmolekularem Protein zusammen, das durch weitere Aggregation wasserunlöslich wird. Dieses Protein bleibt vorerst harnstofflöslich, weiteres Altern führt zur Harnstoffunlöslichkeit (Hoenders und Bloemendal 1982; Bloemendal und Hockwin 1985). Folgende postsynthetische Veränderungen werden für die Aggregation verantwortlich gemacht:

- Disulfidbrückenbindungen (Zigman und Lerman 1968; Harding 1969; Hockwin 1981)
- nicht enzymatische Glykosylierung (Hockwin 1981)
- Racematisierung von Asparagin (Hockwin 1985)
- Oxidation von Methionin und Cystein (Jedziniak et al. 1987)
- Lektin- Glycoprotein Mechanismus (Ahrend und Bours 1997a)

Alle genannten Mechanismen verlaufen während des Alterungsprozesses gleichmäßig und stetig (s. Abb. 12) (Bours 1983, 1984a).

Unter den wasserlöslichen Kristallinen steigt im Laufe des Lebens der Anteil der  $\beta$ -Kristalline an, während der Anteil der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Kristalline abnimmt (Bours 1977). Die Abnahme des  $\gamma$ -Kristallins findet ihre Erklärung in der verringerten Syntheseleistung während des Alterns. Die relative und absolute Abnahme der  $\alpha$ - Kristallinkonzentration ist durch den Einbau in den wasserunlöslichen Proteinanteil begründet (Hockwin et al., 1958). Die niedermolekularen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Komponenten nehmen in älteren Linsenfasern ab, während die hochmolekularen Komponenten zunehmen (van Kamp und Hoenders 1973).

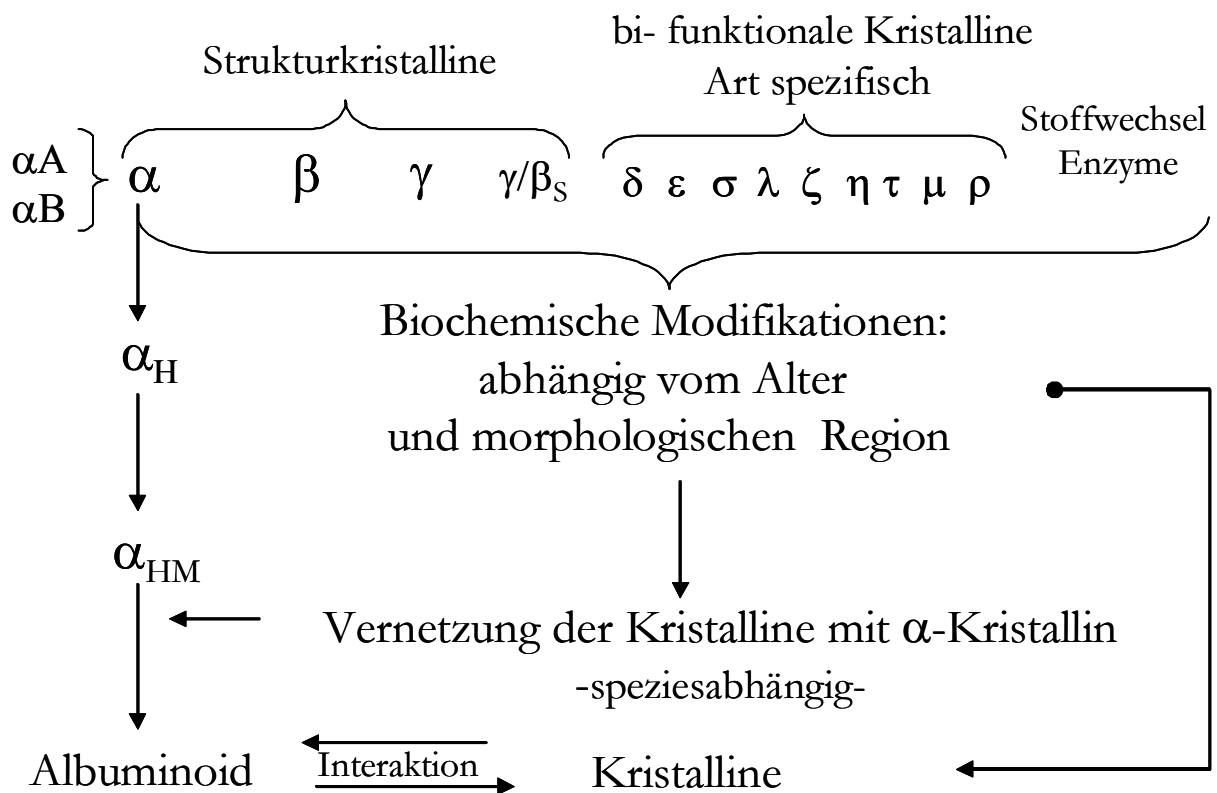


Abbildung 12. Schematische Darstellung des Alterungsprozesses der Linsen kristalline

### 1.10 Die Katarakt

Nach Hockwin [1981, 1983, 1985] ist die Katarakt in ihrer Entstehung als multifaktorielles Geschehen aufzufassen. Die Faktoren, die an ihrer Genese beteiligt sind, greifen in den biochemischen Kreislauf ein und verändern den biochemischen Alterungsprozess der Linse so, dass es zu regional differenzierbaren Trübungserscheinungen der Linse kommt (s. Abb. 13).

Ursachen der Katarakt:

- Ernährungsstörungen → Aminosäure- und Vitaminmangel → Kammerwasser
- Endokrine Störungen
- Physikalische- und chemische Einflüsse
- Anhäufung toxischer Produkte → Änderung des Enzymmusters

Spezies	Formen der Katarakt
<b>Mensch</b>	in allen morphologischen Regionen
<b>Rind</b>	in 1% Kernkatarakte (Inzucht)*
<b>Ratte</b>	abhängig vom Alter
<b>Vogel</b>	dokumentiert bei Wachtel
<b>Amphibien</b>	nicht dokumentiert
<b>Fische</b>	Farmlachs: in allen morphologischen Regionen Wildlachs: Katarakt ähnliche Erscheinungen (Parasiten)

\* n=250, LFG:  $1,457 \pm 0,097$ ; Alter =  $0,41 \pm 0,11$  Jahre; dokumentiert 1996

Abbildung 13. Vorkommen der Katarakt im Tierreich



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Herkunft der Proben

Die untersuchten Lachse rekrutierten sich aus Lachsfarmen entlang der norwegischen Fjord-Küste während der Jahre 1999 bis 2001. Die Kälberaugen wurden aus dem Schlachthaus in Köln bezogen. Die Tintenfische (*Sepia officinalis*) stammten aus dem italienischen Mittelmeer.

### 2.2 Präparation

Die Augen wurden bis zur Präparation bei 4°C gelagert (ca. 4 h). Nach Präparation der Linse und Ermittlung des Linsenfrischgewichtes (LFG) wurden die Linsen bei -20°C eingefroren.

### 2.3 Regionale Teilung von Linsen

#### 2.3.1 Bonner Schneidetechnik

Mit Hilfe der Schneidemaschine „Bonn 1987“ 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 (Bessem's et al. 1989).

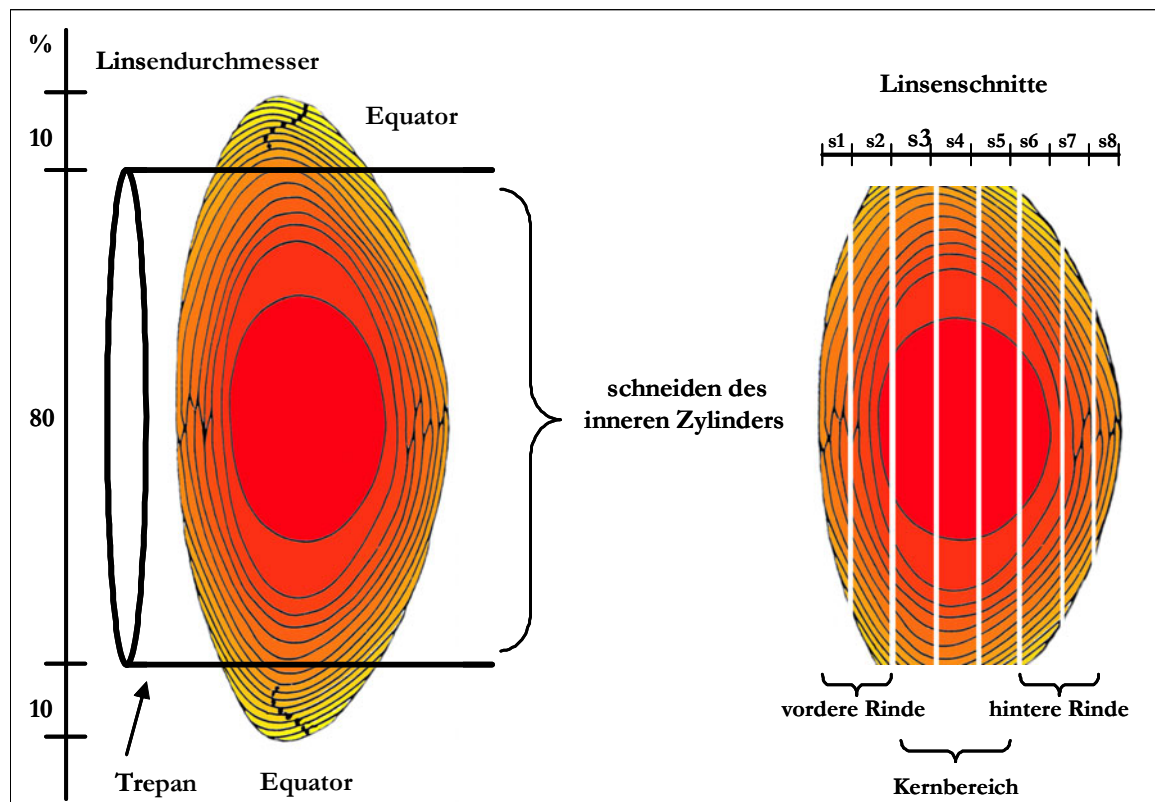


Abbildung 14. Topographische Teilung von Linsen

Die auf dem vorderen Pol aufliegende, gefrorene Linse (-20°C) wird mit einem Trepan dessen Durchmesser variabel ist vom hinteren bis hin zum vorderen Pol durchstanzt. Daraus ergeben sich zunächst zwei Teile: der Linsenequator und der innere Zylinder, im Innern des Trepans, wobei der Durchmesser des Trepans 80% des Linsendurchmessers entspricht. Anschließend wird der Trepan so in eine auf -8°C gekühlte Schneidvorrichtung eingeführt, dass der vordere Pol der Linse zur Schneidfläche hin orientiert ist. Dieser innere Zylinder wird nun mittels eines Metallbolzens, der dem Durchmesser des Trepans entspricht, von unten in vorher festgelegten Abständen nach oben geschoben, so dass der Zylinder um diesen Abstand aus der Schneidfläche hervorragt. Dieser Teil wird mit einem Messer abgetrennt. Dabei ergibt sich folgende Reihenfolge der Schnitte: vordere subkapsuläre und äußere Rindenregion, tiefe vordere Rindenregion, Kernbereich, tiefe hintere Rindenregion, hintere subkapsuläre und äußere Rindenregion. Die Linsenschnitte werden gewogen um das Linsenteilfrischgewicht (LTFG) zu ermitteln. Anschließend werden die Proben bei -20°C eingefroren.

### 2.3.2 Konzentrisches Rühren

Die appositionelle Schichtung der Faserzellen erlaubt es durch Rühren einer Lösung dekapulierter Linsen erst die jungen Linsenfasern abzutrennen, um dann Schritt für Schritt in die älteren Linsenregionen bis hin zur foetalen Linse vorzudringen (Hockwin und Kleifeld 1965).

## 2.4 Gewinnung von wasserlöslichen Kristallinen und Albuminoid

Die ganze Linse bzw. die Linsenteile, die sich aus der topographischen Teilung ergeben, werden mit Ultraschall homogenisiert, anschließend 1 h bei 32000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand (WS), mit den wasserlöslichen Kristallinen wird bei -20°C eingefroren und lyophilisiert. Das Sediment (WI) wird mit Aq. Bidest solange aufgeschwemmt und abzentrifugiert bis der Überstand nach Kontrollmessung frei von Kristallinen ist. Das gereinigte Sediment wird ebenfalls lyophilisiert. Die Summe aus WS und WI ergibt das Trockengewicht (LTTG). Die Differenz zwischen LTFG und LTTG bestimmt den Wassergehalt einer Linsenregion (Bours 1986).

## 2.5 Isolierung des $\alpha$ - Kristallin aus den Linsen von Kälbern und Lachsen

500 mg des wasserlöslichen Kristallin der äquatorialen Rindenregion aus Kälber- und Lachslinsen werden in 50 ml Piperazinpuffer unter Rühren gelöst und mittels Pumpe auf einen DEAE- Anionenaustauscher aufgetragen. Nach Auswaschen der nicht gebundenen Kristalline (Chromatographieverlauf wird mit einem Schreiber dokumentiert), werden die gebundenen Kristalline mit 1 M NaCl- Piperazinpuffer eluiert und fraktioniert. Der Kristallinpeak wird konzentriert und mit Hilfe der Gelchromatographie über eine Sepharose 4B Gelmatrix der Größe nach getrennt. Der  $\alpha$ - Kristallin Peak wird fraktioniert, konzentriert, entsalzt und lyophilisiert. Zur Ermittlung des Reinheitsgrades dient die native IEF (Mies 1999).

## 2.6 Proteinbiochemische Analyseverfahren für Linsenkristalline

### 2.6.1 Elektrophorese

Proteine besitzen aufgrund ihrer Aminosäurezusammensetzung positive und negative Ladungen. Glutamin- und Asparaginsäure bilden dabei negative, die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin positive Ladungen. Wichtig ist jedoch nur 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).

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

$E$  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 in einem "idealen Raum" auf die Elektrode zuzubewegen, entgegen. Sowohl Größe und Form des Proteins, als auch die Viskosität der durchwandernden Trennmatrix ist bestimmend für die Reibung. Die Geschwindigkeit des Proteins ist proportional der Feldstärke und der Ladung des Proteins, jedoch umgekehrt proportional seiner Größe und der Viskosität der Trennmatrix. Da sich Proteine in ihren Ladungen und Größen voneinander unterscheiden, wandern sie bei angelegtem Feld in einer bestimmten Zeit unterschiedlich weit. Diese charakteristischen Merkmale finden bei elektrophoretischen Analysemethoden, der SDS- Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und Isoelektrischen Fokussierung, ihre Anwendung.

#### 2.6.1.1 Polyacrylamid- Gelelektrophorese

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

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

Acrylamid, N,N'-Methylen-bisacrylamid und TEMED (N,N,N',N',-tetramethyl-1,2-diaminoethane) in ihrer polymerisierten Form erfüllen diese Kriterien. Als Polymerisationsstarter dient Ammoniumperoxidisulfat. In Wasser gelöst, bildet APS freie Radikale, die das Acrylamid aktivieren. Das aktivierte Acrylamid reagiert, unter Bildung von langen Ketten mit viskösem Charakter 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:

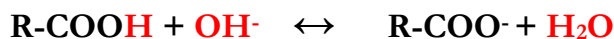
1. keine Wechselwirkung mit den Proteinen
2. der pH-Wert sollte so gewählt sein, dass die Proteine zwar geladen sind, jedoch nicht denaturiert werden.

Die Ionenstärke des Puffers hat 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.

### 2.6.1.2 Prinzip der Isoelektrofokussierung

Die Anwendung der IEF ist auf die Trennung von Molekülen beschränkt, die nach außen positiv und/ 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 seiner 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.

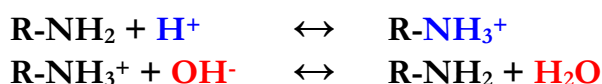
In einem alkalischen Milieu sind die Carboxylgruppen der Aminosäuren (AS) negativ geladen.



In einer sauren Umgebung sind die Säurerestgruppen neutral.



Arginin, Histidin und Lysin sind die Hauptquellen für die positiven Ladungen der Proteine. Diese Aminosäuren 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 wird die charakteristische Aminogruppe ungeladen.



Als isoelektrischen Punkt (IP) bezeichnet man denjenigen pH-Wert eines Proteins, bei dem die positiven und negativen Ladungen gleich sind, d.h. die Gesamtladung des Proteins ist Null. Aus der spezifischen Reihenfolge und der unterschiedlichen Anzahl der Aminosäuren in der Primärstruktur ergibt sich für jedes Protein ein charakteristischer isoelektrischer Punkt.

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.

### 2.6.1.3 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. Sharpio umging 1967 diese Schwierigkeit, indem er Proteine in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS) elektrophoretisch auftrennte.

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, wobei die Eigenladung des Proteins überlagert wird.

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 (Osborn und Weber 1969).

Die Gradientengel-PAGE bietet durch unterschiedliche Acrylamidkonzentrationen - somit unterschiedliche Porengrößen innerhalb eines Gels- die Möglichkeit, die Größe eines nativen undissoziierten Proteins zu bestimmen.

Die Kombination von SDS-Behandlung und Gradientengel gewährleistet somit ideale Bedingungen für die Charakterisierung von Proteinen.

### 2.6.1.4 Zweidimensionale Elektrophorese

Das Ziel der zweidimensionalen Elektrophorese (2D-PAGE) ist es, Proteine zu trennen und durch mehrere Eigenschaften zu charakterisieren. Diese Eigenschaften müssen unabhängig voneinander sein. Wenn als erste Dimension ein IEF-PAGE und als zweite Dimension eine SDS-PAGE verwendet wird, kann den Proteinen ein isoelektrischer Punkt und eine Molmasse zugeordnet werden.

Die von Görg entwickelte horizontal Technik mit ultradünnen rehydratisierten IEF und ultradünnen SDS-Gelen (Görg et al. 1980) diente als Methode für die zweidimensionale Kristallincharakterisierung.

### 2.6.2 Ionenaustauschchromatographie

Die Nettoladung des Proteins bestimmt die Wahl der stationären Phase (Matrix) der Ionenaustauschchromatographie.

Anionische Proteine können mit positiv geladener Diethylaminoethylcellulose (DEAE-Cellulose) und kationische Proteine mit einer negativ geladenen Carboxymethylcellulose (CM-Cellulose) getrennt werden.

Ein Protein, welches bei pH 7 eine positive Nettoladung hat, wird sich in der Regel an die Carboxylgruppe der Matrix binden. Ein negativ geladenes Protein hingegen nicht. Erhöht man die Ionenkonzentration z.B. NaCl in der mobilen Phase (Elutionspuffer), können die gebundenen Proteine ausgewaschen (eluiert) werden. Dabei konkurrieren die Natriumionen mit den positiv geladenen Gruppen des Proteins um die Bindungsstelle an der Matrix. Proteine mit einer geringen positiven Ladungsdichte lösen sich bei einer geringen Salzionenkonzentration; die Proteine mit einer hohen Ladungsdichte benötigen zum Ablösen von der Matrix eine höhere Ionenkonzentration.

### 2.6.3 Gelfiltrations- Chromatographie

Die häufigste Methode zur Trennung von Makromolekülen aufgrund unterschiedlicher Molekulargewichte ist die Gelfiltrations-Chromatographie (Gelchromatographie). Bei dieser Methode werden die einzelnen Komponenten des zu trennenden Stoffgemisches (Proteine) idealerweise weder adsorptiv noch interaktiv, sondern ausschließlich nach Molekülmasse bzw. Molekulargewicht auf einer Matrix getrennt (Fischer 1969).

Die Trennung von Proteinen erfolgt über eine Säule, die mit kleinen Kügelchen (Gel) gefüllt ist. Diese sind von schwammartiger Struktur mit einem definierten Porendurchmesser. Wird eine Mischung unterschiedlich großer Proteine auf eine Säule aufgetragen, so können die größeren nicht in die Poren diffundieren. Proteine mit einem hohen Molekulargewicht eluieren mit geringem Widerstand durch die Säule. Kleinere Proteine diffundieren in die Poren, wodurch ihre Durchflußgeschwindigkeit erniedrigt wird. Sie bewegen sich so lange nicht abwärts, bis sie wieder aus den Kügelchen herausdiffundiert sind. So werden die kleineren Proteine in der Säule zurückgehalten. Der Vorgang des Zurückhaltens wird als "Retardierung" bezeichnet. Diese ist abhängig von der Zeit, in der sich die Proteine innerhalb der Gelporen befinden. Die Retardierung ist wiederum eine Funktion der Proteingröße und des Porendurchmessers. Ein Protein, das gleichgroß oder größer als der Porendurchmesser ist, wird nicht in das Gel diffundieren. Es wird ausgeschlossen. Die Ausschlussgrenze eines Gels ist das Molekulargewicht des kleinsten Proteins, welches gerade nicht mehr in die Gelmatrix einzudringen vermag. Die charakteristische Zeit, die ein Protein benötigt um die Trennsäule zu verlassen, ist als Retentionszeit definiert. Das Molekulargewicht und die Retentionszeit verhalten sich antiproportional zueinander, d.h. das kleinste Protein verläßt die Säule zuletzt.

Die Trennung der Kristalline erfolgte im präparativ Maßstab über Sephacryl- und Sepharosematrices. Sephacryl ist eine mit N, N'-methylenebisacrylamide quervernetzte Dextranmatrix. Die Trennleistung der eingesetzten Sephacryl S-200® ist mit einer molaren Masse ( $M_r$ ) von  $5 \times 10^3 - 2.5 \times 10^5$  und Sephacryl S-300® mit  $M_r 1 \times 10^4 - 1.5 \times 10^6$  angegeben. Sepharose 4B®, eine Agarosematrix erlaubt die Trennung von Proteinen

mit einer molaren Masse ( $M_r$ ) von  $1 \times 10^4 - 2 \times 10^6$ . Die Detektion der Kristalline erfolgte in der vorliegenden Studie bei einer Wellenlänge von 280 nm; die Dokumentation des Proteinprofils mittels eines Schreibers.

Die qualitativ experimentelle Trennung der Kristalline im Labor erfolgte mittels HPLC-Gelchromatographie. Die eingesetzten TSK-SEC 4000® verfügen über eine modifizierte Kieselgelmatrix.

#### 2.6.4 Immunelektrophorese

Diese Methode basiert auf der Reaktion der Antikörper mit den entsprechenden Antigenen zu einem stabilen Komplex. Befinden sich Antigen und Antikörper in einer Lösung, werden solange Präzipitate gebildet, wie der Antikörper in einem molaren Überschuss vorliegt.

Nach zonenelektrophoretischer Trennung der Antigene in einem Agar folgt eine Doppeldiffusion. Dazu werden zunächst parallel zu den getrennten Proteinen Gräben in den Agar gestanzt, die dann mit Antikörpern (Serum) gefüllt werden. Anschließend Diffusion führt zu einem Aufeinertreffen korrespondierender Antigen-Antikörper Moleküle. Diese bilden einen spezifischen Komplex, der sich als bogenförmige Präzipitationslinie darstellt. Diese von Grabar und Williams [1953] entwickelte Methode wurde von Brahma und Bours [1972] auf Linsenkristalline abgestimmt.

Als Antigene zur Herstellung der korrespondierenden Antikörper in Kaninchen und als Antigen bei der Immunelektrophorese diente wasserlösliches Kristallin von Kälberlinsen (Kalb ganze Linse = KGL, Anti- KGL), das wasserlösliche Kristallin der Lachslinse (Lachs ganze Linse = LGL, Anti LGL), Kristalline der Equatorial (Eq)- und Kernzone (K) beider Spezies und  $\alpha$ - Kristallin der Kälberlinse ( $\alpha$ - Kalb, Anti-  $\alpha$ - Kalb).

### 2.7 Einfluss von Harnstoff auf die Linsenkristalline

Die Behandlung nativer Proteine mit hoher Harnstoffkonzentration (7M) führt zur strukturellen Umwandlung und Verlust der Funktion. Die quarternäre und tertiäre Proteinstruktur verliert durch Lösen von Wasserstoffbrücken und Außerkräftsetzen von „van der Waals Kräften“ ihre Stabilität und entfaltet sich auf die Ebene der Sekundärstruktur.

Entfernt man den Harnstoff z.B. mittels Dialyse, falten sich die Polypeptide zum nativen funktionsfähigen Protein zurück (Anfinsen 1961).

Dieses Renaturierungsprinzip wurde in der vorliegenden Arbeit experimentell so umgesetzt, dass die wasserlöslichen Kristalline in 7M Harnstoffpuffer gelöst und die Chromatographie unter harnstofffreien Bedingungen durchgeführt wurde. Dabei wird der Harnstoff zu Beginn der Säulentrennung immer weiter verdünnt und durch die Poren der Matrix zurückgehalten.

Die Kristalline renaturieren und werden im weiteren Verlauf ihrer Größe nach entsprechend getrennt.

Das gleiche Prinzip fand bei der IEF Anwendung. Wasserlösliches Kristallin wurde in einem 7M Harnstoffpuffer gelöst und unter nativen Bedingungen in einem linearen pH

Gradienten 3-10 seiner Ladung nach getrennt. Der Probeauftrag auf die Gelmatrix erfolgte über Filterpapier. Nach Anlegen des elektrischen Feldes wandern die Kristallinpolypeptide in die Matrix. Der Harnstoffpuffer bleibt am Probeauftrag im Filterpapier zurück. Die Kristalline „renaturieren“ bis zum Zeitpunkt der Trennung bei ~IP 4.5.

Das entgegengesetzte Prinzip findet bei der 2D IEF statt (van den Oetelaar et al. 1989). Die Kristalline werden in der 1. Dimension unter nativen Gelmatrixbedingungen getrennt, wobei die Kristallinprobe in denaturierter Lösung aufgetragen wird. Die 2. Dimension findet unter denaturierenden Bedingungen der Gelmatrix statt.

## 2.8 Einfluß der Temperatur auf das Verhalten der Linsenkristalline

Die Funktion des nativen Proteins ist abhängig von der Temperatur. Die ungefähre Körpertemperatur der Säugetiere liegt bei 37°C und bei Lachsen liegt diese je nach Wassertemperatur zwischen 8°C und 14°C. In diesen Temperaturregionen besitzen die Proteine je nach Spezies optimale Funktion. Erhöhung der Temperatur führt zur Denaturierung der gelösten nativen Proteine. Diese Stresssituation aktiviert Chaperone, welche der Denaturierung entgegenwirken.

### 2.8.1 Inkubationsversuch I 37°C 24h

Die Linsenkristalline des Kalbes, des Lachses und des Tintenfisches (Sepia) mit jeweils n = 3 Linsen wurden in Aq. Bidest und verschiedenen Konzentrationen von  $\alpha$ - Kristallin aus Kälberlinsen gelöst und anschließend 24 h bei 37°C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 30000 x g für 1 h und mehrmaligem Waschen des Sedimentes mit Aq. Bidest, wurde dieses gefriertrocknet und gewichtsmäßig bestimmt.

Der Versuchsansatz bestand aus fünf Ansätzen mit jeweils einem Dreifachansatz aus Kalb-, Lachs- und Sepiakristallin:

- Gruppe 1: 1 %ige Kristallinlösung in Aq. Bidest
- Gruppe 2: 2 %ige Kristallinlösung in Aq. Bidest
- Gruppe 3: 1 %ige Kristallinlösung in 0,1 %iger  $\alpha$ - Kristallinlösung
- Gruppe 4: 1 %ige Kristallinlösung in 0,5 %iger  $\alpha$ - Kristallinlösung
- Gruppe 5: 1 %ige Kristallinlösung in 1,0 %iger  $\alpha$ - Kristallinlösung

### 2.8.2 Inkubationsversuch II 0°C

Jeweils eine 1 % ige Lachs- und Kälblinsenkristallinlösung wurde 1 h bei 0°C inkubiert und anschließend 30 min bei -2°C und 14000 RPM zentrifugiert. Das entstandene Sediment wurde unter -4°C (Eiswasser) Bedingungen gewaschen. Das in Chaps- Puffer gelöste Sediment wurde mittels IEF analysiert.





### 3.1 Verteilung biochemischer Linseninhaltsstoffe

Die morphologische Zerlegung der Linse mit der „Bonner Schneidemaschine“ und anschließende biochemische Aufarbeitung der Linsenteile in ihre Hauptbestandteile: Protein (WS + WI) und Wasser, zeigen eine intraspezifische Altersabhängigkeit, deren Funktion in idealisierter Form ein Polynom 2. Grades, eine Parabel, beschreibt. Dieses Verhalten beschreiben der Wasser ( $H_2O$ )- und der wasserlösliche Kristallinanteil (WS), deren mengenmäßige Konzentrationen vom vorderen Pol (intraspezifisch jung) hin zum Kern (intraspezifisch alt) funktional abnehmen und zum hinteren Pol (intraspezifisch jung) wieder ansteigt. Spiegelbildlich verhalten sich das Trockengewicht (TG):  $TG = WS + WI$  und der wasserunlösliche Anteil (WI); Zunahme der Komponenten TG und WI von jung nach alt.

#### 3.1.1 Altersabhängige Verteilung von Protein und Wasser bei Rinderlinsen

Kennzeichnend bei der funktionalen Verteilung der Linseninhaltsstoffe der alternden Rinderlinse sind die Quotienten von  $H_2O/TG$  und  $WS/WI$ , die einen Wert größer als 1 ( $R > 1$ ) ergeben. Daraus folgt, dass die korrespondierenden altersabhängigen Funktionen keine gemeinsame Schnittfläche bilden (z.B.  $\int f(H_2O) - \int f(TG) = 0$ ).

Der Quotient der korrespondierenden Linseninhaltsstoffe  $H_2O/TG$  der Kernregion zeigt für  $R = 1 > 2$ , wohingegen das Verhältnis  $WS/WI$  der Kernregion einen Wert für  $R = 9 \pm 1$  aufweist (abhängig vom Alter des Tieres).

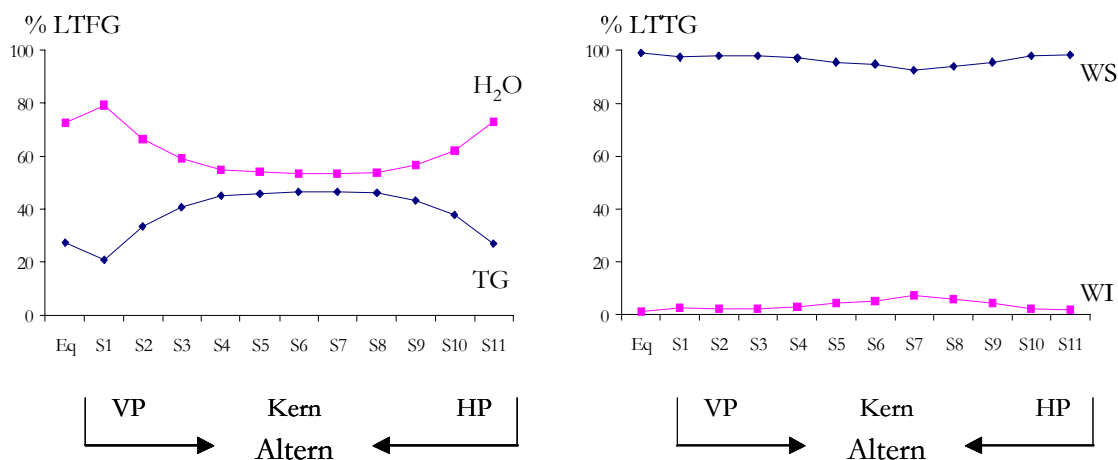


Abbildung 15. Verteilung von Wasser ( $H_2O$ ) und Trockengewicht (TG) einer 4 Jahre alten Rinderlinse bezogen auf das Linsenteilfrischgewicht (LTFG). Wasserlösliche (WS)- und wasserunlösliche Kristalline (WI) bezogen auf das Linsenteiltrockenwicht (LTTG). Der vordere Pol (VP) und hinterer Pol (HP) entsprechen jungen Faserzellen. Der Kern beinhaltet die ältesten Faserzellen. Der Equator (Eq) beinhaltet morphologisch die Germinative Zone (Zelldifferenzierung).

## 3.1.2 Verteilung von Protein und Wasser bei Lachslinsen

Der Vergleich einer jungen (15 Monate) mit einer alten (48 Monate) Lachslinse zeigt für die korrespondierenden Parameter  $H_2O/ TG$  ebenfalls Parabelfunktion. Im Gegensatz zu den Rinderlinsen zeigt der Quotient  $H_2O/ TG$  bei Lachslinsen einen Wert von  $R < 1$ . Folglich schneiden sich die korrespondierenden Funktionen und bilden eine Fläche  $A = \int f(H_2O) - \int f(TG)$  in den Grenzen VP und HP.

Der Vergleich morphologisch identischer Regionen z.B. Kern zweier unterschiedlich alter Linsen (jung/alt) zeigt den Einfluss des Alterns einer Spezies. Der relative Zunahme des Trockengewichtes resultiert aus dem Verlust des Wassers. Der Quotient  $H_2O/ TG$  wird immer kleiner folglich gilt für die Fläche :

$$A(\text{jung}) = \int f(H_2O) - \int f(TG) < A(\text{alt}) = \int f(H_2O) - \int f(TG) \text{ in den Grenzen } f(H_2O) = f(TG)$$

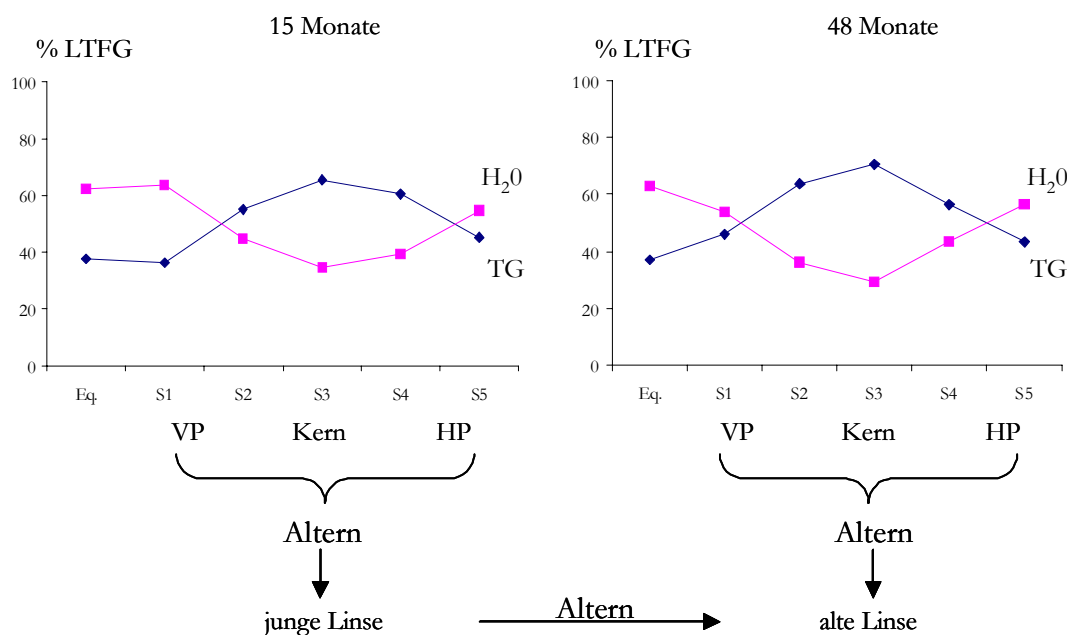


Abbildung 16. Verteilung von Wasser ( $H_2O$ ) und Trockengewicht ( $TG$ ) bezogen auf das Linsenteilfrischgewicht ( $LTFG$ ) einer 15 Monate und 48 Monate alten Linse des Lachses. Die morphologischen Regionen vorderer Pol (VP), hinterer Pol (HP) und der Kern repräsentieren die intraspezifische Altersabhängigkeit. Der Vergleich morphologisch identischer Regionen einer „jungen und alten“ Linse verdeutlicht den Einfluss des Alterns.

### 3.1.3 Verteilung von Protein und Wasser in Sepialinsen

Das Alter des Tintenfisches zu bestimmen war nicht möglich. Jedoch ist das Linsenfrischgewicht abhängig vom Alter. Je größer das Linsenfrischgewicht, desto älter ist das entsprechende Tier. Durch den Vergleich einer 50 mg mit einer 75 mg schwereren Linse, ist der Einfluss des Alters dokumentiert..

Funktional beschreiben die korrespondierenden Parameter ebenfalls eine Parabel. Die Schnittpunkte beider Funktionen bei  $R = 1$  liegen bei der 50mg Linse peripher in der äußeren Rinde. Hingegen zeigt die 75 mg schwere Linse sowohl im Kern als auch im im vorderen und hinteren Pol einen Wert von  $R > 1$ .

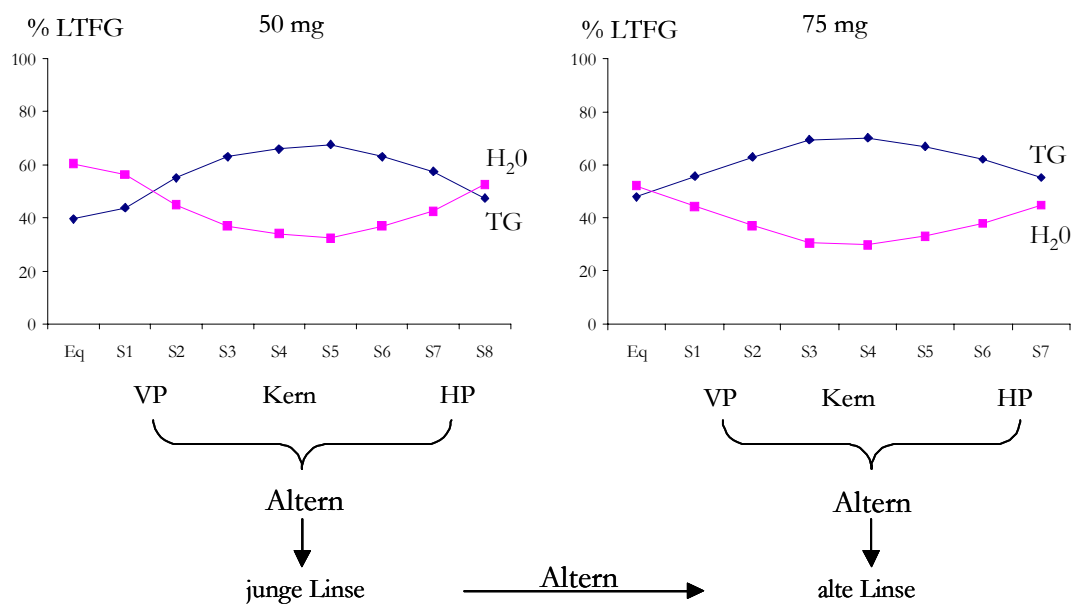


Abbildung 17. Verteilung von Wasser ( $H_2O$ ) und Trockengewicht (TG) bezogen auf das Linsenteilfrischgewicht (LTFG) einer 50 mg und 75 mg schweren Sepialinse.

### 3.1.4 Verteilung von wasserlöslichem- und wasserunlöslichem Protein in Lachslinsen

Die Summe des lyophilisierten wasserlöslichen- und wasserunlöslichen Anteils der „Linsenschnitte“ bilden das Linsenteilrockengewicht (LTTG). Die funktionalen Beziehungen der korrespondierenden Komponenten WS/ WI verdeutlichen den Einfluss des Alterns. Sie sind vergleichbar mit der altersabhängigen Verminderung des Wasserhaushaltes der Linse und der damit verbundenen Erhöhung der Proteinkonzentration.

Der wasserunlösliche Anteil (WI) nimmt in dem Maße zu, wie die wasserlöslichen Kristalline (WS) in ihrer Konzentration abnehmen. Der interspezifische Vergleich der Equatoren zeigt im Vergleich zu anderen morphologischen Regionen einen geringeren Einfluss des Alters (Zeit).

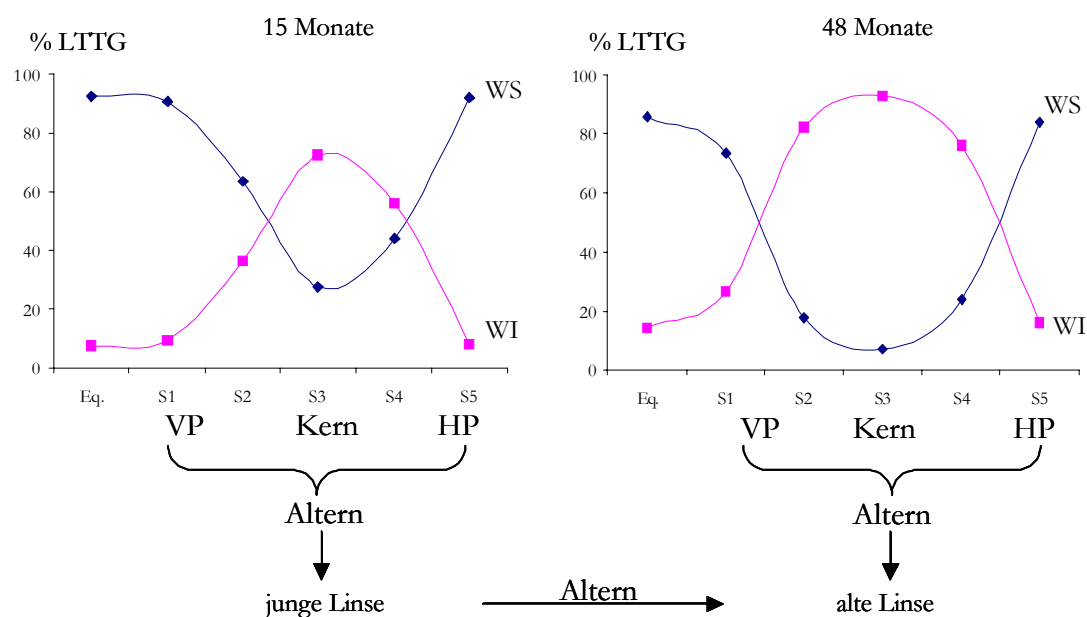


Abbildung 18 Prozentuale Verteilung des wasserlöslichen- und wasserunlöslichen Protein einer 15 und 48 Monate alten Lachslinse.

### 3.1.5 Verteilung von wasserlöslichem- und wasserunlöslichem Protein in Sepialinsen

Im Gegensatz zum Verhältnis der Linsenparameter  $H_2O/TG$  beschreibt die Gegenüberstellung von  $WS/WI$  keine Parabel in der allgemeinen Form:  $f(x) = ax^2$ . Die Beziehung ist höherer Ordnung:  $f(x) = ax^n$ .

Der wasserunlösliche Anteil (WI) nimmt in dem Maße zu, wie die wasserlöslichen Kristalline (WS) in ihrer Konzentration abnehmen. Das Verhältnis von  $WS/WI$  der 50 mg schweren Linse zeichnet sich durch den Quotienten  $R > 1$  in allen morphologischen Regionen aus. Im Laufe des Lebens der Sepia (LFG 75 mg) verändert sich das mengenmäßige Verhältnis von  $WS/WI$  in der Kernregion so, daß  $R < 1$  wird.

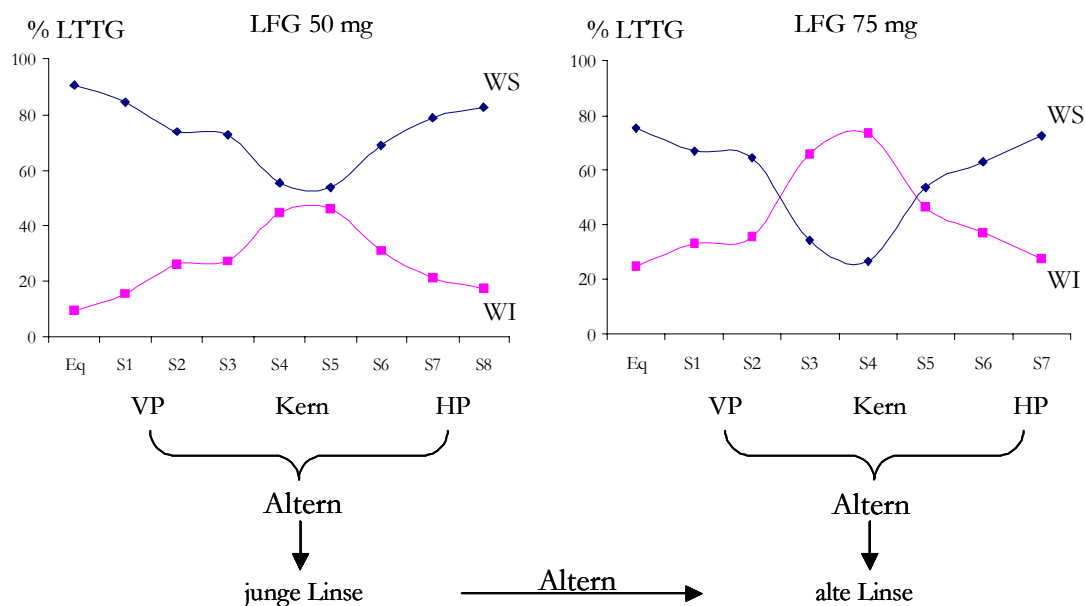


Abbildung 19. Prozentuale Verteilung des wasserlöslichen- und wasserunlöslichen Protein einer 50 und 75 mg schweren Sepialinse.

#### Zusammenfassung 3

Das Altern der Linse geht, mit zunehmenden Alter des Tieres, mit einer Verminderung von Wasser einher. Diese führt zu einer Erhöhung des Trockengewichtsanteiles, der sich aus der Summe des wasserlöslichen und wasserunlöslichen Anteils errechnet. Der wasserlösliche Anteil nimmt altersbezogen in dem Maße ab, wie der des wasserunlöslichen zunimmt.

Diese Veränderungen beschreiben bei den untersuchten Spezies idealerweise ein Polynom 2. Ordnung, eine Parabel. Eine Ausnahme bildet die intraspezifische Verteilung des wasserlöslichen- und wasserunlöslichen Anteils der Sepialinse, die ein Polynom höherer Ordnung beschreibt.

### 3.2 Artspezifische Verteilung der wasserlöslichen Kristalline

Die wasserlöslichen Kristalline bilden quantitativ den Hauptbestandteil des wasserlöslichen Anteils der Linse, welcher im Laufe des Lebens artspezifisch geringer wird. Diese wasserlöslichen Kristalline setzen sich aus den Strukturproteinen  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Kristallinen, den bi-funktionalen Kristallinen und den Enzymen des Stoffwechsel zusammen.

Die Charakterisierung der Kristalline nach ihrem isoelektrische Punkt, mittels isoelektrischer Fokussierung visualisiert die artspezifische Zusammensetzung der Kristalline, wobei die Färbeintensität der Proteine proportional ihrer Konzentration ist. Die Nomenklatur der nativen Strukturproteine basiert auf den Kristallinen der Säugerlinse, die der bi-funktionalen Kristalline ist artspezifisch.

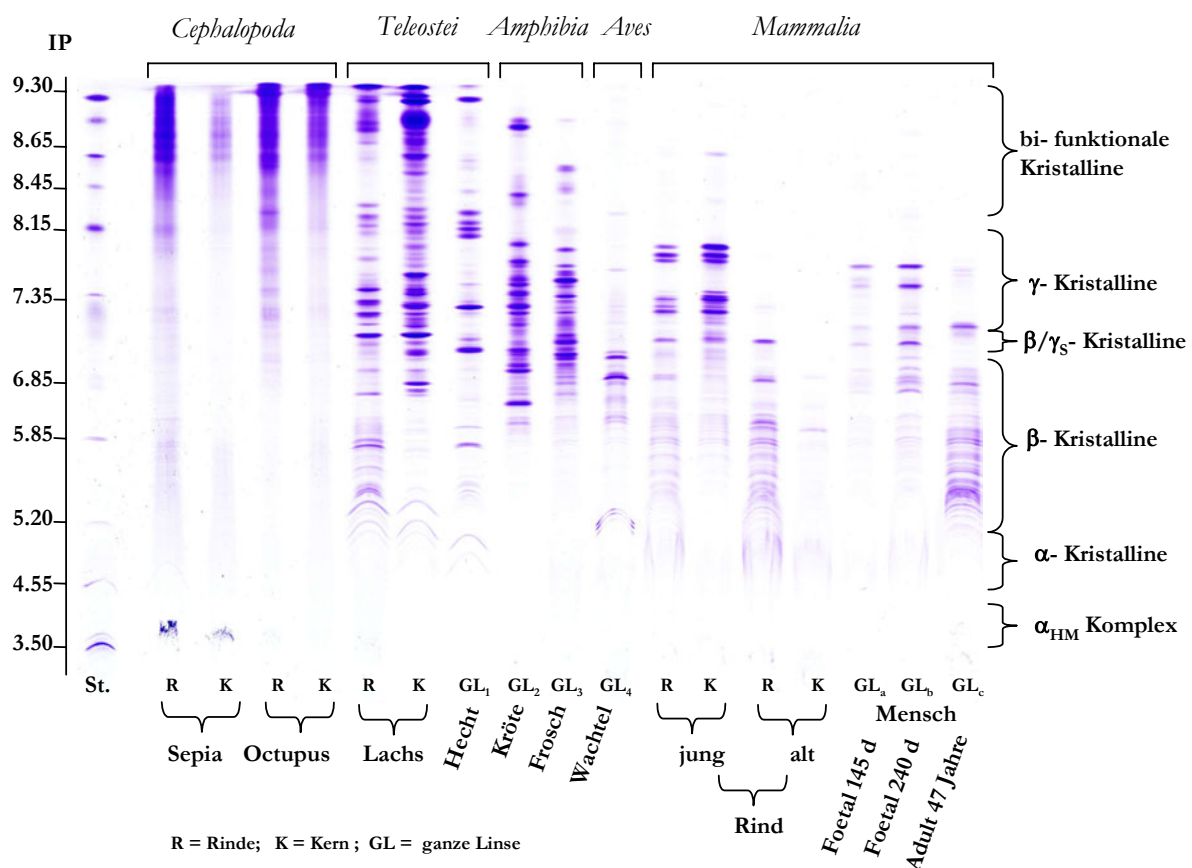


Abbildung 20 Isoelektrische Fokussierung von Augenlinsenkrystallinen verschiedener Spezies. Die Trennung der Kristalline mit IEF erfolgte unter nativen Gelbedingungen in einem pH-Gradienten von 3-10. Proteinkonzentration: 125 $\mu$ g/ Spur. Die Verteilung des pH- Gradienten definiert sich über die IP- Standardproteine (St).

Die Cephalopoden als Repräsentanten des ersten Linsenauges in der Evolution, weisen eine hohe Konzentration basischer bi-funktionaler Kristalline auf. Im IP-Bereich der Strukturproteine IP 8.15 – 4.0 lassen sich in geringen Konzentrationen  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\alpha$ - $H_M$  Kristalline detektieren. Während des Alterns (Vergleich Rinde-Kern) nimmt deren Konzentration gleichmäßig ab.

Die wasserlöslichen Kristalline der Lachslinse (Rinde) besitzen isoelektrische Punkte zwischen IP 5.0 und > 9 und charakterisieren somit die Strukturproteine  $\beta$ -,  $\gamma$ - und bi-

funktionale Kristalline ( $\delta'$ ). Das native  $\alpha$ -Kristallin der Säugerlinse stellt sich in der IEF nicht als eine klar definierte Kristallinbande in einen IP- Bereich zwischen 4 und 5 dar, sondern in Form eines Schweißes. Diese charakteristische  $\alpha$ -Kristallin Verteilung findet sich nach Trennung des WS- Anteiles in der IEF nicht. Jedoch zeigt sich eine Färbung im pH- Bereich des  $\alpha$ -HM Komplexes. Der Vergleich von Kristallinen der Rinde (jung) mit dem Kern (alt) zeigt eine Verminderung der angefärbten Kristalline des Lachses mit einem IP  $< 6.5$  im Bereich der  $\beta$ - Kristalline und eine Zunahme der Färbeintensität der Kristalline IP  $> 6.5$ .

Die Kristallinzusammensetzung der ganzen Linse (GL<sub>1</sub>) des Hechtes lässt sich qualitativ mit der des Lachses vergleichen.

In der Amphibienlinse (Kröte GL<sub>2</sub>; Frosch GL<sub>3</sub>) vermindert sich der Anteil der bifunktionalen Kristalline verglichen mit Cephalopoda und Teleostei. Der Hauptanteil der wasserlöslichen Amphibienkristalline liegt in einem pH- Bereich zwischen IP 5.85 und 8.0 ( $\beta$ -,  $\gamma$ - Kristallin).

Bei der Wachtel (GL<sub>4</sub>) lassen sich vereinzelte Kristalline mit einem IP  $> 7$  ( $\beta$ -,  $\gamma$ -, bifunktionale Kristalline) nachweisen. Eine Gruppe von Kristallinen IP 5.20 ( $\delta$ -Kristallin) ist qualitativ mit Kristallinen des Lachses vergleichbar. Quantitativ bilden die Kristalline zwischen IP 6.0 und 7.0 den wasserlöslichen Anteil (WS) der Wachtellinse.

Der wasserlösliche Anteil (WS) der Rinderlinse setzt sich aus den Strukturproteinen  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\beta_s/\gamma_s$ - und  $\gamma$ -Kristallinen zusammen. Die quantitative Verteilung der Kristalline ist abhängig vom Alter. Die  $\gamma$ - Kristalline (IP 7.1-8.1) der Rinde einer Kälberlinse (jung) verglichen mit dem Kern (alt) nehmen zu. Bei der Betrachtung Kalb/ Rind (25 Jahre) nimmt die Konzentration der  $\gamma$ -Kristalline sowohl für die Rinde als auch für den Kern ab. Die hochmolekularen  $\beta$ -Kristalline (IP 5.7 – 6.45) der Kälber- und Rinderlinse nehmen ebenfalls zu. Die Konzentration des  $\alpha$ -Kristallins verringert sich von der Rinde hin zum Kern. Es zeigt sich jedoch kein Unterschied zwischen einer jungen und alten Kälberlinse. Der Mensch als - entwicklungsgeschichtlich betrachtet - "jüngstes" Lebewesen im Tierreich zeigt, bezogen auf die ganze Linse, die gleichen qualitativen und quantitativen altersabhängigen Veränderungen wie die Rinderlinse. Die foetale Entwicklung der Linse (GL<sub>a</sub>; GL<sub>b</sub>) geht einher mit einer Zunahme aller Kristalline. Der Vergleich einer foetalen mit einer adulten Linse (GL<sub>c</sub>) zeigt eine Erhöhung der  $\beta$ -Kristallinkonzentration und eine relative Verminderung der  $\alpha$ -,  $\beta_s/\gamma_s$  und  $\gamma$ - Kristalline der adulten Linse.

Nach Trennung der wasserlöslichen Linsen kristalline nach ihrem isoelektrischen Punkt zeichnet sich jede Spezies durch ein charakteristisches Kristallinspektrum aus, welches durch den Altersstatus bestimmt wird. Es wird deutlich, dass die basischen Kristalline (bifunktionale Kristalline) anhand der dargestellten Arten im Laufe der Evolution an Bedeutung verlieren. Bei den Säugetieren tritt das native  $\alpha$ -Kristallin in Erscheinung, welches sich derart bei den entwicklungsgeschichtlich älteren Arten nicht visualisieren lässt. Der hochmolekulare  $\alpha_{HM}$ - Komplex hingegen lässt sich in allen Arten nachweisen.



### 3.3 Die Zusammensetzung des wasserlöslichen Kristallins der Lachslinse

#### 3.3.1 Native Kristallinverteilung der Linse des Lachses während des Alterns

Die Trennung der nativen wasserlöslichen Kristalline einer Lachslinse nach ihrem isoelektrischen Punkt, zeigt in Abhängigkeit vom Lebensalter keine qualitativen Unterschiede (Abb. 21).

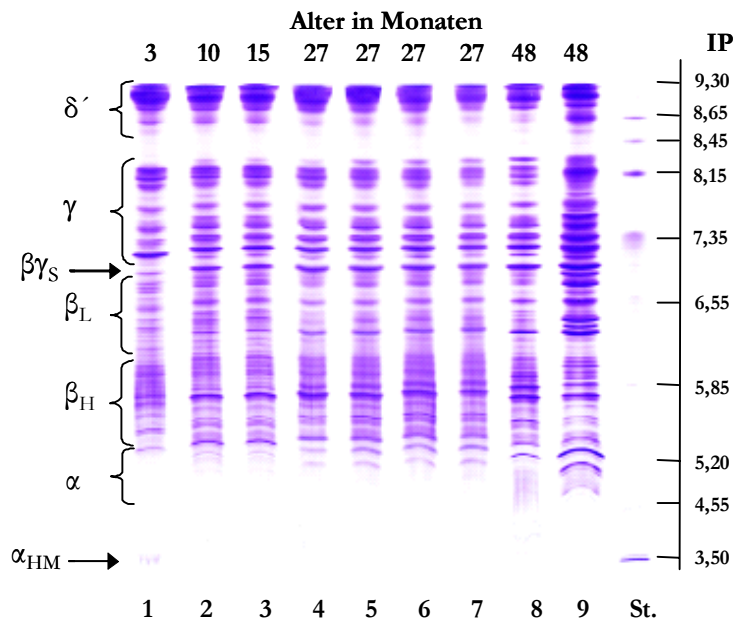


Abbildung 21 Isoelektrische Fokussierung von wasserlöslichen Kristallinen der Lachslinse

Native- IEF- Page

pH- Ampholinegradient 3 - 10

Proteinkonzentration/ Spur 50 µg WS- Kristallin

Proteinstandard IP 3,5 – 9,3

Während des Alterns vermindert sich der Anteil der  $\delta'$ - Kristalline (Spur 1-8). In der Gruppe der  $\gamma$ - Kristalline bildet sich im Alter von 10 Monaten (Spur 2) ein Kristallin mit einem IP von 8,3, dessen Konzentration mit steigendem Alter zunimmt. Die Menge an  $\beta\gamma_S$ - Kristallin steigt in den ersten 10 Monaten sprunghaft an (Spur 1/2) und bleibt dann während der weiteren Alterung konstant. Der Einfluss des Alterns führt bei den  $\alpha$ - Kristallinen (IP  $\geq$  5,2) zu aciden Kristallinbanden.

Der Kern einer 48 Monaten alten Lachslinse (Spur 9) ist von seiner regionalen Größe mit der Linse im Embryonalstadium vergleichbar und repräsentiert somit die gealterten Kristalline einer embryonalen Linse.

Der Vergleich der Linsen gleichen Alters (27 Monate; Spur 4-7), jedoch mit unterschiedlichen Körpergewichten (0,6 kg: Spur 4/5 und 2,5 kg: Spur 6/7) zeigt keinen Einfluss in der mengenmäßigen Linsenproteinzusammensetzung.

### 3.3.2 Linsenregionale Verteilung der nativen Kristalline des Lachses

Die regionale Differenzierung der Linse mit der "Bonner Schneidemaschine" (s. S. 19) und anschließender Trennung der nativen Kristalline nach ihrem isoelektrischen Punkt veranschaulicht die altersabhängige Veränderung der Kristalline einer Linse (Abb. 22).

Eine Abnahme der Kristalline mit einem IP 8,45 -9,5 ( $\delta'$ -Kristallin) in den morphologisch jungen Regionen S1/ S2/ S6/ S7 gegenüber der älteren Kernregion lässt auf eine altersabhängige Verminderung der Proteinbiosynthese schließen.

Hingegen korreliert die Abnahme der wasserlöslichen Kristalline der Kernregionen beider Linsen mit einem IP  $< 7$  (Abb. 22) mit der altersabhängigen Zunahme der wasserunlöslichen Kristalline (s. 3.1.4).

Eine 48 Monate alte Lachslinse zeigt im Vergleich zu einer 15 Monate alten Linse ein Fehlen der kernregionalen Kristalline mit einem IP 5,5 – 7, welches den  $\beta_H$ - Kristallinen der Kälberlinse entspricht.

Die parallele Betrachtung der beiden Linsentrennungen S1-S7 (15 Monate) und S1-S8 (48 Monate) vermittelt die altersabhängige Abnahme der Kristalline während des Alterns durch Verminderung der Färbintensität in IEF.

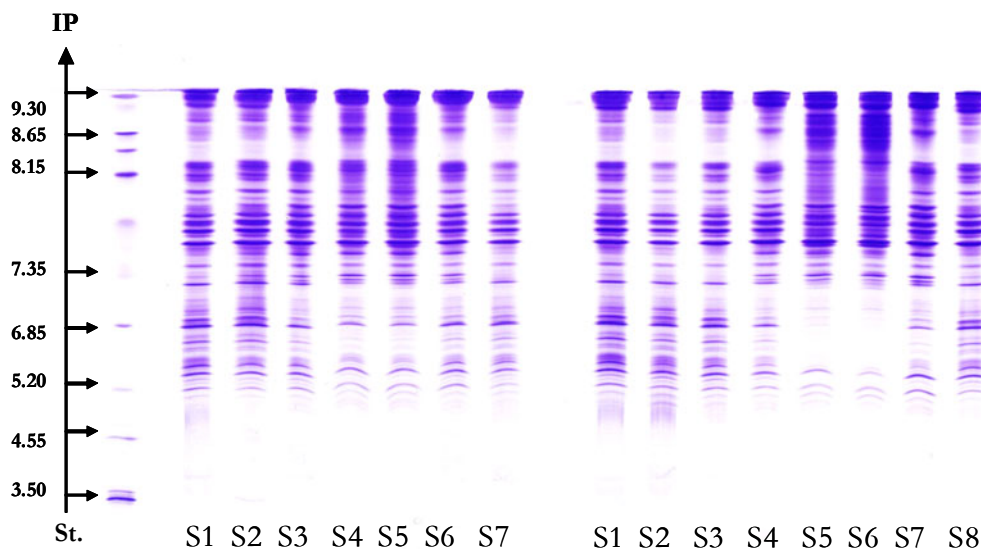


Abbildung 22 IEF der Linsen Kristalline des Lachses nach regionaler Differenzierung mit Hilfe der Bonner Schneidetechnik

Regionale Differenzierung einer 15 (S1 – S7) und 48 (S1 – S8) Monate alten Linse.

15 Monate: S1 – S7: S1 = Linsenequator; S2 = vordere Rinde 1 ; S3 = vordere Rinde 2; S4/ S5 = Kern; S6 = hintere Rinde 1; S7 = hintere Rinde 2.

48 Monate: S1 – S8: S1 = Linsenequator; S2 = vordere Rinde 1 ; S3 = vordere Rinde 2; S4 = vordere Rinde 3 ; S5/ S6 = Kern; S7 = hintere Rinde 1; S8 = hintere Rinde 2. St. = Standard

Native- IEF- Page

pH- Ampholinegradient 3 - 10

Proteinkonzentration/ Spur 50  $\mu$ g WS- Kristallin

Proteinstandard IP 3,5 – 9,3

### 3.3.3 Altersabhängige Polypeptidverteilung der wasserlöslichen Kristalline des Lachses

Die Trennung der nativen wasserlöslichen Kristalline mit der SDS-PAGE (s. S. 23) zeigt in Abbildung 23 die Verteilung der Polypeptide in Abhängigkeit vom Alter.

Die mit dieser Methode nachweisbaren molekularen Größen der Polypeptide der wasserlöslichen Kristalline liegen sowohl bei der Lachslinse als auch bei der Kälberlinse zwischen 21,5 und 31 kDa, jedoch mit unterschiedlichen Größen.

In der Verteilung der Polypeptide der Lachslinse (6, 18, 36, 48,  $W_{48}$ ) zeigt das Altern keine Unterschiede in den molekularen Größen. Die regional- aufgearbeiteten Linsen (s. S. 20) der 18 und 48 Monate alten Lachslinsen zeigen hingegen eine kontinuierliche Abnahme der Polypeptide von der jungen Rinde (Abb. 23 C) hin zur ältesten Kernregion (Abb. 23 F). Diese altersabhängige Verminderung der Polypeptide der wasserlöslichen Kristalline des Lachses lässt sich mit den Veränderungen in der Polypeptidverteilung der Kälberlinse vergleichen.

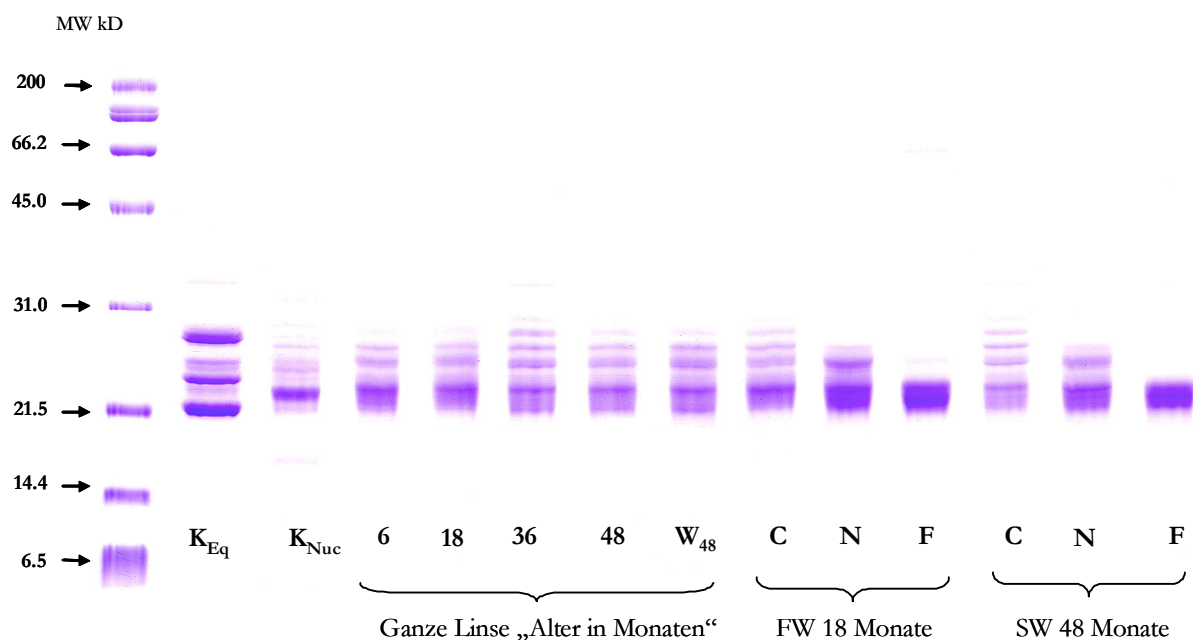


Abbildung 23 SDS- PAGE von Kristallinen des Lachses in Abhängigkeit vom Alter und Aufzuchtbedingungen

$K_{Eq}$  = Polypeptide der Equatorregion und  $K_{Nuc}$  = Polypeptide der Kernregion der Kalberlinse; 6, 18, 36 und 48 Monate alte Farmlachse,  $W_{48}$  = 48 Monate alter Wildlachs; C = Rindenregion, N = regional größerer Kernbereich, F = regional kleinerer Kernbereich, der embryonalen Linse entsprechend. FW 18 Monate = 18 Monate alter Farmlachs in der Frischwasseraufzucht; SW 48 Monate = 48 Monate alter Farmlachs in Fjord- Seewasser lebend.

### 3.3.4 2D- Elektrophorese der Rinderlinsenkrystalline in Abhängigkeit vom Altern

Die Trennung der Kristalline nach ihrem isoelektrischen Punkt unter denaturierenden Bedingungen und einer sich anschließenden Trennung nach molekularer Masse (kDa) in der 2D-Elektrophorese (s. S. 23) veranschaulicht in Abbildung 24 den regional- und somit altersabhängigen Polypeptidstatus der wasserlöslichen Kristalline (Kristallin- Proteom).

Die Polypeptide der Rindenregion einer Kälberlinse besitzen einen IP zwischen 4,8 und 8,1. Sie bilden drei Hauptgruppen zwischen 21,5 und 31 kDa. Der Kern als regionaler Repräsentant der embryonalen Linse zeigt im Vergleich zur Rinde ein heterogeneres Kristallin-Proteom.

Das Altern der Linse führt zu einer kontinuierlichen Abnahme der Polypeptide der wasserlöslichen Kristalline.

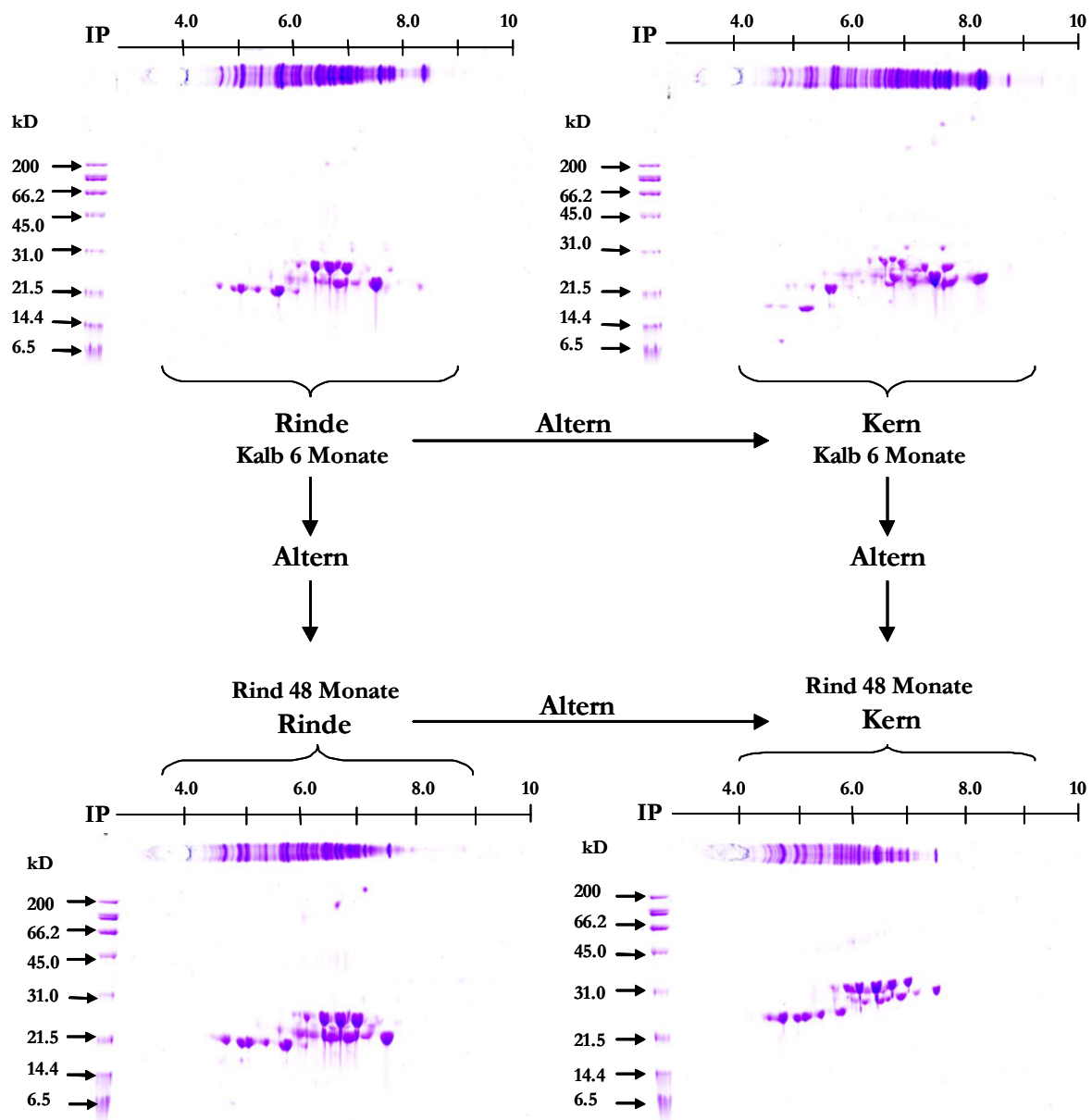


Abbildung 24 2- dimensionale PAGE von Kristallinen der Rinderlinse

### 3.3.5 2D- Elektrophorese der Kristalline des Lachses in Abhängigkeit vom Altern

Das Kristallin-Proteom der Rindenregion einer 15 Monate alten Lachslinse unterscheidet sich von dem Kristallin-Proteom der Kälberlinse derart, daß sich die Polypeptide mit einem IP zwischen 5 und 9,8 in zwei Gruppen darstellen. Eine heterogene Gruppe mit einem IP zwischen 5 und 7 und einer, der molaren Masse entsprechenden, homogenen Gruppe mit einem IP von 7 bis 10.

Der Einfluss des Alterns zeigt sich in einer Verminderung der Polypeptide der heterogenen Gruppe bei relativer Konstanz der Polypeptide mit einer homogenen Masse von 23 kDa und isoelektrischen Punkten zwischen 6 und 10.

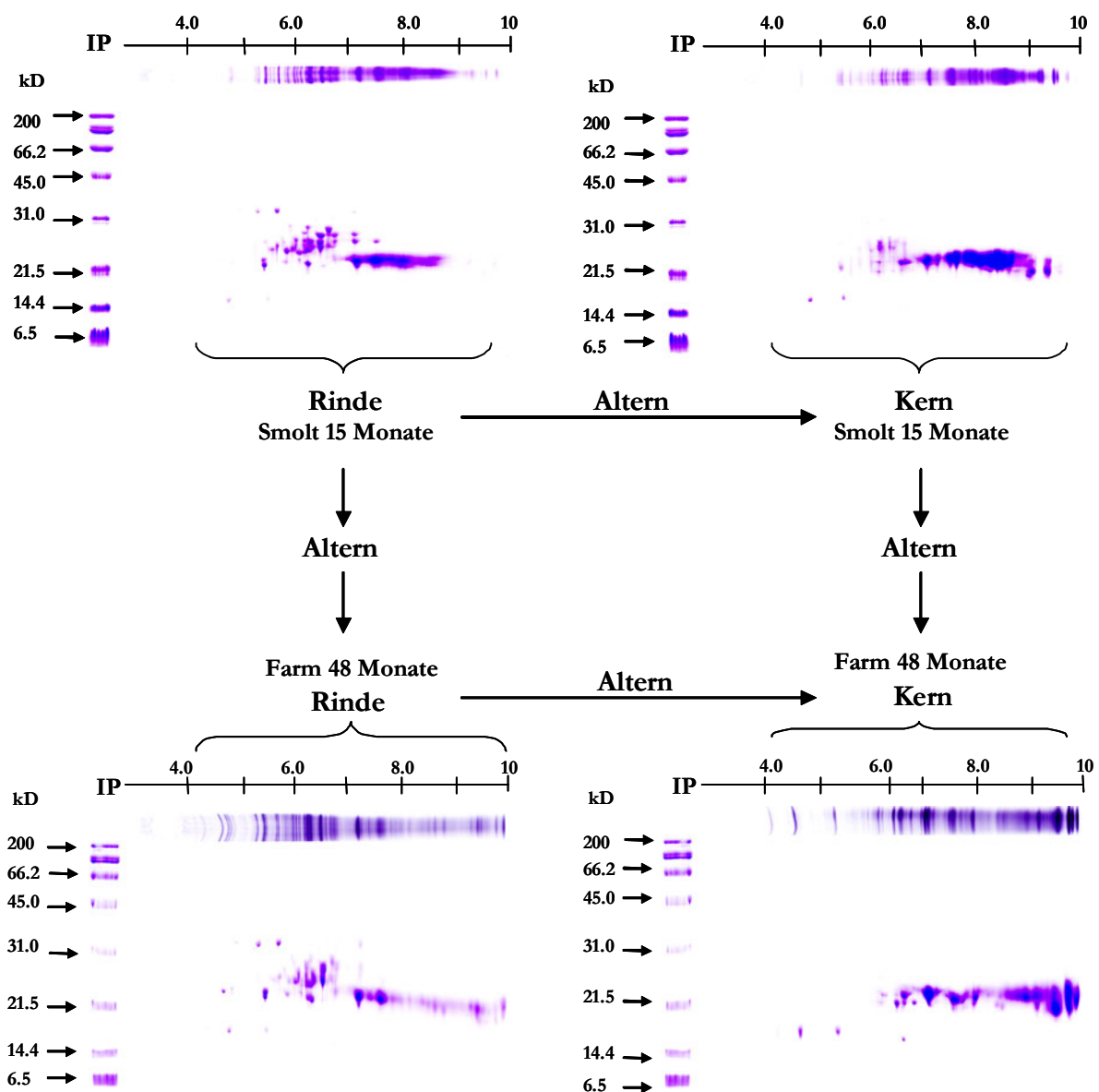


Abbildung 25 2- dimensionale PAGE von Kristallinen unterschiedlich alter Lachslinsen

### 3.4 Gelfiltration (SEC)

#### 3.4.1 Vergleich der Kristallinverteilung bei Farmlachsen und Rindern

Die Gelfiltration mit einer Sepharose 4B Trenngelmatrix als stationäre Phase trennt die wasserlöslichen Kristalline der Rindenlinse in  $\alpha_{HM}$ ,  $\alpha$ -,  $\beta_H$ -,  $\beta_L$ - und  $\gamma$ - Kristallin (s. Abb. 26). Die Kristalline zeigen chromatographisch ein breites Spektrum ihrer molekularen Größe, wobei  $\alpha_{HM}$  Kristallin mit einer Masse  $> 10^6$  Dalton und  $\gamma$ - Kristallin mit  $2 \times 10^4$  Dalton das Proteinprofil begrenzen.

Die synchrone Dokumentation einer chromatographischen Trennung (Sepharose 4B) der wasserlöslichen Kristalline des Farmlachses zeigt bis auf das  $\alpha$ - Kristallin eine Übereinstimmung der molekularen Größenverteilung mit jenen der Rinderlinsen-kristalline. Der dem  $\alpha$ - Kristallin analoge Kristallinkomplex des Lachses zeichnet sich mit einer Masse von  $\sim 4 \times 10^5$  Dalton chromatographisch zwischen  $\alpha$ - und  $\beta_H$ - Kristallin des Rindes ab.

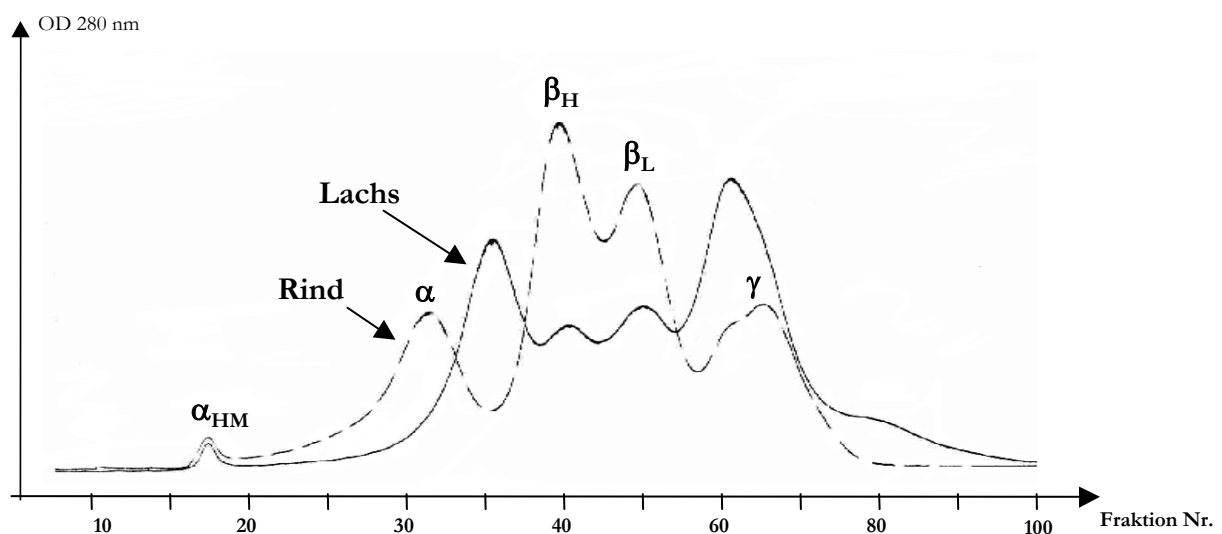


Abbildung 26 Synchrone Dokumentation der Linsenkrystallinverteilung des Farmlachses und des Rindes.

Trenngelmatrix: Sepharose 4B

Trennsäule: 60 cm

Puffer: Tris-HCL, 100 mM, pH 7,4

Flow rate: 0,3 ml/ min.

Proteinmenge: 100 mg

## 3.4.1.1 Kristallinverteilung bei Lachsen nach Gelfiltration mit Sephacryl S-300

Der Einsatz einer Sephacryl S- 300 Gelmatrix zeigt eine differenzierte Trennung der Kristalline mit einem Molekulargewicht  $< 2 \cdot 10^4$  Dalton. Peak Nr. I entspricht dem  $\alpha_{HM}$  Kristallin, Peak Nr. III dem  $\alpha$ - Kristallin analogen Kristallinkomplex, Peak Nr. IV und V repräsentieren  $\beta_H$ - und  $\beta_L$ - Kristallin und  $\gamma$ - Kristallin entspricht Peak Nr. VI. Die Lachs spezifischen  $\delta'$ - Kristalline mit einer Masse  $< \gamma$ - Kristallin trennen sich in Peak Nr. VII und VIII auf.

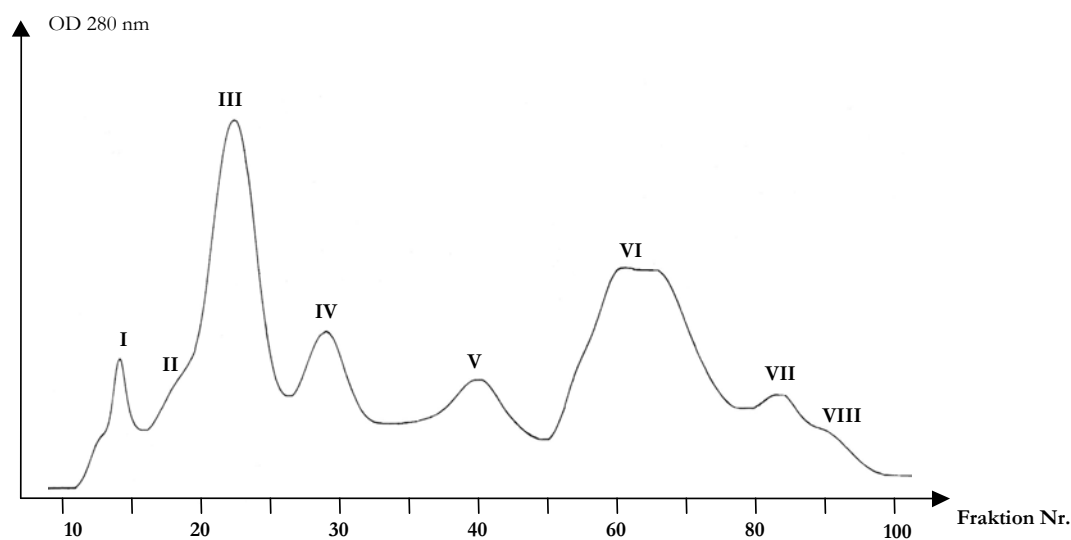


Abbildung 27 Gelchromatographie Sephacryl S-300 von wasserlöslichem Farmlachslinsen-kristallin

Trenngelmatrix: Sepharose 4B

Trennsäule: 60 cm

Puffer: Tris-HCL, 100 mM, pH 7,4

Flow rate: 0,3 ml/ min.

Proteinmenge: 100 mg

### 3.4.2 Kristallinzusammensetzung nach Trennung mit Sephacryl S-300

Für die weitere Differenzierung der Kristalline wurden die Hauptfraktionen der einzelnen Peaks (s. Abb. 27) isoliert, konzentriert und anschließend einer weiteren chromatographischen Trennung mit Sephacryl S-300 unterzogen.

#### 3.4.2.1 Native Isoelektrische Fokussierung der Kristalline

Die Trennung der wasserlöslichen Kristalline der isolierten Kristallin-Peaks I-VIII (s. Abb 28) nach ihrem isoelektrischen Punkt zeigt für die Gruppe der  $\alpha$ - Kristalline (Peak I-III) ein Bandenmuster mit isoelektrischen Punkten zwischen IP 4,55 und 7,35. Peak IV ( $\beta_{II}$ ) beinhaltet Kristalline mit isoelektrischen Punkten zwischen IP 6 und 7. Die Kristalline des Peak V und VI zeigen ein Spektrum von IP 4,8 bis IP 8,15, wobei die Kristalline von Peak V zwischen IP 4,8 und 5,5 stärker visualisiert sind und die von Peak VI zwischen IP 5,5 und 7. Die  $\delta'$ - Kristalline des Peaks VII/ VIII besitzen isoelektrischen Punkte zwischen IP 5,8 und IP 10.

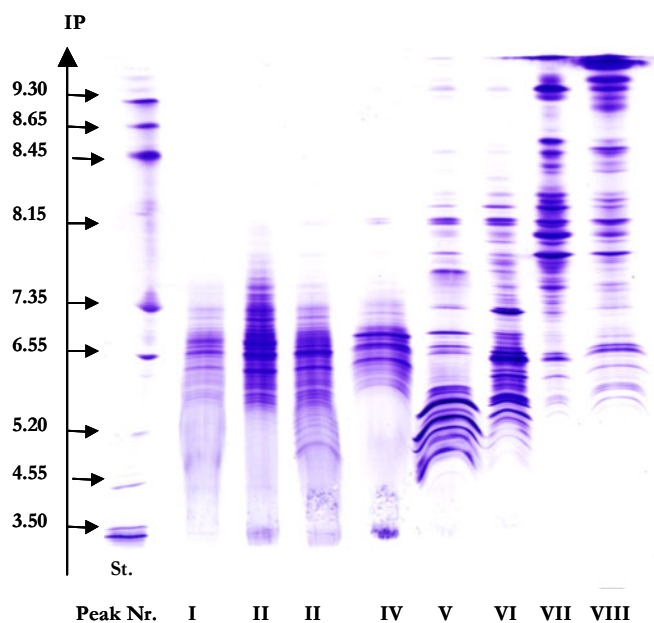


Abbildung 28 Isoelektrische Fokussierung der gelchromatographisch getrennten Lachskristalline

Native- IEF- Page

pH- Ampholinegradient 3 - 10

Proteinkonzentration/ Spur 50  $\mu$ g

Proteinstandard IP 3,5 – 9,3



### 3.4.2.2 Polypeptidverteilung der chromatographisch getrennten Lachskristalline

Die SDS-Page trennt die Polypeptide der Linsenkrilline ihrer molekularen Größe nach. Die chromatographisch getrennten Kristallingruppen (s. S. 41) zeigen für Peak I-V eine qualitative Übereinstimmung mit einem Molekulargewicht von 55 und 58 kDa, wobei die Konzentration von Peak I nach V zunimmt. In einem Bereich zwischen 23 kDa und 31 kDa nimmt die Konzentration der Polypeptide von Peak I nach V ab. Peak VI/ VII setzen sich aus vier Polypeptiden mit Massen zwischen 18 und 23 kDa und zwei Polypeptiden mit 43 und 44 kDa zusammen. Die Polypeptide des Gesamtlinsenkrillins der chromatographischen Trennung (Eq. im Gel dargestellt), zeigen eine qualitative und quantitative Übereinstimmung. Ein Polypeptid mit einer Masse von  $\sim 16$  kDa lässt sich in den Peaks I/ VI und in der Ausgangsprobe erkennen.

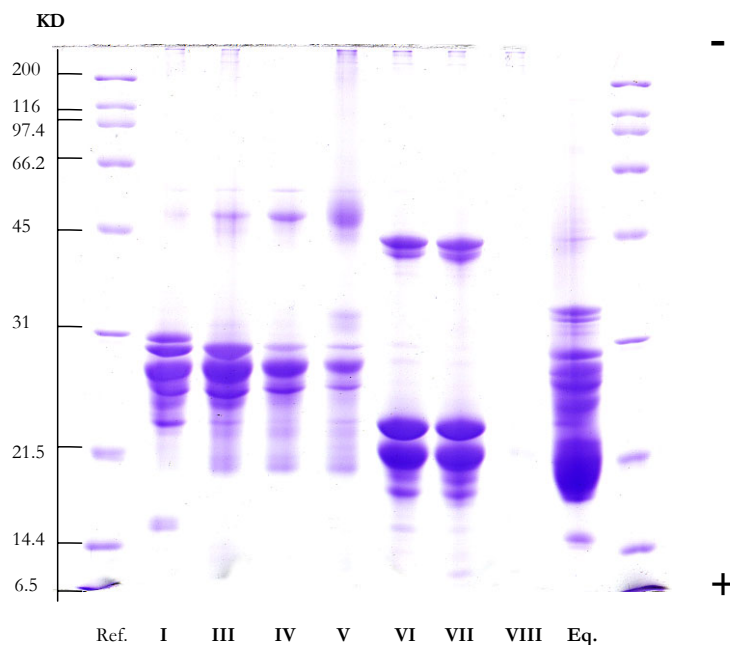


Abbildung 29 SDS- PAGE der gelchromatographisch (S-300) getrennten Linsenkrilline des Lachses

#### Vertikal SDS- PAGE

Acrylamidekonzentration: T = 12%; C = 3%

Proteinmenge/ Spur: 10  $\mu$ g

Referenz (Ref.) SDS-Standardprotein BioRad

Visualisierung: CBB R 250

### 3.5 Alterungsprozess der wasserlöslichen Kristalline

Das Altern der Augenlinse zeichnet sich durch eine Verminderung der Konzentration der wasserlöslichen Kristalline bei gleichzeitiger Zunahme des wasserunlöslichen Proteinanteils aus (s. S. 28). Der Equator (germinative Zone) repräsentiert die jüngsten Kristalline der Linse. Hingegen sind die Kristalline des Kernes so alt wie das Individuum selbst.

Während des Alterns (Equator jung / Kern alt) einer Rinderlinse nimmt der mengenmäßige Anteil des  $\alpha_{HM}$ - und  $\beta_H$  Kristallins zu; bei gleichzeitiger Verringerung der  $\alpha$ - und  $\beta_L$ - Kristallinkonzentration. Die absolute und relative Menge an  $\gamma$ - Kristallin nimmt vom Equator hin zum Kern zu.

Verteilung der wasserlöslichen Kristalline der Lachslinse nach Trennung mit HPLC

Die HPLC als chromatographisches Verfahren trennt die wasserlöslichen Kristalline des Equators in  $\alpha_{HMF}$ ,  $\alpha_{HF}$ ,  $\alpha_F$ ,  $\beta_{F1}$ ,  $\beta_{F2}$ ,  $\gamma_F$ ,  $\delta'$ - Kristallin und niedermolekulare Proteine (PPF).

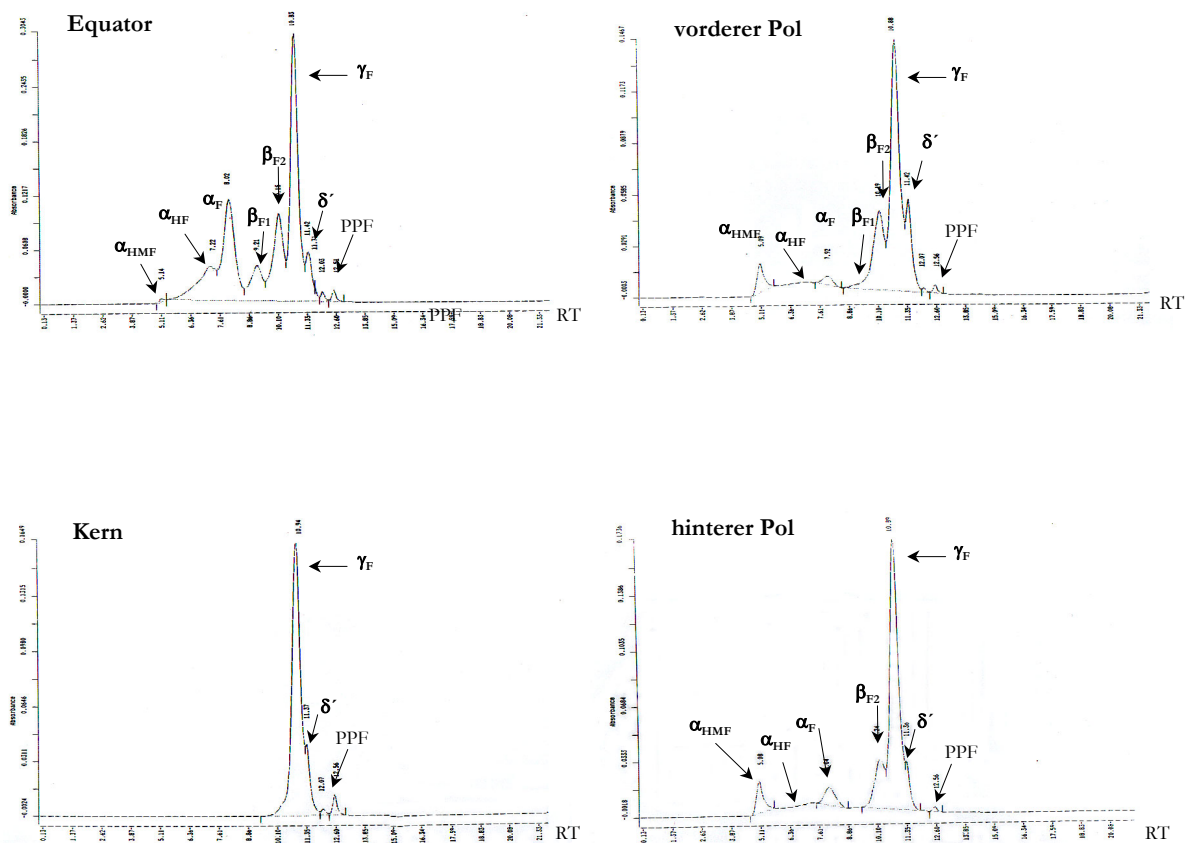


Abbildung 30 Intraspezifische Verteilung von den Kristallinen einer 48 Monate alten Farmlachslinse nach HPLC

Die Kristalline des vorderen Pols unterliegen dem Einfluss des Alterns. Sie zeigen in ihrer Zusammensetzung eine Zunahme des  $\alpha_{HMF}$  und eine Abnahme der  $\alpha_F$ ,  $\alpha_{HF}$ - und  $\beta_{F1}$ - Kristallinkomponenten. Weiteres Altern, repräsentiert durch den Kern, führt zum Verlust der  $\alpha_F$ ,  $\alpha_{HF}$ ,  $\beta_{F1}$ - und  $\beta_{F2}$ - Kristalline.  $\gamma_F$ - und  $\delta'$ - Kristallin zeigen keine mengenmäßige

Abnahme und bilden somit das wasserlösliche Kristallins des Kerns. Der hintere Pol ist vom Alter und der Kristallinzusammensetzung mit dem vorderen Pol vergleichbar.

### 3.5.1 Vergleich der wasserlöslichen- und wasserunlöslichen Kristalline nach Trennung mit IEF

Während des Alterns einer Linse (Rinde/Kern) verringert sich die Konzentration der wasserlöslichen Kristalline und der Anteil des wasserunlöslichen Proteinanteils nimmt spiegelbildlich zu (s. 3.1.4). Konzentrisches Rühren einer dekapsulierten Linse führt zur schichtweisen Ablösung der appositionell angeordneten Linsenfasern. Die biochemisch jüngsten Kristalline befinden sich in Rinde 1. Die morphologisch tiefere und somit ältere Linsenregion charakterisiert Rinde 2. Der Kern einer adulten Linse entspricht der foetalen Linse einer Spezies.

Ein Lösen des wasserunlöslichen Proteinanteils mit 7 M Harnstoff ist in Abhängigkeit vom Alter der Kristalline (Rinde 1/ Kern) nicht vollständig. Der Vergleich der Polypeptide von WS/ WI der Rinde 1 zeigt eine qualitative Übereinstimmung (s. Abb. 31). Jedoch sind in einem IP- Bereich zwischen IP 6,2 / 6,8 keine Polypeptide des WI-Anteils nachweisbar.

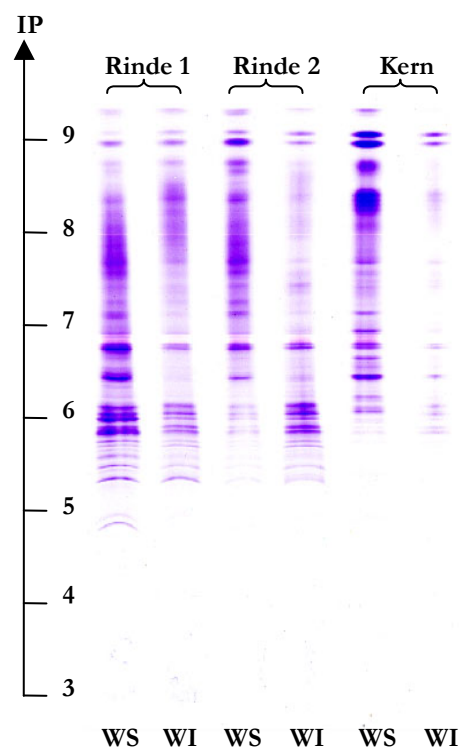


Abbildung 31 Urea- IEF von wasserlöslichen- und unlöslichen Kristallinen einer 48 Monate alten Farmlachslinse. Rinde 1 = vordere Rinde; Rinde 2 = tiefere Rinde

Der Anteil der WS-Kristallin Polypeptide der Rinde 2 ist im Vergleich zum WS-Kristallin der Rinde 1 unterhalb IP 6,2 mengenmäßig geringer. Dagegen nimmt die Konzentration der Polypeptide des WI der Rinde 2 im Vergleich zum WI der Rinde 1 und des WS der Rinde 2 zu.

Im Kern ist die Konzentration der Polypeptide des WS mit einem IP > 8 höher als bei Rinde 1/ 2. Die Polypeptide des Kern-WI zeigen eine dem WI der Rinde 1/ 2

vergleichbare Zusammensetzung sind aber wegen der geringeren Löslichkeit des wasserunlöslichen Kernkristallin schwächer visualisiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Polypeptidverteilung der wasserlöslichen- und unlöslichen Kristalline in den morphologischen Regionen der Linse qualitativ vergleichbar ist. Die Konzentration der Polypeptide des WS, mit einem IP < 6,2 nimmt im Verlauf des Alterns ab. Gleichzeitig steigt die Menge dieser Polypeptidgruppe im WI an (Rinde 1/ 2). Hingegen fehlen sowohl dem WS- als auch dem WI-Anteil des Kerns die Polypeptide mit einem IP < 5,8

### 3.5.2 2- dimensionale IEF

Die 2- dimensionale IEF gibt Aufschluss über die Polypeptidzusammensetzung der nativen Kristalline. Sowohl die  $\beta$ - Kristalline als auch das  $\alpha$ - Kristallin zerfallen unter dem Einfluss von 7 M Harnstoff in mehrere Polypeptide. Die isoelektrischen Punkte der einzelnen Polypeptide eines Kristallins unterscheiden sich untereinander und von ihrer nativen Form.

Werden native Kristalline in 7 M Harnstoff gelöst und anschließend einer nativen IEF (1. Dimension) unterzogen, renaturieren die Kristalline. Alle nicht kovalent an das  $\alpha$ - Kristallin gebundenen Kristalline trennen sich und wandern an ihren IP (s. S. 25). Bei anschließender Trennung der 1. Dimension in einer 7 M Harnstoff IEF (2. Dimension) trennen sich die renaturierten Kristalline in Polypeptide entsprechend ihrer IPs auf (s. Abb. 32).

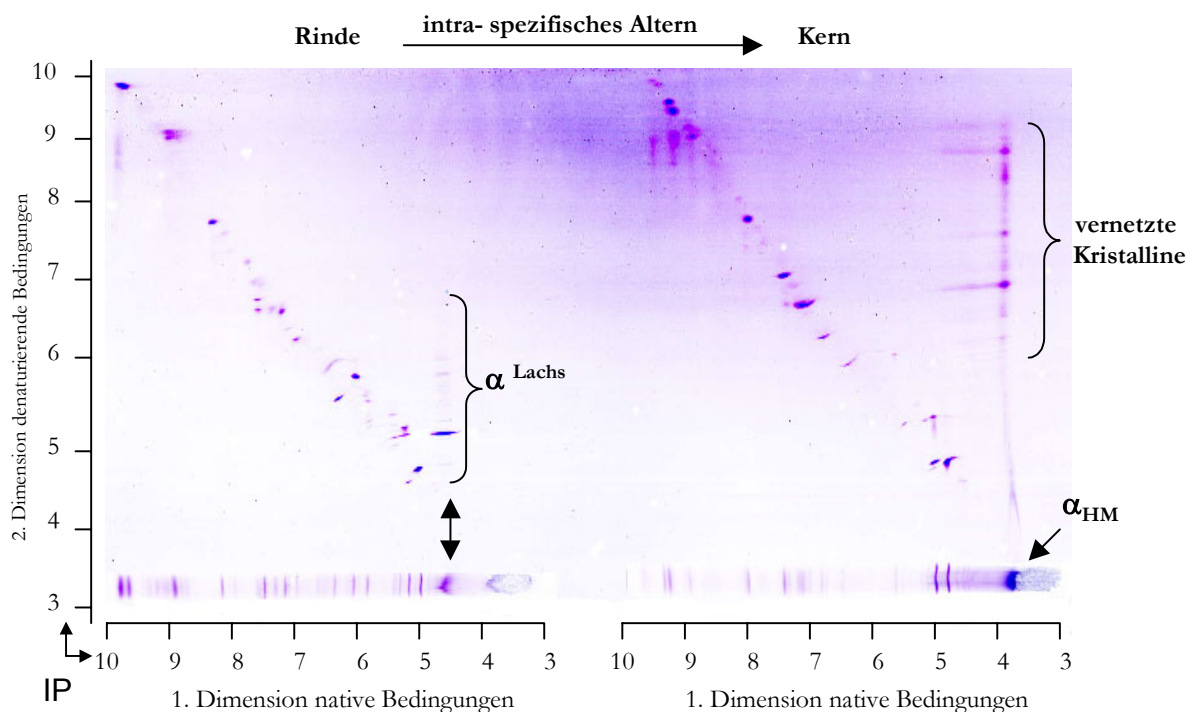


Abbildung 32 2- dimensionale IEF von Rinden- und Kernkristallinen der Linse von Farmlachsen  
Die Trennung von wasserlöslichem Linsenkrystallin der Farmlachslinse (48 Monate) aus der morphologisch jungen Rindenregion zeigt in der 1. Dimension eine Bande bei IP 4,8 (entsprechend  $\alpha$ - Kristallin Rind). Im Gegensatz dazu visualisiert sich in der Kernregion

ein Kristallin bei IP 3,8 (entsprechend  $\alpha_{HM}$ - Kristallin Rind). Die 2. Dimension läßt für das Kristallin IP 4,8 eine sehr ausgeprägte Bande bei IP 5,2 und schwach visualisierte Banden  $>$  und  $<$  IP 5,2 erkennen. Hingegen zeigt die Trennung der 2. Dimension für das Kernkristallin IP 3,8 Polypeptide mit einem IP zwischen 6 und 10.

Die Kristalline mit einem IP  $>$  5 zeigen in der 2. Dimension sowohl für die Rinden- als auch für die Kernregion eine heterogene Verteilung der IP's der Polypeptide. Der mengenmäßige Anteil der Kristalline zwischen IP 5 und 7 ist in der Kernregion geringer als in der Rindenregion.

#### 1. Dimension

Native- IEF- WS / Kristallin in 7 M Harnstoff

pH- Ampholinegradient 3 - 10

Proteinkonzentration/ Spur 50  $\mu$ g

#### 2. Dimension

7 M Harnstoff IEF

pH- Ampholinegradient 3 - 10

### 3.6 2D Page des $\alpha$ -Kristallins vom Kalb und seines Analogons im Farmlachs

Im Gegensatz zur 2D- IEF, bei der in der 1. Dimension die nativen Kristalline und in der 2. Dimension die Polypeptide entsprechend ihrem IP getrennt werden, folgt bei der 2D-PAGE (s. S. 23) der 1. Dimension in einer 7 M Harnstoff IEF eine SDS- PAGE in der 2. Dimension. Die Charakterisierung des Polypeptides erfolgt über den IP (1. Dimension IEF) und die molare Masse (2. Dimension SDS- PAGE).

Der Ermittlung der molaren Masse (s. S. 40) und des isoelektrischen Punktes (s. S. 46) des Kalb analogen Lachs  $\alpha$ - Kristallins folgte eine präparative Isolierung und Reinigung des  $\alpha$ - Kristallins und seines Analogons im Lachs (s. S. 20).

Die Trennung der aufgereinigten  $\alpha$ - Kristalline vom Kalb und Lachs mittels 2D-PAGE erfolgte sowohl in der 1. als auch in der 2. Dimension auf einem Trenngel (s. Abb. 33).

Das native  $\alpha$ - Kristallin des Kalbes bildet eine Gruppe von Polypeptiden mit einer Masse von 23 kDa und IP's zwischen 6,7 und 7,2 ( $\alpha$ B- Kristalline) und Polypeptide mit einem IP 5,2 bis 5,8 und einer molaren Größe von 22 kDa ( $\alpha$ A- Kristalline).

Der  $\alpha$ - Kristallin analoge Komplex des Lachses zeigt bezüglich seiner isoelektrischen Punkte und seiner Masse eine Heterogenität und ist mit dem  $\alpha$ - Kristallin des Kalbes in seiner Zusammensetzung nicht zu vergleichen. Einzig zwei Polypeptide mit einem IP von 5,2 und einer Masse von 22-23 kDa sind mit dem  $\alpha$ A- Kristallin vergleichbar (s. S. 46).

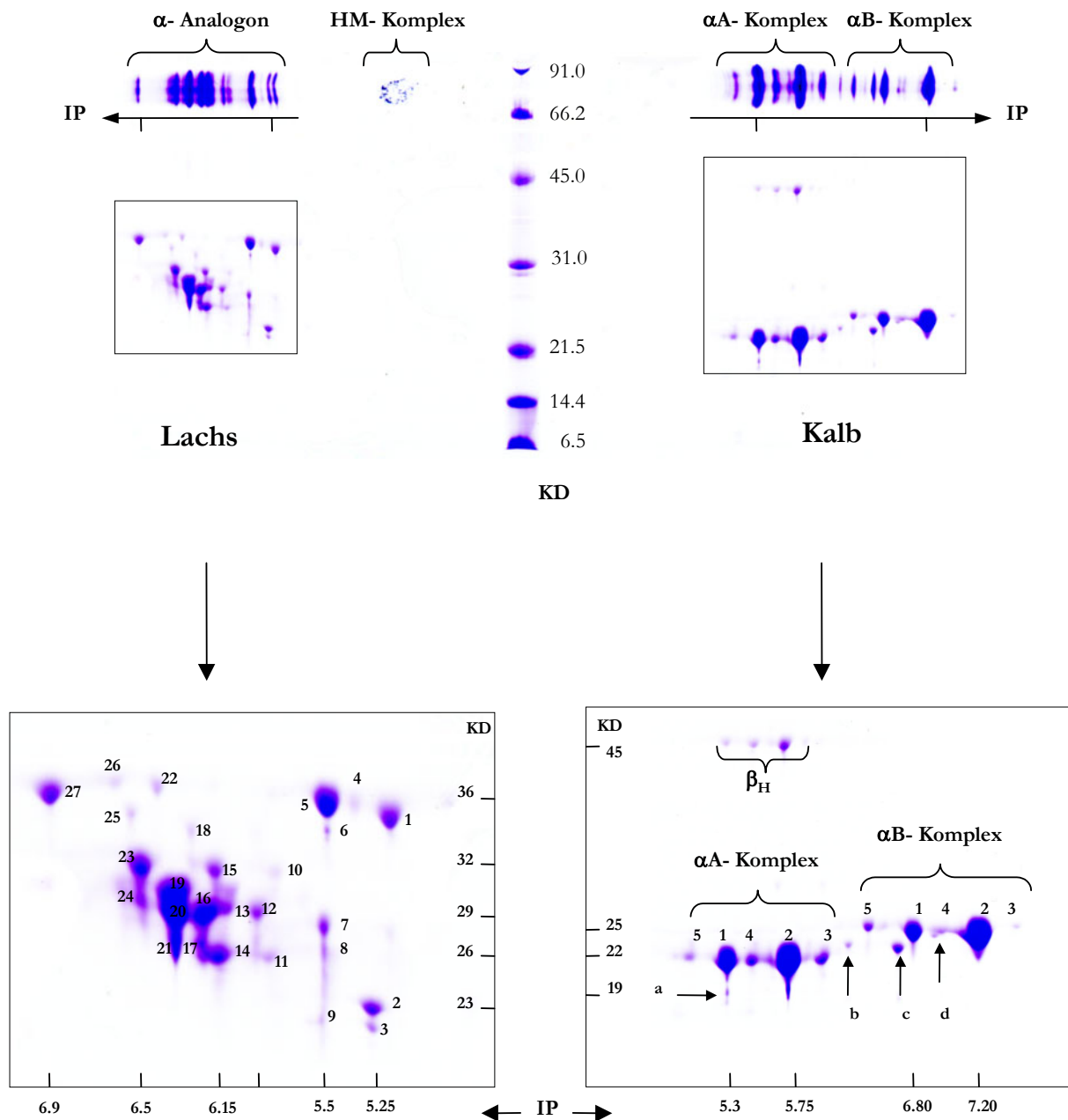


Abbildung 33 2D- PAGE des Kalb-  $\alpha$ - Kristallin und dessen analogen Komplexes bei Lachsen

Die Subunits des Kälber  $\alpha$ - Kristallins  $\alpha A_{1-5}$  und  $\alpha B_{1-5}$  unterscheiden sich nur durch ihren IP innerhalb einer Gruppe. Die Massen sind identisch. Zusätzlich zu den bekannten Polypeptiden des  $\alpha$ - Kristallins befinden sich drei Polypeptide mit einem molaren Gewicht von 45 kDa und isoelektrischen Punkten zwischen 5,3 und 5,75 sowie vier (a-d) Polypeptide  $\neq \alpha A$  und  $\alpha B$ .

Die Gegenüberstellung des Farmlachs " $\alpha$ "- Kristallins mit dem  $\alpha$ - Kristallin des Kalbes weist auf drei, dem  $\alpha A$ -Kristallin vergleichbare Polypeptide (Spot 2, 3 und 9) hin. Die verbleibenden Spots des Farmlachs " $\alpha$ "- Kristallins besitzen Massen  $> \alpha A_{1-5}$  und  $\alpha B_{1-5}$

### 3.7 Einfluß von Urea auf den Faltungsprozeß der Linsenkristalline des Kalbes und Farmlachses

Die überwiegend nicht kovalent gebundenen wasserlöslichen Kristalline lassen sich in einer 7 M Harnstofflösung vollständig in ihre Sekundärstruktur überführen. Die Rückführung (Rückfaltung) der denaturierten Kristalline in den nativen Zustand (tertiär Struktur  $\gamma$ - Kristallin/ Monomere; quartär Struktur  $\alpha$  und  $\beta$ - Kristalline/ Oligomere) durch die Verminderung der Harnstoffkonzentration, läßt sich mit einer modifizierten Kieselgelmatrix mit nativen Pufferbedingungen (s. S. 25) durchführen.

Die Abbildungen 34/35 demonstrieren den Einfluss verschiedener Harnstoffkonzentrationen auf die Renaturierung von wasserlöslichen Kristallinen des Kalbes und Farmlachses unter Einsatz der HPLC mit einem Molekularsieb als Trennmatrix.

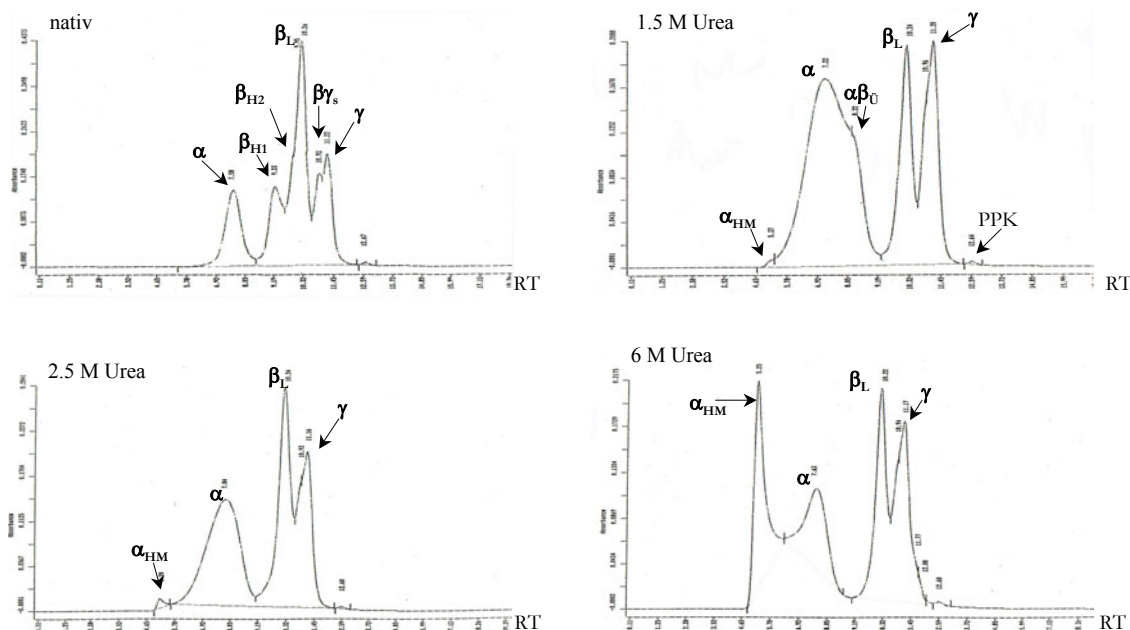


Abbildung 34. Einfluss von Urea auf die Faltung der wasserlöslichen Kälberlinsenkristalline

Die molekulare Größenverteilung der nativen wasserlöslichen Linsenkristalline der morphologisch jungen Rinde der Kälberlinse zeigt eine Auftrennung in  $\alpha$ -,  $\beta_{H1/2}$ -,  $\beta_L$ -,  $\beta_{\gamma}$ - und  $\gamma$ - Kristalline. Unter dem Einfluss einer 1,5 M Harnstoffkonzentration (Urea) bildet sich während der Renaturierung  $\alpha_{HM}$ . Der flächenmäßige Anteil der  $\alpha$ - und  $\gamma$ - Kristallin Region nimmt gegenüber den nativen Kristallinen zu. Die  $\beta_{H1/2}$  Kristalline nehmen ebenfalls an Größe zu ( $\alpha\beta_{\gamma}$ ).  $\beta_{\gamma}$ - ist nicht nachweisbar. Allein die  $\beta_L$ - Kristalline behalten bei allen Harnstoffkonzentrationen, sowohl in der Fläche, als auch in ihrer molekularen Größe, ihre Stabilität.

Die Erhöhung der Harnstoffkonzentration auf 2,5 M führt zu einem Anstieg des  $\alpha_{HM}$ - Kristallins bei gleichzeitiger Abnahme der  $\alpha$ -/ $\alpha\beta_{\gamma}$ - und  $\gamma$ - Kristallinfläche.

Zu einem rapiden Anstieg der  $\alpha_{HM}$ - Fläche bei gleichzeitiger Abnahme der  $\alpha$ - Kristallinfläche führt die Renaturierung der Kristalline in einer 6 M Harnstofflösung. Die Fläche des  $\gamma$ - Kristallins wird im Vergleich zu 2,5 M Harnstoff unwesentlich größer.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unter dem Einfluss verschiedener Harnstoffkonzentrationen und anschließender Renaturierung eine molekulare



Größenzunahme der Rinderlinsen kristalline in Richtung des hochmolekularen  $\alpha$ -Kristallins stattfindet. Obwohl eine quantitative Verschiebung der Kristalline stattfindet, lassen sich auch unter dem Einfluss von 6 molarem Harnstoff bis auf die hochmolekularen  $\beta$ - und  $\beta\gamma$ - Kristalline alle Kristallingruppen der Kälberlinse nachweisen.

Der Einsatz des Renaturierungsverfahrens bei den wasserlöslichen Kristallinen der Lachslinse (s. Abb. 35) trennt diese in die Kalb analogen  $\alpha_{HF}$ -,  $\alpha_F$ -,  $\beta_{F1}$ -,  $\beta_{F2}$ -,  $\gamma$ - Kristalline, die Fisch spezifischen  $\delta'$ - Kristalline und eine niedermolekulare Gruppe PPF. Unter dem Einfluss von 1,5 molarem Harnstoff vermindert sich der flächenmäßige Anteil der  $\beta_{F1}$ - Kristalline und die Fläche des  $\alpha_F$ - und  $\beta_{F2}$ - Kristallinanteile nehmen zu. 2,5 molarer Harnstoff führt zu  $\alpha_{HMF}$ - Kristallin und einer drastischen Verminderung der  $\alpha_{HF}$ -,  $\alpha_F$ -,  $\beta_{HF}$ - Kristallinfraction.  $\beta_{F2}$ -,  $\gamma$ -,  $\delta'$ - Kristalline und die PPF bleiben sowohl qualitativ als auch quantitativ stabil. Die Renaturierung in einer 6 M Harnstoff-/ Kristallinlösung führt bei geringer Zunahme des  $\alpha_{HMF}$ - Kristallinkomplexes zu einer weiteren Abnahme aller Kristallingruppen. Die  $\gamma$ -,  $\delta'$ - Kristalline und die PPF zeigen sich gegenüber Harnstoff stabil.

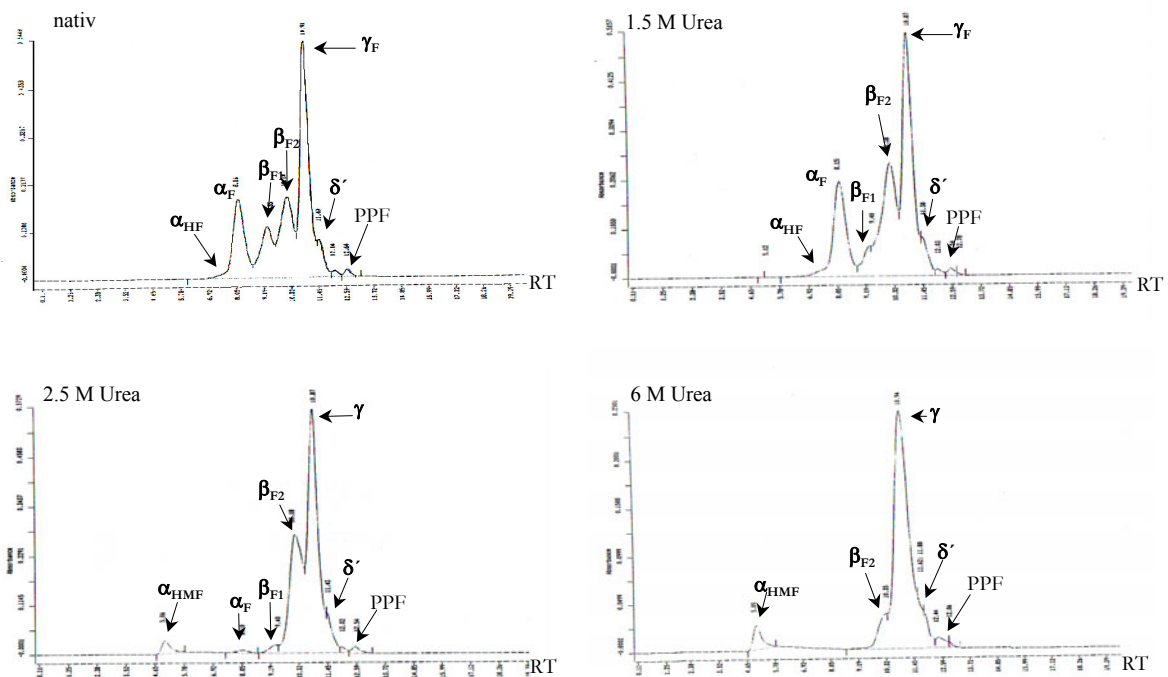


Abbildung 35. Einfluss von Urea auf die Faltung der wasserlöslichen Lachslinsenkristalline

Der Vergleich der molekularen Verteilungsprofile der Linsenkristalline von Kalb und Lachs unter dem Einfluss verschiedener Harnstoffkonzentrationen lässt auf unterschiedliche Faltungsmechanismen während der Renaturierung schließen.



### 3.8 Einfluss der Temperatur auf das Verhalten von Kristallinen der Lachslinse

Die Erhöhung/ Verminderung von Energie in einem System bedeutet Stress für eine Zelle und somit auch für ihre Proteine. Die Zufuhr von Wärme destabilisiert das funktionelle Protein (Tertiärstruktur) und überführt/ denaturiert es in die Form der Sekundärstruktur. Die Säugetiere schützen sich in solchen zellulären Stresssituationen durch die Produktion so genannter "heat-shock-proteine" (Hsp's). Diese Hsp's interagieren mit den denaturierenden Proteinen und schützen diese vor weiterer Entfaltung und folgender Aggregation.

#### 3.8.1 Harnstoff IEF der temperaturabhängigen Aggregationsprodukte

Die Inkubation einer wässrigen Kristallinlösung bei Temperaturen von  $-4^{\circ}\text{C}$  und  $37^{\circ}\text{C}$  und anschließender Zentrifugation (Trennung WS/WI) ergab für die Kristalline des Kalbes kein Aggregationsprodukt in Form eines wasserunlöslichen Sedimentes. Hingegen zeigten die Kristalline der Lachslinse sowohl bei  $-4^{\circ}\text{C}$  als auch bei  $37^{\circ}\text{C}$  ein Aggregationsprodukt.

Der Vergleich der aufgereinigten Aggregationsprodukte ( $-4^{\circ}\text{C}/ 37^{\circ}\text{C}$ ) mit den wasserlöslichen ( $\text{WS}_A/ \text{WS}_{E1}/ \text{WS}_{E2}$ )- und unlöslichen Kristallinen (WI) der Rindenregion der Lachslinse nach Trennung der Polypeptide mittels Urea- IEF zeigt keine qualitativen Unterschiede in ihrer Zusammensetzung (s. Abb.36).

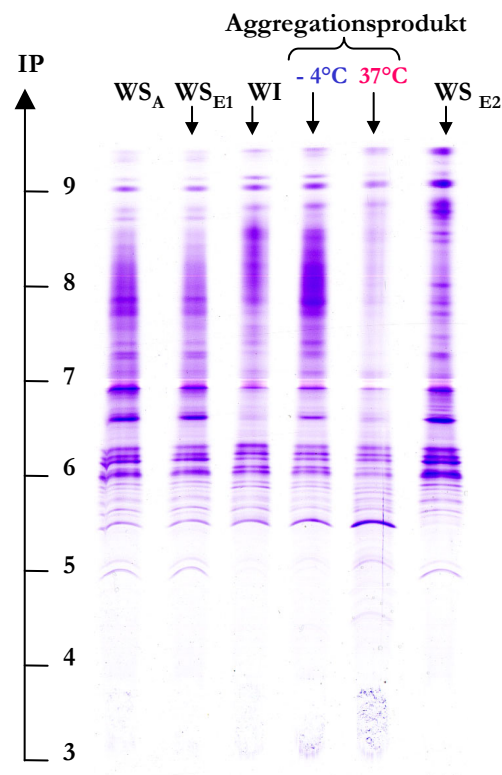


Abbildung 36 Harnstoff-IEF temperaturabhängiger Aggregationsprodukte des wasserlöslichen Kristallins der Farmlachslinse

$\text{WS}_A$  = wasserlösliches Kristallin Ausgangsprobe;  $\text{WS}_{E1}$  = wasserlösliches Kristallin nach  $-4^{\circ}\text{C}$  Inkubation;  $\text{WS}_{E2}$  = wasserlösliches Kristallin nach  $37^{\circ}\text{C}$  Inkubation

Der Einfluss der Temperatur auf die wasserlöslichen Kristalline in Form von unlöslichen Aggregaten zeigt im Vergleich zu dem nativen wasserunlöslichen Kristallin (WI) eine identische Polypeptidzusammensetzung.

### 3.8.2 Einfluss der Temperatur (4°C) auf isolierte Kristalline der Lachslinse

Nach Trennung der Kristalline mit einer Sephacryl S-200 Matrix (s. Abb. 37) und anschließender Aufarbeitung (s. S. 42) der jeweiligen chromatographischen Peak Maxima folgte eine 24stündige Inkubation der Kristallin-Pufferlösung (Peak I-VII; Abb. 36) bei 4°C.

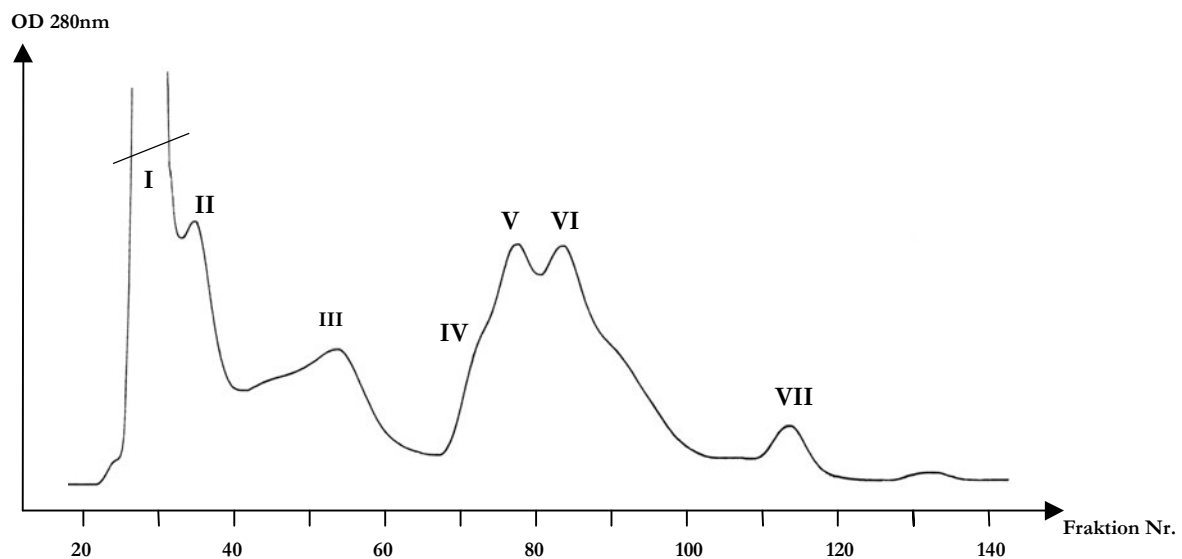


Abbildung 37. Gelchromatographische (S-200) Verteilung von Kristallinen (Peak I-VII) der Lachslinse

Trennmatrix: Sepharose S-200  
Puffersystem: Tris-HCl, 100 mM; pH 7,4  
Flow rate: 0,5 ml/ min  
Protein: 100 mg WS-Kristallin der Lachslinsenrinde (Alter 48 Monate)

Die Verteilung der entsalzten und konzentrierten Kristalline nach ihrem isoelektrischen Punkt (s. Abb. 38) veranschaulicht den Prozess der Kristallin-Interaktion.

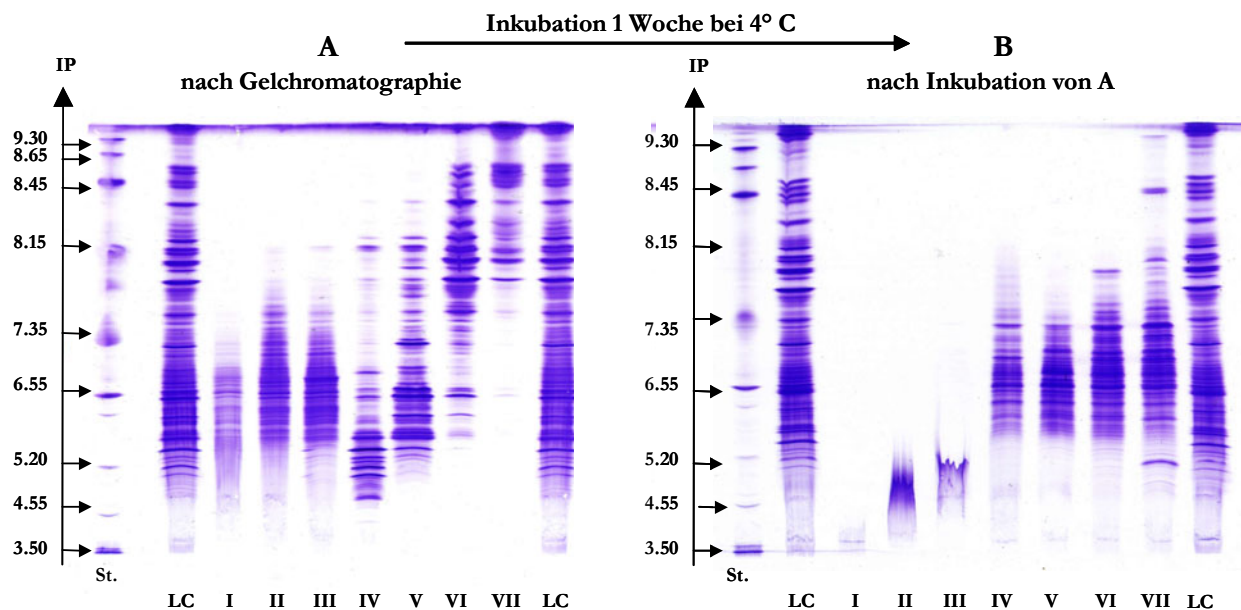


Abbildung 38. nativ-IEF der mit Sephacryl getrennten (A) und Kälte ausgesetzten Kristalline (B)

Der direkte Vergleich der chromatographisch getrennten Kristalline nach ihrem isoelektrischen Punkt vor und nach Inkubation, eine Woche bei 4°C, (s. Abb. 38 Gel A/ B) zeigt nach Kälte-Inkubation in der IEF für Peak I eine Verminderung der Kristalline mit IP's von 4,55 bis 7,35 auf 3,5 bis 3,55. Die miteinander vergleichbaren Kristalline von Peak II/ III (IP 4,5 bis 8,15) verändern sich unter dem Einfluss der Kälte derart, daß sie sich nicht mehr als differenzierte Kristalline, sondern als ein undifferenzierter Kristallinkomplex mit einem IP zwischen 4,55 und 5,2 darstellen. Die treppenartige Verteilung der Kristalline von Peak IV/ VII mit isoelektrischen Punkten zwischen 4,55 und 10 (s. Abb. 38 Gel A) ändern nach Kälteeinfluss ihre Ladung in einem IP- Bereich zwischen 5,2 und 8,15.

Der Einfluss der Temperatur auf das Verhalten der Kristalline untereinander führt bei Peak I/ II/ III zu Kristallinen, die in ihrer IEF- Darstellung dem  $\alpha_{HM}$ - und  $\alpha$ - Kristallin der Rinderlinse entsprechen (s. S. 33). Die Kristalline von Peak I – VII verändern ihren isoelektrischen Punkt so, dass ihr Ladungsverhalten mit denen der  $\beta$ - und  $\gamma$ - Kristalline der Rinderlinse vergleichbar sind. Die Vielfältigkeit der nativen Kristalline der Lachslinse reduziert sich unter Stresssituation in Folge von Energieverminderung durch Kälte (Kälteschock).

Das Lösen der bei 4°C inkubierten Kristalline in 7 M Harnstoff überführt die Kristalline aus ihrer nativen Form in Polypeptide, wobei Kristallin-Kristallin- Interaktionen aufgelöst werden.

Abbildung 39 demonstriert die Verteilung der Polypeptide der gelchromatographisch und kälteinkubierten Kristalline des Lachses nach ihrem isoelektrischen Punkt.

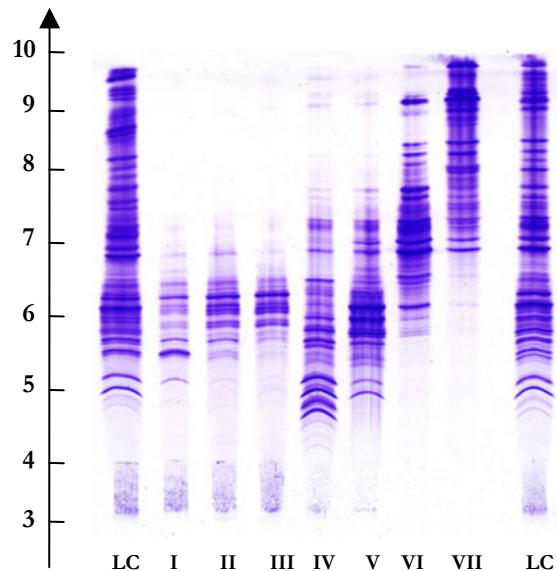


Abbildung 39 Urea-IEF- PAGE der „in vitro“ gealterten Linsen Kristalline des Lachses

Die Polypeptide von Peak I/ II/ III sind in ihrer qualitativen Zusammensetzung verwandt und entsprechen den Polypeptiden des unter 3.6 charakterisierten lachsspezifischem  $\alpha$ - Kristallin. Unterschiede bestehen in der mengenmäßigen Verteilung der Kristallin- Komponenten. Die treppenartige Stufung der Polypeptide von Peak IV – VII ist vergleichbar mit der Auftrennung der nativen Kristalline der entsprechenden Peak's (s. S 53 Abb. 38 A). Diese Polypeptide bilden die Sekundärstrukturelemente für die Faltung der nativen Kristalline *in vivo*.

### 3.9 Schutzfunktion des $\alpha$ - Kristallin des Kalbes

Die Stabilität der Kälber- Linsen Kristalline gegenüber Temperatur ( $-4^{\circ}$ /  $37^{\circ}$ C) beruht auf der „heat shock“ Funktion des  $\alpha$ - Kristallins (s. S. 11).  $\alpha$ - Kristallin unterbindet die stressinduzierte (Temperatur) Interaktion der Kristalline und sichert somit die Löslichkeit der Kristalline *in vivo* und *in vitro*.

Diese heat-shock-Stabilität besitzen die Kristalline der Lachslinse nicht (s. S. 51). Sie bilden sowohl bei  $-4^{\circ}$ C als auch bei  $37^{\circ}$ C ein wasserunlösliches Kristallinprodukt aus Polypeptiden, das mit denen des nativen wasserunlöslichen Kristallin des Laches vergleichbar sind.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass das  $\alpha$ - Kristallin des Lachses nicht mit dem des Kalbes zu vergleichen ist. Weder in der Funktionalität (s. S. 51) noch in der Poypeptidzusammensetzung (s. S. 47) ergeben sich Gemeinsamkeiten.

Den Einfluss des  $\alpha$ - Kristallins (s. S. 26) der Kälberlinse (Säugetiere) auf die Interaktion der wasserlöslichen Kristalline (WS) des Farmlachses (Knochenfische) und von Sepia (Weichtiere) in Form eines wasserunlöslichen Komplexes (WI) unter Stress (37°C) zeigt Abbildung 40.

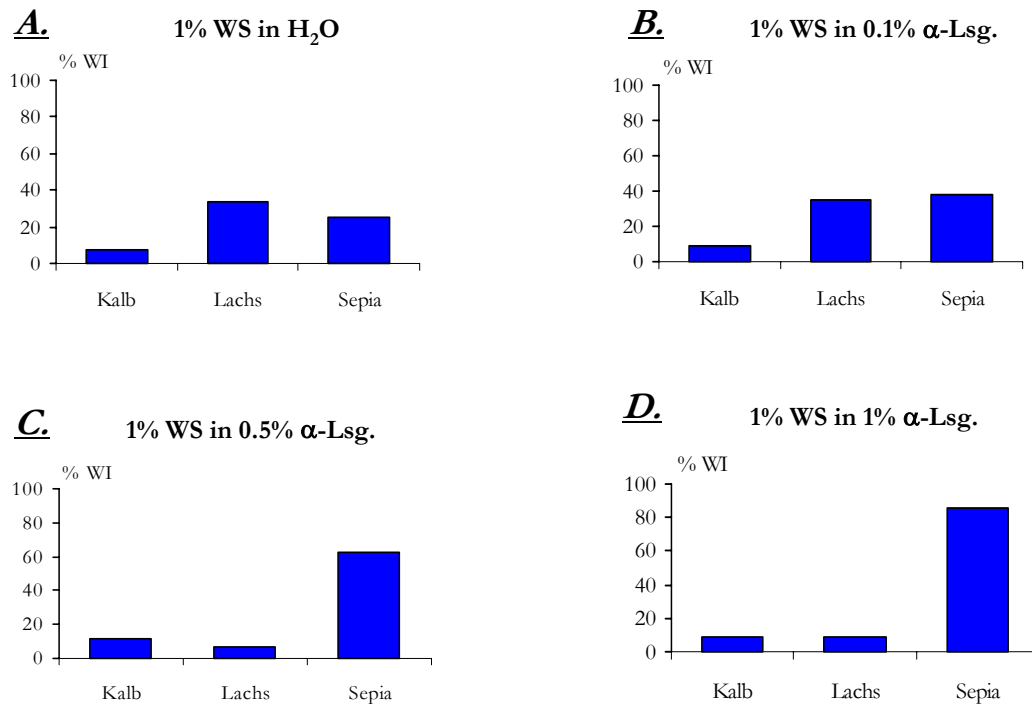


Abbildung 40 Einfluss des  $\alpha$ - Kristallins des Kalbes auf die Bildung des wasserunlöslichen Kristallins (% WI) bezogen auf die eingesetzten wasserlöslichen Kristalline (100%).

Die signifikante Zunahme des gebildeten wasserunlöslichen Kristallin- Komplexes (WI) (Abb. 40 A) aus den wasserlöslichen Kristalline der Lachslinse und Sepialinse basiert auf der fehlenden Hsp- Funktion der Kristalline dieser Spezies in einer Temperatur-Stresssituation. Die Zugabe von 0,1 %  $\alpha$ - Kristallin (Abb. 40 B) führt nur bei den Kristallinen der Sepialinse zu einer signifikanten ( $p=0,05$ ) Zunahme des WI- Komplexes. Hingegen bewirkt eine Zugabe von 0,5 %  $\alpha$ - Kristallin (Abb. 40 C) zu einer signifikanten Verminderung des WI- Komplexes bei den Lachskristallinen. Die Sepialinsenkristalline zeigen wie in Abb. 40 B eine signifikante Zunahme des WI- Komplexes. Eine Erhöhung der  $\alpha$ - Kristallinkonzentration auf 1 % (Abb. 40 D) fördert die weitere Zunahme des WI- Komplexes.

Diese Ergebnisse veranschaulichen, daß das native  $\alpha$ - Kristallin der Kälberlinse in der Lage ist, stressinduzierte Komplexierung der wasserlöslichen Kristalline der Farmlachse zu unterbinden, jedoch mit den Kristallinen der Sepialinse einen gemeinsamen wasserunlöslichen Kristallin- Komplex bildet und somit keine Hsp- Funktion besitzt.

## Statistische Auswertung (Student T- Test) von 3.9

WS-Kristallin	1% in H <sub>2</sub> O	2% in H <sub>2</sub> O	1% in $\alpha$ -Lsg.(0,1%)	1% in $\alpha$ -Lsg.(0,5%)	1% in $\alpha$ -Lsg.(1%)
Kalb					
Lachs	0,23	0,04	0,04	0,95	71,28
Sepia	0,87	1,02	0,15	0,004	0,25

WS-Kristallin	1% in H <sub>2</sub> O	2% in H <sub>2</sub> O	1% in $\alpha$ -Lsg.(0,1%)	1% in $\alpha$ -Lsg.(0,5%)	1% in $\alpha$ -Lsg.(1%)
Kalb		27,03	36,66	9,63	37,22
Lachs		28,14	67,79	0,63	0,44
Sepia		44,72	2,22	0,25	0,15

Angaben in % Irrtumswahrscheinlichkeit  $p=0,05$

### 3.10 Immunologische Charakterisierung der Linsenkristalline des Lachses

Die Charakterisierung der Kristalline des Farmlachses auf der Basis polyvalenter Antikörper (Immunglobuline), gerichtet gegen Epitope des Kälber - Kristallins (Anti  $\alpha$  KGL), der Linsenkristalline des Kalbes (Anti KGL) und des Farmlachses (Anti Lachs), lässt Rückschlüsse auf die evolutionäre Konservierung immunrelevanter Kristallindömanen zu.

Nach elektrophoretischer Trennung (s. S. 25) liegen die Kristalline in ihrer nativen Form vor (Tertiär- bzw. Quartärstruktur). Die Immunglobuline (IgG) interagieren mit Epitopen an der "Oberfläche" des funktional vorliegenden Kristallins. Die Interaktion von Antigen (Kristallinepitope) und Antikörper (IgG) führt zu hochmolekularen Aggregaten in Form von bogenförmigen Präzipitationslinien (s. Abb. 41).

Die Visualisierung der Antigen/ Antikörper Aggregate (Abb. 41 Nr. 1. KEq.; 41 Nr. 3. KN) zeigt drei charakteristische Präzipitationsbögen, die entsprechend ihrer elektrophoretischen Mobilität (s. 1.9) den  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ - Kristallinen zugeordnet werden. Die parallele Darstellung mit Lachskristallinen (Abb. 41 Nr 1. LEq.; 41 Nr. 3. LN; 41 Nr. 5. LEq, LN ) zeigt Bögen, die den  $\beta$ - Kristallinen vergleichbar sind und einen unvollständig ausgebildeten Präzipitationsbogen, der aufgrund seiner Mobilität dem  $\alpha$ -Kristallin zuzuordnen wäre.

Die Interaktion von Kristallinepitopen des Lachses und ihrer korrespondierenden Immunglobuline (Abb. 41 Nr. 2 LEq.; 41 Nr. 4 LN; 41 Nr. 6 und 7 LGL) zeigt den  $\beta$ -Kristallinen entsprechende Bögen. Die Kristalline des Kalbes (Abb. 41 Nr. 2 KEq.; 41 Nr. 4 KN; 41 Nr. 7 KGL) reagieren nicht mit Immunglobulinen der Lachslinsenepitope.

Abbildung 41 Nr. 8 zeigt, dass die Linsenkrystalline des Lachses keine dem  $\alpha$ - Kristallin des Kalbes identischen Epitope besitzen.

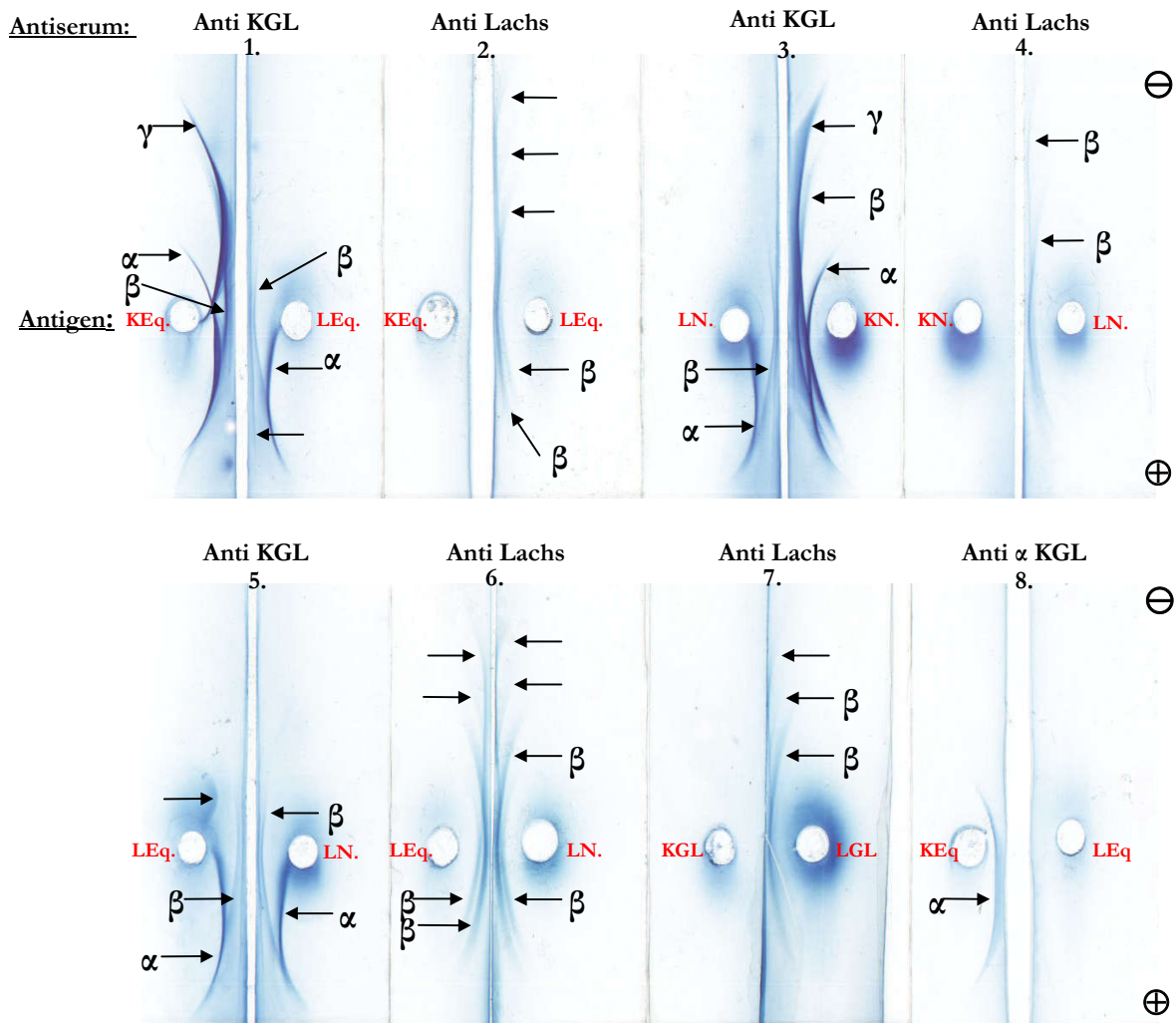


Abbildung 41 Immunelektrophoretische Charakterisierung der Kristalline des Lachses

Anti-KGL= Antikörper gerichtet gegen Kälberlinsen-Kristalline; Anti-Lachs= Antikörper gerichtet gegen die Kristalline der Lachslinse; Anti  $\alpha$  KGL= Antikörper gerichtet gegen das Kälber  $\alpha$ - Kristallin. Die Antigene: **KEq**= Kälberlinsen-Kristalline der equatorialen Linsenregion entsprechend **LEq.** für Farmlachs; **KN**= Kälberlinsen-Kristalline der Kernlinsenregion entsprechend **LN.** für Farmlachs; **KGL**= wasserlösliches Kristallin einer Kälberlinse; **LGL** = wasserlösliches Kristallin einer Farmlachslinse.



## 4 Diskussion

Die Funktion der Linse liegt in der Fokussierung des Lichtes, so daß ein scharfes Abbild des Wahrgenommenen in der Retina in elektrische Impulse umwandelt wird und diese im Gehirn einen Mechanismus auslösen, der das Gesehene nicht im Gehirn, sondern außerhalb des Organismus projiziert.

Voraussetzung für die Funktionalität der Linse ist ihre einzigartige morphologische und biochemische Organisation. Auf molekularer Ebene bildet das lebenslange Zusammenspiel der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ - Kristalline, in Form von gerichteten Kristallin-Interaktionen, die Grundlage für die Durchlässigkeit des Lichtes.

Diese Proteininteraktionen führen zeitlebens zu sich selbstorganisierenden hochmolekularen Proteinkomplexen aus Linsenkrystallinen, die während des Alterns zu wasserunlöslichen Kristallinkomplexen (Albuminoid) aggregieren. Eine lebenslange gerichtete und somit funktionale Vernetzung der Kristalline innerhalb des Kristallinkomplexes führt zu einer sich ständig ändernden räumlichen Struktur. Die Aufgabe des "Faltungskeimes" bei der Bildung des altersabhängigen Komplexes (Kristallincluster) übernimmt das native  $\alpha$ - Kristallin.

Offen bleibt die Frage, wie es zu der funktionellen Anordnung der Kristalline kommt, welche als Grundlage für die hohe Transparenz der Linse und deren optischen Leistung vorhanden sein muss. Ebenso bleibt es ungeklärt, warum eine so hohe Proteinkonzentration wie sie in der Linse vorliegt nur im intakten Organ durchsichtig, eine gleichgeartete Proteinlösung im Reagenzglas jedoch trübe ist.

Ziel dieser Arbeit war es, anhand von vergleichenden Untersuchungen der Linseninhaltsstoffe des Lachses und des Rindes, Mechanismen des Alterungsprozesses der Linsenkrystalline zu charakterisieren, um am Beispiel der Clusterbildung von Kristallinen die Hypothese der "quintären Struktur" eines Proteins aufzustellen.

Die Rinderlinse, eines der best beschriebenen Organe in der ophthalmologischen Forschung dient als Orientierung, da systematische Untersuchungen über die Biochemie der Augenlinsenkrystalline bei Fischen, insbesondere bei Lachsen, in der Literatur nicht beschrieben sind.

Die Augenlinse der Wirbeltiere gehört neben Hornhaut, Kammerwasser und Glaskörper zu den lichtbrechenden Medien des Auges. Sie ist aufgrund ihrer funktionellen Spezialisierung ein glasklarer, zyklometrischer Rotationskörper, der weder eine Nerven- noch Gefäßsystemanbindung besitzt. Eine optimale Nährstoffversorgung der Linse gewährleistet das sie umfließende Kammerwasser. Die Energie für das lebenslange appositionelle Wachstum, in Form von ständig elongierenden Faserzellen mit Proteinkonzentrationen von bis zu 65 % bei Lachsen (s. 29), liefert die Glykolyse

Säugetiere akkomodieren, indem die spezifische Form der Linse durch Innervation des Ciliarmuskels verändert wird. Fische hingegen fokussieren, indem die Position der Linse im Auge verändert wird. Die Formveränderung der Säugerlinse setzt Elastizität voraus. Dagegen muss die Fischlinse durch die Verschiebung - parallel zur optischen Achse - innerhalb des Auges Druckkräften standhalten.

Die physikalischen Voraussetzungen, Formflexibilität der Säugerlinse und die Formstabilität der Fischlinse während der Akkomodation, erklären sich auf molekularer



Ebene aus dem Verhältnis von Gesamtprotein und Wasser und hier insbesondere dem Verhältnis von wasserlöslichen- und wasserunlöslichen Kristallinen. Die Zunahme des Gesamtproteins bei gleichzeitiger Abnahme der Wasserkonzentration vom jungen zum alten Linsengewebe führt zu einer höheren Dichte des Linsengewebes und somit zu einer Verminderung der Elastizität, die wiederum einen Einfluss auf die Akkomodation hat. Die graphische Darstellung dieser beiden Parameter in Form spiegelbildlicher Parabeln (s. S. 28; 29; 30) zeigt bei den Rinderlinsen in allen morphologischen Regionen einen Wert größer  $R > 1$  d.h., der Wassergehalt liegt in allen Altersregionen höher als das Gesamtprotein. Hingegen zeigt sich sowohl bei den Lachs- als auch bei den Sepialinsen eine deutliche Zunahme des Proteingehaltes, so dass das Verhältnis von  $R = \text{H}_2\text{O}/\text{TG}$  im Kern (morphologisch alt) bis zur tieferen Rinde (morphologisch jung)  $< 1$  ist. Daraus folgt, dass Fisch- und Sepialinsen im Vergleich zu den Rinderlinsen eine höhere Dichte des Linsengewebes haben. Diese Tendenz setzt sich mit steigendem Lebensalter der beiden Spezies in der Weise fort, dass die Zunahme des Proteingehalt in den morphologisch jungen Regionen (vorderer Pol; hinterer Pol) weiter zunimmt und gegen den Wert  $R < 1$  strebt. Frühere Untersuchungen an Säugerlinsen konnten zeigen, dass das Verhältnis von  $\text{H}_2\text{O}/\text{TG}$  unabhängig vom Lebensalter und morphologischer Region  $> 1$  ist.

Den Hauptanteil (90%) des Gesamtproteins, abhängig vom Lebensalter der Linse, besteht bei den Säugern aus den wasserlöslichen Kristallinen (Bours und Hockwin 1977; Bours et al. 1978; Hoenders und Bloemendal 1982; Hockwin 1983). Diese Ergebnisse bestätigen sich bei der morphologischen Differenzierung der Rinderlinse. Während des Alterns der Linse nimmt die Konzentration der wasserlöslichen Kristalline in dem Maße ab, wie der Gehalt der wasserunlöslichen Kristalline zunimmt (s. S. 28). Da in der Linse kein proteolytischer Abbau der Kristalline stattfindet, können die wasserunlöslichen Kristalline als direktes Vernetzungsprodukt in Form von hochmolekularen Superaggregaten, hervorgehend aus den wasserlöslichen Kristallinen, angesehen werden (Bours und Delmotte 1979; Ahrend et al. 1987).

Den gleichen Effekt des Alterns, aus wasserlöslichen werden wasserunlösliche Kristalline, zeigen die Untersuchungen der Lachs- und Sepialinsen (s. S. 31; 32). Bei diesen Spezies der Prozeß der Vernetzung in der Kernregion einer 48 Monate alten Lachslinse zu einer Konzentration wasserunlöslichen Kristallins von bis zu 90 % (s. S. 31).

Konsequenterweise führt ein geringer Wasser- und hoher Proteingehalt, einhergehend mit einer hohen Konzentration von wasserunlöslichem Kristallin bei den Lachs- und Sepialinsen zu einer Stabilität des Linsengewebes; entsprechend bei der Rinderlinse, als Vertreter der Säugetiere, bildet ein hoher Wasser- und niedriger Proteingehalt, verbunden mit einer hohen Konzentration an wasserlöslichen Kristallinen die physikalische Grundlage einer formflexiblen Linse.

Das Prinzip des Alterns der Augenlinse, die Metamorphose von wasserlöslichem- zu wasserunlöslichem Kristallin, ist bei Sepia, Lachs und Rind konserviert. Dabei spielen die wasserlöslichen Kristalline den Ausgangspunkt dieses Prozesses.

Die Differenzierung entwicklungsgeschichtlich unterschiedlicher Linsen Kristalline nach ihrem isoelektrischen Punkt veranschaulicht beispielhaft ihren Werdegang in der Evolution (s. S. 33). Es zeigt sich, dass jede Art ihre spezifische Kristallinzusammensetzung besitzt. Ein charakteristisches Merkmal ist die hohe

Konzentration von bi-funktionalen Kristallinen bei den im Wasser lebenden Arten und das Verschwinden dieser bei den Vögeln und Säugern. Im Gegensatz zu den Cephalopoden zeichnen sich die Fische durch ein sehr differenziertes Kristallinspektrum aus, welches qualitativ mit dem der Amphibien, Vögeln und den Säugern vergleichbar erscheint. Den Übergang vom Leben im Wasser zu den Landbewohnern repräsentieren die Amphibien, die in ihrer juvenilen Entwicklung im Wasser leben und nach der Metamorphose Landbewohner werden. Brahma und Bours konnten 1972 bei der Entwicklung von *Xenopus laevis* zeigen, daß während der Embryogenese die bi-funktionalen Kristalline als erstes, gefolgt von den  $\gamma$ - und  $\beta$  Kristallinen gebildet werden,  $\alpha$ -Kristallin jedoch erst nach der Metamorphose im adulten Tier nachweisbar ist. Hingegen erscheint  $\alpha$ -Kristallin beim Menschen schon während der Embryogenese (Ahrend et al. 1987). Weder bei den Cephalopoden noch bei den Fischen ist natives  $\alpha$ -Kristallin nachweisbar.

Es stellt sich die Frage, welche Funktion erfüllen die Kristalline der unterschiedlichen Arten, wobei eine besondere Beachtung dem nativen  $\alpha$ - Kristallin gilt. Warum tritt es erst bei den an Land lebenden Tieren in Erscheinung? Sowohl die Funktion der Linse, Fokussierung des Lichtes, als auch das Prinzip des Alterns, aus wasserlöslichen- werden wasserunlösliche Kristalline, ist identisch. Eine mögliche Erklärung findet sich in der ökologischen Nische einer Spezies. Die im Wasser lebenden Arten sind geringen Temperaturschwankungen und je nach Wassertiefe keiner UV-Belastung ausgesetzt. Der Mensch seinerseits ist in der Lage alle ökologischen Nischen der Erde zu besetzen. Infolgedessen unterliegt er großen Temperatur- und Strahlungsunterschieden ohne einen Funktionsverlust der Linse. Diese physikalischen Parameter bedeuten einen außerordentlichen biochemischen Stress für die Linse, welcher durch das native  $\alpha$ -Kristallin kompensiert werden kann (Das et al. 1996, Liao et al. 2002). Das Verschwinden der bi-funktionalen Kristalline könnte durch eine funktionelle Übernahme durch  $\gamma$ - und  $\beta$ - Kristalline bei den in der Evolution höher stehenden Arten erklärt werden

Als gegen Ende des letzten Jahrhunderts die Katarakte bei Farmlachsen im Norden Europas ein dramatisches Ausmaß annahmen (Ersdal et al. 2001), führte dieses Phänomen dazu, das Thema "Charakterisierung von Augenlinsen Kristallinen" und die Frage des "Alterns von Linsen Kristallinen" neu zu diskutieren (Ahrend et al. 1999).

Mehrere Exkursionen in den Jahren 1999-2001 zu norwegischen Lachsfarmen lieferten umfangreiches Untersuchungsmaterial. Schon während der Aufarbeitung der Linsen vor Ort zeigten sich die ersten Unterschiede zu den Säugerlinsen. Der klar erscheinende wasserlösliche Kristallinüberstand ergab nach einigen Minuten sowohl bei Raumtemperatur als auch bei  $-4^{\circ}\text{C}$  Trübungserscheinungen. Die Zentrifugation dieses Überstandes ergab ein Sediment, welches durch mehrmaliges Waschen und anschließender Analyse mittels der Isoelektrischen Fokussierung mit dem nativen wasserunlöslichen Kristallin des Lachses qualitativ identisch ist (s. S. 51). Abweichend zu den stabilen wasserlöslichen Kristallinlösungen der Rinderlinsen, muss den Kristallinen des Lachses das stabilisierende Element, welches die Rinderkristalline in Lösung hält, fehlen.

Die analytische Erfassung der altersbedingten Veränderungen wasserlöslicher Kristalline des Lachses nach ihrem isoelektrischen Punkt mit der IEF, lässt für die ganze Linse einige

Unterschiede erkennen (s. S. 35). Die Gruppe der  $\delta'$ -Kristalline vermindert sich während des Alterns analog den der  $\gamma$ - Kristalline des Rindes (Bours 1984b), wobei die  $\gamma$ -Kristalline des Lachses sowohl qualitativ als auch quantitativ keiner Veränderung unterliegen (s. S. 35). Die  $\beta_L$ - Kristalline bilden bis zu einer Lebensspanne von 15 Monaten eine Vielzahl von Banden, welche sich im weiteren Alter dann deutlich vermindern. Diese Verminderung geht einher mit der Zunahme der  $\beta_H$ - Kristalline; vergleichbar verläuft dieser Prozess mit dem der  $\beta_L$ - und  $\beta_H$ - Kristallinen des Rindes während der Alterung.

Entgegengesetzt zum  $\alpha$ -Kristallin des Rindes zeigt sich eine altersabhängige Zunahme der Kristalline der  $\alpha$  Region, wobei sich diese Banden nicht in der Gestalt in der IEF visualisieren lassen wie die der nativen  $\alpha$ - Kristallinform der Rinderlinse. Der Vergleich zweier Linsen, gleichen Linsenfrischgewichtes, eines identischen Kristallinspektrums und gleichen Alters, aber unterschiedlicher Körpergewichte des Lachses, ist ein Indiz für die Autonomie der Linse innerhalb des Organismus.

Bei der Betrachtung der Kristallinveränderungen innerhalb einer Linse (intraspezifisches Altern), durch Anwendung der „Bonner Schneidetechnik“, läßt sich im Gegensatz zum Kristallinstatus ganzer Linsen unterschiedlichen Alters (interspezifisches Altern) der Einfluss der Zeit auf ein Individuum darstellen. Die Anwendung dieser Technik bietet zudem die Möglichkeit identische morphologische Regionen unterschiedlich alter Linsen zu vergleichen (Hockwin 1986).

Die Anwendung dieser Vorgehensweise bei einer jungen- und alten Linse läßt nach elektrophoretischer Trennung der wasserlöslichen Kristalline mit der IEF und SDS-PAGE (s. S. 36; 37) für die morphologisch junge Equatorregion keine Verminderung der Kristallinkonzentration und somit keinen Einfluss des Alterns auf die Proteinbiosynthese erkennen. Hingegen veranschaulicht die Gegenüberstellung der morphologisch älteren Regionen der jungen und alten Linse sowohl intra- als auch interspezifische Einflüsse des Alterns, welche mit denen der Rinderlinsen vergleichbar sind (Babizhayev et al. 1996). Die Darstellung der wasserlöslichen Kristallinproteome mit der 2D-PAGE (s. S. 38; 39) bestätigt die bisher gewonnen Resultate und zeigt artspezifischen Übereinstimmungen der Mechanismen des Alterns bei Rind und Lachs.

Weitere Untersuchungen der wasserlöslichen Kristalline auf der Basis ihrer molekularen Größe unter Verwendung der HPLC, zeigen das Verschwinden aller Kristalline bis auf die  $\gamma$ - und  $\delta'$ Kristalline von der morphologisch jungen Equatorregion hin zum alten Kern (s. S. 44). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Untersuchungen an Säugerlinsen, in welchen dieser Prozess eine kontinuierliche Abnahme aller Kristalline bewirkt, wobei keine Kristallingruppe völlig verschwindet (Bours et al. 1978; Bessems et al. 1989). Die Gegenüberstellung der wasserlöslichen- und wasserunlöslichen Kristalline nach ihrem isoelektrischen Punkt zeigt die qualitative Übereinstimmung beider Kristallinarten entsprechend ihrer morphologischen Region (s. S. 45). Daraus folgt, das bei der Linse des Lachses im Gegensatz zu den Rinderlinsen (Berg 1997; Chaudhuri 1998) nicht alle wasserlöslichen Kristalline am zeitabhängigen Vernetzungsprozess der wasserunlöslichen Kristalline gleichermaßen beteiligt sind.

Bei der synchronen Dokumentation chromatographisch getrennter wasserlöslicher Rinder- und Lachslinsenkristalline stimmen, bis auf das  $\alpha$ - Kristallin des Rindes, die molekularen Größenverhältnisse der Lachskristalline mit den  $\alpha_{HM}$ -,  $\beta_H$ -,  $\beta_L$ - und  $\gamma$ - Kristallinen des Rindes überein. Aufgrund der molekularen Größe des Peaks, welcher zwischen dem  $\alpha$ - und  $\beta_H$ - Kristallin des Rindes liegt, kann dieser als dem des Rindes analogen  $\alpha$ - Kristallin des Lachses bezeichnet werden (s. S. 40).

Die elektrophoretische Trennung der isolierten, den Rinderlinsenkristallinen gewichtsmäßig übereinstimmenden Kristallinen des Lachses zeigen in ihrer Verteilung der isoelektrischen Punkte (s. S. 42) keine Ähnlichkeit mit den wasserlöslichen Kristallinen der Säugerlinse (s. S. 11). Aus der Polypeptidverteilung der chromatographisch gewonnenen Kristalline in der SDS-PAGE (s. S. 43) ist zu erkennen, dass die molekularen Massen der Lachskristalline den Säugerlinsenkristallinen vergleichbar sind. Diese Polypeptide bilden in ihrer nativen Form (s. S. 42) den Säugerlinsen massenanaloge Kristallingruppen (s. S. 40) aus, welche der klar differenzierten IP- Einteilung der Säugerlinsenkristallinen nicht entsprechen. Folglich unterliegen die Säugerlinsenkristalline in Gegensatz zu den Fischen einem höheren Ordnungsprinzip in Form von homogenen Kristallingruppen.

Die Frage der evolutionären Konservierung der Kristalline und die Überprüfung der Analogie der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ - Kristalline von Lachs und Rind konnte durch den Nachweis immunrelevanter Kristallindomänen mit polyvalenten Antikörpern geklärt werden (s. S. 56). Der Einsatz von Antikörpern gegen Kälberlinsenkristallin visualisiert in der Immunelektrophorese bei den Lachskristallinen eine nicht vollständig ausgeprägte Präzipitationslinie, die bezüglich ihrer elektrophoretischen Mobilität dem  $\alpha$ - Kristallin des Kalbes zuzuordnen ist. Diese Form der Präzipitationslinie weist auf teilweise identische Domänen des Kristallins gegenüber ihrer vergleichbaren nativen  $\alpha$ - Kristallinlinie des Kalbes hin. Des Weiteren stellt sich eine den  $\beta$ - Kristallinen des Kalbes analoge Präzipitationslinie dar.  $\gamma$ - Kristallin konnte in der Lachslinse nicht nachgewiesen werden. Die Verwendung von Antikörpern gegen Lachskristallin zeigte überraschenderweise bei den Kälberlinsenkristallinen keine Kreuzreaktion, aber Präzipitationslinien mit Lachskristallin, die dem  $\alpha$ - und  $\beta$ - Kristallin des Kalbes vergleichbar sind. Für  $\gamma$ - Kristallin zeichnete sich keine Linie ab. Den speziesspezifischen  $\delta'$ - Kristallinen des Lachses entspricht die Präzipitationslinie mit einer hohen elektrophoretischen Mobilität (s. S. 35).

Die immunologischen Untersuchungen bestätigen für das  $\alpha$ - und  $\beta$ - Kristallin des Lachses eine Analogie mit der Rinderlinse, wobei dem  $\alpha$ - Kristallin des Lachses (gegenüber dem  $\alpha$ - Kristallin des Rindes) eine Teilidentität zugeschrieben werden kann. Das native  $\gamma$ - Kristallin des Lachses stimmt zwar mit der molekularen Masse des Rindes überein, jedoch besteht keine Übereinstimmung immunrelevanter Kristallindomänen dieser Kristalline.

Mit Hilfe der 2D-IEF (s. S. 45) konnte die Teilidentität des  $\alpha$ -Kristallins des Lachses mit dem  $\alpha$ -Kristallin des Rindes geklärt werden. Das Ergebnis (s. S. 46 Abb.32, Rinde) zeigt in der 1. Dimension (native Bedingungen) für das renaturierte Kristallin einen dem nativen  $\alpha$ - Kristallin des Rindes übereinstimmenden isoelektrischen Punkt, welcher sich unter denaturierenden Bedingungen in der 2. Dimension in Bezug auf seinen isoelektrischen Punkt als  $\alpha_A$ - Kristallin darstellt. Gestützt wird dieses Ergebnis von der

Analyse des isolierten nativen  $\alpha$ - Kristallin des Lachses mit der 2D-PAGE (s. S. 47), in der die physiko-chemischen Eigenschaften der Kristalline, isoelektrischer Punkt und molekulare Masse zur Differenzierung dieser beitragen. Unter Berücksichtigung dieser beiden Parameter lässt sich nur das  $\alpha_A$ - Kristallin dem nativen  $\alpha$ - Kristallin der Kälberlinse zuordnen.  $\alpha_B$ - Kristallin konnte in der nativen Form des  $\alpha$ - Kristallin des Lachses nicht nachgewiesen werden. Dieses  $\alpha_A$ - Kristallin der altersmäßig jüngsten morphologischen Region der Lachslinse bildet schon nach der Proteinbiosynthese der Kristalline mit einer Vielzahl von ihnen einen nativen, wasserlöslichen Kristallinkomplex (Kristallincluster) mit einer molekularen Masse von  $\sim 4 \times 10^5$  Dalton (s. S.40). Van den Oetelaar et al. konnte 1990 für experimentell renaturiertes  $\alpha_{A2}$  der Rinderlinse eine Masse von  $2,5 \times 10^5$  Dalton bestimmen. In Anbetracht dessen, dass das  $\alpha_A$ - Kristallin der Lachslinse als Cluster mit anderen Kristallinen vernetzt ist, ergibt sich eine Übereinstimmung der molekularen Massen. Der direkte Vergleich des nativen  $\alpha$ - Kristallins von Lachs und Rind (s. S. 46) verdeutlicht auf eindrucksvolle Weise die Unterschiede beider Kristalline.

Das alleinige Vorhandensein des  $\alpha_A$ - Kristallin im nativen  $\alpha$ - Kristallin des Lachses stellt die Frage nach der Funktion des Kristallins. Die Subunits des nativen  $\alpha$ - Kristallins der Säugerlinse,  $\alpha_A$  und  $\alpha_B$ , werden funktional als Chaperone beschrieben.

Chromatographische Renaturierungsexperimente (s. S. 25) veranschaulichen die unterschiedlichen Funktionen des  $\alpha$ - Kristallin bei Lachs- und Kälberlinsen Kristallinen in Form ihrer Trennungsprofile mittels HPLC (s. S. 49). Es zeigt sich bei den Kälberlinsen Kristallinen, daß mit steigender Harnstoffkonzentration -und somit höherem Dissoziierungsgrad der Kristalline- eine Verminderung der  $\beta$ - und  $\gamma$ - Kristalline und ein Anstieg der Menge von  $\alpha$ - bzw.  $\alpha_{HM}$ - Kristallin einhergeht. Der mengenmäßige Zuwachs an  $\alpha$ - und  $\alpha_{HM}$ - Kristallin erklärt sich durch die Interaktion der  $\beta$ - und  $\gamma$ - Kristalline mit dem  $\alpha$ - Kristallin während der Renaturierung, das durch die weitere Interaktion mit diesen zu  $\alpha_{HM}$ - Kristallin vernetzt (Bours 1991). Die Chaperonfunktion des  $\alpha$ - Kristallins liegt nun darin, die sich renaturierenden Kristalline (Rückfaltung der durch Harnstoff dissoziierten Kristalline in ihre native Form) so in Lösung zu halten, dass sie nicht zu unlöslichen Aggregaten vernetzen und somit ausfallen. Dieses zeigt sich in der qualitativen Übereinstimmung der Kristallinprofile der nativen und der mit Harnstoff versetzten Kristalline. Hingegen zeigen die Kristalline des Lachses mit steigender Harnstoffkonzentration ein kontinuierliches Verschwinden aller Kristalline bis auf die  $\gamma$ - und  $\delta'$ - Kristalline. Diese Kristallingruppen sind in der Kernregion als wasserlösliche Kristalline nachweisbar (s. S. 44). Sie scheinen somit an dem Prozess der Interaktion der Kristalline mit dem  $\alpha$ - Kristallin während der Renaturierung und am Alterungsprozess der Kristalline nicht beteiligt zu sein. Die Veränderung des qualitativen Kristallinprofils in der Form, dass die Kristalline nach Renaturierung in der HPLC nicht mehr nachweisbar sind, ist eine Folge der fehlenden Chaperonfunktion des  $\alpha_A$ - Kristallins der Lachslinse. Anstatt die Kristalline in Lösung zu halten, wie das  $\alpha$ - Kristallin des Kalbes, vernetzt das  $\alpha_A$ - Kristallin der Lachslinse diese Kristalline derart, dass die molekulare Masse des Komplexes die Ausschlussgröße der trennenden Matrix in der HPLC übersteigt und somit nicht mehr nachweisbar ist.

Weitere Beweise für die fehlende Chaperonfunktion des  $\alpha$ A- Kristallin des Lachses liefern temperaturabhängige Untersuchungen der wasserlöslichen Kristalline des Lachses. Die Inkubation von chromatographisch getrennten Linsenkristallinen bei 4°C (s. S.52) demonstriert die Vernetzung der nativen Kristallingruppen zu hochmolekularen Komplexen in Folge von „Kälteschock“. Hierbei entsteht eine deutliche Veränderung ihrer nativen isoelektrischen Punkte (s. S. 53). Durch die Trennung dieser vernetzten Kristalline in der Harnstoff-IEF (s S. 54) können die Kristallinspektren mit denen des nativen Zustandes verglichen werden.

Der dem „Kälteschock“ entgegengesetzte Prozess ist der „Hitzeschock“ in Form von Wärmezufuhr (s. S. 54). Dieser Versuch illustriert eindrucksvoll die fehlende Chaperonfunktion des  $\alpha$ A- Kristallin des Lachses und die besondere Stellung der Sepialinsenkristalline innerhalb der Evolution. Die Inkubation von Kalb-, Lachs- und Sepialinsenkristallinen bei 37°C führt bei Lachs- und Sepialinsenkristallinen im Vergleich zu Kälberlinsenkristallinen zu signifikant erhöhten unlöslichen Kristallinkomplexen (s. S. 55), welches auf eine fehlende Chaperonfunktion deutet. Durch Zugabe von nativen  $\alpha$ - Kristallin des Kalbes vermindert sich der unlösliche Kristallinkomplex des Lachses auf einen der Kälberlinsen vergleichbaren Wert. Dagegen erhöht sich der unlösliche Kristallinkomplex der Sepialinse mengenmäßig um den Anteil des zugegebenen  $\alpha$ - Kristallins des Kalbes. Im Gegensatz zur Chaperonfunktion des nativen  $\alpha$ - Kristallins des Kalbes bei den Lachskristallinen kann das native  $\alpha$ - Kristallin des Kalbes bei Sepialinsenkristallinen die Vernetzung der Kristalline nicht verhindern; im Gegenteil, es vernetzt sich mit diesen zu unlöslichen Komplexen. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Kristalline der Sepialinse evolutionär nicht mit denen der Lachs- und Kälberlinsenkristallinen verwandt sind.

Wenn durch Zugabe von nativem  $\alpha$ - Kristallin des Kalbes ( $\alpha$ A und  $\alpha$ B) die Vernetzung zu wasserunlöslichen Komplexen bei den Lachslinsenkristallinen verhindert wird, sollte folglich das  $\alpha$ B- Kristallin für die Chaperonfunktion verantwortlich sein, weil sowohl die Lachs- als auch die Kälberlinse über das  $\alpha$ A- Kristallin verfügen, es sei denn, daß erst in Folge von Mutationen im Laufe der Evolution das  $\alpha$ A- Kristallin des Kalbes (Säugerlinsen) die Funktion eines Chaperon erworben hat. Da aber die Linsenkristalline beider Spezies dem gleichen Prinzip des Alterns unterliegen, aus wasserlöslichen werden wasserunlösliche Kristalline (Albuminoid), muss das  $\alpha$ A- Kristallin beider Spezies für die Vernetzung der Kristalline verantwortlich sein.

Sowohl die Funktion der Linse als auch das Prinzip des Alterns der speziesspezifischen Linsenkristalline ist bei den untersuchten Arten identisch. Allerdings zeichnen sich bei diesen Spezies spezifische Mechanismen des Alterns der Kristalline ab.

Ausgangspunkt des Alterungsprozesses bilden die wasserlöslichen  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ , und bifunktionalen Kristalline einer Linsenfaserzelle. Nach Abschluss der Proteinbiosynthese der ausdifferenzierten Faserzelle in der morphologisch jungen Rindenregion einer Linse, beginnen die Kristalline zu altern. Dieses geht mit der kontinuierlichen Zunahme des wasserunlöslichen Kristallins (Albuminoid), bei gleichzeitiger Abnahme des wasserlöslichen Kristallins, in Abhängigkeit von der Lebenszeit, einher. Frühere Arbeiten konnten bei Säugerlinsen zeigen, dass die Hauptkristallinkomponente des Albuminoids

junger Linsenfaserzellen natives  $\alpha$ - Kristallin ist und erst im weiteren Verlauf des Lebens  $\beta$ - und  $\gamma$ - Kristalline nachweisbar werden (Glässer 1971; Bours 1984b). Wenn also  $\alpha$ - Kristallin die erste Kristallinkomponente des Albuminoides darstellt, so ist es als die treibende Kraft der Vernetzung der Kristalline während des Alterns anzusehen. Die räumliche Vernetzung der  $\beta$ - und  $\gamma$ - Kristalline mit dem  $\alpha$ - Kristallin ist als ein gerichteter Prozess anzusehen, denn die räumliche Konfiguration des Albuminoides (Kristallincluster) mit einer molekularen Masse  $> 10^7$  Dalton (Abhängig vom Alter und morphologischer Region) beeinträchtigt die Transparenz der Linse und somit ihre Funktionalität nicht. Immunologisch verhält sich die native Form des Albuminoides wie ein  $\alpha$ -Kristallin (Glässer 1971). Bestimmte Formen der Katarakt, weisen einen nicht altersgemäßen Albuminoidanteil auf (Bours et al. 1995), wodurch die Transparenz der Linse (veränderter Lichtstreuung) und infolgedessen die Funktionalität der Linse beeinträchtigt wird. Diese pathologische Form der Kristallinvernetzung bei Katarakten ist als ein ungerichteter Prozess zu betrachten.

Die gerichtete räumliche Vernetzung „Faltung“ der Kristalline mit  $\alpha$ - Kristallin als „Faltungskeim“ führt in Abhängigkeit von Alter (Zeit) und morphologischer Region (Raum) zu sich ständig funktional ändernden Kristallinnetzwerken (Kristallincluster) dem so genannten Albuminoid. Zur Charakterisierung dieses Raum-Zeit typischen Kristallinclusters wird daher an dieser Stelle vom Autor der bisher in der Literatur nicht benutzte Begriff der „Quintär Struktur“ eines Proteins vorgeschlagen.

Die molekulare Organisation des  $\alpha$ - Kristallins in der Gestalt von Micellen (s. S. 11) bietet durch posttranslationale Modifikationen (s. S. 16) eine Vielfalt von möglichen Micellen, die als Faltungskeim bei der Clusterbildung fungieren können. Die Frage ist, über welchen molekularen Mechanismus vermögen die  $\beta$ -,  $\gamma$ - und bi-funktionalen Kristalline der Linse mit dem  $\alpha$ - Kristallin Cluster zu bilden? Die c-terminalen Zwischenräume der micellenartigen Anordnung der Subunits des  $\alpha$ - Kristallins bieten einen Interaktionsraum zwischen der  $\alpha$ - Kristallinmicelle und den  $\beta$ -,  $\gamma$ - und bi-funktionalen Kristallinen (Groth-Vasselli et al. 1995 s. S 13).

Ein ubiquitäres „Schlüssel-Schloß Prinzip“ in der Form von glycosilierten Kristallinen und entsprechenden Zuckerrezeptoren bietet eine mögliche Erklärung für die gerichtete Interaktion der Kristalline und deren Clusterbildung. Sowohl  $\beta_L$ -,  $\beta/\gamma_S$  und  $\gamma$ - Kristalline (Ahrend et al. 1997b; Bours et al. 1998) als auch  $^1\alpha_{HM}$ - und  $^2\alpha$ - Kristallin ( $^1$ Bours et al. 1987;  $^2$ Roquemoire et al. 1996;  $^2$ Chalkley und Burlingame 2001) liegen in einer glycosilierten Form vor. Der Glycosilierung mit N-Acetylglucosamin (O-GlcNAc) wird eine potentielle Rolle bei der Protein-Protein Interaktion und einem Schutz vor Proteindegradation zugeschrieben (Comer und Hart 2000). Neue Untersuchungen zeigen die Glycosilierung der  $\beta$ - und  $\gamma$ - Kristalline mit O-GlcNAc (Ahrend et al. 2004). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, daß die Kristalline nicht nur glycosiliert sind, sondern auch Rezeptoren für Zucker (Mannose) besitzen (Ahrend et al. 1997a). Beide Merkmale, Glycosilierung der Kristalline, und das Vorhandensein von Zuckerrezeptoren sind unter physiologischen altersbedingten posttranslationalen Modifikationen die Basis für die räumlich gerichtete Vernetzung der Kristalline zu einem funktionalen Kristallincluster.

Posttranslationale Modifikationen der Kristalline sind physiologisch und tragen somit zur funktionalen Alterung der Linse bei. Zusätzliche Modifikationen in Form einer veränderten Glycosylierung durch einen erhöhten Glucosespiegel bei diabetischen Zuständen führen zu einem unspezifischen Glykokristallin.

Hormone (Koch Siedek 1975; Koch et al. 1977), Herz- Kreislauf Medikamente (Bours 1986) und Antibiotika (Schlüter 1987, Christ et al. 1988) haben zur Folge, dass diese Moleküle derart mit den Linsenkrystallinen reagieren können, dass zusätzliche (pathologische) reaktive Gruppen an den Kristallinen gebildet werden. Ein falscher Kohlenhydratanteil und oder reaktive Gruppen verändern die Interaktionsmöglichkeiten der Kristalline untereinander in der Weise, dass es zu einer fehlgerichteten räumlichen Konformation der "Quintär-Struktur" des Kristallinclusters kommt. Die dadurch resultierende Lichtstreuung hat einen Transparenzverlust der Linse zur Folge, welches sich in einer Katarakt manifestiert.

Obwohl die native Form des  $\alpha$ - Kristallins der Säuger (Micelle bestehend aus  $\alpha A$  und  $\alpha B$ ) linsenspezifisch ist, konnten deren Subunits entweder  $^1\alpha A$  oder  $^2\alpha B$  in allen Organen des Menschen nachgewiesen werden ( $^1$ Srinivasan et al. 1992;  $^1$ Kappahn et al. 2003;  $^2$ Iwaki et al. 1990;  $^2$ Longoni et al. 1990;  $^2$ Kato et al. 1991). Ebenfalls treten diese bei Herzkreislauferkrankungen<sup>3</sup>, neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. „Alexander's disease"<sup>4</sup>, Alzheimer<sup>2</sup> und Gehirntumoren<sup>4</sup> in Erscheinung ( $^1$ Iwaki et al. 1989;  $^2$ Liang 2000;  $^3$ Chiesi et al. 1990,  $^3$ Golenhofen et al. 1999,  $^4$ Hitotsumatsu et al. 1996). Die physiologische Funktion von  $\alpha A$  und  $\alpha B$  in den Organen sind nicht eindeutig geklärt. Das Auftreten von  $\alpha B$  bei ischämischen Zuständen des Herzens deutet auf ein nicht funktionales Proteincluster hin (Chiesi et al. 1990).

Im Kristallincluster des Albuminoides spiegeln sich die biochemischen Modifikationen wieder, seien sie gerichtet (physiologisch) oder ungerichtet (pathologisch). Im übertragenen Sinne verkörpern sie einen Informationsspeicher des Lebens (Alter). So wie sich in den Jahresringen des Baumes, analog der morphologischen Schichtung der Faserzelle einer Linse die Rhythmen des Lebens widerspiegeln, so beinhaltet die unschiedliche Organisation des Kristallincluster einer jeden Faserzelle die altersabhängige biochemische Information des Individuums.

Eine der spannendsten Fragen unserer Zeit ist, wie wird unabhängig von der DNA Information gespeichert? Da Augenlinse und Gehirn gleichen embryonalen Ursprungs sind, können ähnliche biochemische Mechanismen vorhanden sein. Kann es nicht sein, das Proteincluster, welche keinem physiologischem turnover mehr unterliegen, im Gehirn, vergleichbar mit denen in der Linse, eine Art „molekularen Speicher“ für Information, auf der Basis von Proteinen, darstellen?



## 5 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der vergleichenden biochemischen Untersuchung der Linseninhaltsstoffe des Lachses und des Rindes, unter besonderer Berücksichtigung der Linsen kristalline des Lachses zeigen:

- Die Formflexibilität der Säugerlinse und die Formstabilität der Fischlinse, die die Grundlagen für die unterschiedlichen Akkomodationsmechanismen sind, erklären sich auf molekularer Ebene aus dem Verhältnis von Wasser und Gesamtprotein und hier insbesondere dem Verhältnis von wasserlöslichen- und wasserunlöslichen Kristallinen.
- Das Prinzip des Alterns der Augenlinse der Säugetiere, die Abnahme der wasserlöslichen- und die Zunahme des wasserunlöslichen Kristallins zeigt sich auch bei der Lachs- und der Sepialinse.
- Die Differenzierung entwicklungsgeschichtlich unterschiedlicher Linsen kristalline nach ihrem isoelektrischen Punkt zeigt eine Abnahme der basischen Kristalline (bifunktionale Kristalline/  $\gamma$ - Kristalline) von den Cephalopoden hin zu den Säugetieren. Das für die Säugetiere charakteristische native  $\alpha$ - Kristallin ist weder bei den Cephalopoden noch bei den Fischen nachweisbar.
- Während des Alterns verändern sich die  $\delta'$ - Kristalline des Lachses analog den  $\gamma$ - Kristallinen des Rindes. Die  $\gamma$ - Kristalline des Lachses unterliegen dagegen keiner altersabhängigen Veränderung.
- Im Gegensatz zu den Kristallinen des Rindes, die alle am altersbedingten Vernetzungsprozess beteiligt sind, zeigen die  $\delta'$ - und  $\gamma$ - Kristalline des Lachses keine Vernetzungsbereitschaft.
- Die molekularen Größen der  $\alpha_{HM}$ -,  $\beta_H$ -,  $\beta_L$  und  $\gamma$ - Kristalline des Lachses stimmen mit den Kristallinen des Rindes überein. Eine molekulare Größenübereinstimmung des  $\alpha$ - Kristallins des Rindes mit dem des Lachses konnte nicht nachgewiesen werden.
- Die immunologische Charakterisierung der Linsen kristalline des Lachses mit polyvalenten Antikörpern zeigt eine eindeutige Kreuzreaktivität für die  $\beta$ - Kristalline, eine Teilidentität für das  $\alpha$ - Kristallin des Lachses mit dem des Rindes und keine Übereinstimmung immunrelevanter Kristallindomänen bei den  $\gamma$ - und  $\delta'$  Kristallinen.
- Mit Hilfe der 2 dimensional IEF und 2D- PAGE konnte bei den Kristallinen des Lachses  $\alpha_A$ - Kristallin nachgewiesen werden.
- Die Renaturierungsexperimente mittels HPLC konnten zeigen, dass die Kristalline des Lachses im Gegensatz zu den Kristallinen des Rindes einem anderen Vernetzungsmechanismus unterliegen.
- Der Einfluss der Temperatur (4°C und 37°C) auf die Lachslinsen kristalline führt anders als bei den Kristallinen des Rindes- zu einer Aggregation der ursprünglich löslichen Kristalline, was auf eine fehlende Chaperonefunktion hinweist.

- Die Zugabe von nativem  $\alpha$ - Kristallin des Rindes zu den wasserlöslichen Kristallinen des Lachses und der Sepia bei den „Hitzeschockexperimenten“ bestätigt die fehlende Chaperonefunktion des  $\alpha A$ - Kristallin des Lachses. Die Aggregation der wasserlöslichen Kristalline der Sepialinse konnte durch natives Rinder  $\alpha$ - Kristallin nicht verhindert werden.

Sowohl die Funktion der Linse als auch das Prinzip des Alterns (wasserlösliche Kristalline vernetzen zu wasserunlöslichen hochmolekularen Kristallinclustern ohne die Transparenz der Linse zu beeinträchtigen) ist bei Rinder- und Lachslinse identisch. Die alters- bzw. zeitabhängigen Kristallincluster bilden sich durch gerichtete Vernetzungs-/ Faltungsprozesse der Kristalline, wobei das  $\alpha$ - Kristallin als „Faltungskeim“ fungiert. Diese gerichtete Vernetzung der nativen Kristalline führt zu einer räumlichen Konformation des Kristallinclusters, wofür der neue Begriff „Quintär Struktur“ eingeführt wurde.

Die unterschiedlichen Mechanismen der Clusterbildung von Kristallinen bei der Linse des Lachses einerseits über  $\alpha A$ - Kristallin und andererseits über Rinder  $\alpha$ -Kristallin als Faltungskeim, bestehend aus den Subunits  $\alpha A$  und  $\alpha B$ , unterstützen die Hypothese der Quintär-Struktur von Kristallinen. In der folgenden Graphik werden die unterschiedlichen Mechanismen der Clusterbildung am Beispiel der Linsen Kristalline des Lachses (Mechanismus I) und der Rinderlinse (Mechanismus II) dargestellt.

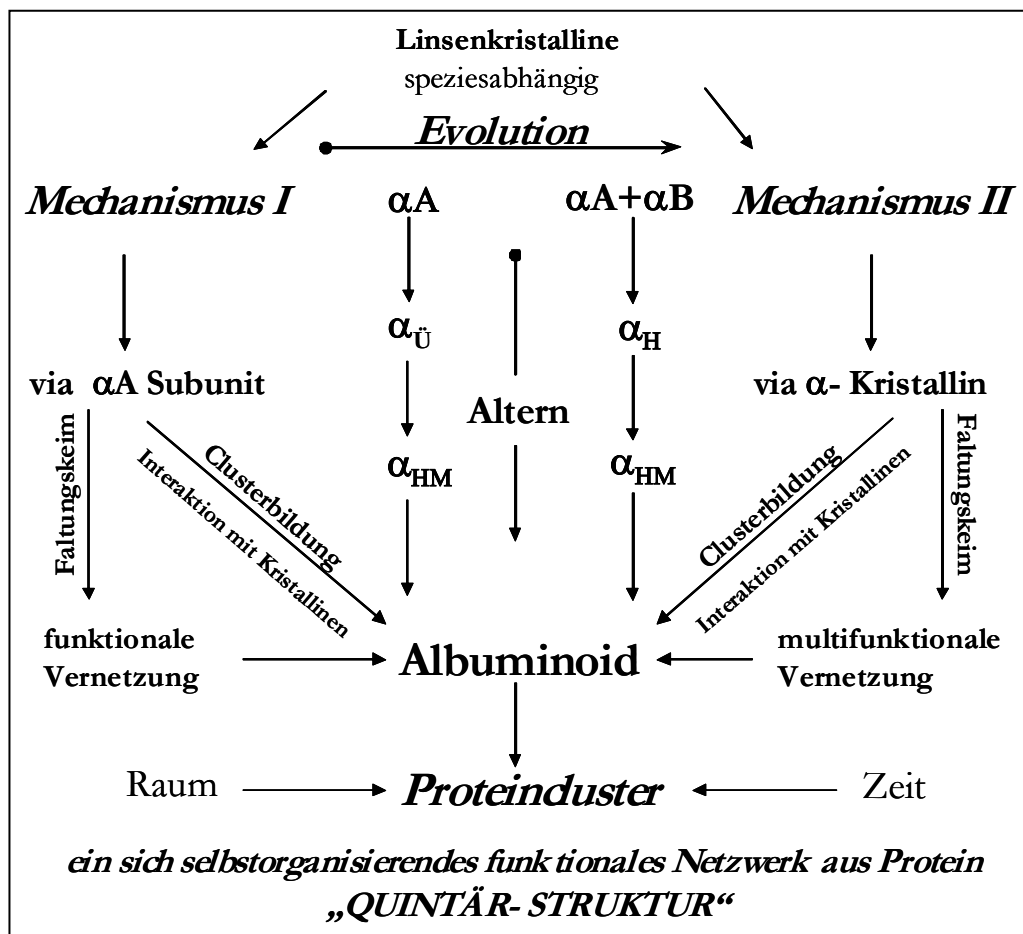


Abbildung 42. Schematische Darstellung der physiologischen Clusterbildung von Linsen-kristallinen

## 6 Abkürzungen

ABAC = Antiserum gerichtet gegen bovines  $\alpha$ -Kristallin  
ABGC = Antiserum gerichtet gegen bovines  $\beta$ -Kristallin  
AC = Anteriorer Cortex  
AK = Antikörper  
Anti KGL = Anti-Kalb-Ganze-Linse  
APS = Ammoniumperoxosulfat  
C = Cortex  
Da = Dalton  
Eq = Äquator  
HM = Hochmolekulares  $\alpha$ -Kristallin  
IEF = Isoelektrofokussierung  
IP = isoelektrischer Punkt  
KC = Kalb Linsencortex  
KGL = Kalb-Ganze-Linse  
KN = Kalb-Nucleus  
LFG = Linsenfrischgewicht  
LTFG = Linsenteilfrischgewicht  
MG = Molekulargewicht  
N = Nucleus der Linse  
PC = Posteriorer Cortex der Linse  
Schnitt Nr. = Schnitt Nummer  
SDS = Natriumlaurylsulfat = Natriumdodecylsulfat  
U = Urea = Harnstoff  
UI = Urea-insoluble = harnstoffunlöslich  
US = Urea-soluble = harnstofflöslich  
WI = Water-insoluble = wasserunlöslich  
WIUS = Water-insoluble – Urea-soluble = wasserunlöslich - harnstofflöslich  
WIUI = Water-insoluble – Urea-insoluble = wasserunlöslich - harnstoffunlöslich  
WS = Water-soluble = wasserlöslich  
2D- IEF = 2 dimensionale **i**soelektrische **F**okussierung  
2D- PAGE = 2 dimensionale **P**oly **A**crylamid **G**el **E**lektrophores

## 7 Rezepturen

### IEF

Bau einer Gießkassette

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

- zwei Glasplatten (B 12,5 x L 026,5 cm)
- einer Gelbondfolie in den Maßen der Glasplatten
- einem U-förmigen Gummi (d = 0,5 mm)
- acht Klammern.

Die Glasplatten wurden mit Repel-Silane silikonisiert. Eine Glasplatte wurde auf einem nivellierten Tisch mit einer geringen Menge Aq. 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.

Gießen eines IEF-Gels

Die Gießkassette wurde auf einen Nivelliertisch gestellt und die Gellösung eingefüllt (bis ca. 0,5 cm unter dem oberen Rand). Nach zweistündiger Polymerisation wurden die Glasplatten entfernt. Das auf der Folie haftende Gel wurde drei Mal 10 min in Aq. bidest gewaschen und anschließend für 30 min in eine 1%ige Glycerinlösung gegeben. Danach wurde das Gel bei Raumtemperatur getrocknet und in einer Plastikfolie im Gefrierschrank gelagert.

Rehydratisierung des Gels:

Das getrocknete Gel konnte je nach Fragestellung als natives bzw. denaturierendes Gel rehydratisiert werden. Die Rehydratisierungszeit betrug 1 h.

### Verwendete Lösungen IEF

#### Acrylamid- Stammlösung

(T=30%, C=2%)

29,4 g Acrylamid

0,6 g Bisacrylamid

ad 100 ml Aq. Bidest

#### Gellösung für ein Gel

4 ml Lsg. B

10 µl TEMED

20 µl APS

ad 20 ml Aq. Bidest

#### Natives rekonstituiertes IEF Gel

184,2 mg CHAPS (15 mmol)

2 g Sorbitol

2 mL Servalyte ISO-Dalt 3-10 (linear)

mit H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub> ad 20 mL

Denaturierendes rekonstituiertes IEF Gel

8,4 g Harnstoff

184,2 mg CHAPS (15 mmol)

2 g Sorbitol

2 mL Servalyte ISO-Dalt 3-10 (linear)

mit H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub> ad 20 mL

Nativer IEF Probenpuffer

40 mg CHAPS (4.0%)

50 µL Servalyte ISO-Dalt 3-10 linear (0,5%)

mit H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub> ad 1 mL

Denaturierender IEF Probenpuffer

840 mg Harnstoff

40 mg CHAPS (4.0%)

50 µL Servalyte ISO-Dalt 3-10 linear (0,5%)

mit H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub> ad 1 mL

Probenauftrag

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

Proteinkonzentration: 50 µg

Probenvolumen: 10 µL 0,5 %

15 min inkubieren bei 20°C

Nach 15 min wurde die Trennung zur Entnahme der Probenplättchen kurz unterbrochen. Die gesamte Trenndauer betrug 120 min. Anschließend wurde die Gelplatte 15 min in TCA fixiert und 3 x 10 min in Aq. dest unter Rühren bei Raumtemperatur gewaschen. Die Färbung erfolgte für 30 min bei 60°C.

Trennbedingungen: 2000 V      14,0 mA      14 Watt

Fixierungslösung

20%ige Trichloressigsäure (**TCA**)

Färbelösung

1 g Serva R 250 ad 1000 ml Methanol

Vor Gebrauch filtrieren und 1 : 1 mit 20%iger Essigsäure verdünnen

Entfärbelösung

100 ml Essigsäure

300 ml Methanol

ad 1000 ml Aq. Dest

IEF-Standardproteine (Pharmacia)

Trypsinogen	9,30
Lentil lectin-basic-band	8,65
Lentil lectin-middle-band	8,45
Lentil lectin-acidic-band	8,15
Myoglobin-basic-band	7,35
Myoglobin-acidic-band	6,85
Human carbonic anhydrase	6,55
Bovine carbonic anhydrase	5,85
$\beta$ -Lactoglobulin A	5,20
Soybean trypsin	4,55
Amyloglucosidase	3,50

### Verwendete Lösungen und Rezepte SDS-PAGE

Acrylamide/ Bis-acrylamide- Stammlsg. (AA/Bis):

Acrylamide:	30%
Bisacrylamide:	0,8%

SDS Stammlsg:

10% (w/v) SDS = 10 g SDS auf 100 ml bei RT

APS (Ammoniumperoxodisulfat)

10%- Stamm = 100mg/ml

TEMED: N,N,N',N'-Tetramethyldiamin

Sammelgelpuffer (SGP) pH 6,8:

Komponenten	Endkonzentration im Gel	4 x SGP	ad 100 ml
Tris (121,14g/mol)	125 mM	0,5 M	6,06 g
SDS (10%Stammlsg.)	0,1%	0,4%	4 ml

pH 6,8 mit 10 M HCl einstellen. Vorsicht: titriert ab pH 7,5 leicht über!!!!

Trenngelpuffer (TGP) pH 8,8

Komponenten	Endkonzentration im Gel	4 x TGP	ad 100 ml
Tris (121,14g/mol)	375 mM	1,5 M	18,17 g
SDS (10%Stammlsg.)	0,1%	0,4%	4 ml

pH 8,8 einstellen mit HCL

Trenngel:2 Gele 30 ml Gesamtvolumen

Komponenten:	7,5%	10%	12,5%	15%
H <sub>2</sub> O	15 ml	12,5 ml	10 ml	7,5 ml
4 x TGP	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
AA/Bis	7,5 ml	10 ml	12,5 ml	15 ml
APS	150 $\mu$ l	150 $\mu$ l	150 $\mu$ l	150 $\mu$ l

TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl
Gelkonzentration:				
T	7,7%	10,27%	12,83%	15,4%
C	2,6%	2,6%	2,6%	2,6%

Sammelgel: für 2 Gele 10 ml Gesamtvolumen

Komponenten	
H <sub>2</sub> O	5,5 ml
4 x SGP	2,5 ml
AA/Bis	1,5 ml
APS	60 µl
TEMED	20 µl
Gelkonzentration:	
T	4,6 %
C	2,6 %

Laufpuffer (LP)

Komponenten	Endkonzentration im Gel	10 x LP	ad 500 ml	ad 1000 ml
Tris (Base)	25 mM	250 mM	15,14 g	30,28 g
Glycin	192 mM	1,92 M	72,1 g	144,2 g
SDS	0,1 %	1%	5 g	10 g

Auf keinen Fall pH einstellen!!!!

Laufpuffer: 100 ml 10x LP + 900 ml H<sub>2</sub>O

Probepuffer (PP)

Komponenten	Endkonzentration	2 xPP	ad20 ml
Tris (1M)	62,5 mM	125 mM	2,5 ml
SDS (10%)	2 %	4%	8 ml
Saccharose	10 %	20 %	4 g
DTT	50 mM	100 mM	0,3084 g

pH 6,8 einstellen mit HCl Vorsicht bei pH 7,5

150 µl einer gesättigten Bromphenolblausg. dazugeben

## 2D Elektrophorese:

1. Dimension IEF Multiphor II

Elektrodenabstand 9.5 cm

Abstand der Anode von der Unterkante der Folie 1.5 cm

Abstand der unteren Kante des Probenauftrages von der Anode 0.5 cm

Breite der Laufstrecke 0.5 cm

1.Dimension IEF

Trennbedingungen: 2000 V

14,0 mA

14 Watt

## Nativer IEF Probenpuffer

40 mg CHAPS (4.0%)  
50 µL Servalyte ISO-Dalt 3-10 linear (0,5%)  
mit H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub> ad 1 mL

Proteinkonzentration: 50 µg  
Probenvolumen: 10 µL 0,5 %  
15 min inkubieren bei 20°C

## Natives rekonstituiertes IEF Gel

184,2 mg CHAPS (15 mmol)  
2 g Sorbitol  
2 mL Servalyte ISO-Dalt 3-10 (linear)  
mit H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub> ad 20 mL  
Rekonstitutionszeit: 90 min  
Äquibrierung der nativen IEF-Streifen  
Lösungen:  
0,5 mol/L Tris-HCl pH 6,8  
6,06 g Tris  
0,40 g SDS  
0,01 g NaN<sub>3</sub>  
mit H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub> ad 80 mL  
mit 4 mol/L HCl pH 8 titrieren  
mit H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub> ad 100 mL#

Äquibrierungsstammlsg: (ÄSL)

2% SDS  
6 mol/L Harnstoff  
0,1 mmol/L EDTA  
0,01% Bromphenolblau  
0,5 mol/L Tris-HCl pH 6,8  
30% Glycerin (v/v)

Dithiothreitol Stammlösung (2,6 mol/L DTT)

250 mg DTT in 0,5 mL H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub> lösen  
1. Äquibrierungsschritt zu 10 mL ÄSL 200 µl DTT-Lösung 15 min  
2. Äquibrierungsschritt zu 10 mL ÄSL 200 µl DTT-Lösung 15 min  
481 mg Jodacetamid (260 mmol/L)

Die SDS- PAGE der 2. Dimension wurde auf Fertiggelen der Firma Amersham durchgeführt.



## Eindimensionale Immunelektrophorese nach Scheidegger

Je 8 Glasobjektträger wurden in eine Elektrophoresehalterung gelegt und mit einem heißen Gemisch (ca. 65°C) aus 25 g Difco-Agar (3%) und 25 ml Elektrophoresepuffer überschichtet. In die Mitte des Objektträgers wurden kreisrunde Löcher gestanzt, die je nach Menge des Antigens einen Durchmesser von 1-4 mm besaßen. Nach Einfüllen des Antigens (Linsenprotein) erfolgte die Elektrophorese (Shandon-Southern, Modell 600) im Verlauf von 90 min. Im Anschluß an die Elektrophorese wurden parallel zur Laufrichtung Gräben zwischen den Löchern ausgehoben und mit Antiserum gefüllt. Die sich anschließende Immundiffusion erfolgte bei Zimmertemperatur in einer feuchten Kammer 16-18 h. Die nicht präzipitierten Proteine wurden in physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen. Die Objektträger wurden getrocknet, 30 min gefärbt, entfärbt bis der Hintergrund klar war und erneut getrocknet.

### Verwendete Lösungen Immunologie

#### Elektrophoresepuffer (Arronsson und Grönwall, 1957)

6 g Tris

6 g Äthanolaminomethan

ad 1000 ml Aq. Bidest; titrieren mit Borsäure (0,46 %ig) auf pH 8,91

#### Physiologische Kochsalzlösung

9 g NaCl ad 1000 ml Aq. dest

#### Färbelösung

5 g Amidoschwarz 10B ad 1000 ml Aq. dest

#### Entfärbelösung:

2%ige Essigsäure

#### Trennbedingungen:

Spannung 250 V

Stromstärke 25-30 mA

#### Chromatographiepuffer

1,94 g Tris-Base

13,22 g Tris-HCl

10 mg Natriumazid

auf pH 7,4 titrieren ad 1000 ml Aq. bidest

## 8 Chemikalien

AmershamPharmacia Biotech  
Chemicals IPG Buffer pH 3-10, 17-6000-86  
Silver Staining Kit, Protein, 17-1150-01  
Urea, 500g, 17-1319-01  
Chaps, 1g, 17-1314-01  
Dithiothreitol (DTT), 17-1318-01 1g  
Bromophenol Blue, 10 g, 17-1329-01  
IPG Cover Fluid, 1000 ml, 17-1335-01  
Tris, 500 g, 17-1321-01  
SDS, 100 g, 17-1313-01  
Glycerol (87%), 1 liter, 17-1325-01  
Ammonium peroxodisulphate, 25g, 17-1311-01  
TEMED, 25 ml, 17-1312-01  
Acrylamide PAGE, 17-1302-01  
Acrylamide IEF, 17-1300-01  
N,N'-methylenbisacrylamide, 17-1304-01  
Gelbond-Filme für Polyacrylamidgel 125 x 260mm, 80-1129-36  
Glasplatte 125 x260 mm, 0,5 mm, U-Frame, 80-1106-89  
Repel-Silane, 2% (w/v) Dimethyldichlorsilan,  
Sephacryl S-200  
17-1167-01 HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR  
Ionenaustauscher  
IEF Marker, Pharmacia  
SDS Marker, Serva  
Borsäure, Merck 165  
Bromphenolblau Natriumsalz, Merck 11746  
Essigsäure 100%, Merck 63  
Glycin, Merck 4201  
Harnstoff, Merck 8487  
Natriumazid, Merck 6688  
1-Propanol, Merck 1024  
D(-)Sorbit, Merck 7759  
Trichloressigsäure, Merck 100810  
Glycerin, (87%), ICN 800689  
Methanol p.A., Riedel-de Haen 32213  
Nariumchlorid, ICN 152575

### **Serva**

Serva Blau R, Serva 35051

Servalyte 3-10 Iso-Dalt, Serva 42951

Servalyte pH 3-10, Serva 42940

### **Verwendete Geräte:**

Multiphor II Electrophoresis Unit, Pharmacia 18-1018-06

EPS 3501 XL Power Supply, Pharmacia 18-1102-78

MultiTemp III Thermostatic Circulator, Pharmacia 18-1102-78

Immunelektrophoreseausrüstung, LKB 6800 A

Scan Pack 3.0 Biometra

Gefriertrockner: Heto R 502

Dialysegerät: Heidolph, Typ 58120

Schneidemaschine Bonn: siehe Bessems et al. 1989

Varioperpex II Pump, LKB Bromma 2120

Waagen: Mettler AT 250/ Mettler AE 160

WTW Microprocessor pH-Meter pH 537

Zentrifuge: Beckmann, Model J2-21 Zentrifuge

Glasplatten (125 x 260 x 2mm)

Kombiklammern, 80-1009-58

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schematischer Querschnitt einer Säugerlinse .....	2
Abb. 2 Embryonalentwicklung einer Säugeraugenlinse.....	3
Abb. 3 Teleostierauge nach Millichamp .....	5
Abb. 4 Anordnung der Atome eines Dipeptides .....	6
Abb. 5 Schematische Darstellung der Strukturen eines Proteins .....	6
Abb. 6 Modell einer rechtshändigen $\alpha$ - Helix. ....	7
Abb. 7 Atomarer Aufbau einer $\beta$ - Schleife und eines antiparallelen $\beta$ - Faltblattes. ....	7
Abb. 8 Biochemische Zusammensetzung der Augenlinse .....	10
Abb. 9 Querschnitt durch die zentrale Axe von Micellen der $\alpha$ - Kristallin Subunits .....	12
Abb. 10 Ausschnitt der sphärischen Quaternärstruktur einer $\alpha$ A- Kristallin Micelle .....	13
Abb. 11 Proteindomänen und ihre Domänen eines $\gamma$ -Kristallins .....	15
Abb. 12 Schematische Darstellung des Alterungsprozesses der Linsenkrystalline .....	17
Abb. 13 Vorkommen der Katarakt im Tierreich.....	18
Abb. 14 Topographische Teilung von Linsen .....	19
Abb. 15. Verteilung von Wasser und Trockengewicht einer 4 Jahre alten Rinderlinse .....	28
Abb. 16. Verteilung von Wasser und Trockengewicht einer 15 Monate und 48 Monate alten Lachslinse.....	29
Abb. 17 Verteilung von Wasser und Trockengewicht einer 50 mg und 75 mg schweren Sepialinse. ....	30
Abb. 18 Prozentuale Verteilung des wasserlöslichen und -unlöslichen Proteins einer 15 und 48 Monate alten Lachslinse. ....	31
Abb. 19 Prozentuale Verteilung des wasserlöslichen und -unlöslichen Proteins einer 50 und 75 mg schweren Sepialinse. ....	32
Abb. 20 Isoelektrische Fokussierung von Augenlinsenkrystallinen verschiedener Spezies. ....	33
Abb. 21 Isoelektrische Fokussierung von wasserlöslichen Kristallinen der Lachslinse.....	35
Abb. 22 IEF der Linsenkrystalline des Lachses nach regionaler Differenzierung mit Hilfe der Bonner Schneidetechnik.....	36
Abb. 23 SDS- PAGE von Kristallinen des Lachses in Abhängigkeit vom Alter und Aufzuchtbedingungen.....	37
Abb. 24 2- dimensionale PAGE von Kristallinen der Rinderlinse .....	38
Abb. 25 2- dimensionale PAGE von Kristallinen unterschiedlich alter Lachslinsen.....	39
Abb. 26 Synchrone Dokumentation der Linsenkrystallinverteilung des Farmlachses und des Rindes.....	40
Abb. 27 Gelchromatographie Sephacryl S-300 von wasserlöslichem Farmlachslinsen-kristallin...41	
Abb. 28 Isoelektrische Fokussierung der gelchromatographisch getrennten Lachskristalline .....	42
Abb. 29 SDS- PAGE der gelchromatographisch getrennten Linsenkrystalline des Lachses .....	43
Abb. 30 Intraspezifische Verteilung von den Kristallinen einer 48 Monate alten Farmlachslinse nach HPLC.....	44
Abb. 31 Urea- IEF von wasserlöslichen- und unlöslichen Kristallinen einer 48 Monate alten Farmlachslinse.....	45
Abb. 32 2- dimensionale IEF von Rinden- und Kernkrystallinen der Linse von Farmlachsen.....	46
Abb. 33 2D- PAGE des Kalb- $\alpha$ - Kristallin und dessen analogen Komplexes bei Lachsen .....	48
Abb. 34 Einfluß von Urea auf die Faltung der wasserlöslichen Kälberlinsenkrystalline.....	49
Abb. 35 Einfluß von Urea auf die Faltung der wasserlöslichen Lachslinsenkrystalline .....	50

---

Abb. 36 Harnstoff-IEF temperaturabhängiger Aggregationsprodukte des wasserlöslichen Kristallins der Farmlachslinse.....	51
Abb. 37 Gelchromatographische Verteilung von Kristallinen der Lachslinse.....	52
Abb. 38 nativ-IEF der mit Sephacryl getrennten (A) und Kälte ausgesetzten Kristalline (B).....	53
Abb. 39 Urea-IEF- PAGE der „in vitro“ gealterten Linsenkristalline des Lachses.....	54
Abb. 40 Einfluß des $\alpha$ - Kristallins des Kalbes auf die Bildung des wasserunlöslichen Kristallins	55
Abb. 41 Immunelektrophoretische Charakterisierung der Kristalline des Lachses .....	57
Abb. 42 Schematische Darstellung der Clusterbildung von Linsenkristallinen.....	68

## 10 Literatur

Ahrend MHJ, Bours J, Födisch HJ. Water-soluble and insoluble crystallins of the developing human fetal lens, analyzed by agarose/polyacrylamide thin-layer isoelectric focusing. *Ophthalmic Res* 1987; 19: 150-156

Ahrend MHJ, Bours J. Detection of glycated fetal human lens crystallins by concanavalin-A and aldehyde staining. *Mechanismus Ageing & Development* 1997a; 99: 167-179

Ahrend MHJ, Bours J. The glycation of bovine lens  $\beta_L$ -,  $\beta_S$ - and  $\gamma$ -crystallins demonstrated by isoelectric focusing and lectin staining. *Exp. Eye Res* 1997b, 65: 711-715

Ahrend, MHJ, Breck, O, Wegener, A, Breipohl, W. Crystallin patterns of normal and cataractous lenses of farmed atlantic salmon from fresh and seawater period. *Invest. Ophthal. & Vis. Sci.* 1999; 40: 302

Ahrend MHJ, Beipohl W, Wegener A, Schmitz B. Nutrient sensing pathways: O-linked N-acetylglucosamine modification of lens crystallins increases with glucose concentration. *Mosbacher Kolloquium* 2004

Anfinsen CB, Haber E. Studies on the reduction and re-formation of protein disulfide bonds. *J Biol Chem* 1961; 236: 1361-1363

Anfinsen CB. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 1973; 181: 223-230

Arronsson T, Grönwall A. Improved separation of serum proteins in paper electrophoresis. A new electrophoresis buffer. *Scand J. Clin Lab Invest* 1957; 9: 338-341

Babizhayev MA, Bours J, Utikal KJ. Isoelectric focusing of crystallins in microsections of calf and adult bovine lens. *Ophthalmic Res* 1996; 28: 365-374

Berg M. Regionale Untersuchung des harnstofflöslichen Proteins der wasserlöslichen Fraktion von Rinderlinsen. Eine quantitative Darstellung im Verlauf des Alterungsprozesses mittels elektrophoretischer Trennverfahren. *Dissertation Universität Bonn*, 1997

Bessems GHJ. Some chemical aspects of the aging and cataractous eye lens. *Dissertation Universität Nijmegen*, 1985

Bessems GJH, de Man BM, Bours J, Hoenders HJ. Age-related variations in the distribution of crystallins within the bovine lens. *Exp Eye Res* 1986; 43: 1019-1030

Bessems GHJ, Dragomirescu V, Müller P, Raps I, Hockwin O. Protein-chemical analysis of lens sections obtained by a new sectioning device. *Dev Ophthalmol. Basel. Karger.* 1989; 17: 123-127

- Bjerkas I, Bjerkas E. The salmoid lens – distinctive morphological features. Proc. European Society of Veterinary Anatomy, XXI Congress of European Association of Veterinary Anatomists 1996.
- Björk I. Studies on gamma-crystallin from calf lens. I. Isolation by gel filtration. Exp Eye Res 1961; 1: 145-154
- Björk I. Studies on gamma-crystallin from calf lens. II. Purification and some properties of the main components. Exp Eye Res 1964; 3: 254-261
- Bloemendal H. The molecular and cellular biology of the eye lens. Wiley and Sons, New York-Chichester-Brisbane-Toronto 1981
- Bloemendal H, Hockwin O, Hoenders HJ, Ohrloff C, Rink H. Linse 1985; 82-109  
129.
- Bloemendal H, Hoenders HJ. Studium des Alterns. Biologie in unserer Zeit 1990a; 1: 48-54
- Bloemendal H, Hendriks I, Bod P.  $\beta_H$ - and  $\beta_L$ -crystallins are populations of aggregates. Exp Eye Res 1990; 50: 711-713
- Bours J, Hockwin O. Artunterschiede bei Linsenproteinen nach Trennung mit Isoelektrofokussierung auf Polyacrylamid-Dünnschichtplatten. Berl. Münch. Tierarztl. Wschr. 1976; 89: 417-422
- Bours J., und Hockwin, O. Charakterisierung der wasserlöslichen Proteine der Linse mittels Immunologie und Isoelektrofokussierung und ihrer Beziehung zum Alterungsprozess. Klin. Mbl. Augenheilk. 1977; 170: 51-59
- Bours J, Wieck A, Hockwin O. Gel filtration chromatography of crystallins and nucleic acids from different parts of the bovine lens in dependence on age. Interdisciplinary Topics in Gerontology 1978; 12: 205-220
- Bours J, Delmotte P. Age-dependent variations in the composition of the crystallins and albuminoid of the mouse lens studied by isoelectric focusing and isotachopheresis. Science Tools 1979; 26: 58-64
- Bours J. Über das Altern von Proteinen der Augenlinse. Nachr. Techn. Lab. (1983), 31: 266-271
- Bours J. Die Analytik des Linseneiweißes. Pharmazent. Z. 1984a; 129: 502-504
- Bours J. Isotachopheresis and immunoelectrophoresis of water-soluble and -insoluble crystallins of the ageing bovine lens. Current Eye Research 1984b; 3: 691-697

Bours J, Hockwin O, Schnitzlein W, Löhnert G. Influence of high-dose Verapamil on beagle lens protein (Chronic Toxicity Test). *Ophthalmic Research* 1986; 18: 215-233

Bours J. A re-evaluation of lens wet weight, water content and water-soluble and – insoluble crystallins of the aging human lens, compared with other species. *Modern Trends in Aging Research* 1986; 147: 373-379

Bours J, Ahrend MHJ, Wegener A, Hockwin O. Glycosylated crystallins in microsections of diabetic rat lenses. *Concepts in Toxicology* 1987; 4: 350-359

Bours J, Ahrend MHJ, Wegener A. Influence of Phakan<sup>R</sup> on the toxicity of naphthalene in rat lenses analysed by isoelectric focusing of single lens layer. In: *Ocular Toxicology* (Eds. Weisse I, Hockwin O, Green K, Tripathi RC.) Plenum Press, New York, 1995: 197-225

Bours J. Calf lens  $\alpha$ -crystallin, a molecular chaperone, builds stable complexes with  $\beta$ s – and  $\gamma$ -crystallins. *Ophthalmic Research* 1996; 28: 23-31

Bours J, Ahrend MHJ, Utikal KJ. Higher glycation of  $\beta$ L- and  $\beta$ S-crystallins in the anterior lens cortex and maximum glycation of  $\gamma$ -crystallins in the bovine lens nucleus, demonstrated by frozen sectioning, isoelectric focusing and lectin staining. *Ophthalmic Research* 1998; 30: 233-243

Bours J, Ahrend MHJ, Breipohl W. The presence of  $\beta$ -,  $\beta$ S- and  $\gamma$ -crystallins in the water-insoluble crystalline complex of the ageing bovine lens. In: *Eye Lens Membranes and Aging* (Eds. Vrensen G. & Clauweert J.) *Topics in Aging Research in Europe* 1991; 14: 341-349

Boyle D, Gapalakrishnan S, Takemoto L. Localization of the chaperon binding site. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1993; 192: 1147-1154

Brahma SK, Bours J. Thin layer isoelectric focusing of the soluble lens extracts from larval stages and adult *Xenopus laevis*. *Exp Eye Res* 1972; 13: 309-314

Branden C, Tooze J. *Introduction to protein structure*. 2<sup>nd</sup> Edition 1999

Broekhuysse RM, Kuhlmann ED. Lens membranes. IV. Preparative isolation and characterization of membranes and various membrane proteins from calf lens. *Exp Eye Res* 1978; 26: 305-320

Buchner J. Supervising the fold: Functional principles of molecular chaperones *FASEB J* 1996; 10: 10-19

Cann JR. Multiple electrophoretic zones arising from protein-buffer interaction. *Biochemistry* 1966; 5: 1108-1112

Carver JA, Nicholls KA, Aquilina JA, Truscott RJW. Age-related changes in bovine  $\alpha$ -crystallin and high-molecular-weight protein. *Exp Eye Res* 1996; 63: 639-647



- Carver JA, Aquilina A., Williams GA, Cooper PG, Truscott RJW.  $\alpha$ -Crystallin: molecular chaperone and protein surfactant. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1204: 195-206
- Carver JA, Nicholls KA, Truscott RJW. On the interaction of  $\alpha$ -crystallin with unfolded proteins. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1252: 251-260
- Chalkley RJ, Burlingame AL. Identification of GlcNAcylation sites of peptides and  $\alpha$ -crystallin using Q-TOF mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2001; 12: 1106-1113
- Chang HC, Lin TL, Chang GG. Molecular basis for the polymerization of Octopus lens S-crystallin *Biophys J* 2000; 78: 2070-2080
- Chaudhuri BLI. Charakterisierung des wasserlöslichen alpha-crystallin-Großkomplexes der Rinderlinse in Abhängigkeit vom Lebensalter. Dissertation, Universität Bonn 1998
- Chiesi M, Longini S, Limbruno U. Cardiac alpha-crystallin. III. Involvement during heart ischemia. *Mol Cell Biochem* 1990; 97: 129-136
- Chuang C-C, Wu S-H, Chiou S-H, Chang G-G. Homology modelling of Cephalopod lens S-crystallin: A natural mutant of sigma-class glutathione transferase with diminished endogenous activity *Biophys J* 1999; 76: 679-690
- Christ W, Lehnert T, Ulbrich B. Specific toxicologic aspects of the quinolones. *Reviews of infection diseases* 1988; 10: 141-146
- Comer FI, Hart GW. O-Glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 20179-29182
- Das BK, Liang JJN, Chakrabarti B. Heat-induced conformational change and increased chaperone activity of lens  $\alpha$ -crystallin. *Current Eye Research* 1996; 16: 303-309
- Duke-Elder, S. *System of Ophthalmology*. Vol.1: The Eye in Evolution. Chapter 11: The Eye of fishes; 1958; Publishers Kimpton, London
- Ellenberger, Baum. Das Sehorgan. In: *Handbuch für vergleichende Anatomie der Haustiere*. 18. Auflage. Verlag Springer, Berlin, Heidelberg; 1974; 983
- Ersdal C, Midtlyng PJ, Jarp J An epidemiological study of cataracts in seawater farmed Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis Aquat Organ.* 2001; 45: 229-36.
- Farnsworth PN, Groth-Vasselli B, Kumosinski TF, Sing K. Location and exposure of hydrophobic surfaces in relation to an open micellar quaternary structure of  $\alpha$ -crystallin *Exp Eye Res* 1997; 64: 853-855
- Farnsworth PN, Frauwirth H, Groth-Vasselli B, Singh K. Refinement of 3D structure of bovine lens  $\alpha$ A-crystallin. *Int J Biol Macromol* 1998; 22: 175-185

Farnsworth PN, Singh K. Self- complementary motifs (SCM) in  $\alpha$ -crystallin small heat-shock proteins. FEBS Letters 2000; 482: 175-179

Fischer L. An introduction to gel chromatography in laboratory techniques. In: Biochemistry and Molecular Biology. 1969. American Elsevier, New York.

Gething MJ, Sambrook J. Protein Folding in the Cell. Nature 1992; 355: 33-45

Glässer D. Enzymologische und Enzymimmunologische Untersuchungen zur Zelldifferenzierung in Augenlinsen. Nova Acta Leopoldina 1971; 197: 36

Görg A, Postel W, Westermeier R, Gianazza E, Righetti PG. Gel gradient electrophoresis, isoelectric focusing and two-dimensional techniques in horizontal, ultrathin polyacrylamide layers. J Biochem Biophys Methods. 1980; 3: 273-84

Golenhofen N, Htun P, Ness W, Oob R, Haper W, Denckhahn D. Binding of the stress protein  $\alpha$ B-crystallin to cardiac myofibrils correlates with the degree of myocardial damage during ischemia/reperfusion in vivo. J. Mol. Cell Cardiol 1999; 31: 569-580

Goodenough D.A. Lens metabolic cooperation: A study of mouse lens transport and permeability visualized with freeze-substitution autoradiography and electron microscopy. J Cell Biol 1980; 86: 576-589

Graber P, Williams CA. Méthode permettant l' étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. Biochim Biophys Acta 1953; 10: 193-194

Groth-Vasselli B, Kumosinski TF, Farnworth PN. Computer- generated model of the quaternary structure of  $\alpha$ -crystallin in the lens. Exp Eye Res 1995; 61: 249-253

Harding JJ. Nature and origin of the insoluble protein of the rat lens. Exp Eye Res 1969; 8: 147-156

Harding JJ, Dilley KJ. Structural proteins of the mammalian lens: A review with emphasis on changes in development, aging and cataract. Exp Eye Res 1976; 22: 1-73

Hendrik JP, Hartel FU. Molecular chaperone funktion of heat-shock proteins. Ann Rev Biochem 1993; 63: 349-384

Hitotsumatsu T, Iwaki T, Fukui M, Tateishi J. Distinctive immunohistochemical profiles of small heat-shock proteins (heat-shock protein 27 and  $\alpha$ B-crystallin in human brain tumors). Cancer 1996; 77: 352-361

Hockwin O, Neumann HG, Kleinfeld O. Das Verhalten der Linseneiweiße in Abhängigkeit vom Alter der Meerschweinchen – und Rinderlinsen. Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol 1958; 160: 8-19

- Hockwin O, Kleinfeld O. Das Verhalten von Fermentaktivität in einzelnen Linsenteilen unterschiedlich alter Rinder und ihrer Beziehung zur Zusammensetzung des wasserlöslichen Eiweißes. In: Rohen (Herausg). Die Struktur des Auges. Schattauer Verlag 1965: 395-401
- Hockwin O. Zur Pathogenese und Therapie der Alterskatarakt. Historische Aspekte und neue Vorstellungen. *Hist Ophthalm Internatl* 1981; 2: 115-131
- Hockwin O. Trübungen der Augenlinse. *Spektrum der Wissenschaft* 1983; 9: 28-37
- Hockwin O. Neuere Erkenntnisse über die Ursache der Katarakt. *Die Umschau* 1985; 12: 726-733
- Hockwin O, Ahrend MHJ, Bours J. Correlation of Scheimpflug photography of the anterior eye segment with biochemical analysis of the lens. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1986; 224: 265-270
- Hoenders HJ, Bloemendal H. Aging of lens proteins. In: *Molecular and cellular biology of the eye lens* (Ed. Bloemendal H) New York, Wiley 1981: 279-326
- Hoenders HJ, Bloemendal H. Veränderung des Proteinstoffwechsels beim Altern. In: *Altern der Linse* (Herausg Hockwin O). Symposium über die Augenlinse in Strassbourg. Bergmann & Mayr, Miesbach, 1982
- Hoenders HJ, Bloemendal H. Membran- und Zytoskelettproteine. In: *Biochemie des Auges* (Herausg Hockwin O). Bücherei des Augenarztes Enke-Verlag, Stuttgart 1985; Band 107
- Horwitz J.  $\alpha$ -Crystallin can function as molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10449-10453
- Ingolia TO, Craig EA. For small Drosophila heat-shock proteins are related to each other and to mammalian alpha-crystallin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1982; 2360-2364
- Iwaki T, Kume-Iwaki A, Liem RK, Goldman JE. Alpha B-crystallin is expressed in non-lenticular tissues and accumulates in Alexander's disease brain. *Cell* 1989; 1: 71-78
- Iwaki T, Kume-Iwaki A, Goldman JE. Cellular distribution of alpha B-crystallin in non-lenticular tissues. *J Histochem Cytochem* 1990; 38: 31-39
- Jaenicke R. Eye-lens proteins: Structure, superstructure, stability, genetics. *Naturwissenschaften* 1994; 81: 423-429
- Jedziniak JA, Arredondo M, Andley U. Oxidative damage to human lens enzymes. *Current Eye Res* 1987; 6: 45-51

- Kapphahn RJ, Ethen CM, Peters EA, Higgins LA, Ferrington DA. Modified  $\alpha$ A crystallin in the retina: Altered Expression and truncation with ageing. *Biochemistry* 2003; 42: 15310-15325
- Kato K, Shinohara H, Kurobe N, Goto S, Inoguma Y, Ohshima K. Immunoreactive  $\alpha$ A-crystallin in rat non-lenticular tissues detected with a sensitive immunoassay method. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1080: 173-180
- Koch H-R, Weihenmeier P, Siedek M. Corticosteroid cataract after kidney transplantation. *Graefe's Archiv Ophthalmol* 1975; 194: 39-53
- Koch H-R, Hockwin O, Ohrloff, C. Metabolic disorders of the lens. *Metabolic Ophtal* 1976; 1
- Koch H-R, Siedek M. Lenticular myopia in steroid cataract. *Klin. Mbl. Augenheilkunde* 1977; 171: 620-622
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-685
- Liang JJN. Interaction between  $\beta$ -amyloid and lens  $\alpha$ B-crystallin. *FEBS Lett* 2000; 484: 8-101
- Liao JH, LeeJS, Chiou SH. Distinct roles of alphaA- and alphaB- crystallins under therm and UV stresses. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 295: 854-861
- Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annual Rev. Genet*. 1988; 22: 631-677
- Liu C, Pande J, Lomakin A, Ogu O, Benedek GB. Aggregation in aqueous solutions of bovine lens  $\gamma$ -crystallins: Special role of  $\gamma_s$ . *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 1609-1619
- Longoni S, Lattonen S, Bullock G, Chiesi M. Cardiac alpha-crystallin. II. Intracellular localization. *Mol Cell Biochem* 1990; 97: 121-128
- Maiti M, Kono M, Chakrabarti B. Heat induced changes in the conformation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -crystallins: unique thermal stability of  $\alpha$ -crystallin. *FEBS Lett* 1988; 236: 109-114
- Mies C. Isolierung, Reinigung und Charakterisierung des  $\alpha$ -Kristallins aus den Linsen von Kälberaugen. Diplomarbeit Fachhochschule für Biotechnologie Berlin 1999
- Millichamp, NJ. Exotic Animal Ophthalmology in Gelatt K.N. (ed), *Veterinary Ophthalmology*. 2. Edition Lea & Febiger, Philadelphia 1991; 680-685
- Mörner CT. Untersuchung der Proteinsubstanzen in den lichtbrechenden Medien des Auges I. *Hoppe-Seyler Z. Physiol Chem* 1894; 18: 61-106

- Oppel A, Franz V. Lehrbuch der vergleichenden mikroskopischen Anatomie der Wirbeltiere. 7. Teil Sehorgan. Lehrbuch der vergleichenden mikroskopischen Anatomie 1906
- Papaconstantinou J. Biochemistry of bovine lens proteins. The  $\gamma$ -crystallin of adult bovine, calf and embryonic lenses. *Biochim Biophys Acta* 1965; 107: 81-90
- Piatigorsky J, Horwitz J. Characterization and enzyme activity of argininosuccinate lyase/ $\delta$ -crystallin of the embryonic duck lens. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1295: 158-164
- Rao P, Horwitz J, Zigler S.  $\alpha$ -Crystallin a molecular chaperone, forms stable complex with carbonic anhydrase upon heat denaturation. *Biochim Biophys Res Commun* 1993; 190: 786-793
- Rao P, Huang QL, Horwitz J, Zigler S. Evidence that  $\alpha$ -crystallin prevents non specific protein aggregation in the intact eye lens. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1245: 439-447
- Righetti PG. Isoelectric focusing: Theory, methodology and application. (Eds. Work TS, Burdon RH) 1983. Elsevier Biochemical Press, Amsterdam
- Rink H, Bours J, Hoenders HJ. Guidelines for the classification of lenses and the characterization of lens Proteins. Notes from the EURAGE workshop in Louvian-La-Neuve, Belgium. *Ophthalmic Res* 1982; 14: 284-291
- Roquemore EP, Chevrier MR, Cotter R, Hart W. Dynamic O-glucosylation of the small heat-shock protein  $\alpha$ B-crystallin. *Biochemistry* 1996; 35: 3578-3586
- Samuelson, DA. Embryology and Anatomy. In: Gelatt K.N. (ed), *Veterinary Ophthalmology*. 2. Edition Lea & Febiger, Philadelphia, 1991; 75
- Schlüter, G. Ciprofloxacin. Review of potential toxicologic effects. *Am. J. Med.* 1987; 82: 91-93
- Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS- polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* 1967; 28: 815-822
- Singh K, Groth-Vasselli B, Kumosinski TF, Farnsworth PN.  $\alpha$ -Crystallin quaternary structure: Molecular basis for its chaperone activity. *FEBS Lett* 1995; 372: 283-387
- Slingsby C, Bateman OA. Rapid separation of bovine  $\beta$ -crystallin subunits  $\beta$ B1,  $\beta$ B2,  $\beta$ B3,  $\beta$ A3 and  $\beta$ A4. *Exp Eye Res* 1989; 51: 21-26
- Slingsby C, Miller LR. Purification and crystallisation of mammalian lens  $\gamma$ -crystallin. *Exp Eye Res* 1983; 37: 517-530

- Spector A, Freund T, Li LK, Augusteyn RC. Age-dependent changes in the structure of  $\alpha$ -crystallin. *Invest Ophthalmol* 1971; 10: 677-686
- Srinivasan AN, Nagineni CN, Bhat SP.  $\alpha$ A-Crystallin is expressed in non-ocular tissues. *J Biol Chem* 1992; 267: 23337-23341
- Stryer L. *Biochemie*. 4. Auflage 1996
- Tan AT, Lerman S. Studies on insoluble lens proteins. *Canad J Ophthalmol* 1972; 7: 80-85
- Van Dam, AF: Purification and composition of  $\beta$ s-Crystallins. *Exp. Eye Res.* 1966; 5: 225-256
- Van Kamp GJ, Hoenders HJ, Bloemendal, H. One step preparation of the polypeptide chain of alpha-crystallin. *Biochem. Biophys. Acta* 1971; 243: 149-151
- Van Kamp GJ, Hoenders HJ. The distribution of the soluble proteins in the calf lens. *Exp Eye Res.* 1973;17: 417-26.
- Van Kleef, FSM: Post-synthetic modification of bovine  $\alpha$ -crystallin. *Dissertationschrift der Universität von Nijmegen* 1975
- Van den Oetelaar PJM, De Man B, Hoenders HJ. Protein folding and aggregation studied by isoelectric focusing in two dimensions. *Biochem Biophys Acta* 1989; 995: 82-90
- Van den Oetelaar PJM, Van Someren PFHM, Thomson JA, Siezen RJ, Hoenders HJ. A dynamic quaternary structure of bovine  $\alpha$ -crystallin as indicated from molecular exchange of subunits. *Biochemistry* 1990; 29: 3488-3493
- Vesterberg O, Svensson H. Isoelectric fractionation, analysis and characterization of ampholytes in natural pH gradients. Further studies on the resolving power with the separation of myoglobins. *Acta Chem Scand* 1966; 20: 820-834
- Welch W, Georgopoulos C. Heat Shock Proteins or Chaperones. *Ann. Rev. Cell Bio.* 1993; 9: 601-634
- Willcock, BPTW, Dukes S. The Eye. In: Ferguson, HW. (ed.) *Systematic Pathology of Fish*. Iowa State Press, 1989; 168-194
- Williams LA, Piatigorsky J, Horwitz J. Structure features of  $\delta$ -crystallin of turtle lens *Biochim Biophys Acta* 1982; 708: 49-56
- Zhang S, Lockshin C, Herbert A, Winter E, Rich A. Zuotin, a putative Z-DNA binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 1992; 11: 3787-3796.

Zhang S, Holmes T, Lockshin C, Rich A. Spontaneous Assembly of a Self Complementary Oligopeptide to Form a Stable Macroscopic Membrane. Proc. Natl.Acad. Sci. 1993; 90: 3334-3338.

Zigman S, Lerman S. The relationship between soluble and insoluble proteins in the lens. Biochim Biophys Acta 1968; 154: 423-425

## 11 Danksagungen

Ich bedanke mich herzlich bei

Herrn Prof. Dr. med Winrich Breipohl für seine stetige Unterstützung und für die Offenheit, mit der er meinen eigenen Ideen gegenüberstand.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Alt für die Übernahme des Korreferates.

Herrn PD Dr. rer. nat. Alfred Wegener für die vielen Diskussionen und die 25 jährige Zusammenarbeit im Institut für Exp. Ophthalmologie.

Herr Dr. rer. nat. Johan Bours für 25 Jahre gemeinsame Forschung.

Frau Prof. Dr. rer. nat. Brigitte Schmitz für die treibende Kraft bei der Fertigstellung der Arbeit.

Meinen ehemaligen Kollegen im Institut für Exp. Ophthalmologie Hannelore Lengert, Heiko Landwehr, Marion Leyendecker, Anja Theisen, Roswitha Blume, Heike Laser, Elke Thome für die langjährige freundschaftliche Zusammenarbeit und die vielen schönen Stunden.

Meinen Kollegen „Friends of Blind Fishes“ in Irland, England, Norwegen und Finnland für die gemeinsame Arbeit am Europa Projekt „Cataract in farmed fish“.



## 12 Lebenslauf

Name	Michael Hugo Josef Ahrend
geboren am	30.12.1959, Siegburg
Familienstand	ledig
Kinder	Tochter Rosa, 21.07.1993
Wehrdienst	1981

### Schulbildung

1966 - 1974	Grund- und Hauptschule Sinzig
1974 - 1976	Fachoberschule für Wirtschaft Bonn
1986 - 1989	Charlottenburg Kolleg, Berlin
1989	Allgemeine Hochschulreife

### Studium

1989 – 1994	Chemie und Biochemie, FU Berlin
1995	Biologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Juli 1997	Diplomhauptprüfung
Mai 1998	Diplomarbeit: „Die Bedeutung des nativen $\alpha$ - Kristallins bei Kälberlinsen während des Alterns“
Juni 1998	Anfertigung einer Dissertationsschrift am Inst. für Exp. Ophthalmologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn Thema: „Das Altern von Augenlinsen kristallinen als Grundlage für die Hypothese der Quintärstruktur von Proteinen“

### Beruflicher Werdegang

1976 - 1979	Ausbildung zum Biologielaboranten an der Universität Bonn
1979 - 1985	Technischer Assistent der Abt. für Exp. Ophthalmologie der Universität Bonn
1986 - 1999	Freier Mitarbeiter im Inst. für Exp. Ophthalmologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn und im Europa Projekt Fair: „Cataract in farmed fish“
2000-2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Inst. für Exp. Ophthalmologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
	Lehrtätigkeit (Proteinchemistry) im Rahmen des Leonardo Projektes BG/00/B/F/PP/132100 im Inst. of Biology and Immunology of Reproduction, Bulgarian Academy of Science, Sofia.

seit Juni 2003

Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Inst. für Physiologie, Biochemie  
und Hygiene der Tiere Abt. Biochemie der Rheinischen Friedrich-  
Wilhelms-Universität Bonn

- Bours, J., **Ahrend, M.H.J.**, Lemmen-Sternberg, A. and Födisch, H.J. (1985)  
Analysis of human embryonic lens crystallins by isotachophoresis, isoelectric focusing and immunological methods.  
Elektrophorese Forum 1985 (Ed. Radola, B.J.), pp. 153-158  
Universitäts-Verlag, München.
- Hockwin, O., **Ahrend, M.H.J.**, Bours, J. (1986).  
Correlation of Scheimpflug photography of the anterior eye segment with biochemical analysis of the lens. Application of a frozen-sectioning technique to investigate differences in protein distribution of single lens layers.  
Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 224, 265-270.
- Ahrend, M.H.J.**, Bours, J., Födisch, H.J. (1987).  
Water-soluble and -insoluble crystallins of the developing human fetal lens, analyzed by agarose/polyacrylamide thin-layer isoelectric focusing.  
Ophthalmic Res. 19, 150-156.
- Bours, J., **Ahrend, M.H.J.**, Wegener, A., Hockwin, O. (1987).  
Glycosylated crystallins in microsections of diabetic rat lenses.  
Concepts Toxicol. 4, 350-359.
- Bours, J., **Ahrend, M.H.J.**, Hockwin, O. (1987).  
Biochemistry of the ageing bovine lens. I. Isotachophoresis of water-soluble crystallins from equator, nucleus and anterior and posterior cortex.  
Lens Res. 4, 143-161.
- Bours, J., **Ahrend, M.H.J.**, Wegener, A., Hockwin, O. (1990).  
Water-insoluble high-molecular-weight and  $\alpha$ -crystallins as the source of the Scheimpflug light scattering pattern in the rat lens.  
Ophthalmic Res. Suppl. 1, 90-94.
- Bours, J., **Ahrend, M.H.J.**, Hockwin, O. (1991).  
Crystallin profiles of calf and bovine lens microsections, stained for free sulfhydryl groups and proteins.  
Lens and Eye Toxicity Res. 7, 531-545.
- Bours, J., **Ahrend, M.H.J.** (1990).  
Staining of free sulfhydryl groups of proteins after separation by isoelectric focusing of Bio-Rad standards and lens crystallins.  
Analytical Biochemistry 190, 244-248.
- Bours, J., **Ahrend, M.H.J.** and Breipohl, W. (1991).  
The presence of  $\beta$ -,  $\beta_s$ - and  $\gamma$ -crystallins in the water-insoluble crystallin complex of the ageing bovine lens.  
In: Eye Lens Membranes and Ageing. (Ed. Vrensen, G. and Clauwaert, J.)  
Topics in Aging Research in Europe 14, 341-349.
- Bours, J., **Ahrend, M.H.J.**, Spitznas, M. and Hofmann, D. (1991).

The age-related decrease of isoelectric points of beta- and gamma-crystallins in the normal and cataractous human lens and in the water-insoluble crystallin complex.  
In: Eye Lens Membranes and Ageing. (Ed. Vrensen, G. and Clauwaert, J.)  
Topics in Aging Research in Europe 14, 351-361.

Bours, J., **Ahrend, M.H.J.** (1993).  
Crystallin and water content of the ageing bovine lens.  
Cross-sectional view by microsectioning perpendicular to the optic axis.  
Progr. in Veterinary and Comparative Ophthalmol. 3, 141-148.

Bours, J., **Ahrend, M.H.J.** and Breipohl, W. (1995)  
Regionality of glycated calf lens crystallin subunits demonstrated by lectin staining.  
In: Ocular Toxicology. Eds. Weisse, I., Hockwin, O., Green, K., Tripathy, R.C.  
Plenum Press, New York, pp. 219-225.

Breipohl, W., Reitz, C., **Ahrend, M.H.J.**, Grus, F.H. and Bours, J. (1995).  
Characterization of human tear glycoproteins by PHAST SDS electrophoresis, western blotting and lectin binding.  
In: Ocular Toxicology. Eds. Weisse, I., Hockwin, O., Green, K., Tripathy, R.C.  
Plenum Press, New York, pp. 317-326.

Bours, J., **Ahrend, M.H.J.** and Wegener, A. (1995).  
Influence of PHAKAN<sup>R</sup> on the lens toxicity of naphthalene in rat lenses, analyzed by isoelectric focusing of single lens layers.  
In: Ocular Toxicology. Eds. Weisse, I., Hockwin, O., Green, K., Tripathy, R.C.  
Plenum Press, New York, pp. 197-225.

**Ahrend, M.H.J.**, Bours, J. (1997)  
Detection of glycated fetal human lens crystallins by Concanavalin-A and aldehyde staining.  
Mechanisms Ageing & Development. 99, 167-179.

**Ahrend, M.H.J.** Bours, J. (1997)  
The glycation of bovine lens  $\beta_L$ -,  $\beta_S$ - and  $\gamma$ -crystallins demonstrated by isoelectric focusing and lectin staining  
Exp. Eye Res. 65, 711-715

Bours, J.; **Ahrend, M.H.J.** (1998)  
Higher glycation of  $\beta_L$ - and  $\beta_S$  crystallins in the anterior lens cortex and maximum glycation of  $\gamma$ -crystallins in the bovine lens nucleus, demonstrated by frozen-sectioning, isoelectric focusing and lectin staining.  
Ophthalmic Res. 30, 233-244

Paul J. Midtlyng, **Michael Ahrend**, Ellen Bjerkås, Rune Waagbø, Tony Wall (1999)  
Current research on cataracts in fish.  
Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. 19, 6, 299-301

Priya Mathur, Suresh K. Gupta, Alfred Wegener, Winrich Breipohl, **Michael H.J. Ahrend**, Yagya D. Sharma, Yogenda K. Gupta and Rasik B. Vajpayee  
Comparison of various calpain inhibitors in reduction of light scattering, protein precipitation and nuclear cataract in vitro.  
Current Eye Res. 21, 6, 926-933

A.Wegener, H. Laser, **M.H.J. Ahrend**, O.Breck, E. Bjerkas, C. Glöckner, P.J. Midtlyng, W. Breipohl (2001)  
Light scattering in normal and cataractous lenses of farmed atlantic salmon (*Salmo Salar*): A slitlamp and scheinplugh photographic study.  
Ophthalmic Res. 33, 264-270

**M. Ahrend**, M. Argirova, W. Breipohl, S. Kalaydjiev, R. Komsa-Penkova, M. Stamenova, A. Pashoy, N. Trifonova (2002)  
A guide to strategies in protein analysis. "Molecular biology and analytical biochemistry in medical training."  
Leonardo BG/00/B/F/PP/132100

Mineva, A. Russinova, **M. Ahrend**, M. Stamenova, N. Trifonova, K. Mainhard, W. Breipohl (2005)  
Localization of low-molecular heat shock protein (sHSP)  $\alpha$ B-crystallin in human placenta.  
Comptes rendus de l'Académie bulgare des Science. 58, 1, 85-90

## Publizierte Abstracts( Poster Präsentationen)

Bours, J. and **Ahrend, M.H.J.** (1980).

The analysis of albuminoid by isoelectric focusing, various electrophoretic methods and column Chromatography of the ageing bovine lens.

4th ISER Congress, New York. Proc. Internat. Soc. for Eye Res. 1, 127.

Hockwin, O., Wegener, A., Micic, L., Kaiser, J., Shibata, S., Schwarz, B., Müller, P., **Ahrend, M.**, Bours, J. and York, B. (1984).

Streptozotocin diabetes and effect of aldose reductase inhibitor AL-1567.

24th AER Congress, Vienna. Ophthalmic Res. 16, 208.

Bours, J. and **Ahrend, M.** (1984).

Isotachopheresis and immunoelectrophoresis of water-soluble and -insoluble crystallins of the ageing lens. 24th AER Congress, Vienna. Ophthalmic Res. 16, 229.

**Ahrend, M.H.J.**, Bours, J. and Hockwin, O. (1984).

Protein profiles of microsections of bovine, rat and human lenses.

6th ISER Congr. Alicante. Proc. Internat. Soc. for Eye Res. 3, 150.

**Ahrend, M.**, Bours, J. and Hockwin, O. (1985).

Protein profiles of microsections of bovine and rat lenses.

25th AER Congress, Lund, Sweden. Ophthalmic Res. 17, 197.

**Ahrend, M.H.J.**, Bours, J. and Hockwin, O. (1985).

Age-related changes in crystallin composition of bovine lens parts, as determined by thin-layer isoelectric focusing in agarose/polyacrylamide gels.

25th AER Congress, Lund, Sweden. Ophthalmic Res. 17, 198.

Bours, J., **Ahrend, M.H.J.**, Lemmen-Sternberg, A. and Födisch, H.J. (1985)

Analysis of human embryonic lens crystallins by isotachopheresis, isoelectric focusing and immunological methods.

Elektrophorese Forum '85 (Ed. Radola, B.J.) 1 pp. 153-158. Universitäts-Verlag München

**Ahrend, M.H.J.**, Hockwin, O. and Wegener, A. (1986).

Protein distribution patterns in microsections of diabetic rat lenses.

Ophthalmic Res. 18, 150.

Sisk, D.R., Wegener, A., **Ahrend, M.** and Hockwin, O. (1986).

Naphthalene cataract in brown-Norway rats: histology, slitlamp microscopy and biochemistry of cataract development.

Ophthalmic Res. 18, 150.

Bours, J., **Ahrend, M.H.J.**, Hockwin, O. and Födisch, H.J. (1987).

Investigation of differences in water content and crystallin distribution of single layers of the human embryonic lens compared to adult lens, with a frozen-sectioning technique.

27th AER Congress, Leysin (CH). Ophthalmic Res. 19, 8.

Bours, J., **Ahrend, M.H.J.**, Raps, I. and Hockwin, O. (1987).  
Protein profiles of microsections of young and old bovine lenses.  
27th AER Congress, Leysin (CH). *Ophthalmic Res.* 19, 38.

Bours, J., **Ahrend, M.H.J.** and Hockwin, O. (1989).  
Age-related changes in the composition of water-soluble and -insoluble crystallins from bovine lens parts, determined by isoelectric focusing in normal and agarose/polyacrylamide gels.  
29th AER Congress, Albena, Bulgaria. *Ophthalmic Res.* 21, 341.

Bours, J., **Ahrend, M.H.J.** and Hockwin, O. (1989).  
Age-related changes in glycosylated water-soluble crystallins from bovine lens parts, visualized by periodic acid/Schiff staining for glycoproteins after isoelectric focusing.  
29th AER Congress, Albena, Bulgaria. *Ophthalmic Res.* 21, 341-342.

Bours, J., **Ahrend, M.H.J.** and Hockwin, O. (1989).  
Agarose isoelectric focusing profiles of low and high molecular weight soluble and insoluble crystallins in microsections of the rat lens.  
29th AER Congress, Albena, Bulgaria. *Ophthalmic Res.* 21, 342.

Bours, J., **Ahrend, M.H.J.** and Hockwin, O. (1990).  
Agarose isoelectric focusing profiles of water-soluble and water-insoluble crystallins from naphthalene-cataractous rat lens microsections.  
30th AER Congress, Montpellier. *Documenta Ophthalmologica* 76, 191.

Bours, J., **Ahrend, M.H.J.** and Hockwin, O. (1991).  
Crystallin profiles of calf and bovine lens microsections, stained for free sulfhydryl groups and proteins.  
31st AER Congress, Bonn. *Documenta Ophthalmologica* 77, 140.

Bours, J. and **Ahrend, M.H.J.** (1992).  
The effect of Phakan<sup>R</sup>-treatment on the crystallin composition of the naphthalene-cataractous rat lens.  
32nd AER Congress, Arhus (DK). *Documenta Ophthalmologica* 80, 259.

**Ahrend, M.H.J.**, Bours, J. and Breipohl, W. (1992).  
Detection of  $\beta$ - and  $\gamma$ -crystallins in the water-insoluble complex of the ageing bovine lens.  
10th ISER Congress, Stresa, Italy. *Exp. Eye Res.* 55, Suppl. 1, p. 198, Nr. 686.

**Ahrend, M.H.J.**, Bours, J. and Hofmann, D. (1992).  
The incorporation of  $\beta$ - and  $\gamma$ -crystallins into the water-insoluble complex of the human normal and cataractous lens.  
10th ISER Congress, Stresa, Italy. *Exp. Eye Res.* 55, Suppl. 1, p. 198, Nr. 687.

Bours, J. und **Ahrend, M.H.J.** (1992).  
Schnittbild, Kristallin- und Wassergehalt der alternden Bovine-, Human- und Katarakt-Linsen, dargestellt durch Mikro-Schnitt-Technik.  
*Klin. Mbl. Augenheilk.* 201, 275.

- Bours, J. and **Ahrend, M.H.J.** (1993).  
 Cross-sectional views, crystallin and water content of ageing bovine, human and cataractous lenses as obtained by micro-sectioning.  
 Internat. Ophthalmol. 16, Suppl., 14.
- Bours, J., **Ahrend, M.H.J.** and Breipohl, W. (1993).  
 Detection of  $\beta$ - and  $\gamma$ -crystallins in the water-insoluble complex of the ageing bovine lens.  
 33rd AER Congress, Aachen. Documenta Ophthalmologica 83, 209-210.
- Bours, J., **Ahrend, M.H.J.** and Hofmann, D. (1993).  
 The incorporation of  $\beta$ - and  $\gamma$ -crystallins into the water-insoluble complex of the human normal and cataractous lens.  
 33rd AER Congress, Aachen. Documenta Ophthalmologica 83, 235.
- Bours, J. and **Ahrend, M.H.J.** (1993).  
 Cross-sectional views, crystallin and water content of ageing bovine, human and cataractous lenses as obtained by micro-sectioning.  
 33rd AER Congress, Aachen. Documenta Ophthalmologica 83, 235.
- Bours, J., Wegener, A. and **Ahrend, M.H.J.** (1994)  
 Detection of glycated human fetal lens crystallins by Concanavalin-A and aldehyde staining.  
 Abstract 35th AER Congress, Montpellier (F). JERMOV Proceedings, Part 1, p. 250.
- Ahrend, M.H.J.**, Breipohl, W. and Bours, J. (1994).  
 Detection of glycated human adult lens crystallins by Concanavalin-A and aldehyde staining  
 Abstract 2nd ECORA Congress, Montpellier (F). JERMOV Proceedings, Part 1, p. 135.
- Bours, J., **Ahrend, M.H.J.** and Breipohl, W. (1995).  
 Regionality of calf lens crystallins by glycoprotein staining with four lectins.  
 Internat. Ophthalmol. 19, Suppl. 1, 17.
- Bours, J., **Ahrend, M.H.J.** and Breipohl, W. (1995).  
 The glycation of bovine lens  $\beta_L$ -,  $\beta_S$ - and  $\gamma$ -crystallins.  
 Vision Res. 35, Suppl. 1, 17.
- Bours, J., **Ahrend, M.H.J.**, Wegener, A. Breipohl, W. (1995)  
 The glycation of bovine lens  $\beta_L$ -,  $\beta_S$ - and  $\gamma$ -crystallins demonstrated by frozen-sectioning and isoelectric focusing.  
 Vision Res. 35, Suppl. 1, 198.
- Breipohl, W., **Ahrend, M.H.J.**, Bours, J., Argirova, M. (1997)  
 Zur Regionalität und Altersabhängigkeit der Kristallin-Zusammensetzung in der Linse.  
 Der Ophthalmologe, Suppl. 1, 188



**Ahrend, M.H.J.**, Bours, J., Wegener, A., Breipohl, W. (1998)

Crystallin Self-Organisation After Experimental Dissociation Into Polypeptides.  
Ophthalmic Res. 30 Suppl.1, 30

**Ahrend, M.H.J.**, Breck, O., Wegener, A., Breipohl, W. (1999)

Crystallin patterns of normal and cataractous lenses of farmed atlantic salmon from fresh and seawater period.  
Invest. Ophthal. & Vis. Sci. 40,4, 302

**Ahrend, M.H.J.**, Breck, O., Wegener, A., Breipohl, W. (1999)

Age-related changes in crystallin patterns of normal and cataractous lenses of farmed Atlantic salmon.  
9<sup>th</sup> International Conference „Diseases of fish and shellfish“, Book of Abstracts P-025

Wegener A, Laser H, **Ahrend MHJ**, Breck O, Bjerkas E, Midtlyng PJ, Glöckner C, Breipohl W (1999)

Scheimpflug photographic documentation of eye lens scattering and cataract development in farmed salmon.  
„Towards predictable quality“. European Aquaculture Society, Special publication No 27, p. 253

Priya Mathur, Suresh K. Gupta, Alfred Wegener, Winrich Breipohl, **Michael Ahrend**, Yagya D. Sharma, Yogenda K. Gupta and Rasik B. Vajpayee (2000)

Calpain inhibitors SJA6017, MDL28170 prevent increase in light scattering, protein cleavage and protein precipitation in *in vitro* models. ICER, Ophthalmic Res.

**Ahrend MHJ**, Beipohl W, Wegener A, Schmitz B. (2004)

Nutrient sensing pathways: O-linked N-acetylglucosamine modification of lens crystallins increases with glucose concentration. Mosbacher Kolloquium