

Friedrich-Schiller-Universität Jena

Biologisch-Pharmazeutische Fakultät

**Leibniz Institut für Altersforschung - Fritz Lipmann Institut
(vormals Institut für Molekulare Biotechnologie e.V. - IMB Jena)**

Arbeitsgruppe Molekulare Cytologie

DIPLOMARBEIT

Zellbiologische Untersuchungen zur Augenlinse der Säugetiere

**"Zellkultivierung, Interaktion mit transformierten Zellen und
strukturelle Eigenschaften des Cytoskeletts"**

**Angefertigt im Studiengang Biologie-Diplom
zur Erlangung des Hochschulabschlusses mit dem akademischen Grad eines
Diplom-Biologen
(Dipl.-Biol.)**

**Erarbeitet und vorgelegt von
Norman Gerstner, geboren am 03. Dezember 1980**

Jena, im November 2005

Die vorliegende Diplomarbeit wurde erstellt und betreut am Leibniz Institut für Altersforschung - Fritz Lipmann Institut (ehemals Institut für Molekulare Biotechnologie e.V. Jena).

Gutachter der Diplomarbeit:

- (1.) **Prof. Dr. habil. Eberhard Unger**
Molecular Cytology Group
Leibniz Institut für Altersforschung - Fritz Lipmann Institut
Beutenbergstraße 11
D-07745 Jena
Deutschland
E-Mail: eunger@fli-leibniz.de
Telefon: 49 (3641) 65 6160

- (2.) **Prof. Dr. Karl Otto Greulich**
Abteilung Einzelzell- und Einzelmolekültechniken
Leibniz Institut für Altersforschung - Fritz Lipmann Institut
Beutenbergstraße 11
D-07745 Jena
Deutschland
E-Mail: kog@fli-leibniz.de
Telefon: 49 (3641) 656401

Zusammenfassung

In der vorliegenden zellbiologischen Arbeit zur Augenlinse der Säugetiere wird zum einen das Verhalten von Linsenepithelzellen bezüglich der Induktion einer Teildifferenzierung zu Linsenfaserzellen und zum anderen die Interaktion von Linsenepithelzellen mit transformierten Zelllinien in Co-Kultur hinsichtlich der Ausbildung einer Wachstumsgrenze für invasiv wachsende Gewebe beschrieben.

Weiterhin werden strukturelle und biochemische Eigenschaften des Cytoskeletts von kultivierten undifferenzierten und teildifferenzierten Linsenepithelzellen (Lentoiden) sowie von sekundären Linsenfaserzellen im Kontext einer Umstrukturierung während der limitierten Apoptose untersucht.

In der Primärkultur konnte verdeutlicht werden, dass die Linsenepithelzellen in einem Vollmedium mit fetalem Kälberserum nach Ausbildung eines regelmäßigen, dichten Zellverbandes eine spontane Teildifferenzierung zu Lentoiden (als frühe Linsenfaser-Vorläuferzellen zu betrachten) induzierten. Die Co-Kultur von Linsenepithelzellen mit maligne transformierten Leukämiezellen ließ aus deren Wachstumsverhalten keine gegenseitigen Interaktionen erkennen. Dagegen bildete sich in der Co-Kultur von Linsenepithel- mit microvaskulären Endothelzellen eine, über mehr als zwei Wochen stabile, Wachstumsgrenze zwischen beiden Zelllinien aus. Die Ergebnisse aus der Primärkultur und den Co-Kulturen deuten an, dass der Beitrag der Linsenepithelzellen zur Ausbildung einer Barriere für invasiv wachsende Gewebe in der Aufrechterhaltung eines dichten, kompakten Zellverbandes liegt. Wenn chemorepulsive oder kontaktrepulsive Effekte überhaupt eine Rolle spielen, dann nur über sehr kurze Distanzen innerhalb direkter Umgebung des Linsenepitheliums.

Die Untersuchung des Cytoskeletts in Linsenepithelzellen, Lentoiden und Linsenfaserzellen ergab hinsichtlich der limitierten Apoptose folgende wichtige Resultate:

- Die Umstrukturierung des F-Aktin-Mikrofilamentsystems führt, bereits beginnend in Lentoiden, zur Ausbildung eines dichten, auf submembranöse Bereiche beschränkten Mikrofilamentnetzwerkes in Linsenfaserzellen.
- In Anpassung an die stark verlängerte Form der Linsenfaserzellen werden Mikrotubuli in Ausrichtung zur Längsachse der Faserzellen organisiert. Diese Umstrukturierung ist ebenfalls auf der Ebene der teildifferenzierten Linsenepithelzellen in Kultur nachzuweisen.
- Das mikrotubuläre Cytoskelett wird dezentralisiert. Das Entspringen aller Mikrotubuli von einem lokalen Mikrotubulus Organisationszentrum (MTOC) geht verloren. Stattdessen wurden distinkte fokale Zentren in sekundären Linsenfaserzellen identifiziert, an denen Mikrotubuli zusammenliefen. Diese Dezentralisierung beginnt bereits in Lentoiden mit einer Dislokation des MTOC vom Zellkern und dem Verlust der Assoziation mit Mikrotubuli, ist hier jedoch reversibel. In den sekundären Linsenfaserzellen konnten dann nur noch membranernahe Verdichtungen von gamma-Tubulin gefunden werden, die nicht mehr mit Mikrotubuli verbunden waren.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Umstrukturierung des Cytoskeletts in Linsenfaserzellen während der limitierten Apoptose entscheidende morphogenetische Voraussetzung für die Stabilität und Elastizität der Linsenfaserzellen ist. Die Teilfragmentierung des MTOC könnte zu einer Verbesserung der optischen Eigenschaften führen, da ein lichtstreuendes Zentrum an dem alle Mikrotubuli verdichtet zusammenlaufen, eliminiert wird.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	III
1 Einleitung	1
2 Zielstellung dieser Diplomarbeit	9
3 Material und Methoden	12
3.1 Biologische Materialien.....	12
3.2 Präparation der Augenlinsen	12
3.3 Desintegration der Augenlinse	13
3.3.1 Isolation von Linsenepithelzellen (LEZ) für die Zellkultur	13
3.3.2 Isolation von Linsenfaserzellen für Immuncytochemie und Elektronenmikroskopie.	13
3.4 Vitalitätsnachweise – Lebendmarkierung von Zellen	14
3.5 Zellkultur	15
3.5.1 Zellkultur der Linsenepithelzellen (LEZ)	15
3.5.2 Co-Kultur von Linsenepithelzellen mit K-562 Leukämiezellen.....	16
3.5.3 Co-Kultur von Linsenepithelzellen mit Endothelzellen (HMEC-1)	16
3.5.4 Mikroskopische Auswertung der Primär- und Co-Kulturen.....	17
3.6 Immuncytochemie und Immunofluoreszenz	17
3.6.1 Immunofluoreszenz von Linsenepithelzellen und Lentoiden (Primärkulturen)	17
3.6.2 Immunofluoreszenz von isolierten Linsenfaserzellen	20
3.6.3 Immunhisto- und Immuncytochemie an Kryostatschnitten der Augenlinse	23
3.6.4 Mikroskopische Auswertung der Fluoreszenzpräparate.....	25
3.7 Elektronenmikroskopie (TEM)	26
3.7.1 Fixierung und Einbettung der Linsenfaserzellen und des Zellpellets	26
3.7.2 Anfertigen von Ultradünnschnitten	27
3.8 Proteinbiochemie.....	28
3.8.1 Proteinextraktion – Isolation von Proteinen aus der Augenlinse	28
3.8.2 Co-Sedimentation – Extraktion von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs).....	29
3.8.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry	30
3.8.4 SDS-Gel-Elektrophorese	31
3.8.5 Coomassie-Färbung von Protein-Gelen	33
3.8.6 Silber-Färbung von Protein-Gelen	33
3.9 Western Blot	34
3.10 Verwendete Antikörper	37
3.11 Pufferlösungen	38
3.12 Zellkulturmedien	39
3.13 Liste der Materialien, Geräte und Substanzen	41

4 Experimente und Ergebnisse	45
4.1 Extraktion der Augenlinse und Desintegration deren Zellen	45
4.1.1 Vitalitätsnachweis	47
4.2 Primärkultur von Linsenepithelzellen – Wachstum, morphologische Eigenschaften und Teildifferenzierung zu Lentoiden	49
4.3 Co-Kultur von Linsenepithelzellen mit K-562 Leukämiezellen.....	53
4.4 Co-Kultur von Linsenepithelzellen mit humanen Endothelzellen (HMEC-1)	55
4.5 Strukturelle Eigenschaften des Cytoskeletts in Linsenzellen	56
4.5.1 Morphologische Eigenschaften des Cytoskeletts von Linsenepithelzellen und Lentoiden.....	57
4.5.2 Die Augenlinse im histologischen Gewebeschnitt.....	64
4.5.3 Strukturelle Eigenschaften cytoskelettaler Elemente in sekundären Linsenfaserzellen.....	67
4.6 Das Mikrotubulus Organisationszentrum in sekundären Linsenfaserzellen	70
4.7 Ultrastruktur von sekundären Linsenfaserzellen	78
4.8 Proteinbiochemie – Isolation von Proteinen aus Linsenfaserzellen	82
5 Diskussion und Schlussfolgerung	85
5.1 Desintegration und Vitalität.....	86
5.2 Primärkultur und Teildifferenzierung.....	86
5.3 Co-Kultur mit transformierten Zellen.....	88
5.4 Die Umstrukturierung des Cytoskeletts während der limitierten Apoptose in Faserzellen.....	90
5.5 Die Teilfragmentierung des Mikrotubulus Organisationszentrum (MTOC) in Faserzellen.....	94
6 Literaturverzeichnis	96

Häufig verwendete Abkürzungen:

µl; ml; l	Mikroliter; Milliliter; Liter
µM; mM; M	Mikromolar; Millimolar; Molar
BSA	Bovines Serum Albumin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FDA	Fluorescein Diacetat
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
g	Erdfallbeschleunigung
kDa	Kilo Dalton
LEZ	Linsenepithelzellen
LFZ	Linsenfaserzellen
LFZ-Pakete	Linsenfaserzell-Pakete
mA; V	Milliampere; Volt
MAPs	Mikrotubuli-assoziierte Proteine
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
MTOC	Mikrotubulus Organisationszentrum
MVK	Multivesikuläre Körperchen
ng; µg; mg; g	Nanogramm; Mikrogramm; Milligramm; Gramm
nm; µm	Nanometer; Mikrometer
OT	Objektträger
PBS	Phosphate Buffered Saline
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat = Natriumdodecylsulfat
sec; min; h	Sekunde; Minute; Stunde

1 Einleitung

Seit der Evolution der Sinnessysteme bei den verschiedenen mehrzelligen Tieren, ist es der visuelle Sinn der im Laufe der fortschreitenden Entwicklung, bis hin zu den Säugetieren immer größere Bedeutung für die Erfassung verhaltensrelevanter Informationen aus der Umwelt erlangte. Er wurde bei den höheren Primaten, einschließlich des Menschen, zum wichtigsten Orientierungssinn und in jeder Sekunde treffen ca. 100 MB an Informationen auf die Netzhaut. Dementsprechend haben sich in den Augentypen Strukturen entwickelt, die neben der Verarbeitung der visuellen Information, auch eine möglichst störungsfreie Weiterleitung des Lichtes auf eine Photorezeptorschicht ermöglichen. Zu diesen Strukturen gehört, neben der Hornhaut (Cornea) und dem Glaskörper (Corpus vitreum), die Augenlinse (Lens crystallina). Sie ist in vielerlei Hinsicht ein höchst außergewöhnliches Organ.

In evolutiver Anpassung an ihre Funktion als optische Linse ist sie transparent und projiziert Abbilder der Außenwelt scharf auf die Netzhaut. Dabei fällt das Umgebungslicht nahezu verlustfrei durch sie hindurch (Dahm, 2005).

Kompakte durchsichtige Organe oder Gewebe sind in der Natur eher selten. Organismen mit nahezu 100% lichtdurchlässigen Geweben bestehen entweder aus nur sehr wenigen Zellschichten und sind somit sehr dünn oder sie haben in einen lockeren Zellverband sehr viel Wasser eingelagert. Die meisten Organe und Gewebe bestehen jedoch in der Regel aus einer Mischung verschiedener Zelltypen. Diese sind oft unterschiedlich pigmentiert, selten völlig homogen entlang einer Orientierungsachse ausgerichtet und bilden innerhalb eines Zellverbundes morphogenetisch oder funktionell wichtige Phasengrenzen aus. Als Beispiel können Kapillaren genannt werden, die sich zwar dynamisch in den Zellverband eines Gewebes einfügen, jedoch stets deutlich von benachbarten Zellen abgrenzbar sind. Solche Grenzen zwischen Körperzellen und hinzukommend ihre Pigmentierung führen immer zu Lichtbrechung und Lichtabsorption. Selbst in einer einzigen Zelle variiert der Brechungsindex zwischen der Plasmamembran, den Zellorganellen und dem Cytoplasma erheblich.

Ganz anders die Augenlinse der Säugetiere und Wirbeltiere im Allgemeinen. Sie besteht komplett aus Zellen, die außergewöhnlich dicht und kompakt in einem optisch homogenen Zellverband organisiert sind. Beispielsweise kann die Linse des Hausschweins Durchmesser von über einem Zentimeter und Dicken bis zu 8 Millimeter erreichen. Trotz der makroskopischen Dimensionen und der hohen Zelldichte erscheint die Augenlinse glasklar. Ihre Trübung ist nahe Null und sie leitet einfallendes Licht nahezu verlustfrei auf die Retina.

Es wachsen keine Blutgefäße und kein einziger Nerv, weder embryonal noch postnatal, in die Linse ein. Diese Strukturen würden ihren kompakten Aufbau stören, die Homogenität unterbrechen (↪ Ausbildung zusätzlicher Phasengrenzen) und zu Verlusten bei der Lichttransmission führen. Dabei wird der Linsenkapsel die Hauptfunktion einer mechano-chemischen Barriere zugesprochen, die eine wirksame Wachstumsgrenze für invasiv wachsende Gewebe ausbildet. Als abgewandelte basale Matrix umgibt die kollagenhaltige Linsenkapsel den zellulären Teil der Linse vollständig (**Abb. 1.1**).

Die Augenlinse wird von Zellen aufgebaut, die sich in drei unterschiedlichen Differenzierungsstadien befinden:

- (1) Undifferenzierte Linsenepithelzellen bilden eine einzellige Schicht von Linsen-Stammzellen am vorderen Pol (gesamte vordere Linsenoberfläche) der Linse (Boulton and Albon, 2004). Sie sind unter anderem für die Neubildung von Linsenfasern zuständig (Tab. 1.1).
- (2) Die Linsenepithelzellen differenzieren sich zu Linsenfasern und bilden Übergangsstadien in Differenzierung befindlicher Fasern.
- (3) Ausdifferenzierte Linsenfasern (LFZ) sind die zelluläre Grundlage für die optischen Eigenschaften der Linse. Sie stellen den größten Teil des Gesamtvolumens der Augenlinse dar.

Die Linsenepithelzellen stellen im Zusammenhang das Linsenepithelium dar, welches den Stofftransport, den Metabolismus und die Detoxifikation für die gesamte Linse organisiert (Bhat, 2001). Durch spezialisierte Transmembrankanäle, die Porenkomplexe der "gap junctions", sind die Zellen der Augenlinse vom Linsenepithelium bis in den Linsen Kern cytoplasmatisch miteinander verbunden. In der Säugerlinse wurden bis jetzt **drei** verschiedene molekulare Varianten dieser gap junctions identifiziert, die zur Ausbildung eines zusammenhängenden, interzellulären Kommunikationsnetzwerkes (Reticulum functionale) führen. Dies ermöglicht einen dynamischen Stoffaustausch innerhalb des Zellverbandes mit niedermolekularen Substanzen (≤ 1000 Da; Ionen, Metabolite, second messenger).

Tabelle 1.1: Eigenschaften der Linsenepithelzellen

Gesicherte Merkmale der Linsenepithelzellen
Besitz von Na ⁺ /K ⁺ -ATPasen (3 Isoformen): pumpen Na ⁺ -Ionen ins Kammerwasser und K ⁺ -Ionen in die Zellen
Besitz von K ⁺ -Ionen Kanälen
Besitz von Aquaporinen
Aufrechterhaltung des Membranpotentials über Kaliumströme
Deutlich polarisiert mit apikaler Oberfläche (grenzt an Linsenkapsel) und basaler Oberfläche (Kontakt zu Linsenfasern), die sich strukturell und funktionell deutlich unterscheiden
Linsenepithelzellen sind in höherem Maße als andere Körperzellen UV-Licht ausgesetzt
Synthetisieren Glutathion und exprimieren Glutathion-Transporter
Enthalten hohe Konzentrationen von Taurin
Enthalten Telomerase (Reparatur von Chromosomenschäden nach Replikation)
Haben Phagozytose- und Endozytosefähigkeiten
Produzieren Kollagen IV und andere Bestandteile der Basalen Matrix (Linsenkapsel)
Haben spezifische Zell-Zell Kontakte zwischen Linsenepithelzellen und zwischen Linsenepithel- und Linsenfasern. Das mechanische feste und gleichzeitig flexible Linsenepithelium ist essentiell für eine gesunde Augenlinse.
Exprimieren in niedrigen Konzentrationen alphaB-Crystallin; dieses ist dort funktionell aktiv als Chaperon
Werden embryonal angelegt und bleiben in diesem morphologisch undifferenzierten Zustand bestehen
Zeigen keine klinisch beschriebenen maligne Transformationen → kein Krebs in der Linse
Bilden als Linsenstammzellen die Linsenfasern
Organisieren die Calcium-Ionen Homöostase für die gesamte Augenlinse; Störungen dieser homöostatischen Prozesse haben Trübungen der Linse zur Folge (erhöhte Na ⁺ -Ionen und Ca ²⁺ -Ionen Konzentrationen bei Katarakt).

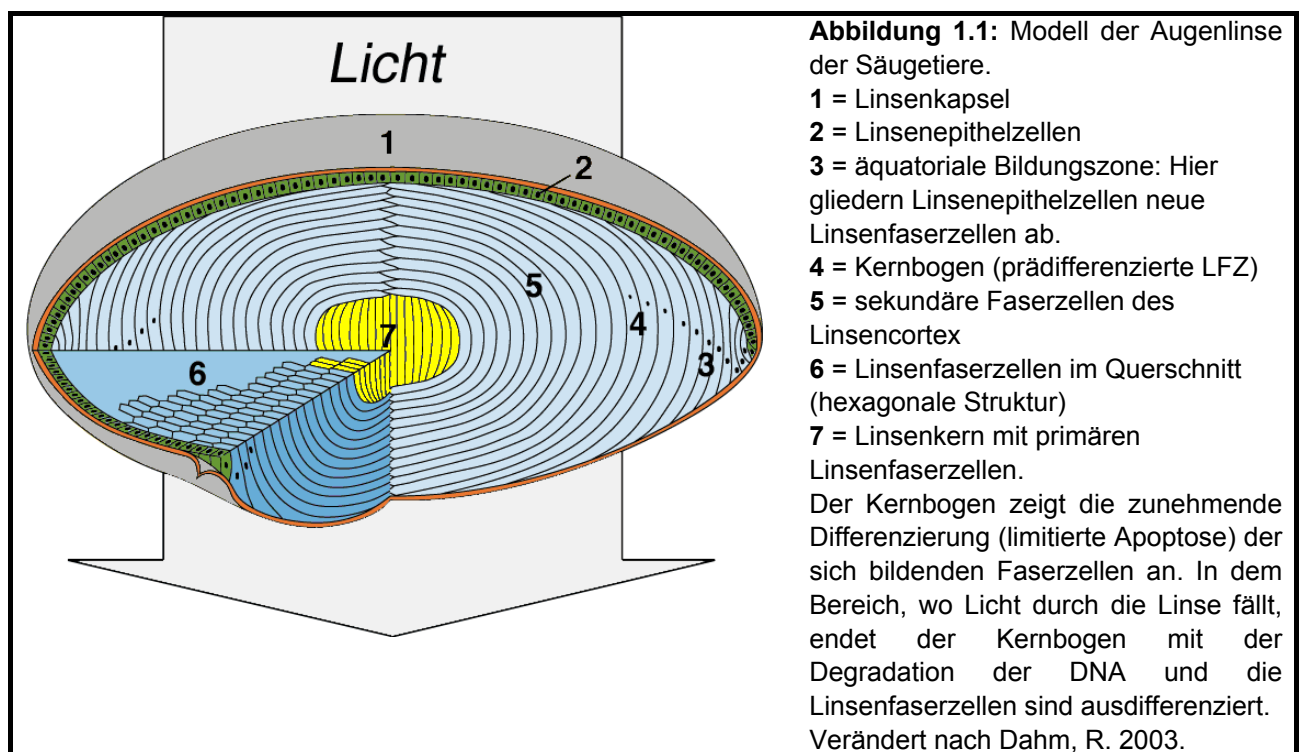
Daneben sind noch andere auf Stofftransport spezialisierte Membranproteine spezifisch in den Linsenfaserzellen nachgewiesen („fiber cell specific proteins“: MP26, ein Aquaporin und MP20) (Benedetti et al., 2000; Gu et al., 2003; Yang and Louis, 2000).

Ausdifferenzierte Linsenfaserzellen können mehr als einen Zentimeter lang werden, mit einem Durchmesser von nur 5 bis 10 Mikrometer. Die längsten Linsenfaserzellen ziehen dann durchgehend von der hinteren zur vorderen Linsenoberfläche. Je weiter man zum Linsenkern kommt, desto kompakter, kürzer und dünner werden die Linsenfaserzellen (Kuszak et al., 2004). Dabei sind die Linsenfaserzellen so hochgradig regulär und präzise angeordnet, dass man die Linse als "biologischen Kristalloid" bezeichnen kann (Dahm, 2003 & 2004) (**Abb. 1.1**). Diese Größenverhältnisse sind in den daraufhin untersuchten Arten relativ konstant gefunden wurden, was andeutet, dass speziesabhängige Unterschiede in der Größe der Augenlinse, in erster Linie eine Funktion der Anzahl von Faserzellschichten ist.

Vergleichbar der Schalenstruktur einer Zwiebel, bauen tausende solcher leicht spindelförmigen Faserzellen die Linse in konzentrischen Lagen auf und werden kontinuierlich zugebildet. Diese Faserzellen sind so regulär angeordnet, dass ihre Zellmembranen nahezu parallel zueinander und senkrecht zur optischen Achse (einfallende Lichtstrahlen) ausgerichtet sind. Einfallende Lichtstrahlen werden so nur minimal an den Zellgrenzen abgelenkt.

Diese hochreguläre Anordnung von Zellen in einem Organ ist eine seltene Ausnahme in der Biologie. Trotz des stark eingeschränkten Stoffwechsels der Augenlinse wird genügend metabolische Energie in allen Linsenzellen bereitgestellt, um dieses komplexe symmetrische Muster zeitlebens stabil zu halten und aus lebendigen Zellen aufzubauen.

In der gesunden Augenlinse werden die Linsenfaserzellen und der überwiegende Teil der Linsenepithelzellen nach ihrer Bildung nicht abgebaut oder ersetzt. Nur für eine kleine Population von Linsenepithelzellen wurde Apoptose nachgewiesen. Die übrigen Linsenzellen leiten keinen programmierten Zelltod ein. Das heisst, dass die Zellen der Augenlinse teilweise so alt sind wie der Organismus selbst und erst mit dessen Tod sterben.



Embryonal werden die Linsenepithelzellen und die ersten Linsenfaserzellen angelegt. Diese primären Linsenfaserzellen bilden den zentralen Linsenkern. Auf die primären Linsenfaserzellen werden, auch postnatal, ständig neue Schichten aus sekundären Linsenfaserzellen aufgelagert (**Box 1.1 und Abb. 1.2**). Während der kontinuierlichen Zubildung neuer Faserzellen werden die darunterliegenden Faserzellschichten weder abgebaut noch sterben sie. Demzufolge wächst die Augenlinse zeitlebens und nimmt stets an Volumen zu. Die Neubildungsrate und Zubildungsgeschwindigkeit von sekundären Linsenfaserzellen nimmt mit zunehmendem Alter ab.

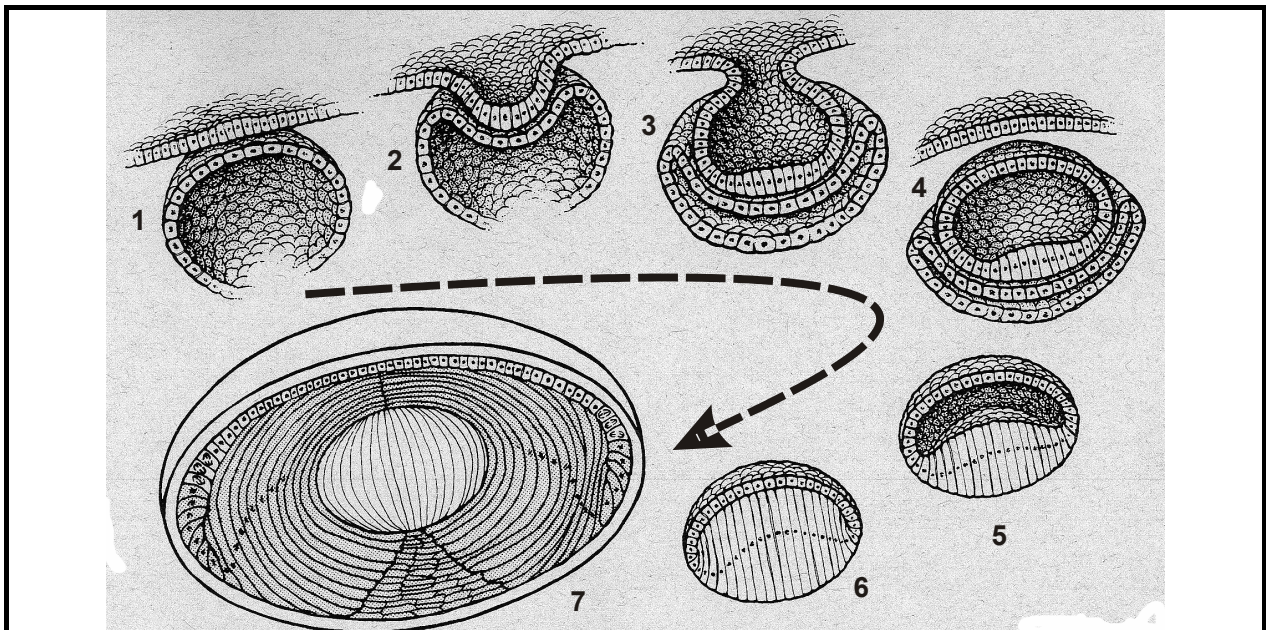


Abbildung 1.2: Schlüsselmomente bei der Embryogenese der Augenlinse der Säugetiere. Im Uhrzeigersinn, beginnend oben links. Eine Einstülpung des Oberflächenektoderms bildet eine Hohlkugel aus Stammzellen die subepithelial verlagert wird (1-3). Die Stammzellen am hinteren Pol dieser Hohlkugel verlängern sich bis zum vorderen Pol und bilden die primären Linsenfaserzellen (4-6). Auf diesen embryonalen Linsenkern werden von da an ständig sekundäre Linsenfaserzellen aufgelagert. Dies geschieht in der äquatorialen Bildungszone (7). Die Stammzellen am vorderen Linsenpol bleiben als Linsenepithelzellen zeitlebens erhalten und bilden die sekundären Linsenfaserzellen. Abgewandelt aus Principles and Practicles of Ophthalmology, 1994

Box 1.1

Linsenepithelzellen = undifferenzierte, noch sehr ursprüngliche (embryonal angelegte) Population von Linsen-Stammzellen

Primäre Linsenfaserzellen = embryonal angelegte, kernlose, völlig ausdifferenzierte Faserzellen des Linsenkerns; vital seit embryonaler Bildung

Sekundäre Linsenfaserzellen = kernlose, völlig ausdifferenzierte Faserzellen des Linsencortex; werden embryonal und postnatal kontinuierlich zugebildet, werden unterteilt in sekundäre Linsenfaserzellen der inneren und äußeren corticalen Schichten

Die Zellen der Augenlinse, im Besonderen die Linsenfaserzellen, sind hochgradig an die Transmission von Licht angepasst. Angefangen mit der Anordnung dieser Zellen, ihrer Erscheinungsform und Ultrastruktur (**Abb. 1.3**), bis hin zu deren Physiologie und molekularen Bestandteile. Dabei durchlaufen die Linsenfaserzellen zur Erlangung ihrer enormen Spezialisierung einen Differenzierungsprozess, der bei keinem anderen Zelltyp der mehrzelligen Tiere gefunden wird.

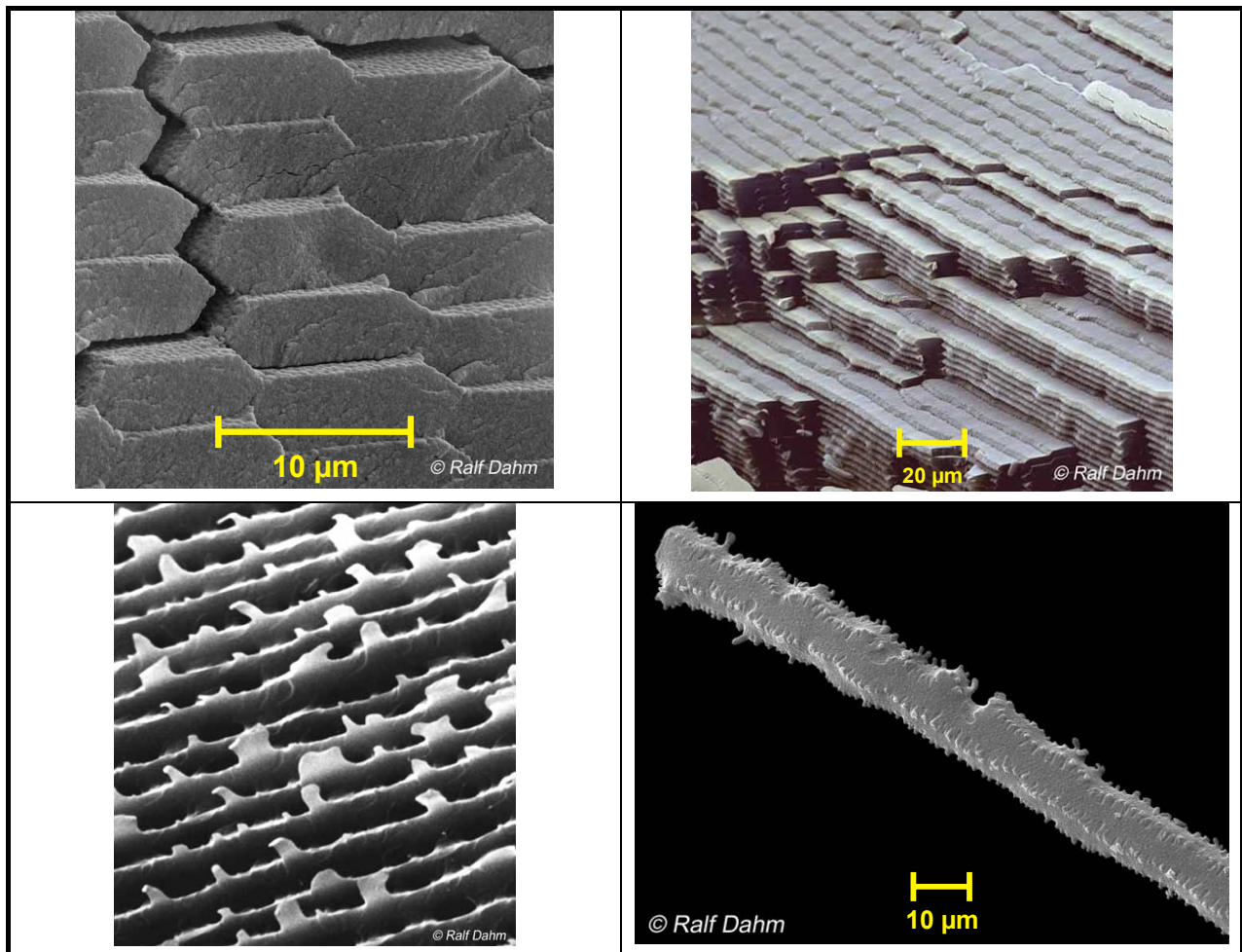


Abbildung 1.3: Cytologie der Augenlinse. Eine kristalloide Struktur. Linsenfaserzellen und deren Organisation im Zellverband (Rasterelektronenmikroskopie).

Oben links: Im Querschnitt sind Linsenfaserzellen abgeflacht sechseckig und bilden im Zellverband ein hochgradig reguläres hexagonales Wabenmuster aus. Diese hexagonale Struktur von Einzelkomponenten und ihre Anordnung in einem Wabenmuster gehört zu den stabilsten Konstruktionen in der Natur und erlaubt die größtmögliche Packungsdichte der Zellen. Die Linsenfaserzellen liegen so dicht aneinander, dass der Interzellularraum auf einen minimalen Spalt reduziert wird. So wird durchfallendes Licht nur minimal gestreut.

Oben rechts: die Linsenfaserzellen sind kristalloid entlang einer Orientierungsachse angeordnet.

Unten links: Die dichte Packung der Linsenfaserzellen wird durch eine extreme Verzahnung der Zellmembranen benachbarter Faserzellen stabilisiert. Wie ineinandergreifende Puzzleteile sind die Membranen durch kleine Ausbuchtungen miteinander verankert (Vrensen, 1995). Diese stabile Anordnung der Faserzellen und deren feste Verbindung untereinander, ist eine wichtige Voraussetzung für Stabilität während häufigen Formveränderungen. Bei der Akkommodation (Nah-Fernsicht-Anpassung) können sich so keine Faserzellen gegeneinander verschieben oder voneinander lösen. Würde dies geschehen, träten Spalträume auf, Licht würde zusätzlich gestreut und die Linse bekäme eine Trübung.

Unten rechts: Eine einzelne Linsenfaserzelle. Faserzellen können mehr als einen Zentimeter lang werden, bei einem Durchmesser von nur 5 – 10 Mikrometer. Die charakteristischen Membranausbuchtungen an den Kanten der Faserzelle werden deutlich. Solche Linsenfaserzellen bauen zu 90% die Augenlinse auf. Ihre hochgradige Differenzierung als Spezialisierung auf Transparenz, ist Grundlage für die optischen Eigenschaften der Augenlinse.

Verändert nach Dahm, Ralf 2003.

Während ihrer Entwicklung, leiten die prädifferentiierten Linsenfaserzellen ein Differenzierungsprogramm ein, das einem Beinahe-Selbstmord gleichkommt. Dieser Prozess wird als "**limitierte Apoptose**" bezeichnet. Er bewirkt, dass Linsenfaserzellen bis zu ihrer Ausdifferenzierung alle membranumgebenen Organellen und einen Großteil ihrer makromolekularen Komplexe aus dem Zellinneren eliminieren.

So werden das Endoplasmatische Reticulum, das Dictyosom (Golgi-Apparat), die Mitochondrien, die Ribosomen und die größeren Vesikel (Lysosomen, Peroxisomen usw.) schrittweise abgebaut. Der Zellkern bleibt am längsten erhalten, wird aber ebenfalls vollständig zerstört. Mit der Degradation der DNA und der Kernmembran verschwinden auch die übrigen Vesikel (Bassnett, 2002).

Im Weiteren werden in dem verbleibenden Grundplasma (Definition siehe **Box 1.2**) linsenspezifische Proteine, die Crystalline, in hohen Konzentrationen angereichert (während andere Proteine durch die limitierte Apoptose abgebaut werden). Aufgrund dessen kann der Proteingehalt 50% von der Gesamtzellmasse betragen und somit vier- bis achtmal so hoch sein wie in übrigen Körperzellen. Dazu kommt, dass der Wassergehalt in den Faserzellen deutlich verringert wird.

Die Crystalline sind sehr homogen in einer Faserzelle verteilt und über kurze Distanzen zu regulären Molekülkomplexen angeordnet. In Anpassung dazu, gleichen die Zellmembranen der Linsenfaserzellen ihren Brechungsindex dem hochviskosen Grundplasma an, so dass ein optisch dichtes Medium mit nahezu einheitlichem Brechungsindex entsteht (Dejong et al., 1994). Mit Ausnahme von Wasser bilden die Crystalline den Hauptanteil der Gesamtmasse der Augenlinse. Die Crystalline umfassen verschiedene Gruppen von Proteinen mit unterschiedlichen Eigenschaften und Anteilen, die sowohl speziesabhängig, als auch in unterschiedlichen Linsenschichten variieren. α -Crystallin (α A und α B) ist das Hauptprotein der Augenlinse, daneben existieren noch β -, γ - und δ -Crystalline.

Eine bedeutende Eigenschaft dieser eher kleinen Proteine (Crystalline haben Molekulargewichte im Bereich zwischen 20 und 40 kDa) ist ihre räumliche und zeitliche Stabilität. Sie denaturieren nicht und sind über Jahrzehnte stabil, auch unter kontinuierlichem physikalischem und chemischem Stress. Sie treten in hohen Konzentrationen auf und im Regelfall kristallisieren sie nicht, noch verklumpen sie. Crystalline schaffen einerseits ein optisch dichtes Grundplasma, wirken andererseits auch als molekulare Chaperone (Unterbindung der Denaturierung anderer Proteine), Protease Inhibitoren und haben Kinase-Aktivität. (Augusteyn and Stevens, 1998); (Bai et al., 2003); (Blundell et al., 1981).

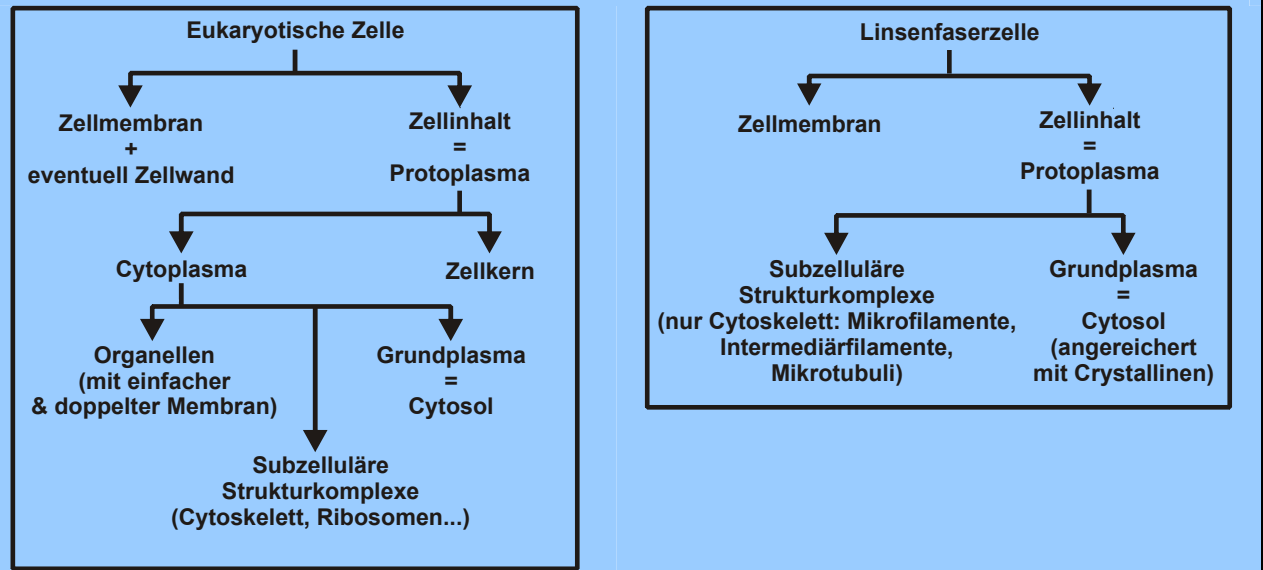
Nach einer Theorie von Steven Bassnett leiten die prädifferentiierten Linsenfaserzellen die limitierte Apoptose ein, wenn Sauerstoffmangel zu ineffizienter Mitochondrienleistung führt (Bassnett and Mataic, 1997). Alternativ wird ein sinkender pH Wert in Folge anaerober Glykolyse und steigender Lactatkonzentrationen als Triggersignal für den Start der limitierten Apoptose diskutiert (Bhat, 2001).

In die Umsetzung dieser limitierten Apoptose sind eine Vielzahl der bekannten Enzyme und Signalwege involviert, die ebenfalls bei der regulären Apoptose sterbender Zellen wirken. Jedoch konnte gezeigt werden, dass beim programmierten Zelltod, bei der Bildung von Erythrocyten (DNA-Degradation während der Erythropoese) und bei der limitierten Apoptose unterschiedliche Systeme zur Degradation der DNA verwendet werden (Nagata, 2005).

Kernlose, ausdifferenzierte Linsenfaserzellen weisen einen stark abgewandelten zellulären Grundbauplan, hinsichtlich ihrer elementaren strukturellen Organisation auf (**Box 1.2**).

Box 1.2

Einfacher Vergleich der zellulären Organisation von höheren eukaryotischen Zellen mit Linsenfaserzellen.



Die zellulären Komponenten sowie molekularen Bestandteile, die nach der limitierten Apoptose in den Faserzellen noch bestehen bleiben, scheinen elementar für Stabilität, Funktionalität und Vitalität über Jahrzehnte zu sein.

Das Cytoskelett ist als eine funktionelle Einheit die einzige subzelluläre, polymere Struktur, die in ausdifferenzierten Linsenfaserzellen noch vorhanden ist (Clark et al., 1999). Alle **drei** Teilsysteme des Cytoskeletts (F-Aktin-Mikrofilamente, Intermediär-Filamente, Mikrotubuli) kommen in Linsenfaserzellen vor, erfahren aber eine grundlegende Umstrukturierung während der limitierten Apoptose. So findet man in den äußeren Linsenfaserzellen cytoskelettale Proteine, die dann in den inneren Linsenfaserzellschichten fehlen (Clark et al., 1999). Das F-Aktin-Mikrofilamentsystem wird als wichtige Voraussetzung für Stabilität des Linsenepitheliums während der Formveränderung der Augenlinse und während der Verlängerung sich bildender Faserzellen angesehen (Kivela and Uusitalo, 1998). Mikrotubuli wurden bisher nur in den prä-differenzierten Linsenfaserzellen nachgewiesen (Millar et al., 1997).

Neben Vimentin und anderen verbreiteten Intermediär-Filamenten existieren in den Faserzellen der Augenlinse spezifische Intermediär-Filamente, die bisher nur dort nachgewiesen wurden (Sandilands et al., 1997). Es handelt sich hierbei um die so genannten „beaded filaments“ die den Hauptanteil der Cytoskelett-Elemente in Linsenfaserzellen darstellen. Dies sind Filamente mit 5 – 8 nm Durchmesser die periodisch angeordnete globuläre Komplexe aufweisen. Das Filamentrückgrat dieser perlschnurartigen Proteinpolymere bilden zwei Strukturproteine (Filensin und Phakinin). Phakinin (auch CP49) und Filensin bilden nur in Kombination Proteinfilamente über einen spezifischen Co-Assemblierungs-Prozess aus. Den "beaded filaments" wird eine Schlüsselrolle bei der Organisation und Aufrechterhaltung der Faserzellarchitektur und damit der konstanten Gewährleistung der optischen Eigenschaften der Augenlinse zugeschrieben (Perng and Quinlan, 2005).

Es wird postuliert, dass die Elemente des Cytoskeletts in den Linsenfasern mit den Crystallinen funktionell gekoppelt sind. So sollen z.B. die globulären Komplexe der "beaded filaments" Crystallin-Aggregate sein. Ebenso wird dem Cytoskelett eine wichtige Rolle bei der Verteilung des Crystallins und konzentrierten, optisch homogenen Anordnung im Grundplasma der Linsenfasern zugeteilt (Kivela and Uusitalo, 1998).

Das Fehlen von DNA und Ribosomen in ausdifferenzierten Linsenfasern lässt auch keine Protein- und Biomakromolekülsynthese mehr zu. So ist eine kontinuierliche Neusynthese von Proteinen nicht mehr möglich, was auch eine Reparatursynthese ausschließt und eine sehr geringe Regenerationsfähigkeit zur Folge hat. Diese starke Differenzierung und Anpassung führt dazu, dass die Linse nur in einem engen Bereich, nahe einem Optimum, auf Störungen reagieren kann. Sind diese Störungen zu groß kommt es zu charakteristischen pathogenen Trübungen der Augenlinse. Intensive UV- u. Wärmebestrahlung über längere Zeiträume, freie O₂-Radikale (oxidativer Stress), Flüssigkeitsmangel über mehrere Wochen, Diabetes mellitus und erhöhter Blutzuckerspiegel können zu einer Trübung der Linse führen (Kyselova et al., 2004). Kleine, intrazelluläre Defekte können sich über die Zeit in Fasern anhäufen und dann zu altersabhängigen Linsentrübungen führen (Altersstar, Katarakt).

In Anbetracht ihrer langen Lebensdauer muss hier noch daraufhin gewiesen werden, dass für die Zellen der Augenlinse keine malignen Transformationen oder Tumorbildungen beschrieben sind. Dies deutet an, dass Linsenfasern nicht durch unkontrollierte mitotische Zellteilungen bzw. durch einen gestörten Zellzyklus entarten. Für die Linsenfasern ist dies verständlich ohne Zellkern und Makromolekül-Syntheseapparat, ohne Blutversorgung und mit stark eingeschränktem Stoffwechsel. Für die Linsenepithelzellen ist dieses Phänomen jedoch höchst ungewöhnlich. Sie besitzen die Organellen und den vollständigen Biosynthese-Apparat wie andere Körperzellen auch, sind über Jahrzehnte mitotisch aktiv (Neubildung von Linsenfasern), werden direkt vom Kammerwasser umspült und sind beispielsweise UV-Licht länger und intensiver ausgesetzt als andere Körperzellen.

Selbst bei genetischen Erkrankungen wie Xeroderma pigmentosum, bei denen nach UV-Schädigung keine DNA-Reparatur mehr stattfindet, weisen Linsenepithelzellen keine malignen Transformationen auf (Jung, 1986).

Interessanterweise ist auch das invasive Einwachsen, von im Auge auftretenden Tumoren in die Augenlinse so selten, dass es darüber keine eindeutigen Berichte gibt. Es scheint eine wirksame Grenze zu existieren, die eine Invasion von linsenfremden Zellen in die Linse hinein unterbindet. Diese Grenzfunktion wird ebenfalls als maßgebend für die fehlende Vaskularisierung und nervale Innervation betrachtet und der Linsenkapsel als mechano-chemischer Barriere zugeschrieben (Stafford, 2001).

2 Zielstellung dieser Diplomarbeit

In Anpassung an die Funktion als Licht leitendes, Licht brechendes und Licht fokussierendes optisches Organ, hat sich die Augenlinse im Laufe ihrer evolutiven Entwicklung hochgradig spezialisiert. Unter diesem Gesichtspunkt werden in der vorliegenden Diplomarbeit einerseits Linsenepithelzellen hinsichtlich ihres Verhaltens gegenüber transformierten Zellen in Zellkultur untersucht. Andererseits wird die Umstrukturierung des Cytoskeletts in undifferenzierten Linsenepithelzellen, teildifferenzierten Linsenepithelzellen (Lentoide) sowie Linsenfaserzellen im Kontext der limitierten Apoptose wissenschaftlich erörtert.

Für die Experimente wird als biologisches Modell die Augenlinse des Hausschweins (*Sus scrofa domesticus*) verwendet.

Einleitend soll die Augenlinse unter einfachen experimentellen Bedingungen desintegriert werden. Hierbei gilt es Linsenepithelzellen und Linsenfaserzellen aus ihrem komplexen Gewebeverband herauszulösen um sie für weitere Untersuchungen experimentell zugänglich zu machen.

Die Linsenepithelzellen sollen direkt in Primärkultur gebracht werden um ihre morphologischen Eigenschaften und ihr Wachstum zu untersuchen. Hierbei ist von Interesse, ob die Linsenepithelzellen in der Zellkultur spontan nachweisbare Teildifferenzierungen in Richtung Linsenfaserzellen einleiten (ohne Stimulation mit Wachstumsfaktoren).

Die Linsenfaserzellen sollen strukturerhaltend fixiert werden, um ihre cytoskelettalen Teilsysteme morphologisch zu charakterisieren.

In zwei Telexperimenten gilt es Ergebnisse im Bezug auf das fehlende invasive Einwachsen von (1.) unkontrolliert wachsenden Tumorzellen und (2.) Kapillarendothelzellen (fehlende Vaskularisierung) in die Augenlinse zu finden. Obwohl der Linsenkapsel als mechano-chemischer Barriere die Hauptfunktion bei der Aufrechterhaltung der Grenz Wirkung zugesprochen wird, ist es hypothetisch wahrscheinlich, dass die Linsenzellen auch einen Beitrag zu dieser Wirkung leisten. Sie grenzen schließlich direkt an die dünne Bindegewebmatrix der Linsenkapsel.

Unter diesem Gesichtspunkt wird die Etablierung zweier unabhängiger Co-Kultur-Systeme angestrebt, in der einerseits Linsenepithelzellen gemeinsam mit Leukämiezellen (unkontrolliertes Wachstum) und andererseits gemeinsam mit microvaskulären Endothelzellen (Angioneogenese¹) kultiviert werden. Es ist die Frage zu klären, ob lichtmikroskopisch bestimmte Interaktionen zwischen beiden Zellarten nachweisbar sind, die auf eine gegenseitige Beeinflussung durch Kontaktrepulsion (Zelloberflächenproteine) und / oder Chemorepulsion (Gradienten diffusibler Substanzen) hindeuten.

¹**Angioneogenese** = Gefäßneubildung. Das Einwachsen von Kapillaren und Blutgefäßen in Gewebe, beginnend mit dem Einwandern von Endothelzellen.

Das Cytoskelett^{II} als funktionelle zelluläre Einheit wird durch die limitierte Apoptose der Linsenfaserzellen nicht abgebaut. Es findet zwar eine grundlegende Umstrukturierung statt, aber in ausdifferenzierten Linsenfaserzellen sind noch alle drei Teilsysteme des Cytoskeletts vorhanden.

II Cytoskelett: funktionelles System einer jeden eukaryotischen Zelle, bestehend aus **drei** Teilsystemen unterschiedlicher polymerer, filamentöser Proteinkomplexe – den F-Aktin-Mikrofilamenten, den Intermediär-Filamenten und den Mikrotubuli. Die filamentösen Proteinkomplexe sind aus Protofilamenten aufgebaut, die wiederum aus monomeren und dimeren Strukturproteinen bestehen. Das Cytoskelett der eukaryotischen Zellen hat zentrale elementare Bedeutung für Morphogenese, Zellbewegung, Zellteilung, Proliferation, Zelldifferenzierung und Zelltod. Darüber hinaus ist es essentiell für die Interaktion der Zelle mit der Extrazellulären Matrix und ihrer Umgebung (Geiger et al., 2001).

Unter der Prämisse, dass die Strukturproteine des Cytoskeletts eine elementare funktionelle Voraussetzung für die Stabilität von Linsenfaserzellen, bei gleichzeitiger Flexibilität und Dynamik, haben, soll die Struktur deren Cytoskelett untersucht werden. Dabei stehen das mikrotubuläre Cytoskelett und die F-Aktin-Mikrofilamente im Vordergrund. Sie bilden ein funktionelles Kontinuum und haben neben einer morphogenetischen Funktion in Faserzellen womöglich auch eine Rolle beim Stofftransport und der homogenen Organisation des Grundplasmas. Dafür wäre ein funktionierendes intrazelluläres Transportsystem notwendig. Um dies zu klären wird das Verteilungsmuster des an Mikrotubuli funktionell gebundenen Motorproteins Kinesin ebenfalls untersucht.

Mittels Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie sollen entsprechende Resultate diesbezüglich erarbeitet werden (subzelluläre Struktur und Verteilungsmuster).

Um eine eventuelle Umstrukturierung in den Linsenfaserzellen deutlich zu veranschaulichen, werden auch die in Primärkultur wachsenden Linsenepithelzellen sowie möglicherweise auftretende Differenzierungsformen in die Untersuchungen zum Cytoskelett mit einbezogen.

Im Zusammenhang mit dem mikrotubulären Cytoskelett wird angestrebt, Hinweise auf Vorhandensein und Lage eines Mikrotubulus organisierenden Zentrums^{III} (MTOCs) in Linsenfaserzellen zu finden. Bis zum Beginn dieser Arbeit herrschte noch weitestgehend Unklarheit darüber, was mit dem übergeordneten Bildungszentrum für die Mikrotubuli während der limitierten Apoptose geschieht. In der Literatur ist bisher für Linsenfaserzellen noch kein Mikrotubulus Organisationszentrum beschrieben. Über spezifische Antikörper gegen γ -Tubulin soll das MTOC in Linsenfaserzellen experimentell nachgewiesen werden.

Um eventuelle morphologische Veränderungen der gamma-Tubulin Verteilung bzw. einen Abbau des MTOC in Linsenfaserzellen nachvollziehen zu können, werden ebenfalls Linsenepithelzellen in Zellkultur und eventuell dort auftretende Differenzierungsformen auf die Lage des MTOCs hin untersucht.

III Mikrotubulus Organisationszentrum = MTOC (microtubule organizing center): im Grundmuster der eukaryotischen Zellen der Ausgangspunkt für die Polymerisation von Mikrotubuli. Die Minus-Enden der Mikrotubuli sind am MTOC lokalisiert. Eine Isoform des Tubulins, das gamma-Tubulin, bildet im Komplex mit anderen Proteinen einen Nukleationskeim für polymerisierende Mikrotubuli (bindet alpha-Tubulin). Gamma-Tubulin wurde in nahezu allen daraufhin untersuchten tierischen und pflanzlichen Zellen nachgewiesen. Das MTOC tritt bei Säugerzellen häufig in direkter Umgebung zum Zellkern auf, wird während der Mitose verdoppelt und bildet die Spindelpole der Teilungsspindel. Das MTOC ist elementar für Funktion und Dynamik des Mikrotubulus-Netzwerkes sowie für den gerichteten intrazellulären Transport.

Um einen Eindruck von der Organisation der Linsenepithelzellen und Linsenfaserzellen im Zellverband zu gewinnen, sowie um dort die cytoskelettale Architektur zu untersuchen, ist es geplant, dünne Gewebeschnitte von der Augenlinse anzufertigen. Dazu werden Linsen physikalisch fixiert (Kryoimmobilisierung = Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff). Dies ermöglicht einen experimentellen Zugang unter anderen Fixierungsbedingungen.

Im Rahmen von Voruntersuchungen für Ursachen der langen Proteinstabilität, ist es geplant, lösliche cytosolische Proteine sowie die in Komplexen bzw. an die Zellmembran gebundenen Proteine aus Linsenfaserzellen zu isolieren. Hierbei soll geklärt werden, ob Strukturproteine des Cytoskeletts in den Fraktionen der isolierten Proteine nachzuweisen sind.

Dabei ist auch von Interesse, ob bestimmte Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) sowie das Motorprotein Kinesin in den isolierten Proteinfractionen zu finden sind.

Solche assoziierten Proteine sind an der Aufrechterhaltung von Dynamik und Stabilität der Mikrotubuli, sowie dem gerichteten intrazellulären Transport stets beteiligt. Für ausdifferenzierte Linsenfaserzellen sind hier besonders spezifische Proteine zu erwarten.

In dieser Arbeit stehen die morphogenetische Funktion des Cytoskeletts sowie einzelne Aspekte des Verhaltens von Linsenepithelzellen in Zellkultur im Vordergrund. Die morphologischen Untersuchungen werden bis auf die Ebene von Makromolekülkomplexen ausgeweitet. Die evolutionär entstandenen, hochgradig angepassten zellbiologischen Eigenschaften der Augenlinse sind nur zu verstehen, wenn Struktur und Funktion im Zusammenhang betrachtet werden.

3 Material und Methoden

3.1 Biologische Materialien

Für die durchgeführten Experimente und Untersuchungen wurden ausschließlich Augenlinsen (Lens crystallina) des Hausschweins (*Sus scrofa domesticus*) verwendet. Die Tiere waren zwischen sechs Monaten und einem Jahr alt und galten damit als adult. Die Augenlinse des Hausschweins diente als generelles Modell für die Augenlinse der Säugetiere.

Dazu wurden die Augen, für die Präparation der Augenlinsen, von einem Schlachthof (Uta Voigt Vieh- und Fleischhandel Schlachthof Jena, Löbstedter Str. 4, 07749 Jena) geholt.

Die verwendeten Schweineaugen wurden sofort nach dem Tod der Tiere entnommen und in einer temperierten Thermobox in das Institut transportiert. Je nach Experiment war die Thermobox gekühlt (4 - 6 °C) oder vorgewärmt (30 – 37 °C).

Von der Entnahme der Augen aus dem Tier bis zur Präparation der Augenlinse und Überführung dieser in Puffermedium verging maximal 1 Stunde.

Für die folgenden Experimente wurden Zellen der isolierten Augenlinse oder die Augenlinse als Ganzes genutzt.

Weiterhin wurden noch folgende Zelllinien für begleitende Untersuchungen verwendet:

Tabelle 3.1: Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Ursprungsspezies	Zellkulturmedium
MRC-5	adhärente, primäre Fibroblasten; Wildtyp	Human, embryonal	MEM + 10% FKS
HMEC-1	adhärente mikrovasculäre Endothelzellen; immortalisierte Zelllinie	Human	Endothelialmedium + Supplementmix
K-562	große, runde Blutkrebszellen CML chronische myeloische Leukämie; wachsen nicht-adhärent in Suspension	Human	RPMI 1640 + 20% FKS

3.2 Präparation der Augenlinsen

- Die Schweineaugen wurden aus der Thermobox entnommen, kurz desinfiziert (70% Ethanol für 5 sec) und präpariert.

Unter sterilen Bedingungen (steriles Präparierbesteck) wurde das Auge wie folgt eröffnet: (Die Präparation erfolgte bei Raumtemperatur (RT) und dauerte weniger als 2 min.)

- ½ cm nach dem Übergang der Hornhaut (Cornea) in die Lederhaut (Sklera) wurde die Sklera mit einem sterilen Skalpell seitlich eröffnet. Der Schnitt wurde so tief gesetzt, dass das Augeninnere mit dem Glaskörper zugänglich war (Primärschnitt).
- Mit einer sterilen Schere wurde der Primärschnitt zirkulär verlängert, bis man den vorderen Teil des Auges (mit Cornea, Iris, Corpus ciliare, Lens crystallina) abheben konnte (Sekundärschnitt) und das Auge vollständig eröffnet war.
- Die Augenlinse wurde nun mit sterilen Pinzetten (abgerundet, nicht spitz oder scharfkantig) von den Zonularfasern (Fibrae zonulares) vorsichtig abgelöst.

- Mit einer sterilen, abgewinkelten und abgerundeten Pinzette wurde die Augenlinse entnommen, gegebenenfalls von restlichem Gewebe (Glaskörper) befreit und sofort in temperiertes Puffermedium (2 °C oder 37 °C, je nach Experiment) überführt.
- Vor den jeweiligen Experimenten erfolgte in jedem Fall die Entfernung der Linsenkapsel (Capsula lentis). Dabei wurde die Linsenkapsel (Capsula lentis) bei RT durch Mikrosektion von dem zellulären Teil der Linse abgetrennt. Dies geschah durch Eröffnung der Linsenkapsel mit einem feinen Schnitt an einer Seite des Linsenäquators. Durch leichten Druck auf das gegenüberliegende intakte Ende der Linsenkapsel trat die innere, zelluläre Masse der Linsenzellen hervor. Diese behielt noch immer die ellipsoide Form der Augenlinse bei und wurde für die folgenden Experimente verwendet.

3.3 Desintegration der Augenlinse

Die Augenlinsen wurden nach Entfernung der Linsenkapsel (Capsula lentis) in eine sterile Trypsinlösung überführt, um die Zell-Zellkontakte der Linsenepithelzellen (LEZ) und Linsenfaserzellen (LFZ) proteolytisch aufzuspalten. So war es möglich die Zellen der Augenlinse aus ihrem Zellverbund herauszulösen. Alle verwendeten Pufferlösungen, die mit nativen, unfixierten Linsenepithel- und Linsenfaserzellen in Kontakt kamen, enthielten keine Ca^{2+} -Ionen. Es ist bekannt, dass nur minimal erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen zur Destabilisierung und Destrukturierung des Cytoskeletts in Zellen der Augenlinse (Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Proteasen) führen. Artificielle Verformungen der Linsenfaserzellen sind die Folge (Marcantonio, 1996; Siew and Bettelheim, 1996; Wang et al., 2001).

3.3.1 Isolation von Linsenepithelzellen (LEZ) für die Zellkultur

- 1 bis 2 Augenlinsen wurden in sterilen 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 10 ml vorgewärmter Trypsin / EDTA-Lösung (0,25% / 0,02%) für 8 min inkubiert; 37 °C im Wasserbad
- Die trypsinisierten Augenlinsen wurden dann 2 x kurz mit sterilem PBS (37 °C) gewaschen.
- Die Vereinzelnung der LEZ erfolgte in 12 ml PBS / Glucose (1 g/l) in sterilen 50 ml Zentrifugenröhrchen. Dazu wurden die Augenlinsen für 15 min auf einem Rotamixer sanft bewegt; bei RT
- Anschließend wurden die Augenlinsen unter sterilen Bedingungen aus dem 50 ml Röhrchen entnommen und verworfen.
- Die vereinzelteten Linsenepithelzellen (LEZ) wurden durch Zentrifugation gesammelt; 4 min bei 800 rpm / 122 g (Tischzentrifuge); RT
- Der Puffer-Überstand wurde mit einer sterilen Pipette entnommen und verworfen. Das Zellpellet wurde in 2 ml vorgewärmten Zellkulturmedium (37 °C) resuspendiert und in die Zellkulturschalen überführt (siehe unten, Abschnitt 3.5 Zellkultur).

3.3.2 Isolation von Linsenfaserzellen für Immuncytochemie und Elektronenmikroskopie

- 1 bis 2 Augenlinsen wurden in sterilen 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 10 ml vorgewärmter Trypsin / EDTA-Lösung (0,25% / 0,02%) inkubiert; für 12 min bei 37 °C
- Alle 4 min wurde mit einer 1 ml Pipette die Trypsinlösung durch auf- und abpipettieren durchmischt.

- Danach wurden die trypsinisierten Augenlinsen 2-mal mit 1x PBS (37 °C) gewaschen und in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 12 ml PBS / Glucose (1 g/l) überführt.
- Die Vereinzelung der Linsenfaserzellen (LFZ) erfolgte für 15 – 18 min bei Raumtemperatur auf einem Rotamixer ↪ Linsenfaserzellpakete (LFZ-Pakete) lösen sich aus ihrem Zellverbund.
- Die Augenlinsen wurden aus dem 50 ml Röhrchen entfernt und die herausgelösten LFZ-Pakete für weitere Untersuchungen in einem Nylon-Zellsieb (40 µm Porengröße) gesammelt.
- Danach erfolgte 2-maliges Spülen mit 1x PBS (37 °C).
- Die LFZ-Pakete wurden anschließend sofort fixiert (siehe unten).
 - Zur Stabilisierung der Mikrotubuli während der Vereinzelung von LFZ-Paketen wurde dem PBS / Glucose-Puffer Taxol (Paclitaxel, 16 µM) zugesetzt.
 - 1x PBS / Glucose Puffer enthielt stets 1 g/l D-Glucose

Trypsin / EDTA-Lösung: 0,25% Trypsin + 0,02% EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) in 1x PBS (ohne Ca²⁺, Mg²⁺)

3.4 Vitalitätsnachweise – Lebendmarkierung von Zellen

Mittels Fluorescein Diacetat (FDA) – Nachweis lebender Zellen

Fluorescein Diacetat (FDA) wird von lebenden Zellen mit intakter Zellmembran aufgenommen und von membrangebundenen und intrazellulären Esterasen in Acetat und Fluorescein gespalten. Das Fluorescein akkumuliert in Zellen mit intakten Membranen und Enzymen. Lebende Zellen leuchten stark grün im Anregungslicht.

- FDA-Stammlösung: 1 – 4 mg / ml FDA wurden in Aceton gelöst. Die Lösung wurde immer wieder frisch hergestellt um Zerfallsprozesse und spontane Eigenfluoreszenz zu vermeiden.
- Endkonzentration: 1 – 4 µg / ml Pufferlösung (1x PBS / Glucose).
- Die Augenlinsen wurden wie oben beschrieben präpariert, trypsinisiert und für die Zellvereinzelung vorbereitet. Die Zellvereinzelung wurde gestartet. 10 min vor Beendigung der Vereinzelung durch den Rotamixer wurden 12 µl FDA-Stammlösung in die 12 ml Pufferlösung zugegeben.
- Nach der Zellvereinzelung wurden die Linsenepithelzellen und Linsenfaserzellen bei Raumtemperatur auf Objektträger übertragen und sofort an einem Fluoreszenzmikroskop (100fach vergrößert) ausgewertet.
- Inkubationszeit der Zellen mit FDA: 10 – 20 min bei RT
- Als Kontrollen dienen:
 - (1) Nur PBS / Glucose (1 g/l) + FDA (2µg/ml); 20 min Inkubation bei RT
 - (2) tote Zellen in PBS / Glucose (1 g/l) + FDA (2 µg/ml); 20 min Inkubation bei RT
 - (3) Linsenepithelzell-Primärkultur in PBS + FDA (2µg/ml); 20 min Inkubation bei RT

Fluorescein Diacetat (FDA):

= Spiro(isobenzofuran-1(3H),9'-(9H)-xanthen)-3-one, 3',6'-bis(acetyloxy)- = 3,6-Diacetoxyfluoran

Formel: C₂₄H₁₆O₇

Molekulargewicht: 416,39 g/mol

Mittels Trypanblau – Nachweis intakter Zellmembranen

Trypanblau ist ein saurer Farbstoff dessen Anion an Zellproteine bindet. Das Trypanblau dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Cytosol und färbt diese Zellen tiefblau. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop leuchtend hell.

- Trypanblau-Stammlösung: 0,5% Trypanblau in physiologischer Kochsalzlösung
- Endkonzentration: 0,05% in 1x PBS
- Die Zellvereinzelung wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die Linsenepithelzellen und die Linsenfaserzell-Pakete wurden 2-mal bei RT mit 1x PBS gewaschen.
- Inkubation der Zellen für 5 min in 0,05% Trypanblau-Lösung (0,05% Trypanblau in 1x PBS); Raumtemperatur
- Sofortige Auswertung unter dem Lichtmikroskop (100fache vergrößert) → lebende Zellen schließen den Farbstoff aus, so dass sie sich als helle, ungefärbte Zellen von der umgebenden blauen Lösung abheben. Tote Zellen färben sich tiefblau.

Trypanblau:Formel: $C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$

Molekulargewicht: 960, 81 g/mol

3.5 Zellkultur

3.5.1 Zellkultur der Linsenepithelzellen (LEZ)

Es wurden immer Primärkulturen angelegt und für alle Experimente an den Linsenepithelzellen und Lentoiden verwendet. Die Arbeiten zur Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank (Laminar Flow) durchgeführt.

Nach der Zellvereinzelung wurden die Zellen entweder in unbeschichteten Zellkulturschalen ($\varnothing = 60$ mm) oder Deckglaskammern bestehend aus 2 Kammern ($A = 4,2$ cm²; 2 ml Volumen) kultiviert.

- 0,5 ml der in Zellkulturmedium (37 °C) resuspendierten LEZ wurden in sterile Zellkulturschalen mit 5 ml Zellkulturmedium (37 °C) überführt.
- 0,1 ml der in Zellkulturmedium (37 °C) resuspendierten LEZ wurden in sterile Deckglaskammern mit 1 ml Zellkulturmedium (37 °C) je Kammer überführt.
- Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂.
- Der erste Mediumswechsel erfolgte einen Tag nach dem Ansetzen der Primärkultur (LEZ benötigen ca. einen Tag zur Adhäsion) und dann jeweils 2-mal wöchentlich (Montag und Freitag). Dabei wurde immer unter sterilen Bedingungen das alte Medium abgenommen und durch neues ersetzt: 5 ml für Zellkulturschalen, 1 ml für je eine Kammer einer Deckglaskammer.
- Die Kontrolle des Zellwachstums, der Morphologie sowie der Differenzierung erfolgte täglich an einem Lichtmikroskop im Phasenkontrast (10x Objektiv).

Die Primärkulturen der Linsenepithelzellen wurden in folgenden Medien kultiviert:**(1)** 1x RPMI 1640 + 0,5% Mercaptoethanol + 1% Penicillin-Streptomycin-Mix (Vollmedium)**(2)** 1x RPMI 1640 + 10% FKS + 0,5% Mercaptoethanol + 1% Penicillin-Streptomycin-Mix (Vollmedium)**(3)** 1x MEM + 10% FKS + 1% Penicillin-Streptomycin-Mix + 1% stabiles Glutamin (0,2 M) (Minimalmed.)

FKS: steriles fetales Kälberserum – fetales Rinderserum; Proteingehalt: 3,0 – 4,5 mg/dl

3.5.2 Co-Kultur von Linseneithelzellen mit K-562 Leukämiezellen

Als Ausgangspunkt dienten Primärkulturen von Linseneithelzellen (LEZ), die ca. 1 bis 2 Wochen kultiviert wurden und mit der Teildifferenzierung begonnen hatten. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden die LEZ in folgendem Vollmedium kultiviert:

→ RPMI 1640 Zellkulturmedium + 10% FKS + 1% Penicillin-Streptomycin-Mix; im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂.

Zu der LEZ-Primärkultur wurde eine definierte Menge ($1 \cdot 10^4$ Zellen pro ml) von K-562 Leukämiezellen zugegeben.

Die Kultivierung erfolgte nun in RPMI 1640 Zellkulturmedium + 20% FKS + 1% Penicillin-Streptomycin-Mix + 1% MEM Non Essential Amino Acids. Die Linseneithelzellen wurden 4 Stunden vor dem Start der Co-Kultur mit diesem Medium überschichtet. Der Tag, an dem die K-562 Zelllinie zu der LEZ-Primärkultur zugesetzt wurde, galt als Tag 0 und Start der Co-Kultur. Nun wurde jeden Tag zur gleichen Zeit die Zellzahl der K-562 Blutkrebszellen durch Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Co-Kultur wurde ohne Mediumwechsel für 9 Tage durchgeführt.

Des Weiteren wurde 1 Kontrolle angesetzt, in der nur K-562 Leukämiezellen kultiviert wurden. Die K-562 Leukämiezellen haben eine Verdopplungszeit von durchschnittlich 20 Stunden.

Die Wachstumskontrolle erfolgte bei 100facher Vergrößerung an einem Lichtmikroskop im Phasenkontrast und die Zellzählung an einem Lichtmikroskop im Hellfeld (10x Objektiv).

Zellkulturmedium für die Co-Kultur von Linseneithelzellen mit K-562 Leukämiezellen:

RPMI 1640 Vollmedium + 20% FKS + 1% Penicillin-Streptomycin-Mix + 1% MEM Non Essential Amino Acids

3.5.3 Co-Kultur von Linseneithelzellen mit Endothelzellen (HMEC-1)

Unter sterilen Bedingungen wurde in eine Zellkulturschale ($\varnothing = 60$ mm) ein flexibler Silikoneinsatz (flexiPERM) mit haftender Unterseite eingepasst. Dies ermöglichte eine Parallelkultivierung und Paralleluntersuchung der Linseneithelzellen (LEZ) und Endothelzellen (HMEC-1). So war die Zellkulturschale in 2 Kultivierungseinheiten (Kammern) unterteilt. In die eine Kammer wurde je 1 ml RPMI 1640 + 10% FKS + 0,5% Mercaptoethanol + 1% Penicillin-Streptomycin-Mix gegeben und dazu Linseneithelzellen (nach der Isolation). In die andere gegenüberliegende Kammer kamen die Endothelzellen in je 1 ml Endothelialmedium.

Die beiden Zelllinien wurden am gleichen Tag, zur selben Zeit in die entsprechenden Kammern eingesät (Tag 0 und Start der Co-Kultur).

Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂.

Nach dem die Zellen so dicht gewachsen waren, dass sie den Boden einer Kultivierungseinheit vollständig bedeckten (nach ca. 1 – 2 Tagen im Brutschrank), wurde der Silikoneinsatz entfernt und die Zellen komplett in Endothelialmedium weiterkultiviert.

Nun wurde das Wachstum und die gegenseitige Annäherung der beiden Zellarten beobachtet. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 4 Tage. Das Wachstum wurde täglich im Lichtmikroskop kontrolliert (10x Objektiv).

Zellkulturmedium für die Co-Kultur von Linsenepithelzellen mit HMEC-1 Endothelzellen:

Endothelial Cell Growth Medium MV = Grundmedium + Supplementmix

3.5.4 Mikroskopische Auswertung der Primär- und Co-Kulturen

Mikroskop – Gerätetyp	Objektiv und Lichteigenschaften	Anwendung
Olympus CK40	10x Objektiv (A10PL) Phasenkontrast	Kontrolle des Zellwachstums, der Morphologie & der Teildifferenzierung
Zeiss AxioLab	10x Objektiv (Plan-Neofluar 10x) Durchlicht	Zellzählung (Co-Kultur)
Zeiss Axiovert 135 TV Kamera: SPOT Insight Software: SPOT Advanced 4.0.5	10x Objektiv (Plan-Neofluar 10x) Hellfeld / Differentieller Interferenzkontrast	Aufnahmen der Primär- & Co- Kulturen für Beschreibung von Wachstum, Morphologie & Teildifferenzierung

→ Eine Nachbearbeitung der Bilder erfolgte in Adobe Photoshop hinsichtlich einer Kontrast- und Helligkeitsverbesserung und in CorelDRAW um Maßbalken und Schriftzüge einzufügen.

3.6 Immuncytochemie und Immunofluoreszenz

F-Aktin wurde über das Pilzgift Phalloidin detektiert, welches spezifisch an polymeres und oligomeres F-Aktin bindet. An das Phalloidin war ein Fluoreszenzfarbstoff (Phalloidin-FITC Konjugat) gekoppelt.

Zur Darstellung der Mikrotubuli, der Mikrotubulus Organisationszentren (MTOCs) und des Kinesin in den Linsenepithelzellen, den Lentoiden und den Linsenfasern wurden spezifische Antikörper gegen die entsprechenden Proteine verwendet. Die Antikörper waren mit einem Fluorophor konjugiert.

- Die Mikrotubuli wurden über direkt markierte Primärantikörper gegen entweder α -Tubulin oder β -Tubulin detektiert.
- Die MTOCs wurden über direkt markierte Primärantikörper gegen γ -Tubulin detektiert.
- Kinesin wurde über einen spezifischen Primärantikörper (aus Maus) und einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (anti-Maus) detektiert.

3.6.1 Immunofluoreszenz von Linsenepithelzellen und Lentoiden (Primärkulturen)

Die Linsenepithelzellen und die teildifferenzierten Lentoide wurden direkt in den Zellkulturschalen bzw. in den Deckglaskammern fixiert und gegen die entsprechenden Proteine mit Antikörpern bzw. Phalloidin markiert.

Zur Kontrolle und zum Vergleich der γ -Tubulin Lokalisation wurden ebenfalls MRC-5 Zellen (humane Fibroblasten) gegen γ -Tubulin und α -Tubulin immunmarkiert.

Sämtliche Inkubations- und Waschschrte der Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern / Phalloidin erfolgten im Dunkeln!

Fixierung der Primärkulturen:

- Die Primärkulturen wurden aus dem Brutschrank entnommen und direkt in den Kulturschalen bzw. Deckglaskammern 2-mal mit 37 °C warmem 1x PBS gespült.
- Dann erfolgte eine Doppelfixierung mit Paraformaldehyd (PFA) und Glutaraldehyd um eine größtmögliche Strukturhaltung in den Zellen zu gewährleisten. Dazu wurden die Zellen für 20 min mit Fixativ überschichtet und bei RT fixiert.
- Anschließend wurden die Zellen gewaschen: 3 x 6 min bei RT mit 1x PBS + Glycin; 4 ml pro Zellkulturschale bzw. 1 ml pro Deckglaskammer. Glutaraldehyd ist ein Dialdehyd. Um ungebundene Aldehydgruppen abzusättigen, wurde dem 1x PBS die Aminosäure Glycin zugesetzt.

1x PBS + Glycin (10 mg/ml)

Fixativ: 4% PFA + 0,05% Glutaraldehyd + 0,1% Triton X-100 in 1x PBS; pH 7,2-7,4
--

Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen:

Bei allen Immunofluoreszenzuntersuchungen, bei denen direkt markierte Antikörper oder die Kombination antigenspezifischer Primärantikörper + fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper verwendet wurden, erfolgte eine vorherige Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen mittels Rinderserumalbumin (BSA).

- Nach der Fixierung wurden die Zellen mit Blockierungslösung überschichtet und für 30 min bei 37 °C darin inkubiert.
- Danach wurde sofort mit dem antigenspezifischen Primärantikörper inkubiert.

Blockierlösung: 1% BSA + 0,1% Tween 20 in 1x PBS + 0,02% Thimerosal
--

Markierung des F-Aktin-Cytoskeletts in Linsenepithelzellen und Lentoiden:

Nach der Fixierung wurden die Zellen entweder sofort mit Phalloidin-FITC markiert oder für 30 min in Blockierlösung inkubiert; beides führte zu gleichen Ergebnissen.

- Die Zellen wurden mit Phalloidin-FITC-Lösung (1 : 200 in 1x PBS) überschichtet und für 1 h bei 37 °C inkubiert.
- Waschen der Zellen: 3 x 6 min mit 1x PBS bei 37 °C. 4 ml pro Zellkulturschale bzw. 1 ml pro Deckglaskammer.
- Einbetten und DNA-Färbung (Kernfarbstoff Hoechst 33342) in einem Schritt.

Markierung der Mikrotubuli und der MTOCs durch direkt markierte Primärantikörper in den Linsenepithelzellen und Lentoiden:

- Die Zellen wurden fixiert und blockiert wie oben beschrieben.
- Inkubation der Zellen mit direkt markiertem, antigenspezifischem Primärantikörper für 1 h bei 37 °C.
 - Mikrotubuli: anti- α -Tubulin-FITC oder anti- β -Tubulin-Cy3 jeweils 1 : 250 in Blockierlösung
 - MTOC: anti- γ -Tubulin-Cy3 = 1 : 500 in Blockierlösung
- 3 x 6 min waschen mit 1x PBS bei 37 °C; 4 ml pro Zellkulturschale bzw. 1 ml pro Deckglaskammer

- Einbetten und DNA-Färbung (Kernfarbstoff Hoechst 33342) in einem Schritt.

Markierung von Kinesin in LEZ und Lentoiden – Primärantikörper + Sekundärantikörper

- Die Zellen wurden fixiert und blockiert wie oben beschrieben.
- Inkubation der Zellen mit dem antigenspezifischen Primärantikörper für 1 h bei 37 °C.
→ Kinesin: anti-Kinesin (aus Maus) = 1 : 200 in Blockierlösung
- 3 x 6 min waschen mit Blockierlösung bei 37 °C; 4 ml pro Zellkulturschale bzw. 1 ml pro Deckglaskammer
- Inkubation der Zellen mit dem Sekundärantikörper für 1 h bei 37 °C.
→ anti-Maus-IgG+IgM+IgA-FITC = 1 : 500 in Blockierlösung
- 3 x 6 min waschen mit 1x PBS bei 37 °C; 4 ml pro Zellkulturschale bzw. 1 ml pro Deckglaskammer
- Einbetten und DNA-Färbung (Kernfarbstoff Hoechst 33342) in einem Schritt.

Doppelmarkierung von F-Aktin und Mikrotubuli in einem Präparat

Für die noch undifferenzierten Linsenepithelzellen in Zellkultur wurden die zwei großen Strukturproteine des Cytoskeletts (Aktin + Tubulin) in einer Doppelmarkierung durch Immunfluoreszenz dargestellt.

- Die Zellen wurden fixiert und blockiert wie oben beschrieben.
- In einem Reaktionsansatz wurden die Zellen mit Phalloidin-FITC und anti- β -Tubulin-Cy3 für 1 h bei 37 °C inkubiert.
→ Phalloidin-FITC (1 : 200) + anti- β -Tubulin-Cy3 (1 : 250) in Blockierlösung
- Danach wurden die Zellen 3 x 6 min mit 1x PBS bei 37 °C gewaschen. 4 ml pro Zellkulturschale bzw. 1 ml pro Deckglaskammer.
- Einbetten und DNA-Färbung (Kernfarbstoff Hoechst 33342) in einem Schritt.

Doppelmarkierung von Mikrotubuli und MTOCs in einem Präparat

Für die noch undifferenzierten Linsenepithelzellen und die Lentoiden in Zellkultur, wurden die Mikrotubuli durch anti- α -Tubulin-FITC und die MTOCs durch anti- γ -Tubulin-Cy3 in einer Doppelmarkierung immunfluoreszenzoptisch dargestellt.

- Die Zellen wurden fixiert und blockiert wie oben beschrieben.
- In einem Reaktionsansatz wurden die Zellen mit anti- α -Tubulin-FITC und anti- γ -Tubulin-Cy3 für 1 h bei 37 °C inkubiert.
→ anti- α -Tubulin-FITC (1 : 250) + anti- γ -Tubulin-Cy3 (1 : 500) in Blockierlösung
- Danach wurden die Zellen 3 x 6 min bei 37 °C mit Blockierungslösung gewaschen. 4 ml je Zellkulturschale bzw. 1 ml je Deckglaskammer.
- Einbetten und DNA-Färbung (Kernfarbstoff Hoechst 33342) in einem Schritt.

Kontrolle der Antikörperspezifität

Zur Kontrolle der Spezifität der Antikörper und dem Sichtbarmachen von unspezifischen Bindungen wurden Primärkulturen mit Linsenepithelzellen und Lentoiden nur mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper behandelt.

Dieser, gegen die Immunglobuline der Maus gerichtete Sekundärantikörper, sollte keine antigenspezifischen Strukturen in den Linsenzellen (LEZ + Lentoide) haben und so nur die unspezifischen Signale anzeigen. Dieses Markierungsmuster muss sich deutlich von dem unterscheiden, welches durch die antigenspezifischen Antikörper detektiert wird.

- Alle Kontrollkulturen wurden mit dem Sekundärantikörper nach der gleichen Prozedur (Fixierung, Blockierung, Markierung) und nach den gleichen Kriterien (Antikörperverdünnungen) behandelt und ausgewertet, wie die Primärkulturen mit den antigenspezifischen Antikörper (siehe oben).
 - anti-Maus-IgG (Fc spezifisch), FITC konjugiert
 - anti-Maus-IgG+IgM+IgA, FITC konjugiert

Die Einbettung erfolgte direkt in den Zellkulturschalen bzw. in den Deckglaskammern. 100 µl Einbettmedium pro Zellkulturschale bzw. 50 µl Einbettmedium pro Deckglaskammer; dann mit einem passenden Deckglas abdecken.

→ Einbettmedium: Antifade wurde selbst hergestellt und mit einem Kern-Farbstoff versetzt.

Einbettmedium Antifade	
0,1 M Tris-HCl; pH 8,4	1 ml
Glycerin	9 g
DABCO (Triethylendiamin)	230 mg
+ DNA-Farbstoff	
Hoechst 33342	80 µg / ml Antifade

Alle immunofluoreszenzmarkierten Präparate wurden nach dem Einbetten sofort am Mikroskop ausgewertet. Die Präparate wurden anschließend im Kühlschrank bei 4 °C gelagert (maximal 2 Wochen). Für längere Zeiträume erfolgte eine Lagerung bei -20 °C im Gefrierschrank.

3.6.2 Immunofluoreszenz von isolierten Linsenfaserzellen

Sofort nach der Vereinzelung wurden die Linsenfaserzellpakete (LFZ-Pakete) in einem Nylon-Zellsieb (40 µm Porengröße) gesammelt und 2-mal kurz mit 1x PBS (RT) gespült.

Fixierung der Linsenfaserzellen:

- Es erfolgte eine Doppelfixierung mit Paraformaldehyd (PFA) und Glutaraldehyd um eine größtmögliche Strukturhaltung der Cytoarchitektur in den Linsenfaserzellen zu gewährleisten.
- Die LFZ-Pakete wurden für 45 min in 4 ml Fixierlösung inkubiert; bei RT
- Anschließend wurden die Zellen 3 x 8 min bei RT mit 4 ml 1x PBS + Glycin gewaschen. Glutaraldehyd ist ein Dialdehyd. Um ungebundene Aldehydgruppen abzusättigen, wurde dem 1x PBS-Puffer die Aminosäure Glycin zugesetzt.

1x PBS + Glycin (10 mg/ml)

Fixativ: 4% PFA + 0,05% Glutaraldehyd + 0,1% Triton X-100 in 1x PBS; pH 7,2-7,4
--

Nach der Fixierung wurden die Linsenfaserzellpakete aus dem Nylonsieb in 10 ml Zentrifugenröhrchen (aus Glas) überführt. In den Glasröhrchen wurden die Blockierung und die Immunmarkierung wie folgt durchgeführt:

Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen:

Bei allen Immunofluoreszenzuntersuchungen, bei denen direkt markierte Antikörper oder die Kombination antigenspezifischer Primärantikörper + fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper verwendet wurden, erfolgte eine vorherige Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen mittels Rinderserumalbumin (BSA).

- Nach der Fixierung wurden die LFZ-Pakete für 30 min bei 37 °C in 4 ml Blockierungslösung inkubiert.
- Danach wurde sofort mit dem antigenspezifischen Primärantikörper inkubiert.

Blockierlösung: 1% BSA + 0,1% Tween 20 in 1x PBS + 0,02% Thimerosal
--

Markierung des F-Aktin Cytoskeletts in den Linsenfaserzellen:

- Fixierung der LFZ-Pakete wie oben beschrieben
- Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen wie oben beschrieben
- Inkubation der LFZ-Pakete für 1 -2 h mit Phalloidin-FITC bei 37 °C.
→ F-Aktin: Phalloidin-FITC = 1 : 300 in Blockierlösung oder nur 1x PBS
- Waschen der Zellen: 3 x 8 min mit 4 ml 1x PBS bei 37 °C.
- Einbetten und DNA-Färbung (Kernfarbstoff Hoechst 33342) in einem Schritt.

Markierung der Mikrotubuli bzw. der MTOCs durch direkt markierte Primärantikörper in den Linsenfaserzellen:

- Die LFZ-Pakete wurden fixiert und blockiert wie oben beschrieben.
- Inkubation der Linsenfaserzellen mit dem direkt markierten Primärantikörper für 1 -2 h bei 37 °C.
→ Mikrotubuli: anti- α -Tubulin-FITC oder anti- β -Tubulin-Cy3 jeweils 1 : 250 in Blockierlösung
→ MTOC: anti- γ -Tubulin-Cy3 = 1 : 500 in Blockierlösung
- 3 x 8 min waschen mit 4 ml 1x PBS bei 37 °C
- Einbetten und DNA-Färbung (Kernfarbstoff Hoechst 33342) in einem Schritt.

Markierung von Kinesin in den Linsenfaserzellen

Antigenspezifischer Primärantikörper + fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper:

- Die LFZ-Pakete wurden fixiert und blockiert wie oben beschrieben.
- Inkubation der Faserzellen mit dem Primärantikörper für 1 – 2 h bei 37 °C.
→ Kinesin: anti-Kinesin = 1 : 100 in Blockierlösung
- 3 x 8 min waschen mit 4 ml Blockierlösung bei 37 °C
- Inkubation der Zellen mit dem Sekundärantikörper für 1 – 2 h bei 37 °C.
→ anti-Maus-IgG+IgM+IgA = 1 : 500 in Blockierlösung.
- 3 x 8 min waschen mit 4 ml 1x PBS bei 37 °C
- Einbetten und DNA-Färbung (Kernfarbstoff Hoechst 33342) in einem Schritt.

Doppelmarkierung von Mikrotubuli und γ -Tubulin in einem Präparat:

- Die LFZ-Pakete wurden fixiert und blockiert wie oben beschrieben.
- In einem Reaktionsansatz wurden die Linsenfasern mit anti- α -Tubulin-FITC und anti- γ -Tubulin-Cy3 für 1 - 2 h bei 37 °C inkubiert.
→ anti- α -Tubulin-FITC (1 : 250) + anti- γ -Tubulin-Cy3 (1 : 500) in Blockierlösung
- Anschließend wurden die Zellen 3 x 8 min mit 4 ml 1x PBS bei 37 °C gewaschen.
- Einbetten und DNA-Färbung (Kernfarbstoff Hoechst 33342) in einem Schritt.

Doppelmarkierung von F-Aktin und γ -Tubulin in einem Präparat:

- Die LFZ-Pakete wurden fixiert und blockiert wie oben beschrieben.
- In einem Reaktionsansatz wurden die Linsenfasern für 1 – 2 h mit anti- γ -Tubulin-Cy3 und Phalloidin-FITC bei 37 °C inkubiert.
→ anti- γ -Tubulin-Cy3 (1 : 500) + Phalloidin-FITC (1 : 300) in Blockierlösung.
- Danach wurden die Zellen 3 x 8 min bei 37 °C mit 4 ml 1x PBS gewaschen.
- Einbetten und DNA-Färbung (Kernfarbstoff Hoechst 33342) in einem Schritt.

Kontrolle der Antikörperspezifität

Zur Kontrolle der Antikörperbindung und zum Nachweis unspezifischer Signale wurden Linsenfasern nur mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper behandelt. Diese, gegen die Immunglobuline der Maus gerichteten Sekundärantikörper, sollten keine antigenspezifischen Strukturen in den Linsenfasern haben und somit nur unspezifische Bindungen anzeigen. Dieses Markierungsmuster muss sich deutlich von dem unterscheiden, welches durch die antigenspezifischen Antikörper (Cytoskelett-Proteine) detektiert wird.

- Die Linsenfasern wurden nach der gleichen Prozedur (Fixierung, Blockierung, Markierung) und nach gleichen Kriterien (Antikörperverdünnungen) mit dem Sekundärantikörper behandelt, wie Fasern mit den entsprechenden antigenspezifischen Antikörpern (siehe oben).
→ anti-Maus-IgG (Fc spezifisch), FITC konjugiert
→ anti-Maus-IgG+IgM+IgA, FITC konjugiert

Die Einbettung der Linsenfasern wurde wie folgt durchgeführt: Die LFZ-Pakete wurden aus dem PBS-Puffer mit einer Glaspipette auf Objektträger überführt. Die Pipettenspitze der Glaspipette hatte einen Durchmesser von 5 mm. Dies verhinderte ein Zerreißen der Linsenfasern beim Übertragen auf den Objektträger. Überschüssiger Puffer wurde vorsichtig abgesaugt, die Proben mit 80 μ l Einbettmedium überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt.

Die mikroskopische Auswertung erfolgte sofort oder innerhalb der nächsten zwei Tage (eingebettete Linsenfasern lagerten solange im Kühlschrank bei 4 °C).

→ Einbettmedium: Antifade wurde selbst hergestellt und mit einem Kern-Farbstoff versetzt.

Einbettmedium Antifade	
0,1 M Tris-HCl; pH 8,4	1 ml
Glycerin	9 g
DABCO (Triethylendiamin)	230 mg
+ DNA-Farbstoff	
Hoechst 33342	80 µg / ml Antifade

3.6.3 Immunhisto- und Immuncytochemie an Kryostatschnitten der Augenlinse

Herstellung der Kryostatschnitte

Die Augenlinsen wurden freipräpariert und sofort physikalisch fixiert. Eine vorherige Entfernung der Linsenkapsel fand nicht statt.

Kleine Alu-Förmchen (aus Aluminium-Folie, $\varnothing = 1,5$ cm) wurden mit einem Kryo-Einbettmedium (Tissue-Tek) gefüllt. In die Alu-Förmchen mit dem Tissue-Tek wurden die Augenlinsen (jeweils eine pro Alu-Form) sofort nach der Präparation überführt und mit einem dünnen Spatel positioniert.

Die Kryoimmobilisierung und physikalische Fixierung durch Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff (- 196 °C) erfolgte sofort nach der Positionierung. Die Alu-Förmchen wurden bis zur Hälfte in flüssigen Stickstoff getaucht, bis das Kryo-Einbettmedium komplett durchgefroren war. Die Dauer des Durchfrierens hängt vom Präparat und dessen Größe bzw. Dicke ab. Wenn sich kein Nebel und keine Gasperlen mehr im Stickstoffbehälter bilden, ist die Temperatur des Präparates an die des flüssigen Stickstoffs angeglichen. Das Präparat ist dann vollständig durchgefroren.

Die Augenlinsen wurden entweder sofort nach dem Schockgefrieren im Kryostaten geschnitten oder bei - 80 °C gelagert.

Zum Anfertigen der Dünnschnitte von den gefrorenen Augenlinsen wurde ein Kryostat (Kryotom) verwendet.

Die Alu-Folie wurde von den Blöcken aus Kryo-Einbettmedium entfernt. Die Blöcke wurden auf dem Probenstisch des Kryostaten mit Kryo-Einbettmedium(Tissue-Tek) fixiert.

Dann wurden die Blöcke soweit abgetragen, bis die eingebettete Augenlinse zum Vorschein kam. Von dieser wurden 15 µm – 20 µm dicke Kryo-Schnitte angefertigt. Dabei hatte der Probenstisch mit der Augenlinse eine Temperatur von - 16 °C und die Schneidekammer des Kryostaten (Messer) eine Temperatur von - 12 °C. Dieser geringfügige Temperaturunterschied ermöglichte beim Schneiden eine leichtere Übertragung der Kryo-Schnitte von dem Probenblock auf das Messer (vom Kälteren zum Wärmeren).

Von dem Messer wurden die Kryo-Schnitte mit einem ungekühlten Glasobjektträger (RT) abgenommen (Aufschmelzen der Schnitte auf den OT) und zum Trocknen in eine Küvette gestellt.

Die Schnitte wurden bei RT für 2 - 4 h luftgetrocknet und anschließend fixiert. Alternativ können die Schnitte nach dem Lufttrocknen auch bei - 80 °C, luftdicht verpackt, gelagert werden.

Fixierung der Kryo-Schnitte

Frische Schnitte wurden mindestens 2 h bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Gefrorene Schnitte wurden in ihrer Verpackung gelassen, bis sie aufgetaut und getrocknet waren.

Die Glasobjektträger (OTs) mit den Schnitten der Augenlinsen wurden in Glasküvetten mit den entsprechenden Lösungen inkubiert.

- Inkubation der OTs für 45 min in Fixativ; bei RT
- Waschen der OTs: 3 x 8 min bei RT in 1x PBS + Glycin (10 mg/ml)
- Zum Stabilisieren der Mikrotubuli wurde Taxol (Paclitaxel, 16 μ M) zugegeben.

Fixativ: 4% PFA + 0,05% Glutaraldehyd + 0,1% Triton X-100 in 1x PBS; pH 7,2-7,4

Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen:

Bei allen Immunofluoreszenzuntersuchungen, bei denen direkt markierte Antikörper oder die Kombination antigenspezifischer Primärantikörper + fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper verwendet wurden, erfolgte eine vorherige Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen mittels Rinderserumalbumin (BSA).

- Nach der Fixierung wurden die OTs für 30 min bei 37 °C in Blockierungslösung inkubiert.

Blockierlösung: 1% BSA + 0,1% Tween 20 in 1x PBS + 0,02% Thimerosal

Fluoreszenzmarkierung des F-Aktin Cytoskeletts an Faserzellen der Kryo-Schnitte:

- Die OTs mit den Schnitten der Augenlinse wurden fixiert wie oben beschrieben.
- Inkubation der OTs für 1 h mit Phalloidin-FITC bei 37 °C in einer feuchten Kammer.
→ F-Aktin: Phalloidin-FITC = 1 : 200 in 1x PBS
- Dann wurden die Schnitte 3 x 8 min mit 1x PBS gewaschen; bei 37 °C
- Einbetten und DNA-Färbung (Kernfarbstoff Hoechst 33342) erfolgten in einem Schritt.

Markierung der Mikrotubuli durch direkt markierte Primärantikörper an den Kryo-Schnitten:

- Die OTs mit den Schnitten der Augenlinse wurden fixiert und blockiert wie oben beschrieben.
- Inkubation der OTs für 1 h mit anti- β -Tubulin-Cy3 oder anti- α -Tubulin-FITC bei 37 °C.
→ Tubulin / Mikrotubuli: anti- α -Tubulin-FITC (1 : 250) oder anti- β -Tubulin-Cy3 (1 : 250) in Blockierlösung
- Dann wurden die Schnitte 3 x 8 min mit 1x PBS gewaschen; bei 37 °C
- Einbetten und Gegenfärbung der DNA (Kernfarbstoff Hoechst 33342) erfolgte in einem Schritt.

Kontrolle der Antikörperspezifität

Zur Kontrolle der Antikörperbindung und zum Nachweis unspezifischer Signale wurden Kryo-Schnitte mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper behandelt. Dieser, gegen die Immunglobuline der Maus gerichtete Sekundärantikörper, sollte keine antigenspezifischen Strukturen in den Faserzellen der Linse haben und so nur unspezifische Bindungen anzeigen. Das Markierungsmuster muss sich deutlich von dem unterscheiden, welches durch die antigenspezifischen Antikörper (Cytoskelett-Proteine) detektiert wird.

- Als Kontrollen wurden mehrere Kryo-Schnitte der Augenlinse ausschließlich mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern inkubiert (nach gleicher Prozedur und gleichen Auswertungskriterien wie Kryo-Schnitte mit Primärantikörpern).
→ Sekundärantikörper: anti-Maus IgG (Fc spezifisch), FITC konjugiert

Zur Einbettung der Kryo-Schnitte wurden diese mit 80 µl Einbettmedium überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt. Dann erfolge sofort oder innerhalb der nächsten 2 Tage die Auswertung am Mikroskop (bis Auswertung Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C).

→ Einbettmedium: Antifade wurde selbst hergestellt und mit einem Kern-Farbstoff versetzt.

Einbettmedium Antifade	
0,1 M Tris-HCl; pH 8,4	1 ml
Glycerin	9 g
DABCO (Triethylendiamin)	230 mg
+ DNA-Farbstoff	
Hoechst 33342	80 µg / ml Antifade

3.6.4 Mikroskopische Auswertung der Fluoreszenzpräparate

Mikroskop – Gerätetyp	Objektiv und Lichteigenschaften	Anwendung
Zeiss Axioskop Kamera: Vario Cam Software: Smart Capture VP	10x + 40x/Oil + 60x/Oil + 100x/Oil Epifluoreszenz; HBO50-Lampe	Auswertung der fluoreszenzmarkierten Präparate

Folgende Filter wurden genutzt um die Fluoreszenzsignale zu detektieren:

- (1) Hoechst 33342 Filter: Zeiss, Deutschland; Anregung: 365 nm / Emission: LP 420 nm; zur Detektion der DNA.
- (2) FITC Filter: Zeiss, Deutschland; Anregung: 450 – 490 nm / Emission: 515 – 560 nm; zur Detektion des F-Aktin, des α -Tubulin und des Kinesin sowie des Fluorescein beim Vitalitätsnachweis.
- (3) Cy3 / Rhodamin Filter: Zeiss, Deutschland; Anregung: 546/12 nm / Emission: LP 590 nm; zur Detektion des β -Tubulin und des γ -Tubulin.

→ Absorption – Emission der konjugierten Fluorophore:

Fluorophor	Absorption / Anregung	Emission	Farbe
Fluorescein	494 nm	518 nm	grün
FITC	494 nm	518 nm	grün
Cy3	554 nm	570 nm	rot
Hoechst 33342	346 nm	460 nm	blau

→ Eine Nachbearbeitung der Bilder erfolgte in Adobe Photoshop hinsichtlich einer Kontrast- und Helligkeitsverbesserung und in CorelDRAW um Maßbalken und Schriftzüge einzufügen.

3.7 Elektronenmikroskopie (TEM)

Die Linsenfaserzellen und das Zellpellet wurden für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) vorbereitet, um ihre Ultrastruktur erfassen zu können. Methodik abgewandelt nach Plattner, H., Zingsheim, H.P.: Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell- und Molekularbiologie.

3.7.1 Fixierung und Einbettung der Linsenfaserzellen und des Zellpellets

Nach der Zellvereinzelung (siehe oben) und dem Spülen in 1x PBS wurden die Linsenfaserzellen in 10 ml Glas-Zentrifugenröhrchen überführt und sofort mit Fixativ überschichtet. In diesen Glas-Zentrifugenröhrchen wurden die Fixierung und die Inkubation in Kunstharz durchgeführt. Die entsprechenden Lösungen wurden jeweils zugegeben und mit einer Pipette wieder entfernt – die LFZ-Pakete setzten sich am Boden ab, so dass die Lösungen durch vorsichtiges pipettieren nahezu vollständig entfernt werden konnten, ohne LFZ-Pakete zu verlieren.

Das Zellpellet wurde durch Homogenisation der Linse (siehe 3.8.1 Proteinextraktion) und Ultrazentrifugation bei 91000 g gewonnen. Die Homogenisation erfolgte bei Raumtemperatur. Die Linsenfaserzellpakete und Zellpellets wurden jeweils nach demselben Protokoll fixiert und eingebettet. Sie sind im Folgenden zusammenfassend als „Proben“ aufgeführt.

Alle Fixierungs- und Einbettungsschritte wurden unter einem Abzug und nur mit Handschuhen durchgeführt.

Primärfixierung:

- Der PBS-Überstand wurde abgenommen und die Proben mit der 1. Fixierlösung überschichtet.
- Inkubation der Proben bei Raumtemperatur (RT) für 2 h in der 1. Fixierlösung.
- Danach wurde 6 x 5 min bei RT in 1x PBS gewaschen.

1. Fixierlösung: 4% PFA + 0,5% Glutaraldehyd + 10 μ M Taxol in 1x PBS; pH 7 -7,5

Sekundärfixierung:

- Nach der Primärfixierung wurden die Proben im Dunkeln für 2 h bei 4 °C in der 2. Fixierlösung inkubiert.
- Waschen der Proben: 6 x 5 min bei RT in Aqua bidest
- Nach der Sekundärfixierung wurden die Zellpellets geviertelt um den Diffusionsweg für das Uranylacetat und das Kunstharz zu vermindern.

2. Fixierlösung: 1% OsO₄ in 1x PBS

Tertiärfixierung:

- Inkubation der Proben nach der Sekundärfixierung in der 3. Fixierlösung; über Nacht bei RT
- Abschließend wurden die Proben 6 x 5 min bei RT in Aqua bidest gewaschen.

3. Fixierlösung: 1% Uranylacetat in Aqua bidest

Entwässerung der Proben mittels Aceton:

- Die Entwässerung der Proben erfolgte in einer aufsteigenden Acetonverdünnungsreihe.
- Inkubation in (1.) 30%, (2.) 50%, (3.) 70%, (4.) 80%, (5.) 90% Aceton (in Aqua bidest) für jeweils 30 min bei RT
→ Inkubation in 70% Aceton auch über Nacht oder Wochenende möglich
- 2-malige Inkubation in 100% Aceton für jeweils 1 h; bei RT

Einbettung in Kunstharz (Agar 100 resin Kit):

Um eine nahezu vollständige Diffusion des Kunstharzes in die Proben zu erreichen, wurden diese zuerst in Kunstharz-Aceton-Mischungen inkubiert.

- 1 Teil Kunstharz + 3 Teile Aceton für 45 min bei RT
- 1 Teil Kunstharz + 1 Teil Aceton für 45 min bei RT
- 3 Teile Kunstharz + 1 Teil Aceton für 45 min bei RT
- Anschließend Inkubation der Proben 2-mal für je 1 h in reinem Kunstharz; bei RT
- Danach wurden die Proben in passende Einbettförmchen überführt.
- Das Aushärten der Proben erfolgte für 2 Tage bei 60 °C (Heizschrank) und anschließend für 1 Woche unter dem Abzug (vollständige Polymerisation des Kunstharzes).

Kunstharz-Gemisch Agar 100 resin Kit:

bei 50 °C – 60 °C in vorgewärmten Gläsern anmischen. Mischungsverhältnis ergibt ein Kunstharz mittlerer Härte!

- 10 ml Agar epoxy resin
- + 8 ml Hardener DDSA
- + 4 ml Hardener MNA
- gut vermischen und anschließend den Katalysator zugeben
- + 0,65 ml Accelerator BDMA; wieder gut vermischen

3.7.2 Anfertigen von Ultradünnschnitten

Nach dem vollständigen Aushärten erfolgte die Vorbereitung der Proben für das Anfertigen von Ultradünnschnitten.

- Antrimmen des Probenblocks: dazu wurden die Probenblöcke mittels einer Rasierklinge oder einer Fräse unter dem Stereomikroskop kegelartig angespitzt;
→ Probenoberfläche an der Kegelspitze = 0,25 mm²
- Von den Kegelspitzen wurden mit einem Diamantmesser die Ultradünnschnitte abgetragen
→ Schichtdicke der Ultradünnschnitte ca. 50 – 60 nm
- Aufschwimmen der Ultradünnschnitte auf die Objektträger (Kupfer-Schlitzblenden).
- Nachkontrastierung: Uranylacetat – Bleicitrat

(1) 1% Uranylacetat in Aqua bidest für 5 min bei RT

→ 1-mal kurz waschen in Aqua bidest

(2) 2% Bleicitrat in Aqua bidest (pH 11) für 5 min bei RT

→ 1-mal kurz waschen in Aqua bidest

- Trocknen bei RT

- Auswertung im Transmissionselektronenmikroskop (TEM):
Gerätetyp: Zeiss CEM 902A mit CCD Kamera (Gatan BioScan); Die Bilder wurden mit der zugehörigen Software (digital micrograph, Version 3.9.3.) aufgenommen und mit Adobe Photoshop (Helligkeits- / Kontrastbearbeitung) sowie CorelDraw (einfügen von Schrift und Zeichen) nachbearbeitet.

3.8 Proteinbiochemie

3.8.1 Proteinextraktion – Isolation von Proteinen aus der Augenlinse

Die Augenlinsen wurden freipräpariert wie oben beschrieben. Nach dem Entfernen der Linsenkapsel durch Mikrosektion wurden die Augenlinsen sofort in eisgekühlten (2 °C) Homogenisationspuffer überführt und homogenisiert. Von der Entnahme des Auges aus dem Tier bis zur Homogenisation der Augenlinse im Puffersystem vergingen ca. 45 min.

- 2 Augenlinsen wurden nach der Mikrosektion in einen Potter mit 5 ml Homogenisationspuffer überführt und auf Eis (bei 0 – 2 °C) homogenisiert.
- Das Homogenat wurde in vorgekühlte 1,5 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt. Durch Ultrazentrifugation bei 2 °C und 91287 g für 30 min wurden die löslichen Proteine von Zelltrümmern, Zellfragmenten (Membranen) und verbleibenden Organellen (Zellkerne, Mitochondrien, Lysosomen usw.) abgetrennt.
→ **Ultrazentrifugation durch Beckman Ultrazentrifuge: (Rotor TLA-45, 45000 rpm = 91287 g)**
- Nach der Ultrazentrifugation wurde der Überstand mit den löslichen Proteinen auf 2 ml Laborröhrchen aufgeteilt, mit 1 M Glycerin versetzt und bei – 20 °C gelagert.

↳ 1. Überstand = Isolat mit den löslichen Proteinen = (1) Fraktion cytosolischer Proteine!

- Das Pellet mit den Zellresten wurde 2-mal in der Kälte (auf Eis, 0 – 2 °C) gewaschen, indem es jeweils in 1 ml Homogenisationspuffer resuspendiert und für 15 min bei 2 °C und 91287 g zentrifugiert wurde.
- Die Waschüberstände wurden verworfen.
- Um auch die unlöslichen, membrangebundenen oder in Komplexen organisierten Proteine isolieren zu können, wurde das Pellet nun in 1x SDS-Ladepuffer (5x SDS-Ladepuffer der Gel-Elektrophorese 1 : 5 in Aqua bidest verdünnt) bei RT resuspendiert und nochmals homogenisiert. Anschließend erfolgte ein Denaturieren der Probe bei 95 °C für 10 min in einem Thermomixer und ein erneutes Homogenisieren bei RT mittels einer Pipette.
- Nun wurde ein letztes Mal für 20 min bei 25 °C und 91287 g zentrifugiert.
- Daraus resultierte der letzte Überstand mit den unlöslichen, gebundenen Proteinen, der in ein 2 ml Laborröhrchen überführt und ebenfalls bei – 20 °C gelagert wurde.

↳ Letzter Überstand: Isolat mit den unlöslichen, gebundenen Proteinen = (2) Fraktion unlöslicher Proteine!

In folgenden Experimenten wurden die Fraktion löslicher Proteine (1) und die Fraktion unlöslicher Proteine (2) in der SDS-Gel-Elektrophorese und im Western Blot untersucht. Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den beiden Fraktionen erfolgte mittels des Lowry-Tests.

3.8.2 Co-Sedimentation – Extraktion von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs)

Aus der Fraktion der cytosolischen Proteine, sollten Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAPs) durch Co-Sedimentation mit aufgereinigtem neuronalen Tubulin (gereinigt über Phosphocellulose-Säulenchromatographie nach Weingarten et al., 1974) extrahiert werden. Die aufgereinigten Tubulindimere / Tubulinoligomere polymerisieren unter den Pufferbedingungen und in Gegenwart von Taxol bei 37 °C zu Mikrotubuli. An diese Mikrotubuli sollten die MAPs aus der Fraktion der cytosolischen Proteine binden. Die Mikrotubuli-Aggregate mit eventuell gebundenen MAPs, wurden durch Ultrazentrifugation vom Rest der Proteine im Überstand abgetrennt. Protokoll abgewandelt nach (Vallee, 1982).

Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet:

- 500 µl aufgereinigtes Tubulin + 500 µl der Fraktion löslicher Proteine wurden in einem 1,5 ml Zentrifugenröhrchen vermischt.
 - Das aufgereinigte Tubulin und die isolierten Proteine aus der löslichen Fraktion waren in Homogenisationspuffer + Taxol (Paclitaxel, 20 µM) + GTP (0,5 mM) gelöst.
 - Konzentration von aufgereinigtem Tubulin im Reaktionsansatz = 1,5 mg/ml.
- Assemblierung: Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.
- Ultrazentrifugation: Danach wurde für 30 min bei 37 °C und 91287 g zentrifugiert
- 1. Waschschrift: Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Homogenisationspuffer + Taxol (20 µM) + GTP (0,5 mM) resuspendiert und weitere 5 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.
- Ultrazentrifugation: Nach dem 1. Waschschrift wurde für 15 min bei 37 °C und 91287 g zentrifugiert
- 2. Waschschrift: Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet in 1 ml Homogenisationspuffer + Taxol (20 µM) + GTP (0,5 mM) resuspendiert und weitere 5 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.
- Ultrazentrifugation: Nach dem 2. Waschschrift wurde für 15 min bei 37 °C und 91287 g zentrifugiert
- Denaturieren des Mikrotubuli-MAP-Assemblats: Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml 1x SDS-Ladepuffer (5x SDS-Ladepuffer der Gel-Elektrophorese 1 : 5 in Aqua bidest verdünnt) bei RT resuspendiert, bei 95 °C für 10 min denaturiert und erneut homogenisiert. Dann wurde Glycerin (1 M) zugesetzt und der Co-Sedimentationsextrakt bei – 20 °C gelagert.

Als Kontrolle wurde parallel ein 1 ml Reaktionsansatz, der nur aufgereinigtes Tubulin enthielt, nach der gleichen Prozedur behandelt und nach den gleichen Kriterien ausgewertet.

- Kontrollansatz: 500 µl aufgereinigtes Tubulin + 500 µl Homogenisationspuffer + Taxol (20 µM) + GTP (0,5 mM)

- Der Co-Sedimentationsextrakt wurde zusammen mit dem aufgereinigten Tubulin aus der Kontrolle in einer SDS-Gel-Elektrophorese weiter untersucht → Coomassie- und Silberfärbung der Gele.

Homogenisationspuffer; pH 6,8

Substanz	Endkonzentration in mM	g/l
PIPES	20	6,05
EGTA	1	0,38
NaCl	80	4,67
MgCl ₂	0,5	0,048
DTT	1	0,155
+		
Sigma Protease Inhibitor Cocktail	10 µl Cocktail-Lösung pro 1 ml Homogenisationspuffer	—

Puffer im Reaktionsansatz bei der Co-Sedimentation:

Homogenisationspuffer + Taxol (Paclitaxel, 20 µM) + GTP (0,5 mM) + Glycerin (1 M)

Sigma Protease Inhibitor Cocktail für Gewebe- und Zellextrakte aus Säugetieren

Komponenten	Konzentration in mM	Welche Proteasen werden inhibiert
AEBSF	104	Serin-Proteasen
Aprotinin	0,08	Serin-Proteasen
Leupeptin	2	Serin- & Cystein-Proteasen
Bestatin	4	Aminopeptidasen
Pepstatin A	1,5	Proteasen in saurem Milieu wie Pepsin
E-64	1,4	Cystein-Proteasen

3.8.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Proteine bilden mit Cu²⁺-Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex (Biuret-Reaktion). Dieser bildet mit dem Folin-Ciocalteu Reagenz einen weiteren instabilen blauen Komplex, der als Maß der Proteinkonzentration dient. Die optische Dichte dieses instabilen blauen Komplexes wird bei 760 nm im Spektralphotometer gemessen. Es wurde eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin erstellt und mit den zu untersuchenden Proben verglichen.

Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Fraktion löslicher, cytosolischer Proteine (1) und der Fraktion unlöslicher, gebundener Proteine (2).

Herstellung der Eichlösung (Standard)

Die BSA-Stammlösung (1 mg/ml) wurde mit Aqua bidest 1:10 verdünnt

↳ 100 µg/ml BSA-Eichlösung.

Es wurden 6 Standardproben für die Eichkurve vorbereitet. BSA wurde in Aqua bidest verdünnt.

Eichreihe für 200 µl Probenvolumen:

Probe Standard	Endkonzentration BSA in µg/ml im Standard
1.	0
2.	20
3.	40
4.	60
5.	80
6.	100

Vorbereitung der Proben

Die Proteine aus den zwei Fraktionen wurden zuerst jeweils 1 : 10 in Aqua bidest vorverdünnt. Anschließend wurde folgende Verdünnungsreihe (für 200 µl Probenvolumen, mit Aqua bidest.) für die Konzentrationsbestimmung hergestellt:

Probe Proteinfraction	Verdünnung	Endverdünnung
1.	1 : 25	1 : 250
2.	1 : 50	1 : 500
3.	1 : 100	1 : 1000

Herstellen der Meßansätze

Den 6 Standardproben und den jeweils 3 Proben mit den Proteinfractionen wurden nun gleiche Volumina von Analysereagenzien zugesetzt und wie folgt inkubiert:

Probenvolumen	200 µl
+ Arbeitslösung	+ 1 ml → 10 min bei RT inkubieren
+ Folin-Reagenz	+ 100 µl → 30 min bei RT im Dunkeln inkubieren

Arbeitslösung: 50 ml Lösung A (Natriumcarbonatlösung) + 1 ml Lösung B (Cu(II)-sulfat-Lösung)

→ Lösung A: 2% Na₂CO₃ in Aqua bidest

→ Lösung B: 0,5% CuSO₄ • 5 H₂O + 1,5% tri-Natriumcitrat Dihydrat in Aqua bidest

Folin-Ciocalteu's Phenol Reagenz 2N: 1:1 auf 1N mit Aqua bidest verdünnt.

Nach der Inkubation mit dem Folin-Reagenz wurden die einzelnen Proben sofort in 1 ml Küvetten überführt und bei 760 nm im Spektralphotometer vermessen. Die optische Dichte bei 760 nm (OD₇₆₀) diente zum Erstellen einer Eichkurve und dem Errechnen einer Ausgleichsgeraden durch lineare Regression (Software: Microsoft Excel).

Anhand der Gleichung der Ausgleichsgeraden konnte die Konzentration der Proteine in den Proben des Proteinisolats errechnet werden. Durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor erhielt man die ungefähre Proteinkonzentration der beiden Fraktionen in mg/ml.

3.8.4 SDS-Gel-Elektrophorese

Die Auftrennung der, aus der Augenlinse, isolierten Proteine (Isolat mit der Fraktion löslicher Proteine + Isolat mit der Fraktion unlöslicher Proteine) erfolgte im elektrischen Feld in einem Polyacrylamidgel. Dieses bestand aus Sammel- und Trenngel.

Sammelgel: 5% Acrylamid

Trenngel: 8% Acrylamid; 10% Acrylamid; 12% Acrylamid

Zusammensetzung des Sammelgels (pro 1 Gel, 5 ml)

Lösung	5% SDS-Gel
Aqua bidest	1,100 ml
Lösung A	0,313 ml
Lösung C	0,470 ml
10% APS	0,019 ml
TEMED (Katalysator)	7 µl

Zusammensetzung der Trenngele (pro 1 Gel, 5 ml)

Lösung	8% SDS-Gel	10% SDS-Gel	12% SDS-Gel
Aqua bidest	2,37 ml	2,10 ml	1,75 ml
Lösung A	1,33 ml	1,60 ml	2,00 ml
Lösung B	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml
10% APS	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
TEMED (Katalysator)	6 µl	6 µl	6 µl

Lösungen A, B und C

	Lösung A	Lösung B, pH 8,8	Lösung C, pH 6,8
Acrylamid	30%	---	---
Bisacrylamid	0,8%	---	---
Tris HCl	---	1,5 M	0,5 M
SDS	---	0,4%	0,4%

TEMED [N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan]:

Katalysator für die Acrylamid-Polymerisation; unter Stickstoff abgefüllt, 99%.

10% APS: 10% Ammoniumpersulfat gelöst in Aqua bidest

Zum Auspolymerisieren wurden die Trenngele für 50 min und das Sammelgel für 20 min bei RT unter dem Abzug stehen gelassen.

Die Proben für das SDS-Gel wurden wie folgt hergestellt:

- Probenvolumen für das Gel: 25 µl pro Laufspur
- Proteinisolat (Proteine aus löslicher oder unlöslicher Fraktion) + 5x SDS-Ladepuffer
→ 5 µl 5x SDS-Ladepuffer + x µl Protein + restliche µl Aqua bidest = 25 µl Probenvolumen
(1) Fraktion löslicher Proteine: ca. 5 mg/ml pro Laufspur aufgetragen
(2) Fraktion unlöslicher Proteine: ca. 2,6 mg/ml pro Laufspur aufgetragen
- Denaturieren bei 95 °C für 6 min im Thermomixer

Es wurden jeweils 24 µl der Probe, sowie 5 µl des Proteingrößenstandards (Protein-Marker "Sigma Wide Range"; 6,5 – 205 kDa) auf das SDS-Gel aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte, je nach Gel (% Acrylamid), für ca. 50 min bei einem konstanten Strom von 25 mA pro Gel in einem 1x SDS-Ladepuffer.

5x SDS-Ladepuffer

Substanz	Konzentration in 5x Ladepuffer
Tris HCl pH 7,5	250 mM
SDS	5%
Glycerin	50%
Mercaptoethanol	250 mM
Bromphenolblau	0,05%

1x SDS-Laufpuffer (10x SDS-Page mit Aqua bidest auf 1x verdünnt)

Substanz	Endkonzentration in 1x SDS Laufpuffer
Tris HCl	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	1%

Die SDS-Gele wurden anschließend durch Coomassie-Färbung, Silber-Färbung oder Western Blot weiter untersucht.

3.8.5 Coomassie-Färbung von Protein-Gelen

Für den Nachweis von Proteinen ab 1 µg Proteingehalt pro Bande.

Das Gel wurde nach der Elektrophorese von den Glasplatten getrennt und in eine Färbelösung überführt.

- Inkubation für 20 min in Färbelösung; bei RT auf einem Schüttler
- Anschließend Inkubation des Gels für 10 min in Entfärbelösung; bei RT auf einem Schüttler
- Nun wurde alle 30 min die Entfärbelösung gewechselt, bis das Gel genügend entfärbt war (klare Sichtbarkeit der entsprechenden Banden); bei RT auf einem Schüttler
- Abschließend wurde das Gel für 20 min in einem Trocknungspuffer inkubiert (bei RT auf einem Schüttler) und dann zwischen Zellulosefolien (in Trocknungspuffer eingeweicht) in einen Kunststoffrahmen eingespannt.
- Trocknen für 3 Tage bei RT
- Ausschneiden und dokumentieren (Scanner)

Lösungen für die Coomassie-Färbung

Färbelösung	Entfärbelösung	Trocknungspuffer
Blau R (Brillant Blau R Konzentrat) 1 : 1 mit Aqua bidest verdünnt.	10% Essigsäure + 10% Ethanol in Aqua bidest	10% Glycerin + 20% Methanol in Aqua bidest

3.8.6 Silber-Färbung von Protein-Gelen

Für den Nachweis von Proteinen ab 1 ng Proteingehalt pro Bande. Wurde zur Detektion von MAPs nach der Co-Sedimentation verwendet. Abgewandelt nach (Blum et al., 1987).

- Nach der Gel-Elektrophorese wurde das Gel von den Glasplatten getrennt und in Fixativ überführt: Fixierung für 1 h bei RT auf dem Schüttler, anschließend Fixativ wechseln und erneut für mindestens 1 h bei RT fixieren.
- Gel für 20 min in 20%igem Ethanol spülen; RT; auf Schüttler

- Gel für 10 min in Aqua bidest. spülen; RT; auf Schüttler
- Gel für 1 min im Sensibilisierer inkubieren; RT; auf Schüttler
- Gel für 3 x 20 sec in Aqua bidest. spülen
- Gel für 45 min in der Silbernitrat-Lösung inkubieren; RT; auf Schüttler
- Gel kurz in Aqua bidest. spülen (für ca. 10 sec)
- Das Gel in Entwickler-Lösung leicht bewegen, bis die Banden deutlich sichtbar sind.
- Das Gel anschließend sofort in die Stopper-Lösung überführen und für mindestens 6 min leicht schütteln lassen.
- Das Gel für 20 min in Trocknungspuffer inkubieren (RT, Schüttler) und dann zwischen die Cellulosefolien zum Trocknen einspannen.

Fixativ: 10% Eisessig + 30% Ethanol in Aqua bidest.

Sensibilisierer: 0,02% Natriumthiosulfat in Aqua bidest.

Silbernitrat-Lösung: 0,2% Silbernitrat in Aqua bidest.

Entwickler-Lösung: 0,3% Natriumcarbonat + 0,025% Formaldehyd (> 35%) + 0,001% Natriumthiosulfat in Aqua bidest.

Stopper-Lösung: 50 g TRIS Base + 25 ml Eisessig + Aqua bidest auf 1 Liter

3.9 Western Blot

Im Western Blot erfolgte der Nachweis von Strukturproteinen und assoziierten Proteinen des Cytoskeletts aus Linsenfasernzellen.

Dazu wurden die aus der Augenlinse isolierten Proteine (Fraktion löslicher, cytosolischer Proteine + Fraktion gebundener Proteine) in einer SDS-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und über einen antigenspezifischen Primärantikörper gefolgt von einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper in einer Chemilumineszenz-Reaktion (ECL-Reaktion) detektiert.

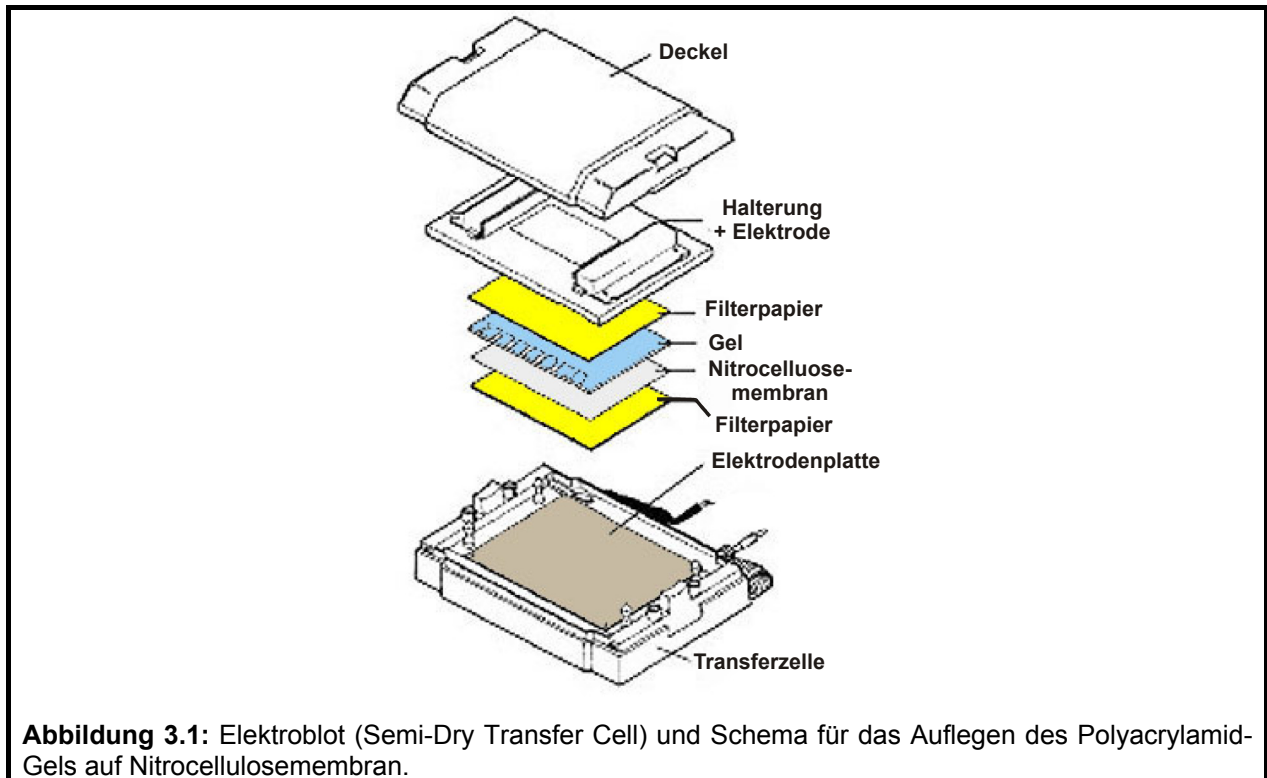
SDS-Gel-Elektrophorese – 8%iges Polyacrylamid-SDS-Gel

- Wie oben beschrieben wurden die Proteinisolate mit 5x SDS-Ladepuffer gemischt und bei 95 °C denaturiert.
- Auf ein 8%iges Gel wurden 5 µl Protein-Marker "Wide Range" (6,5 – 205 kDa) + 24 µl Probe mit den cytosolischen Proteinen + 24 µl Probe mit den gebundenen Proteinen aufgetragen.
- Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für ca. 50 min bei einem konstanten Strom von 25 mA pro Gel in einem 1x SDS-Laufpuffer.

Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran – Elektroblob

- Das Filterpapier und die Nitrocellulosemembran wurden vor dem Elektroblob für 10 min bei RT in Transferpuffer inkubiert.

- Auf die Elektrodenplatte der Blotkammer (Semi-Dry Transfer Cell) wurden das Filterpapier und die Membran (eingeweicht in Transferpuffer), sowie das SDS-Gel nach folgendem Schema aufgelegt: **Filterpapier – Nitrocellulosemembran – SDS-Gel – Filterpapier** (siehe Abb. 3.1)
- Der Elektroblot in der Blotkammer erfolgte bei Raumtemperatur für 1 h bei einer konstanten Spannung von 9 V.



Transferpuffer: wurde selbst hergestellt; pH 8,3

Substanz	Endkonzentration
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20%

Ponceaurot Proteinfärbung des Blots

Ponceaurot färbt Proteine auf Nitrocellulosemembranen, ist reversibel und ermöglicht eine anschließende Detektion der Proteine mit Antikörpern.

Die Ponceaurot Proteinfärbung diente als Kontrolle für die Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran und als Möglichkeit die Position der Markerbanden festzuhalten.

- Die Nitrocellulosemembran wurde aus der Blotkammer entnommen (der Rest wurde verworfen) und für 2 min bei RT in der Ponceaurot-Lösung inkubiert.
- Dann wurde in Aqua dest gewaschen, bis die Proteinbanden deutlich hervortraten und die überschüssige Färbung entfernt war.
- Die Markerbanden wurden mit Bleistift auf der Membran nachgezeichnet.

Ponceaurot: 2% Ponceau´s Reagenz in 30% Trichloressigsäure + 30% Sulfosalicylsäure

Blocken der Nitrocellulosemembran und Inkubation mit den Antikörpern

Um unspezifischen Bindungen der Antikörper an die Proteine auf der Nitrocellulosemembran vorzubeugen, wurde diese direkt nach der Ponceauroffärbung in einer Blockierlösung inkubiert.

- Inkubation der Membran für 1 h in Blockierlösung; bei RT auf einem Schüttler

Blockierlösung für Western Blot: 5% Magermilch in 1x PBS + Tween 20 (0,05%)

Primärantikörper:

Nach dem Blockieren wurde die Membran kurz in 1x PBS gespült und dann mit dem antigenspezifischen Primärantikörper inkubiert.

- Der antigenspezifische Primärantikörper wurde in 1x PBS + 5% Magermilch + 0,05% Tween 20 (Blockierlösung) verdünnt (Verdünnungen siehe Tabelle unten).
- Inkubation der Nitrocellulosemembran mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank.
- Am nächsten Tag wurde die Blotmembran gewaschen: 3 x 20 min in 1x PBS + 0,05% Tween 20; bei RT auf einem Schüttler

Sekundärantikörper:

Nach dem Waschen der Blotmembran erfolgte die Inkubation mit einem Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper.

- Der speziesspezifische Sekundärantikörper wurde in 1x PBS + 5% Magermilch + 0,05% Tween 20 (Blockierlösung) verdünnt (Verdünnungen siehe Tabelle unten).
- Die Blotmembran wurde für 1 h auf einem Schüttler bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert.
- Nach dem Sekundärantikörper wurde die Membran 4-mal wie folgt gewaschen:
 - 5 min in 1x PBS + 0,1% Tween 20; bei RT auf einem Schüttler
 - 2 x 10 min in 1x PBS + 0,05% Tween 20; bei RT auf einem Schüttler
 - 20 min in 1x PBS, bei RT auf einem Schüttler

ECL-Reaktion - Chemilumineszenz

Nach dem Waschen wurden in einer Chemilumineszenzreaktion (ECL-Reaktion) die Signale der gebundenen Antikörper detektiert. Die Peroxidase, die an die Sekundärantikörper konjugiert ist, katalysiert die Oxidation von Luminol und löst damit Chemilumineszenz aus. Das an der Stelle der Reaktion (an der auf dem Blot Sekundärantikörper und Peroxidasesubstrat zusammentreffen) entstehende Licht wird über einen photosensitiven Film detektiert.

- Die Blotmembran wurde mit 1,25 ml Detektionsreagenz (Peroxidasesubstrat) überschichtet und für 2 min bei RT inkubiert.
- Danach wurde die Lösung abgetropft und die Membran in eine Fotokammer zwischen zwei Klarsichtfolien eingelegt.
- In der Dunkelkammer wurde die Blotmembran für kurze Zeit (20 sec – 2 min, je nach Stärke des Signals) dem photosensitiven Film exponiert.
- Abschließend erfolgte die Entwicklung des Films in der Dunkelkammer in einer Entwicklermaschine.

Detektionsreagenz: 1 ml Lumigen PS-3 detection reagent solution A
+ 0,025 ml Lumigen PS-3 detection reagent solution B

3.10 Verwendete Antikörper

Antikörper + Toxine zur Immunfluoreszenzmarkierung der untersuchten Proteine:

Antikörper bzw. Toxin	Spezifität Protein	Konjugation	Stamm-lösung	Endver-dünnung
Phalloidin	F-Aktin	Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	0,1 mg/ml in Methanol gelöst	1 : 200 für LEZ, Lentoide & Kryoschnitte 1 : 300 für LFZ
Anti- α -Tubulin monoklonaler Antikörper aus Maus; IgG1 Primärantikörper	Epitop am C-Terminus von α -Tubulin → Mikrotubuli	Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	1,5 mg/ml Protein in 0,01 M PBS + 1% BSA + 15 mM Natriumazid	1 : 250
Anti- β -Tubulin monoklonaler Primärantikörper aus Maus; IgG1 Primärantikörper	Epitop am C-Terminus von β -Tubulin → Mikrotubuli	Cy3-Fluorophor	1 mg/ml Protein in 0,01 M PBS + 1% BSA + 15 mM Natriumazid	1 : 250
Anti-Kinesin (heavy chain) aus Maus, IgM Primärantikörper	schwere Kette von Kinesin	Unkonjugiert	1 mg/ml Protein in PBS + 15 mM Natriumazid	1 : 200
Anti-Maus-IgG+IgM+IgA; polyklonaler Sekundärantikörper aus Kaninchen	IgG+IgM+IgA aus Maus	Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	1,20 mg/ml in 50% Glycerol + 0,1 M NaCl + 0,01 M PBS	1 : 500
Anti- γ -Tubulin Primärantikörper aus Kaninchen	N-Terminus von γ -Tubulin → MTOCs	Cy3-Fluorophor	0,5 mg/ml Protein in 0,01 M PBS + 1% BSA + 15 mM Natriumazid	1 : 500
Anti-Maus IgG (Fc spezifisch) Sekundärantikörper aus Ziege	IgG Fc-Fragment aus Maus	Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	Antikörper in 0,01 M PBS + 15 mM Natriumazid	1 : 200 – 1 : 500 je nach Kontroll-experiment

Antikörper zur Detektion der untersuchten Proteine im Western Blot:

Antikörper	Spezifität	Konjugation	Stammlösung	Endver-dünnung
Anti- α -Tubulin Monoklonaler Primärantikörper aus Maus	Humanes α -Tubulin	Unkonjugiert	200 μ g IgG _{2a} in 1 ml PBS + 0,1% Natriumazid + 0,1% Gelatine	1 : 1000
Anti-Aktin Monoklonaler Primärantikörper aus Maus	C-Terminus von G- Aktin (Human)	Unkonjugiert	200 μ g IgG ₁ in 1 ml PBS + 0,1% Natriumazid + 0,1% Gelatine	1 : 1000
Anti- γ -Tubulin Primärantikörper aus Kaninchen	N-Terminus von γ -Tubulin (Human)	Unkonjugiert	13 mg/ml IgG Antiserum + 15 mM Natriumazid	1 : 1000
Anti-Microtubule Associated Proteins (MAPs) Primärantikörper aus Kaninchen	MAP 2 & Tau- Protein	Unkonjugiert	76 mg/ml Protein Antiserum + 0,1% Natriumazid	1 : 2000
Anti-Kinesin Monoklonaler Primärantikörper	Kinesin (heavy chain)	Unkonjugiert	1 mg/ml IgM in PBS + 15 mM Natriumazid	1 : 200 – 1 : 400
Anti-Maus- IgG+IgM+IgA Polyklonaler Sekundärantikörper aus Kaninchen	Maus IgG+IgM+IgA	Peroxidase (HRP)	1,20 mg/ml Protein in 0,01 M PBS + 0,1 M NaCl + 50% Glycerol	1 : 2000 oder 1 : 10000
Anti-Rabbit-IgG Polyklonaler Sekundärantikörper aus Ziege	IgG aus Kaninchen (ganzes Molekül)	Peroxidase (HRP)	IgG in 0.01 M PBS, pH 7.4 + 0.01% Thimerosal	1 : 10000
Anti-Maus-IgG Sekundärantikörper aus Ziege	Alle Maus-IgG's (Fab spezifisch)	Peroxidase (HRP)	IgG in 0.01 M PBS, pH 7.4 + 0.01% Thimerosal	1 : 10000

3.11 Pufferlösungen1x PBS Zellpuffer:

PBS Phosphate Buffered Saline (Dulbecco), PBS-Trockensubstanz ohne Ca²⁺, Mg²⁺ zum Lösen in 1 l Reinstwasser; pH 7,2

Komponenten	mg/l
NaCl	8000
KCl	200
Na ₂ HPO ₄	1150
KH ₂ PO ₄	200

3.12 Zellkulturmedien

Vollmedium 1x RPMI 1640: 1x Flüssigmedium

Komponenten	mg/l
NaCl	6000
KCl	400
Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	1512
MgSO ₄ x 7H ₂ O	100
Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	100
D-Glucose	2000
Phenolrot	10
NaHCO ₃	2000
L-Arginin	200
L-Asparagin	50
L-Asparaginsäure	20
L-Cystein	50
L-Glutamin	300
L-Glutaminsäure	20
Glycin	10
L-Histidin	15
L-Hydroxyprolin	20
L-Isoleucin	50
L-Leucin	50
L-Lysin x HCl	40
L-Methionin	15
L-Phenylalanin	15
L-Prolin	20
L-Serin	30
L-Threonin	20
L-Tryptophan	5
L-Tyrosin	20
L-Valin	20
Glutathion	1
Biotin	0,2
Vitamin B ₁₂	0,005
D-Ca-Pantothenat	0,25
Cholinchlorid	3
Folsäure	1
myo-Inositol	35
Nicotinamid	1
p-Aminobenzoessäure	1
Pyridoxin x HCl	1
Riboflavin	0,2
Thiamin x HCl	1

Minimalmedium MEM – Minimum Essential Medium Eagle: 1x Flüssigmedium

Komponenten	g/l
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0,265
MgSO ₄ (anhyd)	0,09767
KCl	0,4
NaHCO ₃	2,2
NaCl	6,8
NaH ₂ PO ₄ (anhyd)	0,122
L-Arginin • HCl	0,126
L-Cystein • 2HCl	0,0313
L-Histidin • HCl • monohydrat	0,042
L-Isoleucin	0,052
L-Leucin	0,052
L-Lysin • HCl	0,0725
L-Methionin	0,015
L-Phenylalanin	0,032
L-Threonin	0,048
L-Tryptophan	0,01
L-Tyrosin • 2Na • dihydrat	0,0519
L-Valin	0,046
Cholin chlorid	0,001
Folsäure	0,001
myo-Inositol	0,002
Niacinamid	0,001
D-Pantothensäure • ½Ca	0,001
Pyridoxal • HCl	0,001
Riboflavin	0,0001
Thiamin • HCl	0,001
Glucose	1
Phenolrot • Na	0,011
L-Glutamin	0,292

Endothelialmedium: Endothelial Cell Growth Medium MV – Grundmedium + Supplementmix

Grundmedium: Rezeptur von PromoCell

Supplementmix:

Komponente	Endkonzentration pro ml Medium
FKS	0,050 ml
Endothelial Cell Growth Supplement/Heparin	0,004 ml
EGF; Human	10,00 ng
Hydrocortison	1,000 µg
Gentamicinsulfat	50,00 µg
Amphotericin B	50,00 ng
Phenolrot	0,620 ng

3.13 Liste der Materialien, Geräte und Substanzen

Isolation der Linsenzellen und Zellkultur	
1x PBS (Dulbecco) w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺ Trockensubstanz für 1l Lösung	Biochrom AG, Berlin
Aceton	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Aqua bidest / Reinstwasser	Millipore / Milli-Q _{Plus} , hauseigene Anlage
Chambered Coverglas System Deckglaskammern mit 2 Kammern	Lab-Tek, Nunc / VWR International GmbH, Darmstadt
D-Glucose	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
FDA – Fluorescein Diacetat	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Flexiperm Disc mit 4 Kammern	Greiner Bio-One International AG, Frickenhausen
Labofuge 400e Tischzentrifuge	Heraeus Instruments / Kendro Laboratory Products GmbH Thermo Electron, Langenselbold
MEM Non Essential Amino Acids	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
Penicillin-Streptomycin-Mix	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
Rotamixer „Rotamix RM1“	ELMI Ltd., Riga
Stabiles Glutamin	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
Sterile 15 ml und 50 ml Zentrifugenröhrchen (PP)	Greiner Bio-One International AG, Frickenhausen
Sterilfilter	Nunc / VWR International GmbH, Darmstadt
Taxol (Paclitaxel)	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin
Trypsin / EDTA-Lösung EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure	Biochrom AG, Berlin
Zellkulturmedium Endothelialmedium + Supplementmix	PromoCell GmbH, Heidelberg
Zellkulturmedium Minimum Essential Medium Eagle (MEM)	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
Zellkulturmedium RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin
Zellkulturschalen (Ø = 60 mm)	Nunc / Greiner Bio-One International AG, Frickenhausen
Zelllinie HMEC-1	DKFZ Heidelberg
Zelllinie K-562	DSMZ Braunschweig
Zelllinie MRC-5	Uniklinik Saarland; M.Kühne

Immunhistochemie und Immunofluoreszenz	
1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO)	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
1x PBS (Dulbecco) w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺ Trockensubstanz für 1l Lösung	Biochrom AG, Berlin
1x PBS (Dulbecco) w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺ Trockensubstanz für 1l Lösung	Biochrom AG, Berlin
40 µm Zellsieb	Bd Falcon™ / BD Biosciences, San Jose, CA USA
Anti-β-Tubulin-Cy3	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
Anti-γ-Tubulin-Cy3	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
Anti-α-Tubulin-FITC	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
Anti-Kinesin	Acris Antibodies GmbH / Abcam Ltd., Hiddenhausen
Anti-Mouse-IgG+IgM+IgA-FITC	Acris Antibodies GmbH / Abcam Ltd., Hiddenhausen
Anti-Mouse-IgG-FITC (Fc specific)	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
Aqua bidest / Reinstwasser	Millipore / Milli-Q _{Plus} , hauseigene Anlage
Bisbenzimid Hoechst 33342	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
Bromphenolblau	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Glutaraldehyd	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Glycerin	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
Glycin	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
HCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kryostat: Kryotom AS 620E	Shandon GmbH, Frankfurt
Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Agar Scientific Ltd., Stansted, England
Phalloidin-FITC	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
Sterile 15 ml und 50 ml Zentrifugenröhrchen (PP)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Thimerosal	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
Tissue-Tek	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Triton X-100	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tween 20	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Proteinbiochemie – SDS-Gel-Elektrophorese – Western Blot	
10x SDS-Laufpuffer (Rotiphorese 10x)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
1x PBS (Dulbecco) w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺ Trockensubstanz für 1l Lösung	Biochrom AG, Berlin
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
Anti- α -Tubulin	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA USA
Anti- γ -Tubulin	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
Anti-Actin	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA USA
Anti-Kinesin	Acris Antibodies GmbH / Abcam Ltd., Hiddenhausen
Anti-MAPs	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
Anti-Mouse-IgG (Fab specific) (HRP)	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
Anti-Mouse-IgG+IgM+IgA (HRP)	Acris Antibodies GmbH / Abcam Ltd., Hiddenhausen
Anti-Rabbit-IgG (HRP)	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
Aqua bidest / Reinstwasser	Millipore / Milli-Q _{plus} . hauseigene Anlage
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
Bromphenolblau	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
CuSO ₄ • 5 H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt
EGTA	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
Elektroblotkammer (Semi-Dry Transfer Cell)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA USA
Entwicklermaschine Cuvix 60	Agfa Deutschland Vertriebsgesellschaft mbH & Cie. KG, Köln
Essigsäure (Eisessig)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Filterpapier	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA USA
Folin-Ciocalteu's phenol reagent	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Formaldehyd	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Glycerin	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
GTP	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
Lumigen PS-3 detection reagent solution A+B	Amersham Biosciences UK Ltd., Buckinghamshire
Magermilch	Kaufhalle
Mercaptoethanol	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
MgCl ₂	Merck KGaA, Darmstadt
NaCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumazid NaN ₃	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
Natriumthiosulfat Na ₂ S ₂ O ₃	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Nitrocellulosemembran	Amersham Biosciences UK Ltd., Buckinghamshire
Optima TLX Ultrazentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Photofilm für Chemilumineszenz (Hyperfilm)	Amersham Biosciences UK Ltd., Buckinghamshire
PIPES	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Proteinbiochemie – SDS-Gel-Elektrophorese – Western Blot	
Ponceaurot	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
Rotiphorese blau R (Brillant Blau R Konzentrat)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Rotiphorese Gel30(Acrylamid + Bisacrylamid)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
SigmaMarker Wide Range Protein-Marker (6,5 – 205 kDa)	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
Silbernitrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Taxol (Paclitaxel)	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
TEMED	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg
tri-Natriumcitrat Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
TRIS Base	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tris HCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tween 20	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
1,4 Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
1,5 ml Zentrifugenröhrchen	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

Elektronenmikroskopie	
1x PBS (Dulbecco) w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺ Trockensubstanz für 1l Lösung	Biochrom AG, Berlin
Aceton	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Aqua bidest / Reinstwasser	Millipore / Milli-Q _{plus} , hauseigene Anlage
Bleicitrat (Reynold´s Lösung)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Elektronenmikroskop CEM 902A	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Glutaraldehyd	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Kunstharz Agar 100 resin Kit	Plano GmbH, Wetzlar
Osmiumtetroxid (OsO ₄)	Chemex GmbH, Delligsen
Paraformaldehyd (PFA)	Agar Scientific Ltd., Stansted, England
Taxol (Paclitaxel)	Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri USA
Uranylacetat	Merck KGaA, Darmstadt

4 Experimente und Ergebnisse

4.1 Extraktion der Augenlinse und Desintegration deren Zellen

Für die experimentellen Untersuchungen zur Augenlinse der Säugetiere wurden als Ausgangsmaterial ausschließlich Augenlinsen des Hausschweins (*Sus scrofa domesticus*) verwendet. Die Augenlinse grenzt mit ihrer Lage in der hinteren Augenkammer an kein anderes zelluläres Gewebe. Da sie demzufolge keinen direkten Kontakt zu anderen Körperzellen hat, kann sie relativ einfach ohne Kontamination mit nicht zur Linse gehörenden Zellen aus dem Auge präpariert werden. Nach der hier angewandten Präparationstechnik (siehe Material und Methoden Abschnitt 3.2) hat man, für die weiteren Experimente, die isolierte Augenlinse vorliegen. Sie ist noch vollständig von der Linsenkapsel umgeben und erscheint, befreit von den anhängenden Zonulafasern und Resten des Glaskörpers, als transparentes "biologisch-kristalloides" Organ. Morphologisch stellt sie im gesunden Zustand eine ellipsoide, bikonvexe Linse dar, wobei die hintere konvexe Oberfläche (vom Linsenäquator zum hinteren Linsenpol) stärker gekrümmt ist als die flachere vordere Linsenoberfläche (**Abb. 4.1**). Als abgewandelte basale Matrix bildet die Linsenkapsel eine feste und formgebende Hülle um die Linsenzellen. Ihrer natürlichen Eigenelastizität folgend, rundet sich die Linse nach dem Ablösen von den Zonulafasern tropfenförmig ab. Direkt unter der Linsenkapsel liegen die Zellen der Augenlinse. Sie scheinen nur durch ein schmales Interstitium von ihr abgegrenzt zu sein (Wirkung als Gleitschicht bei Verformung?).

Für die Augenlinse (Lens crystallina) des adulten Hausschweins (6-12 Monate alt) wurden mit intakter Linsenkapsel (Capsula lentis) folgende Größen ermittelt:

Tabelle 4.1: Größenangaben zur Augenlinse des adulten Hausschweins (Alter: 6-12 Monate)

Äquatorialer Durchmesser	Bis zu 96 mm
Lentikularer Durchmesser (von der Oberfläche des vorderen zum hinteren Linsenpol)	Bis zu 70 mm
Gewicht	Durchschnittlich 0,45 g

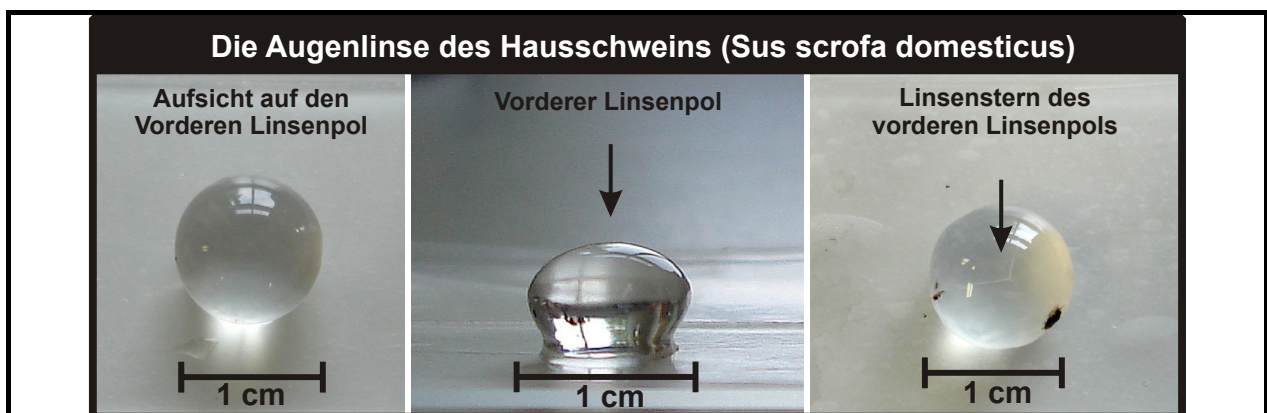
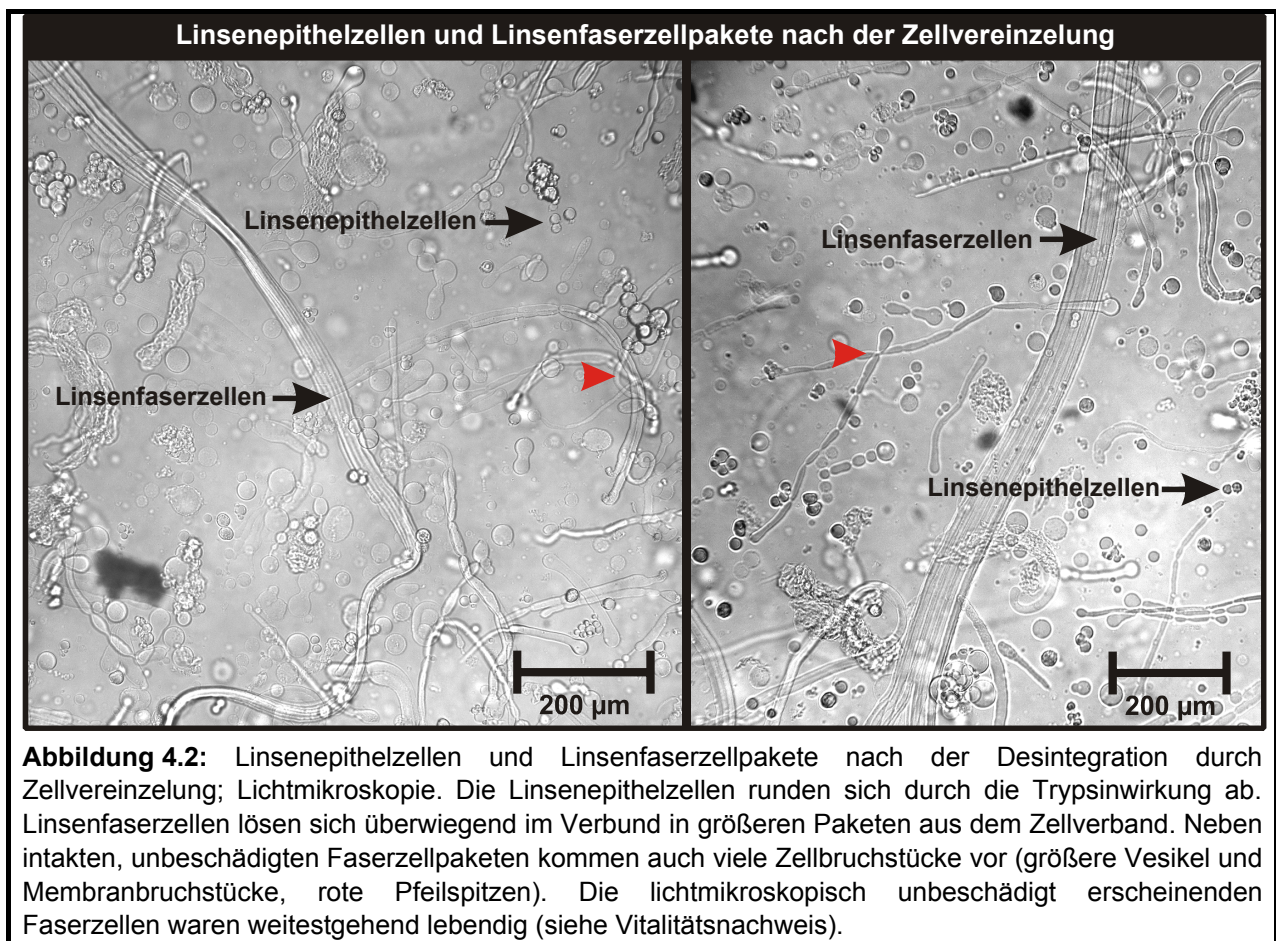


Abbildung 4.1: Die Augenlinse (Lens crystallina) des Hausschweins nach der Extraktion aus dem Auge. Das linke und mittlere Teilbild zeigen die native Augenlinse wobei die Linse im rechten Teilbild kurz fixiert wurde (ca. 2 min in 35% Formaldehyd) um den Linsenstern (primäre Wachstumsnaht an der Linsenfaserzellen zusammentreffen) des vorderen Linsenpols sichtbar zu machen.

Die Desintegration der Augenlinse und das Herauslösen von Linsenepithelzellen und Linsenfaserzellen aus ihrem dichten und kompakten Zellverband erfolgte durch die proteolytische Wirkung von Trypsin (0,25%, max. 12 min, RT oder 37 °C). Die Linsenkapsel wurde vorher durch Mikrosektion entfernt. Die zeitabhängige proteolytische Spaltung der Zell-Zellkontakte führte zum Ablösen von Linsenepithelzellen (LEZ) und Linsenfaserzellpaketen (LFZ-Pakete) beim sanften Bewegen in PBS / Glucose-Puffer. Dabei wurden überwiegend nur Linsenfaserzellen aus den äußeren cortikalen Faserzellschichten gewonnen. Darunter waren noch in Differenzierung befindliche Übergangsstadien (enthielten noch einen Zellkern) und ausdifferenzierte sekundäre Linsenfaserzellen (kernlos). Sekundäre Linsenfaserzellen aus den inneren cortikalen Schichten und primäre Linsenfaserzellen aus dem Linsenkern (älteste Schichten) wurden nicht isoliert. Die zeitabhängige proteolytische Wirkung des Trypsin führte bei längerer Inkubation (> 15 min) zur Zerstörung der abgelösten Zellen.

Die Linsenepithelzellen rundeten sich während ihrer Vereinzelnung kugelförmig ab. Die Linsenfaserzellen lösten sich weitestgehend in Zellpaketen mehrerer zusammenhängender Faserzellen von der Linse. Zahlreiche der extrem dünnen (5 – 12 µm) und langen (bis 9 mm) Linsenfaserzellen erlitten Brüche oder mikroskopisch sichtbare Membranschäden. An Bruchstellen schließt sich die Membran wieder und bildet konvexe Membranausstülpungen. Für die weiteren Untersuchungen an den Linsenfaserzellen wurden solche ausgewählt, die nach der Vereinzelnung und lichtmikroskopischen Bewertung noch weitgehend als intakte Faserbündel vorlagen und keine sichtbaren Brüche aufwiesen (**Abb. 4.2**).



4.1.1 Vitalitätsnachweis

Um die Frage zu klären, ob Linsenepithel- und Linsenfaserzellen die Vereinzelung größtenteils überleben, wurden zwei Vitalitätsnachweise durchgeführt. Sie beruhten beide im Wesentlichen auf dem Vorhandensein intakter Zellmembranen. Als Prämisse galt die Kausalität, dass Zellen mit intakten Cytoplasmamembranen als lebendig einzustufen waren.

Experimentell untersucht wurde dies, indem die Linsenepithel- und Faserzellen direkt nach der Vereinzelung entweder dem Farbstoff Trypanblau oder der Substanz Fluorescein Diacetat (FDA) ausgesetzt wurden (**Abb. 4.3**). Trypanblau wird von lebenden Zellen mit intakter Zellmembran ausgeschlossen und kann in den ersten 10 min nicht in sie eindiffundieren. Die Substanz Fluorescein Diacetat (FDA) wird von lebenden Zellen gezielt aufgenommen und von membrangebundenen und cytosolischen Esterasen in Acetat und Fluorescein gespalten. Das Fluorescein akkumuliert in den Zellen und führt zu einer starken grünen Fluoreszenz im Anregungslicht.

Die Linsenepithelzellen schlossen zu ca. 90% den Farbstoff Trypanblau in der vorgeschriebenen Inkubationszeit (innerhalb der ersten 10 min) aus. Sie nahmen ebenfalls zu ca. 90% das FDA auf, spalteten es und akkumulierten das Fluorescein im Cytosol. Demzufolge sind ihre Zellmembranen nach der Vereinzelung noch intakt und die FDA spaltenden Enzyme in einem funktionsfähigen Zustand.

Die Linsenfaserzellen schlossen zu ca. 70% das Trypanblau aus. Auch sie nahmen zu ca. 70% das FDA auf, spalteten es und akkumulierten Fluorescein im Cytosol.

Der Großteil der Linsenfaserzellpakete, der lichtmikroskopisch keine Membranschäden oder Brüche aufwies, schloss das Trypanblau aus und nahm das FDA auf.

Im Vergleich dazu färbten sich solche Linsenfaserzellen, die lichtmikroskopisch Membranschäden (Zellbrüche, **Abb. 4.2**) erkennen ließen, sofort nach Zugabe des Trypanblau tief blau und konnten ebenfalls kein Fluorescein im Zellinneren akkumulieren.

Die Vitalitätsnachweise ergaben, dass es sich beim überwiegenden Teil der Linsenepithelzellen und gut Zweidritteln der Linsenfaserzellen nach der proteolytischen Desintegration der Linse um lebende Zellen handelte.

Die **Abbildung 4.3** zeigt beispielhaft den Vitalitätsnachweis mittels Fluorescein Diacetat.

Die mehrheitlich lebenden Linsenepithelzellen eigneten sich für die Entwicklung von Primärkulturen und für Studien zur Teildifferenzierung und Interaktion mit transformierten Zelllinien (Co-Kulturmodelle).

Die lebendigen Linsenfaserzellen wurden zur weitgehenden Erhaltung ihrer intrazellulären Struktur sofort nach der Vereinzelung fixiert. Daraufhin folgten Untersuchungen zu strukturellen Eigenschaften des Cytoskeletts mittels Immunfluoreszenz- und Elektronenmikroskopie.

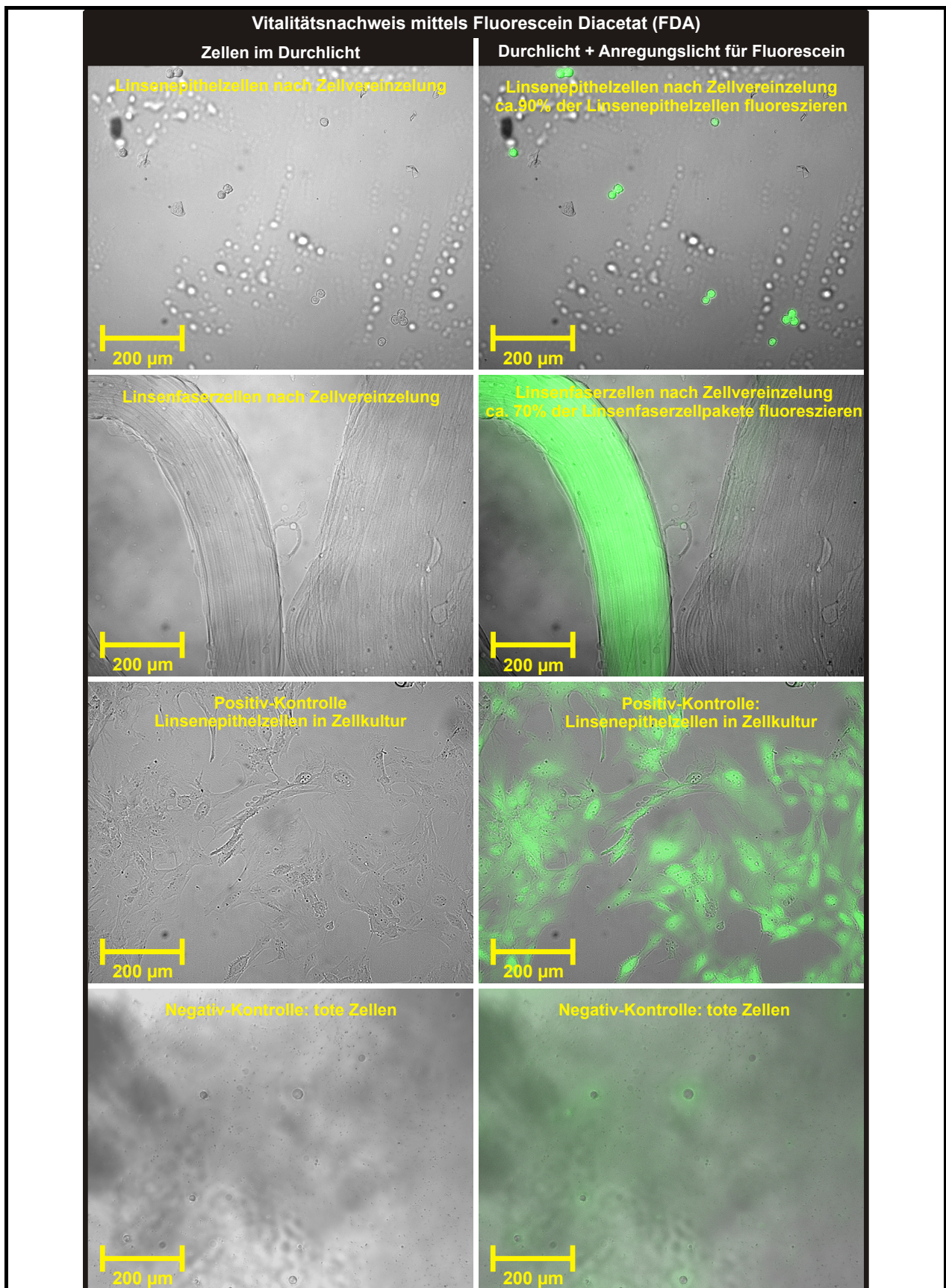


Abbildung 4.3: Nachweis der Vitalität mittels Fluorescein Diacetat (FDA); Licht- + Fluoreszenzmikroskopie. Nach Zugabe von FDA fluoreszieren Linsenepithelzellen zu ca. 90%, Linsenfaserzellen nur zu ca. 70%. Die Positivkontrolle zeigt die Aufnahme von FDA und Akkumulation von Fluorescein in Linsenepithelzellen einer Zellkultur. Die Negativkontrolle zeigt, dass tote Zellen FDA weder aufnehmen, noch spalten oder das Fluorescein im Zellinneren akkumulieren können. Zellen die Fluorescein akkumulieren leuchten im Anregungslicht grün und werden als lebendig betrachtet.

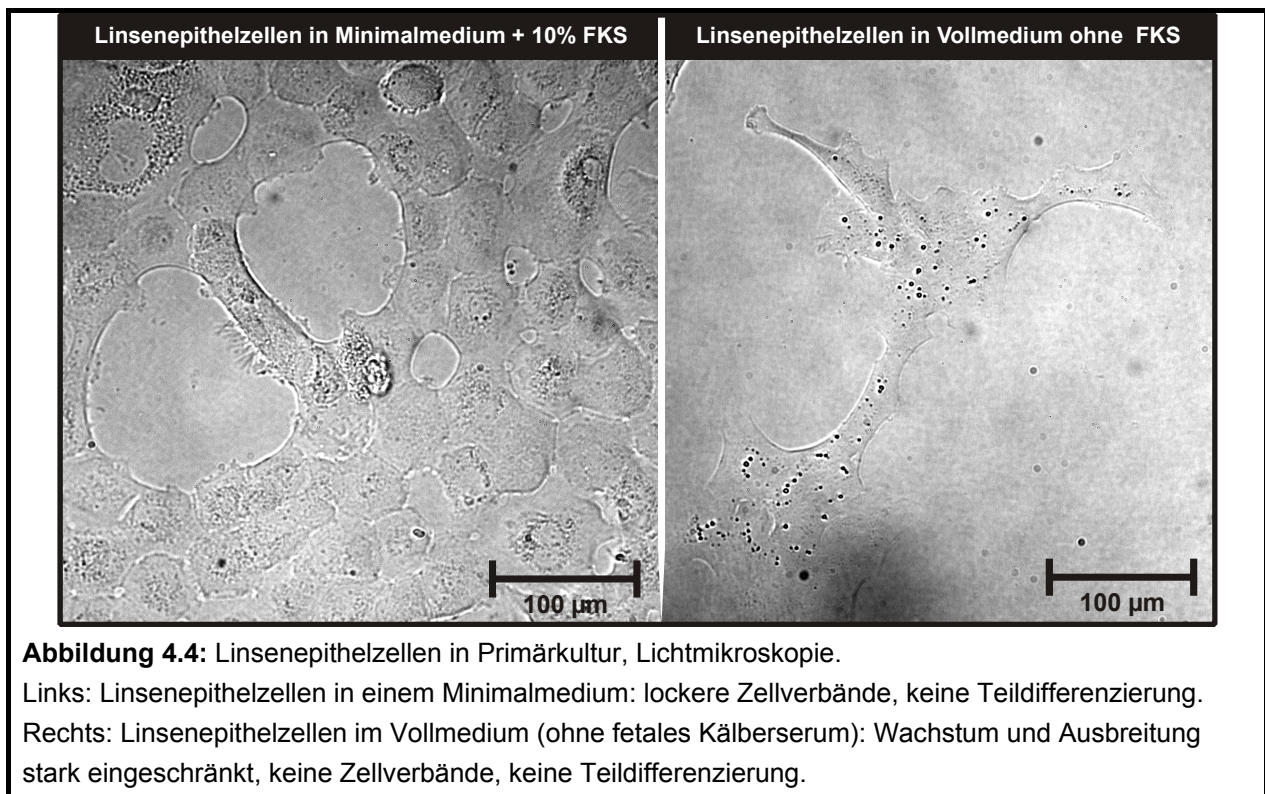
4.2 Primärkultur von Linseneithelzellen – Wachstum, morphologische Eigenschaften und Teildifferenzierung zu Lentoiden

Die isolierten Linseneithelzellen wurden nach der Vereinzlung durch Zentrifugation gesammelt und im Gemisch in Zellkultur gebracht (37 °C, 5% CO₂ im Brutschrank). Es wurden drei Varianten von Zellkulturmedien auf ihre Eignung zur Kultivierung von Linseneithelzellen getestet (Tab. 4.2). Ein Minimalmedium (enthielt nur essentielle Aminosäuren und Vitamine) mit fetalem Kälberserum, ein Vollmedium (enthielt essentielle und nicht-essentielle Aminosäuren und Vitamine sowie bestimmte Co-Faktoren) ohne fetales Kälberserum (FKS) und ein Vollmedium mit fetalem Kälberserum. In allen drei Kulturmedien benötigten die Zellen ca. 1 Tag um sich nach dem Übertragen in die Zellkulturschale (Hersteller siehe Liste der Materialien) vollständig an deren Boden festzusetzen. Sie wuchsen stets adhärent in der Zellkultur.

Tabelle 4.2: Linseneithelzellen in Primärkultur – Abhängigkeit vom Zellkulturmedium

Zellkulturmedium	Wachstum	Stabilität über die Zeit	Differenzierungsstadien
Minimalmedium 1x MEM + 10% FKS essentielle Aminosäuren & Vitamine	Adhärent; Ausbildung von lockeren Zellverbänden, kompakte Zellen, gedrungenes Wachstum	bis 4 Wochen stabil in Primärkultur	Keine Differenzierungsstadien morphologisch nachweisbar; Zellen sind kompakt, und morphologisch homogen; ohne größere Pseudo- oder Filopodien
Vollmedium 1x RPMI 1640 essentielle + nicht-essentielle Aminosäuren & Vitamine + Co-Faktoren	Adhärent; Nahezu keine Zellteilungen; keine Zellverbände; viele verstreut liegende Einzelzellen + kleinere Gruppen ohne sichtbare Wechselwirkungen	Einzelne Zellen bis zu 4 Wochen in Primärkultur vital, Mehrheit geht eher zu Grunde	Keinerlei Differenzierungsstadien morphologisch nachweisbar; Zellen wachsen breitflächig und weisen Pseudo- und Filopodien auf
Vollmedium 1x RPMI 1640 + 10% FKS essentielle + nicht-essentielle Aminosäuren & Vitamine + Co-Faktoren	Adhärent; Zellen bilden dichte Zellverbände die sich über den Boden der gesamten Kulturschale erstrecken; zahlreiche Filo- & Pseudopodien bei undifferenzierten Linseneithelzellen	Mehr als 3 Monate stabil in Primärkultur, dann wurde Kultivierung abgebrochen	Neben undifferenzierten Linseneithelzellen, sind morphologisch zwei deutliche Differenzierungsstadien erkennbar (1.) inselartige Zellhaufen (2.) faserförmige Zellen → Lentoide = teildifferenzierte Linseneithelzellen in Primärkultur

In dem Minimalmedium bildeten die Linseneithelzellen einen lockeren Zellverband (häufig unterbrochen durch zellfreie Zonen) aus kompakten, gedrunge­nen Zellen. Sie waren in diesem Medium nicht sehr bewegungsaktiv (veränderten kaum ihre Position an einer markierten Stelle), wiesen keine größeren Filopodien oder Pseudopodien auf und zeigten auch keinerlei Differenzierungsstadien die sich morphologisch (Lichtmikroskopie) abgrenzen ließen. In dem Vollmedium, in dem das fetale Kälberserum fehlte, wuchsen die Linseneithelzellen nur sehr eingeschränkt. Zellteilungen waren selten, die Ausbildung von Zellverbänden fand praktisch nicht statt und lichtmikroskopisch konnten auch keine morphologisch distinkten Differenzierungsstadien gefunden werden (Abb. 4. 4).



Die Kombination aus den Inhaltsstoffen des Vollmediums und den wachstumsfördernden Proteinen des fetalen Kälberserums (1x RPMI 1640 + 10% FKS) eignete sich deutlich besser für eine Kultivierung von Linsenepithelzellen. Die Zellen dieser Primärkulturen wuchsen zu Beginn groß- und breitflächig mit vielen Filo- und Pseudopodien. Sie bildeten zusammenhängende, dichte Zellverbände und leiteten spontane Teildifferenzierungen ein. Die daraus hervorgegangenen Differenzierungsstadien ließen sich im Lichtmikroskop morphologisch klar von undifferenzierten Linsenepithelzellen abgrenzen. Sie wurden im Weiteren als Lentoide bezeichnet (↪ Lentoide = teildifferenzierte Linsenepithelzellen in Primärkultur).

Wachstum und Teildifferenzierung von Linsenepithelzellen in Vollmedium + 10% FKS

Nach vollständiger Adhäsion am Boden der Zellkulturschale (ca. 1 Tag nach dem Übertragen in die Primärkultur), begannen die Linsenepithelzellen breitflächig zu wachsen. Sie teilten sich in diesem Primärkultur-System ca. alle 21 Stunden. Anfangs wuchsen sie großflächig, mit vielen Zellausläufern (Filo- & Pseudopodien) und waren sehr beweglich (hohe Bewegungsaktivität!). Dies offenbarte deutlich der hohe turnover von Zellen an einer markierten Stelle am Boden der Zellkulturschale, die über drei Tage wiederholt (mehrmals täglich) beobachtet wurde.

Die Linsenepithelzellen bildeten stets dichte, zusammenhängende Zellverbände wenn sie mit Nachbarzellen in Kontakt kamen (**Abb. 4.5**). Circa 1 – 2 Wochen nach dem Beginn einer Primärkultur leiteten die Linsenepithelzellen relativ konstant eine spontane Teildifferenzierung ein. In Folge dessen bildeten sich zwei morphologisch unterschiedliche Differenzierungsformen (Lentoide = teildifferenzierte Linsenepithelzellen) aus.

In Bereichen der Kulturschale, in denen die Linsenepithelzellen sehr dicht beieinander lagen und nach der Adhäsion direkten großflächigen Kontakt zu Nachbarzellen hatten, bildeten sich lokale mehrzellige Zellverbände aus.

Diese inselartigen, mehrschichtigen Zellhaufen, bestehend aus kleinen, dicht gepackten Zellen ohne erkennbare Zellausläufer, bildeten die eine Differenzierungsform (**Abb. 4.6**). Sie ließen sich morphologisch deutlich von den übrigen undifferenzierten flächig wachsenden Linsenepithelzellen abgrenzen.

An Stellen, an denen die Zellen nach dem Einsähen in die Primärkultur nicht in engem Kontakt zu liegen kamen und sich mehrere vereinzelte Gruppen adhärerender Zellen bilden konnten, trat eine andere Differenzierungsform auf. Die Linsenepithelzellen wuchsen zunächst ebenfalls breitflächig und bewegten sich über den Boden der Zellkulturschale, bis sie in Kontakt mit benachbarten Zellen kamen. Dabei ordneten sich benachbarte Zellen regelmäßig in parallelen, einschichtigen Zellverbänden an und bildeten langgestreckte, bandförmige Zellen aus. Eine Streckung der Linsenepithelzellen erfolgte immer erst nach der charakteristischen Ausrichtung von benachbarten Zellen. Dabei trat die faserförmige Verlängerung in der Art und Weise auf, dass sich zwei gegenüberliegende Zellbereiche (Zellpole) in entgegengesetzte Richtungen voneinander entfernten (**polares Wachstum, Abb. 4.7a**). Es schien als seien der direkte Zellkontakt zu Nachbarzellen und eine spezifische regelmäßige Anordnung im Zellverbund eine wichtige Voraussetzung für die Einleitung einer Teildifferenzierung zu verlängerten lentoiden Zellen (**Abb. 4.7b**). Im Weiteren wird nur der Differenzierungstyp der bandförmig verlängerten Zellen als Lentoide bezeichnet. Diese Lentoide hatten ein optisch sehr homogenes Cytoplasma und wiesen über ihre gesamte Länge keine größeren Filo- oder Pseudopodien auf. Der Zellkern wurde der schmalen Erscheinungsform der Lentoide angepasst (von rund zu ellipsoid). Für ca. 4 – 6 Wochen blieben die lentoiden Zellen in der Primärkultur stabil bestehen. Dann setzte eine Redifferenzierung zurück zu breitflächig wachsenden Linsenepithelzellen ein, wobei die bandförmige und polare Gestalt verloren ging. Die rückdifferenzierten Linsenepithelzellen behielten ihre Teilungsfähigkeit und wurden noch für 2 weitere Wochen in Kultur gehalten. Dann erfolgte der Abbruch der Kultivierung.

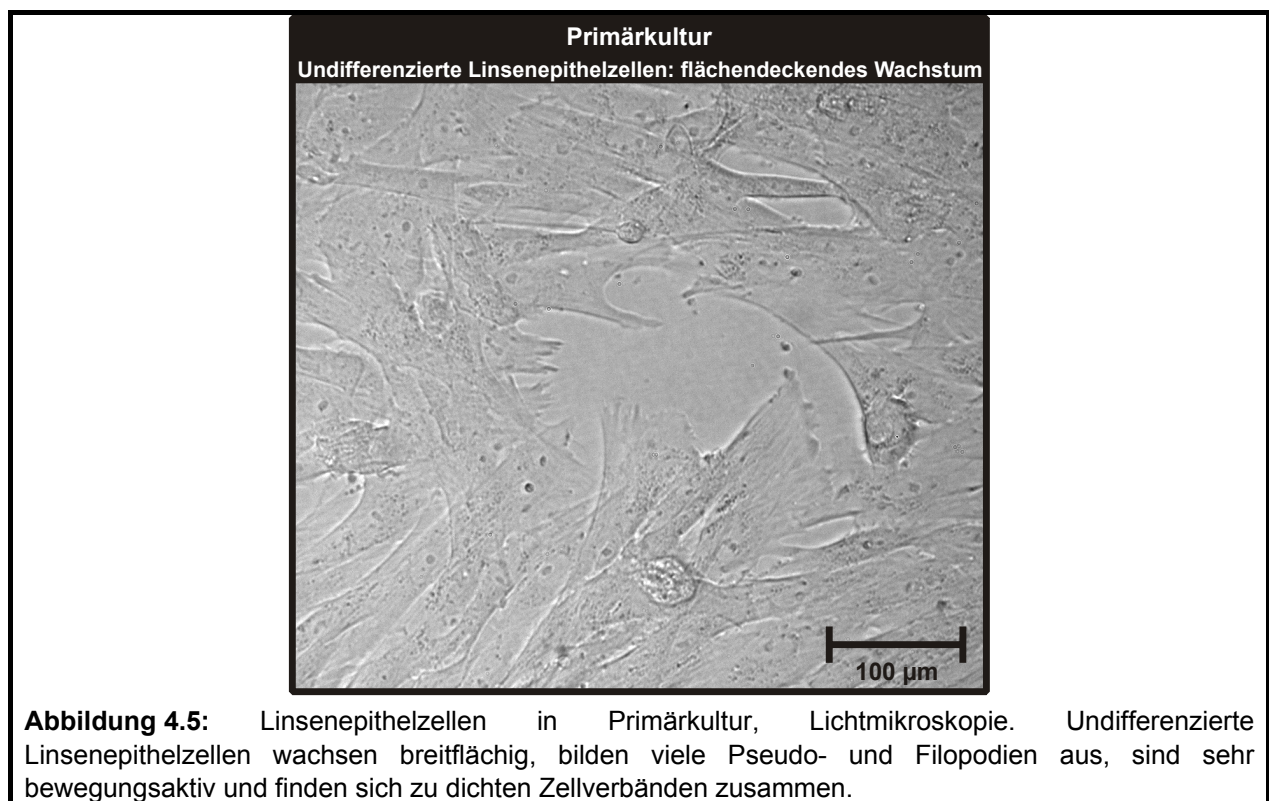
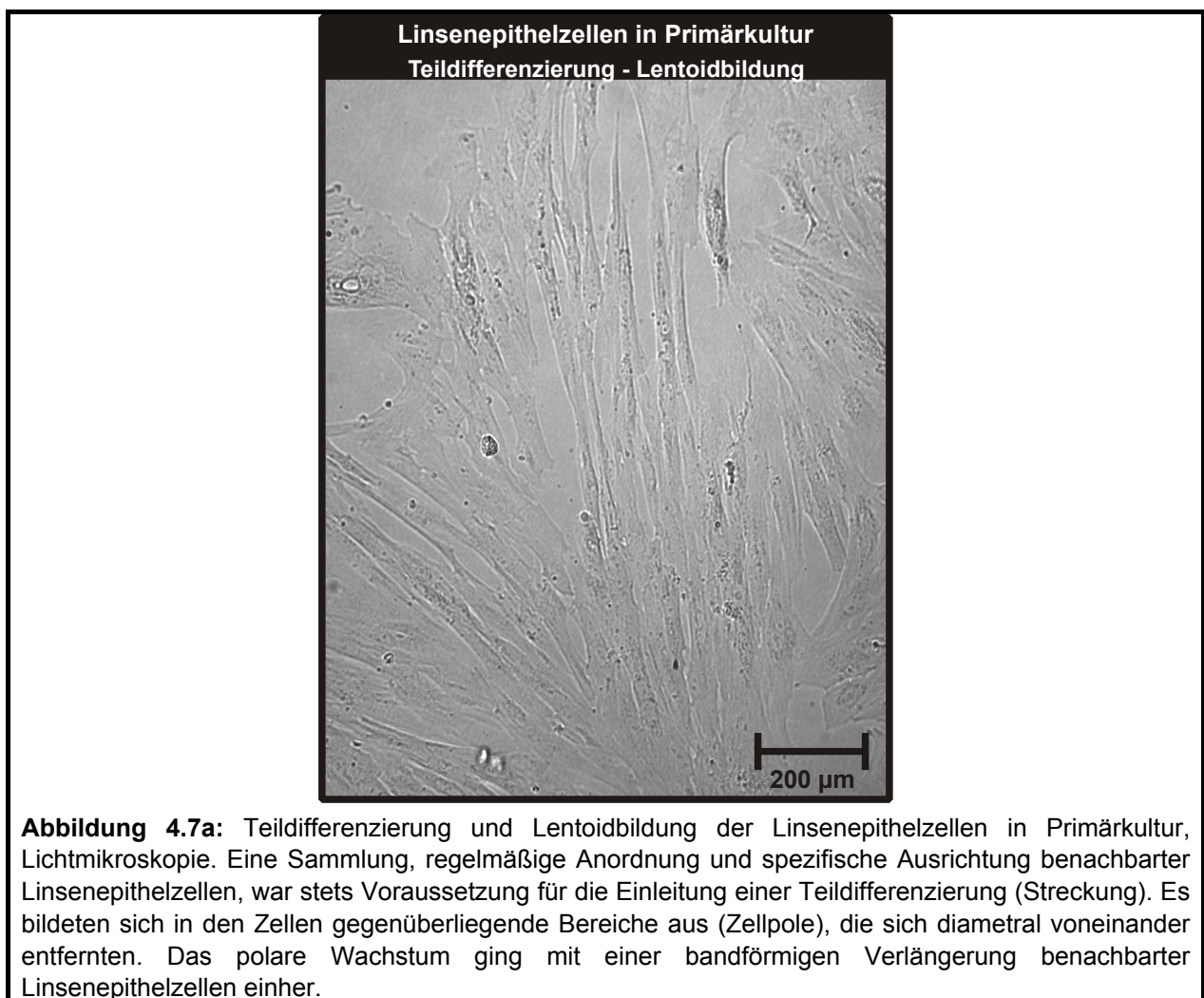
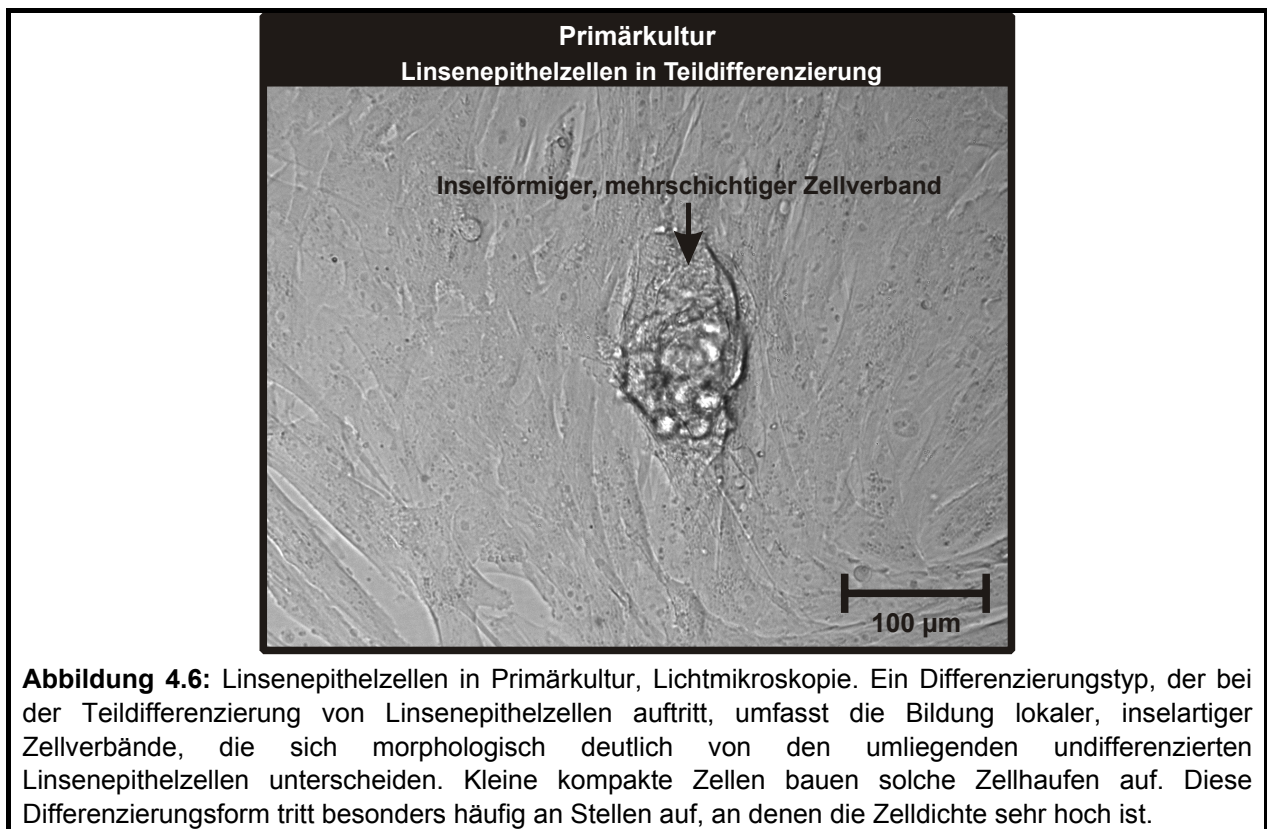
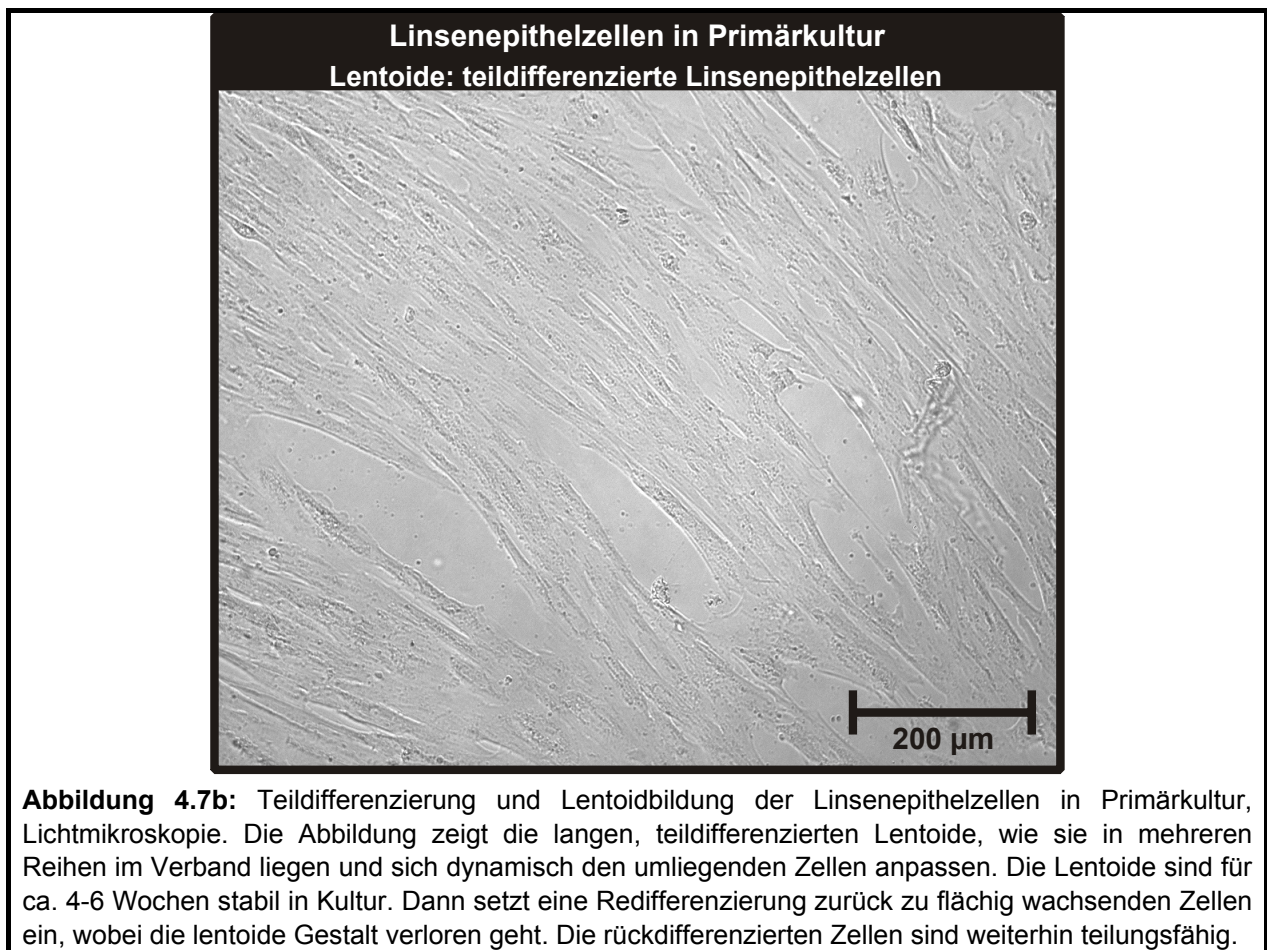


Abbildung 4.5: Linsenepithelzellen in Primärkultur, Lichtmikroskopie. Undifferenzierte Linsenepithelzellen wachsen breitflächig, bilden viele Pseudo- und Filopodien aus, sind sehr bewegungsaktiv und finden sich zu dichten Zellverbänden zusammen.





4.3 Co-Kultur von Linseneithelzellen mit K-562 Leukämiezellen

In einem einfachen Co-Kulturmodell sollte getestet werden, ob Linseneithelzellen das Wachstum von Leukämiezellen negativ beeinflussen. Neben der Tatsache, dass für Linseneithelzellen keine malignen Transformationen und damit verbundene Tumorbildungen beschrieben sind, wird die Augenlinse auch nicht von invasiv wachsenden Tumorzellen befallen. Als entscheidende mechano-chemische Barriere, die die Augenlinse vor einer Invasion von metastasierenden Zellen oder im Auge ausbreitenden Tumoren schützt, wird die Linsenkapsel diskutiert. Es wäre ebenso möglich, dass Linseneithel- und Linsenfaserzellen bestimmte diffusible Substanzen sezernieren oder gewisse Faktoren exprimieren (membrangebundene Oberflächenrezeptoren), die ein Einwachsen von Tumoren in die Augenlinse inhibieren. Bei den K-562 Leukämiezellen handelte es sich um in Suspension (nicht adhären) wachsende Zellen einer humanen, maligne transformierten Zelllinie (CML = chronische myeloische Leukämie).

Die Linseneithelzellen wurden für 2 Wochen kultiviert bis sie einen flächendeckenden Zellverband ausbildeten und mit der Teildifferenzierung begannen. Dann erfolgte für 9 weitere Tage eine Co-Kultivierung mit den Leukämiezellen (**Abb. 4.8**). Hier zeigte sich deutlich, dass die K-562 Leukämiezellen in ihrem Wachstum nicht negativ beeinflusst wurden. Sie vermehrten sich in den Co-Kulturen mit ca. 22 Stunden Verdopplungszeit nahezu ebenso gut wie die Leukämiezellen der Kontrollkultur (nur K-562 Zellen) (**Abb. 4.9**).

Deutlich zu beobachten war, dass während der 9 Tage der Co-Kultur die Dichte der Linseneithelzellen abnahm und viele von ihnen zugrundegingen.

Die Leukämiezellen vermehrten sich stattdessen so stark, dass sie die Co-Kultur eindeutig dominierten. Als Resultat kann somit festgehalten werden, dass die K-562 Leukämiezellen während der Co-Kultur in ihrem Wachstum nicht gehemmt wurden.

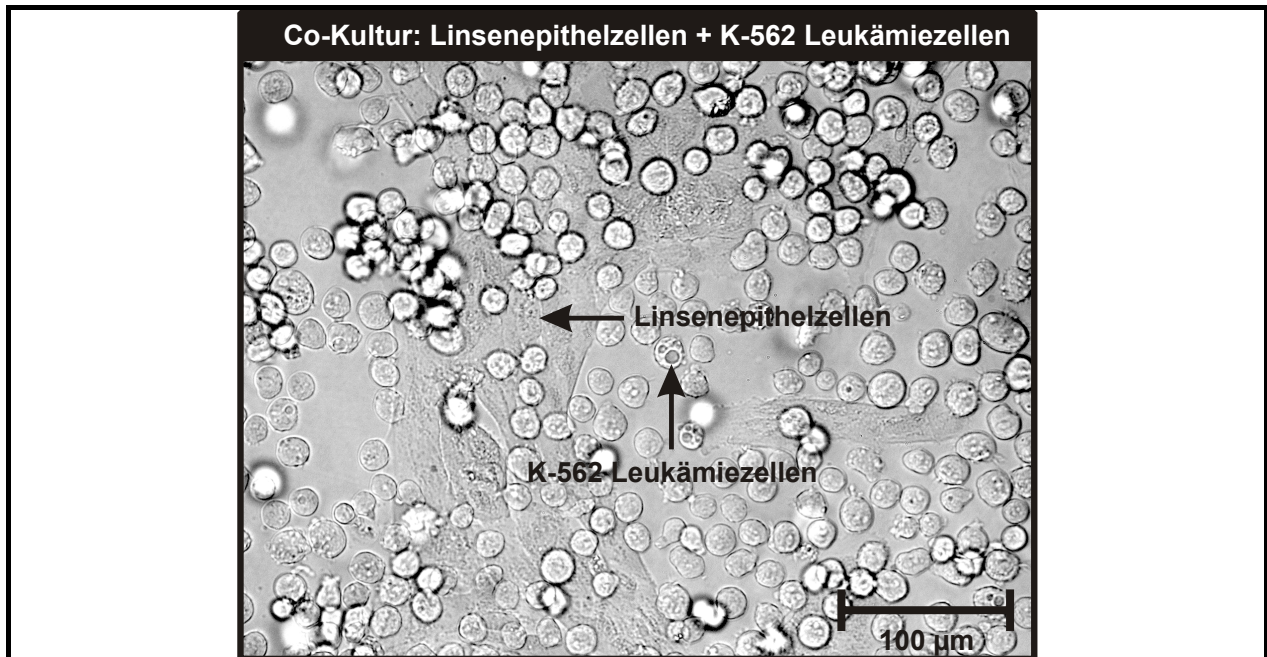


Abbildung 4.8: Co-Kultur von Linsenepithelzellen und K-562 Leukämiezellen, Lichtmikroskopie. Die Leukämiezellen wuchsen als kugelförmige Zellen in Suspension über den adhären wachsenden Linsenepithelzellen. Eine negative Beeinflussung oder Wachstumshemmung der K-562 war nicht nachweisbar. Im Gegenteil dominierten die Leukämiezellen die Co-Kultur deutlich.

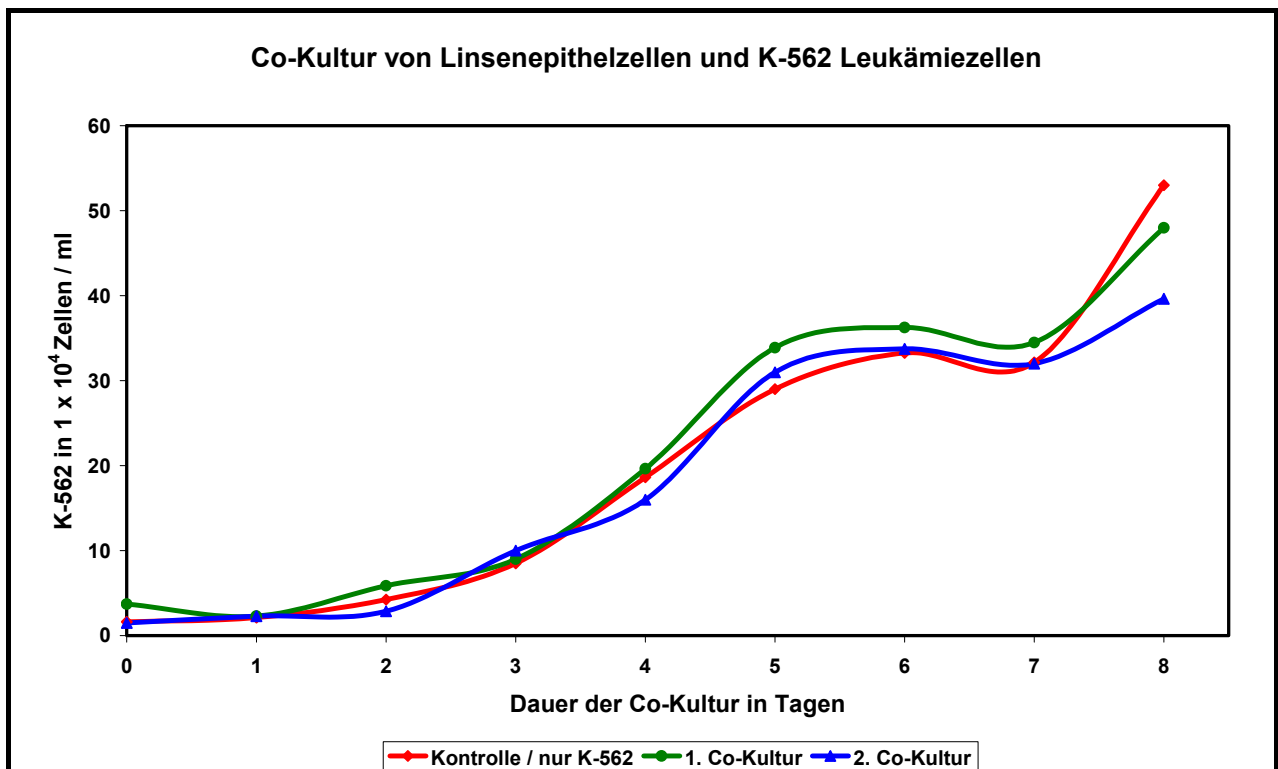


Abbildung 4.9: Co-Kultur von Linsenepithelzellen und K-562 Leukämiezellen. Wachstumskurven der K-562 Leukämiezellen. In der Kontrolle (rot) teilten sich die Leukämiezellen ca. alle 22 Stunden. Die Co-Kulturen (grün + blau) zeigten Wachstumskurven die denen der Kontrolle entsprachen. Eine Hemmung der K-562 bezüglich ihrer Teilungsaktivität wurde nicht festgestellt.

4.4 Co-Kultur von Linsenepithelzellen mit Endothelzellen (HMEC-1)

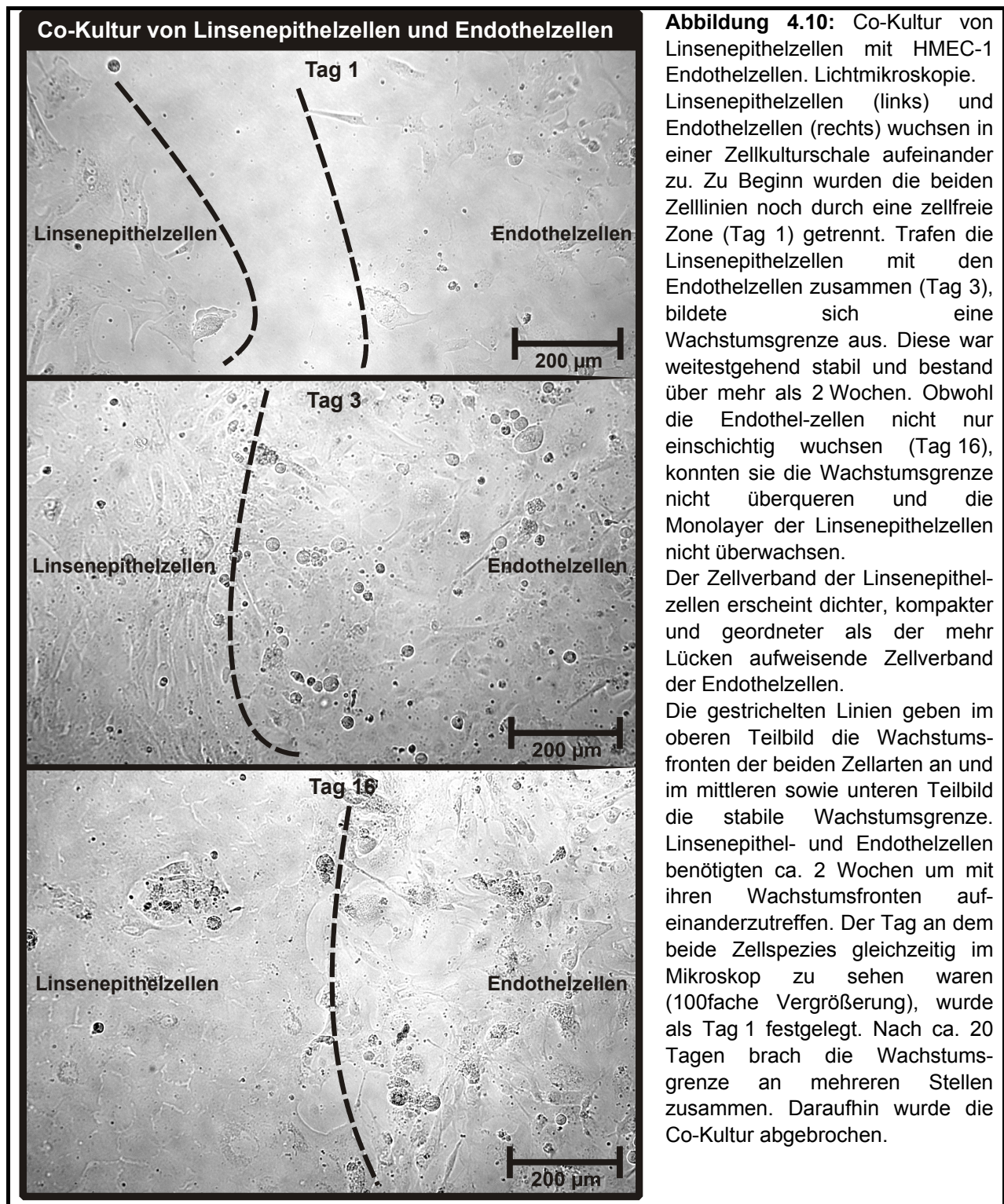
Die Augenlinse scheint eine hochwirksame und stabile Grenze für invasiv wachsende Gewebe auszubilden. So wie ein pathogenes Einwachsen von unkontrolliert wuchernden Zellen bisher nicht beobachtet werden konnte, so wachsen in die gesunde Augenlinse auch keine Blutgefäße und Nerven ein. Die fehlende Vaskularisierung und nervale Innervation während der embryonalen und postnatalen Entwicklung wird wiederum auf die Linsenkapsel als mechano-chemische Barriere zurückgeführt. Auch hier stellt sich die Frage inwieweit die Zellen der Augenlinse die Ausbildung einer Grenzfunktion mit beeinflussen und ob sie an deren Aufrechterhaltung beteiligt sind.

In einem einfachen Co-Kultursystem sollte das Auftreten einer Wachstumsgrenze zwischen Linsenepithel- und Endothelzellen überprüft werden. HMEC-1 ist eine humane Zelllinie von immortalisierten, microvaskulären Endothelzellen. Die Ursprungszellen dieser Linie sind Endothelzellen (HMEC) die im Körper direkt an der Gefäßneubildung (Angiogenese) und dem Einwachsen von Kapillaren in Gewebe beteiligt sind. Für die Zellkultur etablierte langlebige Endothelzellen dieser Linie (HMEC-1) wachsen adhärent, sehr dicht und sehr dominant in Zellkultur. Weiterhin haben sie die Fähigkeit behalten, in Kultur auf einem Extrazellulären-Matrix-Substrat kleine, kapillarähnliche Röhren zu bilden.

Die Linsenepithelzellen und die Endothelzellen (HMEC-1) wurden so in eine Zellkulturschale eingebracht, dass auf der einen Seite ausschließlich Linsenepithelzellen und auf der anderen Seite nur Endothelzellen adhärten. Zwischen den beiden Zellarten war ein Silikonblock in die Kulturschale eingesetzt, der als Trennungszone und mechanische Wachstumsbarriere fungierte. Nachdem sich Linsenepithel- und Endothelzellen auf ihrer jeweiligen Seite vollständig festgesetzt und flächendeckende Zellverbände etabliert hatten, wurde der Silikoneinsatz entfernt. Eine zellfreie Zone (Spalt von ca. 5 mm) trennte nun die Zellen voneinander und sie konnten von da an mechanisch ungehindert wachsen. Es wurden ihre gegenseitige Annäherung und Interaktion beobachtet und bewertet.

Als die Linsenepithelzellen und die Endothelzellen mit ihren Wachstumsfronten zusammentrafen, bildeten sie eine Wachstumsgrenze aus, die im Folgenden über mehr als zwei Wochen stabil bestehen blieb (**Abb. 4.10**). Diese Wachstumsgrenze stellte eine Barriere dar, die von keiner der beiden Zellarten überquert wurde. Obwohl die Endothelzellen auf ihrer Seite der Grenze nicht nur einschichtig, sondern mehrheitlich auch übereinander wuchsen, konnten sie die Grenze und die Linsenepithelzellen nicht überwachsen.

Des Weiteren kam es mehrmals vor, dass Zellen beider Zellarten, die direkt an der Wachstumsgrenze lagen, zugrundegingen und die Grenze dadurch lokal zusammenbrach. Sie wurde jedoch von nachfolgenden Zellen wieder reorganisiert, so dass sie im Ganzen bestehen blieb. Diese Wachstumsgrenze hat sich während ihres Bestehens geringfügig zur Seite der Endothelzellen hin verschoben. Es war deutlich zu beobachten, dass die Linsenepithelzellen auf ihrer Seite der Wachstumsbarriere einen kompakteren und dichteren einschichtigen Zellverband ausbildeten, als die oftmals in zwei Zelllagen übereinander wachsenden Endothelzellen. Die beiden Zellarten waren nicht über die gesamte Länge der Wachstumsgrenze durchgehend in direktem Kontakt. Ab und zu trennte sie ein schmaler Spalt. Nach ca. 20 Tagen verlor die Wachstumsgrenze ihre Stabilität und brach mehrfach lokal zusammen, einhergehend mit dem Absterben der meisten Zellen in dichter Nähe zu ihr. An solchen Stellen wuchsen die beiden Zellarten ohne erkennbares Muster durcheinander.



4.5 Strukturelle Eigenschaften des Cytoskeletts in Linsenzellen

Das Cytoskelett der eukaryotischen Zellen ist ein funktionelles System, bestehend aus **drei** Teilsystemen filamentöser Makromolekülkomplexe. Diese setzen sich jeweils aus mehreren Protofilamenten zusammen die wiederum aus monomeren und dimeren Strukturproteinen aufgebaut sind. Die drei Teilsysteme sind in den daraufhin untersuchten Zellen essentiell und elementar für Morphogenese, intrazellulären Transport, Bewegung und Kontraktibilität, Mitose, Interaktion mit anderen Zellen und dem Substrat (Extrazelluläre Matrix), Differenzierung etc.

Die verschiedenartigen Elemente (**Tab. 4.2**) des Cytoskeletts gewährleisten diese Funktionen in unterschiedlichem Ausmaß.

Tabelle 4.2: Elemente des Cytoskeletts

Filamentöser Makromolekülkomplex	Strukturproteine (Molekulargewicht)	Polymere Form (Dicke)
F-Aktin-Mikrofilamente	Globuläres G-Aktin (42 kDa)	Primär unverzweigte Filamente (6 nm)
Intermediär-Filamente	Variabel (meist über 40 kDa)	Unverzweigte Filamente (10 – 15 nm)
Mikrotubuli	α - β -Tubulin Heterodimer (2 x 50 kDa)	Unverzweigte Hohlzylinder (25 nm)

Um das Verteilungsmuster der Mikrotubuli und der Aktin-Mikrofilamente in den sekundären Linsenfaserzellen zu erfassen und zu verstehen, wurden diese cytoskelettalen Anteile auch in den Linsenepithelzellen und Lentoiden (Primärkulturen) untersucht. So konnte eine eventuelle Umstrukturierung der filamentösen Proteinpolymere in undifferenzierten Linsenepithelzellen, über in Teildifferenzierung befindlichen Lentoiden hin zu sekundären Linsenfaserzellen nachgewiesen werden. Zur Darstellung wurden spezifische fluoreszenzmarkierte Antikörper und das Toxin Phalloidin (spezifisch für F-Aktin) verwendet.

4.5.1 Morphologische Eigenschaften des Cytoskeletts von Linsenepithelzellen & Lentoiden

Es zeigte sich, dass die in Primärkultur wachsenden Linsenepithelzellen ein komplexes F-Aktin Cytoskelett ausbilden, das netzwerkartig die Zelle durchzieht (**Abb. 4.11**). Mehrere F-Aktin Filamente traten gebündelt auf und bildeten Stressfasern aus. Neben unverzweigten Mikrofilament-Bündeln kamen ebenso Verzweigungspunkte vor (Aktin-Bindeproteine?). In der Regel bildeten Aktin-Filamente auch subcortikale (unter der Zellmembran) Verdichtungen aus, die die Zellperipherie auskleideten. Diese submembranösen Verdichtungen erschienen nicht stärker gebündelt als die übrigen cytoplasmatischen Mikrofilamente.

Über das Phalloidin wurden auch Mikrofilament-Bündel detektiert, die an ihren peripheren Enden lokale Verdickungen aufwiesen (**Abb. 4.11**). Es könnte sich hierbei um Fokalkontakte (Interaktionspunkte der Zelle mit der Extrazellulären Matrix, dem Substrat bzw. Boden der Kulturschale) handeln. Das F-Aktin Muster in den Linsenepithelzellen entsprach einer Anordnung die typisch ist für kultivierte Epithelzellen.

Ähnlich war die Verteilung des mikrotubulären Cytoskeletts von Linsenepithelzellen in Primärkultur organisiert. Ausgehend von einer hohen Dichte in der Nähe des Zellkerns bildeten die Mikrotubuli ein komplexes Netzwerk, welches die gesamte Zelle durchzog (**Abb. 4.12**). Dieses Muster war wieder typisch für die Anordnung von Mikrotubuli in kultivierten Epithelzellen.

Parallel zu den Mikrotubuli wurde auch das Motorprotein Kinesin über Antikörper nachgewiesen. Es sollte später Hinweise auf dessen Verteilung in den sekundären Linsenfaserzellen liefern und Aussagen zu einem intrazellulären Stofftransport in diesen Zellen ermöglichen. Für die Linsenepithelzellen konnte das Kinesin-Muster in deutlicher Ähnlichkeit zum Mikrotubuli-Muster nachgewiesen werden (**Abb. 4.12**). Dabei ist das Kinesin größtenteils als punktiertes Filamentmuster und nur geringfügig als größere Spots (Bindung an Transportvesikel, siehe Verteilung in Lentoiden) nachzuweisen. Das Auftreten einer Filament-ähnlichen Verteilung ist durch die funktionelle Bindung des Kinesin an die Mikrotubuli zu erklären.

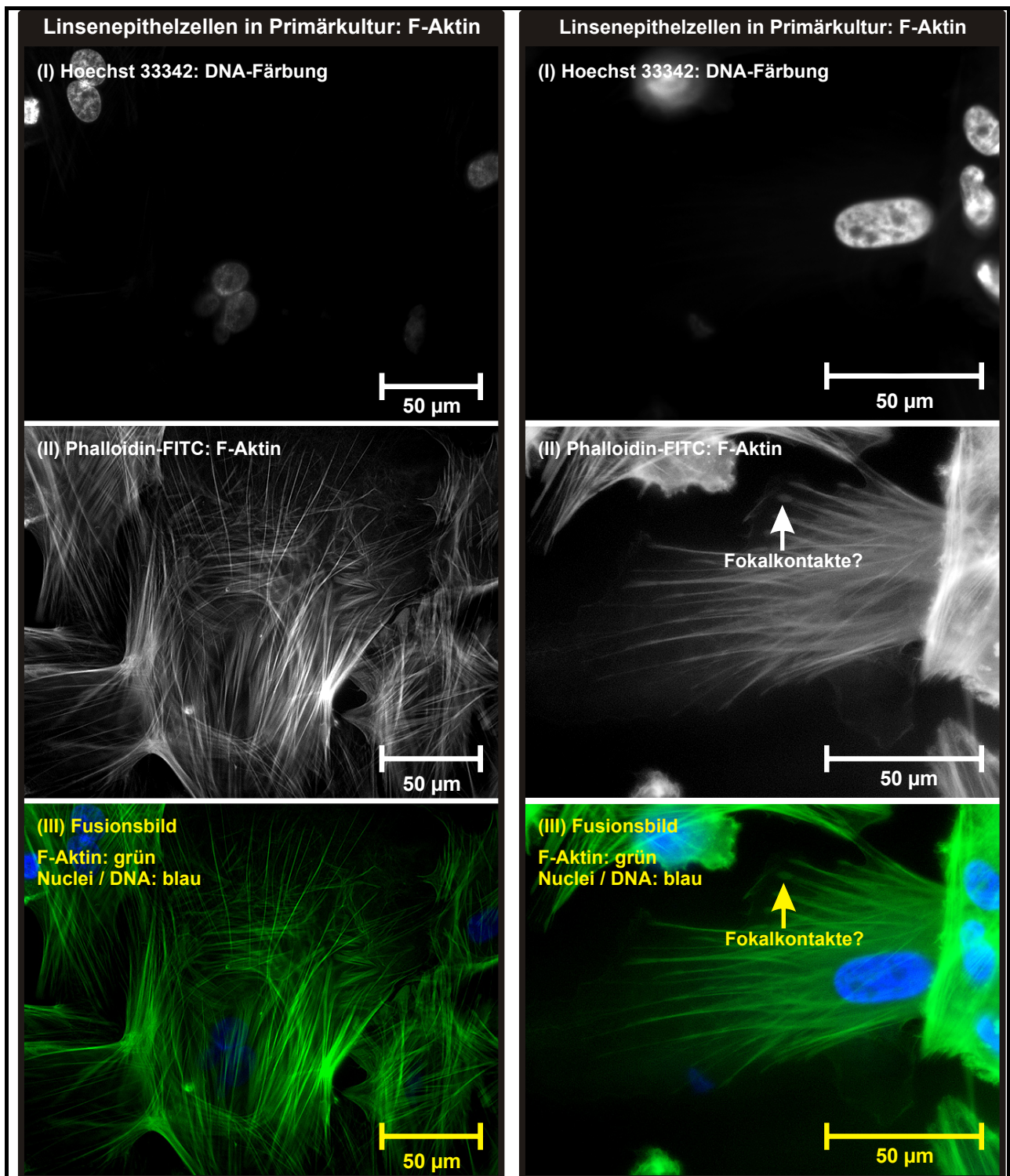
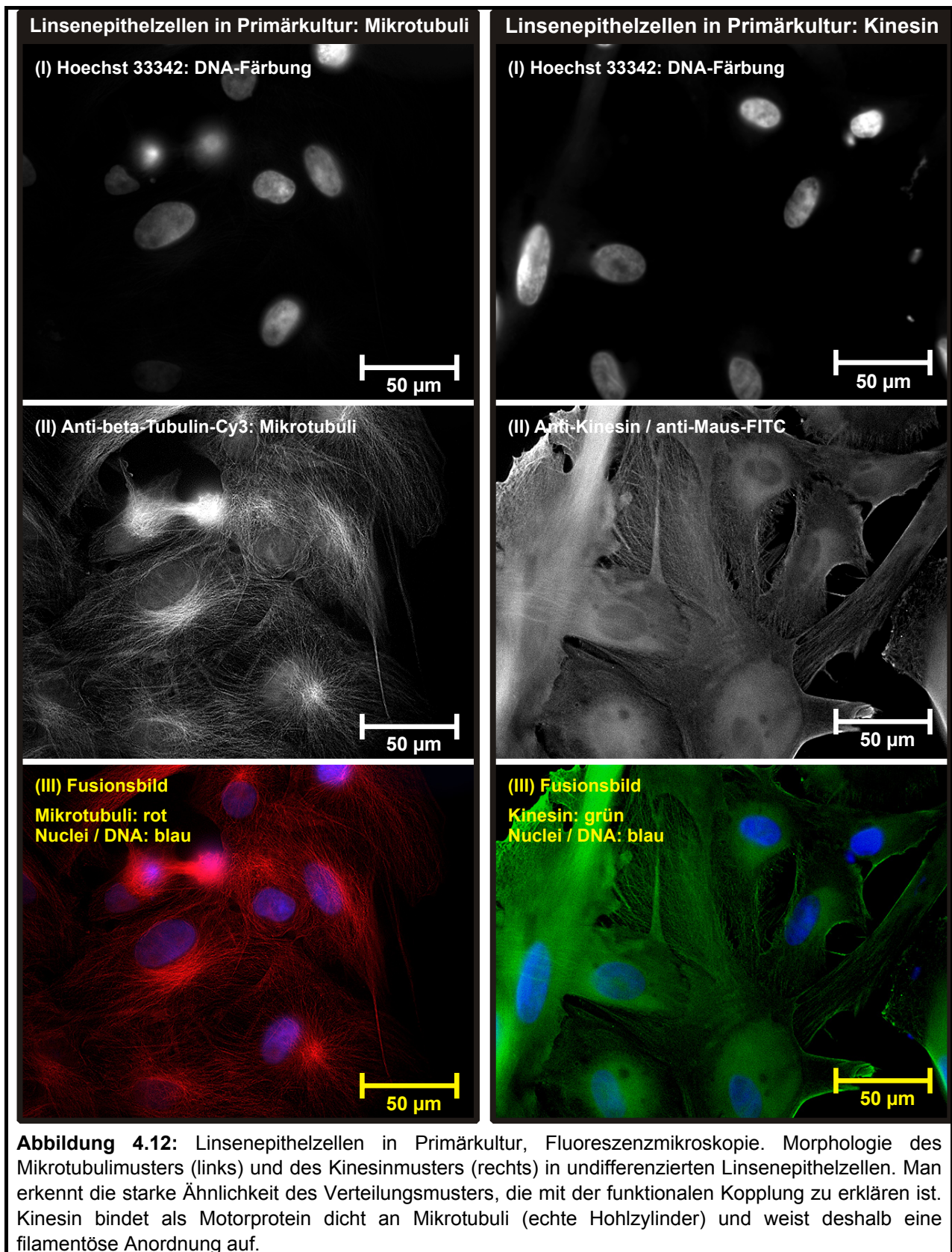
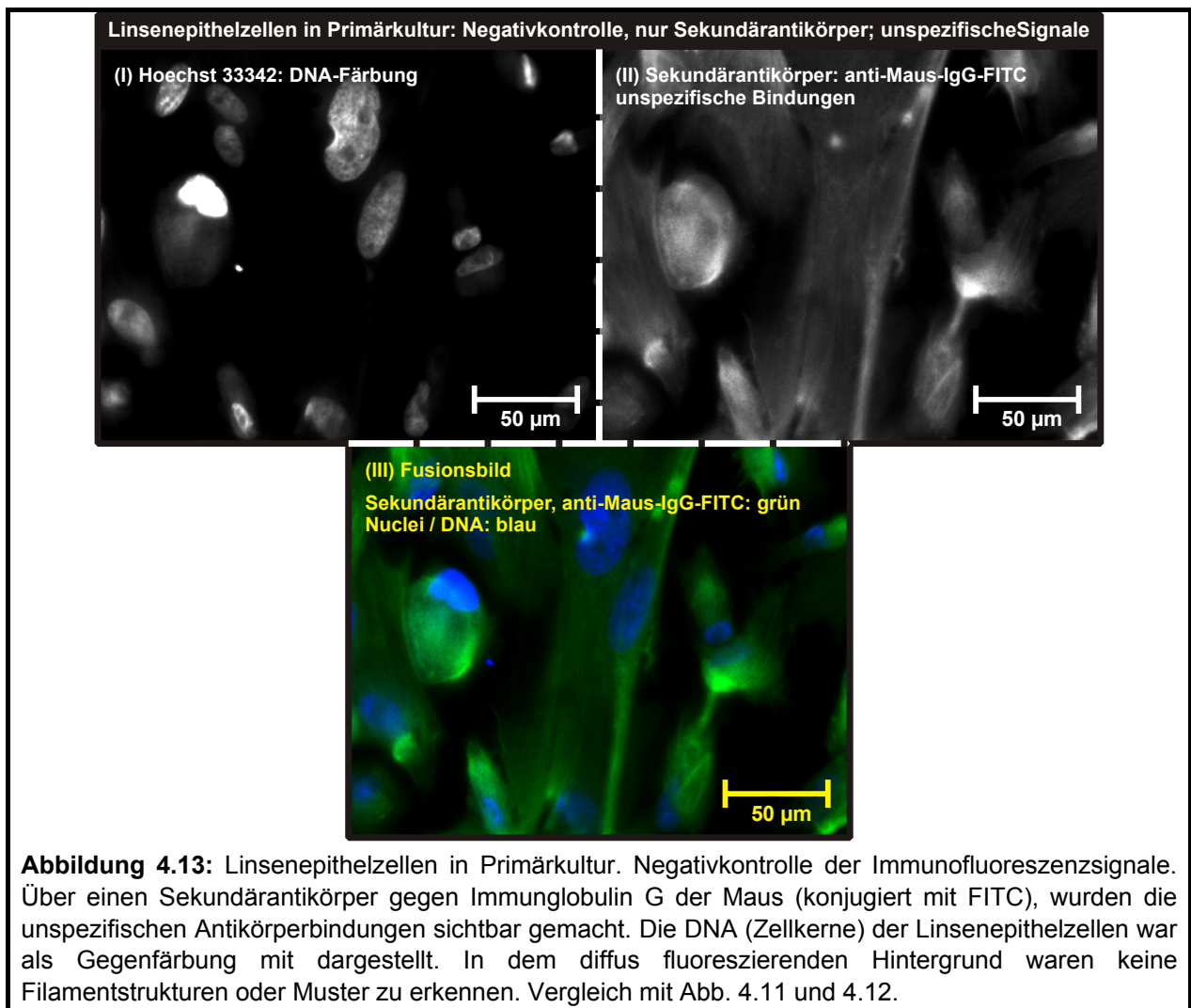


Abbildung 4.11: Linsenepithelzellen in Primärkultur und ihr F-Aktin Cytoskelett, Fluoreszenzmikroskopie. Deutlich treten die gebündelten Mikrofilamente hervor. Sie ziehen durch die gesamte Zelle. Einige der auflösbaren Mikrofilament-Bündel wiesen lokal verdickte Endbereiche auf (Hinweis auf Fokalkontakte). Die Bilder zeigen jeweils das Signal für die DNA (Nuclei, oben), das Signal für das F-Aktin (Mitte) und ein Fusionsbild (unten).



Die in den Linseneithelzellen detektierten Verteilungsmuster der F-Aktin-Mikrofilamente, der Mikrotubuli und des Kinesin wurden als spezifisch betrachtet. Die Negativ-Kontrollen, die unspezifische Antikörperbindungen aufzeigen sollten, ließen nur einen diffusen Hintergrund erkennen. In dieser Hintergrundfluoreszenz waren keine Filamente nachzuweisen (**Abb. 4.13**). Ein Sekundäntikörper gegen Immunglobuline der Maus diente als unspezifischer Marker.



Die Teildifferenzierung von Linseneithelzellen zu **Lentoiden** in Primärkultur geht mit charakteristischen morphologischen Änderungen der Cytoskelettarchitektur einher.

F-Aktin-Mikrofilamente erfuhren eine Bündelung und Verlagerung in Nähe der Zellmembran.

Das Aktin-Mikrofilament-Netzwerk wurde der länglichen Erscheinungsform der lentoiden Zellen in der Art und Weise angepasst, dass F-Aktin-Filamente mehrheitlich aus dem zentralen Cytoplasma verschwanden und in periphere Bereiche der Zelle, membrannah, verlagert wurden. Die Aktin-Mikrofilamente wurden dabei so dicht an die Innenseite der Zellmembran angelagert, dass der Eindruck eines verdichteten, submembranösen Aktin-Filament-Netzwerkes entstand. Es konnten nur noch wenige einzelne Aktin-Mikrofilament-Bündel aufgelöst werden, die, wenn vorhanden, als lange Stränge durch die lentoiden Zelle zogen, parallel zu deren Längsachse (**Abb. 4.14**).

Das mikrotubuläre Cytoskelett erfuhr ebenfalls eine Anpassung an die lentoiden Erscheinungsform der teildifferenzierten Linseneithelzellen. Mehrheitlich zogen die Mikrotubuli parallel zur Längsachse der Lentoiden durch das Cytoplasma. Jedoch wurden sie nicht auf Bereiche dicht unter der Zellmembran beschränkt (im Gegensatz zu den Aktin-Filamenten), sondern kamen verteilt im gesamten Cytoplasma vor (von zentralen Bereichen bis membrannah). Diese deutliche Längsausrichtung der Mikrotubuli ging mit einer teilweisen Verdichtung einher. Es war zu beobachten, dass in den lentoiden Zellen Bereiche auftraten, an denen stärker verdichtete Mikrotubuli neben weniger stark verdichteten vorkamen (**Abb. 4.15**).

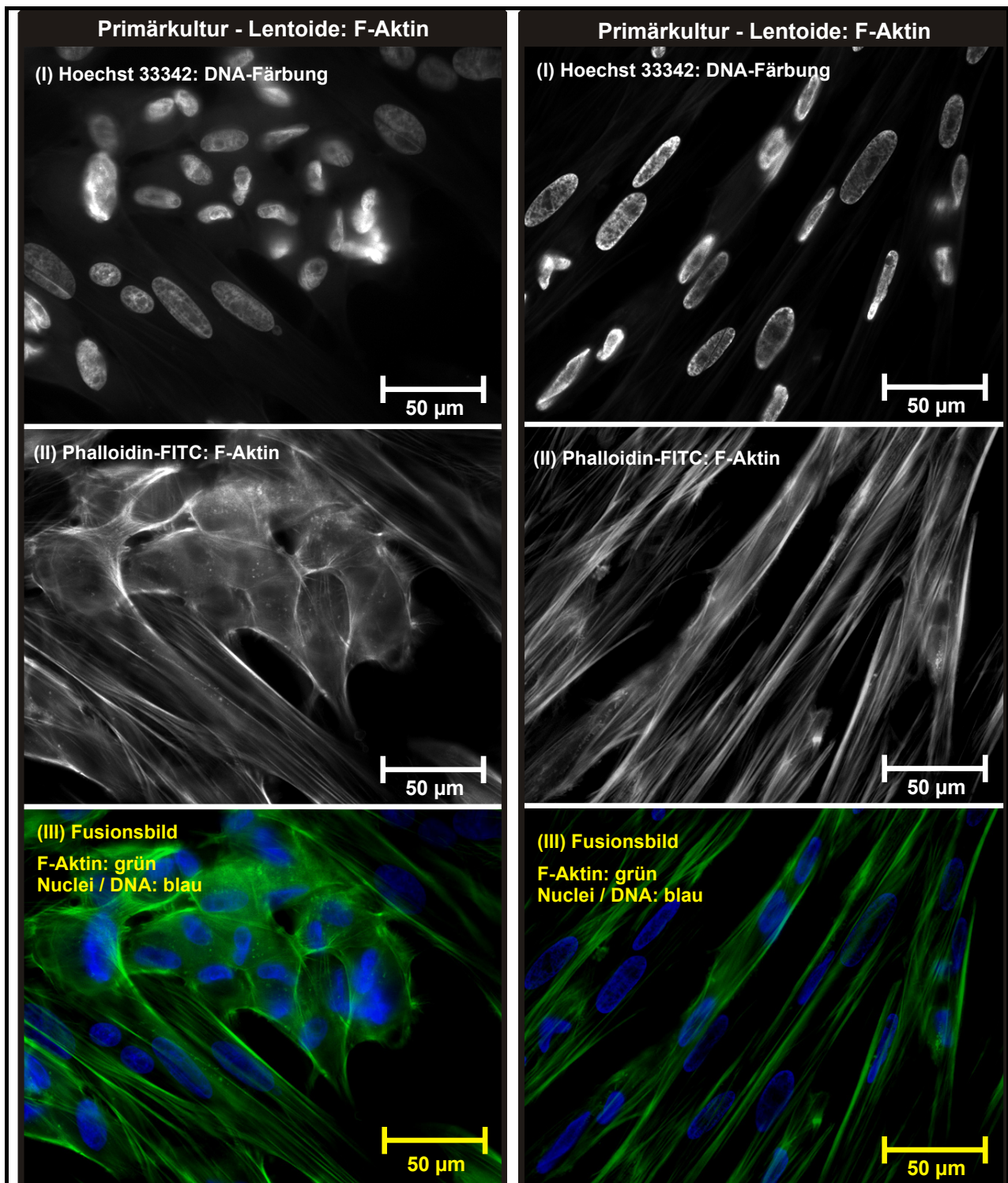


Abbildung 4.14: Lentoide in Primärkultur, Fluoreszenzmikroskopie. Das F-Aktin Cytoskelett in teildifferenzierten Linsenepithelzellen. Die Mikrofilamente traten gebündelt und dicht an die Zellmembran angelagert auf. Sie wurden in membrannahen Bereiche verlagert und angeordnet. Im zentralen Cytoplasma waren nur noch vereinzelt F-Aktin-Bündel zu finden die, wenn vorhanden, eine gewisse Längsausrichtung erfuhren. Die Zellkerne (Nuclei) passen sich der Form der lentoiden Zelle an und bilden flache, langgestreckte Ellipsoide. Die linke Bildreihe zeigt Lentoide und benachbarte, nicht verlängerte Linsenepithelzellen. Die rechte Bildreihe zeigt Lentoide die schon ca. 3 Wochen stabil in Primärkultur existieren.

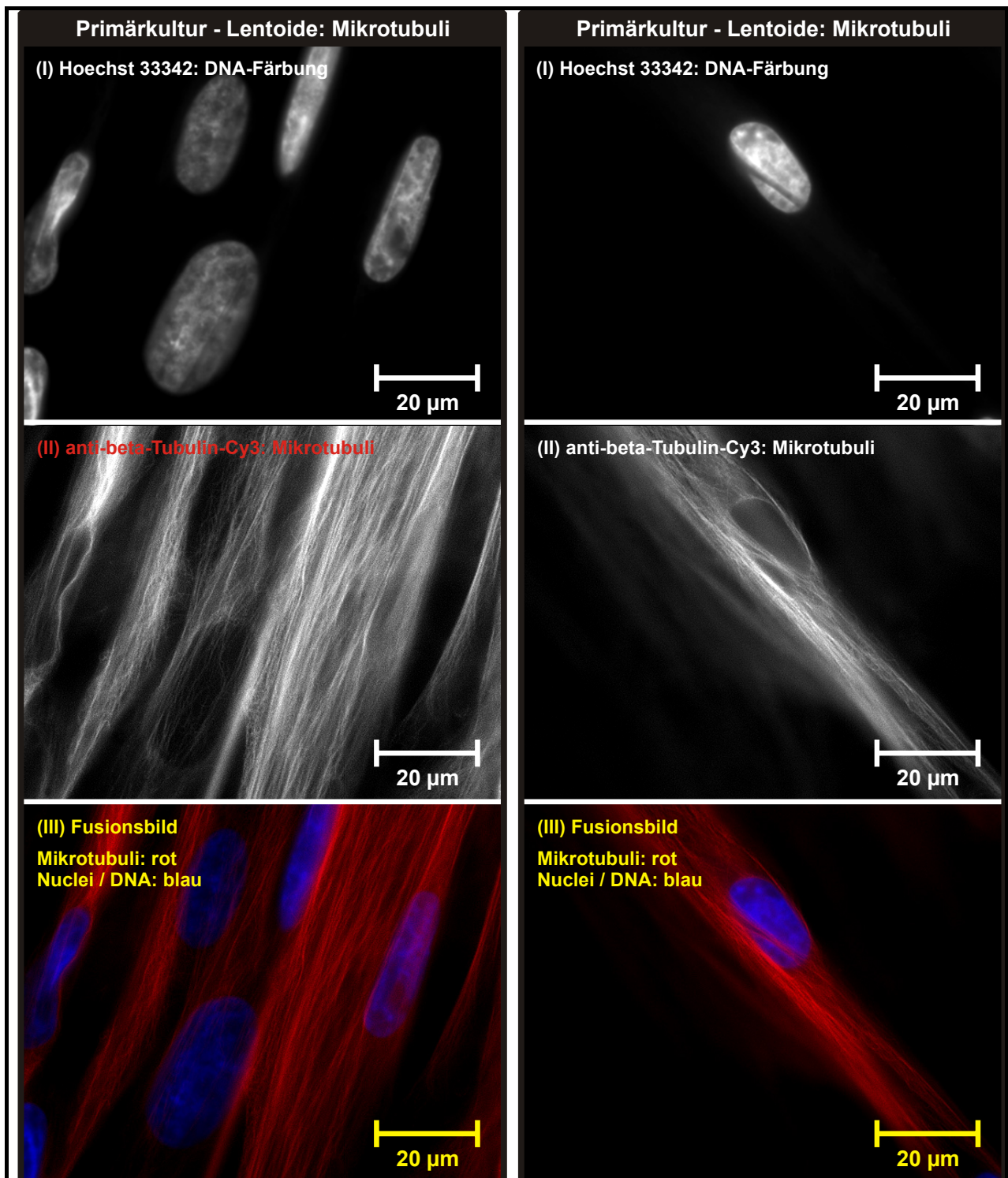


Abbildung 4.15: Lentoide in Primärkultur, Fluoreszenzmikroskopie. Das mikrotubuläre Cytoskelett in Lentoiden. Die Mikrotubuli zogen überwiegend entlang der Längsachse durch die Zelle. Im Gegensatz zu den Aktin-Mikrofilamenten waren sie nicht beschränkt auf submembranöse Bereiche, sondern kamen mehrheitlich in Längsausrichtung im gesamten Cytoplasma vor. Die Zellkerne sind wiederum abgeflacht und länglich ellipsoid.

Für die Lentoide offenbarte sich ebenfalls eine Veränderung in der nachweisbaren Kinesin-Verteilung. Während Kinesin in den undifferenzierten Linsenepithelzellen meist eine filamentöse Anordnung (funktionelle Bindung an Mikrotubuli) aufwies, ist diese Verteilung in den Lentoiden unterrepräsentiert. Dagegen wird das Kinesin in Lentoiden überwiegend in kugelförmigen Spots (Bindung an Vesikel?) im gesamten Cytoplasma detektiert (**Abb. 4.16**).

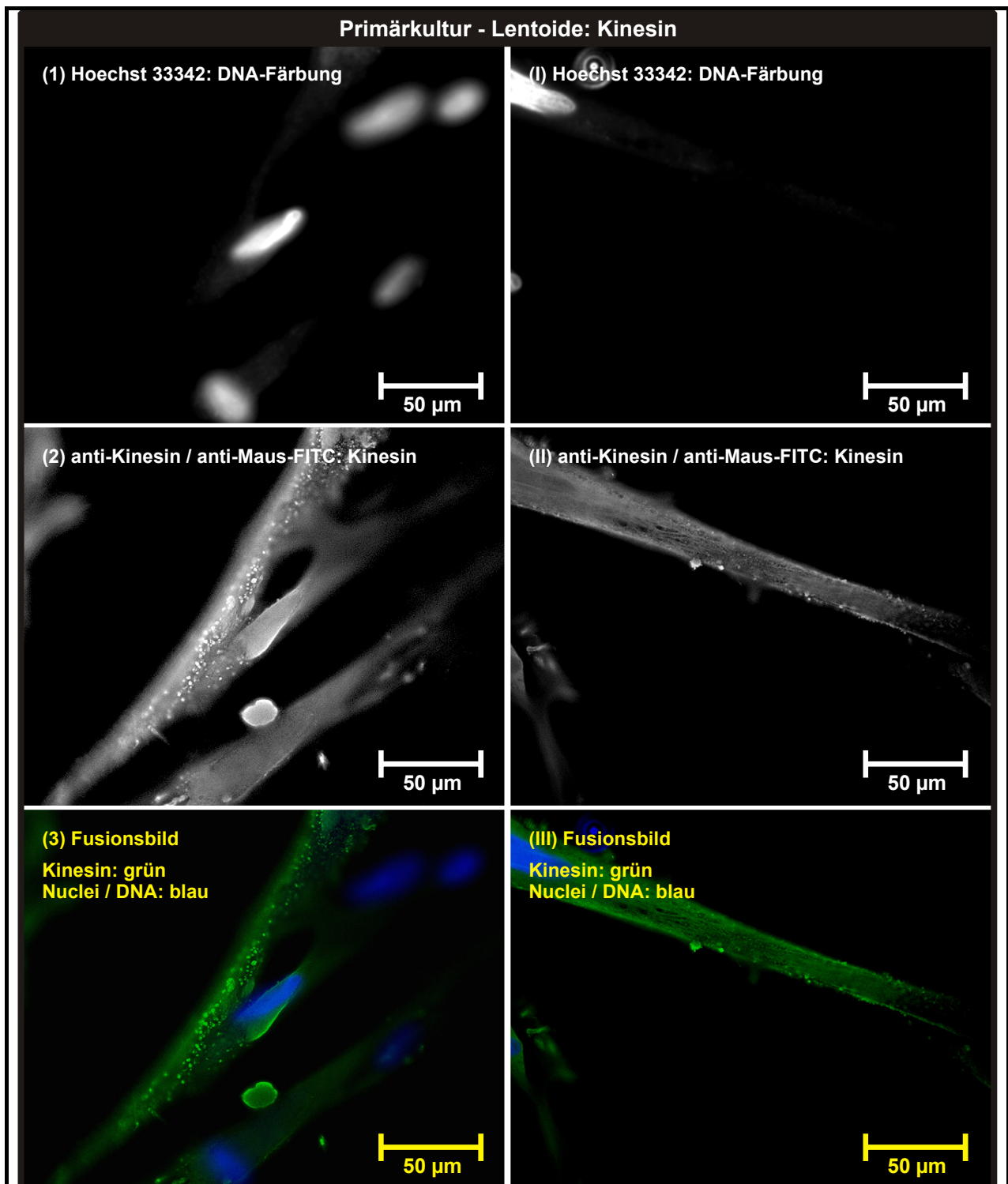
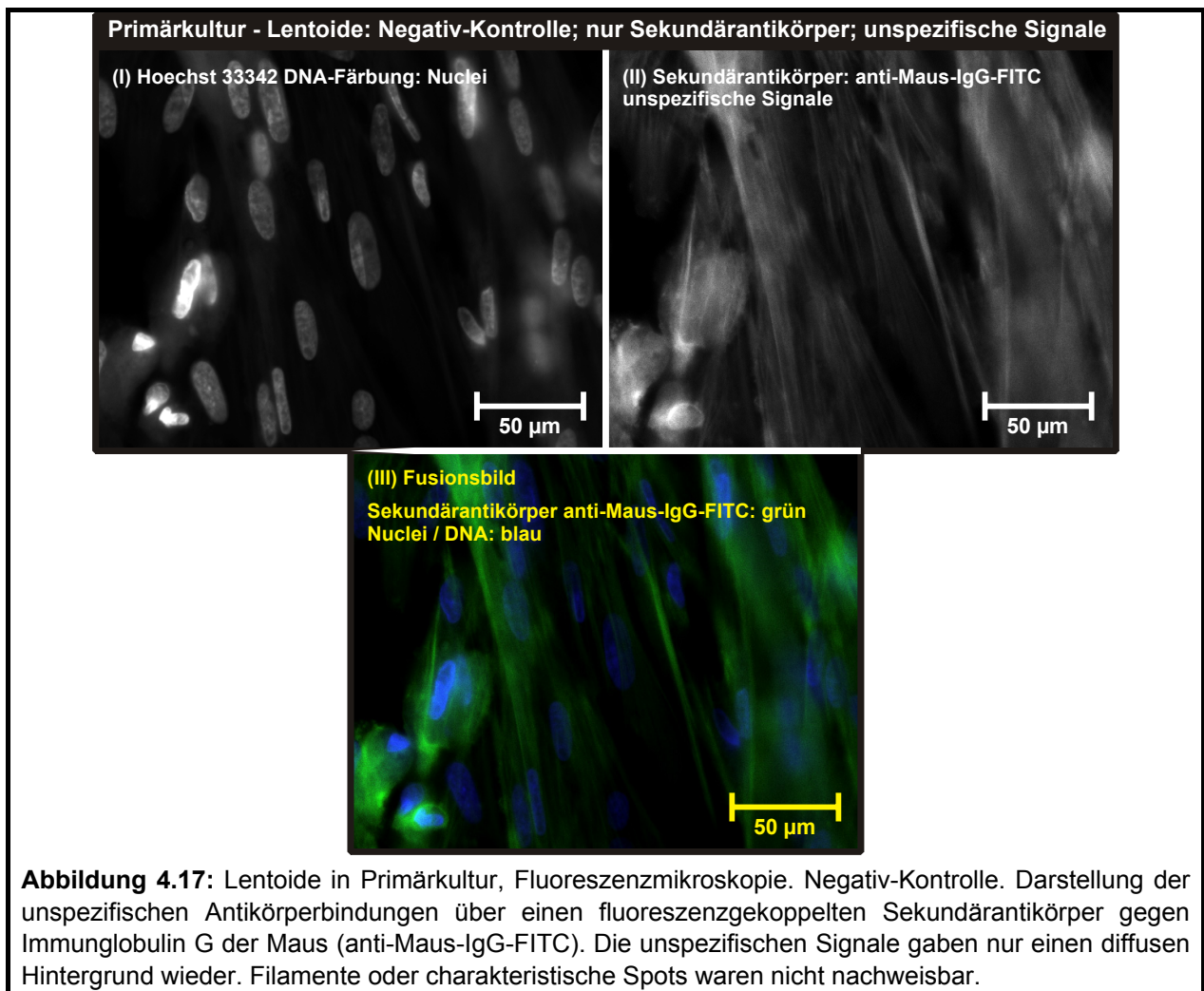


Abbildung 4.16: Lentoide in Primärkultur, Fluoreszenzmikroskopie. Die Verteilung von Kinesin in Lentoiden. Das Kinesin wurde zum überwiegenden Teil als vesikuläre Spots detektiert (linke Bildreihe). Die vesikulären Strukturen mit den Kinesinsignalen lagen dabei stochastisch in der Zelle verteilt und zeigten keine spezifische Anordnung. Das unterbrochene Filamentmuster des Kinesin, wie es in den undifferenzierten Linsenepithelzellen gefunden wurde, war in den Lentoiden zwar nachweisbar, aber deutlich unterrepräsentiert (rechte Bildreihe).

Die detektierten Verteilungsmuster für F-Aktin, Mikrotubuli und Kinesin wurden als spezifisch für Lentoide (teildifferenzierte Linsenepithelzellen) gewertet. Sie unterschieden sich deutlich von den Negativ-Kontrollen (unspezifische Signale), die nur einen diffusen Hintergrund, ohne erkennbare Filamente oder filamentöse bzw. vesikuläre Strukturen, offenbarten (**Abb. 4.17**).



4.5.2 Die Augenlinse im histologischen Gewebeschnitt

Um von den Linsenepithelzellen und Lentoiden der Primärkultur zur Untersuchung der natürlichen Organisation des Cytoskeletts in Linsenfasern zu übergehen, wurden zunächst histologische Schnitte (Kryo-Schnitte) von der Augenlinse angefertigt. Dies ermöglichte, die Zellen der Linse in ihrer natürlichen Anordnung im Zellverband erfassen zu können sowie die Architektur des Cytoskeletts in benachbarten Faserzellen darzustellen.

Dazu wurde die entnommene Augenlinse physikalisch fixiert (Kryo-Immobilisierung) und in einem Kryotom bei -16 °C geschnitten. Diese Quer- und Längsschnitte waren 15 – 20 Mikrometer dick. In den Kryo-Schnitten konnten die noch in Übergangsstadien befindlichen Linsenfasern anhand des Kernbogens sehr gut dargestellt werden. In der gesunden Augenlinse differenzieren sich in der äquatorialen Bildungszone Linsenepithelzellen zu Linsenfasern (siehe Einleitung **Abb. 1.1**). Der Differenzierungsprozess schließt eine deutliche morphologische Veränderung ihrer Zellkerne ein. Die hier erhaltenen Ergebnisse bestätigten dies. Während die Interphasekerne der undifferenzierten Linsenepithelzellen als rund und kugelförmig erschienen, waren die Kerne der Übergangsstadien zu Linsenfasern ellipsoid abgeflacht (**Abb. 4.18**). Sie bildeten den Kernbogen (**Abb. 1.1**) der dann abrupt abbrach. Die folgenden Fasern waren kernlos und damit ausdifferenzierte sekundäre Linsenfasern. Sie konnten klar von den Übergangsstadien abgegrenzt werden, ließen jedoch nach spezifischer Markierung keine Mikrofilamente oder Mikrotubuli erkennen.

Dagegen waren Signale für F-Aktin und Tubulin in sekundären Linsenfaserzellen der Kryo-Schnitte stets nur in wandnahen Bereichen, angelagert an die Innenseiten der Zellmembranen nachzuweisen (Abb. 4.18 + 4.19).

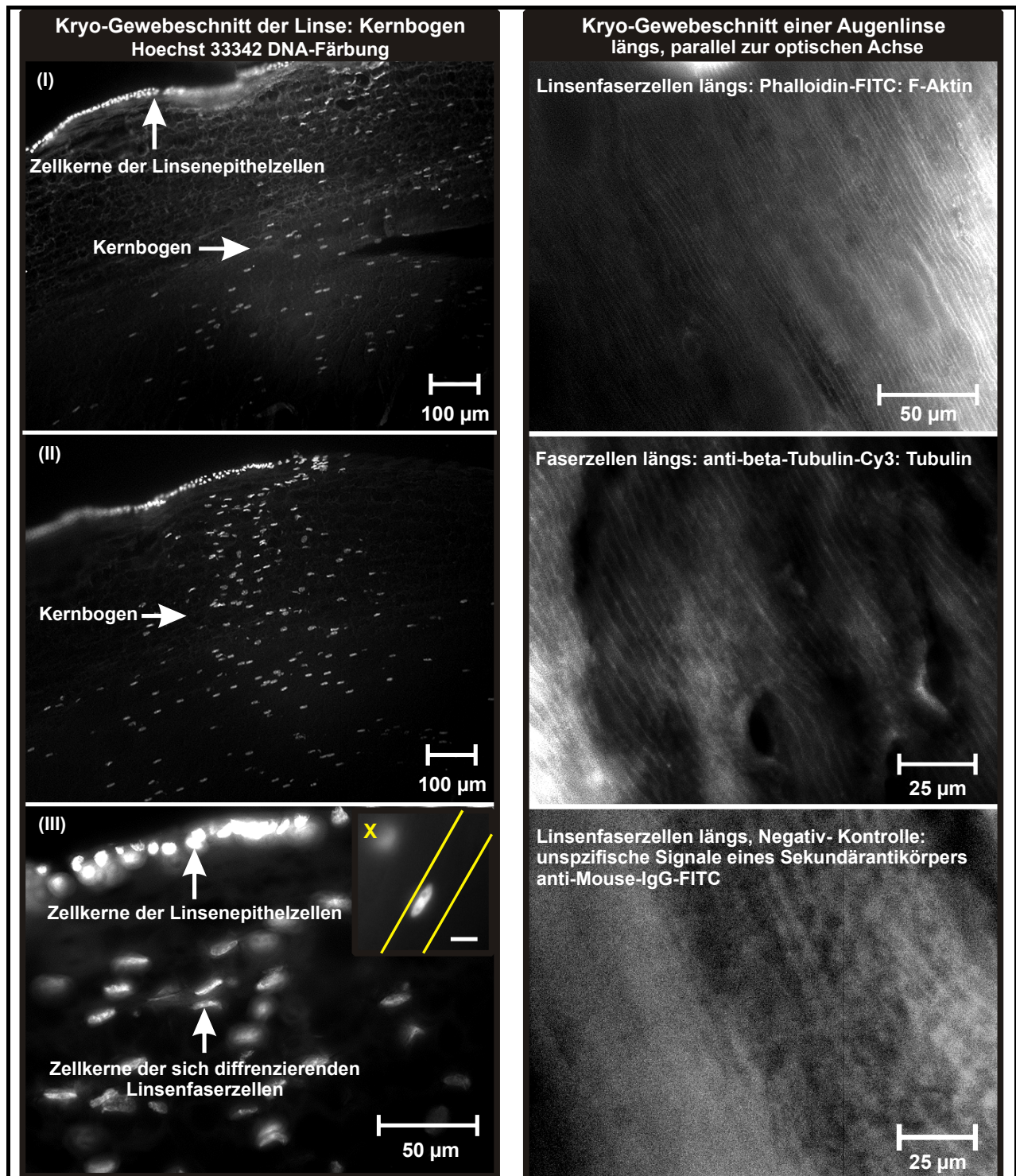
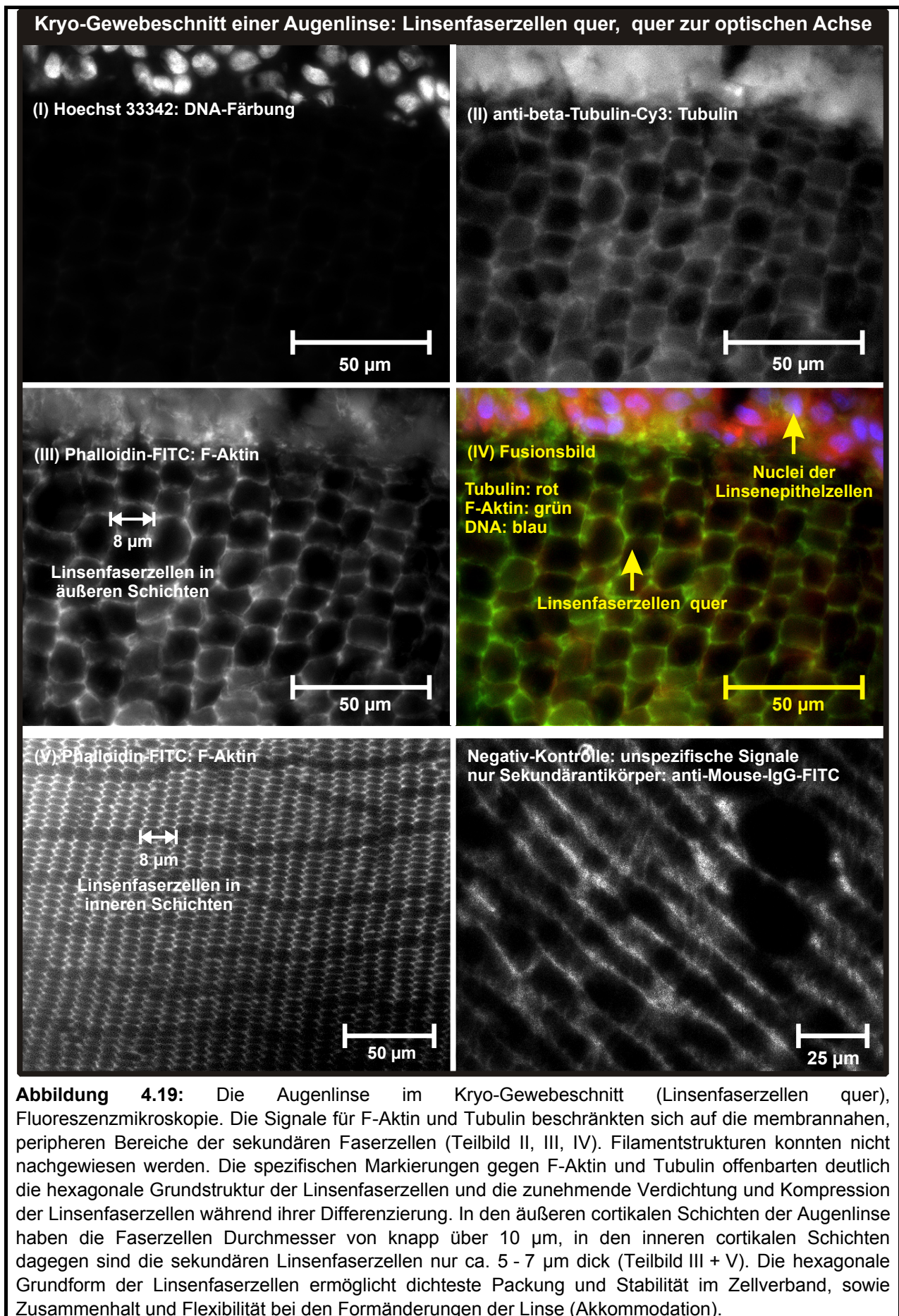


Abbildung 4.18: Die Augenlinse im Kryo-Gewebeschnitt (Linsenfaserzellen längs), Fluoreszenzmikroskopie. Die linke Bildreihe zeigt den Kernbogen mit den Zellkernen der sich differenzierenden Linsenfaserzellen. Die morphologischen Änderungen von rund zu ellipsoid werden beim Vergleich mit Kernen der Linsenepithelzellen (Monolayer am vorderen Linsenpol) deutlich. Das kleine Teilbild (X, im unteren Bild der linken Bildreihe) zeigt den Zellkern einer isolierten Linsenfaserzelle, die kurz vor dem Ende des Kernbogens lag & sich somit in der Endphase der Differenzierung befand (gelbe Linien deuten die Zellmembran an, Maßstab = 10 µm). Die rechte Bildreihe zeigt die Signale für F-Aktin und Tubulin in sekundären Linsenfaserzellen. Sie wurden stets entlang der Zellmembran detektiert.



In den Längsschnitten (**Abb. 4.18**, Linsenfaserzellen längs) sowie in den Querschnitten (**Abb. 4.19**, Linsenfaserzellen quer) beschränkte sich der Nachweis von F-Aktin und Tubulin auf Bereiche der Zellgrenzen benachbarter Faserzellen (angelagert an die Innenseiten der Zellmembran). Darüber hinaus konnte an den Querschnitten noch deutlich gezeigt werden, dass die Linsenfaserzellen von der Peripherie zum Zentrum der Linse immer kompakter und stärker komprimiert wurden. Sekundäre Linsenfaserzellen wiesen einen abgeflacht hexagonalen Querschnitt auf (**Abb. 4.19**). Die Kryo-Schnitte verdeutlichten den regulären "biologisch-kristalloiden" Aufbau der Augenlinse als Folge der regelmäßigen Anordnung ihrer Zellen (besonders der Linsenfaserzellen).

Die Kryo-Schnitte lieferten einen ersten Eindruck bezüglich morphologischer Merkmale des Cytoskeletts von Linsenfaserzellen nach physikalischer Fixierung. Im Folgenden wurden nun isolierte sekundäre Linsenfaserzellen hinsichtlich ihrer cytoskelettalen Architektur untersucht. Dies sollte unter anderen Fixierungs- und Isolationsbedingungen noch exaktere Ergebnisse liefern.

4.5.3 Strukturelle Eigenschaften cytoskelettaler Elemente in sekundären Linsenfaserzellen

Kernhaltige, prädifferentiierte Linsenfaserzellen und ausdifferenzierte, sekundäre Linsenfaserzellen (kernlos) wurden einerseits bei 2 – 4 °C und andererseits bei 30 – 37 °C isoliert und chemisch strukturerhaltend fixiert. Die Verteilung von F-Aktin-Filamenten, Mikrotubuli und Kinesin wurde durch fluoreszenzmarkiertes Phalloidin bzw. spezifische Antikörper detektiert.

In prädifferentiierten und sekundären Linsenfaserzellen konnten keine einzelnen Aktin-Mikrofilament-Bündel oder Stressfasern aufgelöst werden. Des Weiteren fehlten spezifische F-Aktin-Signale im zentralen Grundplasma der Faserzellen. Filamentöses Aktin konnte stets nur verdichtet in direkter Co-Lokalisation zur Zellmembran detektiert werden (gebündelte Anlagerung im peripheren Grundplasma an die Innenseiten der Faserzellmembran, **Abb. 4.20**). Die Fluoreszenzsignale vermittelten den Eindruck eines submembranösen/subcortikalen Aktin-Mikrofilament-Netzwerkes, das über die gesamte Länge der untersuchten Faserzellen dicht an deren Zellmembran angelagert war. Diese F-Aktin-Verteilung wurde unabhängig von der Temperatur, bei der die Faserzellen isoliert wurden, nachgewiesen.

Eine deutliche Temperaturabhängigkeit ergab sich für das optisch auflösbare Mikrotubuli-Muster. In sekundären Linsenfaserzellen, die bei 30 – 37 °C isoliert wurden, konnten Mikrotubuli im Grundplasma der Faserzellen gefunden werden. Sie liefen wellenförmig längs durch die Faserzellen, kreuzten aber auch oft von einer Seite der Zelle durch das Grundplasma auf die andere Seite. Sie beschränken sich also nicht auf zellmembrannähe Bereiche. Der spezifische Antikörper gegen α -Tubulin markierte neben den Mikrotubuli stets auch membrannähe, streifenförmige, nicht-filamentöse Bereiche (Membrantubulin? **Abb. 4.21**).

Diese α -Tubulin-Signale erstreckten sich über die gesamte Länge der daraufhin untersuchten sekundären Linsenfaserzellen.

In der Mehrheit der untersuchten sekundären Linsenfaserzellen wurden zusätzlich zu den Mikrotubuli und dem membranständigen Tubulin deutlich charakteristische fokale Zentren detektiert. An diesen lokalen Fixpunkten, die ebenfalls durch den monoklonalen Antikörper gegen α -Tubulin stark markiert wurden, liefen mehrere Mikrotubuli zusammen (**Abb. 4.21**).

Dabei waren in der Mehrheit der untersuchten sekundären Linsenfaserzellen mehrere dieser fokalen Zentren pro Faserzelle zu finden (siehe auch **Abb. 4.27**).

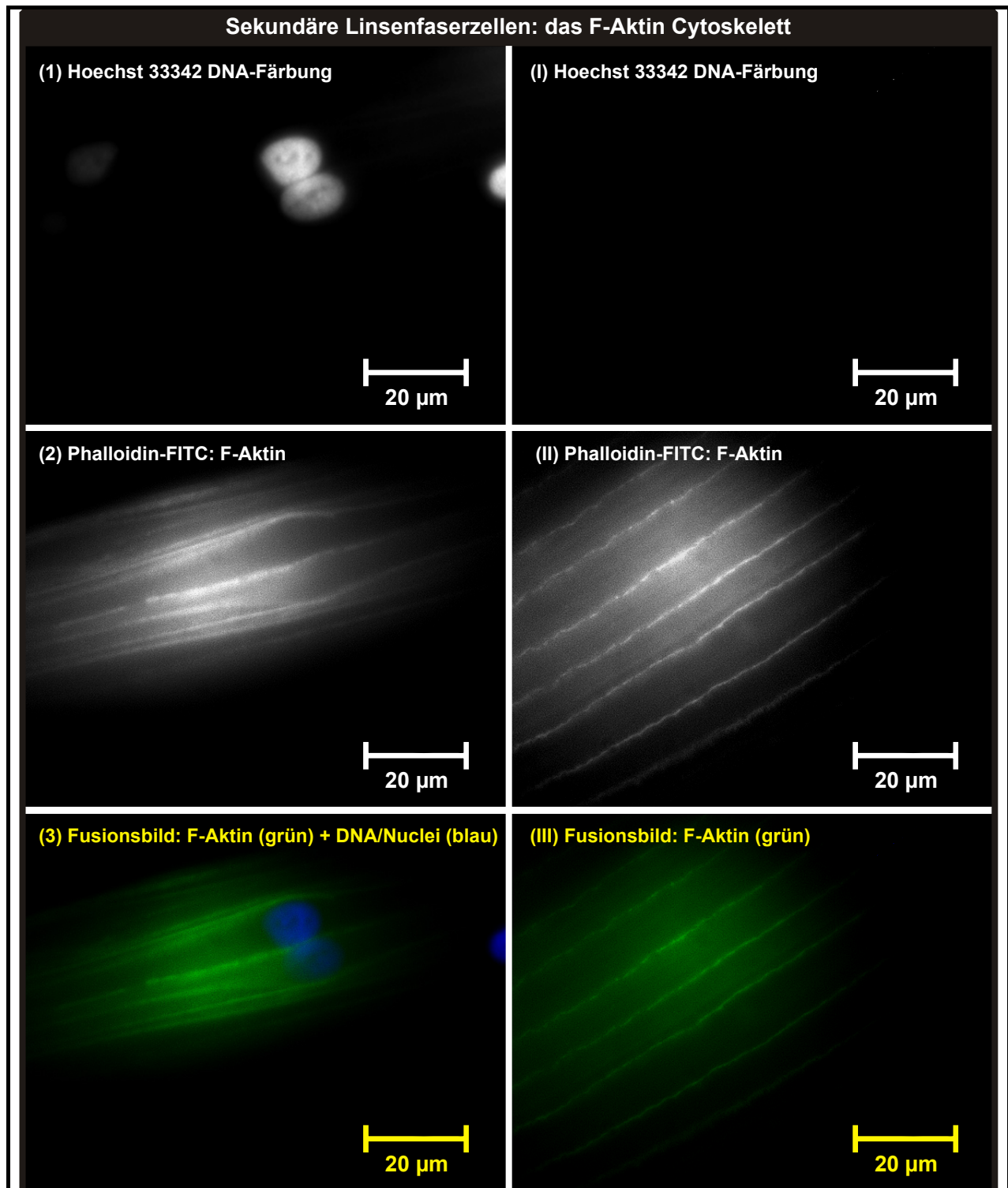


Abbildung 4.20: Isolierte sekundäre Linsenfaserzellen, Fluoreszenzmikroskopie. F-Aktin-Verteilung. Linke Bildreihe (Teilbilder 1-3): prädifferentierte Linsenfaserzellen; Sie waren noch nicht ausdifferenziert und besaßen noch ihren Zellkern. F-Aktin war beschränkt auf Bereiche dicht unter der Zellmembran und dort konzentriert. Aktin-Mikrofilamente waren nicht nachweisbar. Im zentralen Grundplasma konnte nur ein diffuser Hintergrund detektiert werden.

Rechte Bildreihe (Teilbilder I-III): ausdifferenzierte sekundäre Linsenfaserzellen (kernlos) mit der konzentrierten Verdichtung und Anlagerung von F-Aktin an die Zellmembran. Dabei wurde das F-Aktin über die gesamte Länge der Faserzellen in Co-Lokalisation zu deren Membranen gefunden. In allen untersuchten sekundären Faserzellen waren über den Kernfarbstoff keine DNA-Reste mehr zu finden.

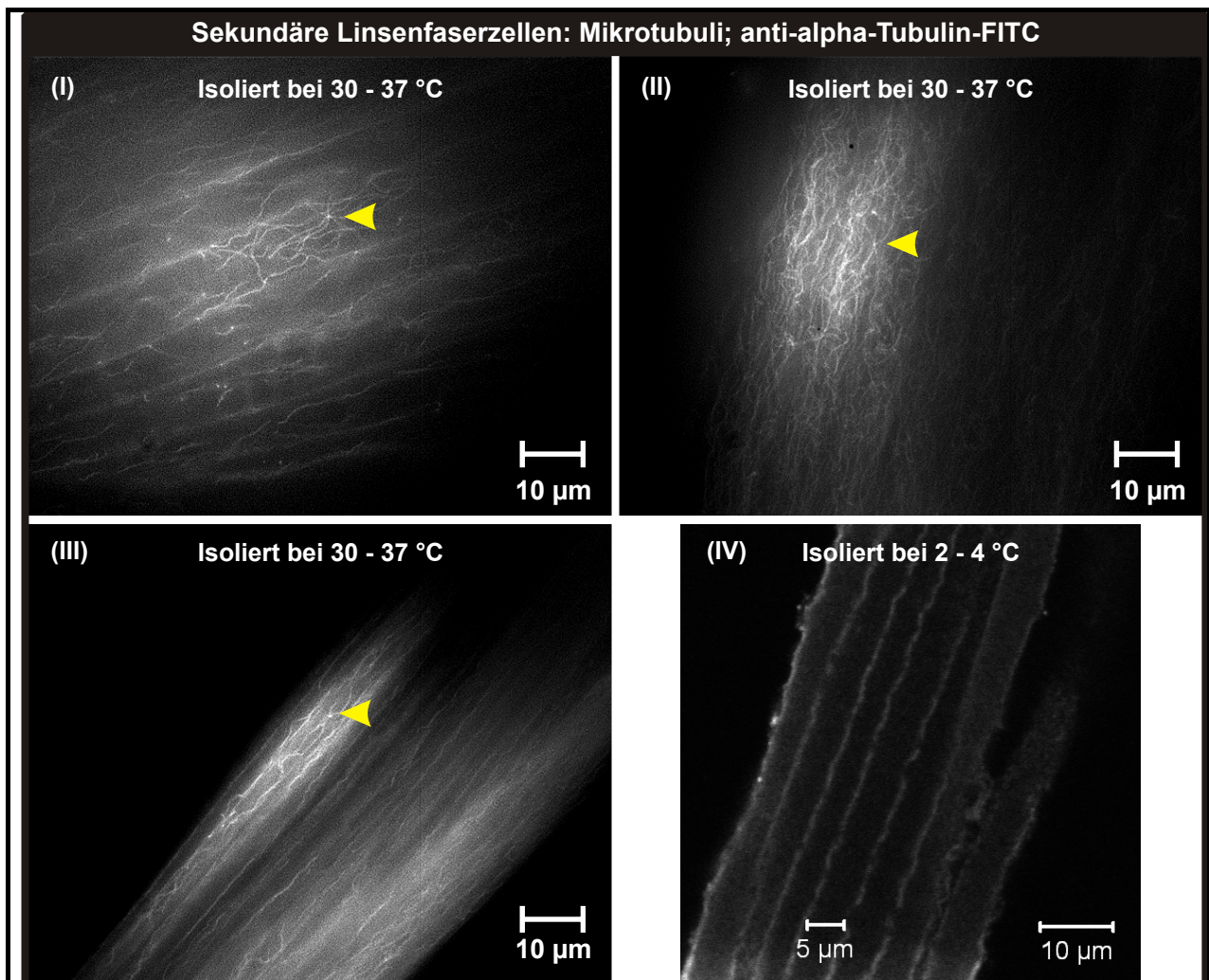
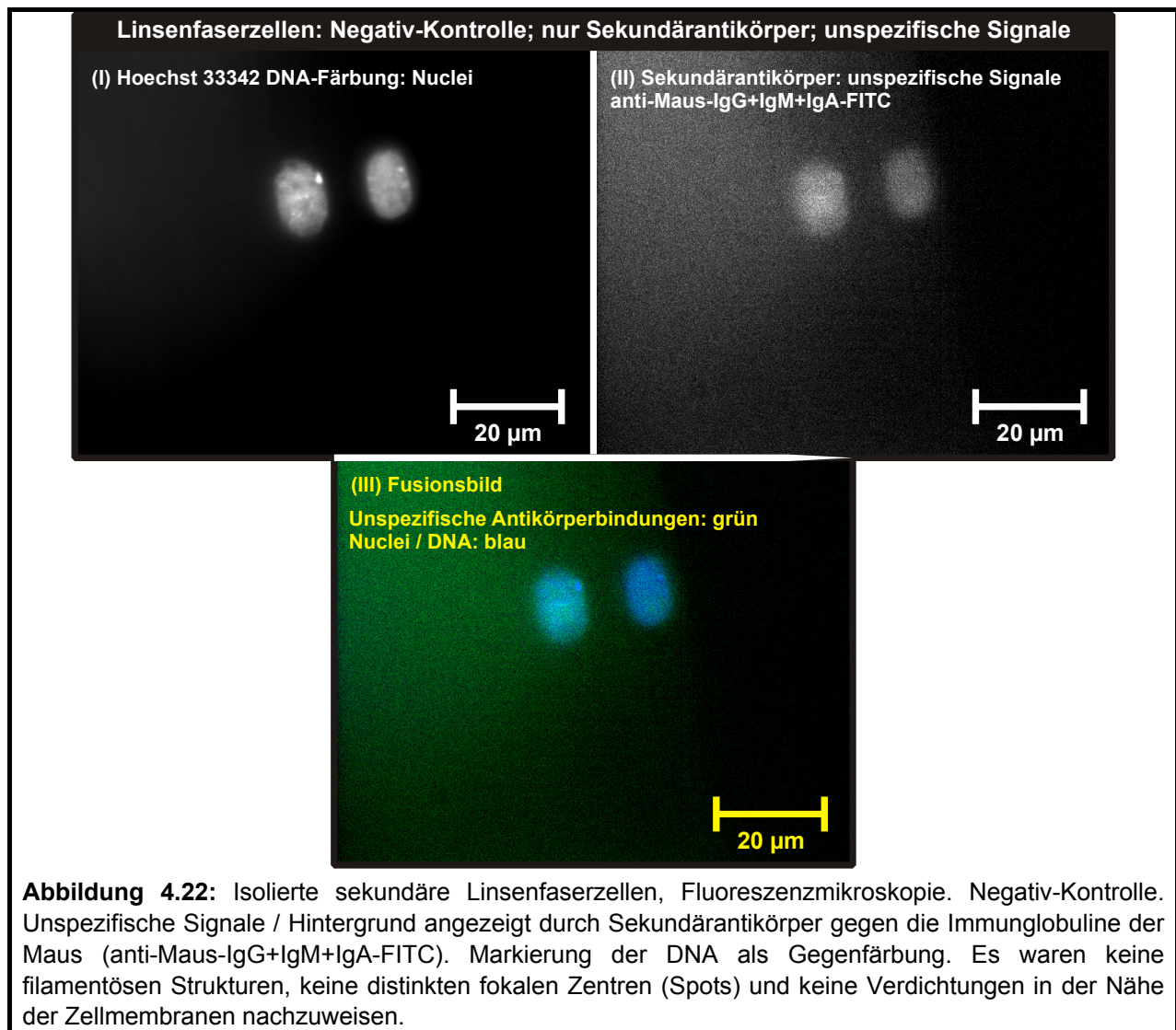


Abbildung 4.21: Isolierte sekundäre Linsenfaserzellen, Fluoreszenzmikroskopie. Tubulin-Verteilung. Mikrotubuli stabilisiert durch Taxol. In Linsenfaserzellen, die bei 30 – 37 °C isoliert wurden, fand man Mikrotubuli, die wellenförmig in Längsrichtung durch die Faserzellen zogen, aber auch durch die Zellen kreuzten. Weiterhin konnte das Tubulin-Signal auch streifenförmig in direkter Nähe zu den Zellmembranen (Membrantubulin?) gefunden werden. Auffällig waren die distinkten fokalen Zentren (gelbe Pfeilspitzen), an denen Mikrotubuli zusammenliefen und die ebenfalls durch den α -Tubulin-Antikörper markiert wurden.

In sekundären Linsenfaserzellen, die bei 2 – 4 °C isoliert wurden (Teilbild IV), waren keine plasmatischen Mikrotubuli und keine distinkten fokalen Zentren nachweisbar. Das membrangebundene Tubulin war aber auch hier stets zu beobachten.

Wurden die Linsenfaserzellen bei 2 – 4 °C isoliert und anschließend chemisch fixiert, waren weder Mikrotubuli noch die α -Tubulin positiven fokalen Zentren im Grundplasma nachzuweisen. Dagegen konnte im Zellinneren nur ein diffuser Hintergrund detektiert werden. Jedoch wurden auch nach der Kältebehandlung immer noch die streifenförmigen membran-nahen Tubulin-Signale beobachtet (Membrantubulin? **Abb. 4.21**).

Die Negativ-Kontrollen zeigten, dass unspezifische Signale durch unspezifische Antikörperbindungen nur einen diffusen Hintergrund lieferten. Filamentöse Strukturen oder distinkte Spots waren nicht zu erkennen (**Abb. 4.22**). Zum Nachweis unspezifischer Antikörperbindungen wurde ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper gegen die Immunglobuline der Maus eingesetzt.



Für das Motorprotein Kinesin wurde in den isolierten sekundären Linsenfaserzellen kein spezifisches Verteilungsmuster gefunden. Die Kinesin-Markierung mittels spezifischer Antikörper ergab nur ein sehr schwaches, diffuses Signal das nicht vom Fluoreszenzhintergrund der Negativ-Kontrollen unterschieden werden konnte. Der Kinesin-Nachweis fiel für die sekundären Linsenfaserzellen komplett negativ aus.

4.6 Das Mikrotubulus Organisationszentrum in sekundären Linsenfaserzellen

Mikrotubuli sind polare Nanozylinder aus polymerisierten Heterotubulindimeren. Sie entspringen in den meisten eukaryotischen Zellen einem übergeordneten Bildungszentrum, dem Mikrotubulus Organisationszentrum (MTOC). Das MTOC ist in allen eukaryotischen Zellen essentiell für ein funktionierendes Mikrotubuli-Netzwerk (Stabilität, gerichteter Transport, Mitose etc.). Dieses Organisationszentrum, als Ausgangspunkt für die Polymerisation von Mikrotubuli, enthält ubiquitär das Protein gamma-Tubulin, eine Isoform des Tubulins, die ein zentraler Bestandteil des Nukleationskeims für die Mikrotubulibildung ist. Das γ -Tubulin bindet das α -Tubulin des α - β -Tubulin Heterodimers und fixiert das Minus-Ende des Mikrotubulus am MTOC. Bei dem überwiegenden Teil der Säugetier-Zellen ist das MTOC in zentraler Nähe zum Zellkern lokalisiert.

Um dies zu verdeutlichen und mit der Lage in den Zellen der Augenlinse zu vergleichen, wurde das MTOC von humanen Fibroblasten (humane Zelllinie MRC-5) markiert. Mittels spezifischer Antikörper gegen gamma-Tubulin konnte das MTOC in den Fibroblasten in Zellkultur deutlich dargestellt werden. Es erwies sich als kleine punktförmige Struktur in direkter Co-Lokalisation zum Zellkern die dicht von Mikrotubuli überlagert war und wo Mikrotubuli zusammentrafen (**Abb. 4.23**). Das MTOC war stets dicht an den Kern angelagert. Die maximale Entfernung vom Zellkern betrug 10 µm. Die Signale für das gamma-Tubulin erschienen in guten Präparaten als zwei deutliche Punkte eingebettet in eine eng umgrenzte amorphe Grundmatrix.

Für die **undifferenzierten Linseneithelzellen** in Primärkultur konnte das Mikrotubulus Organisationszentrum ebenfalls in direkter Nähe zum Zellkern nachgewiesen werden, war deutlich mit Mikrotubuli assoziiert und glich in seiner Grundstruktur dem der humanen Fibroblasten. Die maximale Entfernung des MTOC vom Zellkern betrug auch hier 10 µm. Ebenso wurde es (gamma-Tubulin) als Bestandteil der Spindelpole von mitotischen Teilungsspindeln gefunden (**Abb. 4.24**).

Die **Lentoide** (teildifferenzierte Linseneithelzellen in Primärkultur) offenbarten erste auffällige Veränderungen bezüglich Struktur und Lage des MTOC. Nur ein geringer Teil wies ein mit Mikrotubuli assoziiertes MTOC in direkter Umgebung des Zellkerns auf.

Der überwiegende Teil der untersuchten Lentoide ließ eine deutliche Dislokation des MTOC vom Nucleus erkennen (**Abb. 4.25**). Durch die spezifischen Antikörper gegen γ -Tubulin konnten die MTOC-typischen punktförmigen Strukturen in Entfernungen vom Zellkern detektiert werden, die deutlich über 10 µm lagen (durchschnittlich 17 µm vom Zellkern entfernt). Sie wurden bis 40 µm entfernt vom Zellkern gefunden. Mit zunehmender Entfernung der MTOC-typischen Strukturen vom Zellkern, nahm auch ihre Assoziation mit Mikrotubuli ab. Das heißt, je weiter die gamma-Tubulin positiven Spots vom Kern der Lentoide entfernt waren, desto geringer war ihre Überlagerung mit Mikrotubuli. Die am weitesten vom Nucleus entfernten punktförmigen gamma-Tubulin Signale (noch MTOC?) ließen eine Assoziation mit Mikrotubuli nicht mehr klar erkennen.

Des Weiteren war in den meisten Lentoiden eine deutlich stärkere Hintergrundfluoreszenz für das gamma-Tubulin zu finden. Hinzukommend traten mehrere gamma-Tubulin positive Spots auf, die nicht in einer lokalen amorphen Grundmatrix zusammengefasst, sondern verstreut im Cytoplasma lokalisiert waren (→ vergleiche Struktur des MTOC in humanen Fibroblasten und undifferenzierten Linseneithelzellen Abb. 4.23 + 4.24).

Neben der Dislokation des MTOC bei gleichzeitigem Verlust der Überlagerung mit Mikrotubuli, konnte in einigen Lentoiden überhaupt gar kein MTOC mehr detektiert werden.

Isolierte **Sekundäre Linsenfaserzellen** wiesen ebenfalls gamma-Tubulin positive punktförmig verdichtete Zentren auf, die jedoch keine Verbindung mit Mikrotubuli erkennen ließen. Die kompakten Zentren konnten mehrere größere Spots enthalten und waren stets dicht an die Innenseite der Faserzellmembranen angelagert (**Abb. 4.26**).

In den prädifferentenzierten Linsenfaserzellen, die ihren Zellkern noch nicht degradiert hatten, konnte gamma-Tubulin in verdichteten Zentren nur extrem selten in Kernnähe nachgewiesen werden.

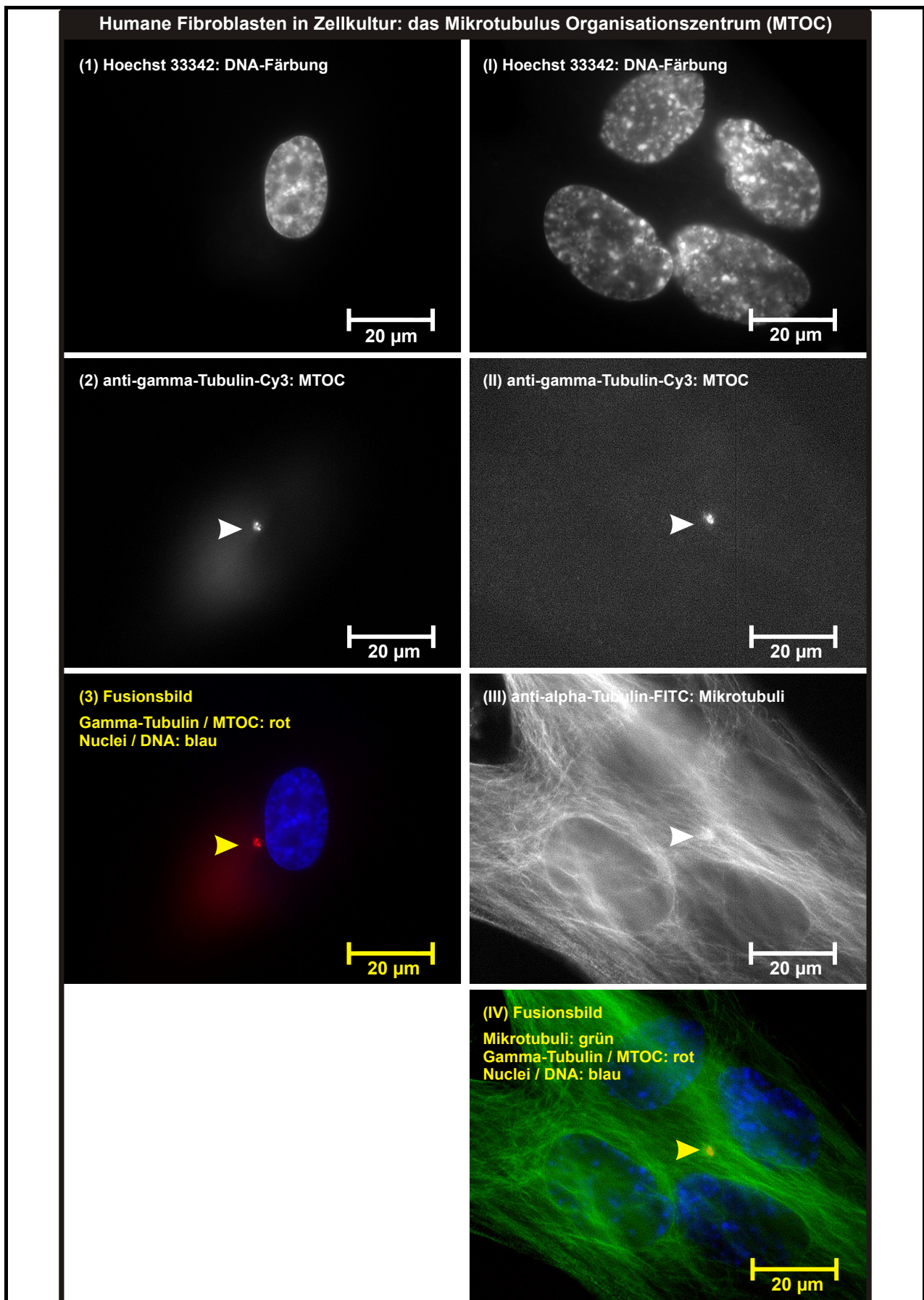


Abbildung 4.23: Humane Fibroblasten in Zellkultur (Zelllinie MRC-5), Fluoreszenzmikroskopie. Lage und Struktur des Mikrotubulus Organisationszentrum. Über spezifische Antikörper gegen gamma-Tubulin detektiert, lag das MTOC (Pfeilspitzen) in direkter Umgebung zum Zellkern, war mit Mikrotubuli assoziiert und bildete ein Zentrum mit verdichteten Punkten, eingebettet in eine amorphe Grundmatrix.

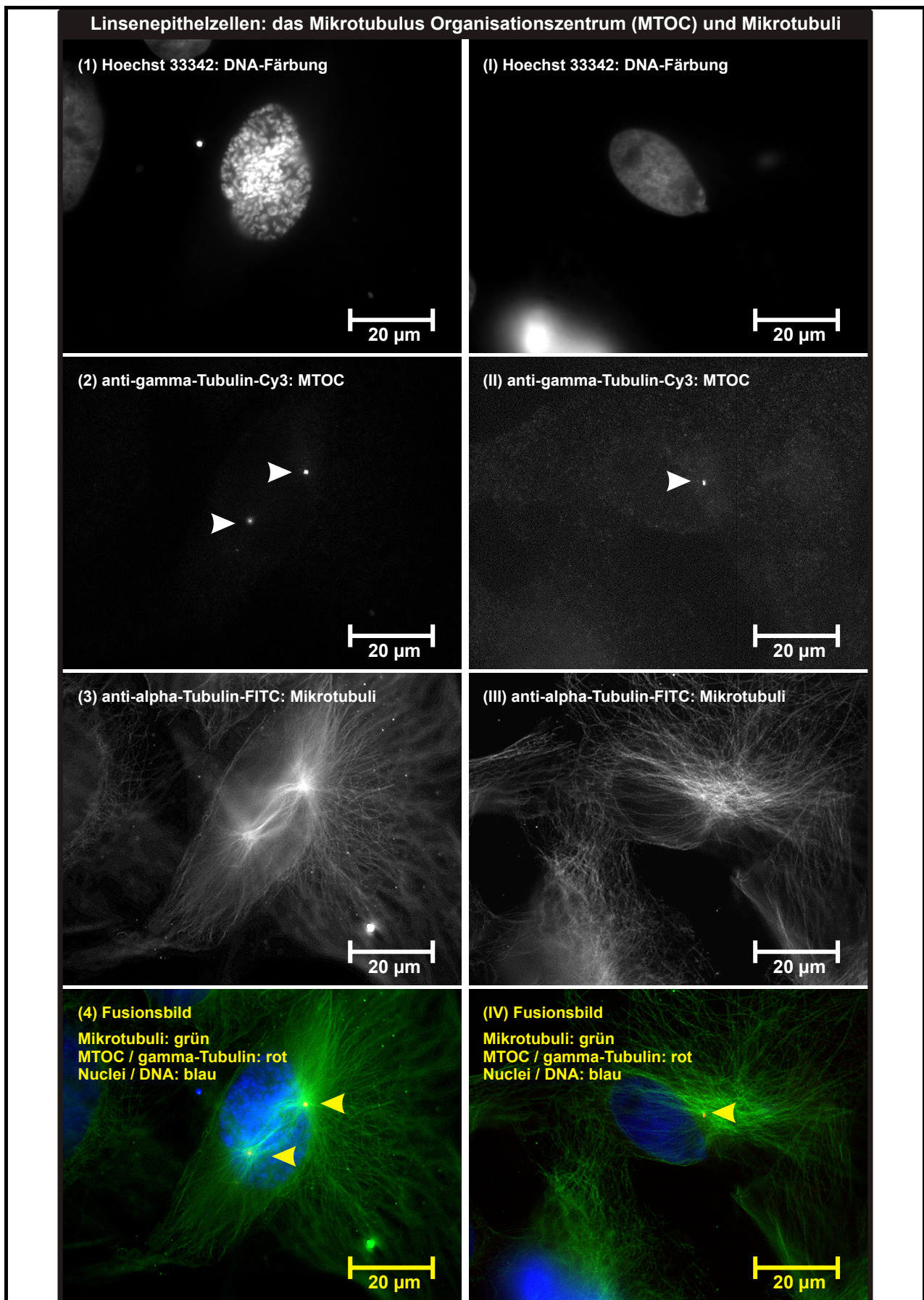


Abbildung 4.24: Undifferenzierte Linseneithelzellen in Primärkultur, Fluoreszenzmikroskopie. Das Mikrotubulus Organisationszentrum (MTOC, Pfeilspitzen). Das MTOC als Bestandteil der Spindelpole einer mitotischen Teilungsspindel (linke Bildreihe) sowie als Organisationszentrum für Mikrotubuli in Interphasekernen (typisch für Säuger-Zellen, siehe humane Fibroblasten, Abb. 4.23).

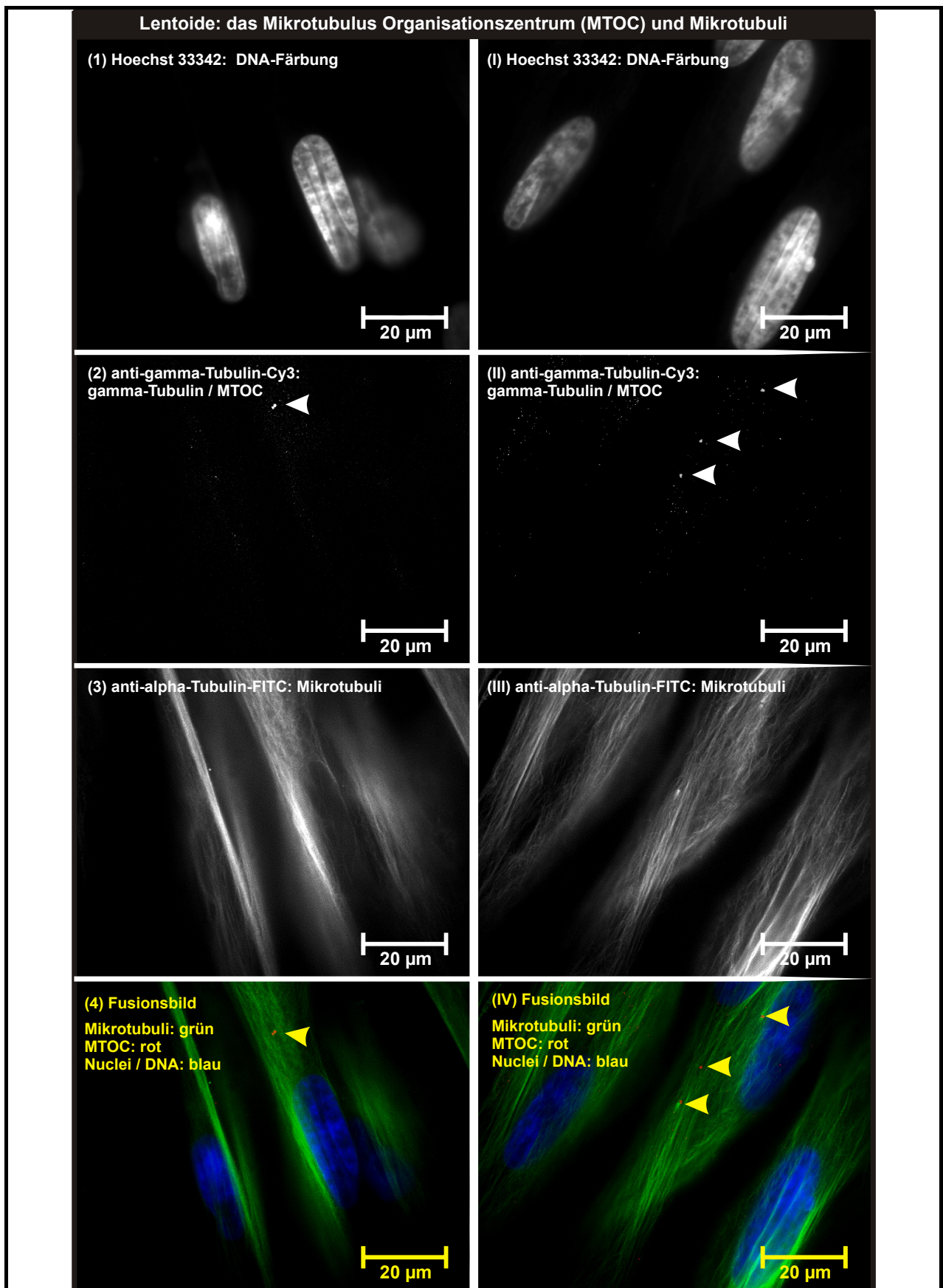


Abbildung 4.25: Lentoide in Primärkultur, Fluoreszenzmikroskopie. Das Mikrotubulus Organisationszentrum (MTOC, Pfeilspitzen). Dislokation des MTOC vom Zellkern. Mit zunehmender Entfernung vom Nucleus verringerte sich die Verbindung der gamma-Tubulin positiven Zentren mit Mikrotubuli und war teilweise nicht mehr klar nachzuweisen. Zusätzlich zu den punktförmigen Verdichtungen von γ -Tubulin, waren noch weitere kleinere γ -Tubulin-Spots im Cytoplasma der Lentoide verteilt.

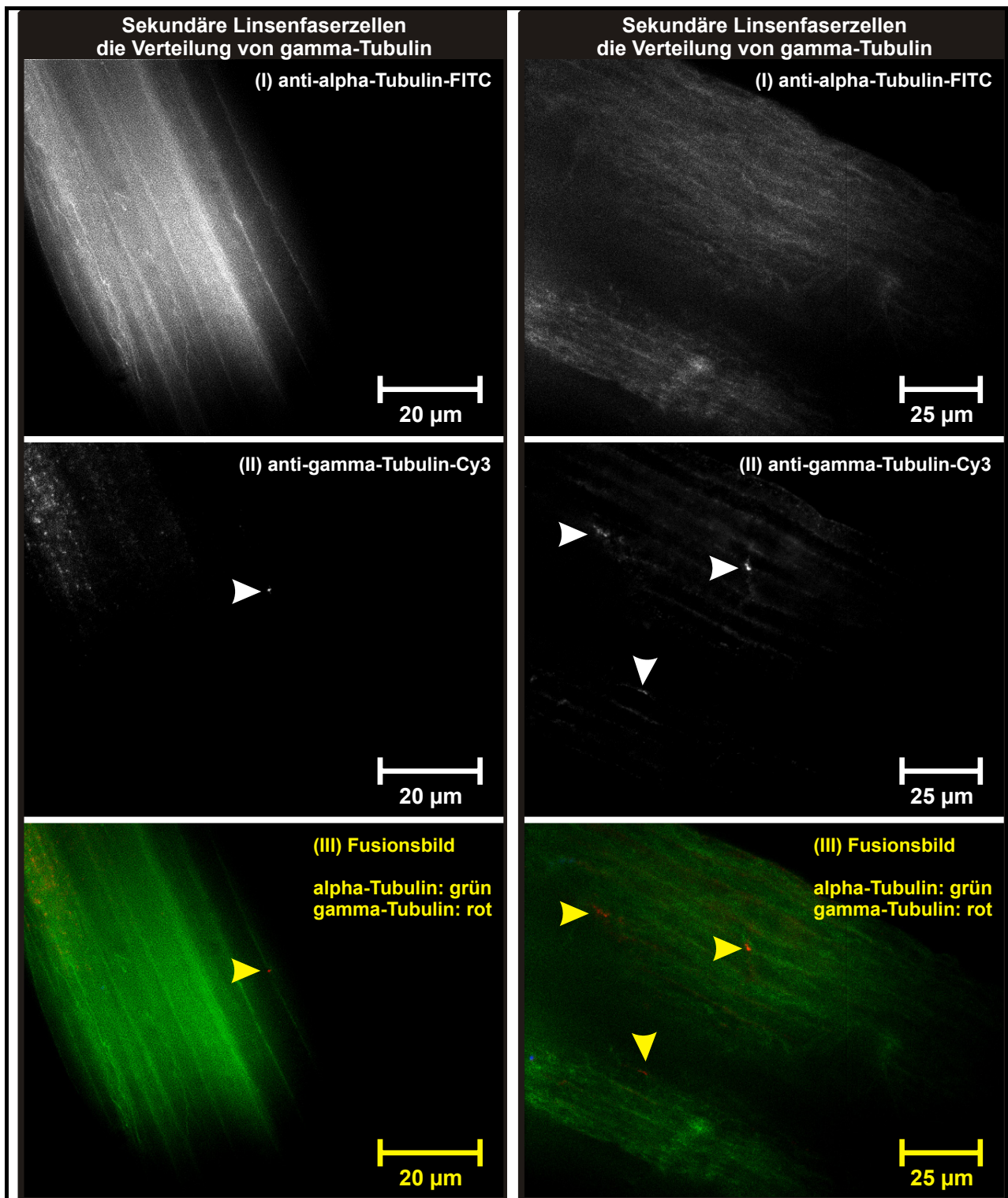


Abbildung 4.26: Isolierte sekundäre Linsenfasernzellen, Fluoreszenzmikroskopie. Linsenfasernzellen bei 37 °C und unter Einwirkung von Taxol isoliert. Gamma-Tubulin Verteilung. Auch in sekundären Linsenfasernzellen konnte gamma-Tubulin in Form verdichteter, punktförmiger Zentren (Pfeilspitzen) nachgewiesen werden. Diese lokalen Zentren waren stets an die Zellmembran angelagert, deren Verlauf durch das membranständige alpha-Tubulin zu erkennen war. In einem Bündel isolierter Fasernzellen konnte das gamma-Tubulin nur in wenigen benachbarten Zellen konzentriert gefunden werden (max. 1 - 3 benachbarte Fasernzellen wiesen in der untersuchten Region die Verdichtungen von γ -Tubulin auf). Des Weiteren konnten häufig mehrere γ -Tubulin positiven Spots in einer Fasernzelle gefunden werden.

In den bei 30 – 37 °C isolierten Linsenfaserzellen war das gamma-Tubulin oftmals in mehreren lokalen Spots entlang der Zellmembran nachzuweisen (**Abb. 4.27**). Von den vielen auf gamma-Tubulin hin untersuchten sekundären Linsenfaserzellen konnte nur in ca. 20% der Fälle das gamma-Tubulin als verdichtetes, punktförmiges Zentrum angelagert an die Zellmembran detektiert werden. In den übrigen 80% war es entweder nicht nachweisbar oder nur in Form mehrerer membranaher kleiner Spots in der Peripherie der Faserzellen. Mit Mikrotubuli waren die γ -Tubulin positiven Zentren in den Faserzellen nie assoziiert.

Bei den Untersuchungen zur Verteilung des gamma-Tubulin in isolierten sekundären Linsenfaserzellen stellte sich heraus, dass die bereits beschriebenen fokalen Zentren, die positiv für alpha-Tubulin waren und an denen Mikrotubuli zusammentrafen, nicht mit den Signalen für gamma-Tubulin identisch waren. Das heisst, die γ -Tubulin-Verdichtungen (nicht mit Mikrotubuli assoziiert) und die fokalen α -Tubulin-Zentren (mit Mikrotubuli assoziiert) waren distinkte, verschiedene Strukturen (**Abb. 4.27**).

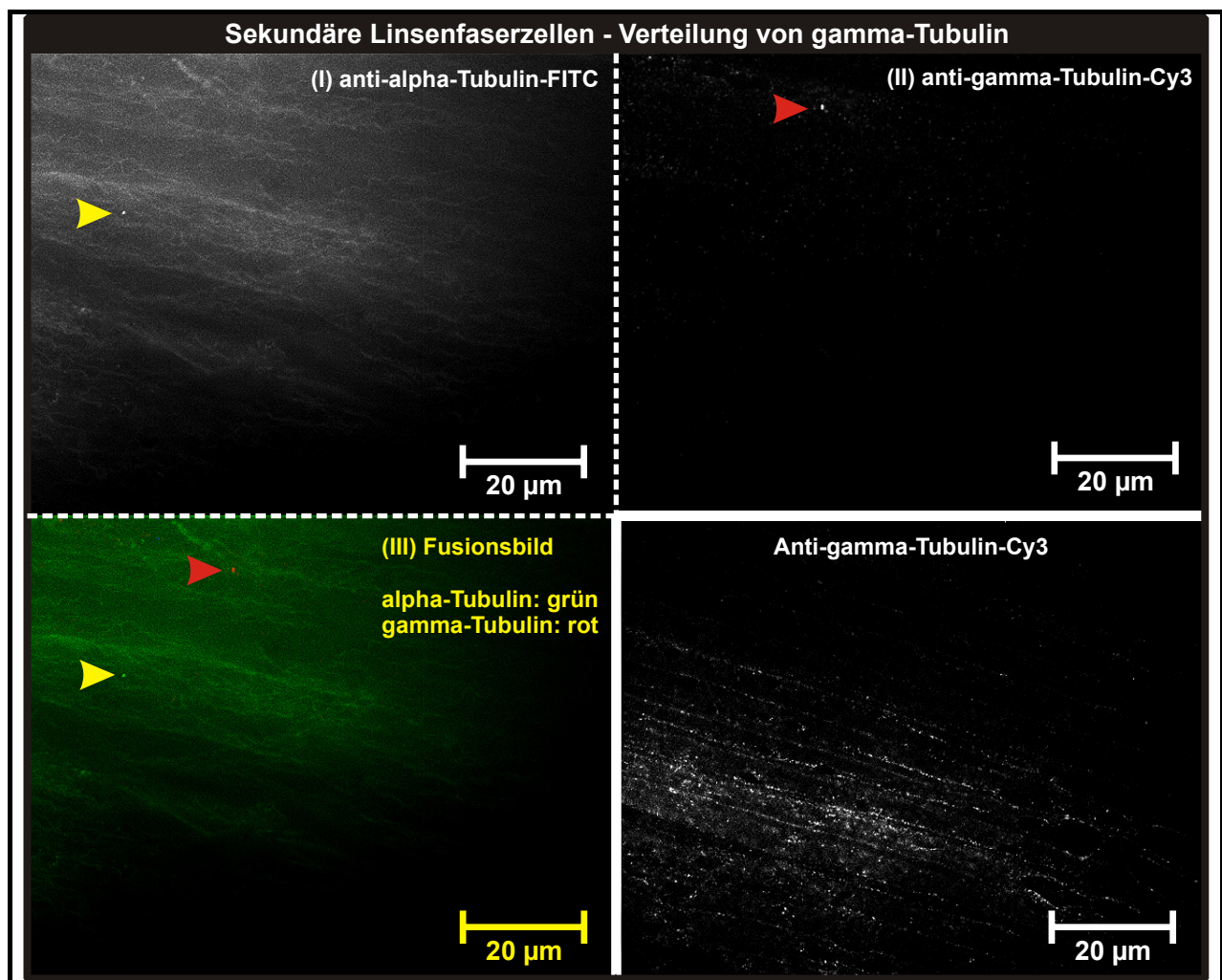


Abbildung 4.27: Sekundäre Linsenfaserzellen, isoliert bei 37 °C, Mikrotubuli stabilisiert durch Taxol, Fluoreszenzmikroskopie. Die Teilbilder I bis III zeigen ein fokales Zentrum das positiv für α -Tubulin (gelbe Pfeilspitze) und eine punktförmige Verdichtung die positiv für γ -Tubulin (rote Pfeilspitze) war. Das gamma-Tubulin kam dicht angelagert an die Zellmembran vor.

Im Teilbild unten rechts ist nur das gamma-Tubulin gezeigt, wie es in einigen sekundären Linsenfaserzellen, nach der Isolation bei 30 – 37 °C, dicht mit der Zellmembran assoziiert nachweisbar war.

Die detektierten MTOCs und gamma-Tubulin-Verdichtungen wurden als spezifisch für die Linsenepithelzellen, Lentoide und sekundären Linsenfaserzellen angesehen. In den Negativ-Kontrollen konnten keine distinkten verdichteten Zentren sowie keine Mikrotubuli oder spezifischen Muster gefunden werden. Zum Nachweis unspezifischer Antikörperbindungen wurden die Linsenzellen (LEZ; Lentoide; LFZ) mit einem Sekundärantikörper gegen die Immunglobuline der Maus inkubiert (**Abb. 4.28**).

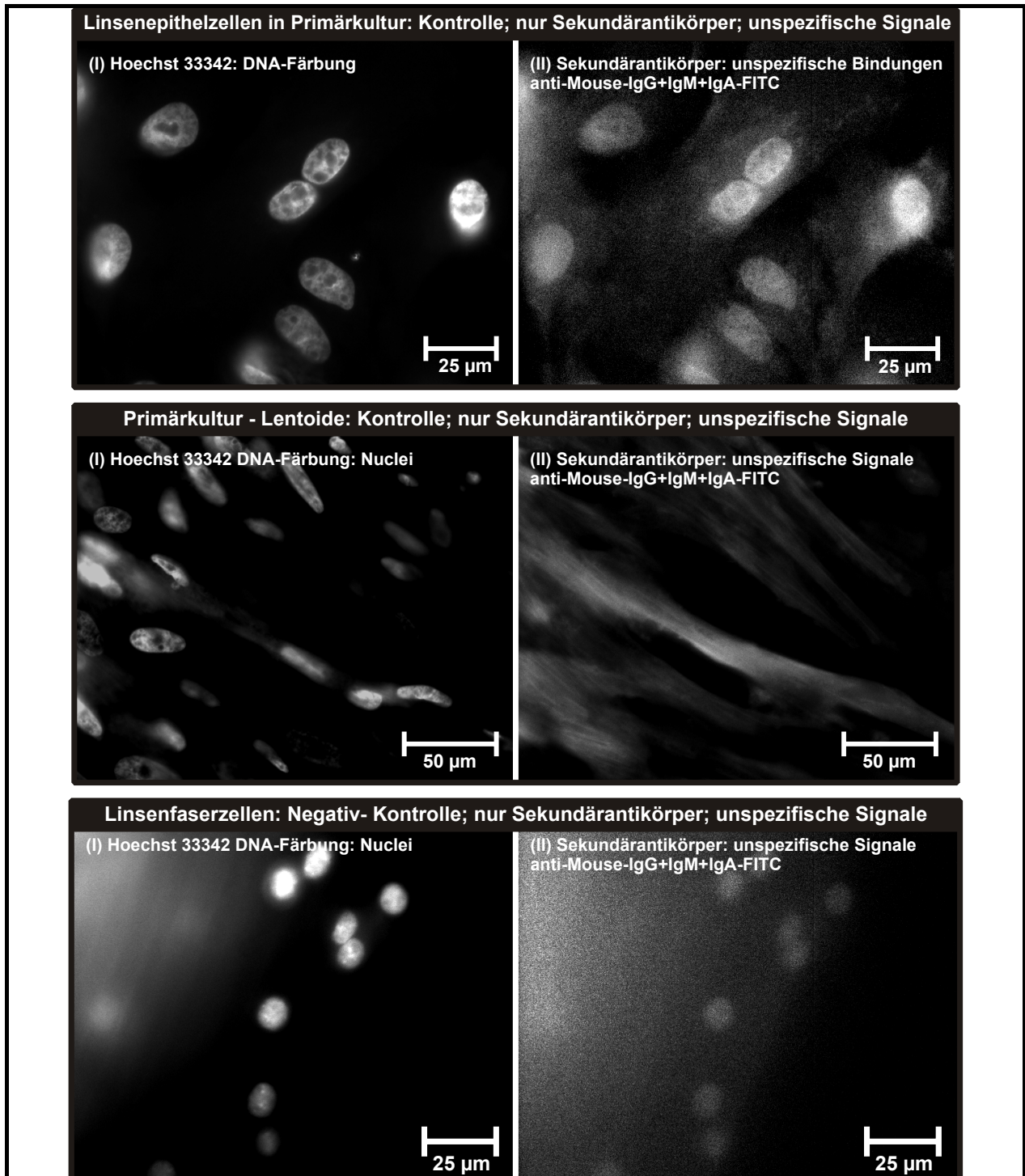


Abbildung 4. 28: Negativ-Kontrollen der Linsenepithelzellen (oben) und Lentoide (Mitte) in Primärkultur sowie der isolierten Linsenfaserzellen (unten). Die Behandlung mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (gegen die Immunglobuline der Maus) zeigte die unspezifischen Bindungen an. Es konnte nur ein diffus fluoreszierender Hintergrund detektiert werden, ohne abgrenzbare verdichtete Zentren. Markierung der DNA als Gegenfärbung.

4.7 Ultrastruktur von sekundären Linsenfaserzellen

Während der limitierten Apoptose werden in den Faserzellen deren Organellen, Endomembransysteme und makromolekulare Komplexe weitestgehend abgebaut. Für die Elemente des Cytoskeletts gilt das nicht. Hier werden zwar grundlegende Umstrukturierungen angenommen, doch ist bekannt, dass auch in ausdifferenzierten Linsenfaserzellen vor allem Intermediär-Filamente, aber auch F-Aktin-Mikrofilamente und Mikrotubuli vorhanden sind.

Einleitend ist zu sagen, dass in den untersuchten Linsenfaserzellen (des Hausschweins) bis auf einige vesikuläre Strukturen, keine Organellen (Mitochondrien), keine intrazellulären membranumgebenen Kompartimente (Funktionsräume) und keine Zellkerne gefunden wurden. Bei den vesikulären Strukturen handelte es sich um einzelne Vesikel und um Multivesikuläre Körperchen.

In den Längsschnitten und Querschnitten wurden die hochreguläre Anordnung und dichte Packung der Linsenfaserzellen im Zellverband deutlich. Die Querschnitte zeigten weiterhin, das charakteristische abgeflacht-hexagonale Grundmuster der Faserzellen (**Abb. 4.29**). Aufgrund ihrer hohen Kompaktheit im Zellverband waren die nachweisbaren Interzellularräume zwischen benachbarten Linsenfaserzellen sehr eng und überwiegend nicht breiter als 20 Nanometer (**Abb. 4.31**). Die Zellmembranen der Faserzellen waren durch zahlreiche Ausbuchtungen ineinander verzahnt. Das Grundplasma erschien stets homogen und gleich verteilt ohne lokale Verdichtungen oder komplexe plasmatische Aggregate.

In den isolierten Linsenfaserzellen waren elektronenmikroskopisch Mikrotubuli, Intermediär-Filamente und Mikrofilamente nachweisbar (**Abb. 4.30**).

Mikrotubuli wurden aufgrund ihrer charakteristischen Erscheinungsform und ihres Durchmessers (23 – 27 Nanometer) identifiziert. Die Nanozyylinder waren in peripheren (membrannah) und zentralen Bereichen der untersuchten Faserzellen zu finden. Mehrere parallel laufende oder in geordneten Paketen organisierte Mikrotubuli konnten nicht identifiziert werden. Hingegen waren in Bereichen, in denen ein längeres Stück eines Mikrotubulus abzubilden war, mehrmals noch angeschnittene, kürzere Abschnitte in dessen direkter Umgebung zu finden (Wellenform der Mikrotubuli?).

Mikrofilamente wurden aufgrund ihres Durchmessers (6 – 8 nm) identifiziert. Sie waren gehäuft in dichter Nähe zur Zellmembran der Linsenfaserzellen zu finden. Dort wiesen sie aber keine einheitliche Anordnung oder Ausrichtung auf, sondern eher eine vernetzte Erscheinungsform.

Am häufigsten waren **Intermediär-Filamente** in den isolierten Linsenfaserzellen nachzuweisen. Sie hatten Durchmesser von überwiegend 10 Nanometer.

Intermediär-Filamente wurden in der gesamten Faserzelle gefunden, mehrheitlich aber in der Nähe zur Faserzellmembran. Dort waren sie häufig parallel zu ihr ausgerichtet und erschienen nur geringfügig verzweigt.

Im Sediment eines Linsenfaserzellhomogenats nach Ultrazentrifugation, konnte ein Typ von Intermediär-Filament gefunden werden, der bisher als spezifisch für Linsenfaserzellen gilt und als "beaded filament" bezeichnet wird.

Es handelt sich hierbei um filamentöse Proteinpolymere aus linsenspezifischen Proteinen, die mit globulären Proteinkomplexen verbunden sind (Perlenschnur-Struktur). Im Falle der Linsenfaserzellen des Schweins hatten die Filamente Durchmesser zwischen 6 – 8 nm und waren beidseitig mit globulären Makromolekülkomplexen assoziiert (**Abb. 4.30**).

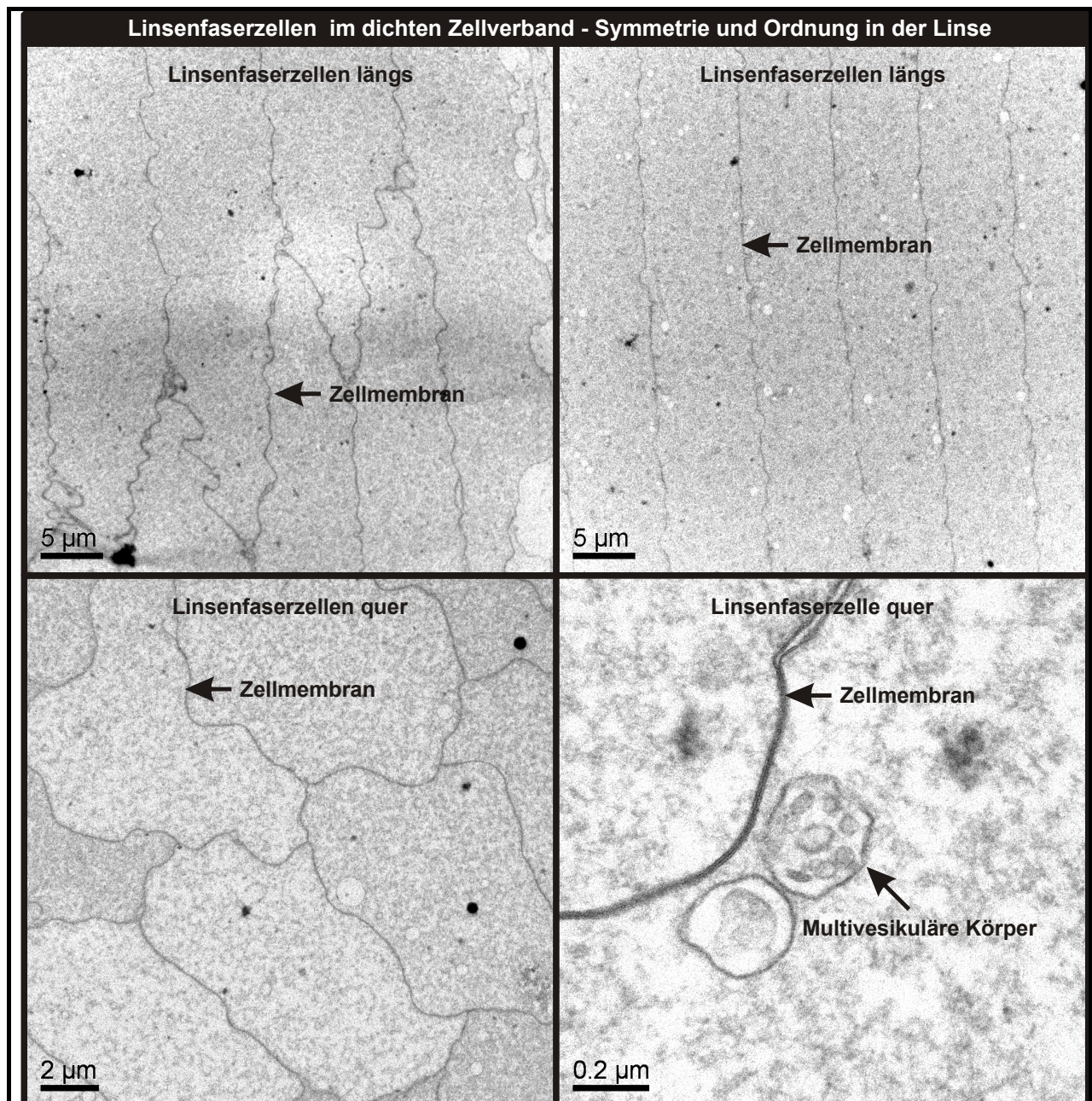


Abbildung 4.29: Isolierte Linsenfaserzellen im Transmissionselektronenmikroskop. Im linken oberen Bild sind die Faserzellen im Längsschnitt abgebildet, wie sie an einer Wachstumsnaht (Linsenstern) zusammentreffen. Im oberen rechten Bild ist ein Ausschnitt aus dem dichten Zellverband dargestellt, wie er sich im Längsschnitt zeigt. Das untere linke Bild offenbart die abgeflacht hexagonale Struktur im Querschnitt der Faserzellen. Die Linsenfaserzellen lagen stets sehr dicht und eng verzahnt (durch Ausbuchtungen der Zellmembran) und wiesen keine intrazellulären Organellen oder Kompartimente auf. Die einzigen Endomembranen, die in den hier untersuchten Linsenfaserzellen gefunden wurden, gehörten zu Vesikeln und Multivesikulären Körperchen. Das Grundplasma erschien weitgehend gleich verteilt ohne lokale Verdichtungen oder Anhäufungen subzellulärer Strukturen.

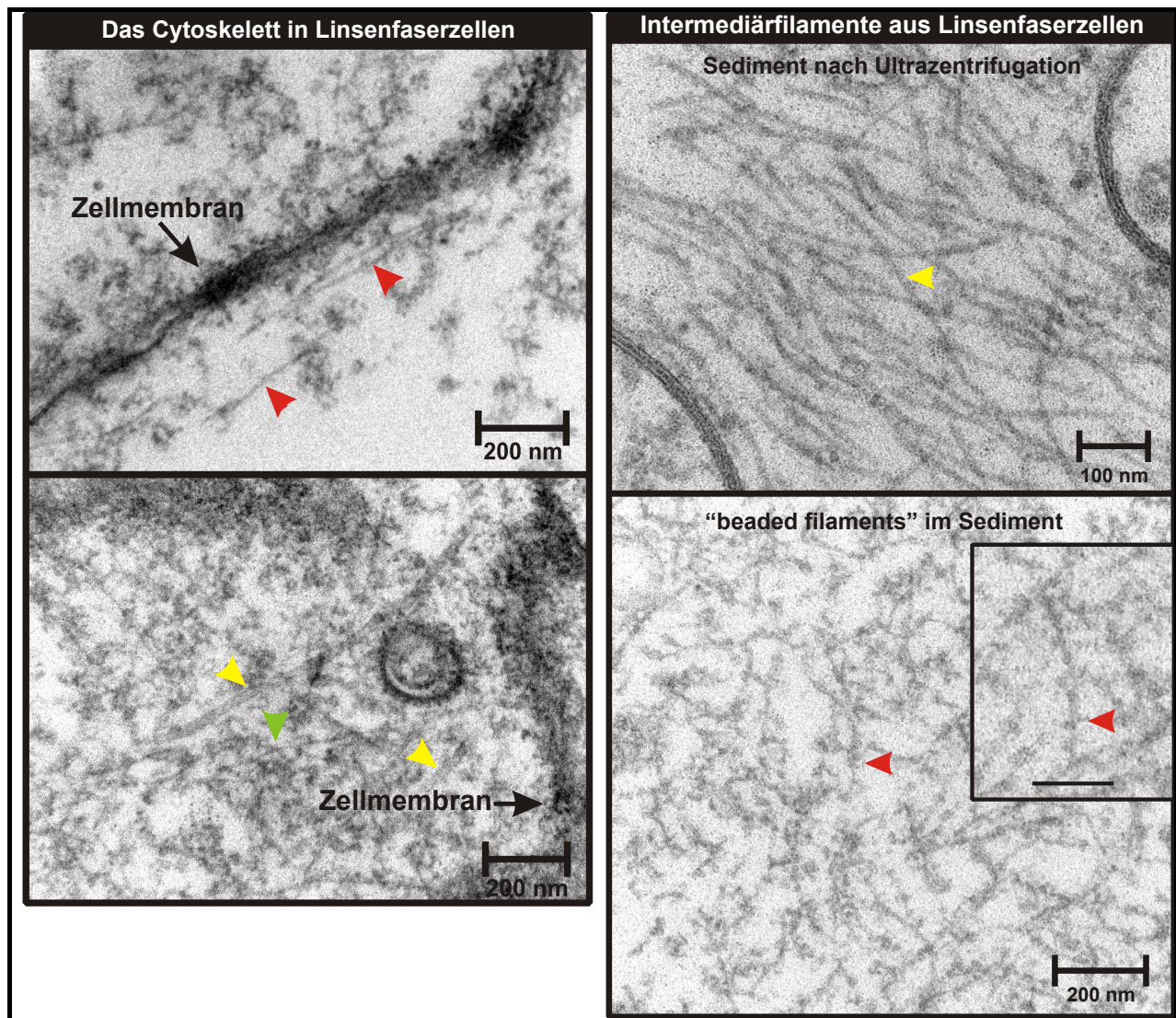


Abbildung 4.30: Linsenfaserzellen im Transmissionselektronenmikroskop.

Die linke Bildreihe zeigt Filamentstrukturen in den isolierten und fixierten Faserzellen. Die Filamente traten gehäuft in der Nähe der Zellmembran auf. Im oberen linken Bild handelt es sich um Intermediärfilamente (rote Pfeilspitzen, ca. 10 nm dick). Das untere Bild zeigt Mikrotubuli (gelbe Pfeilspitzen, ca. 25 nm dick) und Mikrofilamente (grüne Pfeilspitze ca. 6 – 8 nm dick) in der Nähe der Zellmembran.

Die rechte Bildreihe zeigt Intermediärfilamente im Sediment (Pellet), nach Homogenisation und Ultrazentrifugation von Linsenfaserzellen. Im oberen rechten Bild handelt es sich um Intermediärfilamente (gelbe Pfeilspitze) von ca. 10 nm Durchmesser. Im unteren rechten Bild sind die linsenspezifischen "beaded filaments" (rote Pfeilspitze) dargestellt, mit einem Filamentdurchmesser von ca. 7 nm und angelagerten globulären Makromolekülaggagaten (Perlschnurstruktur). Bei den globulären Proteinkomplexen handelt es sich um α -Crystalline. Die beaded filaments bilden einen eigenständigen Intermediärfilamenttyp aus linsenspezifischen Strukturproteinen (CP49 und Filensin, Quinlan et al., 1996). Maßstab im kleinen Teilbild: 100 nm.

In einer Schnittserie eines Linsenfaserzellpräparates war eine amorphe Struktur auffällig, in deren Nähe Mikrotubuli verliefen und die in der Nähe zur Zellmembran zu liegen kam (**Abb. 4.31**). Es könnte sich hierbei um den Rest (?) eines Mikrotubulus Organisationszentrums (MTOC) handeln bzw. um ein fokales Zentrum welches mit Mikrotubuli assoziiert war.

Aufgrund der verdichteten Gestalt würden aber ebenso heterochromatische DNA-Reste in Frage kommen, wie sie nach einer Defragmentierung des Zellkerns vorliegen könnten.

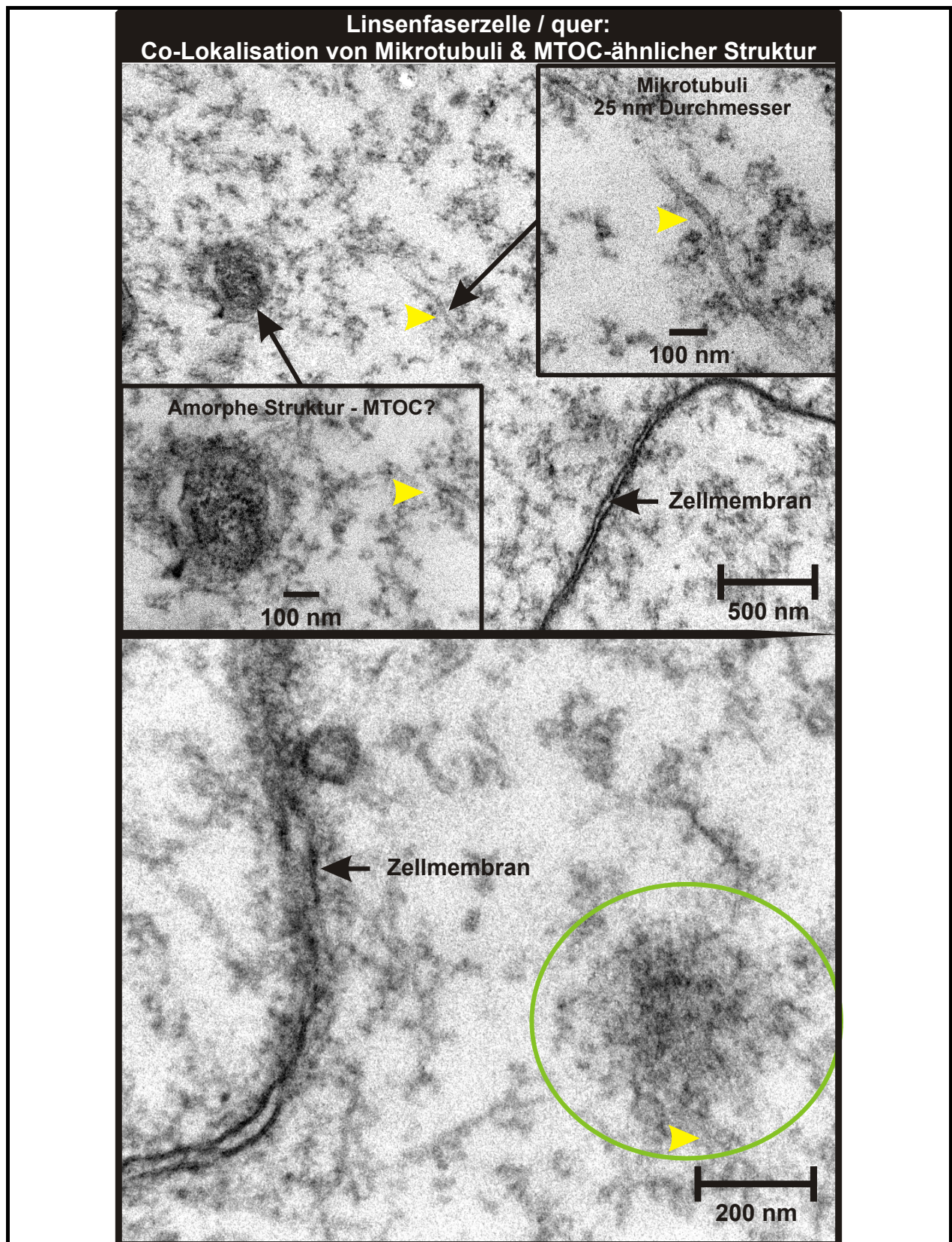


Abbildung 4.31: Sekundäre Linsenfaserzellen im Transmissionselektronenmikroskop. Die Bildreihe zeigt eine amorphe konzentrische Struktur, in deren unmittelbarer Nähe Mikrotubuli verlaufen. Es könnte sich hierbei um den Rest eines Mikrotubulus Organisationszentrum handeln. Möglicherweise offenbart das Mikrotubulus Organisationszentrum während der limitierten Apoptose eine solche Gestalt. Das untere Bild zeigt dieselbe amorphe Struktur (grüner Kreis) wie das obere Bild, nur einige Schnitte weiter im Präparat. Die gelben Pfeilspitzen zeigen Mikrotubuli an (Durchmesser ca. 25 nm). Bei der amorphen Struktur könnte es sich auch um heterochromatische DNA-Reste handeln. Die Interzellularräume der untersuchten Linsenfaserzellen waren nur selten breiter als 20 Nanometer.

4.8 Proteinbiochemie – Isolation von Proteinen aus Linsenfaserzellen

Im Rahmen von Voruntersuchungen zur Protein-Stabilität cytoskelettaler filamentöser Proteinpolymere in Linsenfaserzellen, wurden die cytosolischen, löslichen sowie die membrangebundenen, unlöslichen Proteine aus Faserzellen der Augenlinse isoliert.

Nach der Entnahme der Linsen aus den Augen, erfolgte zunächst die komplette Entfernung der Linsenkapsel durch Mikrosektion (siehe Material & Methoden, Kapitel 3.2). Dabei blieb ein Teil der Linsenepithelzellen an der Linsenkapsel haften und wurde so gleich mit entfernt. Da die Linsenepithelzellen weniger als 10% der zellulären Masse einer Augenlinse ausmachen, war der Anteil des verbleibenden Teils nur sehr gering.

Der überwiegende Teil an Linsenzellen (> 90%), die Linsenfaserzellen wurden in einem geeigneten Homogenisationspuffer bei 2–4 °C homogenisiert (in einem Potter) und bei 91287 g zentrifugiert. Durch diese Ultrazentrifugation wurden Zelltrümmer (Membranen) und Makromolekülkomplexe in einem Pellet sedimentiert und so von den cytosolischen Proteinen abgetrennt. Das Sediment wurde mehrmals gewaschen und erneut homogenisiert und denaturiert, um die in Komplexen organisierten und membrangebundenen Proteine in Lösung zu bekommen. Die restlichen Zellfragmente wurden erneut durch Ultrazentrifugation (91287 g; 2-4 °C) abgetrennt. Der erhaltene Überstand beinhaltete die membrangebundenen, unlöslichen Proteine.

Die SDS-Gel-Elektrophorese zeigte, dass der mit Abstand mengenmäßig überwiegende Teil der Proteine aus den Linsenfaserzellen Molekulargewichte zwischen 20 und 36 kDa aufwies. In diesem Bereich liegen die in Faserzellen angereicherten Crystalline (α -, β -, γ -Crystalline) mit Molmassen zwischen 20 und 40 kDa.

Auffallend war, dass bei den Mengen an Proteinisolat die auf das Gel aufgetragen wurden (Fraktion löslicher Proteine: ca. 5 mg/ml pro Laufspur; Fraktion gebundener Proteine: ca. 2,6 mg/ml) noch distinkte Banden zu detektieren waren, die nur im Bereich zwischen 20 und 36 kDa ineinander übergangen (Crystalline?) (**Abb. 4.32**).

Von den mittels mikroskopischer Techniken identifizierten F-Aktin-Mikrofilamenten und Mikrotubuli konnten ebenfalls die zugrunde liegenden Strukturproteine im Western Blot nachgewiesen werden. So waren G-Aktin (ca. 42 kDa) und α -Tubulin (ca. 50 kDa) in der Fraktion der löslichen sowie in der Fraktion der unlöslichen Proteine zu finden (**Abb. 4.33**). Dabei war das zu detektierende Signal beider Proteine jeweils in der Fraktion der cytosolischen Proteine stärker.

Das gamma-Tubulin (ca. 48 kDa), als ubiquitärer Bestandteil des MTOC war, in Übereinstimmung mit den immunfluoreszenzoptischen Methoden, in beiden Fraktionen der aus den Linsenfaserzellen isolierten Proteine nachweisbar. In der Fraktion der löslichen, cytosolischen Proteine wurde ein starkes Signal für γ -Tubulin bei 45 kDa detektiert, sowie zwei schwächere Banden zwischen 50 und 66 kDa. In der Fraktion der unlöslichen, gebundenen Proteine erschien das Signal für γ -Tubulin deutlich bei ca. 50 kDa und 84 kDa (**Abb. 4.33**). Das γ -Tubulin wurde also in beiden Fraktionen fragmentarisch mehrmals bei verschiedenen Molekulargewichten detektiert.

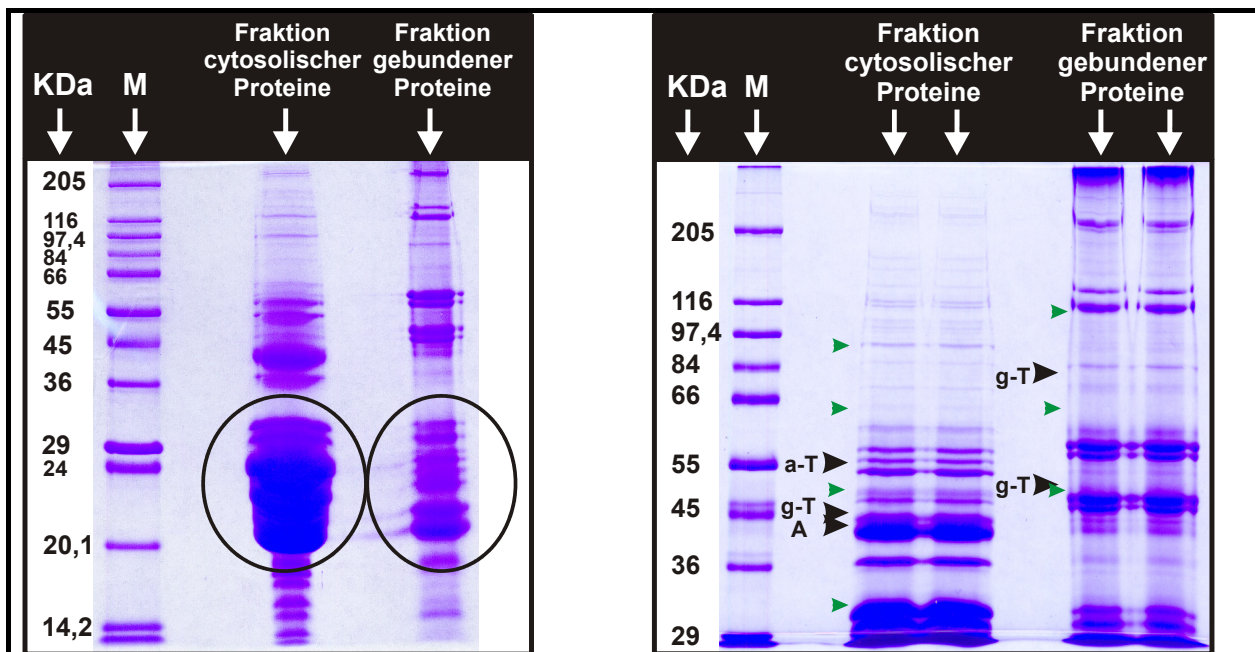


Abbildung 4.32: Die Gesamtheit der Proteine in Linsenfaserzellen, SDS-Gel-Elektrophorese. Links ein 12%iges SDS-Gel, rechts ein 8%iges SDS-Gel. Aufgetragen sind jeweils die Fraktion der löslichen, cytosolischen Proteine sowie die Fraktion der membrangebundenen, unlöslichen Proteine. Im linken Bild (12%iges Gel) wird die Verteilung der Proteine deutlich. Die Mehrheit der isolierten Proteine liegt in beiden Fraktionen zwischen 20 und 36 kDa (Ellipsen, Crystalline?). Trotz der Mengen an Protein, die aufgetragen wurden (Proteingehalt Fraktion cytosolischer Proteine ca. 5 mg/ml; Proteingehalt Fraktion gebundene Proteine ca. 3 mg/ml) waren die Proteine mehrheitlich in klar abgrenzbaren Größenbereichen zu finden. Im rechten Bild (8%iges Gel) sind die Positionen der im Western Blot identifizierten cytoskelettalen (schwarze Pfeilspitzen) & Mikrotubuli-assoziierten Proteine (grüne Pfeilspitzen) markiert. M = Marker/Proteingrößenstandard; A = G-Aktin; a-T = α -Tubulin; g-T = γ -Tubulin

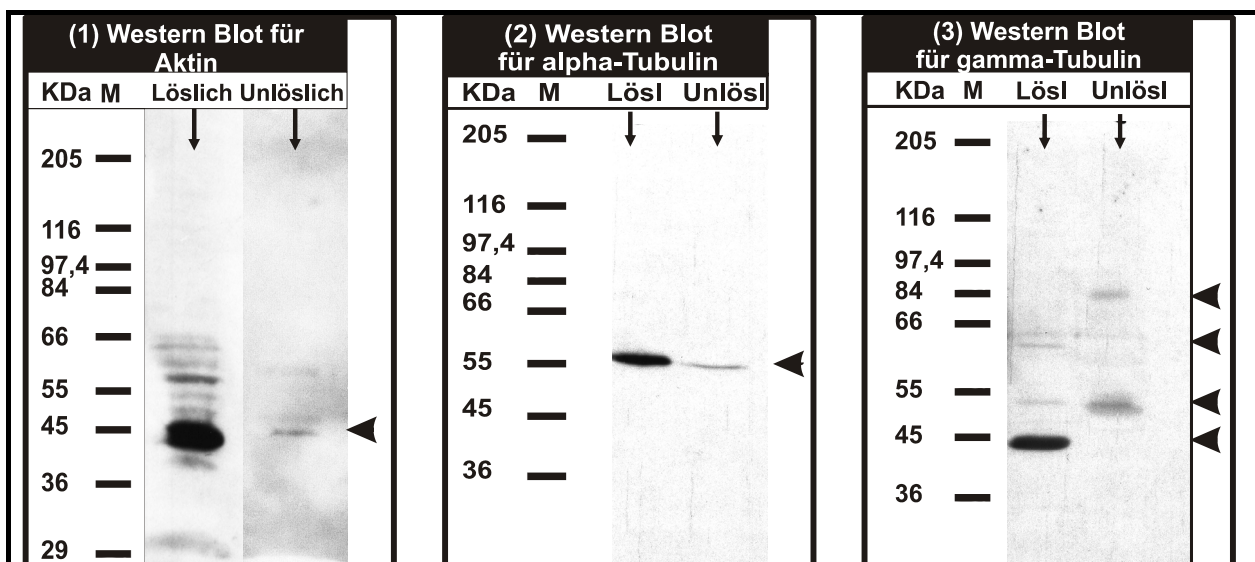


Abbildung 4.33: Strukturproteine des Cytoskeletts in Linsenfaserzellen, Western Blot. G-Aktin (links), alpha-Tubulin (Mitte) und gamma-Tubulin (rechts) konnten in Linsenfaserzellen über spezifische Antikörper identifiziert werden. Die Pfeilspitzen zeigen jeweils die deutlichen und spezifischen Signale an. Die Proteine wurden stets in beiden Fraktionen gefunden. Auffallend ist, dass gamma-Tubulin fragmentarisch an mehreren Positionen (Molekulargewichten) nachweisbar war. Proteine isoliert bei 2 – 4 °C. M = Marker / Proteingrößenstandard.

Um Hinweise auf Mikrotubuli-assoziierte Proteine zu finden, die stabilisierend und protektorisch auf die Mikrotubuli wirken, wurden die beiden isolierten Proteinfractionen auf das Vorhandensein von zwei der drei großen Familien Mikrotubuli-assoziiierter Proteine (MAP2 & Tau) hin untersucht. Mittels spezifischer Antikörper gegen MAP2 und Tau Proteine konnte ein klares MAP-Muster in den aus Faserzellen isolierten Proteinen nachgewiesen werden. Dabei erstreckten sich die detektierten Proteine hinsichtlich ihrer Molekulargewichte über ein weites Spektrum (**Abb. 4.34**). Zwischen 30 kDa und 116 kDa waren positive Signale für Mikrotubuli-assoziierte Proteine sowohl in der Fraktion der cytosolischen als auch in der Fraktion der gebundenen Proteine zu finden. Aufgrund ihrer Molekulargewichte sind die detektierten Proteine unterhalb von 80 kDa wahrscheinlich den Tau Proteinen zuzurechnen. Die hochmolekularen, über 80 kDa detektierten Proteine gehören demzufolge zur Familie der MAP2 Proteine.

Im Zusammenhang mit assoziierten Proteinen wurden die beiden isolierten Proteinfractionen auch auf das Vorkommen von Kinesin getestet. Jedoch konnte weder in der cytosolischen, noch in der unlöslichen Proteinfraction das Motorprotein Kinesin nachgewiesen werden.

Der Versuch die im Western Blot identifizierten Mikrotubuli-assoziierten Proteine durch Bindung an Taxol-stabilisierte Mikrotubuli (polymerisiert aus neuronalem Tubulin) aus der Fraktion der cytosolischen Proteine zu extrahieren, führte zu keinem Ergebnis (**Abb. 4.34**).

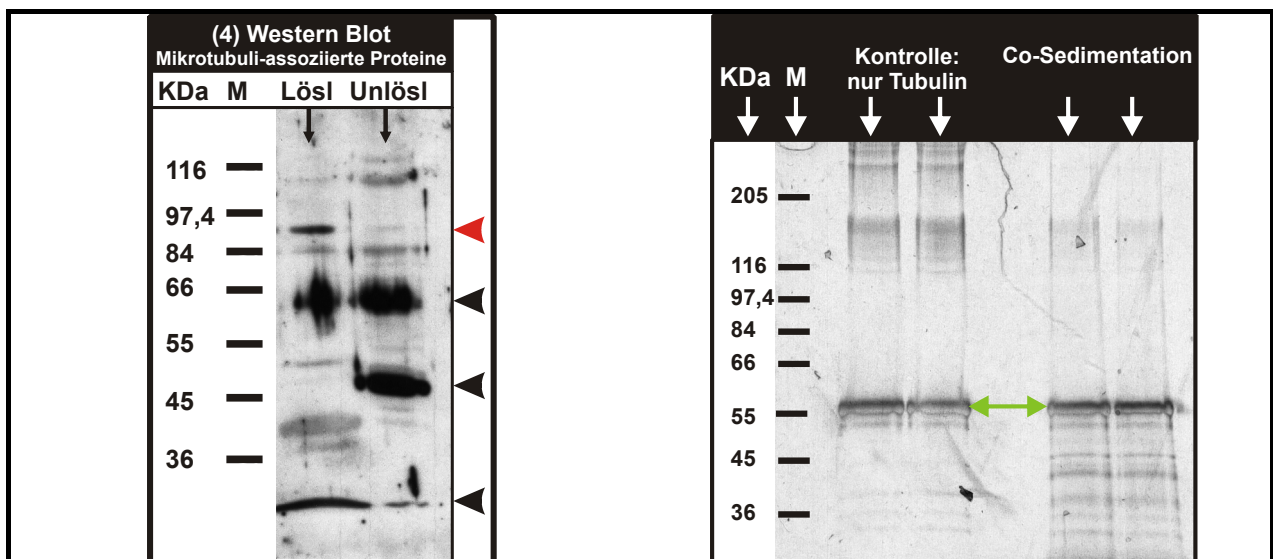


Abbildung 4.34: Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) in Linsenfaserzellen.

Das linke Bild zeigt einen Western Blot für MAP 2 und Tau-Proteine. In Linsenfaserzellen ist ein spezifisches MAP-Muster nachweisbar. Aufgrund der bekannten charakteristischen Molekulargewichte von Tau Proteinen (20 bis 70 kDa) und MAP2 Proteinen (typisch: 200-300 kDa, aber auch bei 70 kDa und zwischen 19 und 34 kDa nachgewiesen) handelt es sich bei den detektierten MAPs der Linsenfaserellen wahrscheinlich mehrheitlich um Tau Proteine (schwarze Pfeilspitzen). Die über 80 kDa liegenden positiven Signale für MAPs gehören eventuell zu MAP2 Proteinen (rote Pfeilspitze). Eine intensiv markierte Proteinbande liegt in einem Bereich, in dem auch die Crystalline aufgrund ihres Molekulargewichtes eingeordnet werden (unterste schwarze Pfeilspitze, bei ca. 29 kDa).

Das rechte Bild zeigt ein SDS-Gel (Silber-Färbung), auf das Kontrolle und Probe einer Co-Sedimentation aufgetragen wurden. Durch die Silberfärbung konnten geringste Mengen (10 ng/Bande) von Proteinen detektiert werden. Der grüne Doppelpfeil kennzeichnet das aufgereinigte neuronale Tubulin, welches als Substrat für die Polymerisation von Mikrotubuli diente. An die Mikrotubuli sollten MAPs aus der Fraktion der cytosolischen Proteine binden und so aus den cytosolischen Proteinen extrahiert werden. Jedoch konnten keine zusätzlichen Proteine identifiziert werden, die nicht auch in der Kontrolle zu finden waren.

5 Diskussion und Schlussfolgerung

In der vorliegenden zellbiologischen Arbeit zur Augenlinse der Säugetiere konnten folgende bisherigen Erkenntnisse zur Biologie der Augenlinse verifiziert werden:

- Die Augenlinse ist ein transparentes, kompaktes, aus Zellen bestehendes Organ.
- Eine formgebende, mechanisch stabile Linsenkapsel umschließt die Zellen der Augenlinse vollständig.
- Aufgebaut ist die Augenlinse aus Linsenepithelzellen (bilden ein einschichtiges Linsenepithelium über die gesamte vordere Oberfläche der Linse) und Linsenfaserzellen (bilden die zelluläre Hauptmasse der Linse).
- In einer äquatorialen Bildungszone differenzieren sich Linsenepithel- zu Linsenfaserzellen. Die sich bildenden Linsenfaserzellen werden auf bereits vorhandene Faserzellschichten aufgelagert. Der Kernbogen zeigt jene Linsenfaserzellen an, die prädifferentiert sind und ihren Zellkern noch besitzen. Dieser Kernbogen bricht dann abrupt ab, und die folgenden Faserzellen sind kernlos und somit sekundäre Linsenfaserzellen (ausdifferentiert).
- Im Zellverband sind die Linsenfaserzellen sehr regelmäßig angeordnet. Durch das abgeflachte hexagonale Grundmuster der Faserzellen (im Querschnitt) kommt eine sehr dichte Packung zustande. Die Zellmembranen der Linsenfaserzellen sind durch zahlreiche Membranausbuchtungen in einander verankert (Puzzle-ähnliche Verzahnung) ↪ "biologisches Kristalloid".
- Ausdifferentierte Linsenfaserzellen, die keinen Zellkern mehr besitzen, weisen ebenso keine membranumgebenen Organellen auf (Endoplasmatisches Reticulum, Dictyosom, Mitochondrien fehlen). Das verbleibende Grundplasma erscheint gleich verteilt ohne erkennbare lokale Verdichtungen makromolekularer Komplexe.
- Linsenfaserzellen der äußeren cortikalen Schichten haben als einzige subzelluläre Struktur ein komplettes Cytoskelett. Sie besitzen F-Aktin-Mikrofilamente, Intermediär-Filamente und Mikrotubuli. Die linsenspezifischen "beaded filaments" (Quinlan et al., 1999) konnten auch in der vorliegenden Arbeit in den Faserzellen der Linse vom Schwein nachgewiesen werden.
- Linsenfaserzellen haben ein stark mit Proteinen angereichertes Grundplasma. Die überwiegende Mehrheit dieser Proteine weist Molekulargewichte zwischen 20 und 40 kDa auf (hierbei handelt es sich höchstwahrscheinlich überwiegend um Crystalline).

Weiterhin konnten folgende neue Aspekte für die Zellen der Augenlinse nachgewiesen werden:

- Die durch spontane Teildifferenzierung von kultivierten Linsenepithelzellen gebildeten Lentoide (frühe Linsenfaser-Vorläuferzellen) leiten nach ca. 4-6 Wochen eine Redifferenzierung zurück zu breitflächig wachsenden Linsenepithelzellen ein.
- In Linsenfaserzellen der äußeren cortikalen Schichten wurden Multivesikuläre Körperchen nachgewiesen.
→ Multivesikuläre Körperchen (MVK; Terminologia histologica: Corpusculum multivesiculare; englisch: multivesicular body; multivesicular endosome): Diese rundlich bis länglich ovalen, membranumgebenen Organellen weisen mehrere kleinere Vesikel in ihrem Inneren auf. Sie wurden anhand ihrer charakteristischen Erscheinungsform identifiziert.

Multivesikuläre Körperchen werden zu den sekundären Lysosomen gezählt. Über ihre Funktionen ist noch nicht viel bekannt. Sie werden im Zusammenhang mit der Regulation von Rezeptordichten durch Ca^{2+} -abhängige Fusionen mit der Zellmembran (Savina et al., 2005) sowie mit dem gezielten lysosomalen Abbau von Proteinen (Piper and Luzio, 2001); (Denzer et al., 2000) diskutiert. Weiterhin werden MVK als Transportvehikel für mehrere kleinere Vesikel über längere Strecken angesehen (so z.B. in Neuronen, Weible and Hendry, 2004). Für die Linsenfaserzellen kann bezüglich dieser Multivesikulären Körperchen nur spekuliert werden. Es ist anzunehmen, dass die Linsenfaserzellen die solche MVK enthielten noch prädifferentiiert waren und dass die MVK bei der Degradation der Organellen im Rahmen der limitierten Apoptose eine Funktion haben. Aus der Literatur lässt sich vermuten, dass die MVK in Faserzellen neben dem Abbau von Zellorganellen auch der exocytotischen Ausschläuung der abgebauten Strukturen dienen.

- In den Linsenfaserzellen wird das mikrotubuläre Cytoskelett dezentralisiert.
- Linsenfaserzellen der äußeren cortikalen Schichten weisen in ihrem mikrotubulären Cytoskelett distinkte fokale Zentren auf, an denen Mikrotubuli zusammentreffen (Kapitel 5.4)
- Linsenfaserzellen haben lokale Verdichtungen von gamma-Tubulin, die ähnlich eines Mikrotubulus Organisationszentrum erscheinen, jedoch nicht mehr mit Mikrotubuli assoziiert sind → Teilfragmentierung des MTOC (Kapitel 5.5).

Die nachfolgenden Kapitel diskutieren die wesentlichen Ergebnisse dieser Diplomarbeit.

5.1 Desintegration und Vitalität

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass es unter einfachen experimentellen Bedingungen möglich ist, Augenlinsen des Hausschweins freizulegen und deren Zellen für weitere Untersuchungen aus ihrem Zellverbund herauszulösen. Die proteolytische Wirkung des Trypsin limitierte den Prozess der Desintegration auf Linsenepithelzellen, prädifferentiierte Linsenfaserzellen und sekundäre Linsenfaserzellen.

Die Vitalitätsnachweise kennzeichneten die Mehrzahl der gewonnenen Linsenepithel- und Linsenfaserzellen nach dem Prozess der Desintegration als lebendig.

Das bedeutet, dass auch die kernlosen, sekundären Linsenfaserzellen ohne einen Biomakromolekül-Syntheseapparat als lebendige Zellen in der Augenlinse vorliegen.

Es darf angenommen werden, dass neben dem hier verwendeten Trypsin auch andere Proteasen (z.B. Collagenasen) in gleichem Maße geeignet sind, Linsenepithel- und Linsenfaserzellen aus ihrem Zellverband zu lösen. So stellt die Augenlinse ein gut zugängliches Modellsystem für die Untersuchung grundlegender biologischer Fragestellungen, wie z.B. den Prozess des Alterns oder der limitierten Apoptose dar.

5.2 Primärkultur und Teildifferenzierung

Linsenepithelzellen eignen sich hervorragend für das Anlegen von Primärkulturen.

Deutlich herausgearbeitet werden konnte die Wichtigkeit des Zellkulturmediums für Wachstum, Stabilität über die Zeit und Teildifferenzierung. In dem Minimalmedium (nur essentielle Aminosäuren und Vitamine; keine Co-Faktoren) lag in gewisser Weise eine Nährstoffmangelsituation vor.

Trotz des Zusatzes von fetalem Kälberserum bildeten die Linsenepithelzellen keine morphologisch abgrenzbaren Differenzierungsformen. Ebenso in dem Vollmedium, wenn sie ohne fetales Kälberserum kultiviert wurden. In beiden Kultursystemen (Minimalmedium mit FKS bzw. Vollmedium ohne FKS) waren die Linsenepithelzellen maximal nur einen Monat stabil kultivierbar.

Die Kombination aus dem verwendeten Vollmedium (essentielle plus nicht-essentielle Vitamine und Aminosäuren, Co-Faktoren) mit dem fetalen Kälberserum (FKS) als wachstumsfördernden Zusatz, erwies sich als geeignet für eine stabile Primärkultur der Linsenepithelzellen über mehrere Monate. Nur in diesem Zellkulturmedium traten die in der Literatur beschriebenen und den vorliegenden Ergebnissen bestätigten Differenzierungsformen auf.

Die Ergebnisse sprechen für eine spontane Induktion der Teildifferenzierung von Linsenepithelzellen zu Lentoiden. Spontan bedeutet hierbei ohne zusätzliche Behandlung mit weiteren Wachstumsfaktoren. Es bleibt die Frage, ob die Kombination einzelner Faktoren des Vollmediums und fetalen Kälberserums die Linsenepithelzellen zur Teildifferenzierung anregen oder ob die Gesamtheit des Zellkulturmediums nur ein geeignetes Umgebungsmilieu darstellte, in dem andere Prozesse die Ausbildung von Lentoiden ermöglichten. Für die zweite Variante spricht die Beobachtung, dass die Linsenepithelzellen erst nach dichter und regelmäßiger Anordnung im Zellverband eine Teildifferenzierung in Primärkultur einleiteten. Das Zellkulturmedium (Vollmedium mit FKS) bildet somit die Voraussetzung, dass die Zellen ausreichend flächig wachsen, sich bewegen und in charakteristischer Weise anordnen können. Die Ergebnisse lassen weiterhin vermuten, dass die regelmäßige Anordnung der Linsenepithelzellen in einem dichten Zellverband der entscheidende Triggermechanismus ist, der zur Ausbildung der Lentoide führt. Bildeten die Linsenepithelzellen in Zellkultur nur einen dichten Zellverband, ohne sich vorher regelmäßig anzuordnen, traten die beschriebenen sphärischen, inselartigen Zellpopulationen auf. Die Lentoide, die eher an die bandförmigen Linsenfaserzellen erinnern, traten nur nach regelmäßiger Anordnung der Linsenepithelzellen auf. Die hier beschriebenen morphologischen Eigenschaften der Lentoide wurden auch in Primärkulturen von Linsenepithelzellen anderer Spezies (Huhn, Schaf) gefunden und, unterstützt durch molekularbiologische Befunde, mit einer Differenzierung in Richtung Linsenfaserzellen in Verbindung gebracht (Wride, 1996).

In der Augenlinse wird die Induktion der limitierten Apoptose in den Linsenfaserzellen durch ineffiziente Mitochondrienleistung oder andere Folgen eines stark eingeschränkten Stoffwechsels diskutiert (Bassnett, 2002). Für die Linsenepithelzellen in Zellkultur könnte ebenso eine Nährstoffmangelsituation zur Ausbildung eines Minimalmetabolismus führen, der eine induktive Wirkung entfalten könnte. Jedoch spricht dagegen, dass die in Minimalmedium kultivierten Linsenepithelzellen keine Lentoide ausbildeten. Und das Vollmedium mit dem FKS, in dem eine Teildifferenzierung zu Lentoiden auftrat, wurde alle 4 Tage gewechselt, so dass kein Nährstoffmangel entstehen konnte.

Im Zusammenhang betrachtet kann angenommen werden,

(1.) dass die Linsenepithelzellen ein endogenes Differenzierungsprogramm einleiten, welches unter den Bedingungen des Zellkulturmediums zur Bildung früher Linsenfaser-Vorläuferzellen führt.

(2.) dass der Differenzierungsprozess nach Bildung der Lentoide aufgrund fehlender weiterführender Signale abgebrochen wird. Denn nach 4 – 6 Wochen setzte eine Redifferenzierung von Lentoiden zurück zu flächig wachsenden, teilungsfähigen Linsenepithelzellen ein. Im Hinblick auf die Dislokation des MTOC vom Zellkern (siehe Kapitel 5.5) ist anzunehmen, dass dieser Prozess in den Lentoiden noch reversibel ist und die Teilung nach der Redifferenzierung wieder ermöglicht.

(3.) dass es Parallelen zur Neubildung von Linsenfasern in der nativen Augenlinse gibt. Womöglich ist die Organisation der Linsenepithelzellen in einem regelmäßig geordneten, dichten Zellverband essentiell für die extreme Verlängerung zu Faserzellen in der äquatorialen Bildungszone.

(4.) dass sich die ausgeprägte Polarität der Linsenfasern (das eine Ende liegt am vorderen Linsenpol, das andere am hinteren Linsenpol) bereits in den Lentoiden (ebenfalls bandförmig mit diametral voneinander entfernten Zell-Enden) manifestiert hat.

Die distinkten morphologischen Merkmale der Lentoide lassen den Schluss zu, dass die Teildifferenzierung zur Ausbildung sehr früher Linsenfasern-Vorläuferzellen führt. Ergebnisse aus anderen Arbeiten hinsichtlich der Ca^{2+} -Regulation von Lentoiden und der Reaktion auf spezifische Wachstumsfaktoren deuten ebenfalls eine Entwicklung von linsenfaserspezifischen Eigenschaften in den Lentoiden an (Churchill and Louis, 2002; Ooto et al., 2003).

5.3 Co-Kultur mit transformierten Zellen

Die Linsenkapsel wird als wirksame mechano-chemische Barriere angesehen, die das invasive Einwachsen von Blutgefäßen, Nerven und im Auge maligne transformierten Zellen in die Linse unterbindet (Chaturvedi, 2003). Jedoch ist anzunehmen, dass Linsenepithel- und Linsenfasern auch an der Aufrechterhaltung der Grenzfunktion beteiligt sind.

Die Ergebnisse aus den Voruntersuchungen dazu haben folgendes gezeigt:

- Linsenepithelzellen (LEZ) beeinflussten in Co-Kultur mit maligne transformierten Zellen (K-562 Leukämiezellen) weder deren Wachstum, noch deren Ausbreitung. Die Leukämiezellen verhielten sich, hinsichtlich ihrer Generationszeit, in der Kontrollkultur ohne LEZ nicht anders als in der Co-Kultur mit LEZ.
- In Co-Kultur von Linsenepithelzellen mit immortalisierten, microvaskulären Endothelzellen bildete sich eine deutliche Wachstumsgrenze zwischen den beiden Zellarten aus, die für mehr als zwei Wochen stabil bestehen blieb. Diese Phasengrenze deutet auf ein Kontaktphänomen durch gegenseitige spezifische Interaktion hin.

Die Zellen der Augenlinse könnten einerseits über die Abgabe diffusibler repulsiver Substanzen andere invasiv wachsende Zellen am Eindringen in die Linse hindern (Chemorepulsion). Andererseits oder in Verbindung mit einer Chemorepulsion könnten sie membrangebundene Oberflächenfaktoren exprimieren, die bei Kontakt zu linsenfremden Zellen repulsiv auf diese wirken (Kontaktrepulsion).

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Sezernierung von diffusiblen, repulsiv wirkenden Faktoren, wenn überhaupt vorkommend, nur zu einer Wirkung über kurze Distanzen führt.

So könnten repulsiv wirkende Substanzen im Kulturmedium der Co-Kultur mit den Leukämiezellen so stark ausverdünnt worden sein, dass die Konzentrationen nicht mehr ausreichten um die in Suspension wachsenden Leukämiezellen zu beeinflussen. Weiterhin bestand zwischen den adhärent wachsenden Linsenepithelzellen und den nicht adhärent wachsenden Leukämiezellen eine gewisse räumliche Entfernung, die eine Wirkung von diffusiblen, repulsiven Substanzen über kurze Distanzen oder eine Interaktion durch Kontaktphänomene mit den Linsenepithelzellen ausschloss.

Bei der Co-Kultur mit den Endothelzellen war die räumliche Nähe gegeben. Der Befund, dass die Linsenepithelzellen und die Endothelzellen an der Wachstumsgrenze nicht durchweg dicht an dicht lagen, sondern mehrmals durch enge Spalträume voneinander getrennt waren, lässt wieder beide Varianten in Frage kommen. Die Linsenepithelzellen könnten repulsive, oder wachstumshemmende Faktoren sezernieren, die nur in unmittelbarer Umgebung der Linsenepithelzellen in ausreichend hohen Konzentrationen vorlagen um auf die benachbarten Endothelzellen zu wirken. Oder sie wirken nur nach Kontakt mit den Endothelzellen wachstumshemmend auf diese.

Die Tatsache, dass die Linsenepithelzellen in der Co-Kultur mit den Endothelzellen im Bereich der Wachstumsgrenze einen sehr dichten Zellverband, ohne erkennbare Lücken aufwiesen lässt eine weitere Hypothese zu. Womöglich ist es der dichte Zellverband den die Linsenepithelzellen in Primärkultur, wie auch im Linsenepithelium der Augenlinse, ausbilden, der mechanisch ein invasives Einwachsen linsenfremder Zellen unterbindet.

Es muss erwähnt werden, dass es sich bei den Leukämie- und Endothelzellen um humane Zelllinien handelte. Deshalb ist anzunehmen, dass die natürliche Speziesgrenze eine gegenseitige Wechselwirkung bzw. Beeinflussung der beiden Zellarten verhinderte und die beschriebene Wachstumsgrenze zwischen Linsenepithel- und Endothelzellen nur eine unspezifische mechanische Inhibierung andeutete. In gleichem Atemzug kann ebenso vermutet werden, dass die Linsenepithelzellen des Schweins auch invasiv wachsende Zellen anderer Säugetierarten beeinflussen. In weiterführenden Co-Kulturexperimenten müsste deshalb untersucht werden, ob Linsenepithelzellen und HMEC1 Endothelzellen unabhängig voneinander mit anderen Zelllinien die beschriebenen Wachstumsgrenzen ausbilden.

Würden Linsenepithelzellen diffusible repulsive Substanzen sezernieren, dürften diese nur über kurze Distanzen wirken und müssten relativ unspezifisch sein. Dafür spricht unter anderem, dass verschiedene im Auge auftretende Tumore, die das ganze Auge ausfüllen, dicht an die Linse heranwachsen und dort eine klare Grenze zu ihr ausbilden (Chaturvedi, 2003). Würden die Linsenepithelzellen repulsiv wirkende, membrangebunden Oberflächenfaktoren exprimieren, müssten die ebenfalls unspezifisch auf mehrere Zellarten wachstumshemmend wirken.

Deshalb wird geschlossen, dass die Ausbildung und Aufrechterhaltung der linsentypischen Wachstumsgrenze für invasiv wachsende Gewebe, nach der Grenzfunktion der Linsenkapsel, am ehesten durch die mechanische Barriere des dichten und kompakten Zellverbandes der Linsenepithel- und Linsenfasern erklärt werden kann.

5.4 Die Umstrukturierung des Cytoskeletts während der limitierten Apoptose in Faserzellen

Das Cytoskelett ist als funktionelles System die einzige subzelluläre Struktur die in ausdifferenzierten Linsenfaserzellen noch vorhanden ist. Es wird durch die limitierte Apoptose nicht abgebaut, erfährt aber eine grundlegende Umstrukturierung die noch nicht vollends verstanden ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass bereits bei der Teildifferenzierung von Linsenepithelzellen zu Lentoiden in der Zellkultur deutliche Veränderungen im Verteilungsmuster der Mikrofilamente und der Mikrotubuli auftreten. Gleiches konnte für die Lage des Mikrotubulus Organisationszentrum gezeigt werden (siehe Kapitel 5.5).

Undifferenzierte Linsenepithelzellen in Primärkultur hatten ein komplexes Netzwerk aus **Mikrofilamenten**, die in mehreren Bündeln in der gesamten Zelle nachzuweisen waren. Dieses F-Aktin-Netzwerk scheint in besonderer Weise bei den kultivierten Linsenepithelzellen für die Ausbildung des beschriebenen dichten und kompakten Zellverbandes verantwortlich zu sein. Dies wird durch Ergebnisse einer Arbeit von Chifflet (Chifflet et al., 2004) deutlich, in der gezeigt wurde, dass induzierte Veränderungen des F-Aktin-Cytoskeletts zu einem Verlust des dichten Zellverbandes führten.

In Lentoiden tritt eine starke Bündelung von Mikrofilamenten und Verlagerung in periphere Bereiche der Zelle auf. Mikrofilamente werden aus dem zentralen Cytoplasma dicht an die Innenseite der Zellmembran angelagert. Für Linsenepithelzellen konnte in einer anderen Arbeit gezeigt werden, dass die Organisation des F-Aktin Cytoskeletts eng mit den Biosynthese-Prozessen der Zellen korreliert ist (Iwig, 1997). Die Umstrukturierung des Aktin-Mikrofilamentsystems in den Lentoiden hat möglicherweise bereits einen Einfluss auf deren Biomakromolekülsynthese und ist mit verantwortlich dafür, dass die lentoiden Zellen nur über einen Zeitraum von 4 - 6 Wochen stabil sind.

In isolierten sekundären Linsenfaserzellen, sowie in den Kryo-Schnitten der Augenlinse konnte F-Aktin konzentriert nur in direkter Co-Lokalisation zur Zellmembran nachgewiesen werden. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Linsenfaserzellen bestätigten die Existenz eines submembranösen F-Aktin-Filamentnetzwerkes, wie es auch in anderen Arbeiten gefunden wurde (Ireland et al., 1983).

Im Gegensatz zu einer Arbeit von Lo, zur Orientierung von Aktin-Filamentbündeln in Linsenfaserzellen der Ratte (Lo et al., 1997), konnten in den Linsenfaserzellen des Schweins keine Aktin-Filamentbündel in spezifischer Ausrichtung zur Faserzellmembran gefunden werden. Hier war das F-Aktin organisiert in einem dichten submembranösen Netzwerk nachweisbar. Die dichte Bündelung der Aktin-Mikrofilamente auf der Innenseite der Cytoplasmamembran lässt vermuten, dass eine funktionelle Kopplung zur Zellmembran der Faserzellen besteht. Die Tatsache, dass bei den biochemischen Untersuchungen das G-Aktin (monomeres Strukturprotein der F-Aktin-Mikrofilamente) in beiden Proteinfractionen aus Linsenfaserzellen, also den cytosolischen und den membrangebundenen Fraktionen, nachzuweisen war, unterstützt die Hypothese einer funktionellen Kopplung des Mikrofilamentnetzwerkes an die Zellmembran. Jedoch kann angenommen werden, dass diese Kopplung nur punktuell an mehreren Stellen der Membran vorhanden ist.

Über verschiedene Aktin bindende Proteine könnten die Aktin-Filamente untereinander und mit der Zellmembran vernetzt sein. Das Vorhandensein solcher Aktin-Bindeproteine in Linsenfaserzellen wurde bereits in anderen Arbeiten nachgewiesen (Woo et al., 2000). In einer Arbeit von Bassnett, Missey und Vucemilo (1999) wurde für Linsenfaserzellen eine funktionelle Kopplung von Aktin-Filamenten mit bestimmten Zelladhäsionsmolekülen (N-Cadherin) postuliert. Demzufolge sollte ein subcortikales F-Aktin-Netz die Bindung der Linsenfaserzellen an die posteriore Linsenkapsel über Zelladhäsionsmoleküle stabilisieren.

Somit kann geschlussfolgert werden, dass das F-Aktin Cytoskelett als subcortikaler mechanischer Stabilisator die Zellmembranen der Linsenfaserzellen erstens über die extreme Länge und zweitens über den hexagonalen Querschnitt verstärkt und so die mechanische Stabilität und Elastizität der Faserzellen als Ganzes entscheidend mitbestimmt.

F-Aktin könnte neben einer morphogenetischen Funktion auch eine Rolle bei der Organisation des Stofftransportes in den Linsenfaserzellen spielen, indem durch die Strukturierung des F-Aktin-Filamentnetzwerkes funktionell bedeutende Bereiche in der Zellmembran determiniert werden. Eine Assoziation von F-Aktinbündeln mit den gap junctions der Faserzellmembranen in Linsen von Primaten wurde bereits in anderen Arbeiten diskutiert und durch Beweise untermauert (Lo et al., 1994).

Nicht zuletzt ist die Eliminierung von F-Aktin-Filamentbündeln aus dem zentralen Grundplasma als evolutive Anpassung an möglichst verlustfreie Lichtweiterleitung und Verbesserung der optischen Eigenschaften der Linsenfaserzellen zu verstehen. Mikrofilamentbündel die kreuz und quer durch das Grundplasma der Faserzellen ziehen, würden zur zusätzlichen Streuung von Licht und damit zur Trübung der Linse führen.

Mikrotubuli bildeten in den Linsenepithelzellen, ausgehend von einer hohen Dichte in direkter Umgebung zum Zellkern (Kopplung an das MTOC), ein durch die gesamte Zelle ziehendes komplexes Netzwerk aus.

In den Lentoiden ist das Verteilungsmuster des Mikrotubulinetzwerkes den faserförmig verlängerten Zellen zwar angeglichen, nicht aber auf deren Längsachse beschränkt.

In den isolierten Linsenfaserzellen konnten ebenfalls Mikrotubuli nachgewiesen werden. Sie ziehen einerseits wellenförmig längs durch die Zellen und andererseits kreuzen sie die Zellen von einer Seite der Zellmembran zur anderen.

Die Ergebnisse zeigen, dass das mikrotubuläre Cytoskelett mit zunehmender Differenzierung der Linsenfaserzellen dezentralisiert wird!

Dabei konnten Mikrotubuli auch in Linsenfaserzellen detektiert werden, die bereits keinen Zellkern mehr besaßen. Dies steht im Widerspruch zu einer Arbeit von Millar et al., 1997, in der Mikrotubuli nur in prädifferentiellen Linsenfaserzellen beschrieben wurden. Jedoch wurde auch in den Ergebnissen von Millar deutlich, dass die Mikrotubuli einerseits wellenförmig durch die Faserzellen ziehen und andererseits die Zellen kreuzen. Die helikale Anordnung mehrerer Mikrotubuli entlang einer Orientierungsachse (Längsachse der Faserzellen), könnte den Faserzellen zusätzliche Flexibilität und Elastizität verleihen. Für die Ausbildung von helikalen Mikrotubuli wären zusätzliche assoziierte Proteine anzunehmen, die die Organisation einer solchen wellenförmigen Struktur unterstützen.

Bisher noch nicht beschrieben, sind die in den Linsenfaserzellen der äußeren cortikalen Schichten distinkten fokalen Zentren, an denen Mikrotubuli zusammenlaufen. Unklar ist, ob die Mikrotubuli an den gefundenen fokalen Zentren zusammentreffen oder von ihnen entspringen. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Zentren um reorganisierte Nukleationselemente an denen Mikrotubuli an mehr als nur einer Stelle in den Faserzellen polymerisieren können (siehe Kapitel 5.5). Mehrere solcher Nukleationskeime über die Länge einer Faserzelle verteilt, würden die unabhängige Bildung von polymeren Mikrotubuli an molekularbiologisch weit entfernten Orten ermöglichen.

Es könnte sich bei den distinkten fokalen Zentren der Faserzellen um Orte handeln an denen Mikrotubuli eines bestimmten Faserzellabschnitts stabilisiert werden. So könnte die Dynamik in dem mikrotubulären System minimiert werden um ständige Umbauprozesse bzw. lokale Verdichtungen von Mikrotubuli (und damit Lichtstreuung) zu unterbinden. Über spezifische Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs, Capping-Proteine) könnte sowohl das Assemblierungs-Desassemblierungs-Gleichgewicht, als auch die dynamische Instabilität zur polymeren Form der Mikrotubuli hin verschoben sein. Dass Mikrotubuli-assoziierte Proteine in den Linsenfaserzellen nachzuweisen sind, wurde in dieser Arbeit gezeigt. Dabei handelte es sich weitestgehend um Proteine mit Molekulargewichten unter 116 kDa. Dies lässt vermuten, dass es sich mehrheitlich um Tau Proteine handelt, welche die Mikrotubuli-assoziierten Proteine mit den niedrigen Molekulargewichten zwischen 50 und 70 kDa repräsentieren. In Neuronen ist eine Isoform von Tau Proteinen beschrieben die ein Molekulargewicht von 120 kDa hat (Shahani and Brandt, 2002). In Linsenfaserzellen könnten ebenfalls Tau Proteine mit Molekulargewichten über 70 kDa existieren. Für Tau Proteine ist nachgewiesen, dass sie positiv auf die Assemblierung sowie das Wachstum von Mikrotubuli wirken und sie durch Reduktion der dynamischen Instabilität stabilisieren. Des Weiteren liefern Tau Proteine, als primäre Bindungspartner von Mikrotubuli, zusätzliche Bindungsstellen für andere Interaktionspartner des mikrotubulären Cytoskeletts. So können über Tau Proteine Mikrofilamente mit Mikrotubuli strukturell und funktionell gekoppelt werden, ebenso wie Mikrotubuli über Tau Proteine und weitere Bindungspartner mit der Zellmembran verbunden werden können (Shahani and Brandt, 2002).

Durch die MAPs wird auch eine Interaktion der Mikrotubuli zu den Crystallinen möglich. Ergebnisse von Fujita (Fujita et al., 2004) haben gezeigt, dass α B-Crystallin über MAPs an die Mikrotubuli bindet und so deren Stabilität erhöht. Die Interaktion von α B-Crystallin über MAPs mit Mikrotubuli führte zu einer Resistenz der Mikrotubuli gegenüber depolymerisierenden Noxen (Nocodazol, erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen). Weiterhin wurde in der Arbeit von Fujita gezeigt, dass das α B-Crystallin nicht an Mikrotubuli bindet, die aus aufgereinigtem Tubulin polymerisiert wurden und keine MAPs gebunden hatten.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Mikrotubuli der Linsenfaserzellen über Mikrotubuli-assoziierte Proteine einerseits in den distinkten fokalen Zentren stabilisiert werden und andererseits mit dem submembranösen Aktin-Mikrofilamentnetzwerk verbunden sein könnten. Ebenso wäre über die MAPs eine funktionelle Interaktion zu den Crystallinen möglich.

Die im Western Blot nachgewiesenen MAPs konnten nicht durch Bindung an Taxol-stabilisierte Mikrotubuli (aufgereinigtes neuronales Tubulin), aus der Fraktion der cytosolischen Proteine, isoliert werden.

Es ist bekannt, dass die Bindung von MAPs an polymerisierte Mikrotubuli deutlich von den post-translationalen Modifikationen des α,β -Tubulinheterodimers abhängt (Bonnet et al., 2001). Es wäre möglich, dass die Mikrotubuli der Linsenfaserzellen spezifische post-translationalen Modifikationen aufweisen, die eine Voraussetzung für die differentielle Bindung der linsenspezifischen MAPs sind. Der Nachweis, dass Mikrotubuli in Linsenfaserzellen post-translational modifiziert sind (durch Acetylierung) wurde bereits erbracht (Millar et al., 1997). Wenn dem neuronalen Tubulin diese Modifikationen fehlen, können auch die MAPs aus den Linsenfaserzellen nicht an Mikrotubuli binden die aus neuronalem Tubulin assembliert wurden. Alternativ kann vermutet werden, dass in den Linsenfaserzellen ein spezifisches biochemisches Umgebungsmilieu existiert, was für die Interaktion von MAPs mit Mikrotubuli in Linsenfaserzellen essentiell ist und unter den verwendeten experimentellen Bedingungen im Reaktionspuffer nicht erreicht wurde.

Trotz der gefundenen Hinweise auf eine deutliche Stabilisierung der Mikrotubuli in den Linsenfaserzellen, ist diese nicht irreversibel. Die hier gezeigte Kälte-Sensitivität der Faserzell-Mikrotubuli deutet an, dass immer noch eine Dynamik im mikrotubulären System erhalten bleibt. Die immunofluoreszenzoptischen Untersuchungen konnten deutlich zeigen, dass die bei 37 °C isolierten Linsenfaserzellen Mikrotubuli, die beschriebenen α -Tubulin positiven fokalen Zentren und stets auch membrannahen Verteilungen von Tubulin aufwiesen.

In den bei 2 °C isolierten Linsenfaserzellen waren dagegen keine Mikrotubuli und keine α -Tubulin positiven fokalen Zentren, wohl aber die membrannahen Tubulin-Verdichtungen nachzuweisen. Die Hypothese, dass Mikrotubuli kältesensitiv sind wird auch durch die Western Blot Analysen gestützt. Hier konnte das α -Tubulin viel konzentrierter in der Fraktion der cytosolischen Proteine als in der mit den gebundenen Proteinen detektiert werden. Da die Linsenfaserzellen während der Isolation der beiden Proteinfractionen bei 2 °C homogenisiert wurden, ist anzunehmen, dass die Mikrotubuli desassemblierten und das Tubulin deshalb konzentrierter in den löslichen Proteinen zu finden war. Demzufolge müsste nach Homogenisation der Linsenfaserzellen bei 37 °C das Tubulin konzentrierter in der Fraktion der gebundenen Proteine nachweisbar sein (wurde hier nicht untersucht).

Bei den detektierten membrannahen Tubulin-Verteilungen (streifenförmig entlang der Faserzellmembran) bleibt die Frage, ob es sich um in die Zellmembran inkorporiertes Tubulin handelt (Membrantubulin) oder ob in den Linsenfaserzellen ein subcortikaler Tubulin-Pool existiert. Solch ein Pool für Tubulin entlang der Zellmembran wäre eine gute Quelle um an jedem Ort der Faserzelle Tubulin zum Einbau in Mikrotubuli parat zu haben.

Haben die Mikrotubuli in den Linsenfaserzellen der äußeren corticalen Schichten nur morphogenetische Funktion oder sind sie an der Organisation eines intrazellulären Stofftransportsystems beteiligt? Ergebnisse von Lo et al. (Lo et al., 2003) lassen vermuten, dass in Differenzierung befindliche Linsenfaserzellen (der Ratte) während der limitierten Apoptose den Transport von Vesikeln und Proteinen über ein mikrotubuläres Transportsystem organisieren und dazu die Motorproteine Kinesin und Dynein verwenden.

Hingegen konnte in der vorliegenden Arbeit Kinesin weder immunfluoreszenzoptisch noch über Western Blot Analysen in den Faserzellen nachgewiesen werden. Prädifferenzierte sowie ausdifferenzierte Linsenfaserzellen waren komplett negativ für Kinesin.

Linsenfaserzellen können sich ein energieverbrauchendes Transportsystem nur leisten, wenn spezifische Umverteilungen nötig wären. Für die Differenzierung während der limitierten Apoptose ist dies gut vorstellbar. Jedoch bleibt die Frage was in den sekundären Linsenfaserzellen noch transportiert werden muss? Möglicherweise ist eine Umverteilung von Proteinen (Crystalline?) nur in sehr geringem Maße über Motorproteine organisiert, so dass Kinesin unterhalb der Nachweisgrenze liegt (bei Nachweis in Proteinextrakten ohne vorherige Anreicherung von Kinesin!).

Ein Merkmal des Cytoskeletts in Linsenfaserzellen ist die deutliche Kopplung an die Zellmembran der Faserzellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die enge Anbindung von F-Aktin-Mikrofilamenten und Mikrotubuli an die Cytoplasmamembran. Für Filensin, ein Strukturprotein der linsenspezifischen "beaded filaments", ist ebenfalls eine Bindung an die Zellmembran nachgewiesen (Brunkener and Georgatos, 1992).

5.5 Die Teilfragmentierung des Mikrotubulus Organisationszentrum (MTOC) in Faserzellen

Die Literaturmeinung geht davon aus, dass die Linsenfaserzellen während der limitierten Apoptose ihr Centrosom verlieren und damit das MTOC grundlegend reorganisieren (Millar et al., 1997). Jedoch konnten bisher weder ein MTOC noch Proteine die das MTOC aufbauen in den Linsenfaserzellen nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden deutliche Hinweise gefunden, die auf eine Teilfragmentierung des Mikrotubulus Organisationszentrums während der limitierten Apoptose der Linsenfaserzellen schließen lassen. Über spezifische Antikörper gegen γ -Tubulin war in den Linsenfaserzellen die Detektion lokaler punktförmiger Verdichtungen möglich. Diese γ -Tubulin positiven Zentren waren niemals mit Mikrotubuli assoziiert und erschienen entweder als ein größeres punktförmiges Zentrum pro Faserzelle oder als mehrere kleinere Spots in einer Faserzelle. In jedem Fall waren die γ -Tubulin Signale dicht angelagert an die Faserzellmembran lokalisiert. Bereits bei den kultivierten, teildifferenzierten Linsenepithelzellen (Lentoiden) konnte eine Dislokation des MTOC vom Zellkern mit gleichzeitigem Verlust der Assoziation mit Mikrotubuli festgestellt werden. Hinzukommend wurde γ -Tubulin auch in Homogenaten von Linsenfaserzellen im Western Blot nachgewiesen. Dabei war das Protein sowohl in der Fraktion der cytosolischen Proteine als auch in der mit den membrangebundenen Proteinen nachzuweisen

All diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das MTOC während der limitierten Apoptose vom Zellkern der sich bildenden Faserzellen gelöst und schrittweise partiell defragmentiert wird. Zusätzlich geht die Funktion als zentrales Mikrotubulus Organisationszentrum und zentrales Nukleationszentrum verloren. Diese Teilfragmentierung scheint schon in frühen Phasen der limitierten Apoptose einzusetzen. In dieser Arbeit konnte bereits in prädifferenzierten Linsenfaserzellen, die noch einen Zellkern besaßen, kein MTOC in dessen Umgebung gefunden werden. Die Tatsache, dass prädifferenzierte Linsenfaserzellen ebenso wie kernlose, sekundäre Linsenfaserzellen Mikrotubuli besitzen, lässt eine Organisation unabhängig von einem zentralen Zentrum vermuten.

Hier kommen die distinkten fokalen Zentren (positiv für α -Tubulin) in Frage, an denen Mikrotubuli zusammenlaufen und die mehrmals pro Faserzelle gefunden wurden.

Möglicherweise handelt es sich nicht nur um lokale Verknüpfungs- und Stabilisationszentren, sondern auch um Orte an denen Mikrotubuli assemblieren können (Nukleationszentren). Das γ -Tubulin könnte in Folge der Fragmentierung des MTOC aus diesem entfernt und in die beschriebenen fokalen Zentren eingelagert werden. Da mehrere solcher distinkten Verknüpfungspunkte für Mikrotubuli in einer Faserzelle nachgewiesen wurden, ist es möglich, dass das γ -Tubulin auf diese Zentren aufgeteilt wurde. So könnten die Konzentrationen des γ -Tubulin innerhalb der fokalen Zentren unterhalb der Nachweisgrenze für die Immunofluoreszenz liegen (aufgrund geringster Mengen immunofluoreszenzoptisch nicht zu detektieren). Dies würde erklären, warum das γ -Tubulin mittels immunofluoreszenzoptischer Methoden nicht in den distinkten fokalen Zentren nachweisbar war.

Alternativ wäre es möglich, dass das γ -Tubulin funktionell mit der Zellmembran verbunden wird und von dort als Nukleationszentrum für die Mikrotubuli der Faserzellen dient. Hierfür sprechen zum einen die Lokalisation von γ -Tubulin in dichter Anlagerung an die Zellmembran und zum anderen die Befunde, dass auch Mikrotubuli direkt an der Zellmembran von Linsenfasern lagen. Jedoch wurden die γ -Tubulin-Verdichtungen nie überlagert von Mikrotubuli detektiert.

Die Mikrotubuli der Linsenfasern könnten auch vor der partiellen Defragmentierung des MTOC nukleiert worden sein, so dass sie in den Linsenfasern ohne funktionierendes MTOC nur noch assembliert oder desassembliert, jedoch nicht mehr neu gebildet werden können. Dies würde aber wiederum ein System erfordern, welches die Mikrotubuli an beiden polaren Enden stabilisiert und die Dynamik kontrolliert.

Alles in allem ist die partielle Fragmentierung des MTOC auch als eine Anpassung an die Verbesserung der optischen Eigenschaften der Linsenfasern zu verstehen. Ein zentraler Punkt an dem die Mehrheit der Mikrotubuli konzentriert zusammentrifft, führt zu zusätzlicher Lichtstreuung. Die Dezentralisierung einer solchen Struktur würde die Streuung des durchfallenden Lichtes weiter minimieren.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass das Cytoskelett der Linsenfasern als funktionelle morphogenetische Einheit fungiert. Besonders bei der Differenzierung der Linsenfasern und deren extremen Verlängerung dürfte die mechanische Stabilisierung der Faserzellmembranen durch subcorticale Cytoskelett-Elemente essentiell sein. Für kultivierte Zellen ist bestätigt, dass Mikrotubuli in die Ausbildung von Polarität, bei gerichteten Bewegungsprozessen sowie in die Ausbildung von Zell-Substrat-Wechselwirkungen involviert sind (Small et al., 2002; Krylyshkina et al., 2003). Auch in Linsenfasern könnte das mikrotubuläre Cytoskelett elementar in die limitierte Apoptose und die damit verbundene Degradation der Organellen, Transport der Multivesikulären Körperchen und stattfindenden Umverteilungen des Grundplasmas eingebunden sein. So ist eine Interaktion mit Crystallinen wahrscheinlich und möglicherweise sind die Mikrotubuli der ausdifferenzierten, kernlosen Linsenfasern an der Aufrechterhaltung der optisch homogenen Verteilung der Crystalline mit beteiligt. Übergeordnet trägt das Cytoskelett als elementarer Bestandteil der Linsenfasern wesentlich zur Aufrechterhaltung der optischen Eigenschaften (Clark et al., 1999) der Augenlinse bei.

6 Literaturverzeichnis

Lehrbücher

Plattner, H., Hentschel, J. Taschenlehrbuch Zellbiologie. Thieme Verlag, Stuttgart, 1997

Plattner, H., Zingsheim, H.P. Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell- und Molekularbiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986

Wissenschaftliche Artikel

Augusteyn, R.C. & Stevens, A. Macromolecular structure of the eye lens. *Progress in Polymer Science* 23, 375-413 (1998).

Bai, F., Xi, J.H., Wawrousek, E.F., Fleming, T.P. & Andley, U.P. Hyperproliferation and p53 status of lens epithelial cells derived from alpha B-crystallin knockout mice. *Journal of Biological Chemistry* 278, 36876-36886 (2003).

Bassnett, S. & Mataic, D. Chromatin degradation in differentiating fiber cells of the eye lens. *Journal of Cell Biology* 137, 37-49 (1997).

Bassnett, S. Lens organelle degradation. *Experimental Eye Research* 74, 1-6 (2002).

Bassnett, S., Missey, H. & Vucemilo, I. Molecular architecture of the lens fiber cell basal membrane complex. *Journal of Cell Science* 112, 2155-2165 (1999).

Benedetti, E.L. *et al.* Structural organization of gap junctions as revealed by freeze-fracture and SDS fracture-labeling. *European Journal of Cell Biology* 79, 575-582 (2000).

Bhat, S.P. The ocular lens epithelium. *Bioscience Reports* 21, 537-563 (2001).

Blum, H., Beier, H., and Gross, H.J. (1987). Improved Silver Staining of Plant-Proteins, Rna and Dna in Polyacrylamide Gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.

Blundell, T. *et al.* The Molecular-Structure and Stability of the Eye Lens - X-Ray-Analysis of Gamma-Crystallin-li. *Nature* 289, 771-777 (1981).

Bonnet, C. *et al.* Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylaton. *Journal of Biological Chemistry* 276, 12839-12848 (2001).

Boulton, M. & Albon, J. Stem cells in the eye. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, 643-657 (2004).

Brunkener, M. & Georgatos, S.D. Membrane-Binding Properties of Filensin, A Cytoskeletal Protein of the Lens Fiber Cells. *Journal of Cell Science* 103, 709-718 (1992).

Chaturvedi *et al.*, The Conundrum of Lenticular Oncology. A Review. *Indian Journal of Ophthalmology* 51, 297-301 (2003).

Chifflet, S., Correa, V., Nin, V., Justet, C. & Hernandez, J.A. Effect of membrane potential depolarization on the organization of the actin cytoskeleton of eye epithelia. The role of adherens junctions. *Experimental Eye Research* 79, 769-777 (2004).

- Churchill,G.C. & Louis,C.F. Ca²⁺ regulation in differentiating lens cells in culture. *Experimental Eye Research* 75, 77-85 (2002).
- Clark,J.I., Matsushima,H., David,L.L. & Clark,J.M. Lens cytoskeleton and transparency: a model. *Eye* 13, 417-424 (1999).
- Dahm, R. Klare Sicht durch Augenlinsen. *Spektrum der Wissenschaft*, 24-30 (2/2005)
- Dahm,R. & Prescott,A.R. Identification of a novel intercellular structure in late-stage differentiating lens cells. *Ophthalmic Research* 35, 2-7 (2003).
- Dahm,R. Dying to see. *Scientific American* 291, 82-89 (2004).
- De Jong, W.W, Lubsen, N.H. & Kraft, H.J. Molecular Evolution of the Eye Lens. *Progress in Retinal and Eye Research* 13, 391-442 (1994).
- Denzer,K., Kleijmeer,M.J., Heijnen,H.F.G., Stoorvogel,W. & Geuze,H.J. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *Journal of Cell Science* 113, 3365-3374 (2000).
- Fujita,Y., Ohto,E., Katayama,E. & Atomi,Y. alpha B-crystallin-coated MAP microtubule resists nocodazole and calcium-induced disassembly. *Journal of Cell Science* 117, 1719-1726 (2004).
- Geiger,B., Bershadsky,A., Pankov,R. & Yamada,K.M. Transmembrane extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, 793-805 (2001).
- Gu,S.M., Yu,X.S., Yin,X.Y. & Jiang,J.X. Stimulation of lens cell differentiation by gap junction protein connexin 45.6. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44, 2103-2111 (2003).
- Ireland,M., Lieska,N. & Maisel,H. Lens Actin - Purification and Localization. *Experimental Eye Research* 37, 393-408 (1983).
- Iwig, M. Alteration of the Cytoskeleton of Lens Epithelial Cells and its Effects on DNA-, RNA- and Protein-Synthesis. *Nova Acta Leopoldina* NF 75, 185-198 (1997).
- Jung,E.G. Xeroderma-Pigmentosum. *International Journal of Dermatology* 25, 629-633 (1986).
- Kivela,T. & Uusitalo,M. Structure, development and function of cytoskeletal elements in non-neuronal cells of the human eye. *Progress in Retinal and Eye Research* 17, 385-428 (1998).
- Krylyshkina,O. *et al.* Nanometer targeting of microtubules to focal adhesions. *Journal of Cell Biology* 161, 853-859 (2003).
- Kuszak,J.R., Zoltoski,R.K. & Sivertson,C. Fibre cell organization in crystalline lenses. *Experimental Eye Research* 78, 673-687 (2004).
- Kyselova,Z., Stefek,M. & Bauer,V. Pharmacological prevention of diabetic cataract. *Journal of Diabetes and Its Complications* 18, 129-140 (2004).
- Lo,W.K., Mills,A. & Kuck,J.F.R. Actin Filament Bundles Are Associated with Fiber Gap-Junctions in the Primate Lens. *Experimental Eye Research* 58, 189-196 (1994).
- Lo,W.K., Shaw,A.P. & Wen,X.J. Actin filament bundles in cortical fiber cells of the rat lens. *Experimental Eye Research* 65, 691-701 (1997).

- Lo,W.K., Wen,X.J. & Zhou,C.J. Microtubule configuration and membranous vesicle transport in elongating fiber cells of the rat lens. *Experimental Eye Research* 77, 615-626 (2003).
- Marcantonio, J.M. & Sanderson, J. Calcium-Induced Cytoskeletal Proteolysis and Lens Opacification. *Nova Acta Leopoldina* NF 75, 145-152 (1997).
- Marcantonio,J.M. Calcium-induced disruption of the lens cytoskeleton. *Ophthalmic Research* 28, 48-50 (1996).
- Millar, A., Hooper, A., Copeland, L., Cummings, F. & Prescott, A. Reorganisation of the Microtubule Cytoskeleton and Centrosomal Loss during Lens Fibre Cell Differentiation. *Nova Acta Leopoldina* NF 75, 169-183 (1997).
- Nagata,S. DNA degradation in development and programmed cell death. *Annual Review of Immunology* 23, 853-875 (2005).
- Nishimoto,S. *et al.* Nuclear cataract caused by a lack of DNA degradation in the mouse eye lens. *Nature* 424, 1071-1074 (2003).
- Ooto,S. *et al.* Induction of the differentiation of lentoids from primate embryonic stem cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44, U322 (2003).
- Perng,M.D. & Quinlan,R.A. Seeing is believing! The optical properties of the eye lens are dependent upon a functional intermediate filament cytoskeleton. *Experimental Cell Research* 305, 1-9 (2005).
- Piper,R.C. & Luzio,J.P. Late endosomes: Sorting and partitioning in multivesicular bodies. *Traffic* 2, 612-621 (2001).
- Quinlan,R.A. *et al.* The eye lens cytoskeleton. *Eye* 13, 409-416 (1999).
- Quinlan,R.A., Carter,J.M., Sandilands,A. & Prescott,A.R. The beaded filament of the eye lens: An unexpected key to intermediate filament structure and function. *Trends in Cell Biology* 6, 123-126 (1996).
- Sandilands, A., Kasoer, M., Prescott, A., Carter, J.M., Wallace, P., Hutcheson, A.M., Quinlan, R.A. Changes in Intermediate Filament Protein Expression and Subcellular Distribution during Lens Fibre Cell Differentiation. *Nova Acta Leopoldina* NF 75, 153-168 (1997).
- Savina,A., Fader,C.M., Damiani,M.T. & Colombo,M.I. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic* 6, 131-143 (2005).
- Shahani,N. & Brandt,R. Functions and malfunctions of the tau proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59, 1668-1680 (2002).
- Siew,E.L. & Bettelheim,F.A. Light scattering parameters of rat lenses with calcium-induced cataracts. *Experimental Eye Research* 62, 265-270 (1996).
- Small,J.V., Geiger,B., Kaverina,I. & Bershadsky,A. How do microtubules guide migrating cells? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3, 957-964 (2002).
- Stafford, M.J. The histology and biology of the lens. *OT (Optometry Today/Optics Today)*. 23-30 (Januar 2001)

Vallee,R.B. A Taxol-Dependent Procedure for the Isolation of Microtubules and Microtubule-Associated Proteins (Maps). *Journal of Cell Biology* 92, 435-442 (1982).

Vrensen,G.F.J.M. Aging of the Human Eye Lens - A Morphological Point-Of-View. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology* 111, 519-532 (1995).

Wang,L., Christensen,B.N., Bhatnagar,A. & Srivastava,S.K. Role of calcium-dependent protease(s) in globulization of isolated rat lens cortical fiber cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42, 194-199 (2001).

Weible,M.W. & Hendry,I.A. What is the importance of multivesicular bodies in retrograde axonal transport in vivo? *Journal of Neurobiology* 58, 230-243 (2004).

Weingarten,M.D., Suter,M.M., Littman,D.R., and Kirschner,M.W. (1974). Properties of Depolymerization Products of Microtubules from Mammalian Brain. *Biochemistry* 13, 5529-5537.

Woo,M.K. & Fowler,V.M. Identification and Characterization of Tropomodulin and Tropomyosin in the Adult-Rat Lens. *Journal of Cell Science* 107, 1359-1367 (1994).

Woo,M.K., Lee,A., Fischer,R.S., Moyer,J. & Fowler,V.M. The lens membrane skeleton contains structures preferentially enriched in spectrin-actin or tropomodulin-actin complexes. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 46, 257-268 (2000).

Wride,M.A. Cellular and molecular features of lens differentiation: A review of recent advances. *Differentiation* 61, 77-93 (1996).

Yang,D.I. & Louis,C.F. Molecular cloning of ovine connexin44 and temporal expression of gap junction proteins in a lens cell culture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41, 2658-2664 (2000).

Danksagung

Ich danke Professor Unger für die Möglichkeit frei und unabhängig zu arbeiten, die wissenschaftliche Unterstützung und Beratung sowie die mehr als nur eine gute Idee.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Prof. Unger und Prof. Greulich für ihre Mithilfe und dafür, dass sie mir ihr unschätzbare Wissen bedingungslos zur Verfügung gestellt haben. Für die Beantwortung der vielen Fragen, die ich täglich hatte und für die tatkräftige Unterstützung beim Lösen auftretender Probleme.

Vielen Dank: Prof. Greulich, Dr. Rapp, Paulius Grigaravicius, Dr. Böhm, Dr. Wollweber, Roland Stracke, Nikolina Kalchishkova, Maria Radeva, Berit Umann, Frau Gemeinhardt, Frau Hoffmann, Frau Wollmann und Frau Günther.

Mein Dank gilt auch Frau Buder für die Unterstützung bei der Durchführung der Elektronenmikroskopie sowie den Mitarbeitern vom Institut für Virologie und Antivirale Therapie: Dr. Henke, Dr. Leipner und Katja Grün.

Weiterhin danke ich Dr. Hemmerich, Dr. Kiel und Frau Haus.

Ganz besonderer Dank gilt nicht zuletzt meiner Familie und wunderbaren Freundin, die mich stets unterstützten und an mich glaubten. Ohne euch wäre das alles so nicht möglich gewesen, Vielen Dank.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Norman Gerstner, dass ich die vorliegende Diplomarbeit selbstständig und unter Zuhilfenahme der angegebenen Materialien und Quellen angefertigt habe. Für die durchgeführten Experimente und erhaltenen Ergebnisse wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt.

Jena, den 21. November 2005

Norman Gerstner