

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit  
Institut für Säugetiergenetik  
Neuherberg

**Analyse apoptotischer Prozesse  
in der Linse von g-Kristallin-Mutanten**

Raimund Bernd Lutz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie  
der Technischen Universität München zur Erlangung des  
akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr. Adelbert Bacher

Prüfer der Dissertation:

1. apl.-Prof. Dr. Jochen Graw
2. Univ.-Prof. Dr. Alfons Gierl

Die Dissertation wurde am 19.05.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Chemie am 04.07.2000 angenommen.

### Erklärung

Diese Dissertation wurde von Herrn Prof. Dr. J. Graw betreut.

### Ehrenwörtliche Versicherung

Hiermit versichere ich, daß die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

München, den 19.05.2000

Raimund B. Lutz

Diese Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 1996 bis Mai 2000. Die experimentellen Arbeiten dazu wurden an der GSF Neuherberg, Institut für Säugetiergenetik (ISG) und an den *National Institutes of Health (NIH)*, *National Eye Institute (NEI)*, Bethesda, USA durchgeführt.

### Danksagung

Herrn Prof. Dr. J. Graw danke ich für die interessante Themenstellung und die ständige Diskussionsbereitschaft, sowie seine Unterstützung bei der Vorbereitung meines einjährigen Forschungsaufenthaltes am *National Eye Institute (NEI)*, *National Institutes of Health (NIH)*, USA. Der allzeit gewährten und großzügigen Unterstützung meiner Ansprechpartner am NEI, Frau Dr. Peggy Zelenka und Herr Dr. Stanislav Tomarev, sowie nicht zuletzt Herrn Dr. Joram Piatigorsky, möchte ich hiermit meinen herzlichen Dank ausdrücken.

Herrn Prof. Dr. Rudi Balling danke ich für die Diskussionsbereitschaft und die immer gewährte Unterstützung. Besonders bei Herrn Prof. Dr. Dr. A. Bacher möchte ich mich für seine stete und großzügige Hilfe während meiner bisherigen wissenschaftlichen Laufbahn bedanken, welche in seinem Arbeitskreis ihren Anfang nahm.

Mein besonderer Dank geht auch an meine Mitstreiter während dieser Zeit, besonders Herr Norman Klopp und Herr Johannes Lengler hatten für alle Fragen immer ein offenes Ohr.

Auch bei meinen Arbeitskollegen des *National Eye Institute* möchte ich mich an dieser Stelle bedanken, sie standen mir stets freundlich, hilfsbereit und tatkräftig zur Seite. Frau Susan Dickinson und Herrn Steven Lee möchte ich auf diesem Wege für ihre Ausdauer bei der schließlich erfolgreichen Mikroinjektion des transgenen DNA-Konstruktes meinen Dank aussprechen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank für ihre Geduld und stetige Unterstützung während dieser Arbeit meinen Eltern und meiner Freundin Daniela, ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
2.1 Die Entwicklung des Auges in Vertebraten	2
2.2 Struktur und Wachstum der adulten Linse	3
2.3 Übergang proliferierender Epithelzellen in postmitotische Faserzellen	4
2.3.1 <i>Einleitung der Differenzierung durch die Sekretion morphogener Faktoren</i>	4
2.3.2 <i>Regulation des Zellzyklus in differenzierenden Linsenfaserzellen</i>	4
2.3.2.1 <i>Erhalt des G<sub>1</sub>-Zustandes durch Zellzyklusinhibitoren</i>	6
2.4 Terminale Differenzierung von Linsenfaserzellen	6
2.4.1 <i>Proteolytische Modelle für den Abbau von Zellorganellen</i>	7
2.4.2 <i>Die zelluläre Apoptosekaskade</i>	7
2.4.3 <i>Aktivierung apoptotischer Prozesse in differenzierenden Linsenfaserzellen</i>	8
2.5 Die Kristalline	9
2.5.1 <i>Struktur und Funktion der <math>\alpha</math>-Kristalline</i>	9
2.5.2 <i>Die <b>b/g</b>-Kristallin-Familie</i>	10
2.5.3 <i>Struktur und Funktion der <math>\beta</math>-Kristalline</i>	11
2.5.4 <i>Struktur und Funktion der <math>\gamma</math>-Kristalline</i>	11
2.5.5 <i>Genomische Organisation der <b>b/g</b>-Kristallingene</i>	12
2.6 Mutationen der Kristallingene erzeugen Katarakte	13
2.6.1 <i>Generierung von murinen Kataraktmutanten</i>	14
2.6.2 <i>Erbgang und genetische Analyse</i>	14
2.6.3 <i>Die Crygb<sup>nop</sup>-Mutation</i>	14
2.6.4 <i>Die Cryge<sup>l</sup>-Mutation</i>	15
2.7 Zielsetzung	16
<b>3. MATERIALIEN UND LÖSUNGEN</b>	<b>17</b>
3.1 Chemikalien und sonstige Reagenzien	17
3.2 Antikörper	18
3.3 Enzyme	19
3.4 Geräte	19
3.5 Filmmaterial	20
3.6 Nukleinsäuren	20
3.6.1 <i>Oligonukleotide und Sequenzierungen</i>	20
3.6.2 <i>Vektoren und Plasmide</i>	20
3.7 Tiere	20
3.8 Medien und Lösungen	21
3.8.1 <i>Allgemeine Lösungen</i>	21

---

3.8.2	<i>Nährmedien für Bakterien</i>	22
3.8.3	<i>Lösungen für die Herstellung hitzekompetenter Zellen</i>	22
3.8.4	<i>Lösungen für die Agarosegelelektrophorese</i>	22
3.8.5	<i>Lösungen für den Transfer von DNA auf Nylonmembranen (Southern blotting)</i>	23
3.8.6	<i>Lösungen für die Hybridisierung von membrangebundener DNA</i>	23
3.8.7	<i>Lösungen für die Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	23
3.8.8	<i>Lösung für die Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen</i>	24
3.8.9	<i>Stammlösungen für die Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen</i>	24
3.8.10	<i>Lösungen für Western blotting von Polyacrylamidgelen (semi dry-Verfahren)</i>	25
3.8.11	<i>Ponceau S-Färbelösung für membranfixierte Proteine</i>	25
3.8.12	<i>Stammlösungen für die Histologie</i>	25
<b>4.</b>	<b>METHODEN</b>	<b>26</b>
4.1	Molekularbiologische Methoden	26
4.1.1	<i>Herstellung hitzekompetenter Bakterien</i>	26
4.1.2	<i>Transformation von Bakterien nach der Hitzeschockmethode</i>	26
4.1.3	<i>Präparation von Nukleinsäuren</i>	27
4.1.3.2	<i>Präparation von Plasmid-DNA</i>	27
4.1.3.3	<i>Präparation von genomischer DNA</i>	27
4.1.3.4	<i>Präparation von RNA</i>	27
4.1.4	<i>Reinigung von Nukleinsäuren</i>	28
4.1.4.1	<i>Phenol-Chloroform-Extraktion</i>	28
4.1.4.2	<i>Ethanol-fällung</i>	28
4.1.4.3	<i>Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen</i>	28
4.1.5	<i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren</i>	29
4.1.5.1	<i>Photometrische Bestimmung</i>	29
4.1.5.2	<i>Konzentrationsbestimmung auf Agarosegelen</i>	29
4.1.6	<i>Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren</i>	29
4.1.6.1	<i>Restriktionsverdau</i>	29
4.1.6.2	<i>Ligation</i>	30
4.1.6.3	<i>Sequenzierung von Plasmid-DNA</i>	30
4.1.6.4	<i>Erststrang-Synthese von cDNA</i>	31
4.1.6.5	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	31
4.1.6.6	<i>Kolonie-PCR zur Identifizierung rekombinanter Plasmide</i>	32
4.1.7	<i>Gelelektrophoretische Techniken</i>	33
4.1.7.1	<i>Agarosegelelektrophorese von DNA</i>	33
4.1.7.2	<i>Denaturierende Agarosegelelektrophorese von RNA</i>	33
4.1.8	<i>Differentielle Genexpressionsanalyse (Differential Display)</i>	33
4.1.9	<i>Übertragung von DNA auf Nylonmembranen (Southern blot)</i>	35
4.1.10	<i>Generierung und radioaktive Markierung (random priming) der DNA-Probe</i>	36
4.1.11	<i>Hybridisierung membrangebundener DNA mit radioaktiv markierten Proben</i>	37
4.2	Proteinbiochemische Methoden	38
4.2.1	<i>Herstellung von Proteinextrakten aus entnommenen Linsen</i>	38
4.2.2	<i>Photometrische Konzentrationsbestimmung nach Lowry</i>	38
4.2.3	<i>Denaturierende SDS-Gelelektrophorese</i>	39
4.2.4	<i>Transfer von Proteinen auf PVDF- oder Nitrozellulosemembranen (Western blot)</i>	40
4.2.5	<i>Nachweisreaktionen für Proteine</i>	41

4.2.5.1	<i>Coomassie-Färbung und Trocknung von SDS-Polyacrylamidgelen</i>	41
4.2.5.2	<i>Silberfärbung von SDS-Acrylamidgelen</i>	41
4.2.5.3	<i>Ponceau S-Färbung membranfixierter Proteine</i>	42
4.2.5.4	<i>Immunologische Nachweisreaktion auf Membranen</i>	42
4.3	<b>Histologische Methoden</b>	44
4.3.1	<i>Fixierung und Einbettung von Präparaten für histologische Übersichtsfärbungen</i>	44
4.3.2	<i>Fixierung und Paraffin-Einbettung von Präparaten für immunologische Nachweise</i>	45
4.3.3	<i>Anfertigen von histologischen Schnitten</i>	45
4.3.4	<i>Histologische Übersichtsfärbung (Methylenblau/basisches Fuchsin)</i>	47
4.3.5	<i>Fluoreszenzmikroskopische Färbereaktionen auf Paraffinschnitten</i>	47
4.3.5.1	<i>Nachweis von DNA-Strangbrüchen (TUNEL-Reaktion)</i>	48
4.3.5.2	<i>Immunologische Nachweisreaktionen</i>	48
4.3.6	<i>Dokumentation</i>	50
<b>5.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>51</b>
5.1	<b>Histologische Charakterisierung von <math>\gamma</math>-Kristallin-Mutanten</b>	51
5.1.1	<i>Die Entwicklung des Phänotyps von <math>Cryge^t</math>-Mutanten</i>	52
5.1.2	<i>Phänotypische Beschreibung der <math>Crygb^{nop}</math>-Mutante</i>	54
5.1.3	<i>Vergleichende Histologie</i>	56
5.2	<b>Biochemische Charakterisierung von <math>\gamma</math>-Kristallin-Mutanten</b>	57
5.2.1	<i>Expression eines mutierten <math>g\beta</math>-Kristallins in Linsen des <math>Crygb^{nop}</math>-Phänotyps</i>	57
5.2.2	<i>Molekulare Auswirkungen eines verkürzten <math>g</math>-Kristallins - Differential Display</i>	58
5.3	<b>Eintreten in die postmitotische Phase - Zellzyklusproteine</b>	65
5.3.1	<i>Expression von Zellzyklusproteinen in Linsen von <math>Crygb^{nop}</math>-Mutanten</i>	65
5.3.2	<i>Expression von Zellzyklusproteinen in Linsen der <math>Cryge^t</math>-Mutante</i>	67
5.4	<b>Untersuchung terminaler Differenzierung von Linsenfaserzellen</b>	70
5.4.1	<i>Fragmentierung von Zellkernmembran und DNA in Linsenfaserzellen</i>	71
5.4.2	<i>Beginn des DNA-Abbaus in Linsenfaserzellen</i>	72
5.4.3	<i>DNA-Fragmentierung in <math>Cryge^t</math>-Linsen</i>	73
5.4.4	<i>DNA-Fragmentierung in <math>Crygb^{nop}</math>-Linsen</i>	74
5.5	<b>Apoptotische Prozesse in Linsen des <math>Crygb^{nop}</math>-Phänotyps</b>	75
5.5.1	<i>Einführung eines inaktiven p53-Allels</i>	75
5.5.2	<i>Spaltung von PARP</i>	76
5.5.3	<i>Freisetzung von Cytochrom C</i>	76
5.5.4	<i>Expression von Bcl-2 in Linsenfaserzellen</i>	77
5.5.5	<i>Expression von Bax</i>	78
5.6	<b>Apoptotische Prozesse in Linsen des <math>Cryge^t</math>-Phänotyps</b>	80
5.6.1	<i>Expression von Bcl-2</i>	80
5.6.2	<i>Expression von Bax</i>	81
5.7	<b>Herstellung eines <i>bax</i>-transgenen Mausmodells</b>	83
5.7.1	<i>Klonierungsstrategie</i>	83
5.7.2	<i>Detektion <i>bax</i>-transgener Tiere</i>	84
5.7.3	<i>Analyse von genomischer DNA durch Southern blotting</i>	85

<b>6. DISKUSSION</b>	<b>88</b>
6.1 Morphologische Charakterisierung von $\gamma$ -Kristallin-Mutanten	88
6.1.1 <i>Linsenentwicklung des Cryge<sup>l</sup>-Phänotyps</i>	88
6.1.2 <i>Linsenentwicklung des Crygb<sup>nop</sup>-Phänotyps</i>	89
6.2 Molekulare Charakterisierung von $\gamma$ -Kristallin-Mutanten	90
6.2.1 <i>Ursache des Crygb<sup>nop</sup>-Phänotyps: Expression eines verkürzten g<math>\beta</math>-Kristallins</i>	90
6.2.2 <i>Auswirkungen eines verkürzten g<math>\beta</math>-Kristallins in der Linse von Crygb<sup>nop</sup>-Mutanten</i>	91
6.2.2.1 <i>Kristalline</i>	91
6.2.2.2 <i>TAXREB 107</i>	91
6.2.2.3 <i>Das Proteasom</i>	92
6.3 Untersuchung terminaler Differenzierung von Linsenfaserzellen	93
6.3.1 <i>Fragmentierung der Zellkernmembran</i>	93
6.3.2 <i>DNA-Abbau in Linsenfaserzellen</i>	94
6.3.3 <i>Treten Linsenfaserzellen von g<math>\beta</math>-Kristallin-Mutanten in die postmitotische Phase ein?</i>	94
6.3.4 <i>Linsenfaserzellen von g<math>\beta</math>-Kristallin-Mutanten sind postmitotisch</i>	95
6.4 Apoptotische Prozesse in Linsen von $\gamma$ -Kristallin-Mutanten	96
6.4.1 <i>Erhalt des Phänotyps nach Inaktivierung eines p53-Allels in Crygb<sup>nop</sup>-Mutanten</i>	96
6.4.2 <i>Nachweis apoptotischer Abbauprodukte in der Linse von Crygb<sup>nop</sup>-Mutanten</i>	96
6.4.3 <i>Freisetzung von Cytochrom C in Linsenfaserzellen von Crygb<sup>nop</sup>-Mutanten</i>	97
6.4.4 <i>Beteiligung von Proteinen der Bcl-2-Familie an apoptotischen Prozessen?</i>	98
6.4.4.1 <i>Expression von Bax in Linsen der Cryge<sup>l</sup>-Mutante</i>	98
6.4.4.2 <i>Expression von Bax in Linsen der Crygb<sup>nop</sup>-Mutante</i>	99
6.4.5 <i>Regulation des bax-Gens</i>	100
6.4.5.1 <i>Aktivierende Elemente</i>	101
6.4.5.2 <i>Reprimierung von bax</i>	102
6.4.6 <i>Nachbildung apoptotischer Prozesse - ektopische Expression von bax in der Linse</i>	102
<b>7. ANHANG</b>	<b>104</b>
7.1 Verwendete Oligonukleotide	104
7.2 Nukleotidsequenzen aus der differentiellen Genexpressionsanalyse	105
7.2.1 <i>Pubmed-Sequenz M11408 (S16 ribosomales Protein, gesamte cds, aus Maus)</i>	105
7.2.2 <i>Pubmed-Sequenz J00376 (alphaA-Kristallin mRNA, 3'-Ende, aus Maus)</i>	106
7.2.3 <i>Pubmed-Sequenz J00378 (beta-A3/A1-Kristallin mRNA, aus Maus)</i>	106
7.2.4 <i>Pubmed-Sequenz J00378 (beta-A3/A1-Kristallin mRNA, aus Maus)</i>	107
7.2.5 <i>Pubmed-Sequenz V00728 (beta-Kristallin mRNA, aus Maus)</i>	108
7.2.6 <i>Pubmed-Sequenz V00728 (beta-Kristallin mRNA, aus Maus)</i>	108
7.2.7 <i>Pubmed-Sequenz K02585 (gammaB-Kristallin mRNA, 3'-Ende, aus Maus)</i>	109
7.2.8 <i>Pubmed-Sequenz Z22573 (gammaB-Kristallin-Gen, aus Maus)</i>	110
7.2.9 <i>Pubmed-Sequenz X81987 (TAXREB107 mRNA, aus Maus)</i>	111
7.2.10 <i>Pubmed-Sequenz AF060092.1 (Psmb3 mRNA, aus Maus)</i>	112
7.3 DNA-Sequenz zur Herstellung bax-transgener Mäuse	113
<b>8. LITERATUR</b>	<b>116</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Rinderserumalbumin
cdk	Cyclin-abhängige Kinase, reguliert den G <sub>1</sub> /S-Phasenübergang im Zellzyklus
Cryg	Symbol für $\gamma$ -Kristalline
Cy3	Indocarbocyanin, Fluoreszenzfarbstoff (A: 533nm, E: 575nm)
dpi	Druckerauflösung "dots per inch"
DAPI	4',6-Diamidin-2'-Phenylindol, Fluoreszenzfarbstoff (A: 358nm, E: 461nm)
DEPC	Diethylpyrocarbammat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
DMF	Dimethylformamid
ECL	Enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENU	Ethylnitrosoharnstoff, für DNA-Mutagenese eingesetzte Substanz
F(ab) Fragmente	Hypervariable Fragmente eines Immunglobulins (Epitop-Bindestellen)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat, Fluoreszenzfarbstoff (A: 492nm, E: 520nm)
HRP	Meerrettich Peroxidase
HTLV	Humanes Leukämie-Virus
IgG	Immunglobulin, G-Klasse
IPTG	Isopropylthio- $\beta$ D-Galactosid
LB	Nährmedium für Bakterien "Luria Bertani"
OD	Optische Dichte
p57 <sup>kip1</sup> , p57 <sup>kip2</sup>	Allosterische Inhibitoren für cyclin-abhängige Kinasen (cdk)
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase, Reparaturenzym für DNA Strangbrüche
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	PCR mit cDNA als Matrize, welche aus mRNA erhalten wurde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TEMED	Triethanolethylendiamin
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TAX	Transaktivierendes Virusprotein des humanen T-Zell-Leukämie Virus Typ I
TAXREB 107	Endogenes Protein der Maus, wechselwirkt mit TAX-Bindemotiven in DNA
TE	Tris-EDTA Puffer
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indo- $\beta$ D-Galactopyranosid

## 1. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschreibt die morphologische und biochemische Charakterisierung zweier Mauslinien, *Crygb<sup>nop</sup>* und *Cryge<sup>t</sup>*, welche in einem Mutageneseexperiment an der GSF Neuherberg erhalten wurden (Kratochvilova *et al.*, 1979) und verschiedene Mutationen im  $\gamma$ -Kristallin-Gencluster aufweisen (Klopp *et al.*, 1998). Beide Linien entwickeln eine kongenitale und progressiv verlaufende Trübung der Augenlinse.

Die pathologische Entwicklung von *Cryge<sup>t</sup>*-Mutanten beginnt im Stadium E14.5 mit der verminderten Elongation der primären Linsenfaserzellen. Sie füllen das Linsenvesikel nicht vollständig aus und werden mit dem Auswachsen sekundärer Faserzellen aus dem Linsenbogen in die posteriore Hemisphäre der Linsenkapsel gedrückt. Die komprimierten Zellen schwellen an und ihre Zellmembran löst sich auf. In *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten beobachtet man erste morphologische Veränderungen ab dem Stadium E15.5 mit der beginnenden Elongation und Differenzierung sekundärer Linsenfaserzellen aus dem Linsenbogen. Neben Schwellungen der Linsenfaserzellen wird eine zunehmende Vakuolisierung der Linse sichtbar. Gleichzeitig unterliegen die primären Faserzellen des Linsenkerns einer fortschreitenden Zytolyse.

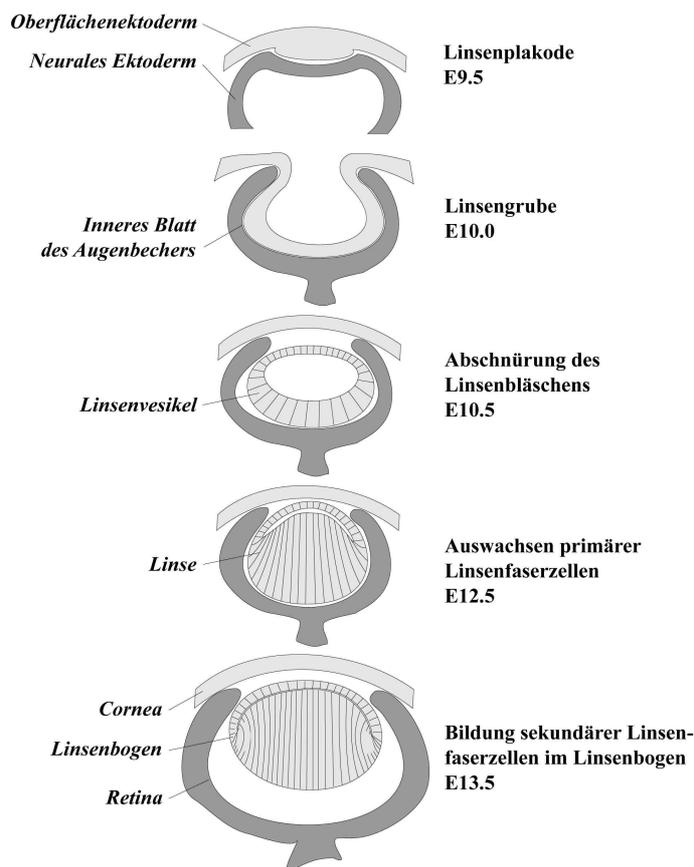
Die pathologischen Veränderungen in beiden Mutanten werden durch ein verkürztes  $\gamma$ -Kristallin hervorgerufen, dessen Expression mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers in der Linse von *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten nachgewiesen werden konnte. In beiden Mutanten wird ein drastisch verminderter Zellkern- und DNA-Abbau beobachtet, woraus sich auf ein gestörtes terminales Differenzierungsprogramm in der Linse von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten schließen läßt. Das aufgrund von Literaturdaten entwickelte Arbeitsmodell schlägt als Ursache hierfür eine fehlerhafte Umwandlung proliferierender Epithelzellen in postmitotische Faserzellen vor. Die immunhistochemische Analyse verschiedener Zellzyklusregulatoren zeigt keine veränderte Expression des **Cyclin D/cdk4**-Komplexes in der Linse. Im Gegensatz dazu belegt das Expressionsmuster seines Inhibitors, **p57<sup>kip2</sup>**, daß die Faserzellen von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten in ein Differenzierungsprogramm eintreten, dieses jedoch nur stark verlangsamt durchlaufen. Die pathologischen Veränderungen werden durch apoptotische Ereignisse hervorgerufen. In *Cryge<sup>t</sup>*-Mutanten wird die Expression von **Bax** durch die posteriore Kompression primärer Faserzellen induziert, in *Crygb<sup>nop</sup>*-Linsen ist sie abhängig von ihrem Differenzierungsgrad. Vorhergesagte apoptotische Ereignisse, die mitochondriale Freisetzung von **Cytochrom C** und die proteolytische Spaltung von **PARP**, werden in *Crygb<sup>nop</sup>*-Linsen gefunden.

Das Ziel der Arbeit war die Erstellung eines **transgenen Mausmodells**, um die Grundlage für die Untersuchung der apoptotischen Prozesse in Linsen  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten zu schaffen.

## 2. EINLEITUNG

### 2.1 Die Entwicklung des Auges in Vertebraten

Sinnesplakoden sind die Ausgangspunkte für die Entwicklung der zentralen Sinnesorgane. Sie werden im Oberflächenektoderm durch Kontakt mit einem Bereich des darunterliegenden Neuroektoderms induziert, der später die Verarbeitung der Sinneswahrnehmung übernimmt.



**Abb. 2.1:** Linsenentwicklung in Vertebraten.

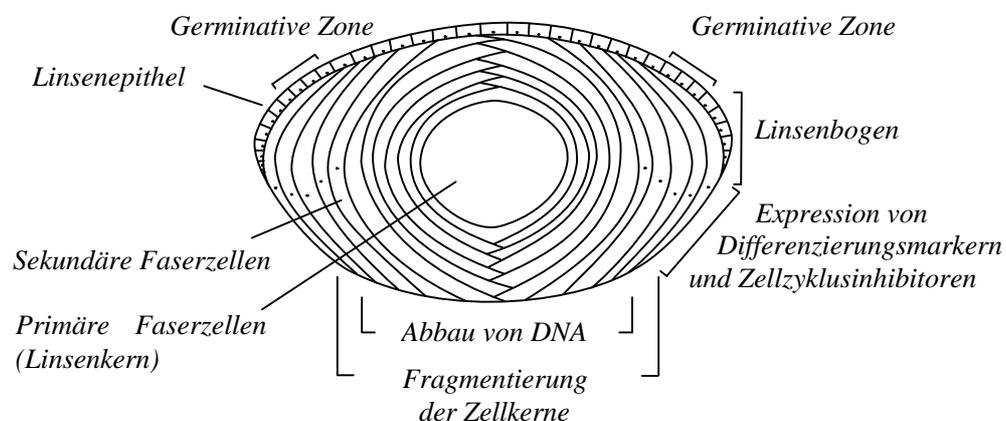
Die Vertebratenlinse entwickelt sich aus der Linienplakode. Es bildet sich eine Liniengrube, die sich zum Linienvesikel abschnürt. Dieses wird von posterior mit primären Faserzellen gefüllt, die den späteren Linsenkernel bilden. Die äquatorialen Zellen des Linienbogens differenzieren zu sekundären Faserzellen, welche den Linsenkernel umschließen.

Am Tag E13.5 füllen diese das Linienbläschen vollständig aus. Ab Tag E14.5 beginnen die äquatorialen Zellen des Linsenepithels zu differenzieren. Während ihrer Elongation verlassen sie als junge sekundäre Faserzellen den Linienbogen und lagern sich in Form konzentrischer Kugelschalen auf die elongierten primären Faserzellen auf (Abbildung 2.1).

Am Tag E9.5 der Embryonalentwicklung in der Maus werden die Linienplakoden durch bestimmte, als Augenbläschen bezeichnete Bereiche des Diencephalons, einem Teil des späteren Vorderhirns, induziert. Im Anschluß an diese Induktionsphase stülpen sich das Neuro- und das Oberflächenektoderm ein und es entstehen die Linienruben und die Augenbecher. Diese bleiben über den Augenbecherstiel mit dem Diencephalon verbunden. Das innere, der Liniengrube zugewandte Blatt des Augenbechers entwickelt sich zur Neuroretina, während das Pigmentepithel des Auges aus dem äußeren Blatt des Augenbechers hervorgeht. Am Tag E10.5 schließt sich die Liniengrube, und das entstandene Linienbläschen schnürt sich vom Ektoderm ab. Anschließend elongieren die posterioren Epithelzellen des Linienvesikels und bilden primäre

## 2.2 Struktur und Wachstum der adulten Linse

Das lebenslang fortschreitende Wachstum der Linse geschieht durch mitotische Aktivität innerhalb der germinativen Zone des Linsenepithels, die sich anterior zum Linsenäquator befindet. Immer neue Epithelzellen werden in Richtung des Linsenbogens geschoben, wo die Umwandlung proliferierender Epithelzellen in postmitotische, durch Elongation und Differenzierung charakterisierte Linsenfaserzellen erfolgt (Kuwabara *et al.*, 1974). Die terminale Differenzierung von Linsenfaserzellen führt schließlich zur Ausbildung einer organell-freien und daher transparenten Zone im Zentrum der Linse (Bassnett 1995). Der Aufbau einer adulten Linse ist in Abbildung 2.2 schematisch dargestellt.



**Abb. 2.2:** Schematische Anordnung primärer und sekundärer Faserzellen in adulten Linsen.

Der aus primären Faserzellen bestehende Linsenkern ist in Form konzentrischer Kugelschalen von sekundären Faserzellen umgeben. Im Linsenbogen erfolgt die Umwandlung proliferierender Epithelzellen in postmitotische Linsenfaserzellen. Durch terminale Differenzierung entsteht eine transparente und organell-freie Zone im Zentrum der Linse.

Die zwiebelschalenartige, regelmäßige und symmetrische Anordnung der sekundären Linsenfaserzellen innerhalb der Linsenkapsel beruht auf einem präzise regulierten Gleichgewicht zwischen der Proliferation des Linsenepithels und der schrittweisen Differenzierung im Linsenbogen (Kuwabara *et al.*, 1974). In den folgenden Abschnitten wird der Weg einer Linsenzelle aus der germinativen Zone in Richtung des Linsenbogens verfolgt und auf die verschiedenen biochemischen Ereignisse näher eingegangen, die für die Differenzierung von Linsenfaserzellen verantwortlich sind.

## 2.3 Übergang proliferierender Epithelzellen in postmitotische Faserzellen

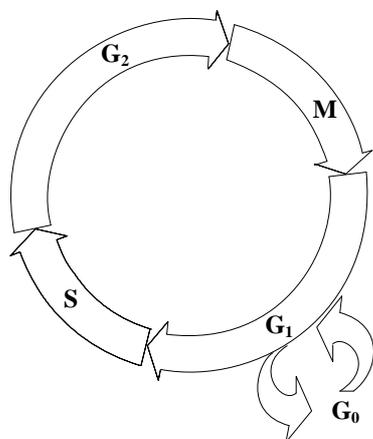
### 2.3.1 Einleitung der Differenzierung durch die Sekretion morphogener Faktoren

Differenzierende Zellen des Linsenbogens exprimieren FGF-1, ein Protein aus der Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren. Die Beteiligung von FGF-1 an der Induktion des Differenzierungsprozesses läßt sich in Zellkultur zeigen. Proliferierende Zellen des Linsenepithels sind *in vitro* schrittweise differenzierbar; sie verlieren dabei ihre mitotische Teilungsfähigkeit und elongieren (Lovicu *et al.*, 1992). Ebenso führt die Expression von FGF-4, FGF-7 und FGF-1 in der Linse zur Differenzierung des Linsenepithels *in vivo* und zur Expression der faserzellspezifischen  $\beta$ -Kristalline (Robinson *et al.*, 1995; Lovicu *et al.*, 1998).

Neben einer zelleigenen (autokrinen) Stimulation des Differenzierungsprozesses im Linsenbogen werden auch parakrine Effekte diskutiert. Im Stadium des Linsenvesikels wird FGF-1 in der gesamten Neuroretina exprimiert. Die posterioren Epithelzellen des Linsenvesikels sind einer erhöhten Konzentration von FGF-1 ausgesetzt und beginnen zu differenzieren. Nach beendeter Elongation der primären Faserzellen beschränkt sich die Expression von FGF-1 auf die anteriore Neuroretina und den Ciliarkörper. Der FGF-Gradient verlagert sich somit in äquatorial benachbarte Bereiche der Linse und induziert dort den Differenzierungsprozeß; die äquatorialen Zellen des Linsenepithels treten aus dem Zellzyklus aus und beginnen ihre Elongation (Maisel 1985; McAvoy *et al.*, 1991).

### 2.3.2 Regulation des Zellzyklus in differenzierenden Linsenfaserzellen

Proliferierende Zellen aus der germinativen Zone des Linsenepithels durchlaufen den gesamten Zellzyklus (Abbildung 2.3), während postmitotische Faserzellen im  $G_1$ -Zustand arretiert sind (Matsuoka *et al.*, 1995). Das Überschreiten des  $G_1$ -Haltepunktes führt zum



Eintritt in die S-Phase und nachfolgend zum Durchlaufen des gesamten Zellzyklus (Kato 1999). Der Übergang von einer Phase zur nächsten wird durch Cyclin-abhängige Kinasen (cdk) und ihre regulatorischen Untereinheiten, die Cycline, gesteuert. Spezifische cdk-Inhibitoren sind ebenso beteiligt. Tabelle 2.1 faßt die Expression von Zellzyklusregulatoren in der Linse zusammen.

**Abb. 2.3:** Schematische Darstellung der Zellzyklusphasen.

Differenzierende Linsenzellen befinden sich in der  $G_1$ -Phase, welche sich an die mitotische Zellteilung (M-Phase) anschließt. Die  $G_0$ -Phase entspricht einer Ruhephase und wird in Linsenzellen nicht beobachtet. Das Überschreiten der  $G_1$ /S-Grenze führt zum Einleiten der DNA-Replikation (S-Phase) und damit zum Durchlaufen des gesamten Zellzyklus, einschließlich der mitotischen Teilung.

Typ	Detektionsmethode, Lokalisation	Referenz
G <sub>1</sub> Cyclin D <sub>1</sub>	mRNA, primäre und sekundäre Faserzellen	Fromm <i>et al.</i> , 1996
cdk4	mRNA, primäre und sekundäre Faserzellen	
p27 <sup>kip1</sup>	mRNA, junge sekundäre Faserzellen (Linsenbogen)	Zhang <i>et al.</i> , 1997
p57 <sup>kip2</sup>	mRNA, junge sekundäre Faserzellen (Linsenbogen)	Zhang <i>et al.</i> , 1998
cdk5	mRNA / Protein, primäre und sekundäre Faserzellen	Gao <i>et al.</i> , 1997
p35	mRNA / Protein, primäre und sekundäre Faserzellen	
G <sub>1</sub> /S pRb	mRNA / Protein, primäre und sekundäre Faserzellen	Fromm <i>et al.</i> , 1996
G <sub>2</sub> /M Cyclin B	mRNA / Protein, primäre und sekundäre Faserzellen	Gao <i>et al.</i> , 1995
cdk1	Protein, primäre und sekundäre Faserzellen	

**Tabelle 2.1:** Expression von Zellzyklusregulatoren in der Linse.

Proliferierende Zellen des anterioren Epithels exprimieren Zellzyklusproteine, welche den G<sub>2</sub>/M-Phasenübergang katalysieren (Cyclin A, Cyclin B1, cdk1 und cdk2; Fromm *et al.*, 1996). Mit beginnender Differenzierung im Linsenbogen beschränkt sich die Expression auf die Regulatoren der G<sub>1</sub>- und G<sub>1</sub>/S-Phase. Eine Ausnahme stellt der Cyclin B/cdk1-Komplex dar (siehe Text).

Cyclin B/cdk1 bewirkt während der Prometaphase proliferierender Zellen den Abbau der Kernmembran und ist vermutlich ebenso am Zellkernabbau differenzierender Linsenfasern beteiligt (Gao *et al.*, 1995; He *et al.*, 1998).

Die Bildung von binären Cyclin/cdk-Komplexen katalysiert den Phasenübergang des Zellzyklus. Die Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinasen (cdk) unterliegt einer strengen Regulation, da die kritischen Prozesse, wie DNA-Synthese (S-Phase) und mitotische Teilung (M-Phase), nicht angehalten oder unterbrochen werden können (Kato 1999). Ein wichtiger Regulationsmechanismus Cyclin-abhängiger Kinasen ist die Verfügbarkeit ihrer regulatorischen Untereinheiten, welche periodisch zu bestimmten Phasen des Zellzyklus exprimiert und daher Cycline genannt werden. Zusätzlich müssen cdk-Proteine an drei Stellen posttranslational modifiziert werden. Beispielhaft sind diese Positionen von cdc2 aus Hefe (=cdk1 der Vertebraten) angegeben: Die Phosphorylierung des *T-Loops* an Position Thr161 und die Dephosphorylierung von Thr14 und Tyr15 sind Voraussetzung für die Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinasen. Ihre Aktivität wird darüber hinaus durch allosterische Inhibitoren (cdki) reguliert. Diese binden an den *T-Loop* der cdk-Proteine, verhindern die Phosphorylierung von Thr161 und inhibieren somit die Aktivität Cyclin-abhängiger Kinasen.

Die cdki-Proteine werden in zwei Familien eingeteilt. Die KIP-Familie (p27<sup>kip1</sup> und p57<sup>kip2</sup>) bindet an verschiedene cdk-Proteine, während die INK-Familie (p15<sup>ink4</sup>, p57<sup>ink4</sup> und p19<sup>ink4</sup>) ausschließlich cdk4 inaktiviert. Die hochgestellt geschriebenen Bezeichnungen bedeuten dabei "*inhibitor of cyclin-dependent kinase, ink*" und "*kinase inhibitory protein, kip*".

### 2.3.2.1 Erhalt des G<sub>1</sub>-Zustandes durch Zellzyklusinhibitoren

In proliferierenden Zellen wird der G<sub>1</sub>/S-Phasenübergang des Zellzyklus durch Bildung eines aktiven Komplexes von cdk4 mit Cyclinen der D-Familie gesteuert. Um jedoch einen erneuten Eintritt der differenzierenden Faserzellen in den Zellzyklus zu verhindern, erfolgt im Linsenbogen die Inhibierung des Cyclin D/cdk4-Systems durch die Expression von Zellzyklusregulatoren aus der KIP-Familie (Lovicu *et al.*, 1999; Gomez *et al.*, 1999). Diese allosterischen Inhibitoren sind essentiell für die Umwandlung proliferierender Epithelzellen in postmitotische Faserzellen (Zhang *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998).

p57<sup>kip2</sup>-defiziente Tiere zeigen massive proliferative Defekte in Nieren, Keimdrüsen, Leber und in der Linse. Die normalerweise postmitotischen Zellen des Linsenbogens setzen ihre Zellteilung zunächst fort und treten schließlich mit verlangsamter Kinetik aus dem Zellzyklus aus (Zhang *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu unterscheiden sich Linsen p27<sup>kip1</sup>-defizienter Tiere nicht vom Wildtyp. Bei zusätzlicher Abwesenheit eines funktionalen p57<sup>kip2</sup>-Allels werden jedoch keine differenzierungsspezifischen Proteine, wie  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kristalline, mehr exprimiert. BrdU-Markierungsexperimente zeigen nun ausschließlich proliferierende Faserzellen, eine terminale Differenzierung findet nicht statt. Die Zellzyklusinhibitoren der KIP-Familie beteiligen sich somit kooperativ an der Umwandlung proliferierender Epithelzellen in terminal differenzierende Faserzellen innerhalb des Linsenbogens (Zhang *et al.*, 1998).

## 2.4 Terminale Differenzierung von Linsenfasern

Die terminale Differenzierung von Linsenfasern geht einher mit der Akkumulation hoher Konzentrationen an Kristallinen in den elongierenden Faserzellen (Piatigorsky 1989; Goring *et al.*, 1992). Zusätzlich kondensiert das Chromatin in den Zellkernen (Vrensen *et al.*, 1991) und es erfolgt der Abbau von Zellorganellen (Bassnett *et al.*, 1992; Bassnett 1995; Dahm *et al.*, 1997) und ihrer DNA (Counis *et al.*, 1998). Für den beobachteten Abbau von Zellorganellen in differenzierenden Linsenfasern werden verschiedene, meist proteolytische Modelle vorgeschlagen. Eine Ausnahme stellt die fragmentierende Zellkernmembran dar. Ihre Lamin-Komponenten könnten, in Analogie zum Beginn der M-Phase mitotischer Zellen, auch durch Phosphorylierung depolymerisiert werden (He *et al.*, 1998).

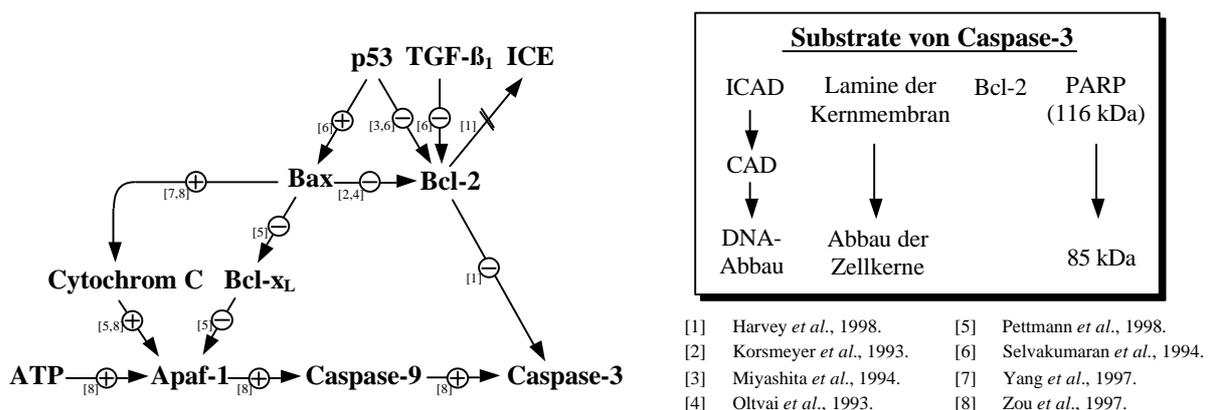
### 2.4.1 Proteolytische Modelle für den Abbau von Zellorganellen

In Linsenzellen sind neben Calpain (David *et al.*, 1984; Lipman *et al.*, 1991) trypsin-ähnliche Proteasen (Tse *et al.*, 1981) und Aminopeptidasen aktiv (Taylor 1993a; Taylor 1993b). Ebenso wird der Abbau mißgefalteter und beschädigter Proteine durch das Proteasom berichtet (Murakami *et al.*, 1990; Wagner *et al.*, 1993). Eine vielversprechende Variante des proteolytischen Abbaus von Zellorganellen in differenzierenden Faserzellen stellt zudem ein teilweise aktiviertes Zelltod-Programm dar (Ishizaki *et al.*, 1998).

### 2.4.2 Die zelluläre Apoptosekaskade

Nach heutigem Wissensstand wird während des programmierten Zelltodes (Apoptose) eine Kaskade von Aspartat-Proteasen (Caspasen) aktiviert, deren Substrate DNA-Polymerasen (PARP), Bestandteile der Zellkernmembran (Lamine) und Apoptose-Inhibitoren (Bcl-2, ICAD) sind (Cheng *et al.*, 1997; Harvey *et al.*, 1998). Die Bcl-2-Familie umfaßt sowohl Proteine, die als Homodimere anti-apoptotisch wirksam sind (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> und Bak), als auch solche, die durch Bildung von Heterodimeren mit der vorigen Gruppe Apoptose initiieren können (Bax und Bad).

Für das System Bax/Bcl-2 wurde ein solches Verhalten bereits beschrieben und als "Rheostat-Modell" bezeichnet (Korsmeyer *et al.*, 1993). Das cytoplasmatisch vorliegende Bax-Homodimer diffundiert hierbei in die Mitochondrienmembran und inaktiviert dort das Bcl-2-Homodimer durch Bildung von Bax/Bcl-2-Heterodimeren (Oltvai *et al.*, 1993). Ist das Bax/Bcl-2-Verhältnis wesentlich zugunsten von Bax verschoben, so führt dies zur



**Abb. 2.4:** Aktivierung von Caspase-3 innerhalb der zellulären Apoptosekaskade.

Aufgrund seiner Substratspezifität wird Caspase-3 als exekutives Element für die morphologischen Veränderungen während des programmierten Zelltodes angesehen. Neben dem Abbau der Zellkernmembran bewirkt sie durch Aktivierung einer Caspase-abhängigen DNase (CAD) die Fragmentierung der DNA. Gleichzeitig inaktiviert sie das zelluläre DNA-Reparatursystem durch die proteolytische Spaltung von PARP, einer DNA-Polymerase.

Schwellung der Mitochondrien und zur Freisetzung von Cytochrom C in das Cytoplasma (Yang *et al.*, 1997), vermutlich durch Bildung von Ionenkanälen aus Bax/Bax-Homodimeren (Pastorino *et al.*, 1998). In Wirbeltieren wird Apaf-1 (*Apoptosis protease-activating factor 1*), ein Homologes des *C. elegans*-Genproduktes ced-4, durch ATP und cytoplasmatisches Cytochrom C in seine aktive Form überführt (Li *et al.*, 1997), welche schließlich eine Kaskade aus Aspartat-Proteasen aktiviert (Zou *et al.*, 1997). Caspase-3 scheint aufgrund ihrer Substratspezifität für ICAD (Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase) und Lamin-Komponenten der Zellkernmembran eine wesentliche Rolle in den beobachteten morphologischen Veränderungen während des programmierten Zelltodes einzunehmen (Ishizaki *et al.*, 1998). In Abbildung 2.4 ist dieser skizzierte apoptotische Signalweg schematisch dargestellt.

### **2.4.3 Aktivierung apoptotischer Prozesse in differenzierenden Linsenfaserzellen**

Mehrere Beobachtungen sprechen dafür, daß apoptotische Prozesse an der terminalen Differenzierung von Linsenfaserzellen beteiligt sind. So führt die Überexpression von Bcl-2, eines zelleigenen Apoptose-Inhibitors, in der Linse transgener Mäuse zur vollständigen Unterdrückung des Denukleationsprozesses differenzierender Linsenfaserzellen und damit zur Kataraktentwicklung (Fromm *et al.*, 1997). Dieser Befund wird von der Beobachtung gestützt, daß unter anderem Caspasen während terminaler Differenzierung aktiv sind. So wurden die Caspase-3-vermittelten Abbauprodukte von PARP in Linsenextrakten aus Ratten nachgewiesen. DEVD-fmk, ein nicht spaltbares Substratanalogon, ist ein spezifischer Inhibitor für Caspase-3. Werden in Zellkultur differenzierende Linsenzellen mit DEVD-fmk inkubiert, so unterbleiben neben der Spaltung von PARP auch andere typische morphologische Veränderungen differenzierender Linsenfaserzellen, wie Kondensierung des Chromatins, Denukleation und DNA-Abbau (Ishizaki *et al.*, 1998).

Ein weiteres typisches Merkmal des programmierten Zelltodes ist die Abschnürung "apoptotischer Vesikel" von der Zellmembran. Dieser Prozeß führt schließlich zur Auflösung der Zelle und wird in der Linse normalerweise nicht beobachtet. Abweichungen vom terminalen Differenzierungsprogramm, beispielsweise der Wiedereintritt differenzierender Faserzellen in den Zellzyklus durch Überschreiten des G<sub>1</sub>/S-Haltepunktes, führen zur Aktivierung des Tumorsuppressor-Proteins p53 und nachfolgend zur Auflösung der Faserzellen (Pan *et al.*, 1995). Offenbar sind nur einige ausgewählte Komponenten des zelleigenen Apoptosesystems an der terminalen Differenzierung von Linsenfaserzellen beteiligt, das vollständige Durchlaufen des Apoptoseprogramms hingegen bewirkt die Entwicklung einer Katarakt.

## 2.5 Die Kristalline

Differenzierende Linsenfaserzellen exprimieren eine Klasse spezialisierter Proteine, die Kristalline. Sie repräsentieren etwa zwei Drittel der Gesamtmasse adulter Linsen. Die Kristalline werden gemäß ihrer Entdeckung von drei Hauptfraktionen aus der Augenlinse in drei Proteinfamilien eingeteilt: Die  $\alpha$ -Kristalline, die  $\beta$ -Kristalline und die  $\gamma$ -Kristalline (Mörner, 1893). Daneben gibt es eine Reihe taxonspezifischer Kristalline, die meist noch eine enzymatische Funktion aufweisen (Piatigorsky 1989). Bei Vögeln beispielsweise werden statt der  $\gamma$ -Kristalline die  $\delta$ -Kristalline exprimiert; sie wirken auch als Argininosuccinat-Lyase. Die besondere Struktur der Kristalline, sowie ihre Bedeutung für die Transparenz der Linse, wird in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

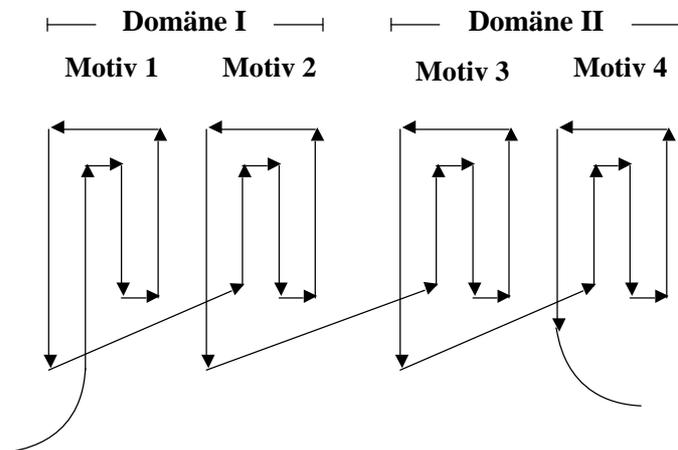
### 2.5.1 Struktur und Funktion der $\alpha$ -Kristalline

In Linsenfaserzellen liegt das  $\alpha$ -Kristallin als Multimer mit einem Molekulargewicht von etwa 800kDa vor. Der Komplex besteht aus den homologen Untereinheiten des  $\alpha$ A- und  $\alpha$ B-Kristallins, mit einem Molekulargewicht von je 20 bzw. 22kDa (van Boekel *et al.*, 1999). Eine um 23 Aminosäuren verlängerte Spleißvariante, das  $\alpha$ A<sup>ins</sup>-Kristallin, wird vorwiegend in Nagetieren gefunden (Hendriks *et al.*, 1990), seine funktionelle Bedeutung ist bislang allerdings unklar.  $\alpha$ A-Kristallin gilt als linsenspezifisches Protein und wird in der Maus ab Tag E12.5 in den Faserzellen exprimiert. Geringe Mengen werden außerdem in Milz und Thymus nachgewiesen (Overbeek *et al.*, 1985; Chepelinsky *et al.*, 1987; Kato *et al.*, 1991). Im Gegensatz dazu wird  $\alpha$ B-Kristallin auch in Herz- und Skelettmuskulatur, Gehirn, Thymus und Niere synthetisiert (Dubin *et al.*, 1991).

Die Struktur des  $\alpha$ -Kristallins ist außerordentlich dynamisch und reicht von kettenförmigen Aggregaten bis hin zu einer micellenförmigen Anordnung, welche einen zentralen Hohlraum mit einem Durchmesser von 55Å aufweist (Smulders *et al.*, 1998). Diese Quartärstruktur wird von  $\alpha$ -Kristallinen bevorzugt nach ihrer Bindung an denaturiertes Protein eingenommen, welches daraufhin in die native Form zurückgefaltet wird. Nicht renaturierbare Proteine bleiben in dem Hohlraum eingeschlossen und werden so in Lösung gehalten (Das *et al.*, 1995; Brady *et al.*, 1997). Diese Funktion der  $\alpha$ -Kristalline wird als Chaperonaktivität bezeichnet und stellt eine wichtige Voraussetzung für die lebenslange Transparenz der Linse dar (Horwitz 1992a; Horwitz *et al.*, 1992b; Boyle *et al.*, 1994).

### 2.5.2 Die $\beta/\gamma$ -Kristallin-Familie

Die strukturelle Besonderheit der  $\beta/\gamma$ -Kristalline ist ein insgesamt vierfach wiederkehrendes Motiv, das aus vier symmetrischen, antiparallel verlaufenden  $\beta$ -Faltblättern besteht und als "Griechischer Schlüssel" bezeichnet wird. Dieses Modell wurde durch Röntgenkristallographie am  $\gamma\beta$ -Kristallin des Rindes etabliert. Inzwischen sind jedoch auch andere Strukturen bekannt, die davon abweichen. Das  $\gamma\text{F}$ -Kristallin des Rindes besitzt beispielsweise vier Faltblätter im ersten Griechischen Schlüssel, das zweite und dritte Motiv wird von je drei  $\beta$ -Faltblättern gebildet und das vierte Motiv besteht schließlich wieder aus vier Faltblättern (Slingsby *et al.*, 1983). Je zwei Griechische Schlüssel sind durch ein kurzes Polypeptid miteinander verbunden und bilden eine Domäne (Abbildung 2.5).



**Abb. 2.5:** Sekundärstruktur der  $\beta/\gamma$ -Kristalline.

Die  $\beta/\gamma$ -Kristalline bestehen aus vier Griechischen Schlüssel-Motiven. Zwei dieser Motive stellen eine Domäne dar (Crabbe *et al.*, 1995). Die Eigenschaften des Verknüpfungspeptids unterscheiden sich in den  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kristallinen. Dadurch wird die Domänenpaarung beeinflusst (siehe Text).

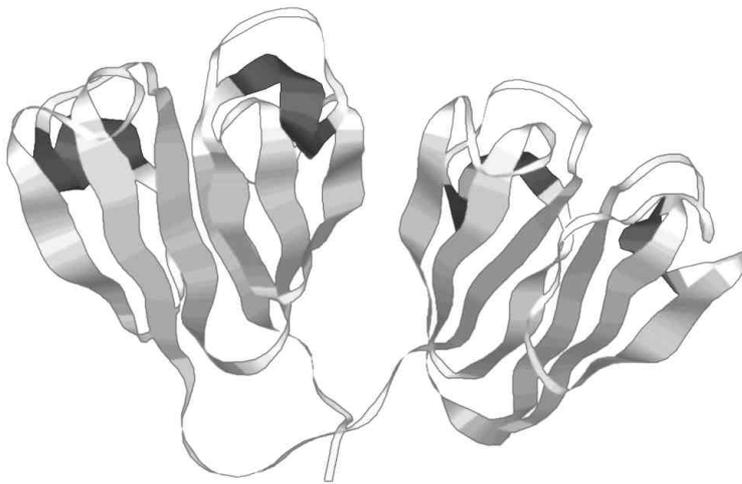
Die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kristalline unterscheiden sich in der Anordnung ihrer Domänen. Da die  $\gamma$ -Kristalline intramolekulare Domänenpaarung zeigen, liegen sie monomerisch vor. Im Gegensatz dazu interagieren die Domänen der  $\beta$ -Kristalline intermolekular, was zu Homo-, Heterodimeren und Multimeren führt (Hope *et al.*, 1994). Eine Ausnahme stellt das  $\beta_s$ -Kristallin dar. Es wurde zunächst den  $\beta$ -Kristallinen zugeordnet, da es chromatographisch in dieser Fraktion vorkommt. Später wurde festgestellt, daß es als Monomer vorliegt und wird nunmehr als  $\gamma_s$ -Kristallin bezeichnet (van Rens *et al.*, 1991). Zur Unterscheidung der beiden Familien dient auch der N-Terminus. Er ist in den  $\beta$ -Kristallinen blockiert und in den  $\gamma$ -Kristallinen frei (de Jong *et al.*, 1988).

### 2.5.3 Struktur und Funktion der $\beta$ -Kristalline

Die  $\beta$ -Kristalline sind vorwiegend in elongierenden Linsenfaserzellen exprimiert (Head *et al.*, 1995; McDermott *et al.*, 1996). Sie werden in saure ( $\beta$ A-) und basische ( $\beta$ B-) Kristalline unterteilt. Die Monomere haben ein Molekulargewicht zwischen 22 und 28kDa und aggregieren zu größeren, maximal oktameren Komplexen (Zarina *et al.*, 1994).  $\beta$ -Kristalline sind an ihren N-Termini acetyliert und unterliegen weiteren posttranslationalen Modifikationen, wie Glykosylierung und Phosphorylierung (de Jong *et al.*, 1988). Für die Ausbildung einer korrekten Quartärstruktur des  $\beta$ B2-Kristallins ist ein intakter C-Terminus essentiell. Die Expression des mißgefalteten Proteins in der Linse führt zur Entwicklung einer progressiven Katarakt (Carper 1982; Chambers *et al.*, 1991; Graw *et al.*, 1999).

### 2.5.4 Struktur und Funktion der $\gamma$ -Kristalline

Die monomer vorliegenden  $\gamma$ -Kristalline besitzen ein Molekulargewicht von etwa 20kDa. Sie werden in elongierenden Linsenfaserzellen exprimiert und erreichen ihr Expressionsmaximum in der Maus etwa drei Wochen nach der Geburt (Goring *et al.*, 1992). Geringe Mengen



**Abb. 2.6:** Röntgenkristallstruktur von bovinem  $\gamma$ B-Kristallin.  $\alpha$ -Helices erscheinen dunkelgrau, die antiparallel verlaufenden  $\beta$ -Faltblätter sind hellgrau gefärbt. Der N-Terminus des Proteins liegt im unteren rechten Drittel, der C-Terminus in der Bildmitte (entnommen aus Lindley *et al.*, 1993).

an  $\gamma$ -Kristallinen werden auch in der Retina nachgewiesen (Jones *et al.*, 1999). Die Quartärstruktur von bovinem  $\gamma$ B-Kristallin (Lindley *et al.*, 1993) ist in Abbildung 2.6 dargestellt. Die Struktur der  $\gamma$ -Kristalline erlaubt hohe Packungsdichten und vermindert so den Wassergehalt der Faserzellen. Ihr Proteingehalt liegt bei über 60 Prozent, etwa zwei Drittel davon entfallen auf die  $\gamma$ -Kristalline. Somatische Zellen haben üblicherweise Proteingehalte von etwa fünf Prozent. Intakte Griechische Schlüssel-Motive von  $\gamma$ -Kristallinen, sowie die korrekte Anordnung ihrer Domänen, sind eine wesentliche Voraussetzung für die Transparenz von Linsenfaserzellen und ermöglichen den hohen Brechungsindex der Auglinse (Crabbe *et al.*, 1995).

an  $\gamma$ -Kristallinen werden auch in der Retina nachgewiesen (Jones *et al.*, 1999). Die Quartärstruktur von bovinem  $\gamma$ B-Kristallin (Lindley *et al.*, 1993) ist in Abbildung 2.6 dargestellt.

Die Struktur der  $\gamma$ -Kristalline erlaubt hohe Packungsdichten und vermindert so den Wassergehalt der Faserzellen. Ihr Proteingehalt liegt bei über 60 Prozent, etwa zwei Drittel davon entfallen auf die  $\gamma$ -Kristalline. Somatische Zellen haben üblicherweise Proteingehalte

### 2.5.5 Genomische Organisation der $\beta/\gamma$ -Kristalline

Die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kristalline unterscheiden sich in ihrer genomischen Organisation. In Vertebraten werden die sauren  $\beta$ A-Kristalline und die basischen  $\beta$ B-Kristalline jeweils von drei Genen codiert (*Cryba1*, *Cryba2*, *Cryba4*; *Crybb1*→*Crybb3*) (Brakenhoff *et al.*, 1992). Sie bestehen typischerweise aus sechs Exons, wobei die ersten beiden für den N-terminalen Arm und die anderen vier für je einen Griechischen Schlüssel codieren (Hogg *et al.*, 1987).

Im Gegensatz dazu existieren in Vertebraten insgesamt sechs verschiedene  $\gamma$ -Kristallin-codierende Gene (*Cryga*@*Crygf*). Die genomische Struktur der  $\gamma$ -Kristalline umfaßt drei Exons. Das erste Exon codiert immer für die ersten drei Aminosäuren der  $\gamma$ -Kristalline. Es wird gefolgt von einem kurzen, 100bp umfassenden Intron. Das zweite (243bp) und dritte Exon (273-276bp) der  $\gamma$ -Kristalline codieren für jeweils zwei Griechische Schlüssel und sind durch ein 1-2kb überspannendes Intron getrennt.

Die  $\gamma$ -Kristalline liegen auf einem eng begrenzten Bereich des Genoms. In Ratten umfassen fünf dieser Gene (*Cryga*→*Cryge*) eine Region von nur 50kb, die relative Lage von *Crygf* hierzu ist allerdings bislang unbekannt (den Dunnen *et al.*, 1989). Die sechs  $\gamma$ -Kristalline der Maus liegen auf Chromosom 1 (Skow *et al.*, 1988). Ortholog hierzu ist der Bereich 2q32-35 des humanen Genoms (den Dunnen *et al.*, 1985). Im Menschen werden jedoch nur vier der sechs vorhandenen  $\gamma$ -Kristalline transkribiert, *CRYGE* und *CRYGF* sind Pseudeogene (Brakenhoff *et al.*, 1990). Die enge Nachbarschaft der  $\gamma$ -Kristalline, sowie ihre hohe strukturelle Homologie, deuten auf ihre Entstehung durch Genduplikation eines gemeinsamen Vorläufers hin. Die sechs  $\gamma$ -Kristallin-codierenden Gene sind zu über 40 Prozent identisch, ihre Aminosäuresequenzen sind zu über 60 Prozent konserviert (Graw *et al.*, 1991; Graw *et al.*, 1993).

## 2.6 Mutationen der Kristalline erzeugen Katarakte

Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation WHO sind Linsentrübungen (Katarakte) beim Menschen weltweit die häufigste Ursache für den Verlust des Sehvermögens. Bei der Geburt manifeste (kongenitale) Katarakte sind zugleich eine der häufigsten Augenkrankheiten bei Kindern (Thylefors *et al.*, 1995). In menschlichen Kristallinen sind unterschiedliche Mutationen bekannt, welche zur Entwicklung einer Linsentrübung führen. Eine Auswahl davon ist zusammen mit entsprechenden Mausmodellen in Tabelle 2.2 angegeben.

Mutationen menschlicher Kristalline und korrespondierende Tiermodelle		
Gen	Bezeichnung, Mutation	Referenz
<i>CRYAA</i>	<i>ADCC</i> ; Aminosäureaustausch R116C <i>Crygaa</i> <sup>-/-</sup> -Maus	Litt <i>et al.</i> , 1997; Litt <i>et al.</i> , 1998 Brady <i>et al.</i> , 1997
<i>CRYBA3/A1</i>	<i>CCZS</i> ; Intron3 ( <i>Splice Site</i> , G→A) <i>Cryba1</i> <sup>po1</sup> ; Ex6 (170 T→A)	Padma <i>et al.</i> , 1995; Kannabiran <i>et al.</i> , 1998 Graw <i>et al.</i> , 1999
<i>CRYBB2</i>	<i>Coppock-like (CCL-2)</i> ; Ex6 (14 C→T) Philly-Maus; Ex3 (Δ 12bp)	Gill <i>et al.</i> , 2000 Carper <i>et al.</i> , 1986; Chambers <i>et al.</i> , 1991
<i>CRYGC</i>	<i>Coppock-like (CCL)</i> ; Ex2 (225 A→C)	Héon <i>et al.</i> , 1999
<i>CRYGD</i>	<i>Aculeiform</i> ; Ex2 (34 C→T) <i>Crygd</i> <sup>Lop12</sup> ; Ex3 (470 G→A)	Stephan <i>et al.</i> , 1999; Pande <i>et al.</i> , 2000 Smith <i>et al.</i> , 2000
<i>CRYG</i> -Gencluster	<i>PCC</i> <i>Cryge</i> <sup>elo</sup> ; Ex3 (503 ΔG)	Rogaev <i>et al.</i> , 1996 Cartier <i>et al.</i> , 1992

**Tab. 2.2:** Mutationen menschlicher Kristalline und korrespondierende Tiermodelle.

Die betroffenen Gene humaner Kristallinmutationen (entnommen aus der OMIM-Datenbank "*Mendelian Inheritance in Man*", <http://www.ncbi.nlm.gov/htbin-post/omim/getmim>) sind zusammen mit der zugehörigen Mutation und der gebräuchlichen Abkürzung angegeben (*ADCC*: *A*utosomal *d*ominant *c*ongenital *c*ataract; *CCZS*: *A*utosomal *d*ominant *z*onular *c*ataract; *CCL*: *C*oppock-*l*ike *c*ataract; *PCC*: *A*utosomal *d*ominant *p*olymorphic *c*ongenital *c*ataract). Auf Mausmodelle mit einer entsprechenden Mutation im Kristallin-Gencluster wird jeweils in der folgenden Zeile verwiesen.

Aufgrund von mangelndem Untersuchungsmaterial ist die Charakterisierung biochemischer Ursachen von Linsentrübungen des Menschen problematisch. Die Verfügbarkeit embryonaler Stadien ist ebenso ein gewichtiges Argument für die Suche nach geeigneten Tiermodellen. Im Allgemeinen werden diese durch Mutageneseexperimente erhalten (Ehling *et al.*, 1985; Hrabé *et al.*, 1998). Durch die hohe Sequenzhomologie der  $\gamma$ -Kristallin-Gene des Menschen zu denen der Maus mit über 80 Prozent (Graw *et al.*, 1993) stellen Mutationen im  $\gamma$ -Kristallin-Gencluster der Maus hervorragende Modellsysteme für molekulare und biochemische Untersuchungen der pathologischen Veränderungen während der Kataraktentwicklung dar.

### 2.6.1 Generierung von murinen Kataraktmutanten

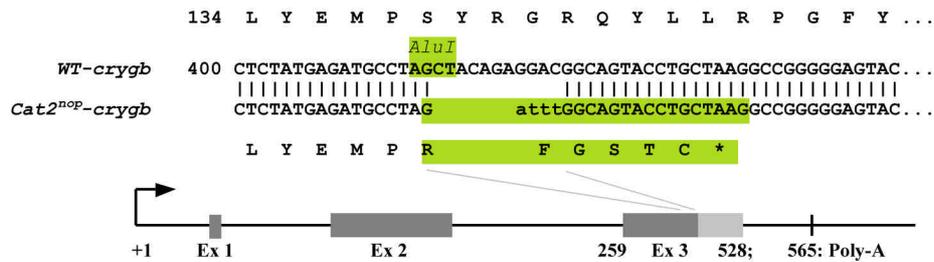
In den späten siebziger Jahren wurde am Institut für Säugetiergenetik der GSF Neuherberg die Dosis/Wirkungsabhängigkeit verschiedener mutagener Einflüsse, wie Röntgenstrahlen oder Ethylnitrosoharnstoff (ENU), auf nachfolgende Generationen an Mäusen untersucht (Kratochvilova *et al.*, 1979). Im Zuge der systematischen Auswertung dieser Ergebnisse entstand die Neuherberger Mutantensammlung (Ehling 1991; Favor 1995).

### 2.6.2 Erbgang und genetische Analyse

Die durch Allelietests zusammengefaßten *Cat2*-Mutanten stellen die umfangreichste Gruppe der Neuherberger Sammlung dar (Kratochvilova *et al.*, 1992). Der *Cat2*-Genort wurde in der Nähe des  $\gamma$ -Kristallin-Genclusters auf Chromosom 1 der Maus kartiert (Everett *et al.*, 1994). Die Feinkartierung des *Cat2*-Genortes zeigt den geringen genetischen Abstand von  $0.3 \pm 0.3\text{cM}$  zu *Cryge* der Maus (Löster *et al.*, 1994). Die  $\gamma$ -Kristallingene wurden daher als Kandidatengene für *Cat2*-Mutationen in der Maus vorgeschlagen. Kürzlich wurden drei Mutationen in den jeweiligen  $\gamma$ -Kristallingenen charakterisiert (Klopp *et al.*, 1998). Mutationen im  $\gamma$ -Kristallin Gencluster der Maus treten als autosomal-dominanter Erbgang in Erscheinung und werden mit voller Penetranz an die nachfolgende Generation weitergegeben. Phänotypisch beobachtet man die Entwicklung einer kongenitalen Katarakt. Die *Crygb<sup>nop</sup>*- und die *Cryge<sup>t</sup>*-Mutante waren in großen Zuchtansätzen an unserem Institut verfügbar und wurden für die in dieser Arbeit beschriebene biochemische Charakterisierung der Kataraktentwicklung von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten verwendet.

### 2.6.3 Die *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutation

Die spontan aufgetretene *Crygb<sup>nop</sup>* Mutante (Graw *et al.*, 1984) zeigt eine Insertions-/Deletions-Mutation im dritten Exon von *Crygb*, welche durch die Verschiebung des Leserasters zum Verlust der *AluI*-Schnittstelle und zur Einfügung einer veränderten Aminosäuresequenz führt (Klopp *et al.*, 1998). Es werden insgesamt sechs neue Aminosäuren im letzten Viertel des Proteins eingebaut, bevor die Proteinkette zwischen dem dritten und vierten Griechischen Schlüssel-Motiv abbricht (Abbildung 2.7). Die veränderte Aminosäuresequenz im *Crygb<sup>nop</sup>*-Protein ermöglicht die Herstellung eines spezifischen Antikörperserums, mit dessen Hilfe die Expression des mutierten  $\gamma$ B-Kristallins in der Linse von *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten untersucht werden kann (siehe Abschnitte 5.2.1 und 5.5.1).

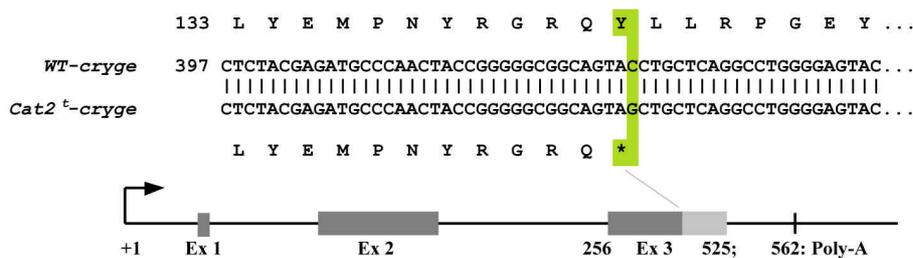


**Abb. 2.7:** Veränderte DNA-Sequenz in *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten.

In heterozygoten Tieren wird eine kongenitale nukleäre Katarakt beobachtet. In homozygoten *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten ist diese etwas stärker ausgeprägt, ebenso nimmt die Größe der Linse ab. Die histologische Analyse dreiwöchiger Mäuse zeigt eine starke Vakuolisierung des Linsenkortex, der verminderte Zellkernabbau deutet auf eine gestörte Faserzellendifferenzierung hin. Ebenso wird eine verminderte Expression der differenzierungsspezifischen  $\gamma$ -Kristalline gefunden, während die Expression der  $\alpha$ -Kristalline unverändert ist (Graw *et al.*, 1990).

### 2.6.4 Die *Cryge<sup>t</sup>*-Mutation

Die *Cryge<sup>t</sup>* Mutante wurde unter Nachkommen von Tieren beobachtet, von denen ein Elternteil mit Röntgenstrahlen behandelt wurde (Graw *et al.*, 1990). Die molekulare Analyse ergab eine Punktmutation (C→G) im dritten Exon von *Crygf* (Klopp *et al.*, 1998), die zu einem Stop-Codon und einem Kettenabbruch der Proteinkette nach dem dritten Griechischen Schlüssel-Motiv führt. Durch die Punktmutation werden keine neuen Aminosäuren gebildet (Abbildung 2.8). Die Herstellung eines spezifischen Antikörpers gegen das verkürzte *Cryge<sup>t</sup>*-Protein ist daher nicht möglich.



**Abb. 2.8:** Veränderte DNA-Sequenz in *Cryge<sup>t</sup>*-Mutanten.

Heterozygote *Cryge<sup>t</sup>*-Mutanten zeigen eine kongenitale Totaltrübung der Linse. In Homozygoten ist diese etwas stärker ausgeprägt, ebenso zeigt sich zunehmende Mikrophthalmie. Die histologische Analyse dreiwöchiger Linsen zeigt eine starke Vakuolisierung sowie persistierende Zellkerne. Die Differenzierung von Linsenfaserzellen ist offenbar massiv gestört. Der Nachweis von Vimentin in der wasserlöslichen Fraktion von Linsenextrakten belegt zudem den Abbau des Cytoskeletts in den Faserzellen von *Cryge<sup>t</sup>*-Mutanten (Graw *et al.*, 1990).

## 2.7 Zielsetzung

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der histologischen und molekularen Charakterisierung von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten, sowie auf der Erstellung eines molekularen Modells, mit Hilfe dessen die gravierenden morphologischen Veränderungen während ihrer Linsenentwicklung beschrieben werden können.

Die beiden untersuchten Mauslinien, *Crygb<sup>nop</sup>* und *Cryge<sup>l</sup>*, wurden in einem Mutageneseexperiment an der GSF Neuherberg erhalten (Kratochvilova *et al.*, 1979) und weisen verschiedene Mutationen im  $\gamma$ -Kristallin-Gencluster auf (Klopp *et al.*, 1998). Beide Linien entwickeln eine kongenitale und progressiv verlaufende Trübung der Augenlinse, begleitet von Mikrophthalmie. Eine erste histologische Charakterisierung zeigt einen verminderten Zellkernabbau in der Linse, woraus sich auf ein gestörtes terminales Differenzierungsprogramm schließen läßt (Graw *et al.*, 1990; Graw *et al.*, 1990).

Zunächst sollten die pathologischen Veränderungen in der Linse von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten während der Embryonalentwicklung charakterisiert werden. Durch vergleichende Histologie und anhand von Literaturdaten sollte nachfolgend ein **Arbeitsmodell** entwickelt werden, welches den Gesamtprozeß der Faserzellendifferenzierung in verschiedene Schritte zerlegt, die einer systematischen Untersuchung zugänglich sind:

- (1) Die Umwandlung proliferierender Zellen aus der germinativen Zone des Linsenepithels in elongierende Faserzellen. Dieser Übergang stellt, wie verschiedene *in vivo*-Experimente belegen, offensichtlich die Voraussetzung für den Eintritt in ein terminales Differenzierungsprogramm dar (Lovicu *et al.*, 1992; Robinson *et al.*, 1995). Durch immunhistochemische Analyse soll ein Expressionsprofil verschiedener Zellzyklusregulatoren in der Linse erstellt und mit  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten verglichen werden.
- (2) Der Abbau von Zellkernen und DNA während terminaler Differenzierung ist essentiell für die optischen Eigenschaften der Linse (Bassnett *et al.*, 1992) und die Beteiligung apoptotischer Prozesse wird vermutet (Pan *et al.*, 1995; Ishizaki *et al.*, 1998). Durch die Analyse der verschiedenen, anhand der Literatur vorhergesagten Ereignisse des programmierten Zelltodes, soll die Faserzellendifferenzierung des Wildtyps mit den pathologischen Veränderungen in  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten verglichen werden.

Ein Ziel der Arbeit war die Umsetzung der erhaltenen Ergebnisse für die Erstellung eines **transgenen Mausmodells**, mit dessen Hilfe die pathologischen Prozesse in Linsen von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten genauer untersucht werden können.

### 3. MATERIALIEN UND LÖSUNGEN

#### 3.1 Chemikalien und sonstige Reagenzien

Alle Chemikalien, die hier nicht aufgeführt sind, wurden bei Merck, Darmstadt in Reinstform bestellt. In Fällen, in denen ähnliche Produkte von derselben Firma angeboten werden, wurden die Katalognummern der Produkte angegeben.

Agarose (Elektrophoresegrad)	Gibco BRL, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen; #A2804
Bacto-Tryptone	Difco Laboratories, Detroit, USA; vertrieben von Otto Nordwald, Hamburg; #0123-17-3
Bacto-Hefeextrakt	Difco; #0140-01
BSA (Rinderserum-Albumin)	Gibco BRL, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva, Heidelberg
DNA/RNA Blotting-Membran (Qiabranen Nylon Plus)	Qiagen, Hilden; #61030
DAPI (4',6-Diamidin-2'-Phenylindoldihydrochlorid)	Boehringer Mannheim
D <sub>C</sub> Protein Assay Kit	BioRad Inc., Hercules, USA; #500-0116
Dithiothreitol	Sigma Deisenhofen; #D9779
DNA aus Heringsspermien	Gibco BRL, Karlsruhe
DNA Molekulargewichtsstandards 3, 8 und 23	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
dNTP-Sets	Pharmacia, Freiburg; Promega, Mannheim
Einbettmedium VectaShield <sup>®</sup>	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA
Einbettmedium Eukitt	O. Kindler GmbH & Co., Freiburg
Einweg-Mikro-Homogenisatorstempel	W. Ebel Laboreinrichtungen, Hamburg
Ethidiumbromid (20mg/ml Stammlösung)	Gibco BRL, Karlsruhe
GeneClean <sup>™</sup>	Bio101; vertrieben durch Oncor, Heidelberg
Histowax (Paraffin für die Histologie)	Cambridge Instruments, Nußloch
IPTG (Isopropylthio-βD-Galactosid)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe; #2316.3
Kanamycin	Sigma Deisenhofen; #K0879
Megaprime <sup>™</sup> DNA Labeling Kit	Amersham Buchler, Heidelberg; #RPN1606
Mikrospin <sup>™</sup> S-300 HR Columns	Pharmacia, Freiburg
Mikrotom-Einmalklingen (A35, blau)	MPM Seidel GmbH, Buchendorf
Nonidet P-40 (IGEPAL CA-630)	Sigma Deisenhofen; #I3021
Phenol, H <sub>2</sub> O-gesättigt	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Plasmid-Präparationssäulen AX-100, AX-500	Macherey-Nagel, Düren
PMSF	Sigma, Deisenhofen; #P7626
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen; #P3504
Propidiumiodid Stammlösung (1mg/ml)	Molecular Probes; #P1304; vertrieben durch MoBiTec, Göttingen

Radiochemikalien ( $^{32}\text{P}$ - $\alpha\text{dCTP}$ )	Amersham Buchler, Heidelberg
RNAzol <sup>TM</sup> B	BIOZOL Diagnostika, Eching
Reverse Transkriptase (SuperScript II <sup>TM</sup> )	Gibco BRL, Karlsruhe
SDS-Blotting-Membran (Nitrozellulose)	BioRad Inc., Hercules, USA; #162-0112
SDS-Blotting-Membran (PVDF)	ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA; #810302
SDS-Proteinstandard 69813, vorgefärbt	Fluka, Deisenhofen; #69813
SDS-Proteinstandard Dalton Mark VII-L	Sigma, Deisenhofen; #MW-SDS-70L
TESPA (Triethoxypolysilan)	Sigma, Deisenhofen; #A3648
TUNEL-Kit (Fluorescein)	Boehringer Mannheim; #1684795
Tween-20	Sigma, Deisenhofen; #P7949
Whatman Filterpapier (GB004)	Schleicher & Schuell, Dassel; #426994
X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl- $\beta\text{D}$ -Galactopyranosid)	Peqlab Biotechnologie, Erlangen

### 3.2 Antikörper

Die Firma Jackson Immuno Research wird vertrieben durch Dianova, Hamburg. Primäre Antikörper wurden bei den Firmen Upstate Biotechnologies Inc., vertrieben durch Biozol GmbH, Eching, sowie Santa Cruz, Heidelberg, bezogen.

Anti-Human Bax, N-terminal (Kaninchen IgG)	Upstate Biotechnologies; #UB06-499
Anti-Maus Bcl-2 (Kaninchen IgG)	Upstate Biotechnologies; #UB06-474
Anti-cdk5 (Kaninchen IgG)	Santa Cruz; #sc-173
Anti-Cryggnop $\gamma\text{B}$ -Kristallin (Kaninchen IgG)	Roy Quinlan, Universität Dundee, Schottland
Anti-Cyclin D <sub>1</sub> (Kaninchen IgG)	Santa Cruz; #sc-753
Anti-Cyclin D <sub>2</sub> (Kaninchen IgG)	Santa Cruz; #sc-754
Anti-Cyclin D <sub>3</sub> (Kaninchen IgG)	Santa Cruz; #sc-755
Anti-Cytochrom C (Kaninchen IgG)	Santa Cruz; #sc-7159
Anti-Lamin B (Ziege IgG)	Santa Cruz; #sc-6217
Anti-PARP, Human (Kaninchen IgG)	Upstate Biotechnologies; #UB06-557
Anti-PARP, Human (Maus IgG, Klon C-2-10)	Biomol; #sa-250
Anti-p27 <sup>kip1</sup> (Kaninchen IgG)	Frank O. Fackelmayer, Universität Konstanz
Anti-p57 <sup>kip2</sup> (Ziege IgG)	Santa Cruz; #sc-1037
Esel-anti-Ziege IgG, FITC-gekoppelt	Santa Cruz; #sc-2024
Ziege-anti-Kaninchen IgG, AP-gekoppelt	Boehringer Mannheim; #1214 632
Ziege-anti-Kaninchen IgG, Cy3-gekoppelt	Dianova; #711-165-152
Ziege-anti-Kaninchen IgG, F(ab), FITC-gekoppelt	Boehringer; #1814257
Ziege-anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt	Jackson Immuno Research; #111-035-144

### 3.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm  
 DNase I, RNase-frei  
 Caspase-3, human, rekombinant  
 Proteinase K, lyophilisiert  
 Restriktionsenzyme  
  
 RNase Inhibitor  
 Taq Polymerase  
 T4 DNA Ligase  
 T4 PNK (Phosphonukleotidkinase)

Boehringer Mannheim; #713023  
 Boehringer Mannheim; #776785  
 Frank O. Fackelmayer, Universität Konstanz  
 Boehringer Mannheim; #1000144  
 Gibco BRL; Boehringer Mannheim; New  
 England Biolabs (NEB), Schwalbach/Taunus  
 Boehringer Mannheim; #799017  
 Gibco BRL, Karlsruhe; #18038-026  
 Boehringer Mannheim; #481220  
 Boehringer Mannheim; #709 557

### 3.4 Geräte

ABI 394 DNA/RNA Synthesizer  
 ABI Prism 310 DNA Sequenzierautomat  
 Acrylamid-Gelelektrophorese-Apparatur  
 Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur  
 Bakterien-Brutschrank  
 Bakterienschüttler  
 Farbvideokamera (HCC 2000)  
 Farbvideokamera (ProgRes 3008)  
 Gelrockner (Modell D63)  
 GeneAmp PCR Systems 2400 und 9600  
 Heizblock, -schüttler (Thermostat 5320)  
 Kühltischzentrifuge (Universal 16 R)  
 Kühltischzentrifuge (Sorvall RC-5B)  
 Mikroskope (Axioplan und Axiophot)  
 Mikrotom für Semidünnschnitte (RM 2055)  
 Mikrotom für Paraffinschnitte (HM 335E)  
 Schwarzweiß-Videokamera (IMAC CCD S30)  
 Stratalinker  
 Szintillationszähler (Easicount 4000)  
 Tischzentrifuge (Biofuge pico)

Applied Biosystems, Foster City, CA, USA  
 Applied Biosystems, Foster City, CA, USA  
 Biometra, Göttingen  
 Gibco BRL, Karlsruhe  
 WT-Binder, Bottmingen, Schweiz  
 Infors, München  
 Fuji  
 Jenoptik GmbH, Jena  
 Biometra, Göttingen  
 Perkin Elmer, Langen  
 Eppendorf, Hamburg  
 Hettich, Tuttlingen  
 Sorvall, Bad Homburg  
 Zeiss, Oberkochen  
 Reichert & Jung, Heidelberg  
 Microm Laborgeräte GmbH, Walldorf  
 Compulog Computer Systems, Böblingen  
 Stratagene, Amsterdam, Niederlande  
 Scotlab, UK  
 Heraeus, Hanau

### 3.5 Filmmaterial

Das in Western blots verwendete Chemolumineszenzverfahren (ECL plus<sup>®</sup>, Amersham Pharmacia) und die Detektion radioaktiv markierter Sonden in Hybridisierungen benötigt Kodak XAR Filme (Eastman Kodak Company, New York, USA). Die Herstellung von Diapositiven aus digitalen Bilddaten erfolgt auf Kodak Elite II Tageslichtfilmen (200 ASA).

### 3.6 Nukleinsäuren

#### 3.6.1 Oligonukleotide und Sequenzierungen

Während meines Aufenthaltes am *National Eye Institute (NEI)*, *National Institutes of Health*, Bethesda, USA wurden die Oligonukleotide am ABI 394 DNA/RNA Synthesizer hergestellt, ebenso wurden die Sequenzierungen am ABI Prism 310 DNA Sequencer durchgeführt (ABI Applied Biosystems, Connecticut, USA). Während meines Aufenthaltes an der GSF Neuherberg am *Institut für Säugetiergenetik (ISG)* wurden die Oligonukleotide von Utz Linzner, ISG, Abteilung BioDV, zur Verfügung gestellt. In Abschnitt 7.1 sind diese tabellarisch aufgeführt; auf die laufende Nummer der verwendeten Oligonukleotide wird in den jeweiligen Abschnitten verwiesen.

#### 3.6.2 Vektoren und Plasmide

Für die Klonierung und Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurde der pCR<sup>™</sup> 2.1 Plasmidvektor von Invitrogen verwendet (TA Cloning<sup>®</sup> Kit, Invitrogen BV, CH Groningen, Niederlande). Der pCR<sup>™</sup> 3.1 Mammalian Expression Vector (Invitrogen) wurde für die Herstellung des DNA-Konstrukts *bax*-transgener Tiere verwendet.

### 3.7 Tiere

Vor der Entnahme von Organen wurden Mäuse aus den GSF-eigenen Inzuchtstämmen nach internationalen Richtlinien schmerzfrei getötet. Als Wildtyp wurden hierbei F1-Hybride der Inzuchtstämme 102/E1 (männlich) und C3H/E1 (weiblich) verwendet. Histologische Untersuchungen zur Kataraktentstehung und RNA-Präparation wurden nach Entnahme von Linsen und Organen der homozygot gehaltenen, hereditären Kataraktlinien *Crygb<sup>nop</sup>* und *Cryge<sup>f</sup>* durchgeführt. Für die kontrollierte Verpaarung wurden die Weibchen früh morgens auf das Vorhandensein eines vaginalen Plugs überprüft. Die embryonalen Entwicklungsstadien werden nach Kaufmann (1992) datiert.

### 3.8 Medien und Lösungen

#### 3.8.1 Allgemeine Lösungen

10x PBS Puffer ( <i>Phosphate-buffered saline</i> )	80g NaCl 14.4g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2.4g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit H <sub>2</sub> O auf 1l auffüllen, pH 7.3 mit HCl einstellen, autoklavieren
10x PCR Puffer	100mM Tris-HCl (pH 7.5-8.3) 500mM KCl 12.5mM MgCl <sub>2</sub> 0.1% Glycerol (optional)
10x dNTP's	je 2.5mM (aus je 10mM dNTP's)
Antibiotika-Stammlösungen (Ampicillin, Kanamycin)	10mg/ml in H <sub>2</sub> O, aliquotiert bei -20°C lagern
EDTA Stammlösung (0.5M)	72.1g/50ml EDTA-Dinatriumsalz unter Zugabe einiger NaOH-Plätzchen in H <sub>2</sub> O lösen, pH8.0 mit HCl einstellen, autoklavieren
Harnstoff-Puffer für Linsenextrakte (10ml)	250µl 2M Tris-HCl, pH8.6 (= 50mM) 500µl 1M NaCl (= 50mM) 20µl 0.5M EDTA (= 1mM) 3.6g Harnstoff (= 6M) 9.3ml H <sub>2</sub> O
IPTG (Isopropylthio-βD-Galactosid)	20mg/ml in H <sub>2</sub> O (2%=83mM), sterilfiltriert, aliquotiert, Lagerung bei -20°C
LE Puffer für Linsenextrakte (10ml)	250µl 2M Tris-HCl, pH8.0 (= 50mM) 300µl 100mM DTT (= 3mM) 50µl 20mM PMSF (= 0.1mM) 6.4ml H <sub>2</sub> O
Proteinase K Stammlösung	20mg/ml in H <sub>2</sub> O, aliquotiert, Lagerung bei -20°C
X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl-βD-Galactosid)	20mg/ml in DMF lösen, lichtgeschützt bei 4°C lagern

### 3.8.2 Nährmedien für Bakterien

Die *E.coli*-Stämme wurden in folgenden Nährmedien (Sambrook *et al.*, 1989) kultiviert:

LB-Medium	1% Bacto-Tryptone 0.5% Bacto-Hefeextrakt 1% NaCl mit NaOH auf pH7.0 titriert, autoklaviert
LB-Agar	LB-Medium 15g/l Difco-Agar, autoklaviert

Für die Antibiotika-Selektion wurde den LB-Medien 50µg/ml Ampicillin oder 25µg/ml Kanamycin zugesetzt, bzw. 50µl Ampicillin- oder 25µl Kanamycin-Stammlösung ausplattiert. Für die blau/weiß-Selektion von Bakterienkolonien wurden zusätzlich 50µl X-Gal- und 50µl IPTG-Stammlösung auf LB-Agar-Platten (Ø 7.5cm) ausplattiert.

### 3.8.3 Lösungen für die Herstellung hitzekompetenter Zellen

TB1	12g RbCl 9.9g MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O 30ml 1M Kaliumacetat, pH7.5 1.5g CsCl · 2 H <sub>2</sub> O auf 1l mit H <sub>2</sub> O auffüllen, mit Eisessig auf pH8.5 einstellen, sterilfiltrieren
TB2	1.2g RbCl 150ml Glycerol 20ml 0.5M MOPS, pH6.8 11g CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O auf 1l mit H <sub>2</sub> O auffüllen, mit NaOH auf pH6.8 einstellen, sterilfiltrieren

### 3.8.4 Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

6x DNA/RNA Ladepuffer für Agarosegele	30% Glycerol 0.2% Bromphenolblau in Tris-HCl (pH 7.5) 1:100 Ethidiumbromid Stammlösung, optional
50x TAE (Tris-Acetat-EDTA Puffer)	242g/l Tris base 18.6g/l EDTA-Natriumsalz ~57ml Eisessig, pH auf 8.0 einstellen, mit H <sub>2</sub> O auf 1l auffüllen

10x TBE (Tris-Borat-EDTA Puffer)	108g/l Tris base (= 1.78M) 55g/l Borsäure (= 1.78M) 40ml/l 0.5M EDTA, pH8.0 (= 200mM) mit H <sub>2</sub> O auf 1l auffüllen
Proteinase K Stammlösung	20mg/ml in H <sub>2</sub> O, aliquotiert, Lagerung bei -20°C
TE (Tris-EDTA Puffer)	5ml/l 2M Tris-HCl, pH7.5 (= 10mM) 2ml/l 0.5M EDTA Stammlösung (=1mM)

### 3.8.5 Lösungen für den Transfer von DNA auf Nylonmembranen (Southern blotting)

DNA-Depurinierungs-Puffer	22ml/l HCl
DNA-Denaturierungs-Puffer	16g/l NaOH Plätzchen (= 0.4N)
20x SSC	88.23g/l Trinatriumcitrat Dihydrat 175.32g/l NaCl

### 3.8.6 Lösungen für die Hybridisierung von membrangebundener DNA

100x Denhardt's Lösung (100ml)	2g BSA 2g Polyvinylpyrrolidon 2g Ficoll
Prähybridisierungslösung (40ml)	2ml 100x Denhardt's Lösung (= 5x Denhardt's) 10ml 20x SSC (= 5x SSC) 400µl 10% SDS (= 0.1% SDS) 400µl 10mg/ml denaturierte Heringssperma-DNA 27.2ml H <sub>2</sub> O

### 3.8.7 Lösungen für die Polyacrylamidgelelektrophorese

10x Anodenpuffer	0.2M Tris-HCl, pH8.9
5x Kathodenpuffer (300ml)	75ml 2M Tris-HCl Stammlösung, pH8.9 26.88g Tricin 15ml 10% SDS 210ml H <sub>2</sub> O
Acrylamid-Lösung (40%, 29:1)	29g Acrylamid 1g N,N'-Bisacrylamid 75ml H <sub>2</sub> O

APS (Ammoniumpersulfat, 10%)	0.1g/ml APS in H <sub>2</sub> O lösen, Lagerung bei 4°C
Gelpuffer I	3M Tris-HCl, pH8.5 (36.35g Tris Base/100ml) 3ml 10% SDS 97ml H <sub>2</sub> O
2x Laemmli-Puffer	50% Glycerol 4% SDS 0.2M Tris-HCl, pH6.8 0.1% Serva Blue 0.1% β-Mercaptoethanol
SDS (Natriumdodecylsulfat, 10%)	0.1g/ml in H <sub>2</sub> O lösen

### 3.8.8 Lösung für die Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Coomassie Färbelösung	5g Coomassie Brilliant Blue G250 450ml Methanol 100ml Eisessig mit H <sub>2</sub> O auf 1l auffüllen
Entfärbelösung	50% Methanol 10% Eisessig

### 3.8.9 Stammlösungen für die Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Silbernitrat-Lösung (10%)	0.1g/ml AgNO <sub>3</sub> in H <sub>2</sub> O lösen
Formaldehyd-Lösung (37%)	37g/100ml Paraformaldehyd in H <sub>2</sub> O, durch Zusatz von einigen Tropfen konz. NaOH bei 50°C lösen, nach dem Abkühlen mit HCl auf pH 6.5-7.5 einstellen.
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Natriumcarbonat, 2%)	2g/100ml Natriumcarbonat in Wasser
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (Natriumthiosulfat, 10%)	10g/100ml Natriumthiosulfat in Wasser
Aceton (50%)	1:1 (v/v) Aceton in H <sub>2</sub> O
TCA (Trichloressigsäure, 50%)	50g/100ml Trichloressigsäure in Wasser

**3.8.10 Lösungen für Western blotting von Polyacrylamidgelen (semi dry-Verfahren)**

Puffer A (333ml)	50ml 2M Tris-HCl Stammlösung, pH10.0 66ml Methanol 217ml H <sub>2</sub> O
Puffer B (400ml)	4ml 2M Tris-HCl Stammlösung, pH10.0 80ml Methanol 316ml H <sub>2</sub> O
Puffer C (320ml)	4ml 2M Tris-HCl Stammlösung, pH10.0 316ml H <sub>2</sub> O

**3.8.11 Ponceau S-Färbelösung für membranfixierte Proteine**

10x Ponceau S-Färbelösung	1g Ponceau S 15g Trichloressigsäure 15g 5-Sulfosalicylsäure mit H <sub>2</sub> O auf 50ml auffüllen
---------------------------	--

**3.8.12 Stammlösungen für die Histologie**

Basisches Fuchsin (Färbelösung, 13%)	1.3g in 10ml Wasser lösen
Methylenblau (Färbelösung, 13%)	1.3g in 10ml Wasser lösen
DAPI Stammlösung	1mg/ml in H <sub>2</sub> O
Blockierungslösung (10% Milch-PBS)	1g/10ml Magermilchpulver in PBS lösen, aufkochen und nach dem Abkühlen wiederholt bei 14000rpm zentrifugieren. Es wird der klare, gelbliche Überstand verwendet.
PBS-gepuffertes Formalin (10%)	100g/l PFA (Paraformaldehyd) zu PBS-Puffer HCl geben, mit wenigen Tropfen konz. NaOH alkalisieren und PFA bei 50°C lösen, mit auf pH 6.5-7.5 einstellen.
Propidiumiodid Stammlösung	1mg/ml in H <sub>2</sub> O

## 4. METHODEN

Die Zusammensetzung der hier erwähnten Lösungen ist in Kapitel 3 beschrieben. Wenn nicht anders angegeben, werden die Behandlungen bei Raumtemperatur durchgeführt.

### 4.1 Molekularbiologische Methoden

#### 4.1.1 Herstellung hitzekompetenter Bakterien

Der gewünschte Bakterienstamm wird auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine einzelne Kolonie wird über Nacht in 5ml LB-Medium hochgezogen. Diese Vorkultur wird am nächsten Tag 1:100 in LB-Medium verdünnt und bis zu einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0.3 bis 0.6 weiter inkubiert. Anschließend wird die Bakterien-suspension im Eisbad auf 0°C abgekühlt. Alle nachfolgenden Bearbeitungsschritte erfolgen auf Eis, mit vorgekühlten Lösungen und Geräten. Die Zellen werden im GSA-Rotor (Sorvall-Kühlzentrifuge, Typ RC-5B) für 5min/4500rpm/4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird in 16ml TB1-Puffer suspendiert, 15min auf Eis inkubiert und erneut abzentrifugiert. Anschließend wird das Pellet in 4ml TB2-Puffer aufgenommen und als 200µl-Aliquots bei -80°C gelagert.

#### 4.1.2 Transformation von Bakterien nach der Hitzeschockmethode

Hitzekompetente Bakterienzellen (DH5α, JM109, Top10F') wurden hergestellt, wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben, oder käuflich erworben (Top10F', 50µl-Aliquots, Invitrogen; Epicurian, 100µl-Aliquots, Stratagene) und bei -80°C gelagert.

Die kompetenten Zellen werden 15min auf Eis aufgetaut. Anschließend wird die entsprechende Menge an 0.5M β-Mercaptoethanol (Top10F': 2.0µl/50µl, Epicurian: 2.4µl/100µl), sowie 1µl des Ligationsansatzes (etwa 50ng/µl) zugegeben. Die Suspension wird für 30min auf Eis inkubiert und anschließend für kurze Zeit einem 42°C-Hitzeschock ausgesetzt (Top10F': 30s, Epicurian: 45s), wodurch die Bakterienzellen die zugesetzte Plasmid-DNA aufnehmen. Nach der Hitzeschock-Behandlung wird die Bakteriensuspension für 2min auf Eis gestellt, anschließend werden 450µl LB-Medium zugegeben und für 60min/37°C im Schüttler bei 250rpm inkubiert. Je 10µl und 50µl des Transformationsansatzes werden auf Selektivmedium ausplattiert, wodurch sich für die Berechnung der Transformationseffizienz ein Verdünnungsfaktor ( $1/45$  bzw.  $1/9$ ) ergibt. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C werden die erhaltenen Kolonien gezählt und die Transformationseffizienz pro ng transformierter DNA berechnet:

$$\text{Transformationseffizienz} = \frac{\text{gezählte Kolonien} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{eingesetzte DNA in ng}}$$

Transformationseffizienzen von  $>1 \cdot 10^6$  Kolonien/ng eingesetzter DNA können mit diesem Protokoll erreicht werden.

### **4.1.3 Präparation von Nukleinsäuren**

#### **4.1.3.2 Präparation von Plasmid-DNA**

Bakterienkulturen wurden bei 37°C über Nacht in Selektivmedium inkubiert. Für Plasmidpräparationen in kleinerem Maßstab wurden 5ml einer Bakterienkultur angesetzt und die Plasmide nach He *et al.* (1989) oder mit dem Wizard *Plus* SV Miniprep Kit (Promega) isoliert. Größere Plasmidmengen werden aus 30ml bzw. 100ml Bakteriensuspension nach Herstellerangaben über Nucleobond AX100 bzw. AX500 (Macherey-Nagel) isoliert.

#### **4.1.3.3 Präparation von genomischer DNA**

Das Gewebe wird über Nacht in einer Proteinase K-Lösung (3% in TE) bei 37°C verdaut. Nach Phenolisierung und Ethanol-fällung (siehe Abschnitt 4.1.4) wird die Konzentration der DNA photometrisch bestimmt (siehe Abschnitt 4.1.5.1). Ein hohes Verhältnis der abgelesenen optischen Dichten (260nm zu 280nm) von  $>2.0$  deutet lediglich auf größere Mengen an RNA hin. Ein kleinerer Wert als 1.6 zeigt verunreinigende Proteine an. Eine wiederholte Extraktion durch Phenolisierung und Ethanol-fällung ist in diesem Fall notwendig.

#### **4.1.3.4 Präparation von RNA**

Das Arbeiten mit RNA erfordert große Sorgfalt, da RNA sehr leicht durch die sehr stabilen RNasen abgebaut wird. Durch Autoklavieren sind RNasen nicht zu zerstören. Lösungen (außer Tris haltigen Lösungen) werden daher mit 0.01% DEPC behandelt. Arbeitsflächen werden mit 10% SDS geputzt, Glasgefäße werden 2 Stunden bei 200°C gebacken. Alle anderen Geräte, ebenso wie die Mikro-Homogenisatorstempel (W. Ebel Laboreinrichtungen) werden mit RNaseZAP<sup>®</sup> oder mit RNAzol<sup>™</sup> B (Biozol Diagnostika) gespült und anschließend in 100% Ethanol aufbewahrt. Die Gewebe werden sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. 50µg Gewebe oder etwa 10 entnommene Linsen werden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit einem Mikro-Homogenisatorstempel in RNAzol<sup>™</sup> B homogenisiert. Die RNA wird nach Herstellerangaben isoliert.

#### **4.1.4 Reinigung von Nukleinsäuren**

##### **4.1.4.1 Phenol-Chloroform-Extraktion**

Ein Volumenanteil einer Mischung aus H<sub>2</sub>O-gesättigtem Phenol/Chloroform (1:1, v/v) wird mit einem Volumenanteil einer Plasmidpräparation bzw. restringiertem Plasmid versetzt und ausgeschüttelt (ca. 10s vortexen). Die Phasenseparation wird durch Zentrifugation (5min/14000rpm/RT) beschleunigt. Die obere wäßrige Phase wird unter Vermeidung der Interphase vorsichtig abpipettiert und anschließend einer Ethanol-fällung unterzogen.

##### **4.1.4.2 Ethanol-fällung**

Die DNA wird mit  $\frac{1}{10}$  Volumenanteil einer 3M Natriumacetat-Lösung und 2.5 Volumenanteilen eiskaltem Ethanol (-20°C) versetzt und für 30min bei -20°C präzipitiert. Die Lösung wird anschließend zentrifugiert (30min/14000rpm/4°C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wird mit eiskaltem Ethanol (-20°C) gewaschen, erneut zentrifugiert (5min/14000rpm/4°C) und nach Verwerfen des Überstandes in einem Vakuumkonzentrator getrocknet (10min/14000rpm/60°C). Anschließend wird das Pellet in einem geeigneten Volumen H<sub>2</sub>O oder TE-Puffer aufgenommen.

##### **4.1.4.3 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

DNA-Fragmente  $\geq 200$ bp werden aus einem mit Ethidiumbromid gefärbten Gel unter UV-Licht ausgeschnitten und mit dem GeneClean<sup>®</sup> Kit (Bio101) nach Herstellerangaben gereinigt. Unter den gewählten Pufferbedingungen (Hochsalz-Puffer) bindet die DNA an eine spezielle SiO<sub>2</sub>-Matrix (Glasmilch) und wird nach einem Waschschrift in H<sub>2</sub>O oder TE-Puffer eluiert. Sollen nach der Reinigung enzymatische Spaltungen der DNA durchgeführt werden, so ist die Elution in H<sub>2</sub>O vorteilhafter, da das in TE-Puffer enthaltene EDTA die Ionenkonzentration der verwendeten Restriktionspuffer durch Komplexbildung zweiwertiger Kationen verändert.

#### **4.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

##### **4.1.5.1 Photometrische Bestimmung**

Die DNA- oder RNA-Lösung wird auf eine geeignete Konzentration in H<sub>2</sub>O verdünnt (aus Plasmid-Präparationen meist 1:100) und die Extinktion dieser Lösung bei 260 und 280 nm mit einem Spektralphotometer bestimmt. Die Absorption bei 260nm sollte zwischen 0.2 und 0.5 liegen, da dies einem linear meßbaren Bereich entspricht. Die DNA-Konzentration der Lösung ergibt sich aus der optischen Dichte bei 260nm ( $OD_{260}$ ), die mit dem Verdünnungsfaktor und einer Konstanten multipliziert wird. Ein abgelesener Wert von 1  $OD_{260}$  entspricht einer DNA-Konzentration von 50ng/ $\mu$ l für doppelsträngige DNA (Plasmide), 33ng/ $\mu$ l für einzelsträngige DNA (Oligonukleotide), sowie 40ng/ $\mu$ l für RNA.

Die Reinheit der Nukleinsäure-Lösungen wird aus dem Quotienten von  $OD_{260}$  zu  $OD_{280}$  bestimmt. Das Verhältnis sollte zwischen 1.8 und 2.0 liegen, andernfalls ist die Präparation mit Proteinen oder Phenol (Interphase aus der Phenol-Chloroform-Extraktion) verunreinigt. Ein sehr hohes  $OD_{260}/OD_{280}$ -Verhältnis von über 2.5 weist auf viele kurzkettige Nukleinsäuren hin, die möglicherweise als Abbauprodukte durch RNasen entstanden sein können.

##### **4.1.5.2 Konzentrationsbestimmung auf Agarosegelen**

Für Konzentrationsbestimmungen kleiner DNA-Mengen werden Verdünnungen der entsprechenden DNA-Lösungen mit Referenzproben bekannter Konzentration auf Agarosegelen aufgetrennt. Nach Interkalation des Ethidiumbromids in die DNA kann durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten definierter Banden die Konzentration der DNA-Lösung abgeschätzt werden, da bei geringen Konzentrationen die Intensität proportional zur DNA-Menge ist.

#### **4.1.6 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren**

##### **4.1.6.1 Restriktionsverdau**

Die Restriktionsenzyme werden mit den vom Hersteller gelieferten Reaktionspuffern verwendet. Es werden dabei eine Unit Restriktionsenzym pro Mikrogramm DNA in einem Volumen von 20 $\mu$ l eingesetzt. Größere Volumina werden in Aliquots von 20 $\mu$ l verdaut, da die Effizienz der Reaktion mit steigendem Volumen abnimmt. Der Restriktionsverdau wird durch Zugabe von DNA-Laufpuffer gestoppt. Die Analyse der Reaktion erfolgt mittels Agarose-Gelelektrophorese.

#### 4.1.6.2 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgt über Nacht bei 4°C in 10µl Gesamtvolumen mit T4-DNA-Ligase im vom Hersteller mitgelieferten Puffer.

Für die Ligation von Restriktionsfragmenten mit geschnittenen Plasmid-Vektoren wird ein molares Verhältnis von Fragment-DNA/Plasmid-DNA von 5:1 verwendet. Im Allgemeinen werden 25 bis 50ng Vektor pro Ligation eingesetzt. Für die Ligation von PCR-Fragmenten in einen Plasmid-Vektor mit T-Überhängen (z.B. pCR<sup>®</sup> 2.1, Invitrogen) werden 1µl PCR-Produkt und 2µl des Vektors (50ng/µl) verwendet, woraus sich ein molares Verhältnis des PCR-Produktes zu Plasmid-Vektor von mindestens 3:1 ergibt.

Die Taq-Polymerase hängt aufgrund ihrer Terminalen Transferase-Aktivität ein einzelnes Nukleotid an die 3'-Enden des synthetisierten PCR-Produktes an, aufgrund der starken Bevorzugung der Polymerase für dATP ist es fast immer ein Adenin (Clark, 1988). Vektoren mit T-Überhängen eignen sich daher ideal zum direkten Klonieren von PCR-Produkten, die mit Taq-Polymerase synthetisiert wurden.

#### 4.1.6.3 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Plasmide werden mittels der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977) sequenziert, die Didesoxynukleotide (ddNTP's) verwendet. Dabei wird die doppelsträngige DNA denaturiert, ein geeignet gewähltes Oligonukleotid hybridisiert an die komplementäre Sequenz der Matrizen-DNA und nach Zugabe von dNTP-Mix, sowie Klenow-Fragment, wird ein neuer DNA-Strang synthetisiert. Im zugegebenen dNTP-Mix ist ein gewisser Anteil ddNTP's durch eine farbstoff-markierte Didesoxy-Variante ersetzt, denen die 3'-OH-Gruppe fehlt und daher bei ihrem Einbau in den neu synthetisierten Strang einen Kettenabbruch erzeugen. Statistisch entsteht somit ein Gemisch von DNA-Strängen, die sich in ihrer Länge nur um jeweils eine Base unterscheiden. Nach elektrophoretischer Auftrennung des Gemisches in einer Polymermatrix wird mittels Laser-Fluoreszenz die Farbe des eingebauten Didesoxynukleotids und somit die Base an der Kettenabbruchstelle bestimmt. Die Sequenzierungen wurden mit Hilfe eines ABI Prism 310 Sequenzierautomaten (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt.

#### 4.1.6.4 *Erststrang-Synthese von cDNA*

Zur Erststrangsynthese wird die SuperScript II<sup>TM</sup> reverse Transkriptase (Gibco BRL) eingesetzt. Nach Zugabe eines Startoligonukleotids synthetisiert die reverse Transkriptase einen neuen DNA-Strang entlang der mRNA, welche als Matrize dient. Für die RT-Reaktion werden folgende Lösungen zusammengegeben:

Zu einem Volumen von 5.0µl einer 0.1µg/µl-Verdünnung der RNA-Matrize werden 0.5µl (dT)<sub>16</sub> Oligimer (50µM, Perkin Elmer) zugegeben und der Ansatz in einem PCR-Thermoblock für 5min bei 70°C denaturiert und danach für 5min auf 4°C abgekühlt. Für den Reaktions-Mix werden 21.4µl H<sub>2</sub>O, 8µl SuperScript II<sup>TM</sup> First Strand Buffer, 4µl dNTP-Mix (je 250µM), 4µl DTT (100mM) und 0.2µl reverse Transkriptase gemischt. In einem neuen Reaktionsgefäß werden 18.8µl Reaktions-Mix und 2.2µl denaturierte Matrizen-RNA vereinigt und in einem Thermocycler nach folgendem Programm inkubiert: 5min/42°C, 50min/50°C, 15min/70°C. Anschließend wird der cDNA-Ansatz auf 4°C abgekühlt und sofort verwendet oder in Aliquots bei -20°C oder -80°C gelagert. Üblicherweise werden 1µl einer 1:10-Verdünnung der hergestellten cDNA (10ng) für eine PCR-Reaktion verwendet.

#### 4.1.6.5 *Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*

Die PCR ist eine *in vitro*-Methode zur enzymatischen Synthese spezifischer DNA-Sequenzen. Ausgangsmaterial ist ein doppelsträngiges DNA-Molekül, welches durch Erhitzen des Reaktionsgemisches auf 95°C denaturiert wird. An die entstehenden komplementären Einzelstränge hybridisieren zwei Oligonukleotid-Primer, die die zu amplifizierende Region flankieren. Mittels einer thermostabilen Polymerase werden, ausgehend von den jeweiligen Oligonukleotid-Sequenzen, die komplementären DNA-Stränge synthetisiert. Aufgrund der zyklischen Durchführung der beschriebenen Reaktionsschritte (Denaturierung, Hybridisierung der Oligonukleotide, Synthese des neuen DNA-Stranges) erreicht die PCR-Methode eine exponentielle Amplifikation der eingesetzten Matrizen-DNA.

Die PCR-Reaktionen werden in einer GeneAMP PCR System 9600 bzw. 2400 Maschine (Perkin-Elmer) durchgeführt. Für eine PCR-Reaktion mit einem Gesamtvolumen von 50µl werden üblicherweise 1ng von rekombinanter Plasmid-DNA, bzw. 10ng von genomischer DNA oder cDNA eingesetzt. Die Reaktionsmischung enthält dabei: 29.8µl H<sub>2</sub>O, 5µl dNTP-Mix (je 2.5mM), 5µl 10x PCR-Puffer, 5µl MgCl<sub>2</sub> (50mM Stammlösung), 4µl Primer-Mix (je 50ng/µl) und 0.2µl Taq-Polymerase (Perkin Elmer *Ampli-Taq*<sup>TM</sup>, 5U/µl).

Normalerweise werden folgende Reaktionsbedingungen gewählt:

	Temperatur	Zeit	
	94°C	5 bis 10 min	Denaturierung
21 bis 42 Zyklen	94°C	0.5 bis 1 min	Denaturierung
	45°C bis 62°C	0.5 bis 2 min	Primer-Hybridisierung
	72°C	0.5 bis 2 min	Elongation
	72°C	10min	Elongation

Die optimale Primer-Hybridisierungstemperatur wird für jedes Primerpaar experimentell ermittelt. Einen Anhaltspunkt zur Schmelztemperatur liefert ihre Berechnung nach folgender Formel:  $T_m = 4 \cdot (G+C) + 2 \cdot (A+T)$ . Hier werden jedoch keine Positionseffekte berücksichtigt, die ebenfalls Einfluß auf die Hybridisierungstemperatur haben. Für deren Abschätzung wird daher das Programm OligoTech<sup>TM</sup> (Oligo Therapeutics Inc., Virginia, USA) benutzt.

#### 4.1.6.6 Kolonie-PCR zur Identifizierung rekombinanter Plasmide

Mit dieser Methode werden nach der Transformation von rekombinanten Plasmiden die erhaltenen Bakterienkulturen daraufhin untersucht, ob sie das gewünschte Insert enthalten. Diese PCR-Reaktion wird in 10µl Gesamtvolumen pro zu untersuchender Bakterienkolonie durchgeführt. Der Reaktions-Mix enthält dabei 5.96µl H<sub>2</sub>O, 1µl 10x PCR-Puffer, 1µl MgCl<sub>2</sub> Stammlösung (50mM), 1µl dNTP's (je 2.5mM), 1.0µl Primer-Mix (je 50ng/µl) und 0.04µl Taq-Polymerase (Perkin Elmer, 5U/µl). Es werden vektorspezifische Primer gewählt, wie T7 und M13. Im Reaktionsansatz ist noch keine Matrizen-DNA enthalten.

Eine einzelne Bakterienkultur wird mit einem sterilen Zahnstocher von der Agar-Platte abgenommen und in den auf Eis gekühlten Reaktions-Mix überführt. Für die Amplifikation wird folgendes Reaktionsprofil verwendet:

	Temperatur	Zeit	
	94°C	9:00 min	Zellaufschluß/Denaturierung
23 Zyklen	94°C	0:30 min	Denaturierung
	45°C bis 62°C	0:30 min	Primer-Hybridisierung
	72°C	0:30 min	Elongation

Je Reaktion werden nun 1.6µl 6x Ethidiumbromid-DNA-Ladepuffer zugegeben. Das gesamte Volumen wird auf einem 2%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (5V/cm, 15min). Die amplifizierten DNA-Fragmente können sofort im UV-Licht betrachtet werden.

#### **4.1.7 Gelelektrophoretische Techniken**

##### **4.1.7.1 Agarosegelelektrophorese von DNA**

Nukleotidfragmente werden in 0.8 bis 4 %-igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Im elektrischen Feld ist die Wanderungsgeschwindigkeit der negativ geladenen DNA proportional zum Logarithmus ihres Molekülgewichts bzw. ihrer Größe. Als Laufpuffer wird 1x TBE verwendet. Im Regelfall erfolgt die Auftrennung der DNA-Fragmente für 30 bis 45 min bei 130V. Wird als Ladepuffer die Ethidiumbromid-Variante gewählt, so können die aufgetrennten Fragmente jederzeit im UV-Licht (366nm) analysiert werden, andernfalls muß das Gel nach der Elektrophorese in einer Ethidiumbromidlösung (2µg/ml) gefärbt werden. Die Nachweisgrenze für distinkte Banden liegt bei etwa 20ng. Die gleichzeitige Auftrennung eines Molekulargewichtsstandards erlaubt die Zuordnung der Fragmentgrößen und -Mengen.

##### **4.1.7.2 Denaturierende Agarosegelelektrophorese von RNA**

Die denaturierende Auftrennung von RNA erfolgt in einem 1%-igen Agarosegel in 1x MOPS Puffer, dem 0.74% Formaldehyd zugesetzt werden. Als Laufpuffer werden 0.74% Formaldehyd in 1x MOPS-Puffer verwendet. Die Elektrophoresekammer wird vor der Verwendung mit RNaseZAP<sup>®</sup> oder 6%-igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gereinigt. 20µg Gesamt-RNA werden mit <sup>1</sup>/<sub>5</sub> Volumen RNA-Probenpuffer versetzt, für 3min bei 65°C denaturiert, 3min auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt für 40min bei 80V. Nach dem Lauf wird die Integrität der RNA anhand der 28S rRNA und der 18S rRNA Bande überprüft.

#### **4.1.8 Differentielle Genexpressionsanalyse (Differential Display)**

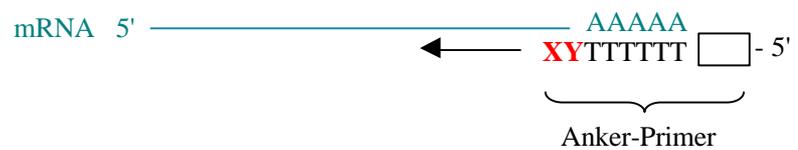
Die differentielle Genexpressionsanalyse ist eine Methode zur Klonierung von Genen eines Zelltyps oder Gewebes, deren Expression im Vergleich zu wildtypischen oder nichtinduzierten Zellen verändert ist. Nach der Präparation der mRNA aus beiden Zellpopulationen (Abschnitt 4.1.3.4) werden jeweils gleiche Konzentrationen eingestellt (je 1.0 µg/µl). Die cDNA-Synthese wird mit jeweils 2µl einer 1:10-Verdünnung dieser mRNA-Präparation durchgeführt (Abschnitt 4.1.6.4), jedoch unter Verwendung eines speziellen, als "*Anker-Primer*" bezeichneten (dT)<sub>16</sub>-Oligomers:

Analog zur Polymerasekettenreaktion ist eine starke Bindung der 3'-gelegenen Nukleotide an die Nukleinsäure-Matrize essentiell für eine erfolgreiche enzymatische DNA-Synthese. An seinem 3'-Ende trägt der *Anker-Primer* ein Nukleotid-Dublett (siehe Abbildung 4.1). Aus der gesamten vorhandenen mRNA werden somit vorwiegend die zum Dublett komplementären

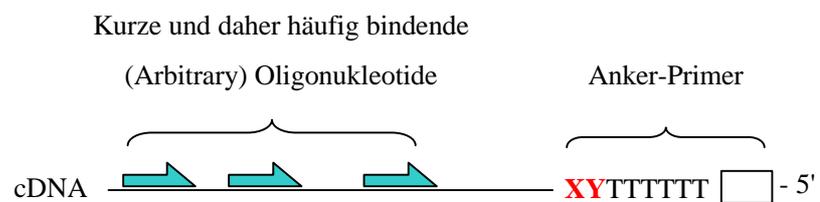
Sequenzen in cDNA umgeschrieben. Durch diese Beschränkung auf eine mRNA-Subpopulation wird die spätere Auswahl unterschiedlich regulierter PCR-Produkte erleichtert.

Insgesamt stehen zwölf *Anker-Primer* zur Verfügung (Abschnitt 7.1); diese werden durch Permutation innerhalb des 3'-Nukleotid-Dubletts erhalten. An seinem 5'-Ende besitzt der *Anker-Primer* eine verkürzte T7-Sequenz. Hingegen weisen die kurzen und daher relativ häufig an verschiedene Positionen der cDNA-Matrize bindenden *Arbitrary-Primer* eine verkürzte M13-Bindestelle auf. Beide Sequenzen (T7 und M13) ermöglichen die spätere Reamplifikation der ausgeschnittenen PCR-Produkte (siehe Abbildung 4.1).

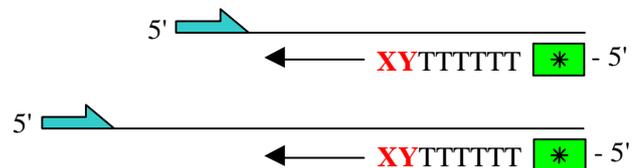
- (1) Erststrangsynthese.  
mRNA-Sequenzen mit einem zu 'XY' komplementären Nukleotid-Dublett stromaufwärts der poly-A-Sequenz werden in cDNA umgeschrieben.



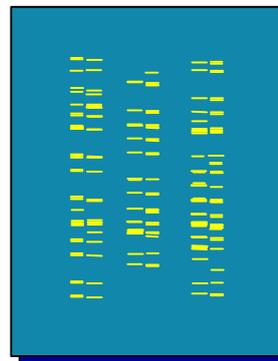
- (2) Hybridisierung der Arbitrary-Oligonukleotide an die cDNA-Matrize, Gegenstrangsynthese.



- (3) Amplifikation der cDNA-Matrize durch exponentielle PCR, Verwendung von radioaktiv- oder fluoreszenzmarkierten Anker-Primern.



- (4) Auftrennung der PCR-Produkte im Polyacrylamidgel.
- (5) Ausschneiden und Reamplifikation der PCR-Produkte.



**Abb. 4.1:** Ablaufschema der Differentiellen Genexpressionsanalyse.

- (1) Erststrangsynthese mit einem Anker-Primer, die sich durch Variation der 'XY'-Sequenz stromabwärts der Poly-T-Sequenz unterscheiden: Für die Position 'Y' der Anker-Primer ist ein Thyminid ausgeschlossen, die Position 'X' kann jedoch aus allen vier Basen gebildet werden.
- (2-3) Gegenstrangsynthese und exponentielle PCR nach Zugabe des Arbitrary-Primers und einer geeignet markierten Version des zur Erststrangsynthese verwendeten Anker-Primers.
- (4-5) Auftrennung der PCR-Produkte im Polyacrylamidgel und Reamplifikation der PCR-Produkte.

Die Schritte 2 und 3 der differentiellen Genexpressionsanalyse (Abbildung 4.1) werden mit jeweils den gleichen Primern für Wildtyp und Mutante in einer Doppelbestimmung durchgeführt (je 1.0µl des cDNA-Ansatzes als DNA-Matrize), anschließend erfolgt die Auftrennung durch Polyacrylamidgelelektrophorese (Schritt 4). Unterschiedlich regulierte Banden werden aus dem Gel ausgeschnitten und in einer erneuten PCR-Reaktion unter Verwendung von T7-/M13-Primern reamplifiziert (Schritt 5):

	Temperatur	Zeit		
	92°C	2 min	Denaturierung	
4 Zyklen	{	92°C	0.5 min	Denaturierung
		50°C	1 min	Primer-Hybridisierung, Ergänzung der unvollständigen T7-/M13-Sequenz
		72°C	2 min	Elongation
		92°C	0.5 min	Denaturierung
30 Zyklen	{	60°C	1 min	Primer-Hybridisierung
		72°C	2 min	Elongation
		72°C	10min	Elongation

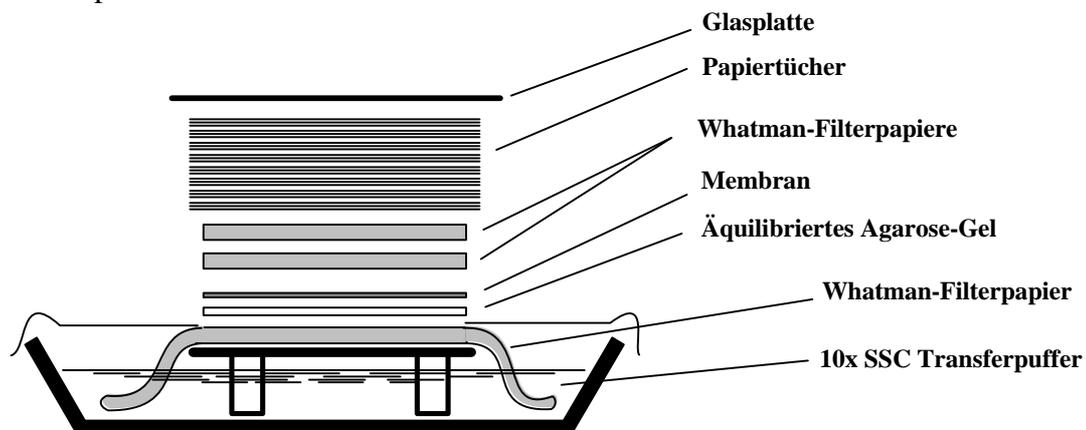
Die so erhaltenen PCR-Produkte haben aufgrund der vorangegangenen elektrophoretischen Auftrennung im Polyacrylamidgel die gleiche Länge, können jedoch unterschiedliche Sequenzen enthalten. Das Sequenzgemisch wird nachfolgend in Plasmidvektoren ligiert und durch Transformation vereinzelt. Nach geeigneten Screening- und Präparationsmethoden von Plasmid-DNA (Abschnitte 4.1.6.6 und 4.1.3.2) aus Bakterienzellen werden die erhaltenen Plasmide sequenziert.

#### 4.1.9 Übertragung von DNA auf Nylonmembranen (Southern blot)

Für die Hybridisierung werden zwischen 10 und 12µg genomischer DNA benötigt. Nach Zugabe von Spermidin (1µl einer 0.1M Lösung) wird die DNA über Nacht in einem Gesamtvolumen von 40 bis 50µl durch geeignete Restriktionsenzyme verdaut. Das Spermidin hilft hierbei, Sekundärstrukturen aufzulösen. Das Restriktionsenzym wird im Überschuß eingesetzt (40U), um sicherzustellen, daß die DNA vollständig restringiert wird. Die DNA-Fragmente werden durch Gelelektrophorese aufgetrennt (0.8% TAE-Agarose) und in einem Ethidiumbromid-Bad angefärbt. Für die Dokumentation wird das angefärbte Gel neben einem Lineal fotografiert, um die Positionen der Marker-DNA festzuhalten. Anschließend wird das Gel im Depurinations-Puffer (~7% HCl) inkubiert, bis die Farbe des im DNA-Ladepuffers enthaltenen Bromphenolblau-Indikators von blau nach gelb umgeschlagen hat. Das Gel wird kurz in

entionisiertem Wasser gespült. Durch Behandlung mit dem alkalischen Denaturierungs-Puffer wird die aufgetrennte DNA an Purinen gespalten und somit der Transfer der hochmolekularen Fragmente (>10 bis 15kb) erleichtert. Nachdem der Bromphenolblau-Indikator wieder die ursprüngliche blaue Farbe angenommen hat, ist diese Reaktion beendet und das Gel wird für eine halbe Stunde unter zweimaligem Wechsel im Transferpuffer (10x SSC) äquilibriert.

Die positiv geladene Transfermembran (Quiabrane Nylon Plus, Quiagen) wird exakt auf Gelgröße zugeschnitten und in entionisiertem Wasser benetzt. Anschließend wird die Membran im Transferpuffer bis zur Verwendung aufbewahrt. Für den Transfer wird nun folgender Stapel errichtet:



Der Transfer erfolgt über Nacht. Anschließend wird der Stapel zerlegt und die Membran unter fließendem Wasser kurz gewaschen, um Reste des Agarosegels zu entfernen und die Membran zu entsalzen. Überschüssiges Salz würde nachfolgend zu einer unspezifischeren Hybridisierung führen. Durch Bestrahlung mit UV-Licht wird die auf der Membran elektrostatisch haftende DNA kovalent gebunden (Stratalinker, Stratagene). Die Membran wird zwischen zwei Whatman-Filterpapieren in trockenem Zustand bei Raumtemperatur gelagert.

#### **4.1.10 Generierung und radioaktive Markierung (random priming) der DNA-Probe**

Die entsprechende Probe wird durch PCR-Amplifikation erhalten. Eine Verunreinigung der Probe mit Matrizen-DNA ist unbedingt zu vermeiden. Das PCR-Produkt wird durch Agarosegelelektrophorese von der Matrizen-DNA getrennt und aus dem Gel ausgeschnitten. Die Reinigung der Probe aus dem Gel erfolgt durch Bindung der DNA an eine Glasmatrix (siehe Abschnitt 4.1.4.3).

Für die radioaktive Markierung der gereinigten und denaturierten Probe mit  $^{32}\text{P}$  wird die Methode des *random primings* eingesetzt (Feinberg *et al.*, 1983; Feinberg *et al.*, 1984). Hierbei läßt man ein Gemisch von Hexanukleotiden an DNA-Einzelstränge hybridisieren und

verlängert diese Stücke anschließend bei 37°C unter Einwirkung des großen Teilstückes der DNA-Polymerase I aus *E. coli* (Klenow Enzym). Für dieses Verfahren wurde der Megaprime™ DNA Labeling Kit (Amersham-Buchler, Heidelberg) verwendet. Die Abtrennung der nicht eingebauten <sup>32</sup>P-radioaktiv markierten Nukleotide erfolgt durch Gelfiltrations-Chromatographie an Mikrospin™ S-300 HR-Säulen (Pharmacia, Freiburg). Es werden etwa 70µl radioaktiv markierte Probe erhalten. Ihre Aktivität wird im Szintillationszähler bestimmt (Cerenkov-Messung der <sup>32</sup>P-β-Strahlung, 0-1000keV; Easicount 4000, Scotlab, UK).

#### **4.1.11 Hybridisierung membrangebundener DNA mit radioaktiv markierten Proben**

Zur Abdeckung unspezifischer Bindestellen wird die Nylonmembran an die Glaswand der Inkubationsflaschen angelegt und mit 10-20ml Prähybridisierungslösung im Drehinkubator bei 65°C für etwa eine Stunde inkubiert. Die eigentliche Hybridisierung erfolgt ebenfalls in der Prähybridisierungslösung, der die <sup>32</sup>P-radioaktiv markierte Probe zugegeben wurde. Die Probe wird hierfür geeignet verdünnt und die Inkubation erfolgt bei 65°C über Nacht. Es sollten nach Möglichkeit nicht weniger als  $3 \cdot 10^7$  cpm/ml Hybridisierungslösung verwendet werden (Sambrook *et al.*, 1989).

Am nächsten Tag wird die Probe dekantiert und die Membran einer Reihe von Waschschritten (je 15min/65°C) mit steigender Stringenz unterzogen (5x SSC, 0.1% SDS; 2x SSC, 0.1% SDS und 0.1x SSC, 0.1% SDS). Nach dem letzten Waschschriff ist die abgegossene Lösung normalerweise nicht mehr radioaktiv. Andernfalls muß die Waschprozedur bei gleichbleibend hoher Stringenz (65°C in 0.1x SSC, 0.1% SDS) solange wiederholt werden, bis keine Restaktivität mehr gemessen werden kann.

Die Membranen werden in Klarsichtfolie eingeschweißt und einem Röntgenfilm (XAR-5, Eastman Kodak Company, New York, USA) über Nacht bei -70°C exponiert. Zur Verstärkung des Signals dienen zwei Folien aus CaWO<sub>4</sub> (Laskey 1980).

## 4.2 Proteinbiochemische Methoden

### 4.2.1 Herstellung von Proteinextrakten aus entnommenen Linsen

Je 15-20 Linsen werden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß nach Zugabe von 250µl LE-Puffer mit einem Mikro-Homogenisatorstempel (W. Ebel Laboreinrichtungen) homogenisiert. Unlösliche Bestandteile des Extrakts werden sedimentiert (15min/14000rpm). Der Überstand enthält die wasserlösliche Fraktion mit einem Proteingehalt von 40-60µg/µl und wird als Linsenextrakt (LE) bezeichnet. Das Pellet wird in 150µl Harnstoffpuffer durch Vortexen aufgenommen und für 30min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (15min/14000rpm) wird der Überstand als harnstofflösliche Fraktion abgenommen. Die Extrakte werden nach Zugabe von 2x Laemmli-Puffer für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese verwendet.

### 4.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung erfolgt nach einer modifizierten Methode von Lowry mit dem BioRad D<sub>C</sub> Protein Assay Kit (Komponenten 'A', 'S' und 'B') durch Messung der Extinktion bei 750nm. Von allen Proben, sowie den hergestellten Proteinstandards, wird eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Färbelösung 'AS' wird durch Zusammengeben von 500µl Reagenz 'A' und 10µl Reagenz 'S' erhalten. In einer Mikrotiterplatte werden 160µl Lösung 'B' mit 20µl Färbelösung 'AS', sowie 4.0µl unbekannter Probe vereinigt. Nach etwa 15min Inkubation bei Raumtemperatur ist die Farbreaktion abgeschlossen, die transparente Lösung färbt sich intensiv blau, abhängig von ihrer Proteinkonzentration.

Die Referenzlösungen werden im gleichen Puffer wie die unbekanntenen Proben angesetzt. Eine 20µg/µl BSA-Einwaage wird in den Verhältnissen 1:20, 1:10 und 1:4 verdünnt, woraus sich Stammlösungen mit je 1µg/µl, 2µg/µl und 5µg/µl ergeben. Proteingehalte von 0-20µg in je 4µl Gesamtvolumen werden anschließend nach folgendem Schema erhalten:

Referenzproben (µg Protein in 4µl Gesamtvolumen)							
	0	2	5	7	10	15	20
Puffer	4µl	2µl	1.5µl	0.5µl	2µl	1µl	-
Stammlösung 1µg/µl	-	2µl	-	-	-	-	-
Stammlösung 2µg/µl	-	-	2.5µl	3.5µl	-	-	-
Stammlösung 5µg/µl	-	-	-	-	2µl	3µl	4µl

Im Konzentrationsbereich von 0-25µg/µl ist die gemessene Extinktion bei 750nm proportional zur Proteinkonzentration. Im Probenaufschlußpuffer enthaltene Reagenzien wie DTT und PMSF beeinflussen die Steigung der Eichgeraden zum Teil erheblich, haben jedoch keinen Einfluß auf den linearen Konzentrationsbereich dieser Proteinbestimmungsmethode.

### 4.2.3 Denaturierende SDS-Gelelektrophorese

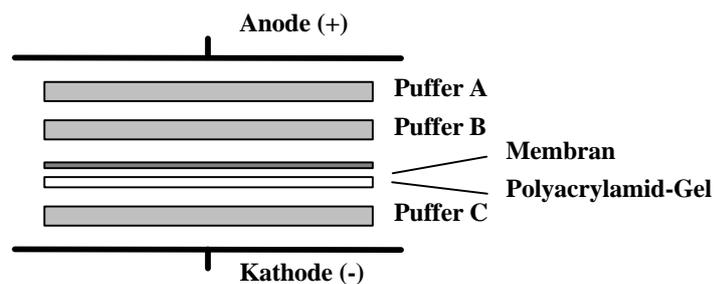
Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht im Polyacrylamidgel erfolgt nach einer modifizierten, ursprünglich von Laemmli (1970) beschriebenen Methode. Denaturierende Bedingungen werden hier durch den Zusatz von SDS herbeigeführt. Als Trennmedium können mit dieser Methode 7.5% bis 12%-ige Acrylamidgele verwendet werden, die nach folgendem Schema hergestellt werden (12ml Gesamtvolumen):

	Trenngele			Sammelgel
	7.5%	10%	12%	4%
H <sub>2</sub> O	3ml	2.31ml	1.68ml	5.75ml
Gelpuffer I	3.6ml	3.6ml	3.6ml	1ml
Glycerol (50%)	3ml	3ml	3ml	-
Acrylamid (40%, 29:1)	2.25ml	3ml	1.8ml	750µl
TEMED	25µl	25µl	25µl	10µl
APS (10%)	80µl	80µl	80µl	50µl

Je 5.5ml Trenngel-Lösung werden zwischen die mit Silikonstreifen abgedichteten Glasplatten der verwendeten Biometra Gelkammer gegossen, mit H<sub>2</sub>O überschichtet und etwa 20min polymerisiert. Der Zusatz von Glycerol im Trenngel führt zu einer schärferen Grenze zum Sammelgel, welches nach Abgießen des Wassers eingefüllt wird. In die noch flüssige Phase wird ein Kamm eingesetzt, um die Taschen für die Proben zu formen. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels werden die Silikondichtungen entfernt, das Gel in die Elektrophoreseapparatur gestellt und die jeweiligen Elektrodenpuffer aufgefüllt. Der Kathodenpuffer steht mit dem Sammelgel in Verbindung und muß innen eingefüllt werden. Die Proben werden mit gleichen Volumina des 2x Laemmli-Auftragspuffers versetzt und kurz aufgekocht, bevor sie in die Taschen des Sammelgels pipettiert werden. Je Spur können bis zu 25µl Probenvolumen aufgetragen werden. Als Proteinmarker werden der ungefärbte Dalton Mark VII-L SDS-Molekulargewichtsstandard (Sigma, #MW-SDS-70L) oder der vorgefärbte SDS-Proteinstandard (Fluka, #69813) verwendet. Die Elektrophorese wird bei einer konstanten Spannung von 60V durchgeführt, bis der Serva-Blue-Farbstoff aus dem Probenpuffer das Gel verlassen hat. Im Verlauf der Trennung steigt die Stromstärke von 20mA auf etwa 70mA an.

#### 4.2.4 Transfer von Proteinen auf PVDF- oder Nitrozellulosemembranen (Western blot)

Nach erfolgter Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel werden die Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Membran übertragen (geblottet), um immunologische Nachweisreaktionen durchzuführen. Der Transfer wird zwischen zwei Graphit-Elektroden im semi-dry-Verfahren bei einer konstanten Stromstärke von  $\leq 1.2\text{mA/cm}^2$  durchgeführt. Hierfür werden drei dicke Whatman-Filterpapiere (GB004, Schleicher & Schuell) auf Gelgröße zugeschnitten und in die jeweiligen Blotting-Puffer A, B und C eingelegt. Die Membran (PVDF oder Nitrozellulose) wird ebenfalls auf Gelgröße zugeschnitten, kurz in 60% Methanol getaucht und für 10min in Puffer C inkubiert. Die Membran wird dabei unter das Whatman-Filterpapier gelegt, um ein Trockenfallen zu verhindern. Das Polyacrylamidgel wird mit destilliertem Wasser gespült und für 15min in Puffer B (unter dem Filterpapier) inkubiert. Für den Transfer wird folgender Stapel luftblasenfrei auf der unteren Graphit-Elektrode errichtet, die als Kathode dient:



Nach 45min bis einer Stunde Transferzeit bei einer konstanten Stromstärke von 60mA ( $1.2\text{mA/cm}^2$ ) wird dessen Vollständigkeit durch Silberfärbung des Polyacrylamidgels überprüft. Allerdings werden Proteine mit einem Molekulargewicht von über 80kDa nur schlecht auf die Membran übertragen. In solchen Fällen wurde der Transfer für 2.5 Stunden bei 37.5mA ( $0.75\text{mA/cm}^2$ ) durchgeführt. Die geringere Wärmeentwicklung ermöglicht so die Verlängerung der Transferzeit, ohne daß die Membran durch Austrocknen unbrauchbar würde. Ebenso können mehrere Lagen Filterpapier verwendet werden, um die zur Verfügung stehende Puffermenge zu erhöhen. Nach dem Transfer wird die Membran mit Wasser gespült und bis zur Verwendung bei 4°C in feuchtem Zustand gelagert.

## 4.2.5 Nachweisreaktionen für Proteine

### 4.2.5.1 Coomassie-Färbung und Trocknung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Färbung der Acrylamid-Gele erfolgt mit Coomassie Brilliant Blue, welches Proteine reversibel und empfindlich anfärbt. Die Protein-Gele werden 10min in der Färbelösung gekocht, mit Wasser gespült und für 30min in die Entfärbelösung gelegt. Anschließend werden die Gele mit Wasser gespült und getrocknet. Hierzu werden die Gele zwischen zwei Lagen Einweckfolie gelegt und auf Whatman-Papier im Vakuum getrocknet (3h/55°C).

### 4.2.5.2 Silberfärbung von SDS-Acrylamidgelen

Ein fast zwei Größenordnungen empfindlicherer Nachweis von Proteinen ist durch die Silberfärbung möglich. Hier wird das Protokoll von Nesterenko *et al.* (1994) verwendet. Für alle Lösungen und Waschschrte ist MilliQ<sup>TM</sup>-Wasser zu verwenden, da normales entionisiertes Wasser zu viele Chloridionen enthält, die durch Silbernitrat ausgefällt werden und schließlich als weißer Niederschlag auf dem Gel zu sehen sind.

Fixieren	20ml 50% Aceton 300µl 50% Trichloressigsäure (TCA) 8.3µl 37% Formalin 5min schütteln
Waschen	3x spülen mit Wasser 5min schütteln mit Wasser 3x spülen mit Wasser
Vorbehandeln	20ml 50% Aceton 5min schütteln  20ml Wasser 33µl 10% Natriumthiosulfat 1min schütteln 3x spülen mit Wasser
Imprägnieren	20ml Wasser 260µl 20% Silbernitrat 200µl 37% Formalin 8min schütteln 3x spülen mit Wasser

---

Entwickeln	20ml 2% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 8.3µl 37% Formalin 8.3µl 10% Natriumthiosulfat kurz schwenken, bis Färbung gerade sichtbar
Stoppen	200µl Eisessig 20ml Wasser 20s schütteln 3x spülen mit Wasser

Das Gel kann nach der Färbung sofort getrocknet werden.

#### **4.2.5.3 Ponceau S-Färbung membranfixierter Proteine**

Die Ponceau S-Färbung geblotteter Proteine ist eine transiente Färbereaktion, die sich jedoch auf die Verwendung von Nitrozellulose-Membranen beschränkt. Immunologische Nachweisreaktionen werden hierbei nicht beeinträchtigt, da sich der rote Farbstoff wieder vollständig entfernen läßt. PVDF-Membranen hingegen zeigen eine permanente Färbung und sind daher für diese Färbereaktion nicht verwendbar. Die Ponceau S-Stammlösung wird mit Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt und die Membran für etwa 5min inkubiert. Anschließend wird die durchgehend rot gefärbte Membran unter fließendem Wasser ab gespült, bis Proteinbanden sichtbar werden. Vor immunologischen Nachweisreaktionen wird die Membran für 15min in Wasser eingelegt, um den Farbstoff wieder vollständig zu entfernen.

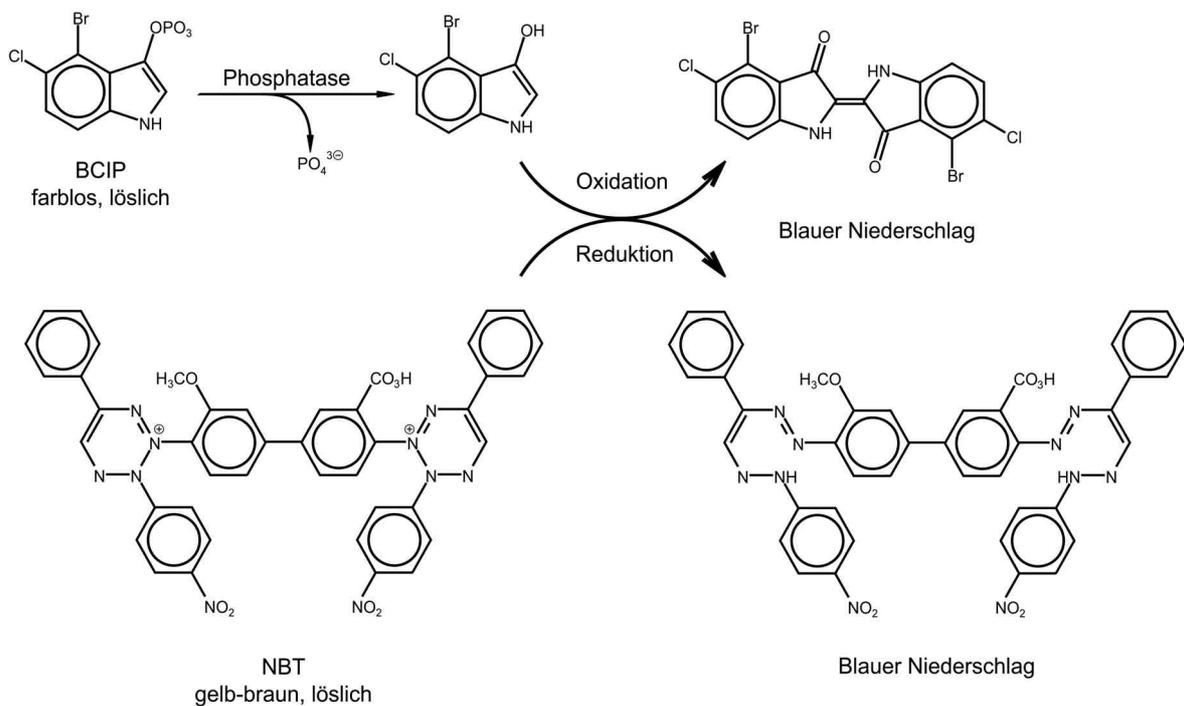
#### **4.2.5.4 Immunologische Nachweisreaktion auf Membranen**

Nach dem Transfer wird die Membran mit Wasser gespült und für mindestens eine halbe Stunde in der vorbereiteten Blockierungslösung (10% Magermilchpulver in PBS) inkubiert. Alle Inkubationen erfolgen im Regelfall bei Raumtemperatur und unter ständigem Schütteln auf einem Eppendorf Thermoschüttler. Überschüssiges Blockierungsreagenz wird unter fließendem Wasser ab gespült und die Membran dreimal für je 10min in Wasser oder PBS gewaschen. Der primäre Antikörper wird geeignet in PBS verdünnt (meist 1:1000 bis 1:5000). Die Zugabe einiger Körnchen Natriumazid verhindert das Wachstum von Mikroorganismen und ermöglicht die wiederholte Verwendung der primären Antikörperlösung. Die Membran wird für eine Stunde mit dem primären Antikörper inkubiert, alternativ kann dieser Schritt auch über Nacht bei 4°C erfolgen. Anschließend wird die Membran unter fließendem Wasser gespült, dreimal je 10min in Wasser oder PBS gewaschen und eine Stunde mit dem 1:5000 bis 1:10000 in PBS verdünnten, enzymgekoppelten sekundären Antikörper inkubiert. Danach

wird die Membran wieder unter fließendem Wasser gespült und mindestens dreimal je 10min mit Wasser oder PBS gewaschen. Zur Detektion werden vorzugsweise chemolumineszente Verfahren eingesetzt, da diese in der Regel um ein Vielfaches empfindlicher sind als konventionelle Färbereaktionen, die auf der Präzipitation eines Farbstoffs beruhen.

#### Nachweisreaktion für AP-gekoppelte sekundäre Antikörper

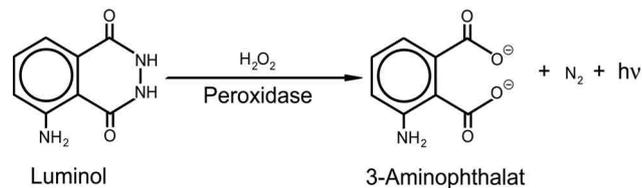
Die Aktivität einer an den sekundären Antikörper gekoppelten alkalischen Phosphatase (AP) wird durch oxidative Umsetzung von BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indoylphosphat) nachgewiesen, wodurch sich nach Abspaltung des Phosphatrestes und Dimerisierung ein blau gefärbtes Präzipitat (Indigo-Derivat) bildet. Als Farbverstärker wirkt NBT (Nitroblau-tetrazoliumchlorid), welches sich an der Redoxreaktion beteiligt und ebenfalls blau präzipitiert. In Abbildung 4.2 ist diese Farbreaktion schematisch dargestellt.



**Abb. 4.2:** Farbreaktion zur Detektion alkalischer Phosphatase

### Nachweis von HRP-gekoppelten sekundären Antikörpern durch Chemolumineszenz

Die Aktivität der an sekundäre Antikörper gekoppelten Meerrettich Peroxidase (HRP) wird durch chemolumineszente Verfahren nachgewiesen. Zugegebenes Wasserstoffperoxid wird hierbei enzymatisch gespalten, die nachfolgende Luminolreaktion führt zur Lichtemission im gelb-grünen Spektralbereich (Abbildung 4.3).



**Abb. 4.3:** Enzymatische Chemolumineszenzreaktion durch Meerrettich Peroxidase

## 4.3 Histologische Methoden

Die Grundlagen der hier beschriebenen Methoden sind in 'Mikroskopische Technik' von Romeis (1989) beschrieben.

### 4.3.1 Fixierung und Einbettung von Präparaten für histologische Übersichtsfärbungen

Gewebepräparationen für histologische Übersichtsfärbungen werden in Carnoy's Fixanz (Ethanol : Chloroform : Eisessig) = (6 : 3 : 1) über Nacht fixiert. Das Fixanz muß jedesmal vor Gebrauch neu hergestellt werden. Die fixierten Gewebe werden in 100%-igem Ethanol gewaschen und in katalysiertem Einbetttharz (JB-4-Kunststoff mit 0.9% Vernetzer) für etwa zwei Tage durchtränkt. In dieser Zeit hat der flüssige Kunststoff das gesamte Organ komplett durchdrungen. Anschließend werden die Präparate in Einbettförmchen überführt und mit polymerisierendem Harz überschichtet (JB-4-Kunststoff, 0.9% Vernetzer, 4% Radikalstarter). Die Polymerisation wird auf Eis durchgeführt und ist nach etwa einer Stunde abgeschlossen. Die eingebetteten Präparate können bei Raumtemperatur für unbegrenzte Zeit gelagert werden.

### ***4.3.2 Fixierung und Paraffin-Einbettung von Präparaten für immunologische Nachweise***

Mausembryonen und Gewebepreparationen für immunhistologische Untersuchungen werden in 10%-igem PBS-Formalin fixiert. Das Fixanz ist mindestens ein halbes Jahr bei Raumtemperatur stabil und muß nicht, wie 4%-PFA/PBS, jedes mal vor Gebrauch frisch angesetzt werden. Präparationen des gesamten Auges werden für mindestens drei Tage fixiert, um sicherzustellen, daß das Organ komplett durchdrungen wurde. Die präparierten Gewebe können bis zu einem halben Jahr bei 4°C in 10%-igem PFA/PBS gelagert werden, ohne daß nachfolgende Antikörperfärbungen negativ beeinflußt werden.

Vor der Einbettung wird überschüssiges Formalin durch Waschen der Präparate in PBS entfernt (60min/RT) und das Gewebe in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert (je drei Stunden in 50% und 70% EtOH, über Nacht in 95% EtOH, schließlich drei Stunden in 100%-igem Ethanol). Nach drei Stunden in 100%-igem Isopropanol werden die Präparate für drei Stunden bei 60°C in Histowax-gesättigtem Isopropanol inkubiert und in reines Histowax überführt. Schließlich werden die Präparate in Einbettförmchen überführt, mit flüssigem Histowax überschichtet und mit vorgewärmten Werkzeugen ausgerichtet. Nach dem Erkalten auf einer -4°C-Platte lassen sich die Paraffinblöcke leicht von den Förmchen trennen. Die eingebetteten Präparate können bei Raumtemperatur für unbegrenzte Zeit gelagert werden.

### ***4.3.3 Anfertigen von histologischen Schnitten***

#### Vorbehandlung der Objektträger

Damit die Gewebeschnitte auf den Objektträgern haften, müssen diese vorbehandelt oder spezielle Objektträger (z.B. SectionLock<sup>TM</sup>, Polysciences; SuperFrost<sup>®</sup> Plus, Menzel-Gläser) verwendet werden. Für die Beschichtung wird eine 2%-ige Lösung von TESPA (Triethoxy-polysilan, Sigma) in Aceton verwendet. Das Silan wirkt hierbei grenzflächenaktiv, da es sich mit den Silylgruppen zur Glasmatrix orientiert, während die hydrophoben Ethylreste vom Glas weg gerichtet sind. Dem Objektträger wird somit eine hydrophobe Oberfläche verliehen, wie sie auch die Gewebeschnitte aufweisen.

Die Objektträger werden in einer Lösung aus 10% HCl in 70%-igem Ethanol entfettet, in technischen Ethanol getaucht und an der Luft getrocknet. Sie können für unbegrenzte Zeit gelagert werden. Unmittelbar vor dem Gebrauch werden die Objektträger zur Beschichtung kurz in eine frische Lösung aus 2% TESPA in Aceton (technisch) getaucht, in reinem Aceton gespült und an der Luft getrocknet. Ein sich bildender weißer Schleier auf der Oberfläche des

Objektträgers hat keinen negativen Einfluß auf nachfolgende immunhistochemische Färbungen. Die beschichteten Objektträger sind mehrere Monate bei Raumtemperatur haltbar.

#### In Kunststoff eingebettete Präparate

Die Kunststoffblöcke werden getrimmt und am Mikrotom (OmU3 Ultramikrotom, Reichert) in einer Schichtdicke von maximal 2µm geschnitten. Die Objektträger werden erwärmt (55°C) und ein Tropfen Wasser aufgebracht. Die Schnitte werden mit einer Pinzette oder einem Zahnstocher vom Glasmesser abgehoben und auf den Wassertropfen gelegt, wodurch diese gestreckt werden. Nach Verdampfen des Wassers werden die Schnitte bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahrt und sind unbegrenzt haltbar. Histologische Übersichtsfärbungen werden, wie in Abschnitt 4.3.4 angegeben, durchgeführt.

#### Paraffinschnitte

Die Paraffinblöcke werden getrimmt und am Mikrotom (Microm HM 335E, Walldorf) in einer Schichtdicke von 6 bis 10 µm bei einem Winkel zwischen 8° und 12° geschnitten und in ein 52-55°C warmes Wasserbad überführt, wodurch die Schnitte gestreckt werden. Mit einem beschichteten Objektträger werden die auf der warmen Wasseroberfläche schwimmenden Schnitte abgenommen. Überschüssiges Wasser wird kräftig abgeschüttelt und der Objektträger über Nacht bei 37°C getrocknet. Die Schnitte werden bis zur weiteren Verwendung für immunhistochemische Nachweise (Abschnitt 4.3.5) bei Raumtemperatur aufbewahrt und sind unbegrenzt haltbar.

#### Vorbereitung der Gewebeschnitte für Färbereaktionen

Bevor Paraffinschnitte den jeweiligen Färbungen (histologische Übersichtsfärbungen, immunhistochemische Nachweise) unterzogen werden können, müssen sie für mindestens 30min in Xylol deparaffiniert werden, Kunststoffschnitte hingegen können direkt verwendet werden.

Für immunhistochemische Nachweisreaktionen ist eine vollständige Entfernung des Paraffins essentiell, eine Inkubation über Nacht hat sich hier als vorteilhaft erwiesen. Anschließend werden die Objektträger für 5min in 100%-iges Isopropanol getaucht, um restliches Xylol zu entfernen. In einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 90%, 70%) werden die Gewebeschnitte für jeweils 5min rehydriert. Die Schnitte werden bis zur Verwendung in 70%-igem Ethanol aufbewahrt und sind bei Raumtemperatur unbegrenzt haltbar.

#### **4.3.4 Histologische Übersichtsfärbung (Methylenblau/basisches Fuchsin)**

Zur histologischen Übersichtsfärbung wird die kombinierte Färbung mit Methylenblau/basischem Fuchsin (MbF) verwendet. Im Vergleich zur Hämatoxylin/Eosin-(H/E)-Färbung sind keine Unterschiede erkennbar, jedoch erweist sich die MbF-Färbung als schneller und einfacher handhabbar. Durch das Methylenblau werden die Zellkerne des Gewebes sichtbar, basisches Fuchsin hingegen färbt die Zellwände und das Cytoplasma.

Die bei Raumtemperatur gelagerten 13%-igen Stammlösungen aus Methylenblau und basischem Fuchsin werden vor Gebrauch im Verhältnis von je 1:100 verdünnt und zusammengegeben. Die in 70%-igem Ethanol gelagerten Gewebeschnitte werden zweimal für je 5min in PBS inkubiert. Anschließend werden die Objektträger für 15-45 Sekunden in die verdünnte Färbelösung getaucht, gewässert und nach Überschichten mit Glycerol oder VectaShield® (Vector Laboratories) durch ein Deckglas abgeschlossen. Eine vorteilhafte Eigenschaft des MbF-Verfahrens gegenüber der H/E-Färbemethode ist, daß bei unzureichender Färbung nachbehandelt werden kann. Hierzu wird das Deckgläschen im Wasserbad abgehoben und der Objektträger erneut in die entsprechend verdünnte Färbelösung getaucht, bis ein zufriedenstellendes Ergebnis erreicht ist.

#### **4.3.5 Fluoreszenzmikroskopische Färbereaktionen auf Paraffinschnitten**

Während allen Inkubationsschritten werden die Objektträger bei Raumtemperatur in einer mit Wasserdampf gesättigten Kammer aufbewahrt, um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Während der gesamten Färbereaktion ist ein Trockenfallen der Schnitte unbedingt zu vermeiden, da dies zu Hintergrundfärbungen führen würde.

Nach Beendigung einer spezifischen Färbereaktion werden verschieden fluoreszierende Farbstoffe zur Gegenfärbung verwendet. Das rot fluoreszierende Propidiumiodid (A: 518nm, E: 605nm) ist ein Interkalationsfarbstoff, der sich zwischen die Basenpaare des DNA-Doppelstranges einlagert. DAPI ist ein blau fluoreszierendes Molekül (A: 358nm, E: 461nm), welches an GC-reiche Sequenzen des Chromatins bindet. Aufgrund ihrer Affinität zu DNA eignen sich beide Farbstoffe für die Anfärbung von Zellkernen in der Fluoreszenzmikroskopie. Beide Farbstoffe werden als 1:1000-Verdünnung der Stammlösung verwendet. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird überschüssiger Farbstoff durch mehrmaliges Eintauchen in jeweils frisches PBS entfernt, die Objektträger werden mit Fluoreszenz-Einbettmedium überschichtet und durch ein Deckglas abgeschlossen.

#### 4.3.5.1 *Nachweis von DNA-Strangbrüchen (TUNEL-Reaktion)*

Mit Hilfe terminaler Transferase werden an freie 3'-OH Enden eines DNA-Moleküls (fluoreszenz-) markierte Nukleotide angehängt. Diese Reaktion wird als "terminal transferase-mediated dUTP nick end labeling" (TUNEL) bezeichnet.

Die in 70%-igem Ethanol gelagerten Objektträger werden zweimal für je 5min in PBS inkubiert. Überschüssiges PBS wird mit einem Wattestäbchen aufgesaugt, so daß nur noch die Gewebeschnitte benetzt bleiben. Zur Permeabilisation wird je ein Tropfen der verdünnten Proteinase K-Stammlösung (1:10 in H<sub>2</sub>O) auf die Schnitte aufgebracht und für 40min bei 37°C in einer mit Wasserdampf gesättigten Kammer inkubiert. Durch mehrmaliges Eintauchen der Objektträger in PBS wird überschüssige Permeabilisationslösung entfernt.

Nach Abtrocknen der Waschlösung mit einem Wattestäbchen werden auf jeden Schnitt etwa 5µl der vorbereiteten TUNEL-Reaktionslösung ( $\frac{9}{10}$  Puffer +  $\frac{1}{10}$  Enzymlösung) aufgebracht. Die Objektträger werden über Nacht bei 37°C inkubiert. Während der Inkubation dürfen die Objektträger keinesfalls mit Deckgläschen abgeschlossen werden. Offenbar steht aufgrund von Kapillarkräften nicht genug Reaktionslösung je Schnitt zur Verfügung, als daß eine ausreichende Färbung erzielt werden könnte. Zur Gegenfärbung werden am nächsten Tag auf jeden Schnitt zusätzlich je 5µl der 1:1000 verdünnten Propidiumiodid-Stammlösung aufgebracht und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Objektträger werden mit Fluoreszenz-Einbettmedium überschichtet und mit einem Deckgläschen abgeschlossen.

#### 4.3.5.2 *Immunologische Nachweisreaktionen*

Die in 70%-igem Ethanol gelagerten Objektträger werden zweimal für je 5min in PBS inkubiert. Anschließend wird überschüssiges PBS mit einem Wattestäbchen aufgesaugt, auf jeden Schnitt ein Tropfen des Permeabilisations-Mix (je 0.1% Tween20 und NP-40 in PBS) geträufelt und für 30min inkubiert. Nachfolgend werden die Objektträger mehrmals in frisches PBS getaucht, um überschüssiges Detergenz zu entfernen. Nach dem Abtrocknen mit einem Wattestäbchen wird ein Tropfen der vorbereiteten Blockierungslösung (10% Milch-PBS) auf die Schnitte aufgebracht und für 30min bis 1h inkubiert.

Überschüssiges Blockierungsreagenz wird abpipettiert und der erste Antikörper, verdünnt in Blockierungsreagenz, aufgebracht. Eine geeignete Verdünnung des primären Antikörpers richtet sich nach seiner Affinität zum Epitop und muß empirisch ermittelt werden. Eine möglichst hohe Verdünnung ist wünschenswert, da sie zu niedrigen Hintergrundfärbungen führt. Üblicherweise werden Verdünnungen zwischen 1:50 und 1:250 für den ersten Antikörper (polyklonales Kaninchen IgG) verwendet. Die Schnitte werden für eine bis

eineinhalb Stunden bei Raumtemperatur im ersten Antikörper inkubiert, anschließend dreimal in frisches PBS getaucht und über Nacht in PBS gelagert. Die Aufbewahrung der Objektträger über Nacht in PBS entfernt überschüssige, durch hydrophobe Wechselwirkungen haftende Antikörper und ermöglicht so die Reduzierung der Hintergrundfärbung auf ein Minimum.

Am nächsten Tag werden die Objektträger in frisches PBS getaucht, mit einem Wattestäbchen getrocknet und der sekundäre Antikörper oder F(ab)-Fragmente, geeignet verdünnt in Blockierungsreagenz, aufgetropft. Die FITC-markierten F(ab)-Fragmente (Ziege-anti-Kaninchen IgG, Boehringer; #1814257) werden im Verhältnis 1:1500 verwendet, der Cy3-markierte sekundäre Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen IgG, Dianova; #711-165-152) wird in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Die Schnitte werden für 30min im zweiten Antikörper inkubiert, anschließend dreimal in PBS getaucht und dreimal je 10min in PBS gewaschen. Für die Gegenfärbung wird Propidiumiodid oder DAPI, wie in Abschnitt 4.3.5 beschrieben, verwendet. Die Objektträger werden mit Fluoreszenz-Einbettmedium überschichtet und mit einem Deckgläschen abgeschlossen.

### **4.3.6 Dokumentation**

Die Schnitte werden unter einem Mikroskop (Zeiss, Axioplan) analysiert. Dieses Mikroskop eignet sich sowohl für Fluoreszenzaufnahmen, als auch für Auf- und Durchlichtmikroskopie.

#### Fluoreszenzmikroskopie

Immunhistochemische Nachweisreaktionen werden nach Vorschalten eines geeigneten Filters (DAPI: 358/461nm, FITC: 492/520nm, Cy3/TR/Rhodamin: 550/620) mit einer digitalen Schwarzweiß-Kamera (IMAC CCD S30) dokumentiert. Das zur Aufnahme verwendete Programm (ISIS v3.0, Metasystems) führt eine automatische Einstellung der Belichtungszeit durch und ermöglicht die Darstellung der Schwarzweiß-Information in einem von drei Farbkanälen (rot, grün und blau), sowie das Zusammenfügen einzelner Farbkanäle zu einem überlagerten Gesamtbild. Für jeden Farbkanal stehen 256 Intensitätsstufen zur Verfügung, die im überlagerten Bild multiplikativ gemischt werden. Mit diesem System können daher bei Ausnutzung aller drei Farbkanäle 16.7 Millionen Farbabstufungen mit einer Auflösung von 300dpi dargestellt werden. Die Aufnahmen werden als TIFF-Dateien abgelegt.

#### Auf- und Durchlichtaufnahmen

Konventionelle lichtmikroskopische Aufnahmen werden mit einer digitalen Farbvideokamera (Fuji HC2000, 300dpi, 16.7 Millionen Farben) dokumentiert. Das verwendete Programm (Photograb II<sup>TM</sup>) verfügt weder über einen Weißabgleich, noch über eine automatische Einstellung der Belichtungszeit. Diese wird nach Einstellung der Farbtemperatur am Helligkeitsregler der mikroskopeigenen Lichtquelle (Stufe 8, entspricht 7200K) empirisch bestimmt. Gegebenenfalls können am Mikroskop vorhandene Graufilter verwendet werden. Die Aufnahmen können in zahlreichen Formaten gespeichert werden - aufgrund ihres verlustfreien Komprimierungsformates haben sich TIFF-Dateien als vorteilhaft erwiesen.

#### Grafische Nachbearbeitung und Erstellen von Papierabzügen der digitalen Bilddaten

Zur digitalen Nachbearbeitung der Rohdaten wird Adobe Photoshop (Version 5.02) verwendet. Mit Hilfe dieses Programms lassen sich Farbbalance und Farbsättigung, Intensität und Mischung einzelner Farbkanäle, sowie Ausleuchtungsfehler korrigieren. Anschließend werden die Aufnahmen mit Hilfe des Adobe Illustrators (Version 8.0) zusammengestellt und beschriftet. Die Bilddaten werden auf Thermosublimationsdruckern (Kodak 8600 und 8650) oder Tintenstrahldruckern (Epson Stylus Color Serie) in Fotoqualität zu Papier gebracht.

## 5. ERGEBNISSE

Zu Beginn der Arbeit wurde durch vergleichende histologische Analyse eine Übersicht zur Kataraktentstehung in murinen  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten gewonnen. Als Wildtyp-Kontrolle wurden hierbei Präparationen des Gesamtauges von C3H-Mäusen verwendet.

### 5.1 Histologische Charakterisierung von $\gamma$ -Kristallin-Mutanten

Mutationen im  $\gamma$ -Kristallin-Gencluster treten als autosomal-dominanter Erbgang in Erscheinung und beschränken sich phänotypisch auf eine verkleinerte Entwicklung des gesamten Auges (Mikrophthalmie) sowie pathologische Veränderungen während der Linsenentwicklung (Graw *et al.*, 1990). Auswirkungen auf andere Organe oder die Fertilität der Tiere werden nicht beobachtet. Die Tiere werden daher als homozygote Linien gehalten (Kratochvilova *et al.*, 1979).

Für die histologische Analyse, ebenso für immunhistochemische Nachweise, wurden homozygote Tiere verwendet. Während der Anfertigung transversaler Serien-Dünnschnitte wurde darauf geachtet, daß die Schnittebene möglichst parallel zur optischen Achse des Auges verläuft. Die Abbildungen zeigen jeweils die zentrale Region des Auges. Neben einer maximal geöffneten Iris ist in frühen embryonalen Stadien daher auch ein angeschnittener Sehnerv sichtbar. Die Ausschnittvergrößerungen wurden für alle Abbildungen gleich gewählt. Ein direkter Größenvergleich zwischen den gezeigten Stadien ist somit möglich.

Die embryonalen Stadien werden nach Kaufman datiert. In kontrollierten Verpaarungen wurde das Vorhandensein eines vaginalen Plugs jeweils morgens überprüft und dieser Tag als E0.5 bezeichnet (Kaufman, 1992).

### 5.1.1 Die Entwicklung des Phänotyps von *Cryge*<sup>t</sup>-Mutanten

Die *Cryge*<sup>t</sup>-Mutation führt zur Ausprägung einer schweren und progressiv verlaufenden kongenitalen Katarakt (t = Totaltrübung), begleitet von Mikrophthalmie. Bereits zwischen dem 12. und dem 14. Tag der Embryonalentwicklung werden pathologische Veränderungen sichtbar. In der Linse (L) des Wildtyps werden primäre Linsenfaserzellen ab Tag E11.5 durch Auswachsen posteriorer Epithelzellen des Linsenvesikels gebildet. Etwa am Tag E13.5 der Embryonalentwicklung erreichen sie das Linsenepithel (E) am anterioren Pol der Linsenkapsel. In *Cryge*<sup>t</sup>-Mutanten ist dieser Elongationsprozeß massiv gestört. Die Elongation der primären Faserzellen ist stark vermindert, sie erreichen nicht den anterioren Pol der Linsenkapsel (Abbildung 5.1b). Ab Tag E14.5 schieben sich die aus dem Linsbogen elongierenden sekundären Faserzellen in den verbleibenden Raum zwischen Linsenepithel und primären Faserzellen, welche daraufhin in die posteriore Hemisphäre der Linsenkapsel gedrückt werden (Abbildung 5.1d).

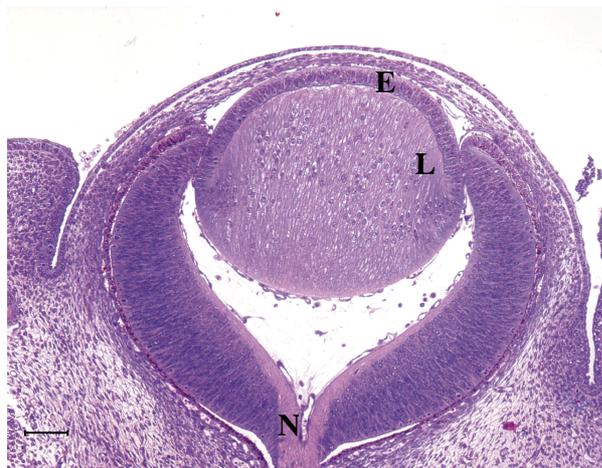


Abb. 5.1a

WT E14.5

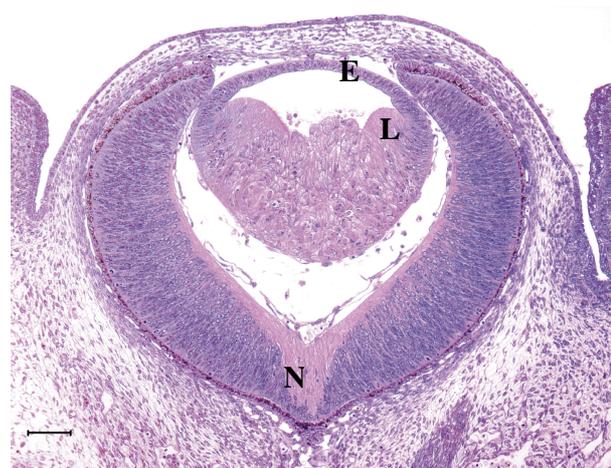


Abb. 5.1b

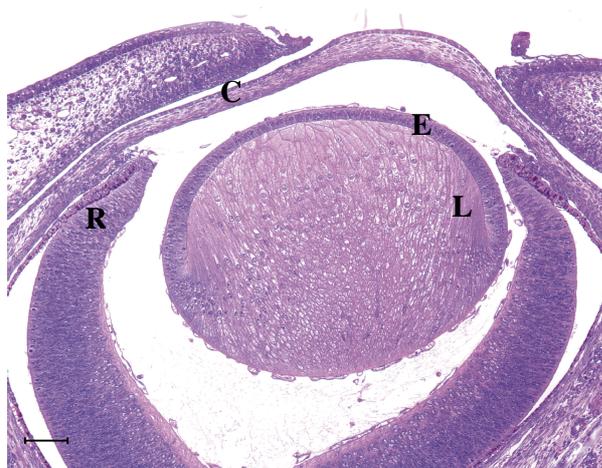
*Cryge*<sup>t</sup> E14.5

Abb. 5.1c

WT E15.5

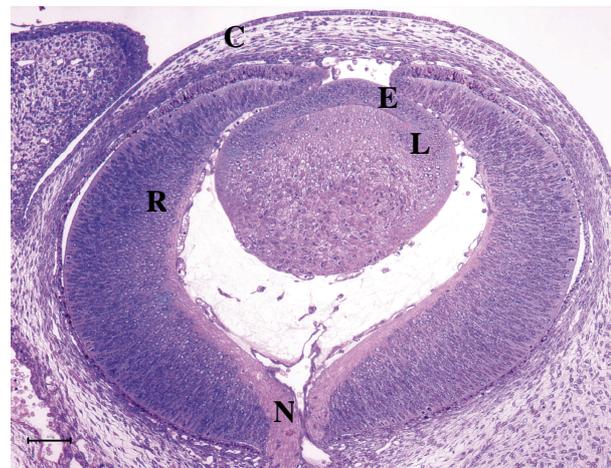


Abb. 5.1d

*Cryge*<sup>t</sup> E15.5

**Abbildung 5.1:** Histologische Übersichtsfärbung zur Linsenentwicklung in den Stadien E14.5 und E15.5 von Wildtyp (links; a, c) und homozygoten *Cryge*<sup>t</sup>-Mutanten (rechts; b, d).

C: Cornea, E: Linsenepithel, L: Linse, N: Sehnerv, R: Retina. Balken: 250µm.

Zwischen E16.5 und E18.5 schwellen die nach posterior gepreßten primären Faserzellen der *Cryge*<sup>f</sup>-Linsen stark an, gleichzeitig verlieren sie ihre Faserstruktur und nehmen eine kugelige Gestalt an. In der posterioren Hemisphäre der Linsenkapsel wird zudem die beginnende Zytolyse der komprimierten Faserzellen sichtbar (Abbildung 5.2b). Ab Tag E18.5 füllen die sekundären Faserzellen den anterioren Bereich der Linsenkapsel fast vollständig aus. In diesem Stadium beginnen auch sekundäre Faserzellen anzuschwellen und ihre Faserstruktur zu verlieren (Abbildung 5.2d). Die unzureichende Elongation primärer Faserzellen leitet somit den Verlust einer normalerweise hochgeordneten Struktur in den Linsen von *Cryge*<sup>f</sup>-Mutanten ein. Ihre Kompression durch elongierende sekundäre Faserzellen führt zu einer gravierenden Deformation der Linse sowie in einem späteren Stadium (zwischen P7 und P14) zum Aufplatzen der Linsenkapsel an ihrem posterioren Pol. Späte embryonale Stadien zeigen zudem beginnende Verwachsungen in der vorderen Augenkammer zwischen der Iris (I) und dem Corneaepithel (Abbildungen 5.2b und 5.2d).

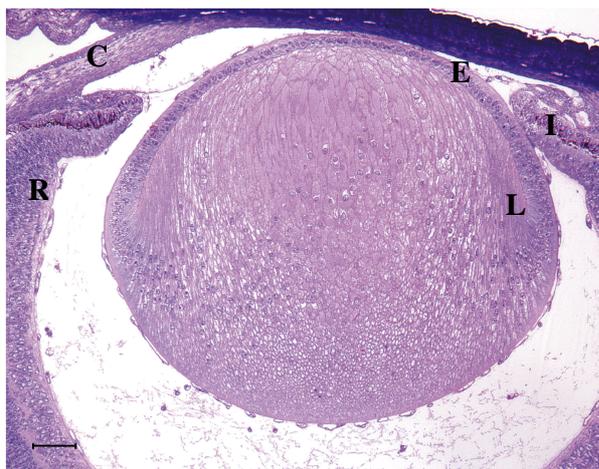


Abb. 5.2a

WT E18.5

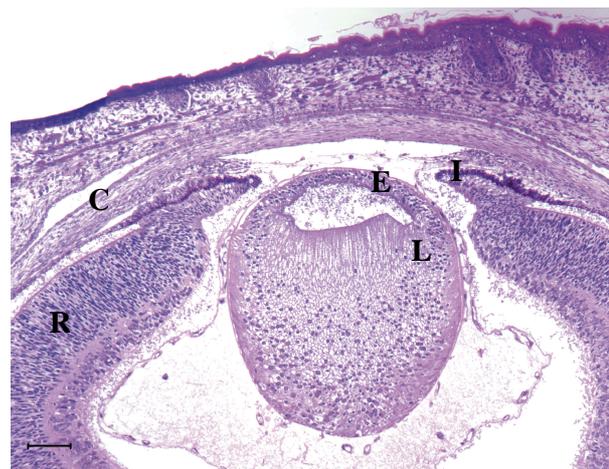


Abb. 5.2b

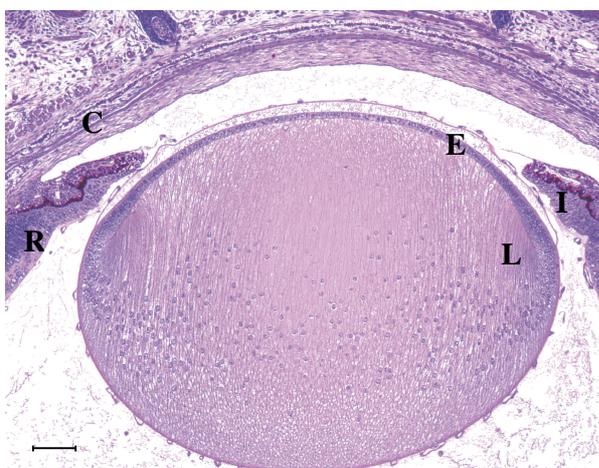
*Cryge*<sup>f</sup> E18.5

Abb. 5.2c

WT P1

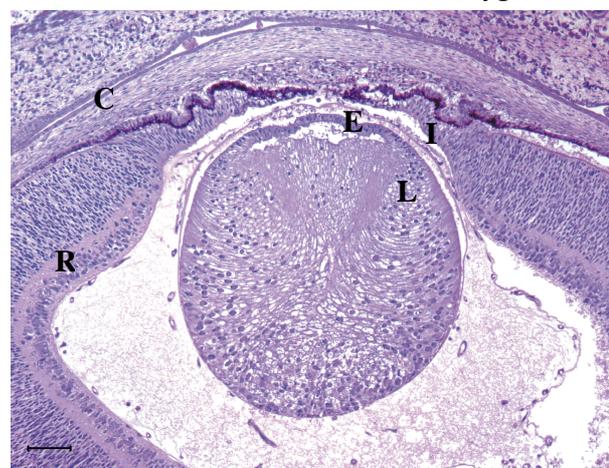


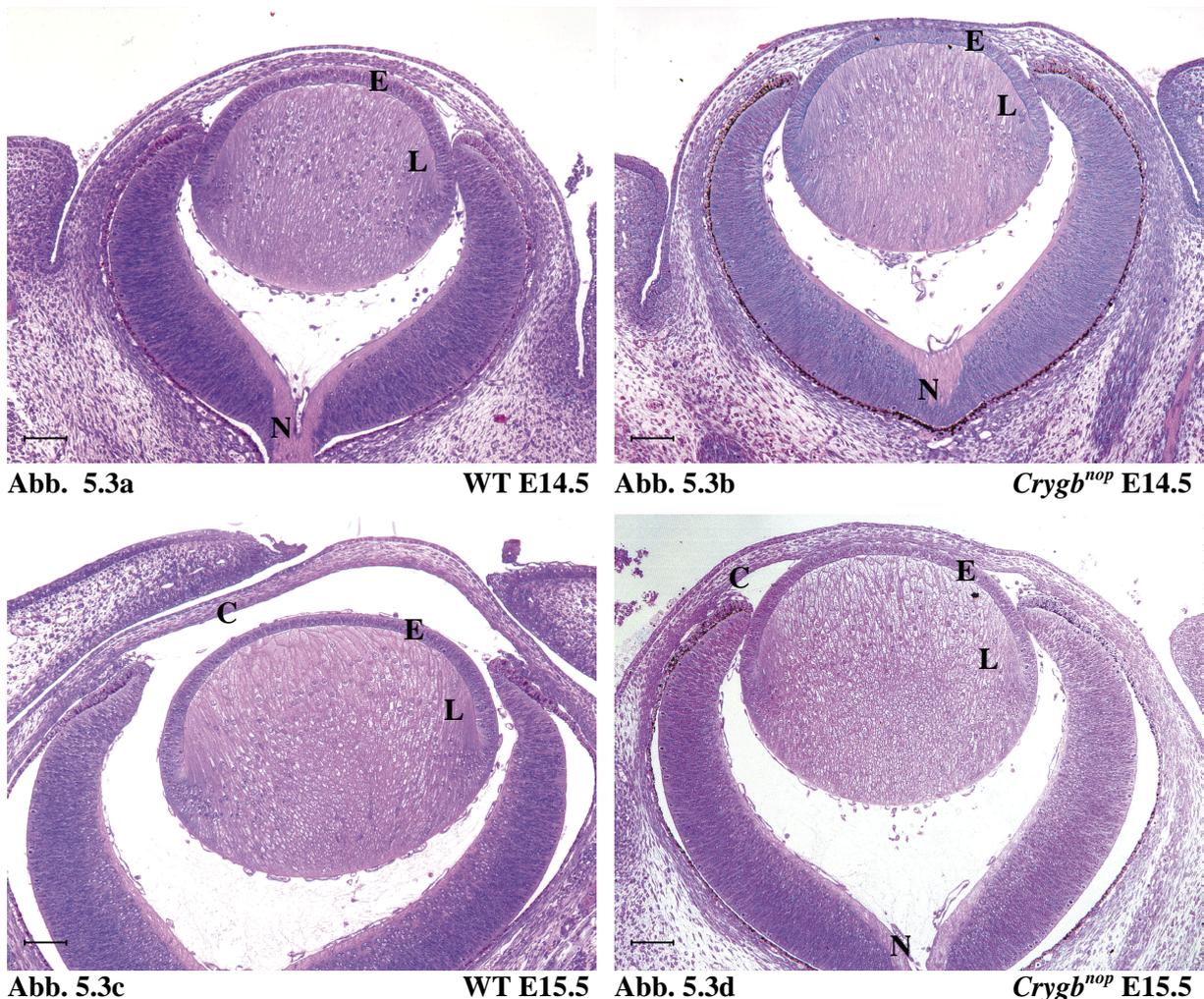
Abb. 5.2d

*Cryge*<sup>f</sup> P1

**Abbildung 5.2:** Histologische Übersichtsfärbung der Linsenentwicklung in den Stadien E18.5 und P1 von Wildtyp (links; a, c) und homozygoten *Cryge*<sup>f</sup>-Mutanten (rechts; b, d). E: Linsenepithel, C: Cornea, I: Iris, L: Linse, R: Retina. Balken: 250µm.

### 5.1.2 Phänotypische Beschreibung der *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante

*Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten entwickeln eine kongenitale und progressiv verlaufende Trübung des Linsenkerns (nop = *nuclear opacity*). Eine vergleichende histologische Analyse der Linsenentwicklung von Wildtyp- und *Crygb<sup>nop</sup>*-Mäusen ist in den Abbildungen 5.3 und 5.4 dargestellt. Am Tag E14.5 der Linsenentwicklung zeigen *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten eine normale und altersgerecht entwickelte Linse. Die Linse (L) ist bereits ausgefüllt von primären Linsenfaserzellen, das Linsenepithel (E) ist als einzellige Schicht gut erkennbar (Abbildung 5.3b). Pathologische Veränderungen in Linsen von *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten werden zwischen dem 15. und 16. Tag der Embryonalentwicklung (Stadien E15.5 bis E16.5) beobachtet. In diesem Differenzierungsstadium beginnt die zunehmende Schwellung primärer Faserzellen im zentralen Bereich der *Crygb<sup>nop</sup>*-Linse (Abbildung 5.3d).



**Abbildung 5.3:** Histologische Übersichtsfärbung zur Linsenentwicklung in den Stadien E14.5 und E15.5 von Wildtyp (links; a, c) und homozygoten *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten (rechts; b, d).

C: Cornea, E: Linsenepithel, L: Linse, N: Sehnerv, R: Retina. Balken: 250µm.

Ab Tag E18.5 bilden sich Vakuolen zwischen dem Linsenepithel und den Faserzellen der *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante, gleichzeitig beginnt die Zytolyse der geschwollenen primären Faserzellen innerhalb des Linsenkerns (Abbildung 5.4b). Gegen Ende der Embryonalentwicklung werden auch sekundäre Faserzellen in die fortschreitende Zerstörung der Zellmembranen mit einbezogen. In neonatalen *Crygb<sup>nop</sup>* Linsen sind die sekundären Faserzellen an der Grenzfläche zum Linsenkern bereits vollständig lysiert. Die in diesem Stadium beobachtete Auflösung primärer und umgebender sekundärer Faserzellen führt zu einer anterioren Verschiebung des Linsenkerns innerhalb der Linsenkapsel (Abbildung 5.4d).

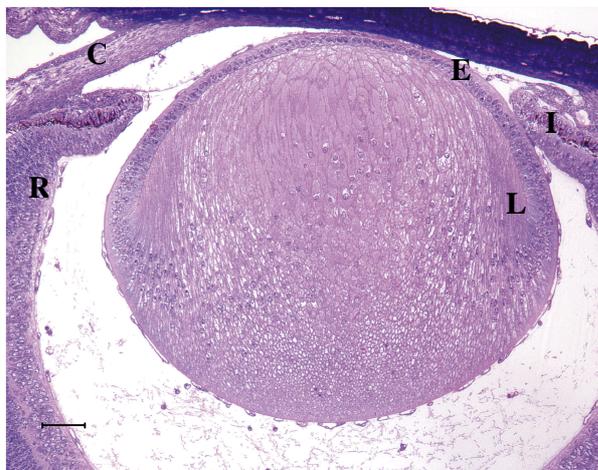


Abb. 5.4a

WT E18.5

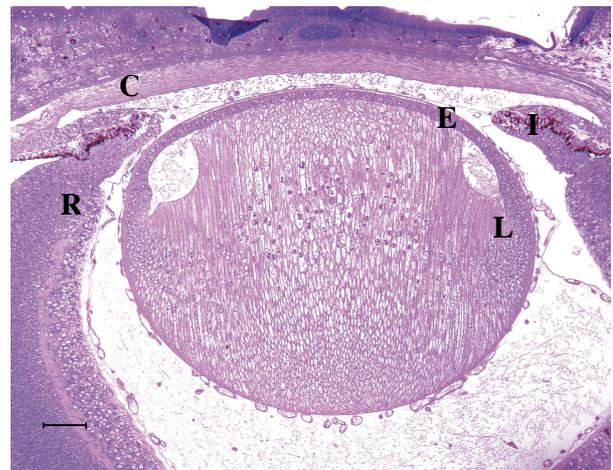


Abb. 5.4b

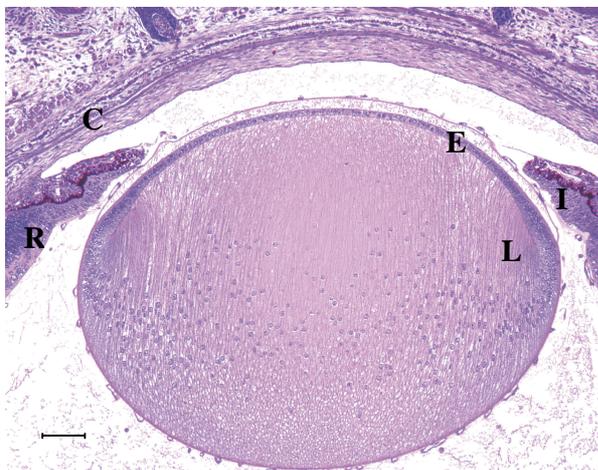
*Crygb<sup>nop</sup>* E18.5

Abb. 5.4c

WT P1

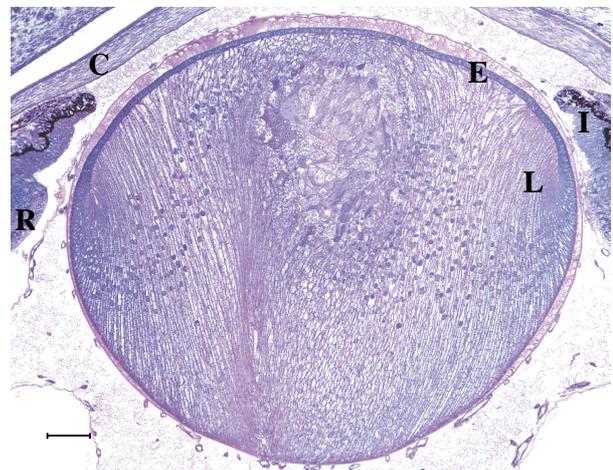


Abb. 5.4d

*Crygb<sup>nop</sup>* P1

**Abbildung 5.4:** Histologische Übersichtsfärbung zur Linsenentwicklung in den Stadien E18.5 und P1 von Wildtyp (links; a, c) und homozygoten *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten (rechts; b, d).

E: Linsenepithel, C: Cornea, I: Iris, L: Linse, R: Retina. Balken: 250µm.

### 5.1.3 Vergleichende Histologie

In vorangegangenen Abschnitten (5.1.1 und 5.1.2) wurden pathologische Veränderungen während der Linsenentwicklung von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten aufgezeigt. Angrenzende Gewebe des optischen Apparates sind nicht betroffen. Die aus dem Neuroektoderm hervorgehenden Strukturen, wie Sehnerv und Retina, entwickeln sich altersgerecht in beiden untersuchten Phänotypen. Ebenso zeigt der zwischen Retina und Linse entstehende Glaskörper keine morphologischen Abweichungen. Die Augenlider beider Mutanten sind bei der Geburt der Tiere noch geschlossen und öffnen sich, entsprechend denen des Wildtyps, zu Beginn der zweiten Lebenswoche. Die aus dem Oberflächenektoderm hervorgehende Cornea wird altersgerecht gebildet, in späten embryonalen Stadien von *Cryge*<sup>t</sup>-Mutanten zeigen sich beginnende Verwachsungen in der vorderen Augenkammer zwischen Iris und dem Corneaepithel.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Analyse und Charakterisierung der biochemischen Prozesse in der **Linse** von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten, welche zur Ausprägung einer Katarakt führen. Beide untersuchten Phänotypen entwickeln eine kongenitale und progressiv verlaufende Trübung der Augenlinse, jedoch beobachtet man einen unterschiedlichen Schweregrad. ***Cryge*<sup>t</sup>-Mutanten** zeigen bereits im Stadium **E14.5** eine stark verlangsamte Elongation der primären Linsenfaserzellen, während die Linse von *Crygb*<sup>nop</sup>-Mutanten in diesem Stadium noch keine Veränderungen aufweist. Etwa zwei Tage später, **zwischen E15.5 und E16.5**, werden auch in der Linse von ***Crygb*<sup>nop</sup>-Mutanten** mit der beginnenden Elongation und Differenzierung sekundärer Linsenfaserzellen erste Schwellungen sichtbar.

Das unterschiedliche zeitliche Auftreten der ersten morphologischen Veränderungen korreliert mit der einsetzenden Expression der jeweils veränderten  $\gamma$ -Kristalline in der Mauslinse. In differenzierenden Faserzellen beginnt die Expression von *Cryge* etwa ab Tag E12.5, während *Crygb* erstmals zwei Tage später, ab E14.5 detektiert wird (N. Klopp, persönliche Mitteilung).

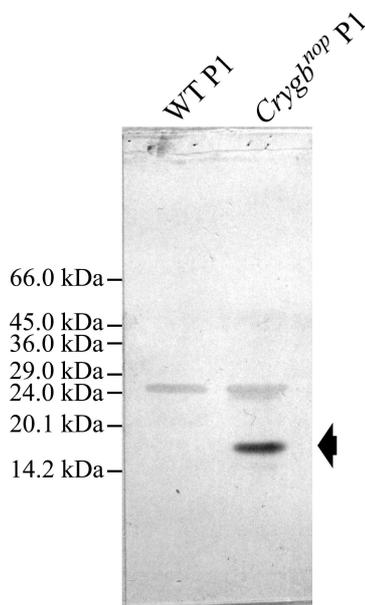
In beiden untersuchten Mutanten wird ein drastisch verminderter Abbau der Zellkerne in den Linsenfaserzellen beobachtet. In späten Stadien erscheinen die Zellkerne fleckig und dunkler gefärbt als in Linsen des Wildtyps (Abbildungen 5.2 und 5.4). Kürzlich wurden diese Flecken in den Zellkernen von *Cryg*-Mutanten als Einschlüsse von  $\gamma$ -Kristallinen identifiziert (A. Sandilands, Universität Dundee, Schottland; mündliche Mitteilung).

## 5.2 Biochemische Charakterisierung von $\gamma$ -Kristallin-Mutanten

Die bisherigen Ergebnisse machen deutlich, daß die Mutation in einem  $\gamma$ -Kristallin-Gen, welches für ein linsenspezifisches Strukturprotein codiert, neben Schwellungen von Linsenfaserzellen offensichtlich zu einem verminderten Abbau der Zellorganellen führt. Die Identifizierung und Untersuchung des zugrunde liegenden molekularen Mechanismus ist Gegenstand des vorliegenden Kapitels.

### 5.2.1 Expression eines mutierten $\gamma$ B-Kristallins in Linsen des *Crygb<sup>nop</sup>*-Phänotyps

Der *Crygb<sup>nop</sup>*-Phänotyp wird durch eine Mutation im dritten Exon des  $\gamma$ B-Kristallins (*Crygb*) hervorgerufen. Die Deletion von 11bp bei gleichzeitiger Insertion von 4bp führt zu einer Verschiebung des Leserasters und der Induktion eines Stop-Codons (Klopp *et al.*, 1998).



**Abbildung 5.5:** Western blot von Wildtyp- und *Crygb<sup>nop</sup>*-Linsenextrakten (je 25 $\mu$ g). Das polyklonale Antiserum zeigt eine starke Reaktion mit dem *Crygb<sup>nop</sup>*-Linsenextrakt auf Höhe von 17.6 kDa, dem Molekulargewicht des verkürzten  $\gamma$ B-Kristallins (Pfeil).

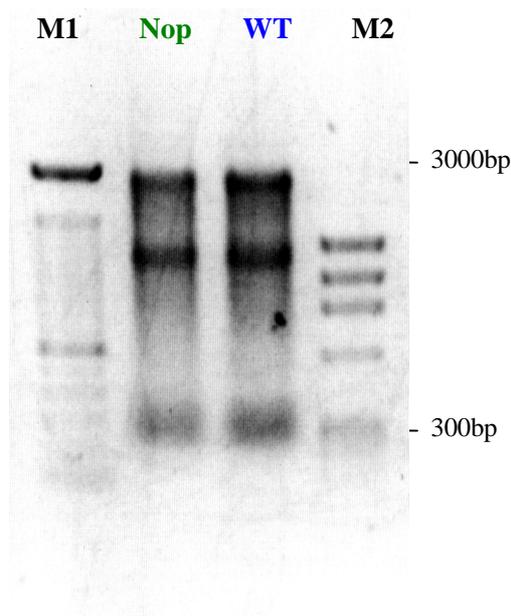
Die *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutation bewirkt somit eine veränderte Aminosäuresequenz im Translationsprodukt. Es werden insgesamt sechs neue Aminosäuren am Ende des mutierten  $\gamma$ B-Kristallins eingefügt, bevor die Proteinkette zwischen dem dritten und vierten Griechischen Schlüssel-Motiv abbricht. Dieses C-terminale, aus sechs Aminosäuren bestehende Polypeptid wurde für die Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen das *Crygb<sup>nop</sup>*-Protein verwendet und von Dr. Roy Quinlan, Universität Dundee, Schottland, zur Verfügung gestellt.

Abbildung 5.5 zeigt die Expression des verkürzten  $\gamma$ B-Kristallins in Linsen des *Crygb<sup>nop</sup>*-Phänotyps. Im Western blot ist neben einer leichten Kreuzreaktion mit Linsenextrakten bei 25kDa eine spezifische Reaktion des Antiserums mit dem *Crygb<sup>nop</sup>*-Protein bei 17.6 kDa sichtbar (Pfeil).

### 5.2.2 Molekulare Auswirkungen eines verkürzten $\gamma$ -Kristallins - Differential Display

Mit Hilfe der differentiellen Genexpressionsanalyse werden die molekularen Auswirkungen eines verkürzt exprimierten  $\gamma$ -Kristallins in Linsenfaserzellen untersucht. Mit dieser Untersuchungsmethode wird die transkriptionelle Regulation eines Zelltyps oder Gewebes mit wildtypischen oder nichtinduzierten Zellen verglichen. Die Reinheit und Qualität der präparierten mRNA sind wichtige Voraussetzungen für eine verlässliche Detektion unterschiedlich regulierter Gene.

Die *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante wurde ausgewählt, da ihre Linsenkapsel während der Kataraktentwicklung intakt bleibt. Ihre Linsen sind gut zu präparieren und umliegendes Gewebe, wie die Iris oder der Ciliarkörper, lassen sich leicht entfernen. Die Kontamination der mRNA-Präparation aus Linsenzellen von *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten mit Transkripten aus angrenzenden Geweben ist daher minimal. Im Gegensatz dazu gelingt die Präparation intakter Linsen aus *Cryge<sup>t</sup>*-Mutanten nur für späte embryonale Stadien. Bereits neonatale Linsen sind stark verformt (siehe Abschnitt 5.1) und ihre Linsenkapsel bricht während der Präparation leicht auf.



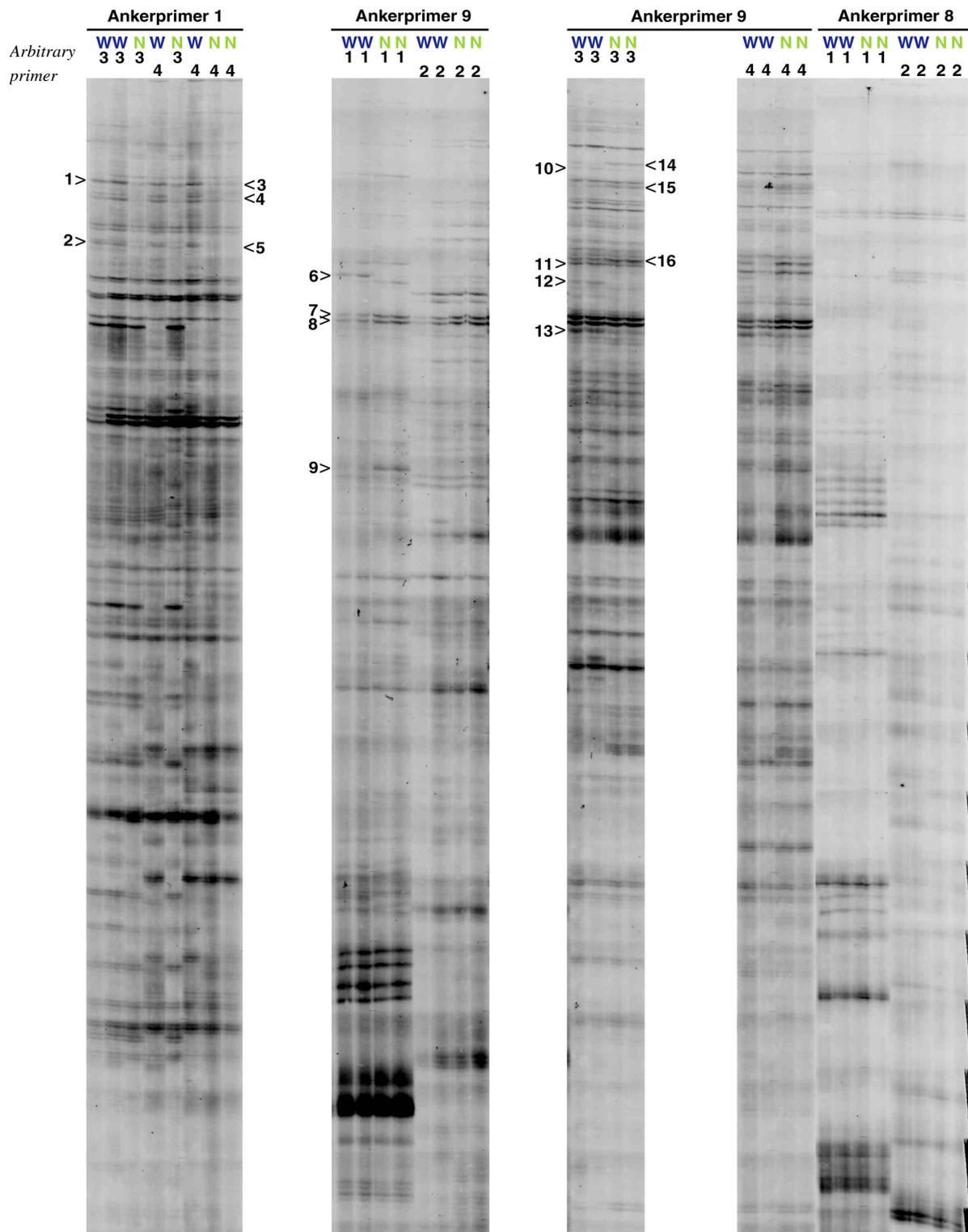
**Abb. 5.6a:** mRNA aus Linsen von Wildtyp und *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten (je 1 $\mu$ g). Die Präparationen zeigen intakte mRNA; Abbauprodukte wären als Schlieren mit einem geringeren Molekulargewicht als 300bp erkennbar.

**M1:** 100bp-Leiterstandard,

**M2:** *Hind III*-verdaute  $\phi$ X-DNA.

Für die Analyse werden Linsen neonataler *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten verwendet, da im Gegensatz zu embryonalen Linsen ausreichend Material zur Verfügung steht und der Phänotyp bereits vollständig ausgeprägt ist. Die mRNA wird aus Linsen isoliert, nach enzymatischem Abbau von genomischer DNA phenolisiert und gefällt. Beide Proben werden auf die gleiche Konzentration eingestellt und in cDNA umgeschrieben. Die Qualität der RNA-Präparation wird anhand der Integrität der 18s- und 28s-rRNA überprüft (Abbildung 5.6a). Die Differential Display-Reaktion wird in je zwei identischen Ansätzen mit verschiedenen *Anker*- und *Arbitrary*-Oligonukleotiden durchgeführt (Abschnitt 4.1.8). Die PCR-Produkte werden durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und die fluoreszierenden Banden im UV-Licht detektiert (Abbildung 5.6b).

### Differentielle Genexpressionsanalyse



**Abbildung 5.6b:** Differentielle Genexpressionsanalyse von neonatalen Wildtyp- und *Crygb<sup>nop</sup>*-Linsen. Die markierten Banden werden ausgeschnitten und in einer erneuten PCR-Reaktion mit T7-/M13-Primern reamplifiziert. W: Wildtyp, N: *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante.



Kolonie-PCR. Anfänglich wurden auch Klone sequenziert (6/5, 6/9, 14/4), deren Länge geringer als das größte in Abbildung 5.6c gezeigte Fragment ist. Die kurzen Sequenzen ergeben jedoch keine guten Übereinstimmungen mit der Datenbank. Die Ergebnisse der differentiellen Genexpressionsanalyse sind in Tabelle 5.1 dargestellt, die zugehörigen Sequenzen sind im Anhang (Abschnitt 7.1) aufgelistet.

DD-Primer	Nop/WT	Klon	BLAST	PubMed-#	Sequenz
<i>AP1 R4</i>	3x down	3/5	839	AF060092	Proteasom Untereinheit mRNA psmb3, aus Maus
<i>AP9 R1</i>	2x down	6/2	364*	M11408	S16 ribosomales Protein, gesamte cds, aus Maus
<i>AP9 R1</i>	2x down	6/5	253*	J00376	$\alpha$ A-Kristallin mRNA, 3'-Ende, aus Maus
<i>AP9 R1</i>	2x down	6/9	146*	Z22573	$\gamma$ B-Kristallin Gen, aus Maus
<i>AP9 R3</i>	2x down	12/6	618, 342	Z22573	$\gamma$ B-Kristallin Gen, aus Maus
<i>AP9 R1</i>	2x down	6/10	844	K02585	$\gamma$ B-Kristallin mRNA, 3'-Ende, aus Maus
<i>AP9 R3</i>	2x up	14/4	220*	J00378	$\beta$ A3/A1-Kristallin mRNA, 3'-Ende, aus Maus
<i>AP9 R3</i>	2x up	14/5	681	J00378	$\beta$ A3/A1-Kristallin mRNA, 3'-Ende, aus Maus
<i>AP9 R3</i>	2x up	14/2	596	V00728	$\beta$ -Kristallin mRNA, aus Maus
<i>AP9 R3</i>	2x up	14/8	582	V00728	$\beta$ -Kristallin mRNA, aus Maus
<i>AP9 R3</i>	3x up	15/3	738	X81987	TAXREB 107, aus Maus

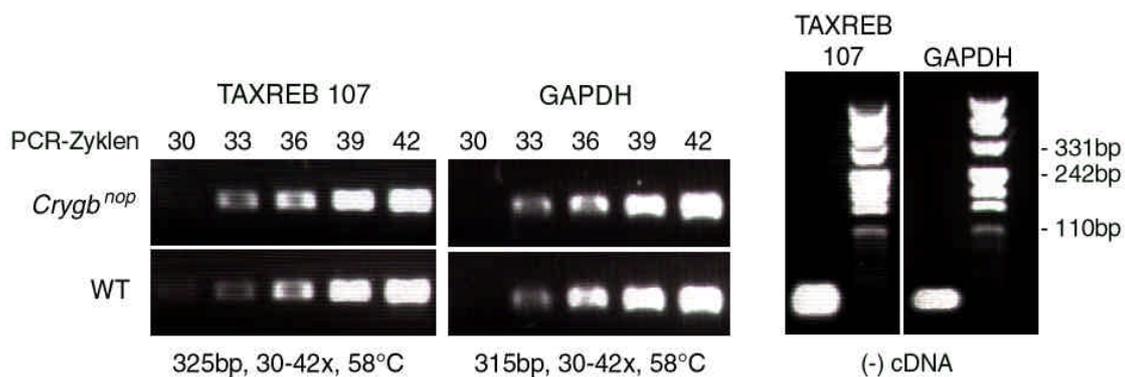
**Tab. 5.1:** Unterschiedlich regulierte Genprodukte in Linsen der *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante, verglichen mit dem Wildtyp. Sequenzen, deren BLAST-Wert mit einem Stern markiert wurde, zeigen nur ungenügende Homologie zum gefundenen Eintrag der BLAST-Datenbank und stellen somit möglicherweise bisher unbekannte Gene dar. *AP*: Anker Primer, *R*: Arbitrary Primer.

### Kristalline

Auffallend ist, daß die überwiegende Anzahl unterschiedlich regulierter Genprodukte als Kristalline identifiziert werden. Die 482bp lange Sequenz des Klons 6/10 (Tabelle 5.1) zeigt 97% Identität zu  $\gamma$ B-Kristallin der Maus. Im Polyacrylamidgel (Abbildung 6.1b) erscheint diese Bande in Linsen der *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante etwa zweifach herunterreguliert. Diese Beobachtung stimmt mit Literaturdaten überein. Die *Northern blot*-Analyse zeigt eine reduzierte Transkription von *Cryg*-mRNA in Linsen der *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante (Graw *et al.*, 1990), was durch *in situ*-Hybridisierung mit einer *gD*-Kristallin Sonde bestätigt wurde (Santhiya *et al.*, 1995). Die vorgeschlagene unterschiedliche Transkription der Kristalline in *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten wurde nicht näher betrachtet, da sie aufgrund ihrer hohen Expression in der Linsen durch weniger sensitive Methoden wie *in situ*-Hybridisierung oder *Northern blotting* quantifiziert werden könnten. Kristalline sind Strukturproteine; aus den Informationen einer unterschiedlichen Transkription wären keine Aufschlüsse über Veränderungen zu erhalten, die zum Abbruch des Differenzierungsprozesses in *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten führen.

TAXREB 107

Ein etwa dreifach hochreguliertes Transkript von 652bp Länge wurde mit 95-prozentiger Identität als mRNA von TAXREB 107 der Maus identifiziert. Das zugehörige Protein fungiert als Adapter für TAX-vermittelte Transaktivierung verschiedener Zielgene, wie *il-2*, *c-fos* und *vimentin* (Nacken *et al.*, 1995). Mit Hilfe vergleichender RT-PCR-Analyse wird das gefundene Transkript auf seine unterschiedliche Regulation in Wildtyp und *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten überprüft (Abbildung 5.7).



**Abbildung 5.7:** Vergleichende RT-PCR-Analyse für TAXREB 107.

Gleiche Mengen cDNA neonataler Wildtyp- und *Crygb<sup>nop</sup>*-Linsen werden einer steigenden Zahl von PCR-Zyklen unterworfen (links, mitte). Ein Ansatz ohne cDNA-Zugabe dient als Negativkontrolle (rechts). Als DNA-Längenstandard wird der *Marker 8* verwendet (MBI, Fermentas).

Für die *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante ist ab 33 Zyklen eine Bande sichtbar und erreicht ab 39 Zyklen ihre Sättigung. Die korrespondierenden Banden des Wildtyps sind in annähernd gleicher Intensität vorhanden. Die visuelle Auswertung zeigt keine signifikant veränderte Regulation von TAXREB 107 in Linsen der *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante.

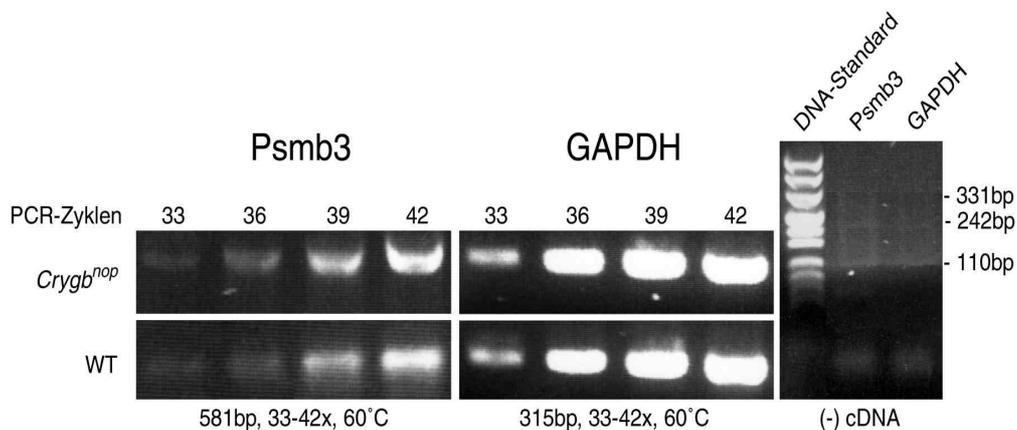
Als invariante Referenz für die vergleichende RT-PCR-Analyse wurde ein 315bp-Fragment der ubiquitär exprimierten Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (*GAPDH*) verwendet. Die ab je 33 Zyklen auftretende *GAPDH*-Bande erreicht bei 39 Zyklen ihre Sättigung. Für die *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante ist bereits ab etwa 33 Zyklen die *TAXREB 107*-Bande sichtbar (325bp).

Die Intensitäten der *GAPDH*-Banden zeigen eine gewisse Schwankungsbreite, welche für die Interpretation der Ergebnisse in Betracht gezogen werden muß. Die bei 33 Zyklen auftretende Bande für die *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante ist etwa 1.5-fach intensiver, bei 36 Zyklen hingegen erscheint sie etwa 1.5-fach vermindert, verglichen mit der korrespondierenden Bande des Wildtyps. Für

die Analyse der TAXREB 107-Intensitäten muß daher eine ähnliche Schwankungsbreite zugrunde gelegt werden. Die TAXREB 107-Bande erreicht zwischen 39 und 42 Zyklen ihre Sättigung, die korrespondierenden Banden aus Wildtyp-cDNA sind in annähernd gleicher Menge vorhanden. Die Auswertung dieser RT-PCR-Reaktion widerlegt daher eine signifikant unterschiedliche Regulation von TAXREB 107 in Linsen von *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten.

### Psmb3

In Linsen der *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante wird ein etwa dreifach schwächer exprimiertes Translationsprodukt mit einer Länge von 445bp gefunden. Es zeigt 98% Identität zur mRNA der Proteasom-Untereinheit C10-II (Psmb3) aus Maus. Die vergleichende RT-PCR-Analyse für Psmb3 ist in Abbildung 5.8 dargestellt.



**Abbildung 5.8:** Vergleichende RT-PCR-Analyse für Psmb3.

Für die PCR-Reaktion werden die gleichen Verdünnungen der neonatalen Wildtyp- und *Crygb<sup>nop</sup>*-cDNA als Matrize verwendet, wie in der vergleichenden RT-PCR für TAXREB 107 (Abbildung 5.7). Die Zahl der PCR-Zyklen steigt von 33 bis 36 (links, mitte); ein Ansatz ohne cDNA-Zugabe dient als Negativkontrolle (rechts).

Um einheitliche Bedingungen für die vergleichende RT-PCR-Analyse zu gewährleisten, wird diese Reaktion mit den gleichen cDNA-Verdünnungen von Wildtyp und *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten durchgeführt, die bereits für die Untersuchung von TAXREB 107 verwendet wurden. Als invariante Referenz dient wieder das amplifizierte 315bp-Fragment von GAPDH.

Die Auswertung dieser Analyse zeigt eine gut sichtbare GAPDH-Bande bei 33 Zyklen, welche für die *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante ein wenig intensiver erscheint, als für den Wildtyp. Bereits ab etwa 36 Zyklen ist eine Sättigung der Banden zu beobachten. Die Verwendung von GAPDH als Referenz für schwach exprimierte Genprodukte ist offenbar ungünstig, da bereits zwischen 33 und

36 Zyklen eine Plateauphase erreicht wird. Durch eine höhere Verdünnung der Matrizen-DNA könnte dieses Problem behoben werden. Daraus ergibt sich jedoch der Nachteil, daß für die PCR-Reaktion kein einheitlicher *Master Mix* mehr verwendet werden kann und daher ein höherer Fehler zu erwarten ist:

Der primäre *Master Mix* enthält neben *Taq*-Polymerase alle notwendigen Komponenten des PCR-Ansatzes, jedoch keine Matrizen-DNA und keine Oligonukleotide. Dieser wird nachfolgend geteilt und die jeweilige Matrizen-DNA zugegeben (Wildtyp und *Crygb<sup>nop</sup>*). Die sekundären *Master Mix*-Ansätze werden in die PCR-Reaktionsgefäße aliquotiert und zuletzt die jeweiligen Oligonukleotide zugegeben. Diese Strategie dient der Fehlerminimierung, da beide Reaktionen (Referenz und Probe) gleiche Mengen an Matrizen-DNA enthalten. Ein Fehler bei der Zugabe der Matrizen-DNA führt zwar zu ungleichen DNA-Konzentrationen zwischen den sekundären *Master Mix*-Ansätzen, über die Bandenintensitäten der Referenzproben kann dieser Fehler jedoch korrigiert werden.

Die PCR-Reaktion für *Psmb3* mit Matrizen-cDNA aus *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten und des Wildtyps zeigt in beiden Fällen einen linearen Anstieg der Bandenintensität von 33 bis 42 Zyklen. Wie bereits für TAXREB 107 beobachtet, muß auch in dieser Reaktion eine gewisse Schwankungsbreite in Betracht gezogen werden. Die visuelle Auswertung zeigt, daß die *Psmb3*-Banden für die *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante in den einzelnen Spuren jeweils geringfügig intensiver erscheinen, als für den Wildtyp. Um denselben Faktor sind auch die Referenzbanden der *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante in allen Spuren intensiver. Daher muß von einer minimal höheren Konzentration der *Crygb<sup>nop</sup>*-Matrizen-DNA zu Beginn des Experiments ausgegangen werden.

Die visuelle Auswertung zeigt eine geringfügig stärkere Expression von *Psmb3* in Linsen der *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante - nach Berücksichtigung des beschriebenen Fehlers stellt sich die unterschiedlich dekodierte Transkription von *Psmb3* in Linsen der *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante jedoch als falsch-positiv heraus.

Die Ergebnisse der differentiellen Genexpressionsanalyse geben keine Hinweise auf die beteiligten Prozesse, welche zu einer veränderten Differenzierung der Linsenfaserzellen von *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten beitragen könnten. Um jedoch die pathologischen Prozesse in der Linse von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten identifizieren zu können, werden die in der Arbeitshypothese (Abschnitte 2.3 und 2.4) beschriebenen Signalwege zwischen Wildtyp und *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante vergleichend analysiert. Im folgenden Abschnitt wird die Umwandlung proliferierender Linsenepithelzellen in elongierende und differenzierende Faserzellen betrachtet.

### 5.3 Eintreten in die postmitotische Phase - Zellzyklusproteine

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß die Expression eines verkürzten  $\gamma$ -Kristallins in der Linse zu einem verminderten Abbau von Zellkernmembranen und DNA führt. Offenbar treten die Faserzellen nicht in ein normales Differenzierungsprogramm ein. Als mögliche Ursache wird ein fehlerhafter Übergang proliferierender Epithelzellen in die postmitotische Phase vorgeschlagen, welcher den terminalen Differenzierungsprozeß beeinträchtigen könnte (Abschnitt 2.3.2). Proliferierende Zellen des Linsenepithels durchlaufen den gesamten Zellzyklus, postmitotische Faserzellen sind jedoch im G<sub>1</sub>-Zustand arretiert (Matsuoka *et al.*, 1995). Diese Umwandlung ist essentiell für den Eintritt der Faserzellen in den terminalen Differenzierungsprozess und wird durch die Expression verschiedener Zellzyklusregulatoren im Linsenbogen reguliert (Zhang *et al.*, 1997). Nachfolgend wird die Expression der beteiligten Zellzyklusproteine, die Komponenten des Cyclin D/cdk4-Komplexes und des darauf wirkenden p57<sup>kip2</sup>-Inhibitors, in Linsen von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten untersucht.

#### 5.3.1 Expression von Zellzyklusproteinen in Linsen von *Crygb*<sup>nop</sup>-Mutanten

Die Cyclin-abhängige Kinase cdk4 interagiert spezifisch mit Cyclinen der D-Familie und bildet einen aktiven Komplex, der den G<sub>1</sub>/S-Phasenübergang des Zellzyklus steuert (Lovicu *et al.*, 1999). Abbildung 5.9 zeigt die Expression von **cdk4** in neonatalen Wildtyp- und *Crygb*<sup>nop</sup>-Linsen. Die Faserzellen der *Crygb*<sup>nop</sup>-Mutante sind im anterioren Bereich etwas stärker gefärbt als im Wildtyp, cdk4 erscheint vorwiegend in den Zellkernen beider Linsen lokalisiert. Für die Zellkerne des Linsenepithels und der Faserzellen ist kein Unterschied in der cdk4-Expression erkennbar, sie erscheinen intensiv gefärbt. Ebenso unterscheiden sich junge Faserzellen im Bereich des Linsenbogens nicht von den hochdifferenzierten Zellen des Linsenkerne.

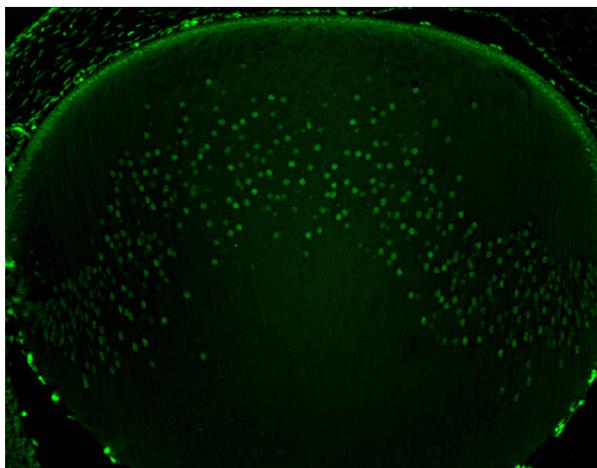


Abb. 5.9a

WT P1

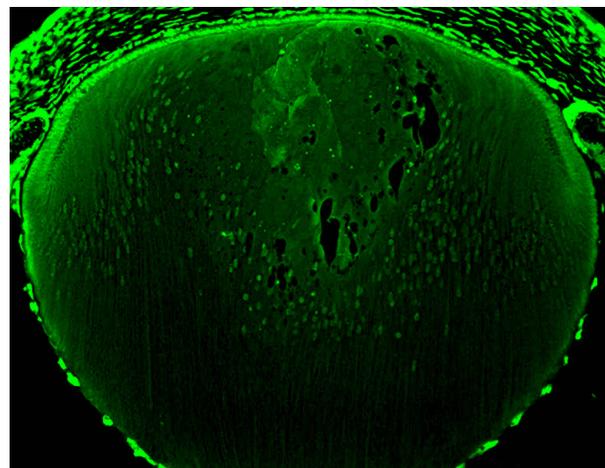
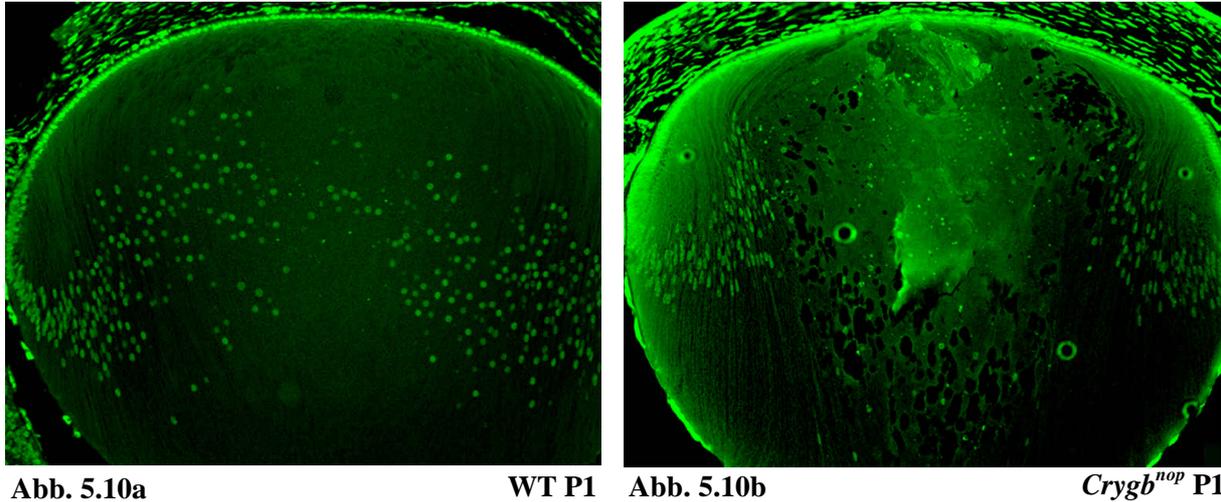


Abb. 5.9b

*Crygb*<sup>nop</sup> P1

**Abbildung 5.9:** Immunhistochemische Detektion von cdk4 in neonatalen Linsen des Wildtyps (links; 5.9a) und *Crygb*<sup>nop</sup>-Mutanten (rechts; 5.9b).

Abbildung 5.10 zeigt die Expression von **Cyclin D<sub>1</sub>** in neonatalen Linsen. Cyclin D<sub>1</sub> ist vorwiegend in den Zellkernen des Linsenepithels und der Faserzellen lokalisiert. Im anterioren Bereich der *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante ist eine etwas stärkere cytoplasmatische Färbung erkennbar, als im Wildtyp. Die Expression von Cyclin D<sub>1</sub> in jungen Faserzellen des Linsenbogens unterscheidet sich nicht von Zellen aus dem zentralen Bereich der Linse.



**Abbildung 5.10:** Immunhistochemische Detektion von Cyclin D<sub>1</sub> in neonatalen Linsen des Wildtyps (links; 5.10a) und *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten (rechts; 5.10b).

Im Linsenbogen erfolgt die Expression von  $p57^{kip2}$ , einem allosterischen Inhibitor des Cyclin D/cdk4-Komplexes. Ein erneuter Eintritt differenzierender Faserzellen in den Zellzyklus wird somit verhindert. Abbildung 5.11 zeigt die Expression von  $p57^{kip2}$  im Linsenbogen von Wildtyp und *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten der Stadien E15.5 und E18.5.

Die zentralen Faserzellen des Wildtyps sind in beiden Abbildungen negativ für  $p57^{kip2}$  (Abbildung 5.11a und 5.11c). Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit Literaturdaten, wengleich die Expression von  $p57^{kip2}$  im Linsenbogen durch *in situ*-Hybridisierung der mRNA bestimmt wurde (Lovicu *et al.*, 1999). In *Crygb<sup>nop</sup>*-Linsen des Stadiums E15.5 ist die Expression von  $p57^{kip2}$  auf den Linsenbogen beschränkt (Abbildung 5.11b). Die Linsen des Stadiums E18.5 zeigen bereits einen vakuolisierten Linsenkerne mit teilweise abgebauten Zellmembranen, wodurch in dieser Region eine unspezifische Bindung der verwendeten Antikörper an das Gewebe beobachtet wird. Die zentrale Färbung des Linsenkerne in *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten ist daher möglicherweise ein Artefakt (Abbildung 5.11d).

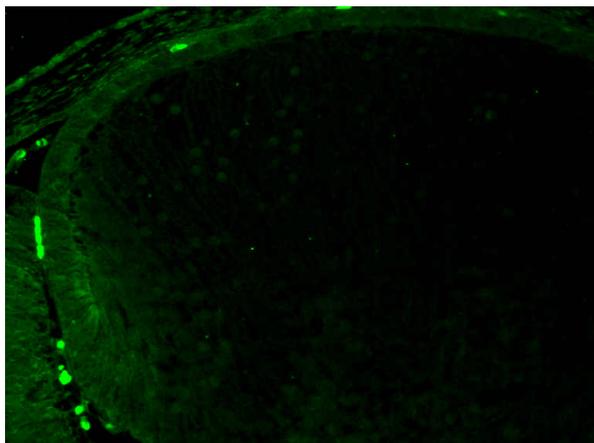


Abb. 5.11a

WT E15.5

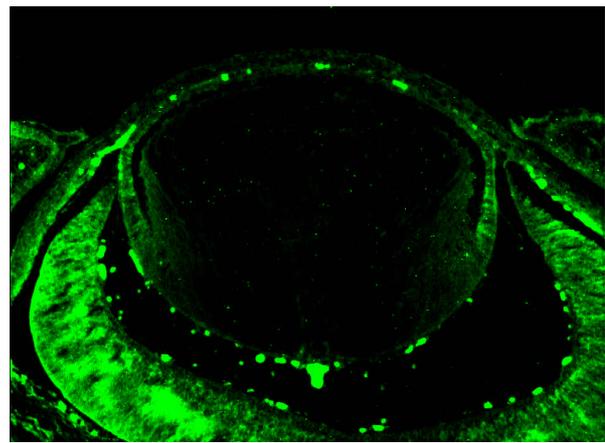


Abb. 5.11b

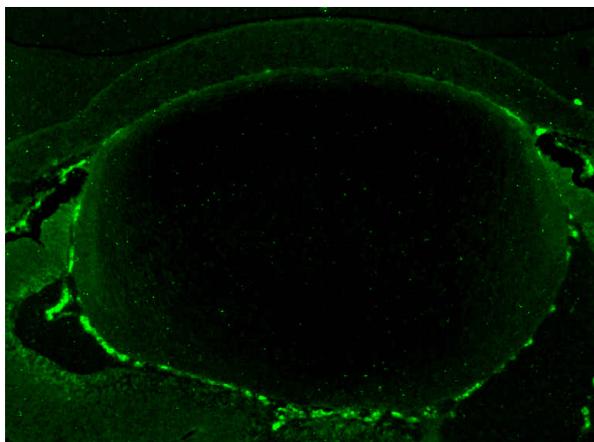
*Crygb<sup>nop</sup>* E15.5

Abb. 5.11c

WT E18.5

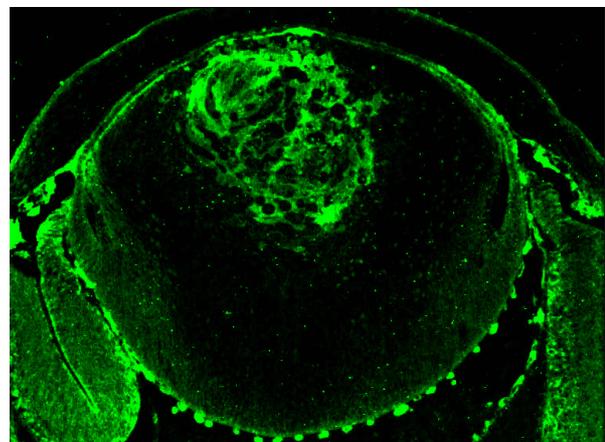


Abb. 5.11d

*Crygb<sup>nop</sup>* E18.5

**Abbildung 5.11:** Immunhistochemische Detektion von p57<sup>kip2</sup> in Linsen der Stadien E15.5 und E18.5 von Wildtyp (links; a, c) und *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten (rechts; b, d).

### 5.3.2 Expression von Zellzyklusproteinen in Linsen der *Cryge<sup>f</sup>*-Mutante

Der frühe Wachstumsstopp primärer Faserzellen in Linsen des *Cryge<sup>f</sup>*-Phänotyps legt eine massive Störung ihres Differenzierungsprozesses nahe. Möglicherweise wird diese durch eine veränderte Zellzyklusregulation verursacht. In Abbildungen 5.12 und 5.13 ist das Expressionsmuster von cdk4 und Cyclin D<sub>1</sub> in den Linsen der *Cryge<sup>f</sup>*-Mutante dargestellt.

Neonatale Linsen des Wildtyp zeigen nur eine geringe cytoplasmatische Färbung für **cdk4**. Die Zellkerne erscheinen blau-grün gefärbt, hervorgerufen durch additive Mischung der sich überlagernden Signale (Abbildung 5.12a). In neonatalen Linsen der *Cryge<sup>f</sup>*-Mutante wird eine vorwiegende Lokalisation von cdk4 im Cytoplasma beobachtet (Abbildung 5.12b). Die primären Faserzellen am posterioren Pol der Linsenkapsel der *Cryge<sup>f</sup>*-Mutante sind intensiv

gefärbt. Auch im Wildtyp erscheint der vergleichbare, aus primären Faserzellen bestehende zentrale Bereich der Linse **cdk4**-positiv (siehe auch Abbildung 5.9a), ebenso wie die sekundären Faserzellen des Linsenbogens (Abbildung 5.12).

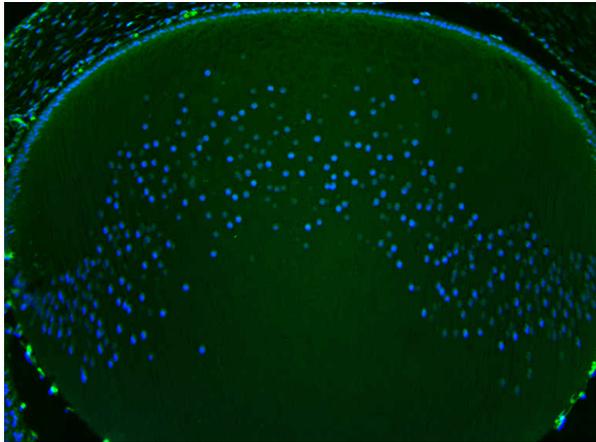


Abb. 5.12a

WT P1

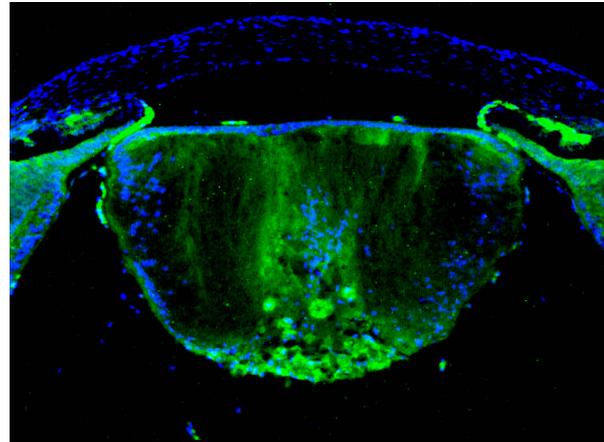


Abb. 5.12b

*Cryge*<sup>1</sup> P1

**Abbildung 5.12:** Immunhistochemische Detektion von **cdk4** (grün) in neonatalen Linsen des Wildtyps (links; 5.12a) und *Cryge*<sup>1</sup>-Mutanten (rechts; 5.12b). Ein chromatin-spezifischer Farbstoff (DAPI) wird für die Anfärbung der Zellkerne verwendet (blau). Kolokalisierende Signale erscheinen blau-grün, hervorgerufen durch additive Farbmischung.

Die Expression von **Cyclin D<sub>1</sub>** in der Linse von *Cryge*<sup>1</sup>-Mutanten ist in Abbildung 5.13b dargestellt. Man beobachtet eine intensive cytoplasmatische Lokalisation im Linsenbogen und in den posterior komprimierten primären Faserzellen. Im Gegensatz zum Wildtyp ist auch für Cyclin D<sub>1</sub> keine ausgeprägte Färbung der Zellkerne erkennbar. Im **Wildtyp** erscheinen die Zellkerne des Linsenbogens intensiv gefärbt (Abbildung 5.13a). Die cytoplasmatische Färbung geht mit zunehmendem Differenzierungsgrad verloren; die Zellkerne der zentralen primären Faserzellen bleiben jedoch positiv für Cyclin D<sub>1</sub> (siehe auch Abbildung 5.10a).

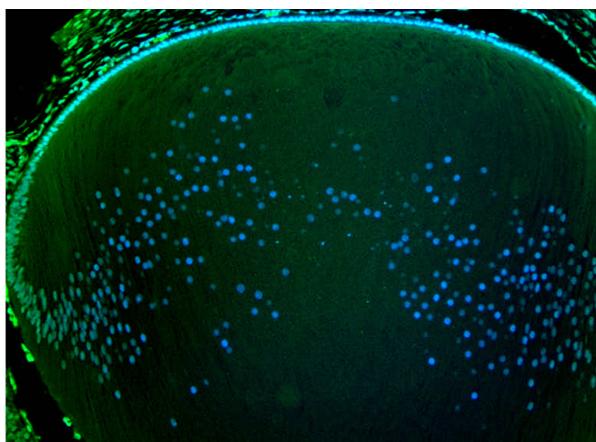


Abb. 5.13a

WT P1

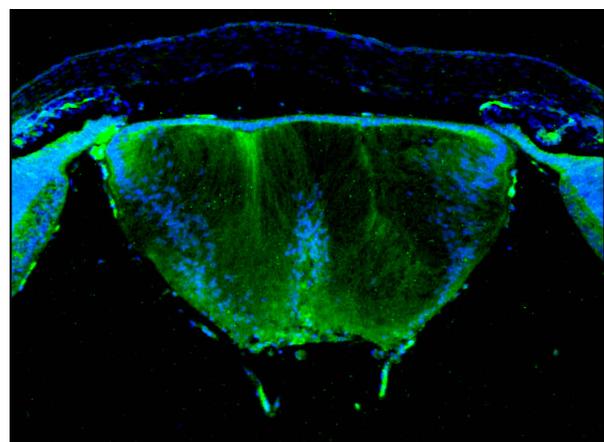


Abb. 5.13b

*Cryge*<sup>1</sup> P1

**Abbildung 5.13:** Immunhistochemische Detektion von Cyclin D<sub>1</sub> (grün) in neonatalen Linsen des Wildtyps (links; 5.13a) und *Cryge*<sup>1</sup>-Mutanten (rechts; 5.13b). Ein chromatin-spezifischer Farbstoff (DAPI) wird für die Anfärbung der Zellkerne verwendet (blau). Überlagerte Signale sind blau-grün.

In Abbildung 5.14 ist die Expression des allosterischen Cyclin D/cdk4-Inhibitors  $p57^{kip2}$  in der Linse von *Cryge<sup>f</sup>*-Mutanten dargestellt. Im Bereich der jungen sekundären Faserzellen des Linsenbogens ist eine starke cytoplasmatische Expression dieses Zellzyklusinhibitors sichtbar. Mit steigendem Differenzierungsgrad der Faserzellen geht das cytoplasmatische Signal verloren, während  $p57^{kip2}$  zunehmend in den Zellkernen des Linsenkortex lokalisiert ist. In den hochdifferenzierten primären Faserzellen des Linsenkerns hingegen ist kein  $p57^{kip2}$  mehr detektierbar (Abbildungen 5.14a und 5.14c).

In der Linse von *Cryge<sup>f</sup>*-Mutanten verläuft dieser Prozeß verspätet. Auffallend ist die starke cytoplasmatische Expression von  $p57^{kip2}$  in der gesamten Linse ab E15.5, während der Linsenkern des Wildtyps negativ erscheint (Abbildungen 5.14a und 5.14c). Während der posterioren Kompression primärer Linsenfaserzellen in der Linsenkapsel bleibt ihr cytoplasmatisches  $p57^{kip2}$ -Signal erhalten. Die Zellkerne primärer Faserzellen werden daher erst verspätet sichtbar, etwa ab Tag E18.5 (Abbildung 5.14d).

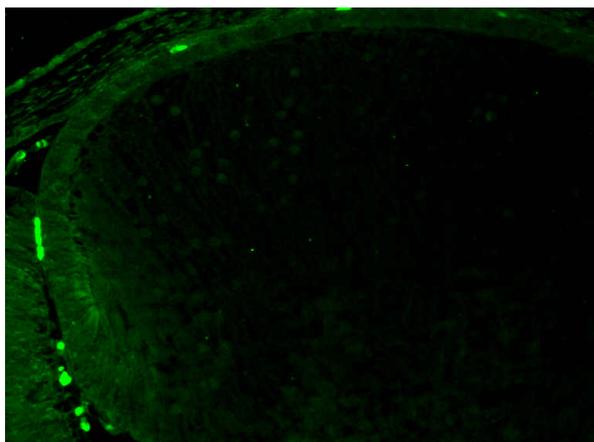


Abb. 5.14a

WT E15.5

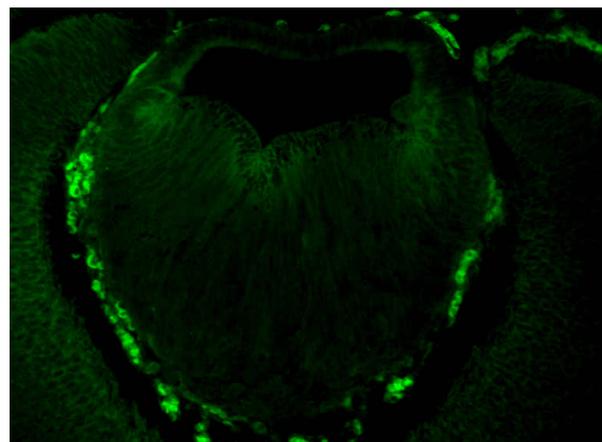


Abb. 5.14b

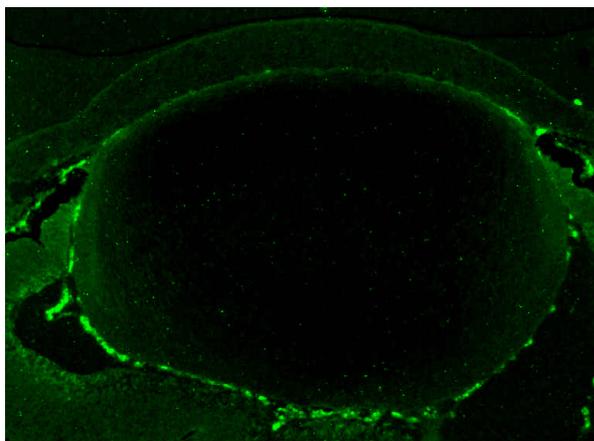
*Cryge<sup>f</sup>* E15.5

Abb. 5.14c

WT E18.5

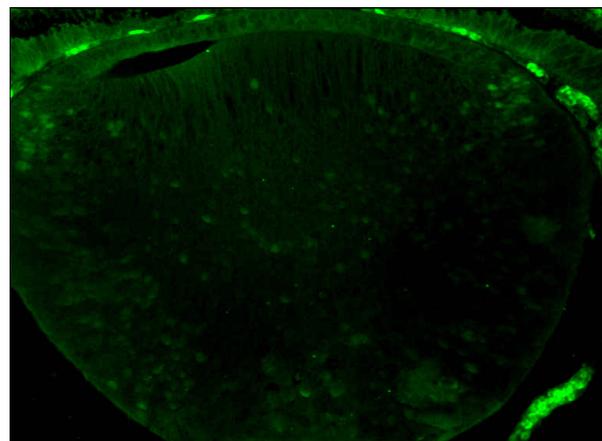


Abb. 5.14d

*Cryge<sup>f</sup>* E18.5

**Abbildung 5.14:** Immunhistochemische Detektion von  $p57^{kip2}$  in Linsen der Stadien E15.5 und E18.5 von Wildtyp (links; a, c) und *Cryge<sup>f</sup>*-Mutanten (rechts; b, d).

#### **5.4 Untersuchung terminaler Differenzierung von Linsenfaserzellen**

Die histologische Analyse (Abschnitt 5.1) zeigt einen drastisch verminderten Zellkernabbau in den Linsenfaserzellen beider untersuchter  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten. Offensichtlich ist ihr Differenzierungsprogramm gestört. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse wurde die Arbeitshypothese entwickelt, daß die Expression eines verkürzten  $\gamma$ -Kristallins (Abschnitt 5.2.1) als Ursache für ihr pathologisch verändertes Differenzierungsprogramm angesehen werden muß.

Um die beobachteten Abweichungen zu verstehen, ist es jedoch notwendig, den zeitlichen Ablauf der terminalen Differenzierung von Linsenfaserzellen genauer zu untersuchen.

Die letzten Ereignisse terminaler Differenzierung von Linsenfaserzellen sind durch die Fragmentierung der Zellkerne und der DNA charakterisiert. Diese Ereignisse werden in den folgenden Abschnitten genauer untersucht. Der Abbau von Zellorganellen, und damit auch die DNA-Fragmentierung in differenzierenden Linsenfaserzellen, sind aufgrund der Vermeidung von Streulichteffekten essentiell für die optischen Eigenschaften der Linse (Bassnett *et al.*, 1992; Bassnett *et al.*, 1997).

Ziel dieser Analyse ist die Identifizierung von molekularen Ereignissen, welche mit der terminalen Differenzierung von Linsenfaserzellen verknüpft sind. Ihre Analyse in Linsen von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten soll nachfolgend die Frage klären, ob die Faserzellen ein terminales Differenzierungsprogramm durchlaufen und welcher Abschnitt ihrer Differenzierung gestört ist.

#### 5.4.1 Fragmentierung von Zellkernmembran und DNA in Linsenfaserzellen

Eine spezifische Anfärbung fragmentierter DNA ermöglicht der TUNEL-Assay. Mit Hilfe einer terminalen Transferase wird hierbei ein fluoreszenzmarkiertes Nukleotid (FITC-dUTP) an die freien 3'-OH-Enden der entstandenen Oligonukleotide angehängt (Abschnitt 4.3.5.1). Die Kombination des TUNEL-Assays mit immunhistochemischen Methoden ermöglicht darüber hinaus die Untersuchung des zeitlichen Zusammenhangs zwischen der Fragmentierung von Kernmembranen und dem Beginn des DNA-Abbaus in Linsenfaserzellen (Abbildung 5.15). In den Aufnahmen 5.15a und 5.15b sind jeweils die letzten intakten Zellkerne in der Übergangszone zwischen sekundären Faserzellen des Linsenbogens und dem Linsenkern dargestellt. Mit Hilfe eines gegen die Lamin-Komponenten der Zellkernmembran gerichteten monoklonalen Antikörpers ließ sich zeigen, daß in differenzierenden Linsenfaserzellen die DNA-Fragmentierung (grün) erst nach begonnenem Abbau der Zellkernmembran einsetzt (rot).

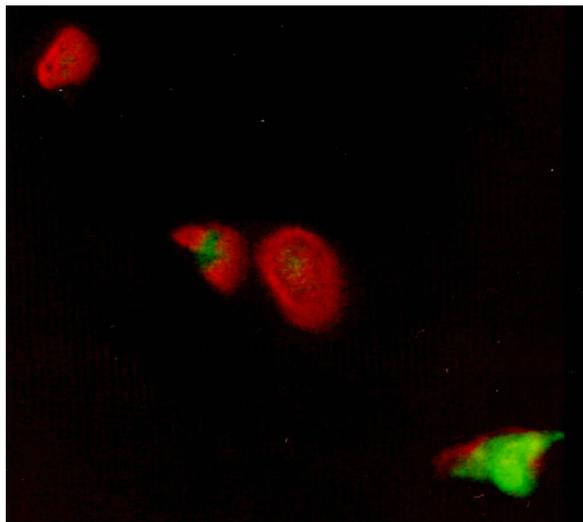


Abb. 5.15a



Abb. 5.15b

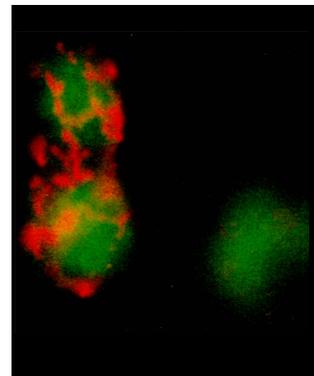


Abb. 5.15c

**Abbildung 5.15:** Zeitliche Abfolge der letzten Schritte terminaler Differenzierung von Linsenfaserzellen. Zellkernmembranen werden mit einem monoklonalen anti-Lamin B-Antikörper angefärbt (rot). DNA-Strangbrüche werden nach Markierung mit terminaler Transferase detektiert (grün). Mit abnehmender Integrität der Zellkernmembran (intakte Zellkerne sind jeweils links oben in 5.15a, 5.15b gezeigt) wird zunehmende DNA-Fragmentierung sichtbar (grüne Zellkerne jeweils unten rechts).

#### 5.4.2 Beginn des DNA-Abbaus in Linsenfaserzellen

Im vorigen Abschnitt wurde gezeigt, daß der DNA-Abbau in differenzierenden Linsenfaserzellen eng an die Fragmentierung der Zellkernmembran gekoppelt ist; intakte Zellkerne beinhalten keine fragmentierte DNA. Elektronenmikroskopische Studien zeigen jedoch einen

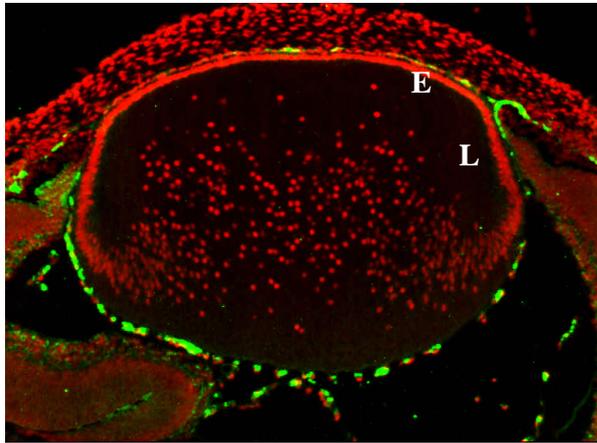


Abb. 5.16a WT E18.5

**Abbildung 5.16a:** Die Zellkerne embryonaler Linsen zeigen keine fragmentierte DNA (grün). Intakte DNA ist mit einem Interkalationsfarbstoff angefärbt (rot). E: Linsenepithel, L: Linse.

beginnenden Abbau der Zellkerne während embryonaler Linsenentwicklung (Vrensen *et al.*, 1991). Somit war zu erwarten, daß auch der DNA-Abbau bereits in embryonalen Stadien beginnt. Entgegen dieser Voraussage kann ein DNA-Abbau unter Entstehung von freien 3'-OH-Enden in embryonalen Linsen nicht bestätigt werden (Abbildung 5.16a). Wird das Linsengewebe mit **DNase I** vorinkubiert, können die enzymatisch induzierten 3'-OH-Enden durch die TUNEL-Reaktion detektiert werden (Abbildung 5.16b; grün). Der postulierte DNA-

Abbau in embryonalen Linsen könnte jedoch über einen anderen Weg verlaufen, welcher durch die 3'-OH-Selektivität der terminalen Transferase nicht nachweisbar wäre. Die Variante der DNA-Spaltung unter Entstehung blockierter 3'-Phosphat- und freier 5'-OH-Enden wurde die vorausgehende enzymatische Dephosphorylierung mit **PNK** jedoch ausgeschlossen; die Zellkerne der Linse bleiben TUNEL-negativ (Abbildung 5.16c).

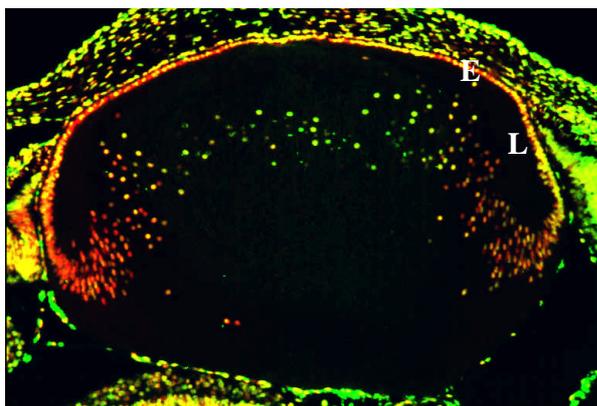


Abb. 5.16b WT E18.5

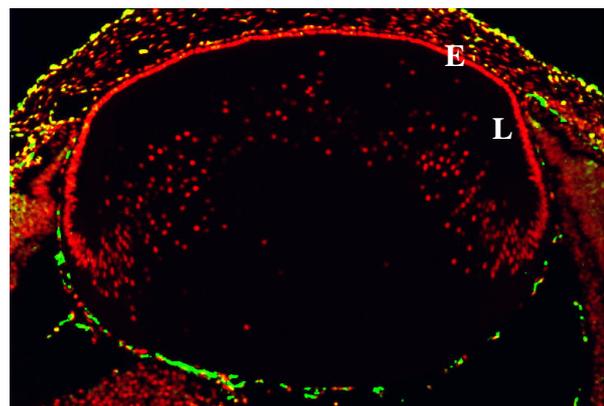


Abb. 5.16c WT E18.5

**Abbildungen 5.16b und 5.16c:** TUNEL-Reaktion in embryonalen Linsen des Wildtyps (E18.5). **DNase I**-induzierter Abbau von DNA (30min, 37°C) erzeugt freie 3'-OH-Enden, die durch nachfolgende TUNEL-Reaktion (grün) nachgewiesen werden können (Abbildung 5.16b). Eine der TUNEL-Reaktion vorausgehende **Dephosphorylierung mit PNK** (60min, 37°C) widerlegt einen hypothetischen DNA-Abbau in embryonalen Linsen unter Entstehung 3'-Phosphat-Enden (Abbildung 5.16c). Intakte DNA ist mit einem Interkalationsfarbstoff gefärbt (rot). E: Linsenepithel, L: Linse.

### 5.4.3 DNA-Fragmentierung in *Cryge*<sup>f</sup>-Linsen

Die histologische Analyse von *Cryge*<sup>f</sup>-Mutanten (Abschnitt 5.1) belegt einen verminderten Zellkernabbau in den Linsenfaserzellen. Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, daß der terminale Differenzierungsprozeß gestört ist. Durch Analyse der DNA-Fragmentierung in Linsenfaserzellen von *Cryge*<sup>f</sup>-Mutanten soll diese Hypothese nun überprüft werden.

Während in embryonalen Stadien kein DNA-Abbau in der Linse beobachtet wird, ist eine nahezu zellkernfreie Zone im Zentrum der neonataler Linsen des **Wildtyps** erkennbar. Die ersten sichtbaren Zellkerne der zentralen sekundären Faserzellen zeigen eine vollständig fragmentierte DNA (grün), während die jungen sekundären Faserzellen des Linsensbogens keine DNA-Strangbrüche aufweisen und daher durchgehend rot gefärbt erscheinen. Einige, dem Linsenkern benachbarte sekundäre Faserzellen des Wildtyps erscheinen orange gefärbt, hervorgerufen durch kolokalisierende Signale von intakter und teilweise fragmentierter DNA (Abbildung 5.17a).

Im Vergleich zum Wildtyp beschränkt sich die DNA-Fragmentierung in der Linse neonataler *Cryge*<sup>f</sup>-Mutanten auf die nach posterior gepreßten primären Linsenfaserzellen, welche im TUNEL-Assay grün gefärbt sind. Gut erkennbar ist zudem die periphere Anordnung der Zellkerne sekundärer Faserzellen in der Linsenkapsel von *Cryge*<sup>f</sup>-Mutanten. In den sekundären Faserzellen der *Cryge*<sup>f</sup>-Mutante findet offensichtlich kein DNA-Abbau statt, da ihre Zellkerne durchgehend rot gefärbt erscheinen (Abbildung 5.17b).

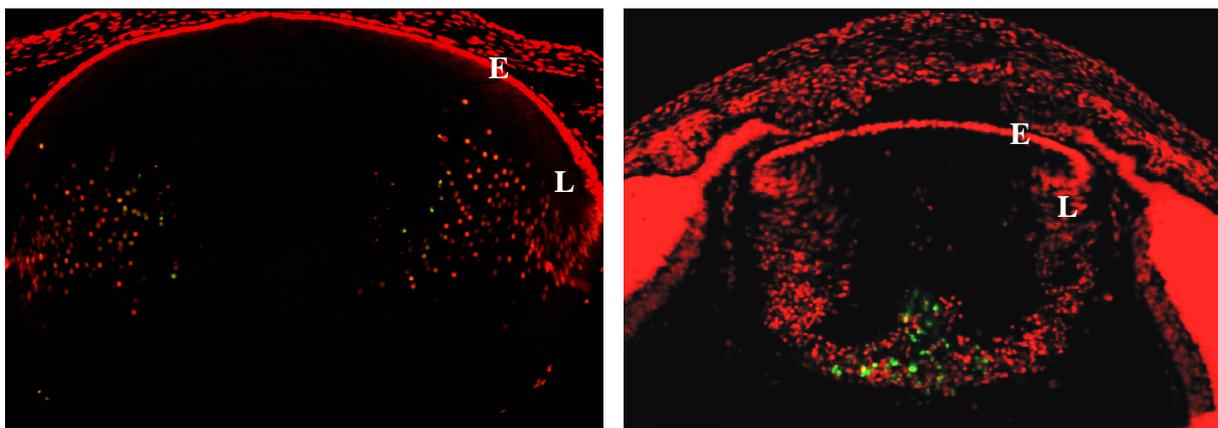


Abb. 5.17a

WT P1

Abb. 5.17b

*Cryge*<sup>f</sup> P1

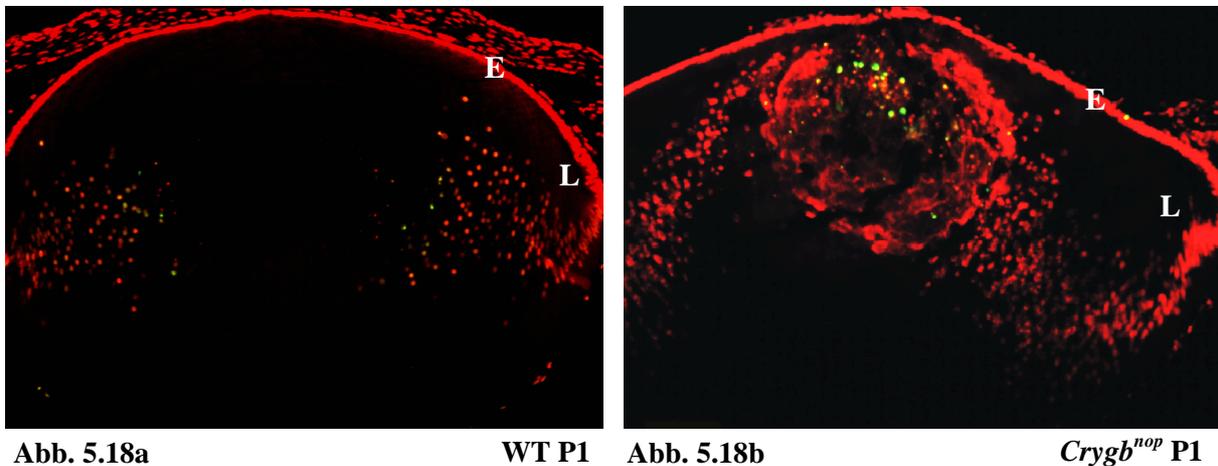
**Abbildung 5.17:** Detektion von fragmentierter DNA in neonatalen Linsen des Wildtyps (links; 5.17a) und homozygoten *Cryge*<sup>f</sup>-Mutanten (rechts; 5.17b). Intakte DNA wird durch einen Interkalationsfarbstoff angefärbt (rot). In *Cryge*<sup>f</sup>-Mutanten beschränkt sich die DNA-Fragmentierung auf die in der posterioren Hemisphäre der Linsenkapsel komprimierten primären Faserzellen. Die Zellkerne der peripher angeordneten sekundären Faserzellen enthalten ausschließlich intakte DNA.

E: Linsenepithel, L: Linse.

#### 5.4.4 DNA-Fragmentierung in *Crygb<sup>nop</sup>*-Linsen

Neonatale Linsen des Wildtyps zeigen eine beginnende DNA-Fragmentierung in kortikalen sekundären Faserzellen (grün), sowie eine nahezu DNA- und zellkernfreie Zone innerhalb des Linsenkerns (Abbildung 5.18a). Im Vergleich zum Wildtyp zeigen neonatale Linsen der *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante einen stark verminderten DNA-Abbau in ihren Faserzellen.

Nur einige zentrale Zellkerne des embryonalen Linsenkerns erscheinen TUNEL-positiv, der Linsenkern ist ringförmig von zerstörten sekundären Faserzellen umgeben. Während ihrer Zytolyse werden offensichtlich keine DNA-Strangbrüche induziert, da sie durchgehend rot gefärbt erscheinen. Die Zellkerne von sekundären Faserzellen außerhalb dieser Zone enthalten ebenfalls ausschließlich intakte DNA (Abbildung 5.18b).



**Abbildung 5.18:** Detektion von fragmentierter DNA in neonatalen Linsen des Wildtyps (links; 5.18a) und homozygoten *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten (rechts; 5.18b). Lediglich einige primäre Faserzellen im Zentrum der Linse von *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten erscheinen TUNEL-positiv (grün). Gut erkennbar ist die Freisetzung von intakter DNA durch die Zytolyse sekundärer Faserzellen, welche den Linsenkern ringförmig umgeben (rot). E: Linsenepithel, L: Linse.

Die in Abbildung 5.18b beobachtbare Zerstörung der Zellmembranen zentraler Faserzellen in der Linse von *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten zeigt Ähnlichkeiten zu apoptotischen Prozessen. Während des programmierten Zelltodes werden eine Reihe von morphologischen Veränderungen sichtbar, unter anderem auch die Auflösung der Zellmembran durch Bildung und Abschnürung sogenannter "apoptotischer Vesikel". Auch die Faserzellen der Linse besitzen die Fähigkeit, Apoptose zu initiieren, beispielsweise durch Aktivierung von p53 (Abschnitte 2.4.2 und 2.4.3). Die Auflösung der Faserzellen führt nachfolgend zur Entstehung einer Linsentrübung (Pan *et al.*, 1995).

## 5.5 Apoptotische Prozesse in Linsen des *Crygb<sup>nop</sup>*-Phänotyps

Die bisher dargestellten pathologischen Veränderungen, wie Schwellung der Faserzellen und Zytolyse ihrer Zellmembranen, lassen die Beteiligung apoptotischer Prozesse während der Linsenentwicklung von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten vermuten. Gegenstand des vorliegenden Kapitels ist daher die Untersuchung verschiedener Elemente der programmierten Zelltodkaskade in der Linse des *Crygb<sup>nop</sup>*-Phänotyps.

### 5.5.1 Einführung eines inaktiven *p53*-Allels

Um die Abhängigkeit der phänotypischen Entwicklung von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten von apoptotischen Prozessen zu untersuchen, wurde durch Kreuzungsexperimente ein **inaktives *p53*-Allel** in die homozygot gehaltene *Crygb<sup>nop</sup>*-Linie eingeführt. In der F<sub>1</sub>-Generation einer (*p53<sup>-/-</sup>* x *Crygb<sup>nop/nop</sup>*)-Kreuzung bleibt der dominante Phänotyp der *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutation erhalten. Dieses Ergebnis zeigt, daß für die Ausprägung des *Crygb<sup>nop</sup>*-Phänotyps offenbar nur ein intaktes maternales *p53*-Allel notwendig ist. Die Etablierung einer für beide *p53*-Allele defekten Linie wurde aufgrund einer problematischen PCR-Analytik nicht weiter verfolgt.

Gut erkennbar ist der vakuolisierte Linsenkern und der verminderte, auf die primären Faserzellen beschränkte DNA-Abbau im Zentrum der neonatalen Linse (Abbildung 5.19a, grün). Mit dem spezifischen anti-*Crygb<sup>nop</sup>*-Antikörper (Abschnitt 5.2.1) werden Expressionsbereiche des verkürzten  $\gamma$ B-Kristallins angefärbt (rot). Die vergrößerte Aufnahme zeigt die teilweise Lokalisierung des mutierten  $\gamma$ B-Kristallins in den Zellkernen sekundärer Linsenfasern (Abbildung 5.19b, purpur).

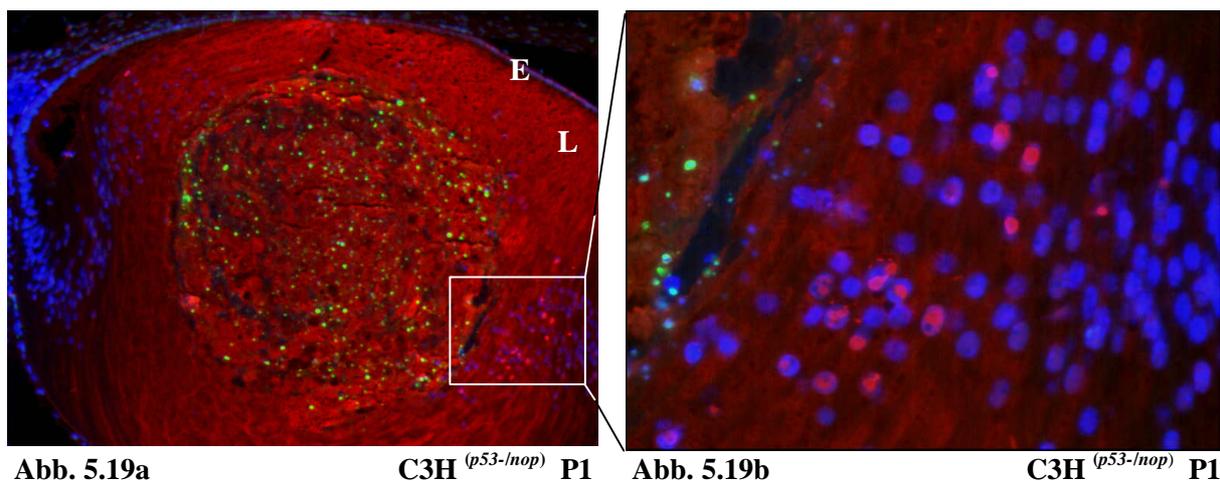


Abb. 5.19a

C3H (*p53<sup>-/-</sup>*) P1

Abb. 5.19b

C3H (*p53<sup>-/-</sup>*) P1

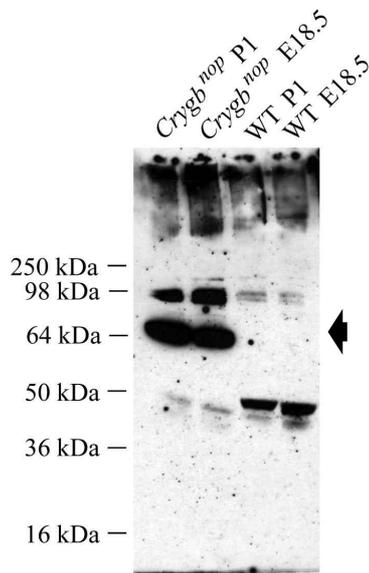
**Abbildung 5.19:** Phänotypische Analyse der Linse von C3H (*p53<sup>-/-</sup>*/*Crygb<sup>nop/nop</sup>*)-Mäusen.

Expressionsbereiche des veränderten *Crygb<sup>nop</sup>*-Kristallins werden mit Hilfe des anti-*Crygb<sup>nop</sup>*-Antikörpers angefärbt (rot). DNA-Strangbrüche werden nach Markierung mit terminaler Transferase detektiert (grün). Ein chromatin-spezifischer Farbstoff wird für die Anfärbung von Zellkernen verwendet (DAPI, blau). Übersichtsfärbung (links; 5.19a) und vergrößerter Ausschnitt (rechts; 5.19b).

E: Linsenepithel; L: Linse.

### 5.5.2 Spaltung von PARP

Caspase-3 wird aufgrund ihrer Substratspezifität für Lamin-Komponenten der Zellkernmembran und ICAD (Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase) als zentraler Effektor für die typischen morphologischen Veränderungen apoptotischer Zellen betrachtet. Caspase-3



**Abbildung 5.20:** Western blot von Wildtyp- und *Crygb<sup>nop</sup>*-Linsenextrakten (je 30µg) zur Detektion von PARP (116kDa). Das polyklonale Antiserum zeigt eine starke Reaktion mit *Crygb<sup>nop</sup>*-Linsenextrakten auf Höhe von etwa 85kDa (Pfeil), dem Molekulargewicht des gespaltenen PARP-Fragments.

bewirkt zudem die proteolytische Spaltung von **PARP** (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) und inaktiviert somit das zelleigene Reparatursystem für DNA-Strangbrüche (Pastorino *et al.*, 1998). Die Überprüfung der Aktivität von Caspase-3 anhand spezifischer Abbauprodukte auf proteinbiochemischem Wege stellt daher eine verlässliche Methode für den Nachweis apoptotischer Prozesse dar.

Linsenextrakte zeigen im *Western blot* eine spezifische Reaktion des polyklonalen Antiserums mit dem ungespaltenen PARP Polypeptids bei etwa 116kDa (Abbildung 5.20). In *Crygb<sup>nop</sup>*-Linsenextrakten wird das Caspase-3-vermittelte **PARP-Abbauprodukt** auf Höhe von 85kDa nachweisen (Pfeil), während Extrakte des Wildtyps keine Reaktion zeigen.

### 5.5.3 Freisetzung von Cytochrom C

Der im vorigen Abschnitt geführte Nachweis von Caspase-3-vermittelten Spaltprodukten in der *Crygb<sup>nop</sup>*-Linse unterstützt die Hypothese, daß die beobachteten pathologischen Veränderungen der Faserzellen durch programmierten Zelltod hervorgerufen werden. Allerdings liefert diese Methode keine Informationen darüber, welche Faserzellen apoptotisch sind. Durch die immunhistochemische Lokalisation auslösender/regulierender Faktoren apoptotischer Prozesse, wie die mitochondriale Freisetzung von **Cytochrom C**, sowie die Expression von Bcl-2 und Bax (Abschnitt 2.4.2), können die gesuchten Information erhalten werden.

In Abbildung 5.21 ist die Anfärbung neonataler *Crygb<sup>nop</sup>*-Linsen mit einem Anti-Cytochrom C-Antikörper gezeigt (grün), ein chromatin-spezifischer Farbstoff wird zur Anfärbung der Zellkerne verwendet (DAPI, blau). Im zentralen Bereich der *Crygb<sup>nop</sup>*-Linse ist eine grün-

blaue Färbung sichtbar, hervorgerufen durch kolocalisierende Signale von Cytochrom C und DAPI. Im Wildtyp beschränkt sich die Expression von Cytochrom C auf den Linsenbogen (Abbildung 5.21a).

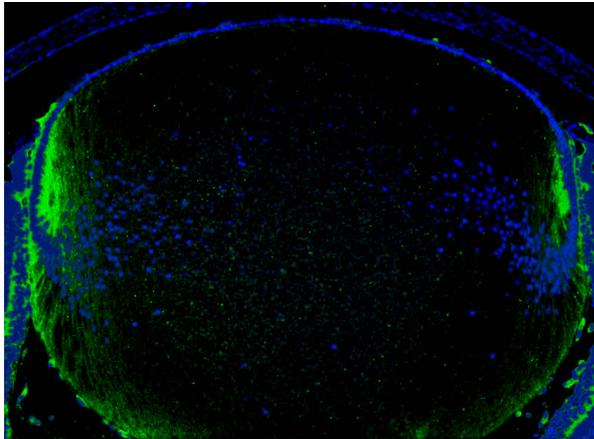


Abb. 5.21a

WT P1

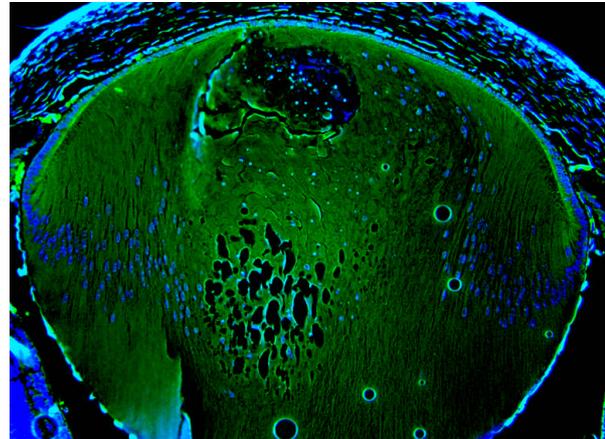


Abb. 5.21b

*Crygb<sup>nop</sup>* P1

**Abbildung 5.21:** Immunhistochemische Detektion von Cytochrom C in neonatalen Linsen des Wildtyps (links; 5.21a) und *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten (rechts; 5.21b).

#### 5.5.4 Expression von *Bcl-2* in Linsenfaserzellen

Abbildung 5.22 zeigt die Expression von *Bcl-2* in der Linse neonataler *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten. Die Kernmembranen primärer und sekundärer Faserzellen erscheinen intensiv gefärbt. Ein diffuses cytoplasmatisches Signal wird durch das im endoplasmatischen Retikulum und in den Mitochondrien lokalisierte **Bcl-2** verursacht. Die beobachtete subzelluläre Lokalisation von *Bcl-2* in der Kernmembran und im Cytoplasma stimmt mit Literaturdaten überein (Krajewski *et al.*, 1993). Signifikante Unterschiede in der Expression von *Bcl-2* zwischen Linsen des Wildtyps und *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten werden nicht beobachtet (Abbildung 5.22a und 5.22b).

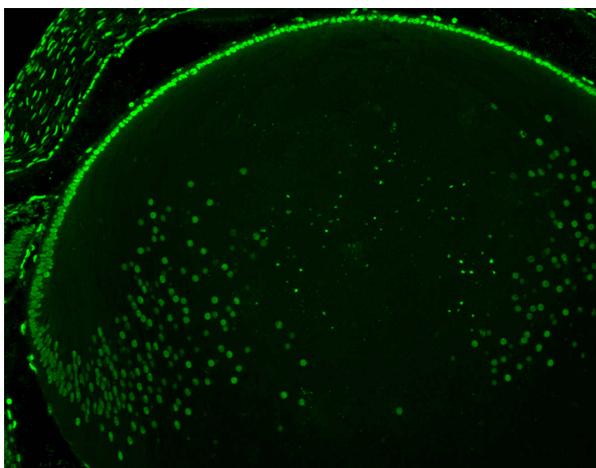


Abb. 5.22a

WT P1

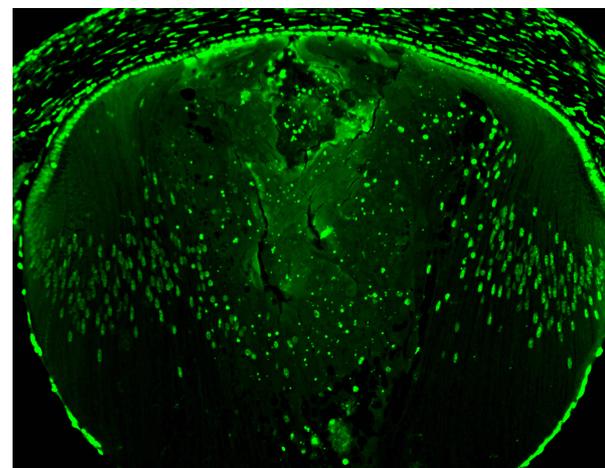


Abb. 5.22b

*Crygb<sup>nop</sup>* P1

**Abbildung 5.22:** Immunhistochemische Detektion von *Bcl-2* in neonatalen Linsen des Wildtyps (links; 5.22a) und *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten (rechts; 5.22b).

### 5.5.5 Expression von Bax

Gravierende Unterschiede im Expressionsmuster zwischen Linsen des Wildtyps und *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten zeigen sich für **Bax**, einem pro-apoptotisch wirkenden Protein. In neonatalen Faserzellen des Wildtyps ist keine Bax-Expression nachweisbar (Abbildung 5.23a). Der gesamte, aus zerstörten primären Faserzellen bestehende Linsenkern von *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten erscheint intensiv gefärbt. Auffallend ist zudem die uneinheitliche Expression von Bax in sekundären Linsenfaserzellen von *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten. Während junge Faserzellen nahe des Linsenbogens negativ erscheinen, ist in den Zellkernen kortikaler Faserzellen ein sprunghafter Anstieg der Bax-Expression erkennbar, noch bevor die typischen morphologischen Veränderungen des *Crygb<sup>nop</sup>*-Phänotyps sichtbar werden (Pfeilspitzen, Abbildung 5.23b).

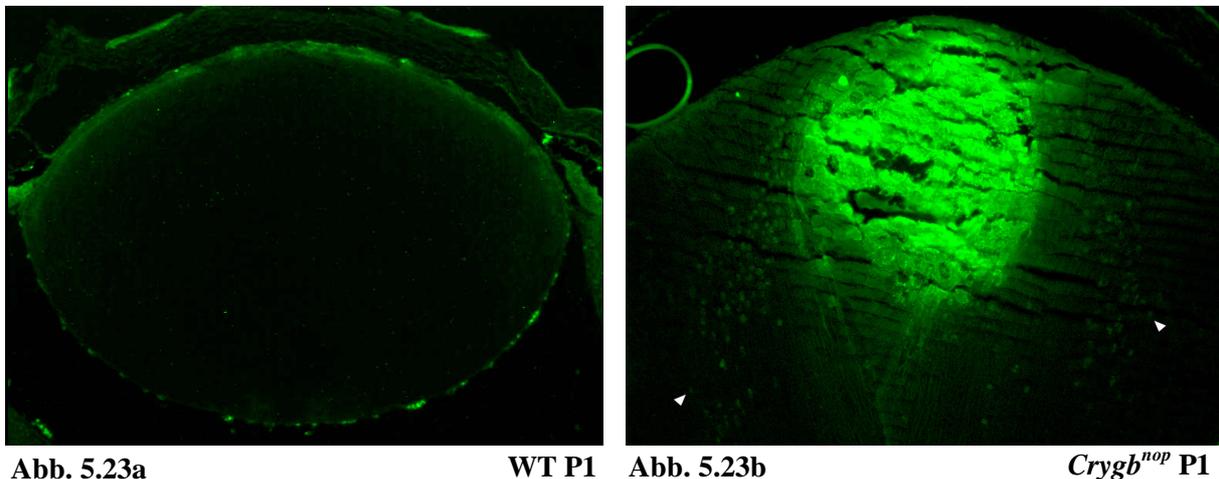


Abb. 5.23a

WT P1

Abb. 5.23b

*Crygb<sup>nop</sup>* P1

**Abbildung 5.23:** Immunhistochemische Detektion von Bax in neonatalen Linsen des Wildtyps (links; 5.23a) und *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten (rechts; 5.23b).

In neonatalen Linsen des Wildtyps wird keine Bax-Expression detektiert. Im Gegensatz dazu ist die Expression von Bax in der Linse von *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten abhängig vom Differenzierungsgrad der Faserzellen. Die zentralen primären Faserzellen sind intensiv gefärbt, während die jungen sekundären Faserzellen des Linsenbogens negativ für Bax erscheinen. Mit zunehmender Differenzierung in Richtung des Linsenbogens ist ein sprunghafter Anstieg der Bax-Expression zu beobachten (Pfeile).

Offenbar besteht ein enger Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad primärer und sekundärer Faserzellen des *Crygb<sup>nop</sup>*-Phänotyps, sowie der Akkumulation eines Apoptosefördernden Proteins in den Membranen ihrer Zellkerne. Diese Beobachtung läßt eine Beteiligung von Bax an den morphologischen Veränderungen von Linsenfaserzellen des *Crygb<sup>nop</sup>*-Phänotyps vermuten. Nachfolgend wurde daher die Bax-Expression während der **embryonalen** Linsenentwicklung von *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten untersucht.

Das im Wildtyp (Stadium **E15.5**) sichtbare Signal im zentralen Bereich der Linse wird durch einen Riß im Gewebe verursacht und stellt daher ein Artefakt dar (Abbildung 5.24a). Auch die Faserzellen der *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante sind in diesem Stadium **Bax**-negativ (Abbildung 5.24b). In Faserzellen des Wildtyps ist auch im Stadium **E18.5** keine Bax-Expression nachweisbar (Abbildung 5.24c). Der Linsenkern des *Crygb<sup>nop</sup>*-Phänotyps erscheint jedoch bereits intensiv gefärbt. Die beginnende nukleäre Lokalisation von Bax in kortikalen Faserzellen eines fortgeschrittenen Differenzierungsstadiums ist sichtbar (Pfeilspitzen, Abbildung 5.24d).

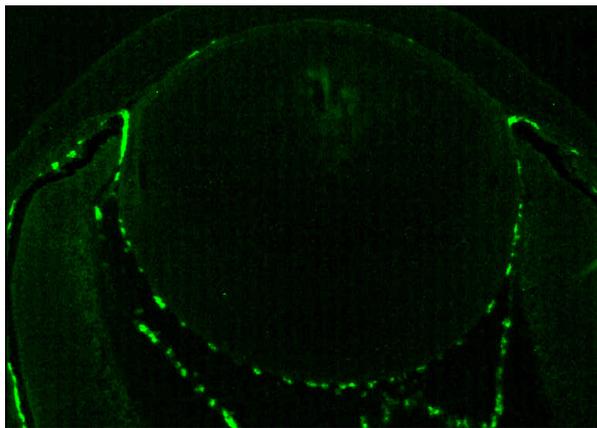


Abb. 5.24a

WT E15.5

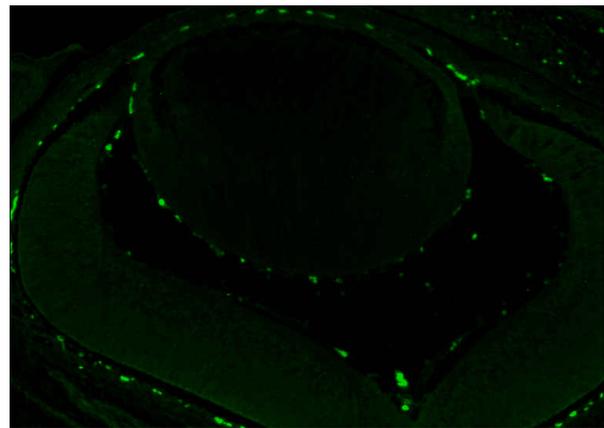


Abb. 5.24b

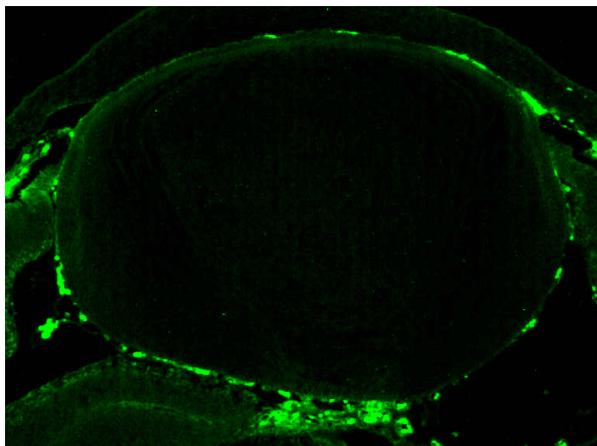
*Crygb<sup>nop</sup>* E15.5

Abb. 5.24c

WT E18.5

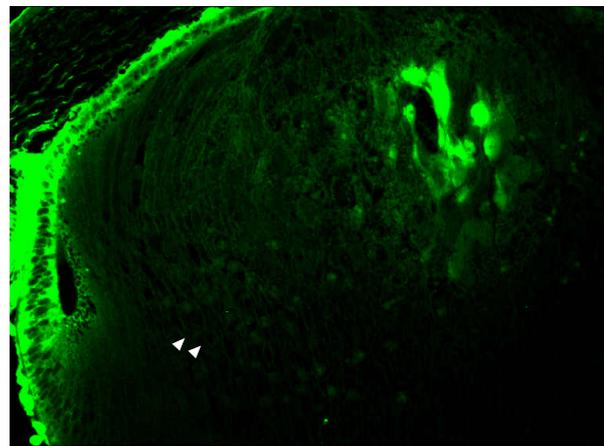


Abb. 5.24d

*Crygb<sup>nop</sup>* E18.5

**Abbildung 5.24:** Immunhistochemische Detektion von Bax während der embryonalen Linsenentwicklung in den Stadien E18.5 und E15.5 von Wildtyp (links; a, c) und *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten (rechts; b, d).

Die pathologischen Veränderungen in der Linse von *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten werden offenbar durch Bax-induzierte apoptotische Prozesse hervorgerufen. Vorhergesagte Ereignisse des programmierten Zelltodes, wie die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom C und die proteolytische Spaltung von Poly-(ADP)-Ribose-Polymerase (PARP), werden in Linsenfasern des *Crygb<sup>nop</sup>*-Phänotyps nachgewiesen und unterstützen diese Hypothese.

## 5.6 Apoptotische Prozesse in Linsen des *Cryge*<sup>t</sup>-Phänotyps

Primäre Linsenfaserzellen von *Cryge*<sup>t</sup>-Mutanten zeigen massive morphologische Veränderungen, wie Schwellung und Zytolyse ihrer Zellmembranen. Als Ursache hierfür werden ebenfalls apoptotische Prozesse vorgeschlagen, welche möglicherweise durch ihre posteriore Kompression innerhalb der Linsenkapsel hervorgerufen werden. Nachfolgend werden daher die Expressionsmuster von zelltod-regulierenden Proteinen während der Linsenentwicklung des *Cryge*<sup>t</sup>-Phänotyps untersucht.

### 5.6.1 Expression von *Bcl-2*

Abbildung 5.25 zeigt das Expressionsmuster des anti-apoptotisch wirkenden **Bcl-2** in neonatalen Linsen von Wildtyp und *Cryge*<sup>t</sup>-Mutanten. Bcl-2 ist vorwiegend in den Kernmembranen primärer und sekundärer Faserzellen lokalisiert (Abbildung 5.25a). In Linsen des *Cryge*<sup>t</sup>-Phänotyps ist zusätzlich eine verstärkte cytoplasmatische Expression von Bcl-2 in den komprimierten primären Faserzellen am posterioren Pol der Linsenkapsel zu beobachten (Abbildung 5.25b).

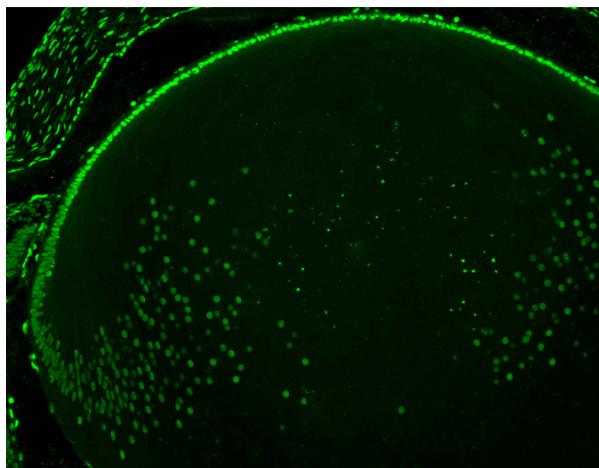


Abb. 5.25a

WT P1

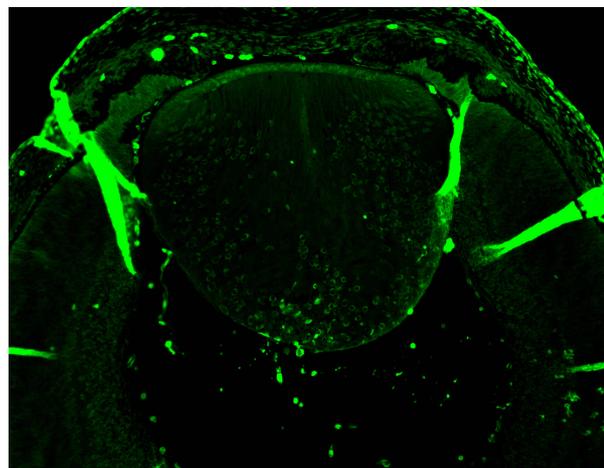


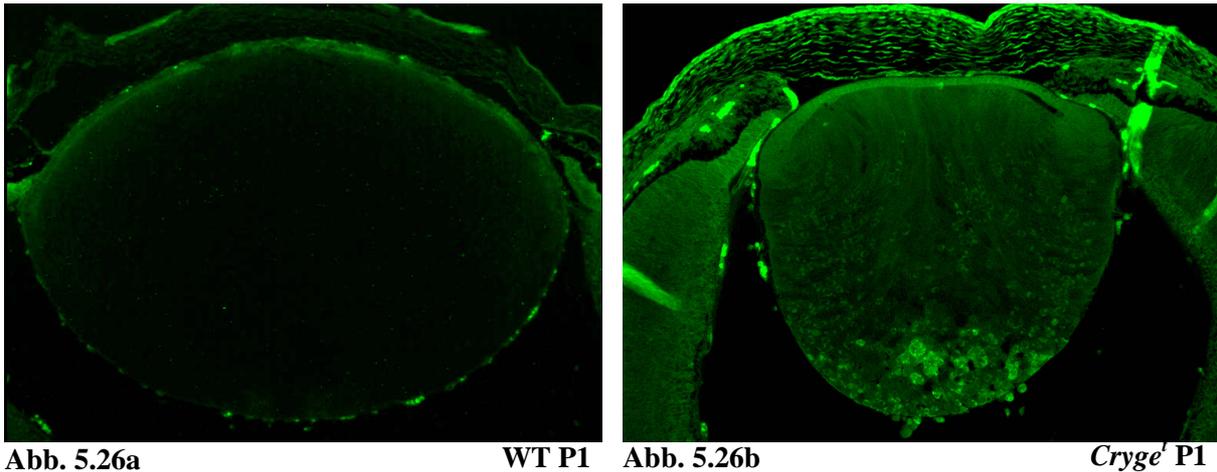
Abb. 5.25b

*Cryge*<sup>t</sup> P1

**Abbildung 5.25:** Immunhistochemische Detektion von Bcl-2 in neonatalen Linsen des Wildtyps (links; 5.25a) und *Cryge*<sup>t</sup>-Mutanten (rechts; 5.25b).

### 5.6.2 Expression von Bax

In Faserzellen neonataler Linsen des Wildtyps wird **Bax** nicht exprimiert (Abbildung 5.26a). Die in der anterioren Hemisphäre der Linsenkapsel elongierenden sekundären Faserzellen des *Cryge<sup>f</sup>*-Phänotyps zeigen nur ein schwaches cytoplasmatisches Signal. Im posterioren Bereich der Linsenkapsel hingegen ist eine intensive Expression von Bax erkennbar (Abbildung 5.26b).



**Abbildung 5.26:** Immunhistochemische Detektion von Bax in neonatalen Linsen des Wildtyps (links; 5.26a) und *Cryge<sup>f</sup>*-Mutanten (rechts; 5.26b).

Während der phänotypischen Entwicklung von *Cryge<sup>f</sup>*-Mutanten unterliegen die primären Faserzellen einer zunehmenden posterioren Kompression innerhalb der Linsenkapsel. Dieser Prozeß führt zur progressiven Zytolyse der primären Faserzellen in Linsen der *Cryge<sup>f</sup>*-Mutante. In neonatalen Linsen sind diese pathologischen Veränderungen bereits weit fortgeschritten. Der posteriore Bereich der Linsenkapsel ist daher angefüllt mit degradierenden primären Faserzellen, welche gleichzeitig eine starke Expression von Bax zeigen.

Möglicherweise wird beobachtete Hochregulierung von Bax in den morphologisch veränderten primären Linsenfaserzellen der *Cryge<sup>f</sup>*-Mutante durch ihre posteriore Kompression hervorgerufen. Durch Analyse des Expressionsmusters während der Linsenentwicklung von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten sollte diese These überprüft werden.

In der folgenden Abbildung ist die Expression von **Bax** jeweils vor (**E15.5**) und nach (**E18.5**) Auftreten der morphologischen Veränderungen primärer Faserzellen des *Cryge<sup>f</sup>*-Phänotyps dargestellt (Abbildung 5.27).

Das im Wildtyp des Stadiums **E15.5** im anterior-zentralen Bereich sichtbare Signal (Abbildung 5.27a) stellt ein Artefakt dar. Es wird durch einen Riß im Gewebe verursacht, der während des Anfertigens der Paraffinschnitte entstanden ist. In wildtypischen Faserzellen ist während der embryonalen Linsenentwicklung kein Bax- Protein detektierbar (Abbildungen 5.27a und 5.27c). Auch die vermindert elongierten primären Faserzellen im Stadium E15.5 des *Cryge*<sup>t</sup>-Phänotyps erscheinen Bax-negativ (Abbildung 5.27b).

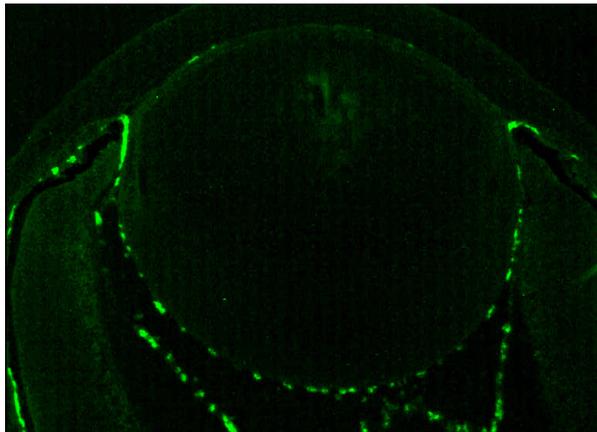


Abb. 5.27a

WT E15.5

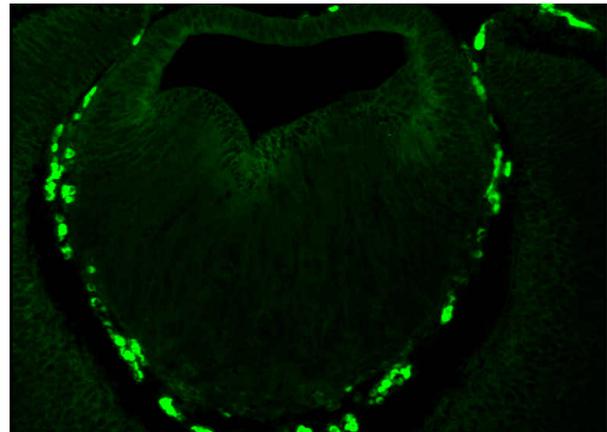


Abb. 5.27b

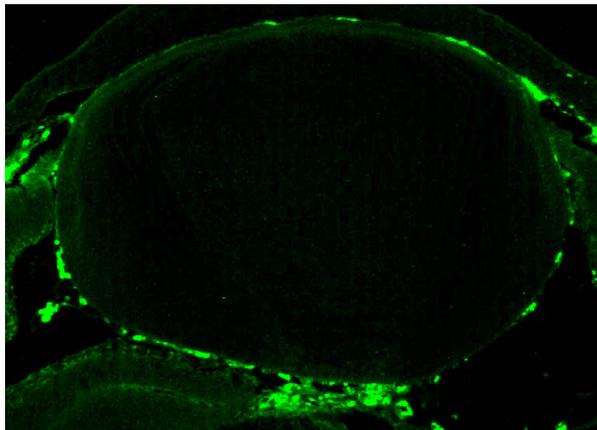
*Cryge*<sup>t</sup> E15.5

Abb. 5.27c

WT E18.5

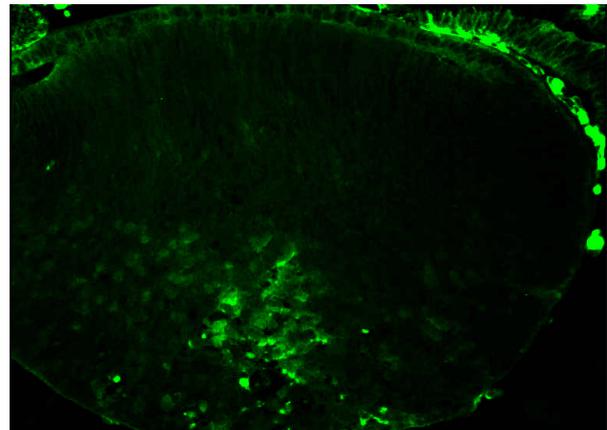


Abb. 5.27d

*Cryge*<sup>t</sup> E18.5

**Abbildung 5.27:** Immunhistochemische Detektion von Bax in embryonalen Linsen der Stadien E18.5 und E15.5 von Wildtyp (links; a, c) und *Cryge*<sup>t</sup>-Mutanten (rechts; b, d).

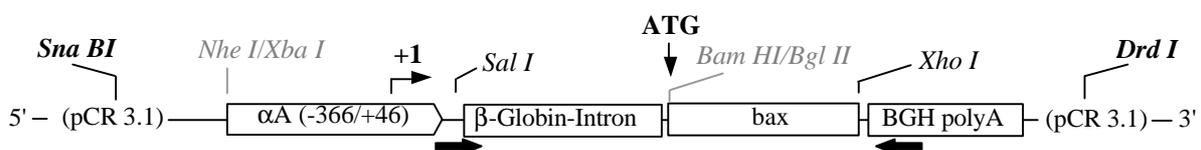
Ab etwa E16.5 werden Schwellung und Zytolyse ihrer Zellmembranen beobachtet. Mit dem Auswachsen sekundärer Faserzellen aus dem Linsenbogen beginnt jedoch ihre Kompression in der posterioren Hemisphäre der Linsenkapsel. Eine intensive cytoplasmatische Färbung am posterioren Pol der Linse ist bereits ab Tag **E18.5** erkennbar (Abbildung 4.27d). *Cryge*<sup>t</sup>-Mutanten zeigen somit eine enge Kopplung zwischen der posterioren Kompression primärer Linsenfaserzellen und der Expression des Apoptose-initiierenden Bax-Proteins.

## 5.7 Herstellung eines *bax*-transgenen Mausmodells

In den vorangegangenen Abschnitten wurde gezeigt, daß Linsenfaserzellen von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten massive Störungen ihres terminalen Differenzierungsprogramms aufweisen. Die beobachteten morphologischen Veränderungen in der Linse stehen offenbar in direktem Zusammenhang mit der Akkumulation von Bax, eines pro-apoptotischen Proteins, in primären und sekundären Linsenfaserzellen. Der Nachweis apoptotischer Abbauprodukte in Linsenextrakten von *Crygb<sup>hop</sup>*-Mutanten unterstützt die Vermutung, daß die beobachteten Veränderungen, wie Schwellung und Zytolyse von Linsenfaserzellen, auf ein aktiviertes Zelltodprogramm zurückzuführen sind. Mit Hilfe eines *bax*-transgenen Mausmodells soll diese apoptotische Kaskade nachgebildet und überprüft werden, ob die in  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten gefundene Expression von Bax hinreichend für die pathologischen Veränderungen der Linsenfaserzellen ist.

### 5.7.1 Klonierungsstrategie

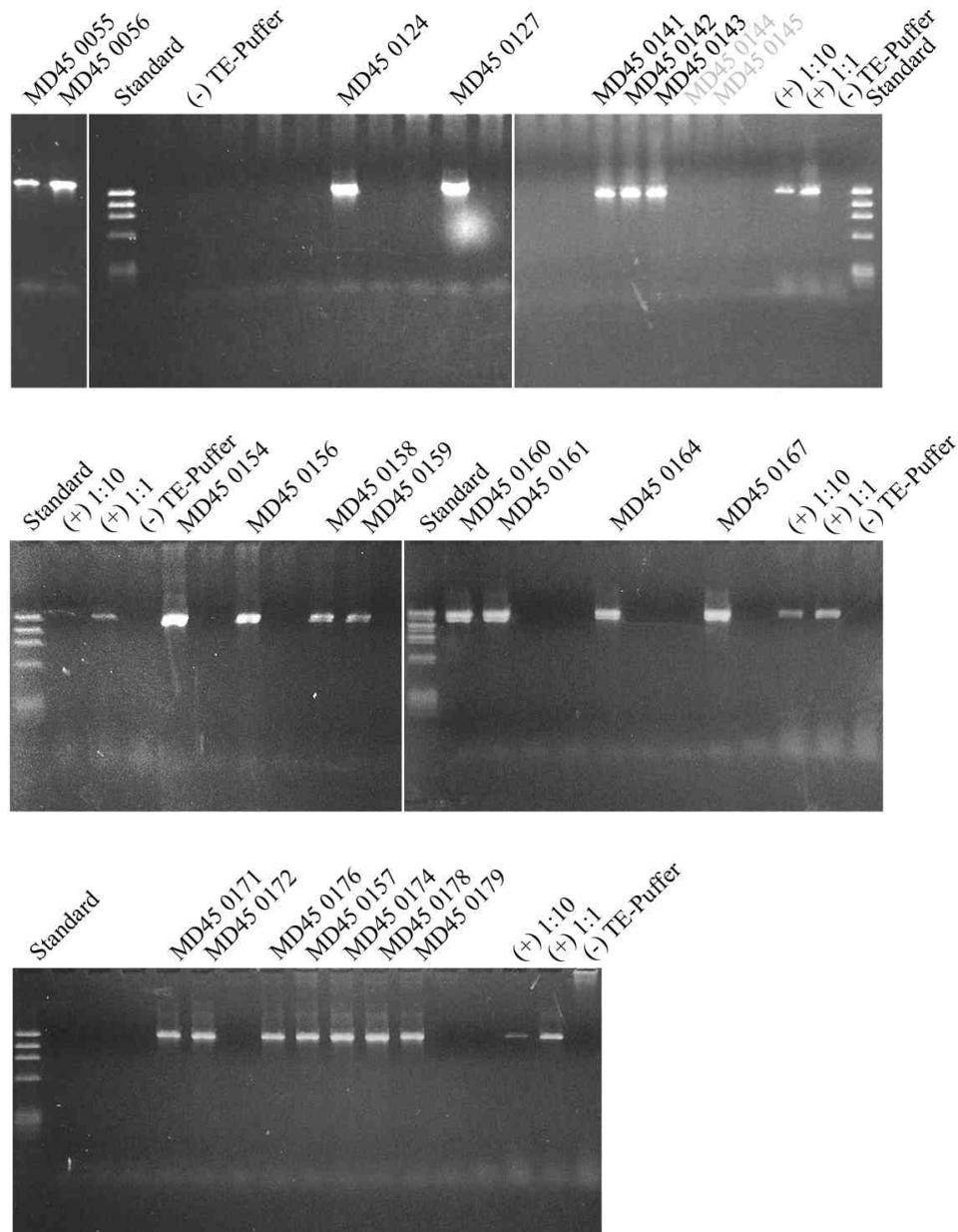
Mit Hilfe des schematisch dargestellten Konstruktes (Abbildung 5.28) wird *bax* unter Kontrolle eines 412bp umfassenden Fragments des  $\alpha$ A-Kristallin-Promoters spezifisch in der Linse transgener Tiere exprimiert (Wawrousek *et al.*, 1990). Im vorliegenden Konstrukt wird durch Einführung einer intronischen Sequenz aus Kaninchen eine künstliche Spleißstelle stromaufwärts des *bax*-Translationsstartes generiert. Der *Cryaa*-Promoter wurde zusammen mit der Intronsequenz als (*Xba I*-*Bam HI*)-Fragment aus einem modifizierten pCMV-Expressionsplasmid ausgeschnitten (zur Verfügung gestellt von P. Zelenka, *National Eye Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA*). Die *bax*-cDNA wurde nach Erststrang-synthese von RNA aus neuralem Gewebe neonataler Mäuse durch PCR-Amplifikation erhalten (Ishii *et al.*, 1996) und als (*Bgl II*-*Xho I*)-Fragment in den (*Nhe I*-*Xho I*)-geschnittenen Klonierungsvektor (Invitrogen® pCR 3.1) eingefügt. Die Ligation unterschiedlich restringierter, jedoch kompatibler DNA-Enden führt zum Verlust einiger Restriktionsschnittstellen (Abbildung 5.28; grau). Die transgenen Tiere wurden durch Pronukleus-Injektion des (*Sna BI*-*Drd I*)-Fragments in Eizellen des FVB/N-Inzuchtstammes generiert. Die Mikroinjektion wurde von Mitarbeitern der *Transgenic Mouse Facility, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA* unter der Leitung von Dr. Eric Wawrousek durchgeführt.



**Abbildung 5.28:** DNA-Konstrukt für die Herstellung einer *bax*-transgenen Mauslinie. Pfeile symbolisieren die Positionen der Oligonukleotide (#6766 und #6464), die für die spezifische Detektion eines 1331bp-Fragments in genomischer DNA *bax*-transgener Tiere verwendet werden.

### 5.7.2 Detektion *bax*-transgener Tiere

Transgene Nachkommen werden nach Isolation von genomischer DNA durch spezifische PCR-Amplifikation eines 1331bp-Fragments identifiziert (Abbildung 5.29). Die Oligonukleotide hybridisieren innerhalb der ersten 25bp der BGH-Polyadenylierungssequenz (*BGHpa rev.*, #6464) und an die verknüpfende Sequenz des Introns mit dem  $\alpha A$ -Kristallin-Promoter (*Cryaa-Intron-Linker for.*, #6766; siehe Abbildung 5.28).



**Abbildung 5.29:** Detektion *bax*-transgener Nachkommen durch spezifische PCR-Amplifikation eines 1331bp-Fragments aus genomischer DNA. *Hind III*-verdaute  $\lambda$ -Phagen-DNA wird als Standard eingesetzt. Als Negativkontrolle wird TE-Puffer ohne DNA-Zugabe verwendet, als Positivkontrollen dienen Aliquots des für die Pronukleus-Injektion verdünnten *Sna BI/Drd I*-Fragments. Die Bezeichnungen PCR-positiver Tiere sind angegeben. Zwei PCR-negative DNA-Proben sind grau gekennzeichnet; diese werden als zusätzliche Negativkontrolle im *Southern blot* verwendet.

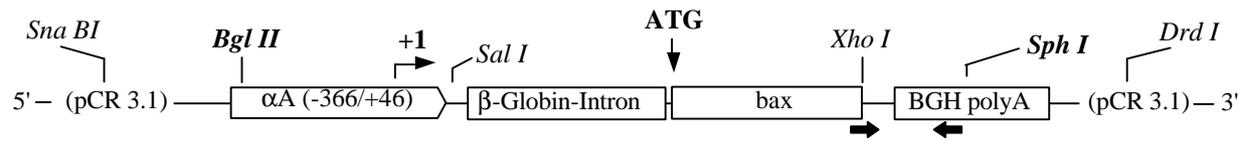
Die Ergebnisse der PCR-Analyse sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst. PCR-positiv erscheinende Tiere sind jeweils aufgelistet. Es ergibt sich somit die nachstehend gezeigte Generationsfolge *bax*-transgener Tiere.

Name	Generation	Geschlecht	Nachkommen	Weitergabe
MD45 0029	F0	M	9	Nein
MD45 0037	F0	M	8	Nein
MD45 0055	F0	F	9	Nein
MD45 0056	F0	F	10	Ja
MD45 0124	F1	M	14	Ja
MD45 0142	F2	F	6	Ja
MD45 0174	F3	M	--	--
MD45 0176	F3	M	--	--
MD45 0177	F3	M	--	--
MD45 0178	F3	F	--	--
MD45 0179	F3	F	--	--
MD45 0171	F2	M	--	--
MD45 0172	F2	M	--	--
MD45 0143	F2	F	8	Ja
MD45 0160	F3	M	--	--
MD45 0161	F3	M	--	--
MD45 0164	F3	M	--	--
MD45 0167	F3	F	--	--
MD45 0127	F1	F	9	Ja
MD45 0154	F2	M	--	--
MD45 0156	F2	F	--	--
MD45 0158	F2	F	--	--
MD45 0159	F2	F	--	--

**Tabelle 5.2:** Generationsfolge *bax*-transgener Tiere. Die F0-Generation wurde durch Pronukleus-Injektion generiert und mit Tieren des FVB/N-Inzuchtstammes verpaart. Angegeben sind Geschlecht und Zahl der Nachkommen, sowie die Weitergabe der transgenen Erbinformation an die nachfolgende Generation.

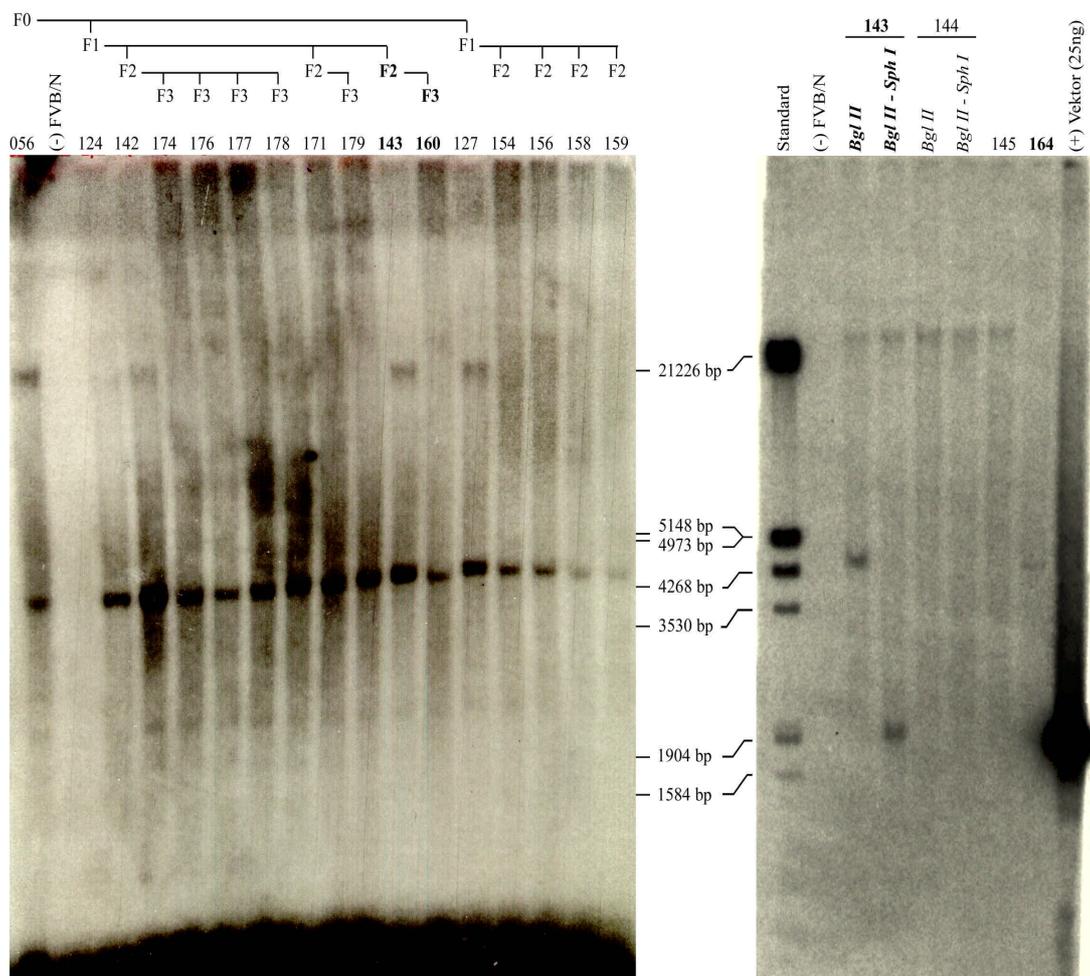
### 5.7.3 Analyse von genomischer DNA durch Southern blotting

PCR-positive Nachkommen der F0-Generation (MD45 0056) werden durch genomische DNA-Hybridisierung (*Southern blotting*) auf die Integration des *bax*-Konstruktes überprüft. Für die Restriktion der genomischen DNA bieten sich Enzyme an, welche im Konstrukt nur einfach schneiden, um die Zuordnung der erhaltenen Banden zu erleichtern. Alle Proben werden mit *Bgl II* verdaut; die Schnittstelle befindet sich innerhalb der ersten sechs Basenpaare des *Cryaa*-Promoters. Die singuläre *Sph I*-Schnittstelle liegt innerhalb der BGH-PolyA-Sequenz, flankierend zum 3'-Ende der Probe. Die radioaktiv markierte Probe wird durch PCR-Amplifikation eines 267bp-Fragmentes aus dem Konstrukt erhalten (Abbildung 5.30).



**Abbildung 5.30:** Anordnung singulärer Restriktionsschnittstellen im *bax*-Konstrukt.

Für die Restriktion genomischer DNA von PCR-positiven Tieren werden singuläre Schnittstellen innerhalb des Konstruktes verwendet. Die *Bgl II*-Schnittstelle liegt am Anfang des  $\alpha$ A-Kristallin-Promoters, *Sph I* befindet sich in der BGH-Polyadenylierungssequenz. Die *Xho I*-Schnittstelle ist Teil der *multiple cloning site* (MCS) des Vektors, welche sich stromaufwärts der BGH-polyA-Sequenz befindet und 30bp innerhalb des *bax*-Konstruktes umfaßt. Pfeile symbolisieren die Positionen der Oligonukleotide, die für die Herstellung der spezifischen DNA-Sonde (267bp) verwendet werden.



**Abbildung 5.31:** Hybridisierung von genomischer DNA aus PCR-positiven Tieren (*Southern blot*).

Die *Bgl II*-verdaute DNA wird mit einer  $^{32}$ P-radioaktiv markierten DNA-Sonde (267bp) hybridisiert. Angegeben sind die Generationsfolge und Endnummern der Tiere. Wildtyp-DNA des FVB/N-Inzuchtstammes dient als Negativkontrolle, das (*Bgl II-Sph I*)-verdaute *bax*-Konstrukt als Positivkontrolle. Alle PCR-positiven Tiere (links) zeigen eine starke Bande auf Höhe von 4400bp. Ein schwächeres Signal wird bei etwa 24kb detektiert, welches in der F3-Generation PCR-positiver Tiere verloren geht (Tiere **143** und **160**, links; sowie **164**, rechts).

Der Verdau mit zwei Enzymen (*Bgl II-Sph I*) setzt das Konstrukt frei. Die ehemals 4400bp-Bande erscheint nun bei 1912bp auf Höhe des Positivkontrolle (Tier **143**; rechts); das 24kb-Signal ist unverändert und erscheint ebenso in PCR-negativen Tieren, denen die 4400bp-Bande fehlt (**144**, **145**; rechts).

Die Hybridisierung der Membran und nachfolgende Waschschr tte wurden unter stringenten Bedingungen durchgeführt (siehe Abschnitt 4.1.9). Als Negativkontrolle wird Wildtyp-DNA des FVB/N-Inzuchtstammes verwendet. Für die Positivkontrolle wird restringierte Vektor-DNA eingesetzt. Die (*Bgl II-Sph I*)-Schnittstellen setzen das vollständige *bax*-Konstrukt mit 1912bp Länge frei.

Beide Membranen wurden nacheinander mit der gleichen Probe hybridisiert. Das Signal bei etwa 2300bp (Abbildung 5.31; links) ließ sich durch längeres Waschen der zweiten Membran entfernen und stellt somit eine unspezifische Bindung der Probe dar (Abbildung 5.31; rechts). Die *Bgl II*-verdauete DNA von PCR-positiven Tieren (Abbildung 5.31; links) zeigt eine starke Bande bei 4400bp. Der Verdau mit zwei Enzymen (*Bgl II-Sph I*) setzt das *bax*-Konstrukt aus genomischer DNA frei; die ehemals 4400bp-Bande erscheint nun auf Höhe der Positivkontrolle bei 1912bp (Tier **143**; rechts). Ein schwaches Signal bei etwa 24kb geht in der F3-Generation verloren (Tiere **143** und **160**; links). Dieses wird offenbar durch ein unvollständig integriertes *bax*-Konstrukt erzeugt, da der Doppelverdau (*Bgl II-Sph I*) keine Veränderung in der Größe dieses Signals bewirkt (Tier **143**; rechts). Es ist ebenso in den PCR-negativen Tieren sichtbar, denen die 4400bp-Bande fehlt (Tiere **144**, **145**; rechts).

Die Auswertung dieser Ergebnisse zeigt, daß mindestens **zwei Integrationen** des *bax*-Konstruktes in das Genom der Tiere stattgefunden haben. Eine teilweise Integration unter Verlust der 5'-*Bgl II*- und der 3'-*Sph I*-Schnittstelle repräsentiert die Bande bei 24kb. Die **4400bp-Bande** erscheint nach Restriktion mit beiden Enzymen auf Höhe der Positivkontrolle und entspricht mit einer Länge von 1912bp dem **intakten *bax*-Konstrukt**. Diese Integration des vollständigen *bax*-Konstruktes in das Genom der Tiere ist offenbar stabil. Sie wird bereits über drei Generationen weitergegeben (Tiere: **056** [F0] → **124** [F1] → **143** [F2] → **160**, **164** [F3]).

## 6. DISKUSSION

Mutationen im  $\gamma$ -Kristallin-Gencluster führen zu einer massiv veränderten Linsenentwicklung während der Embryogenese. Mit beginnender Expression des jeweils betroffenen  $\gamma$ -Kristallins in der Linse werden eine verminderte Elongation und Schwellung der Faserzellen beobachtet. Zusätzlich ist eine verkleinerte Entwicklung des gesamten Auges (Mikrophthalmie) zu beobachten, welche in Heterozygoten schwächer ausgeprägt ist, als in homozygoten Tieren. Zu Beginn der Arbeit wurde durch vergleichende histologische Analyse eine Übersicht zur Kataraktentstehung muriner  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten gewonnen.

### 6.1 Morphologische Charakterisierung von $\gamma$ -Kristallin-Mutanten

#### 6.1.1 Linsenentwicklung des *Cryge<sup>t</sup>*-Phänotyps

Linsen der *Cryge<sup>t</sup>*-Mutante zeigen bereits in frühen Phasen der Faserzeldifferenzierung pathologische Veränderungen. Die posterioren Zellen des Linsenvesikels zeigen eine verminderte Elongation, gleichzeitig werden erste Formanomalien der jungen primären Faserzellen sichtbar. In diesem Entwicklungsstadium zeigen sich bereits erste Schwellungen an den primären Faserzellen. Zusätzlich verhindert das unregelmäßige Wachstum während der Elongation ihre spätere parallele Anordnung innerhalb des Linsenkerens.

Offensichtlich erfolgt die Umwandlung proliferierender Epithelzellen in postmitotische Faserzellen unabhängig vom Elongationszustand der primären Faserzellen. Die aus dem Linsenbogen auswachsenden sekundären Linsenfasern schieben sich daher in den verbleibenden Raum zwischen Linsenepithel und den vermindert elongierten primären Faserzellen. Diese werden daraufhin in der posterioren Hemisphäre der Linsen kapsel zunehmend komprimiert und beginnen, ihre Zellmembran auflösen. Die ausschließlich in der anterioren Hemisphäre elongierenden sekundären Faserzellen schwellen gegen Ende der Embryonalentwicklung stark an und verlieren Faserstruktur, vermutlich aufgrund des fehlenden Kontaktes ihrer basalen Enden mit der Linsen kapsel während des Elongationsprozesses. In histologischen Färbungen präsentieren sich Linsen der *Cryge<sup>t</sup>*-Mutante daher als eine ungeordnete Ansammlung kugelliger Faserzellen innerhalb der Linsen kapsel.

Im Gegensatz zu den primären Faserzellen zeigen sekundäre Faserzellen von *Cryge<sup>t</sup>*-Mutanten keinen Abbau ihrer Zellorganellen - sie unterliegen offenbar keiner terminalen Differenzierung. Lediglich die Zellkerne der nach posterior gedrückten primären Linsenfasern beinhalten bereits fragmentierte DNA und können daher durch ihre positive TUNEL-Färbung identifiziert werden.

### 6.1.2 Linsenentwicklung des *Crygb<sup>nop</sup>*-Phänotyps

Im Gegensatz zu Linsen der *Cryge<sup>t</sup>*-Mutante entsteht der *Crygb<sup>nop</sup>*-Phänotyp in relativ späten Stadien embryonaler Linsenentwicklung. Die aus dem posterioren Epithel des Linsenvesikels hervorgehenden primären Faserzellen elongieren ausreichend schnell. Sie füllen das Lumen vollständig aus, bevor die Differenzierung sekundärer Faserzellen aus dem Linsenbogen beginnt. Schwellungen der primären Faserzellen werden erst sichtbar, nachdem sich bereits einige Schichten junger sekundärer Faserzellen auf den Linsenkern aufgelagert haben. Gegen Ende der Embryonalentwicklung verlieren die geschwollenen primären Faserzellen des Linsenkerns ihre parallele Anordnung. Die Auflösung ihrer Zellmembranen führt nachfolgend zu einer progressiven Vakuolisierung des Linsenkerns.

In diesem Stadium werden auch die auf den embryonalen Linsenkern aufgelagerten sekundären Faserzellen in die fortschreitende Zytolyse ihrer Zellmembranen mit einbezogen. An den Linsenkern angrenzende sekundäre Faserzellen befinden sich in einem späten Stadium terminaler Differenzierung - in diesem Bereich zeigen wildtypische Linsen bereits einen beginnenden Zellkernabbau. In Linsen des *Crygb<sup>nop</sup>*-Phänotyps sind jedoch nur wenige fragmentierende Zellkerne sichtbar, hingegen ist der Großteil an sekundären Faserzellen dieses Differenzierungsgrades einer massiven Zytolyse unterworfen. Charakteristisch für dieses Entwicklungsstadium ist daher die Entstehung einer den Linsenkern ringförmig umgebenden Zone aus zerstörten sekundären Faserzellen.

Im Vergleich zum Wildtyp zeigen die Faserzellen der *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante einen stark verminderten DNA-Abbau. Mit Hilfe des TUNEL-Assays konnte gezeigt werden, daß DNA-Fragmentierung zwar in den primären, nicht jedoch in den geschwollenen und lysierenden sekundären Faserzellen neonataler *Crygb<sup>nop</sup>*-Linsen stattfindet - als Folge daraus beobachtet man an der Grenzfläche zum Linsenkern die ringförmige Freisetzung von intakter DNA.

In Linsen des *Crygb<sup>nop</sup>*-Phänotyps besteht somit ein kausaler Zusammenhang zwischen dem **Differenzierungsgrad** sekundärer Linsenfasern und dem Aufbrechen ihrer Zellmembranen. Im Gegensatz dazu erscheint plausibel, daß die beobachtete **Zytolyse** primärer Faserzellen von *Cryge<sup>t</sup>*-Mutanten, möglicherweise unabhängig von ihrem Differenzierungsgrad, durch ihre zunehmende **posteriore Kompression** innerhalb der Linsenkapsel ausgelöst wird.

## 6.2 Molekulare Charakterisierung von $\gamma$ -Kristallin-Mutanten

Die Mutation in einem linsenspezifischen Strukturprotein führt neben gravierenden morphologischen Veränderungen in der Linse offensichtlich zum Abbruch des Differenzierungsweges von Linsenfaserzellen. Die in den vorangegangenen Abschnitten erhaltenen Ergebnisse werden im Hinblick auf die Induktion morphologischer Veränderungen in Linsen von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten diskutiert.

### 6.2.1 Ursache des *Crygb<sup>nop</sup>*-Phänotyps: Expression eines verkürzten $\gamma$ B-Kristallins

Der *Crygb<sup>nop</sup>*-Phänotyp wird durch eine Insertions-/Deletions-Mutation im dritten Exon des  $\gamma$ B-Kristallins (*Crygb*) hervorgerufen. Der Austausch von 11bp durch 4bp führt zu einer Verschiebung des Leserasters und der Induktion eines Stop-Codons (Klopp *et al.*, 1998). Die *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutation bewirkt somit eine veränderte Aminosäuresequenz im Translationsprodukt (siehe Abbildung 2.5). Es werden insgesamt sechs neue Aminosäuren am Ende des mutierten  $\gamma$ B-Kristallins eingefügt, bevor die Proteinkette abbricht. Dieses C-terminale, aus sechs Aminosäuren bestehende Polypeptid wurde für die Herstellung eines polyklonalen Antiserums verwendet und von Dr. Roy Quinlan, Universität Dundee, Schottland, zur Verfügung gestellt.

Mit Hilfe des erhaltenen Antiserums kann die Expression des veränderten  $\gamma$ B-Kristallins in Linsen von *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten überprüft werden. Im Western blot zeigt sich eine schwache Kreuzreaktion mit Linsenextrakten bei etwa 25kDa. Vermutlich handelt es sich hierbei um  $\beta$ -Kristalline, welche unter den gewählten experimentellen Bedingungen depolymerisieren und daher mit einem monomeren Molekulargewicht zwischen 22kDa und 28kDa auftreten.

Im Gegensatz dazu beträgt das Molekulargewicht der  $\gamma$ -Kristalline 21kDa. Das **verkürzte  $\gamma$ B-Kristallin** der *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante weist jedoch nur eine Länge von 144 Aminosäuren auf, woraus sich rechnerisch ein Molekulargewicht von 17289.40g/mol ergibt. Erwartungsgemäß wird im Western blot eine starke Reaktion bei **17.6kDa** beobachtet. Neben der beschriebenen Kreuzreaktion zeigen die Linsenextrakte des Wildtyps keine weitere Bande. Das Antiserum detektiert somit spezifisch das veränderte  $\gamma$ B-Kristallin.

Das verkürzte Protein wird offenbar stabil in der Linse von *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten exprimiert, da im Western blot keine zusätzlichen, auf eine Degradierung rückführbaren Banden sichtbar sind. Es erscheint daher plausibel, daß die beobachteten morphologischen Veränderungen während der Linsenentwicklung von *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten durch die Akkumulation eines fehlgebildeten  $\gamma$ B-Kristallins hervorgerufen werden.

### 6.2.2 Auswirkungen eines verkürzten g-Kristallins in der Linse von *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten

Die differentielle Genexpressionsanalyse bietet eine Methode zur Analyse molekularer Abweichungen zwischen verschiedenen Zellpopulationen. Im vorliegenden Fall wurde die Expression verschiedenster Gene in Linsen des Wildtyps mit *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten verglichen (siehe Abbildung 5.6b). Unterschiedlich regulierte Genprodukte wurden aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten, subkloniert und sequenziert.

#### 6.2.2.1 Kristalline

Ein großer Vorteil der differentiellen Genexpressionsanalyse ist, daß man keine Sequenzinformationen über die gesuchten, unterschiedlich regulierten Transkriptionsprodukte benötigt. Diese Eigenschaft ermöglicht die Aufklärung bisher unbekannter Regulationsmechanismen. Das Fehlen jeglicher Sequenzinformationen bedingt unter anderem jedoch den Nachteil, daß nur einige wenige unterschiedlich regulierte Transkripte potentielle Schlüsselpositionen innerhalb einer relativ großen Anzahl pathologisch veränderter Signalwege einnehmen. Im konkreten Fall der *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante sind es vorwiegend Kristalline, welche verändert exprimiert erscheinen (siehe Tabelle 5.1). Diese werden während terminaler Differenzierung jedoch erst relativ spät exprimiert. Aus ihrer unterschiedlichen Regulation können somit nur begrenzte Informationen über eine veränderte terminale Differenzierungskaskade in Linsenfaserzellen von *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten erhalten werden.

#### 6.2.2.2 TAXREB 107

Ein weiteres methodisches Problem betrifft die Auswahl der Banden. Nach Isolation, Subklonierung und Sequenzierung der Banden aus dem Polyacrylamidgel wird die unterschiedliche Regulation der gefundenen Transkripte erneut überprüft. Die Kombination differentieller Genexpressionsanalyse mit anderen Methoden, wie vergleichende RT-PCR-Analyse und Northern blotting, erlaubt die nachfolgende Identifizierung vermeintlich unterschiedlich regulierter Transkripte und damit den Ausschluß falsch-positiver Banden.

Als Beispiel für ein vermeintlich hochreguliertes Transkript sei **TAXREB 107** genannt, einem Adapterprotein für die TAX-vermittelte Transaktivierung verschiedener Zielgene, darunter auch *vimentin* (Nacken *et al.*, 1995). Vimentin gehört, ebenso wie CP49 und Filensin, zu den "Intermediate Filament"-Proteinen und repräsentiert eine Komponente des Zytoskeletts in der Linse. Aufgrund seines Expressionsmusters in der Linse stellt Vimentin einen hervorragenden Differenzierungsmarker für Linsenfaserzellen dar. Die undifferenzierten Zellen des Linsenepithels exprimieren signifikante Mengen an Vimentin, mit

beginnendem Zellkernabbau in sekundären Faserzellen des Linsenkorax hingegen ist kein Vimentin mehr nachweisbar (Sandilands *et al.*, 1995). Wird Vimentin in der Linse transgener Mäuse überexprimiert, so führt dies zu gravierenden Störungen des terminalen Differenzierungsprozesses. Man beobachtet die Entwicklung einer massiven Katarakt aufgrund einer verminderten Elongation der Faserzellen, sowie einem ungenügendem Abbau der Zellorganellen (Capetanaki *et al.*, 1989).

Eine TAX-vermittelte Transaktivierung von Vimentin in der Linse böte somit einen Erklärungsansatz für die fehlschlagende Differenzierung in Linsenfaserzellen von *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten. Die vergleichende RT-PCR-Analyse für TAXREB 107 (siehe Abbildung 5.7) widerlegt jedoch eine unterschiedliche Regulation zwischen Linsen des Wildtyps und *Crygb<sup>nop</sup>*-Phänotypen.

### 6.2.2.3 Das Proteasom

Ein vermeintlich dreifach schwächer exprimiertes Genprodukt in der Linse von *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten wurde als mRNA der murinen Proteasom-Untereinheit C10-II (**Psmb3**) identifiziert (siehe Tabelle 5.1 und Abbildung 5.8). Der ubiquitin-abhängige Abbauweg ermöglicht einer Zelle in Verbindung mit dem Proteasom, nicht mehr benötigte Proteine und Stoffwechselprodukte spezifisch und effizient zu beseitigen. Auch in der Linse wird der Abbau mißgefalteter und beschädigter Proteine durch das Proteasom berichtet (Murakami *et al.*, 1990; Wagner *et al.*, 1993). Neben dieser bereits bekannten und gut charakterisierten Funktion des Proteasoms wird seine Beteiligung ebenso am Abbau von Zellorganellen während des Differenzierungsprozesses von Linsenfaserzellen diskutiert (Shang *et al.*, 1999). Eine verminderte Expression des Proteasoms hätte somit gravierende Auswirkungen auf die beobachtbaren morphologischen Veränderungen während der terminalen Differenzierung von Linsenfaserzellen.

Die für *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten nachgewiesene Expression eines mißgefalteten  $\gamma$ -Kristallins in der Linse sollte aus dieser Sichtweise eine Hochregulierung des Proteasoms zur Folge haben. Entweder besitzen Linsenfaserzellen in diesem Differenzierungsstadium keine Möglichkeiten mehr, regulierend auf die Expression des Proteasoms einzugreifen, oder sie erkennen das verkürzte  $\gamma$ -Kristallin nicht als mißgefaltetes und daher zu proteolytischem Abbau freigegebenes Protein. Allerdings könnte die außerordentlich hohe Expressionsrate der  $\gamma$ -Kristalline in differenzierenden Linsenfaserzellen einige wenige und normalerweise ausreichende Proteasom-Untereinheiten kompetitiv inhibieren. Für ihre postulierte reguläre Aufgabe, den Abbau von Zellorganellen, stünden diese damit nicht mehr zur Verfügung.

## 6.3 Untersuchung terminaler Differenzierung von Linsenfaserzellen

### 6.3.1 Fragmentierung der Zellkernmembran

Terminal differenzierende Linsenfaserzellen unterliegen charakteristischen morphologischen Veränderungen. Die aus dem Linsenbogen elongierenden Faserzellen degradieren schrittweise ihre Zellorganellen und ihre DNA (Bassnett 1992), während ihre Zellmembran intakt bleibt (Bassnett *et al.*, 1992). In  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten ist dieser Prozeß massiv gestört. Phänotypisch beobachtet man geschwollene und lysierende Linsenfaserzellen, sowie eine fortschreitende Vakuolisierung der Linse. Um die beobachteten morphologischen Veränderungen in Linsen von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten zu verstehen, bedarf es einer detaillierteren Charakterisierung des terminalen Differenzierungsprozesses von Linsenfaserzellen.

Die in den Abschnitten 5.1 und 5.3 dargestellten Ergebnisse der vergleichenden histologischen Analyse von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten zeigen einen drastisch **verminderten Abbau** von **Zellorganellen** und **DNA** in der Linse. Offensichtlich führt die Expression eines verkürzten  $\gamma$ -Kristallins in Linsenfaserzellen zu einer massiven Störung ihres Differenzierungsprogramms. Mit Hilfe einer terminalen Transferase können fluoreszenzmarkierte Nukleotide an die entstandenen freien 3'-OH-Enden fragmentierender DNA angehängt werden (TUNEL-Assay). Die Kombination des TUNEL-Assays mit immunhistochemischen Methoden ermöglicht zudem die Untersuchung des zeitlichen Zusammenhangs zwischen DNA-Fragmentierung und Abbau der Zellorganellen.

Mit Hilfe eines gegen die Zellkernmembran gerichteten Antikörpers ließ sich auf diese Weise zeigen, daß die DNA-Fragmentierung in wildtypischen Linsenfaserzellen erst nach begunenem Abbau der Zellkernmembran einsetzt. Offenbar wird der DNA-Abbau in Linsenfaserzellen durch Vermischung des Zyto- und Kernplasmas induziert (siehe Abbildung 4.10). Aus dieser Sicht würden während der Faserzelldifferenzierung DNA-abbauende Enzyme exprimiert, welche im Zytoplasma lokalisiert sind und erst nach dem Zusammenbruch der Zellkernmembran zu ihrem Substrat gelangen (Enari *et al.*, 1998; Counis *et al.*, 1998).

### 6.3.2 DNA-Abbau in Linsenfaserzellen

Die DNA-Fragmentierung stellt offenbar den letzten Schritt terminaler Differenzierung von Linsenfaserzellen dar. Im Gegensatz zu postnatalen Linsen wird jedoch während der Embryonalentwicklung keine TUNEL-Färbung beobachtet, obwohl elektronenmikroskopische Daten dieses aufgrund fragmentierter Zellkerne nahelegen (Vrensen *et al.*, 1991). Daraus ließ sich die Hypothese ableiten, daß in embryonalen Linsen der DNA-Abbau über einen anderen Weg als in postnatalen Linsen verläuft. Mit Hilfe eines der TUNEL-Reaktion vorausgehenden Dephosphorylierungsschrittes konnte die Variante der DNA-Spaltung unter Entstehung von 3'-Phosphat- und 5'-OH-Enden allerdings ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 5.16).

Lediglich die primären Faserzellen in Linsen von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten zeigen eine positive TUNEL-Färbung. Auch die ältesten sekundären Faserzellen nahe des Linsenkerns besitzen keine detektierbaren DNA-Strangbrüche. Unabhängig vom beobachteten Phänotyp scheint die Faserzellendifferenzierung daher bereits in einem frühen Stadium gestört, offenbar mit der beginnenden Elongation sekundärer Faserzellen aus dem Linsenbogen. Möglicherweise treten sekundäre Faserzellen von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten erst gar nicht in ein terminales Differenzierungsprogramm ein. Als Ursache hierfür wurde eine fehlerhafte Zellzyklusregulation vorgeschlagen, welche den nachfolgenden Differenzierungsprozeß beeinträchtigen könnte. Im nachfolgenden Abschnitt wird diese Hypothese näher diskutiert.

### 6.3.3 Treten Linsenfaserzellen von $g$ -Kristallin-Mutanten in die postmitotische Phase ein?

Als mögliche Ursache für den ungenügenden Zellkernabbau in sekundären Linsenfaserzellen von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten wurde ein fehlerhafter Eintritt in die postmitotische Phase vorgeschlagen. Ein nachfolgender Differenzierungsprozeß könnte somit massiv beeinträchtigt oder gänzlich unterdrückt werden. In Linsen der  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten wurde daher die Expression der beschriebenen, am G<sub>1</sub>/S-Phasenübergang beteiligten Zellzyklusproteine untersucht.

Im Expressionsmuster des **Cyclin D/cdk4**-Komplexes werden keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp gefunden. Beide Komponenten dieses Komplexes erscheinen gleichmäßig in der gesamten Linse exprimiert. Neben einem leichten cytoplasmatischen Signal sind beide Proteine vorwiegend in den Zellkernen beider Faserzelltypen lokalisiert. Nur im anterioren Bereich zeigt die *Crygb*<sup>noP</sup>-Linse jeweils eine etwas stärkere cytoplasmatische Färbung (Abbildungen 5.9 und 5.10).

Gravierende Unterschiede zwischen den untersuchten  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten und wildtypischen Faserzellen zeigen sich erstmals im Expressionsmuster für **p57<sup>kip2</sup>**. Dieses Protein wird in den elongierenden Faserzellen exprimiert und verhindert ihren Wiedereintritt in den Zellzyklus durch Inaktivierung des Cyclin D/cdk4-Systems. Erwartungsgemäß wird im Linsenbogen des Wildtyps eine intensive Färbung für p57<sup>kip2</sup> beobachtet. In Richtung des Linsenkerns verliert die cytoplasmatische Komponente an Intensität und die Zellkerne werden sichtbar. Der beobachtete p57<sup>kip2</sup>-Gradient ist abhängig vom Differenzierungsgrad der Faserzellen. Mit zunehmender Differenzierung verliert sich auch die nukleäre Färbung. In späteren Entwicklungsstadien erscheinen die primären und angrenzenden sekundären Faserzellen daher negativ für p57<sup>kip2</sup>.

In Linsen der *Cryge<sup>t</sup>*-Mutante beobachtet man eine ähnliche Veränderung im Expressionsmuster von p57<sup>kip2</sup>, allerdings mit stark verminderter Kinetik. Offenbar treten die Faserzellen durchaus in ein Differenzierungsprogramm ein, da sich anfänglich keine Unterschiede zum Wildtyp zeigen. Erwartungsgemäß erscheint eine intensive cytoplasmatische Färbung in den Faserzellen des Linsenbogens, welche in Richtung des Linsenkerns abnimmt und somit die Zellkerne der zentralen primären Faserzellen hervortreten läßt. In Analogie zum Wildtyp sollten diese Faserzellen ihre **nukleäre Färbung** mit zunehmendem Differenzierungsgrad **verlieren**. Dieser Prozeß verläuft in *Cryge<sup>t</sup>*-Mutanten jedoch **stark verlangsamt**. Auch in späteren Entwicklungsstadien der *Cryge<sup>t</sup>*-Mutante können die Zellkerne primärer und sekundärer Faserzellen durch ihre positive p57<sup>kip2</sup>-Färbung identifiziert werden (siehe Abbildung 5.14).

#### **6.3.4 Linsenfaserzellen von $\gamma$ -Kristallin-Mutanten sind postmitotisch**

Die *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante zeigt während der gesamten Linsenentwicklung keine veränderte Expression der untersuchten Zellzyklusproteine. Für p57<sup>kip2</sup> ergeben sich jedoch interessante Abweichungen. In wildtypischen Faserzellen ist der Verlust des p57<sup>kip2</sup>-Signals abhängig von ihrem Differenzierungsgrad. Die verminderte Kinetik, mit der die Faserzellen von *Cryge<sup>t</sup>*-Mutanten das kerngebundene p57<sup>kip2</sup>-Signal verlieren, deutet daher auf ein verzögertes Durchlaufen der frühen Phasen ihrer terminaler Differenzierung hin. Linsenfaserzellen von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten treten somit offenbar durchaus in ein terminales Differenzierungsprogramm ein, durchlaufen dieses jedoch stark verlangsamt.

## 6.4 Apoptotische Prozesse in Linsen von $\gamma$ -Kristallin-Mutanten

Als mögliche Ursache für die in Abschnitt 5.1 beschriebenen pathologischen Veränderungen in Linsen von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten wurde bereits die Aktivierung einer programmierten Zelltodkaskade postuliert, welche durch den fehlschlagenden terminalen Differenzierungsprozeß ausgelöst wird. Die Identifizierung beteiligter Komponenten, sowie die Diskussion möglicher Auswirkungen auf die Linsenentwicklung von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten, ist Gegenstand des vorliegenden Kapitels.

### 6.4.1 Erhalt des Phänotyps nach Inaktivierung eines $p53$ -Allels in $Crygb^{nop}$ -Mutanten

Für eine erste Abgrenzung apoptotischer Einflüsse auf die beobachteten morphologischen Veränderungen in Linsen von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten wurde ein inaktives  $p53$ -Allel in die homozygot gehaltene  $Crygb^{nop}$ -Linie eingeführt. Der dominante  $Crygb^{nop}$ -Phänotyp bleibt in ( $p53^{-/+}$  x  $Crygb^{nop/+}$ )-Mäusen vollständig erhalten - ein verbleibendes intaktes **maternales  $p53$ -Allel** ist somit **hinreichend** für die Initiierung der pathologischen Veränderungen in der Linse von  $Crygb^{nop}$ -Mutanten. Aufgrund einer problematischen PCR-Analytik wurde die Etablierung einer für beide  $p53$ -Allele dominant-negativen  $Crygb^{nop}$ -Linie jedoch nicht weiter verfolgt. Die postulierte Aktivierung apoptotischer Prozesse wurde daher auf protein-biochemischem Wege durch den Nachweis charakteristischer Abbauprodukte untersucht.

### 6.4.2 Nachweis apoptotischer Abbauprodukte in der Linse von $Crygb^{nop}$ -Mutanten

Die proteolytische Spaltung von PARP, einer an der Reparatur von DNA-Strangbrüchen beteiligten Polymerase, gilt als spezifisches Anzeichen zelleigener apoptotischer Vorgänge (Lazebnik *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1999). Über eine Kaskade von Aspartat-Proteasen wird hierbei die Freisetzung von Caspase-3 katalysiert, der exekutiven Komponente apoptotischer Proteolyse (Nakaya *et al.*, 1999). Substrate von Caspase-3 sind unter anderem die Lamine der Zellkernmembran, DNase-Inhibitoren (ICAD), sowie DNA-Polymerasen (PARP).

Wildtyp- und  $Crygb^{nop}$ -Linsenextrakte zeigen im Western blot eine spezifische Reaktion mit dem ungespaltenen **PARP** bei etwa **116kDa**.  $Crygb^{nop}$ -Extrakte zeigen zusätzlich eine starke Bande auf Höhe von **85kDa**, dem Molekulargewicht des Caspase-3-vermittelten **Abbauproduktes** von PARP (siehe Abbildung 5.20). Im Gegensatz zum Wildtyp ist Caspase-3 in der Linse von  $Crygb^{nop}$ -Mutanten offenbar aktiv und induziert dort apoptotische Prozesse. Nachfolgend sollen die beteiligten Komponenten identifiziert und ihre Aktivierung in Abhängigkeit vom terminalen Differenzierungsgrad der betroffenen Faserzellen diskutiert werden.

### 6.4.3 Freisetzung von Cytochrom C in Linsenfaserzellen von *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten

Für die Aktivierung von Caspase-3, und damit der beobachteten Spaltung von PARP in Linsen der *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante, werden mehrere Möglichkeiten vorgeschlagen. Anhand der in Abbildung 2.4 schematisch dargestellten Regulationsmechanismen sollte die Freisetzung von Cytochrom C aus der Mitochondrienmembran in das Zytoplasma eine apoptotische Kaskade in Gang setzen, an dessen Ende die Aktivierung von Caspase-3 steht.

In Linsen des Wildtyps wird ein cytoplasmatischer Signalgradient für Cytochrom C beobachtet, welcher maximale Intensität in den jungen Faserzellen des Linsenbogens besitzt, im Linsenkortex jedoch, nahe der Grenzfläche zum embryonalen Linsenkern, auf ein Minimum absinkt (siehe Abbildung 5.21). Diese Beobachtung stimmt mit Literaturdaten überein - die zur Ausbildung einer organellfreien Zone im Linsenkortex führende terminale Differenzierung ist durch einen sprunghaften, synchronen Abbau der Zellorganellen, und damit auch der Mitochondrien, gekennzeichnet (Bassnett *et al.*, 1992; Bassnett 1995).

In den Faserzellen des *Crygb<sup>nop</sup>*-Phänotyps ist das **cytoplasmatische Cytochrom C**-Signal konstant. Zusätzlich ist jedoch eine **nukleäre Akkumulation** von Cytochrom C in Faserzellen eines fortgeschrittenen Differenzierungsgrades erkennbar. Die Zellkerne junger Faserzellen im Linsenbogen erscheinen nicht gefärbt. In den vom *Crygb<sup>nop</sup>*-Phänotyp betroffenen sekundären Faserzellen des Linsenkortex erreicht das Cytochrom C-Signal jedoch ein Sättigungsniveau, welches in Richtung des aus primären Faserzellen bestehenden Linsenkerns erhalten bleibt. Die beobachtete Akkumulation von Cytochrom C in den Zellkernmembranen läßt sich durch Annahme einer hydrophoben Oberfläche für ein membranständiges Protein erklären, das sich nach seiner Freisetzung in das Zytoplasma nunmehr in einem wäßrigen Milieu befindet und daher eine hohe Tendenz zeigen wird, erneut in ein unpolares Kompartiment zu diffundieren.

Die Akkumulation von Cytochrom C in den Zellkernen stellt einen weiteren Hinweis auf ein gestörtes zelluläres Proteasesystem in *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten dar. Bereits in Abschnitt 6.2.2.3 wurde eine verminderte Aktivität des Proteasom-abhängigen Proteinabbaus in Linsenfaserzellen von *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten diskutiert. Offenbar unterliegt das aus den Mitochondrien freigesetzte Cytochrom C in der Linse von *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten keiner proteolytischen Prozessierung - und diffundiert daher in ein unpolares Kompartiment, die Kernmembran.

#### 6.4.4 Beteiligung von Proteinen der Bcl-2-Familie an apoptotischen Prozessen?

Die bisherigen Beobachtungen stehen im Einklang mit der Aktivierung des zelleigenen **Apoptoseprogramms** in Linsenfaserzellen. Neben der Spaltung von PARP wurde die Freisetzung von Cytochrom C in der Linse von *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten nachgewiesen. Als mögliche Ursache wird die **deregulierte Expression** von Proteinen der **Bcl-2-Familie** vorgeschlagen.

Die Bcl-2-Familie umfaßt sowohl Proteine, welche als Homodimere antiapoptotisch wirksam sind (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> und Bak), als auch solche, die durch Bildung von Heterodimeren mit der vorigen Gruppe Apoptose induzieren können (Bax und Bad). Ist das Bax/Bcl-2-Verhältnis wesentlich zugunsten von Bax verschoben, führt dies zur mitochondrialen Freisetzung von Cytochrom C in das Zytoplasma (Yang *et al.*, 1997) und damit zur Aktivierung von Caspase-3 (Nakaya *et al.*, 1999). Die beschriebenen regulatorischen Zusammenhänge sind schematisch in Abbildung 2.4 dargestellt.

Im Expressionsmuster des apoptose-inhibierenden **Bcl-2** werden **keine Unterschiede** zum Wildtyp gefunden. In allen untersuchten Entwicklungsstadien zeigt sich eine gleichmäßige Lokalisation von Bcl-2 in den Zellkernen primärer und sekundärer Faserzellen. Ein diffuses cytoplasmatisches Signal wird durch das in den Mitochondrien und im endoplasmatischen Retikulum vorhandene Bcl-2 verursacht (Krajewski *et al.*, 1993).

Für eine normale Linsenentwicklung wird offensichtlich kein Bax benötigt. In sämtlichen untersuchten Stadien embryonaler und postnataler Linsenentwicklung erscheinen Faserzellen des **Wildtyps Bax-negativ**. Der in Abschnitt 6.4 diskutierte Abbau von Zellorganellen durch ausgewählte Komponenten eines apoptotischen Programms scheint somit unabhängig von Bax zu erfolgen.

##### 6.4.4.1 Expression von Bax in Linsen der *Cryge<sup>t</sup>*-Mutante

Während der phänotypischen Entwicklung von *Cryge<sup>t</sup>*-Mutanten unterliegen die primären Faserzellen einer zunehmenden **posterioren Kompression** innerhalb der Linsenkapsel. Durch vergleichende histologische Analyse (Abschnitt 5.1) wurde gezeigt, daß dieser Prozeß nachfolgend zu einer progressiven Zytolyse der primären Faserzellen in Linsen der *Cryge<sup>t</sup>*-Mutante führt. Der posteriore Bereich der Linsenkapsel von *Cryge<sup>t</sup>*-Mutanten ist daher angefüllt mit degradierenden primären Faserzellen.

In neonatalen Linsen sind diese pathologischen Veränderungen bereits weit fortgeschritten. In diesem Stadium exprimieren primäre Faserzellen der *Cryge<sup>t</sup>*-Mutante bereits signifikante Mengen von Bax, einem Apoptose-initiierenden Protein. Die in der anterioren Hemisphäre der

Linsenkapsel elongierenden sekundären Faserzellen des *Cryge<sup>t</sup>*-Phänotyps hingegen zeigen nur eine schwache cytoplasmatische Färbung (Abbildung 5.25b).

Möglicherweise wird beobachtete **Hochregulierung** von **Bax** in den primären Linsenfaserzellen der *Cryge<sup>t</sup>*-Mutante durch ihre posteriore Kompression hervorgerufen. Die Aktivierung eines **apoptotischen Programms** stünde im Einklang mit den gravierenden morphologischen Veränderungen, die während der Kompression primärer Linsenfaserzellen in der Linsenkapsel von *Cryge<sup>t</sup>*-Mutanten beobachtet werden. Diese Hypothese wurde durch Analyse des Expressionsmusters von Bax im Hinblick auf den Beginn morphologischer Veränderungen primärer Faserzellen des *Cryge<sup>t</sup>*-Phänotyps überprüft.

In wildtypischen Faserzellen ist während der embryonalen Linsenentwicklung keine Expression von Bax detektierbar. Ebenso erscheinen die primären Faserzellen des *Cryge<sup>t</sup>*-Phänotyps während ihrer Elongation negativ für Bax. Mit dem Auswachsen sekundärer Faserzellen aus dem Linsnbogen beginnt jedoch ihre zunehmende Kompression in der posterioren Hemisphäre der Linsenkapsel, nachfolgend werden Schwellung und Zytolyse ihrer Zellmembranen beobachtet. Erwartungsgemäß zeigen diese komprimierten primären Faserzellen am posterioren Pol der Linse nunmehr eine intensive Expression von Bax (siehe Abbildung 5.27). *Cryge<sup>t</sup>*-Mutanten zeigen somit eine enge Kopplung zwischen morphologischen Veränderungen und der Expression von Bax in primären Faserzellen. Die beobachtete Hochregulierung von Bax in primären Linsenfaserzellen des *Cryge<sup>t</sup>*-Phänotyps ist somit eine direkte **Konsequenz** ihrer **posterioren Kompression** innerhalb der Linsenkapsel.

#### 6.4.4.2 *Expression von Bax in Linsen der Crygb<sup>nop</sup>-Mutante*

In Linsen der *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante erscheint der gesamte, aus zerstörten primären Faserzellen bestehende Linsenkern intensiv gefärbt. Offensichtlich ist die Zerstörung dieser Zellen schon so weit fortgeschritten, daß neben der eigentlichen spezifischen Detektion von Bax eine unspezifische Bindung des verwendeten Antikörpers an die lysierenden Zellen beobachtet wird. Für die Expression von Bax in den sekundären Faserzellen der *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante ergibt sich jedoch ein interessanter Zusammenhang. Offensichtlich ist die beobachtete Expression von Bax abhängig vom Differenzierungsgrad sekundärer Faserzellen. Während die **jungen Faserzellen** nahe des Linsnbogens **Bax-negativ** erscheinen, wird im Linsenkortex ein **sprunghafter Anstieg** der Bax-Expression beobachtet. Die Zellkerne erscheinen bereits intensiv gefärbt, bevor die ersten morphologischen Veränderungen in der Linse sichtbar werden. Auch mit steigender Differenzierung der sekundären Faserzellen in Richtung des Linsnkerns bleibt die Kernlokalisation von Bax erhalten.

Die Expression von Bax während der Embryonalentwicklung korreliert mit der Expression des verkürzten  $\gamma$ -Kristallins in Linsenfaserzellen der *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante (N. Klopp, persönliche Mitteilung). Im Stadium E18.5 ist bereits ein ähnliches Expressionsmuster beobachtbar, wie in neonatalen Linsen. Kortikale sekundäre Faserzellen zeigen eine Lokalisation von Bax in den Zellkernen, bevor morphologische Veränderungen sichtbar werden. Die geschwollenen und lysierenden primären Faserzellen des Linsenkerne erscheinen ebenfalls intensiv gefärbt (Abbildungen 5.23 und 5.24).

Im Stadium E15.5 hingegen, kurz nach beginnender Expression des verkürzten  $\gamma$ -Kristallins in den Linsenfaserzellen, erscheinen die Linsen der *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante negativ für Bax. Diese Beobachtung stimmt mit den histologischen Befunden überein, da die Faserzellen in diesem Stadium noch keine morphologischen Veränderungen aufweisen. In Linsen der *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante besteht somit ein enger Zusammenhang zwischen dem **Differenzierungsgrad** primärer und sekundärer Faserzellen, dem Beginn der typischen morphologischen Veränderungen, sowie der Akkumulation eines Apoptose-fördernden Proteins, Bax, in den Zellkernmembranen.

Es erscheint plausibel, daß die Expression von Bax in Linsenfaserzellen der *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante durch die Akkumulation eines verkürzten  $\gamma$ -Kristallins ausgelöst wird. Offenbar werden in der Linse von *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten apoptotische Prozesse induziert. Die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom C, sowie der Nachweis Caspase-3-vermittelter Abbauprodukte von PARP durch Western blotting, unterstützen diese Ansicht. Die beobachteten morphologischen Veränderungen, wie Schwellung und Zytolyse der Linsenfaserzellen, wären somit die Konsequenz apoptotischer Prozesse während der Linsenentwicklung von *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten.

#### 6.4.5 Regulation des *bax*-Gens

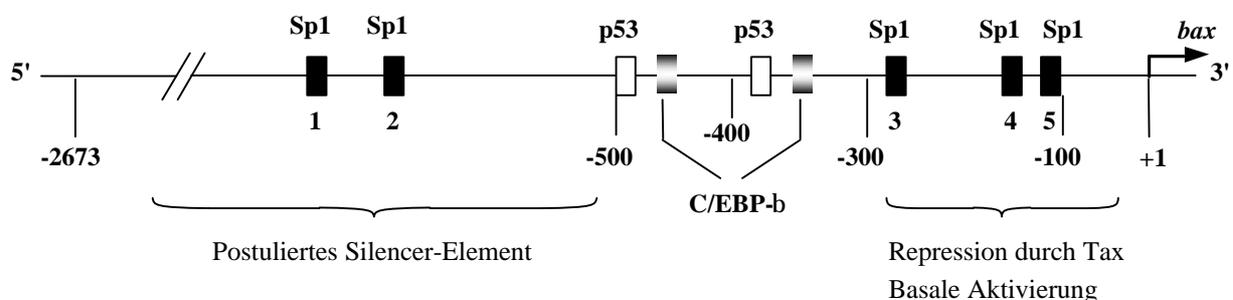
Schon lange ist bekannt, daß apoptotische Prozesse durch ionisierende Strahlung induzierbar sind. Die entstehenden Schädigungen zellulärer DNA führen nachfolgend zu einer erhöhten und nahezu konstant bleibenden Expression des Tumorsuppressor-Proteins p53, welches den Zellzyklus am G<sub>1</sub>-Haltepunkt für DNA-Reparaturmaßnahmen unterbricht. Gleichzeitig werden steigende Mengen an *bax*-Transkripten gefunden, welche durch **p53-vermittelte Transaktivierung** induziert werden (Hollander *et al.*, 1997). Die Kinetik, mit der das proapoptische Bax-Protein exprimiert wird, legt offenbar den Zeitrahmen fest, innerhalb dessen vorhandene DNA-Schädigungen behoben sein müssen.

Für *bax* sind bisher sind nur die Promotor-Sequenzen des Menschen (Miyashita *et al.*, 1995) und der Maus (Igata *et al.*, 1999) bekannt. Neben Bindestellen für basale Transkriptionsfaktoren, wie Sp1 und AP-1 werden Bindemotive für basische Helix-Loop-Helix (bHLH)-Proteine (E-Boxen), C/EBP und p53 gefunden. Die Homologie des murinen *bax*-Promoters zur humanen Sequenz beträgt im 5'-untranslatierten Bereich bis -210bp etwa 60%. Im Gegensatz zur humanen Sequenz besitzt der murine *bax*-Promoter nur zwei mögliche, p53-ähnliche Bindestellen. Ihre Positionen sind jedoch nicht konserviert und zeigen keine Homologie zur humanen Sequenz (Igata *et al.*, 1999).

#### 6.4.5.1 Aktivierende Elemente

Für den **humanen *bax*-Promoter** werden in einem 37bp umfassenden proximalen Bereich (Position -133 bis -77) **drei p53-Bindestellen** identifiziert (Thornborrow *et al.*, 1999). Ein 369bp-Fragment des humanen *bax*-Promoters (Position -687bp bis -318bp) wird durch humanes p53 transaktiviert (Miyashita *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu zeigt die **murine Sequenz** des *bax*-Promoters bis zu 6.5kb stromaufwärts des Transkriptionsstartes **keine Aktivierung durch p53** (Igata *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 1999). Eine direkte Regulation des murinen *bax*-Promoters durch p53 ist somit ausgeschlossen. Dennoch wird nach ionisierender Bestrahlung muriner Lymphzellen eine massive Expression von Bax beobachtet, gefolgt von der Einleitung programmierten Zelltodes (Kitada *et al.*, 1996). Möglicherweise erfolgt die konstitutive Aktivierung des murinen *bax*-Promoters durch p53 auf indirektem, bisher noch unbekanntem Wege.

Der murine *bax*-Promoter zeigt jedoch auch eine **basale Aktivität**, welche durch die Bindestellen für Sp1 und AP-1 vermittelt wird (siehe Abbildung 6.2). Spezifische Mutationen in einer dieser drei Sp1-Regionen zwischen Position -244bp und -104bp führen zu einer signifikanten Abnahme der Promoteraktivität in Zellkultur.



**Abb. 6.2:** Schematische Darstellung des murinen *bax*-Promoters. Identifizierte Motive sind als schwarz ausgefüllte Kästchen dargestellt. Teilweise ausgefüllte Bereiche stellen mögliche vorhergesagte Bindestellen dar. Für weiß markierte Bereiche konnte eine vorausgesagte Bindung bereits widerlegt werden. Mögliche Bindemotive wurden durch das Programm MatInspector gefunden.

#### 6.4.5.2 Reprimierung von *bax*

Die Deletion der beiden distal der Transkriptionsstartes gelegenen Sp1-Bindestellen (bezeichnet mit 1 und 2) zeigt eine Erhöhung der basalen Aktivität um ein Drittel, woraus auf die Existenz eines **Silencer-Elements** stromaufwärts von -455bp geschlossen werden kann (Igata *et al.*, 1999).

Eine konstitutive Repression des **humanen *bax*-Promoters** erfolgt durch spezifische Bindung des **HTLV-I Tax** Proteins (siehe auch TAXREB 107, Abschnitt 5.2.2) an eine der vier enthaltenen E-Box-Sequenzen. In Zellkultur wurde eine Reduktion der basalen Aktivität des unveränderten *bax*-Promoters auf ein Fünftel beobachtet. Die Deletion einer 27bp langen Sequenz, welche die am meisten distal gelegene E-Box enthält (Position -192bp bis -187bp), führt zur vollständigen Aufhebung einer Tax-vermittelten Repression des humanen *bax*-Promoters (Brauweiler *et al.*, 1997). Für die **murine Sequenz** ist eine Repression durch Tax nicht bekannt. Aufgrund der Sequenzhomologie der E-Boxen und ihrer konservierten Positionen erscheint eine analoge Regulation jedoch plausibel.

#### 6.4.6 Nachbildung apoptotischer Prozesse - ektopische Expression von *bax* in der Linse

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die Faserzellendifferenzierung in Linsen von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten massiven Störungen unterworfen ist. Neben einem verminderten Abbau von Zellorganellen und DNA werden gravierende pathologische Veränderungen beobachtet. Bereits in embryonalen Stadien beginnt die progressive Vakuolisierung der Linse, zusätzlich erfolgt die Schwellung und Zytolyse der primären und sekundären Linsenfaserzellen. Aufgrund der beobachteten morphologischen Veränderungen wurde daher vermutet, daß apoptotische Vorgänge an dieser Entwicklung beteiligt sind. In Linsen der *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante wurden mehrere vorhergesagte Ereignisse programmierten Zelltodes von Linsenfaserzellen nachgewiesen. Neben der mitochondrialen Freisetzung von Cytochrom C werden im Western blot spezifisch die Caspase-3-vermittelte Spaltprodukte von PARP erkannt. Immunhistochemische Nachweise belegen zudem, daß die morphologisch veränderten Faserzellen von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten signifikante Mengen eines pro-apoptotischen Proteins exprimieren. Das gefundene Expressionsmuster von Bax zeigt jedoch interessante Unterschiede zwischen den untersuchten Mutanten.

In *Cryge<sup>t</sup>*-Mutanten ist die Expression von **Bax** auf die in der posterioren Hemisphäre der Linsenkapsel zunehmend **komprimierten primären Faserzellen** beschränkt, während Linsenfaserzellen von *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutanten eine Akkumulation von Bax in den Zellkernen zeigen,

noch bevor morphologische Veränderungen auftreten. Auffällig in diesen Mutanten ist die **Abhängigkeit** der Bax-Expression vom **Differenzierungsgrad** der Faserzellen. In primären Faserzellen beginnt die Bax-Expression mit dem Auftreten der morphologischen Veränderungen während der Embryogenese.

Die Bax-Expression in der *Crygb<sup>nop</sup>*-Mutante wird offensichtlich durch die Expression des verkürzten  $\gamma$ -Kristallins verursacht. Bisher gibt es jedoch keine Hinweise auf die Signalwege, die zur Expression von Bax in Linsenfasern von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten führen. Mit der ektopischen Expression von Bax in der Linse **transgener Mäuse** lassen sich jedoch die vermuteten apoptotischen Mechanismen überprüfen, die durch die Expression von Bax in der Linse verursacht werden. In transgenen Mäusen wird *bax* unter Kontrolle eines 412bp umfassenden Fragments des  $\alpha$ A-Kristallin-Promoters spezifisch in der Linse transgener Tiere exprimiert. Das *bax*-Konstrukt (siehe Abbildung 5.28) wurde durch Pronukleus-Injektion in Eizellen des FVB/N-Inzuchtstammes injiziert. Die Mikroinjektion wurde von Mitarbeitern der *Transgenic Mouse Facility, National Institutes of Health (NIH)*, Bethesda, USA unter der Leitung von Dr. Eric Wawrousek durchgeführt. Durch spezifische PCR-Amplifikation eines 1331bp-Fragmentes werden die erhaltenen Tiere auf die Integration des Konstruktes überprüft. Durch *Southern blotting* wird die Anzahl der Integrate bestimmt. Hierfür wird die genomische DNA mit geeigneten Enzymen (*Sph I* und *Bgl II*) geschnitten und mit einer radioaktiv markierten Probe hybridisiert (siehe Abbildung 5.31).

Mindestens **zwei Integrationen** des *bax*-Konstruktes haben in das Genom der Tiere stattgefunden. Eine teilweise Integration führt zum Verlust der 5'-*Bgl II*- und der 3'-*Sph I*-Schnittstellen im Konstrukt. Eine vollständige Integration repräsentiert die Bande bei 4400bp. Sie erscheint nach Restriktion mit beiden Enzymen auf Höhe der Positivkontrolle, welche mit einer Länge von 1912bp dem intakten *bax*-Konstrukt entspricht. Beide Integrationen segregieren unterschiedlich. Die vollständige Integration des *bax*-Konstruktes in das Genom der Tiere ist offenbar stabil; sie wird bereits über drei Generationen weitergegeben.

Die Erstellung eines geeigneten **Mausmodells** für die vergleichende Untersuchung der pathologischen Veränderungen in der Linse von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten, war das Ziel dieser Arbeit. Mit den nun verfügbaren *bax*-transgenen Tieren ist ein Werkzeug geschaffen, mit dem die postulierten apoptotischen Prozesse in Faserzellen von  $\gamma$ -Kristallin-Mutanten genauer analysiert werden können. Insbesondere die Frage, ob **Bax-vermittelte apoptotische Prozesse** in Linsenfasern **hinreichend** für die beobachteten **morphologischen Veränderungen** und damit der Entwicklung einer Linsentrübung sind, läßt sich auf diesem Wege beantworten.

## 7. ANHANG

### 7.1 Verwendete Oligonukleotide

Angegeben sind die laufende Nummer und die Bezeichnung der Oligonukleotide, sowie die verwendete Annealing-Temperatur und die Nukleotidsequenz. Großbuchstaben geben die Schnittstellen für Restriktionsenzyme an. Die T7- und M13-Sequenz der in der differentiellen Genexpressionsanalyse benutzten *Anker-* und *Arbitrary Primer* sind fett geschrieben.

No.	Bezeichnung	°C	Sequenz
6409	<i>Cryaa</i> Promoter (for., <i>Bam</i> HI)	60	5' cca GGA TCC ccg agc tga gca tag aca ttt tgg 3'
6410	<i>Cryaa</i> Promoter (rev., <i>Eco</i> RI)	60	5' cga GAA TTC ccg aag gct ggc agt gag tc 3'
6463	Sequenzierung pCR3.1 (T7 for.)	50	5' taa tac gac tca cta tag gg 3'
6464	Sequenzierung pCR3.1 (BGHpA rev.)	60	5' tag aag gca cag tcg agg 3'
6481	bax (for., <i>Bgl</i> II)	65	5' gaA GAT CTa tta tgg acg ggt ccg ggg 3'
6482	bax (rev., <i>Xho</i> I)	60	5' gcC TCG AGt cat cag ccc atc ttc ttc cag a 3'
6766	<i>Cryaa</i> -Intron ( $\beta$ -Globin)-Linker (for.)	60	5' gta agc ttg tcg acc gat cct g 3'
6768	TAXREB 107 (for.)	60	5' gac cag ttt gtg agg ata cat c 3'
6769	TAXREB 107 (rev.)	60	5' cac cag aag ttt gtc att gcc acc t 3'
27445	<i>Southern blot</i> -Probe BGH-pA (for.)	62	5' tct gga aga aga tgg gct gat gac 3'
27446	<i>Southern blot</i> -Probe BGH-pA (rev.)	62	5' cat gcc tgc tat tgt ctt ccc 3'
27635	Psmb3 (for.)	60	5' tat aat gga ggg gcc gtc atg 3'
27636	Psmb3 (rev.)	60	5' gtc ctg gtg gtg atc ttg tc 3'
-	<i>Anker Primer</i> 1 (T7-dT <sub>12</sub> -AP1)	60	5' <b>ac gac tca cta tag ggc</b> ttt ttt ttt ttt ga 3'
-	<i>Anker Primer</i> 9 (T7-dT <sub>12</sub> -AP9)	60	5' <b>ac gac tca cta tag ggc</b> ttt ttt ttt ttt ac 3'
-	<i>Arbitrary Primer</i> 1 (M13-ARP1)	60	5' <b>a caa ttt cac aca gga</b> cga ctc caa g 3'
-	<i>Arbitrary Primer</i> 2 (M13-ARP2)	60	5' <b>a caa ttt cac aca gga</b> gct agc atg g 3'
-	<i>Arbitrary Primer</i> 3 (M13-ARP3)	60	5' <b>a caa ttt cac aca gga</b> gac cat tgc a 3'
-	<i>Arbitrary Primer</i> 4 (M13-ARP4)	60	5' <b>a caa ttt cac aca gga</b> gct agc aga c 3'

## 7.2 Nukleotidsequenzen aus der differentiellen Genexpressionsanalyse

Die aus der differentiellen Genexpressionsanalyse erhaltenen Nukleotidsequenzen sind nachfolgend angegeben. Die Datenbanksuche wurde mit dem Programm BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) der *National Library of Medicine*, Bethesda, USA, durchgeführt.

In der ersten Zeile steht jeweils die Identifikationsnummer der Nukleotidsequenz, wie sie in der Pubmed-Datenbank (*National Library of Medicine*, Bethesda, USA) angegeben ist. Es folgen die Länge der veröffentlichten Sequenz ('Length'), welche sich im Nukleotidvergleich jeweils in der unteren Zeile befindet und als 'Subject' abgekürzt ist. In diesem Abschnitt sind ebenso die Zahl der gefundenen Übereinstimmungen angegeben ('Identities'), sowie die Anzahl und Länge eventueller Lücken in der Nukleotidabfolge ('Gaps'), die sich aus dem Vergleich mit der veröffentlichten Sequenz ergeben.

### 7.2.1 Pubmed-Sequenz M11408 (S16 ribosomales Protein, gesamte cds, aus Maus)

gb|M11408|MUSRPS16

Mouse S16 ribosomal protein gene, complete cds.

Length = 2649, Score = 364 bits (182), Expect = 8e-99

Identities = 182/182 (100%), Positives = 182/182 (100%)

```

Query:   50 aaggagatcaaagatatacctcatccaatacgcgatcggaccctgcttgtagctgacccccgt 109
          |||
Sbjct: 2108 aaggagatcaaagatatacctcatccaatacgcgatcggaccctgcttgtagctgacccccgt 2167

Query:   110 cgctgcgaatccaaaaagtttgagggtcctggtgcccgatgcccgataaccagaaatcctac 169
          |||
Sbjct: 2168 cgctgcgaatccaaaaagtttgagggtcctggtgcccgatgcccgataaccagaaatcctac 2227

Query:   170 cgataagcccatctcaaggatcgggggttacctttgtaataaacatcctaggattttaa 229
          |||
Sbjct: 2228 cgataagcccatctcaaggatcgggggttacctttgtaataaacatcctaggattttaa 2287

Query: 230  gt 231
          ||
Sbjct: 2288 gt 2289

```

### 7.2.2 Pubmed-Sequenz J00376 (*alphaA-Kristallin mRNA, 3'-Ende, aus Maus*)

gb|J00376|MUSCRYAAB

Mouse lens alpha-A-crystallin mRNA, 3' end.

Length = 1025, Score = 253 bits (125), Expect = 1e-65

Identities = 187/205 (91%), Positives = 187/205 (91%), Gaps = 8/205 (3%)

```

Query: 53 agccctgtgctagagcccctgatggcagnctcctccttattgcccatacttactgca--- 109
      ||||| ||||||||||||||||||| ||||||| |||||||||||||||||
Sbjct: 819 agccctatgctagagcccctgatggcagcctcctcctttttgcccatacttactgcaactg 878

Query:110 --gccacn-tgtgctgggctccgacagccagcttctctcatatcctcttcctgtgacttt 166
      ||| | ||||||||||||||||||| ||||||| |||||||||||||||||
Sbjct: 879 cagccgccgtgtgctgggctccgacagccagcttctctcatatcctcttcctgtgacttt 938

Query: 167 ctctactctgtagtattgctcctgaggaagcctgggtcatccatgaagaatggagcccctg 226
      ||||||||||||||||||| ||| | | ||||||||||||||| |||||||||||||||
Sbjct: 939 ctctactctgtagtattgctcctaagg-accttgggtcatccatg-agaatggagcccctg 996

Query: 227 gcagacaataaagagnangtgacag 251
      ||||||||||||||| | |||||
Sbjct: 997 gcagacaataaagagcaggtgacag 1021

```

### 7.2.3 Pubmed-Sequenz J00378 (*beta-A3/A1-Kristallin mRNA, aus Maus*)

gb|J00378|MUSCRYBA2

Mouse lens beta-A3/A1-crystallin mRNA, 3' end.

Length = 550, Score = 220 bits (110), Expect = 2e-55

Identities = 78/278 (28%), Positives = 78/278 (28%), Gaps = 10/278 (3%)

```

Query: 127 cgctaacattaggaagcagagtcagggcagatcatganattctaganagcttatcaagat 186
      ||||||||| ||||||||| ||| ||||||||| ||||| ||||||||| ||||| |||||
Sbjct: 525 cgctaacatttgggaagcagtgctcgggcagaacatgaaattctagagtgcttagcaagat 466

Query: 187 gtcatagctagagggatncnaggaactnnagctctattgcagtattcggcgaatcagatc 246
      ||||| ||| ||||||||| ||||||| ||||||||| ||||||||| |||||
Sbjct: 465 gtcat-gcttgagggatttttggaaacttttgctctattggtgattcggcgaatt-gatt 408

Query: 247 aggatctgggaagtctgggcgtgagatccccactctggccagnagctcagtagtctcctc 306
      ||||||||||||||||||| ||||||||||||||| ||||| |||||||||||
Sbjct: 407 -ggatctgggaagtctgggcgtgagatccccactctggccagt-gct-tgtagtctcctc 351

Query: 307 catggtggtcacactccaagatatactagataaccacgatatccatgggnactaggtagc 366
      ||||||||||||||||||| ||||||||||||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 350 catggtggtcacactccaagatatact-gataaccacgatatcca-gggtact-ggtagc 294

Query: 367 aaatcccaggccccacatcagtatcttcatggaaccaa 404
      ||| ||||||||||||||| |||||||||||||||
Sbjct: 293 aaa-cccaggccccacat-tgtatcttcatggaaccaa 258

```

**7.2.4 Pubmed-Sequenz J00378 (beta-A3/A1-Kristallin mRNA, aus Maus)**

gb|J00378|MUSCRYBA2

Mouse lens beta-A3/A1-crystallin mRNA, 3' end.

Length = 550, Score = 618 bits (309), Expect = e-175

Identities = 316/317 (99%), Positives = 316/317 (99%), Gaps = 1/317 (0%)

```
Query: 68  tttattgtggatTTTtagcgctaacatTTTggaagcagtgTctgggcagaacatgaaattct 127
          |||
Sbjct: 542  tttattgtggatTTTtagcgctaacatTTTggaagcagtgTctgggcagaacatgaaattct 483

Query: 128  agagtGcttagcaagatgtcatgcttgagggattTTTggaactTTTgctctattgttgta 187
          |||
Sbjct: 482  agagtGcttagcaagatgtcatgcttgagggattTTTggaactTTTgctctattgttgta 423

Query: 188  ttcggcgaattgattggatctgggaagtctgggcgtgagatccccactctggccagtgtc 247
          |||
Sbjct: 422  ttcggcgaattgattggatctgggaagtctgggcgtgagatccccactctggccagtgtc 363

Query: 248  tgtagtctcctccatggTggtcacactccaagatatactgataaccacgatatccagggg 307
          |||
Sbjct: 362  tgtagtctcctccatggTggtcacactccaagatatactgataaccacgatatcca-ggg 304

Query: 308  tactggtagcaaaccaggccccacattgtatcttcatggaaccaacttcattgttgaac 367
          |||
Sbjct: 303  tactggtagcaaaccaggccccacattgtatcttcatggaaccaacttcattgttgaac 244

Query: 368  caaccatggcttgcaa 384
          |||
Sbjct: 243  caaccatggcttgcaa 227
```

### 7.2.5 Pubmed-Sequenz V00728 (beta-Kristallin mRNA, aus Maus)

emb|V00728|MMCR01

Mouse mRNA encoding beta-crystallin.

Length = 669, Score = 596 bits (298), Expect = e-168

Identities = 315/318 (99%), Positives = 315/318 (99%), Gaps = 2/318 (0%)

```

Query: 65  tttattgtggatTTTtagcgctaacatTTTggaagcagtgTctgggcagaacatgaaattct 124
          |||
Sbjct: 661  tttattgtggatTTTtagcgctaacatTTTggaagcagtgTctgggcagaacatgaaattct 602

Query: 125  agagtGcttagcaagatgtcatgcttgagggatTTTtTggaactTTTgctctattgttgta 184
          |||
Sbjct: 601  agagtGcttagcaagatgtcatgcttgagggatTTTtTggaactTTTgctctattgttgta 542

Query: 185  TTCggcgaattgattggatctgggaagtctgggcgtgagatccccactctggccagtgct 244
          |||
Sbjct: 541  TTCggcgaattgattggatctgggaagtctgggcgtgagatccccactctggccagtgct 482

Query: 245  tGtagtctcctccatggcggtcacactccaagatatactgataaccacgatatccagggg 304
          |||
Sbjct: 481  tGtagtctcctccatggcggtcacactccaagatatactgataaccacgatatcca-ggg 423

Query: 305  tactggTtagcaaaccaggccccacattgtatcttcatggaaccaacttcattgttgaa 364
          |||
Sbjct: 422  tactgg-tagcaaaccaggccccacattgtatcttcatggaaccaacttcattgttgaa 364

Query: 365  ccaaccatggcttgcaa 382
          |||
Sbjct: 363  ccaaccatggcttgcaa 346

```

### 7.2.6 Pubmed-Sequenz V00728 (beta-Kristallin mRNA, aus Maus)

emb|V00728|MMCR01

Mouse mRNA encoding beta-crystallin.

Length = 669, Score = 582 bits (291), Expect = e-164

Identities = 321/326 (98%), Positives = 321/326 (98%), Gaps = 4/326 (1%)

```

Query: 44  ttgcaagccatgggTtggttca-caatgaagttggttccatgaagataca-tgtggggcc 101
          |||
Sbjct: 346  ttgcaagccatgggTtggttcaacaatgaagttggttccatgaagatacaatgtggggcc 405

Query: 102  tgggTtgctaccagtaccctggatatcgtggttatcagtatatcttgagtgTgaccac 161
          |||
Sbjct: 406  tgggTtgctaccagtaccctggatatcgtggttatcagtatatcttgagtgTgaccac 465

Query: 162  natggaggagactacaagcactggccagagtggggatctcacgcccagacttcccagatc 221
          |||
Sbjct: 466  catggaggagactacaagcactggccagagtggggatctcacgcccagacttcccagatc 525

Query: 222  caatcaattcgccgaataacaacaatagagcaaaaagttccaaaaatccctcaagcatgaca 281
          |||
Sbjct: 526  caatcaattcgccgaataacaacaatagagcaaaaagttccaaaaatccctcaagcatgaca 585

Query: 282  tcttgctaagncactctagaatttcatgtttctgcccagacactgcttccaaatgTtagc 341
          |||
Sbjct: 586  tcttgctaag-cactctagaatttcatg-ttctgcccagacactgcttccaaatgTtagc 643

Query: 342  gctaaaatccacaataaatgtcattt 367
          |||
Sbjct: 644  gctaaaatccacaataaatgtcattt 669

```

**7.2.7 Pubmed-Sequenz K02585 (gammaB-Kristallin mRNA, 3'-Ende, aus Maus)**

gb|K02585|MUSCRYGB Mouse gamma-B-crystallin (gamma-3) mRNA, 3' end.

Length = 482, Score = 844 bits (422), Expect = 0.0

Identities = 475/485 (97%), Positives = 475/485 (97%), Gaps = 6/485 (1%)

```
Query: 52  ccagaatcataagctacatactttatattggctctagaggaggaaa-gtagagtctcaaaa 110
      |||
Sbjct: 481  ccagaatcataagctacatactttatattggctctagaggaggaaaagtagagtctcaaaa- 423

Query: 111  tgcctcagtaaaaaatccatgactcgctaaaagagccaactttggcatttgcagcccccc 170
      |||
Sbjct: 422  tgcctcagtaaaaaatccatgactcgctaaaagagccaactttggcatttgcagcccccc 363

Query: 171  agtcaagatatctcctgtactccccggccttagcagggtactgccgtcctctgttagcta 230
      |||
Sbjct: 362  agtcaagatatctcctgtacatcccggccttagcagggtactgccgtcctctgt-agcta 304

Query: 231  ggcattctcatagagaaccagcagccctccatcacattgagggnaagtgatttactgaa 290
      |||
Sbjct: 303  ggcattctcatagagaaccagcagccctccatcacattgaggg-agtgatttactgaa 245

Query: 291  gtggaagcgatcctgaaagagagagacaatcgtctgtgatctctgacatttgtcctctga 350
      |||
Sbjct: 244  gtggaagcgatcctgaa-gagagagagacaatcgtctgtgatctctgacatttgtcctctga 186

Query: 351  agtcatctttttcgtagatcctcattctgtaagtgccagagtgttgggggatgaggcggc 410
      |||
Sbjct: 185  agtcatctttttcgtagatcctcattctgtaagtgccagagtgttgggggatgaggcggc 126

Query: 411  aggaacgaatggagtcgctgaaacccatccactgctggtagtcaggggtac-ctccacgtc 469
      |||
Sbjct: 125  aggaacgaatggagtcgctgaaacccatccactgctggtagtcaggggtactctccacgtc 66

Query: 470  tcaggaagtactggtggccctggtagttggggcgctcatanagcatccagcagccactgt 529
      |||
Sbjct: 65  tcaggaagtactggtggccctggtagttggggcgctcatagagcatccagcagccactgt 6

Query: 530  ccacg 534
      |||
Sbjct: 5  ccacg 1
```

### 7.2.8 Pubmed-Sequenz Z22573 (*gammaB-Kristallin-Gen, aus Maus*)

emb|Z22573|MMGBCRYA

M.musculus gamma-B-crystallin gene.

Length = 2670, Score = 618 bits (309), Expect = e-175

Identities = 333/337 (98%), Positives = 333/337 (98%), Gaps = 3/337 (0%)

```

Query: 64   gctacatactttatattggctctagaggaggaaagtagagtctcaaaatgcctcagtaaaa 123
          |||
Sbjct: 2670 gctacatactttatattggctctagaggaggaaagtagagtctcaaaatgcctcagtaaaa 2611

Query: 124  atccatgactcgcctaaaagagccaactttggcatttgagccccccagtcagatatct 183
          |||
Sbjct: 2610 atccatgactcgcctaaaagagccaactttggcatttgagccccccagtcagatatct 2551

Query: 184  cctgtactccccggccttagcaggtagctgccgtcctctgttagctaggcatctcataga 243
          |||
Sbjct: 2550 cctgtactccccggccttagcaggtagctgccgtcctctg-tagctaggcatctcataga 2492

Query: 244  gaaccagcagccctccatcacattgagggagtgatttactgaagtggaagcgatcc 303
          |||
Sbjct: 2491 gaaccagcagccctccatcacattgaggg-agtgatttactgaagtggaagcgatcc 2433

Query: 304  tgaaagagagagacaatcgtctgtgatctctgacatttgcctctgaagtcatttttc 363
          |||
Sbjct: 2432 tg-aagagagagacaatcgtctgtgatctctgacatttgcctctgaagtcatttttc 2374

Query: 364  gtagatcctcattctgtaagtgccagagtgttggggg 400
          |||
Sbjct: 2373 gtagatcctcattctgtaagtgccagagtgttggggg 2337

```

Score = 342 bits (171), Expect = 4e-92

Identities = 182/185 (98%), Positives = 182/185 (98%), Gaps = 1/185 (0%)

```

Query: 394  ttgggggatgaggcggcaggaacgaatggagtcgctgaaacccatccactgctggtagtc 453
          |||
Sbjct: 1002 ttgggggatgaggcggcaggaacgaatggagtcgctgaaacccatccactgctggtagtc 943

Query: 454  agggtagc-ctccacgtctcaggaagtactggtggcctggtagttggggcgctcatanag 512
          |||
Sbjct: 942  agggtagcctccacgtctcaggaagtactggtggcctggtagttggggcgctcatagag 883

Query: 513  catccagcagccactgtccacgcggacagaattgcancggctgaagtaggtctgcaggtt 572
          |||
Sbjct: 882  catccagcagccactgtccacgcggacagaattgcagcggctgaagtaggtctgcaggtt 823

Query: 573  ggggc 577
          |||
Sbjct: 822  ggggc 818

```

**7.2.9 Pubmed-Sequenz X81987 (TAXREB107 mRNA, aus Maus)**

emb|X81987|MMTAX107

M.musculus mRNA for TAX responsive element binding protein 107

Length = 950, Score = 738 bits (369), Expect = 0.0

Identities = 421/441 (95%), Positives = 421/441 (95%), Gaps = 1/441 (0%)

```
Query: 48  acctatgaagctgtttaattagggttaacaattagaagaccagtttgtgaggatacatcc 107
          |||
Sbjct: 922  acctatgaagctgtttaattagggttaacaattagaagaccagtttgtgaggatacatcc 863

Query: 108  cgtttgtcagggaaaactgagagcgcaggtagccctggagttgaggaacagctggaatct 167
          |||
Sbjct: 862  cgtttgtcagggaaaactgagagcgcaggtagccctggagctgaggaacagctttaatct 803

Query: 168  ttggcaaaatctgcaaatccacagctttctgggtcagcctttcgctgctctgtaatctcgt 227
          |||
Sbjct: 802  ttggcaaaatctgcaaatccacagctttctgggtcagcctttcgctgctctgtaatctcgt 743

Query: 228  atttctccttctctgtgtcgaagatctcgccctcctgatgcctgggcttgccgagctgct 287
          |||
Sbjct: 742  atttctccttctctgtgtcgaagatctcgccctcctgatgcctgggcttgccgagctgct 683

Query: 288  tcttcttgaagtaagcgtcagtcaggtggttggggattttaacatcgctgatatnactt 347
          |||
Sbjct: 682  tcttcttgaagtaagcgtcagtcaggtggttggggattttaacatcgctgatatcaactt 623

Query: 348  ttgtanaggtggcaatgacaaaacttctggtgtgttctgcgcanaggaa-tctgttgatgg 406
          |||
Sbjct: 622  ttgtagaggtggcaatgacaaaacttctggtgtgttctgcgcagaggaactctgttgatga 563

Query: 407  caagangcccagtcgcanconcaagccnctgtccacctgcttcanganaacnactctct 466
          |||
Sbjct: 562  caagaggcccagtcacaagcagcaagccactgtccagctgcttcaggaaaaccactctct 503

Query: 467  tgcccctgtngcgcccagtgga 487
          |||
Sbjct: 502  tgcccctgtggcgcccagtgga 482
```

**7.2.10 Pubmed-Sequenz AF060092.1 (Psm3 mRNA, aus Maus)**

gb|AF060092.1|AF060092

Mus musculus proteasome subunit C10-II (Psm3) mRNA, complete cds

Length = 652, Score = 839 bits (423), Expect = 0.0

Identities = 439/445 (98%), Strand = Plus / Plus

```
Query: 30  gcagacagacgtttcgggattnnggccagatggtgaccacggacttccagaagatcttt 89
          |||
Sbjct: 86  gcagacagacgtttcgggatccaggccagatggtgaccacggacttccagaagatcttt 145
```

```
Query: 90  cccntgggtgacaggctctacataggcctggccggcctggccactgacgtccagacagt 149
          |||
Sbjct: 146 cccatgggtgacaggctctacataggcctggccggcctggccactgacgtccagacagt 205
```

```
Query: 150 gcccagcgtctcaagttccgactgaacttgatgagctgaaagaaggctcgacagatcaag 209
          |||
Sbjct: 206 gcccagcgtctcaagttccgactgaacttgatgagctgaaagaaggctcgacagatcaag 265
```

```
Query: 210 ccttacaccctcatgagcatgggtggccaacctcctgtatgagaagcggttcggtccttac 269
          |||
Sbjct: 266 ccttacaccctcatgagcatgggtggccaacctcctgtatgagaagcggttcggtccttac 325
```

```
Query: 270 tacacagagcctgtcattgctggcctggacccgaagaccttcaagcccttcatttgctct 329
          |||
Sbjct: 326 tacacagagcctgtcattgctggcctggacccgaagaccttcaagcccttcatttgctct 385
```

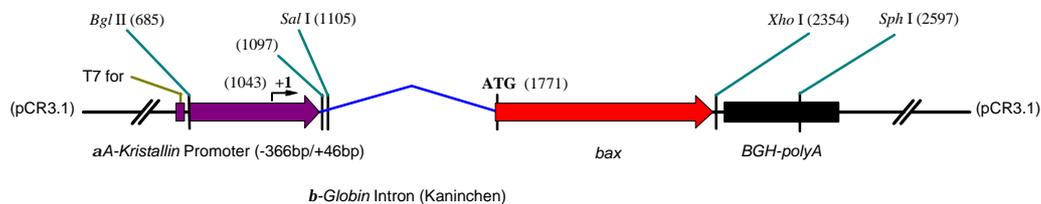
```
Query: 330 ctggacctcatcggctgtcccatgggtgactgatgactttgtagtcagtggtacctgctcc 389
          |||
Sbjct: 386 ctggacctcattggctgtcccatgggtgactgatgactttgtagtcagtggtacctgctcc 445
```

```
Query: 390 gaacaaatgtatgggatgtgtgagtcctctctgggggcccacatggatccagaacacctg 449
          |||
Sbjct: 446 gaacaaatgtatgggatgtgtgagtcctctctggggagcccacatggatccagaacacctg 505
```

```
Query: 450 tttgaaaccatttctcaggccatgc 474
          |||
Sbjct: 506 tttgaaaccatttctcaggccatgc 530
```

### 7.3 DNA-Sequenz zur Herstellung *bax*-transgener Mäuse

Für die Herstellung des DNA-Konstrukts zur Generierung *bax*-transgener Mäuse wurde der eukaryotische Expressionsvektor pCR3.1<sup>®</sup> (Invitrogen) verwendet. Die angegebenen Positionen beziehen sich jeweils auf deren Lage im Vektorplasmid. Die Abfolge der eingefügten Nukleotidsequenzen ist nachfolgend beschrieben. Unter Kontrolle des  $\alpha$ A-Kristallin-Promoters (Wawrousek *et al.*, 1990) erfolgt die linsenspezifische Expression der *bax*-cDNA. Für die Erzeugung einer künstlichen Spleißstelle stromaufwärts der *bax*-cDNA wurde die Sequenz des zweiten Introns des *b-Globin*-Gens aus Kaninchen verwendet. Als Polyadenylierungssequenz dient die vorhandene BGH-Sequenz aus dem Expressionsvektor, welche sich im Anschluß an die *Xho I*-Schnittstelle befindet.



Bgl III  
~~~~

638 TAATACGACT CACTATAGGG AGACCCAAGC TGGCTAGAGC GGCCGCAGAT  
ATTATGCTGA GTGATATCCC TCTGGGTTTCG ACCGATCTCG CCGGCCTCTA

Bgl III  
~~

688 CTCTGGAGGT TTCGGAGCTC TGCAGATGGC CTGCTAATCT GTGCCTACCT  
GAGACCTCCA AAGCCTCGAG ACGTCTACCG GACGATTAGA CACGGATGGA

738 CTCCCCACCT GTGAAACAGG GCTCTGAATT CTTCTTCCAA AGGAGGCCAG  
GAGGGGTGGA CACTTTGTCC CGAGACTTAA GAAGGAGGTT TCCTCCGGTC

788 GAGGATGCCT CAGTACAATG TGGGAAGAAA CAGTGATGTC CCTTGGCTCA  
CTCCTACGGA GTCATGTTAC ACCCTTCTTT GTCACTACAG GGAACCGAGT

838 AAGGATAAGG CTCTCCACAG ACCTTCTTGG AGACATCTGG TCTGAGAGCC  
TTCCTATTCC GAGAGGTGTC TGAAGAACC TCTGTAGACC AGACTCTCGG

888 TCTGCTGCTC AGCGTGTGTT GCTGGGGCTG GGCAGGCGGG TGAGCATTCC  
AGACGACGAG TCGCACACAA CGACCCCGAC CCGTCCGCC ACTCGTAAGG

938 AGCTGCTGAC GGTGCAGCCT CTCCCCGAG CTGAGCATAG ACATTTTGGG  
TCGACGACTG CCACGTCGGA GAGGGGGCTC GACTCGTATC TGTA AAACCC

988 AAATCCCTTA ATTCTCCAT TCTGTGCAGG CATATATAGG GAGGGCTGGA  
TTTAGGGAAT TAAGGAGGTA AGACACGTCC GTATATATCC CTCCCGACCT

+1  
 ↙  
 ↘

1038 ACGCT**A**GCTC ACCACCGCAC TGCCCAGAGG CTCCTGTCTG ACTCACTGCC  
 TCGGAT**T**CGAG TGGTGGCGTG ACGGGTCTCC GAGGACAGAC TGAGTGACGG

SalI  
~~~~~

1088 AGCCTTCGGT AAGCTTGTCTG ACCGATCCTG AGAACTTCAG GGTGAGTTTG  
 TCGGAAGCCA TTCGAACAGC TGGCTAGGAC TCTTGAAGTC CCACTCAAAC

1138 GGGACCCTTG ATTGTTCTTT CTTTTTCGCT ATTGTAAAAAT TCATGTTATA  
 CCCTGGGAAC TAACAAGAAA GAAAAAGCGA TAACATTTTA AGTACAATAT

1188 TGGAGGGGGC AAAGTTTTCA GGGTGTGTGTT TAGAATGGGA AGATGTCCCT  
 ACCTCCCCCG TTTCAAAAGT CCCACAACAA ATCTTACCCCT TCTACAGGGA

1238 TGTATCACCA TGGACCCTCA TGATAATTTT GTTTCTTTCA CTTTCTACTC  
 ACATAGTGGT ACCTGGGAGT ACTATTAATAA CAAAGAAAAGT GAAAGATGAG

1288 TGTTGACAAC CATTGTCTCC TCTTATTTTC TTTTCATTTT CTGTAACTTT  
 ACAACTGTTG GTAACAGAGG AGAATAAAAAG AAAAGTAAAA GACATTGAAA

1338 TTCGTTAAAC TTTAGCTTGC ATTTGTAACG AATTTTTTAAA TTCACTTTTG  
 AAGCAATTTG AAATCGAACG TAAACATTGC TTAAAAATTT AAGTGAAAAC

1388 TTTATTTGTC AGATTGTAAG TACTTTCTCT AATCACTTTT TTTTCAAGGC  
 AAATAAACAG TCTAACATTC ATGAAAGAGA TTAGTGAAAA AAAAGTTCCG

1438 AATCAGGGTA TATTATATTG TACTTCAGCA CAGTTTTTAGA GAACAATTGT  
 TTAGTCCCAT ATAATATAAC ATGAAGTCGT GTCAAAAATCT CTGTGTTAACA

1488 TATAATTTAA TGATAAGGTA GAATATTTCT GCATATAAAT TCTGGCTGGC  
 ATATTAATTT ACTATTCCAT CTTATAAAGA CGTATATTTA AGACCGACCG

1538 GTGGAAATAT TCTTATTGGT AGAAACAACCT ACATCCTGGT CATCATCCTG  
 CACCTTTATA AGAATAACCA TCTTTGTTGA TGTAGGACCA GTAGTAGGAC

1588 CCTTTCTCTT TATGGTTACA ATGATATACA CTGTTTGAGA TGAGGATAAA  
 GGAAAGAGAA ATACCAATGT TACTATATGT GACAAACTCT ACTCCTATTT

1638 ATACTCTGAG TCCAAACCGG GCCCCTCTGC TAACCATGTT CATGCCTTCT  
 TATGAGACTC AGGTTTGGCC CGGGGAGACG ATTGGTACAA GTACGGAAGA

1688 TCTCTTTCTT ACAGCTCCTG GGCAACGTGC TGGTTGTTGT GCTGTCTCAT  
 AGAGAAAGGA TGTCGAGGAC CCGTTGCACG ACCAACAAACA CGACAGAGTA

1738 CATTTTGGCA AAGAATTCTT CGACGGATCT ATT**A**TGGACG GGTCCGGGGA  
 GTAAAACCGT TTCTTAAGGA GCTGCCTAGA TA**A**T**A**CCTGC CCAGGCCCTT

1788 GCAGCTTGGG AGCGGCGGGC CCACCAGCTC TGAACAGATC ATGAAGACAG  
 CGTCGAACCC TCGCCGCCCG GGTGGTCGAG ACTTGTCTAG TACTTCTGTC

1838 GGGCCTTTTT GCTACAGGGT TTCATCCAGG ATCGAGCAGG GAGGATGGCT  
 CCCGGA AAAA CGATGTCCCA AAGTAGGTCC TAGCTCGTCC CTCTACCGA

1888 GGGGAGACAC CTGAGCTGAC CTTGGAGCAG CCGCCCCAGG ATGCGTCCAC  
 CCCCTCTGTG GACTCGACTG GAACCTCGTC GGCGGGGTCC TACGCAGGTG

1938 CAAGAAGCTG AGCGAGTGTC TCCGGCGAAT TGGAGATGAA CTGGACAGCA  
 GTTCTTCGAC TCGCTCACAG AGGCCGCTTA ACCTCTACTT GACCTGTTCGT

1988 ATATGGAGCT GCAGAGGATG ATTGCTGACG TGGACACGGA CTCCCCCGA  
 TATACCTCGA CGTCTCCTAC TAACGACTGC ACCTGTGCCT GAGGGGGGCT

2038 GAGGTCTTCT TCCGGGTGGC AGCTGACATG TTTGCTGATG GCAACTTCAA  
 CTCCAGAAGA AGGCCACCG TCGACTGTAC AAACGACTAC CGTTGAAGTT

2088 CTGGGGCCGC GTGGTTGCC TCTTCTACTT TGCTAGCAAA CTGGTGCTCA  
 GACCCCGGCG CACCAACGGG AGAAGATGAA ACGATCGTTT GACCACGAGT

2138 AGGCCCTGTG CACTAAAGTG CCCGAGCTGA TCAGAACCAT CATGGGCTGG  
 TCCGGGACAC GTGATTTTAC GGGCTCGACT AGTCTTGGTA GTACCCGACC

2188 ACACTGGACT TCCTCCGTGA GCGGCTGCTT GTCTGGATCC AAGACCAGGG  
 TGTGACCTGA AGGAGGCACT CGCCGACGAA CAGACCTAGG TTCTGGTCCC

2238 TGGCTGGGAA GGCCTCCTCT CCTACTTCGG GACCCCCACA TGGCAGACAG  
 ACCGACCCTT CCGGAGGAGA GGATGAAGCC CTGGGGGTGT ACCGTCTGTC

2288 TGACCATCTT TGTGGCTGGA GTCCTCACCG CCTCGCTCAC CATCTGGAAG  
 ACTGGTAGAA ACACCGACCT CAGGAGTGGC GGAGCGAGTG GTAGACCTTC

## XhoI

~~~~~

2338 AAGATGGGCT **GATG**ACTCGA GTCTAGAGGG CCCGTTTAAA CCCGCTGATC  
 TTCTACCCGA **CTACT**GAGCT CAGATCTCCC GGGCAAATTT GGGCGACTAG

2388 AGCCTCGACT GTGCCTTCTA GTTGCCAGCC ATCTGTTGTT TGCCCTCCC  
 TCGGAGCTGA CACGGAAGAT CAACGGTCGG TAGACAACAA ACGGGGAGGG

2438 CCGTGCCTTC CTTGACCCTG GAAGGTGCCA CTCCCCTGT CCTTTCCTAA  
 GGCACGGAAG GAACCTGGAC CTTCCACGGT GAGGGTGACA GGAAAGGATT

2488 TAAAATGAGG AAATTGCATC GCATTGTCTG AGTAGGTGTC ATTCTATTCT  
 ATTTTACTCC TTTAACGTAG CGTAACAGAC TCATCCACAG TAAGATAAGA

2538 GGGGGGTGGG GTGGGGCAGG ACAGCAAGGG GGAGGATTGG GAAGACAATA  
 CCCCCACCC CACCCCGTCC TGTCGTTCCC CCTCCTAACC CTTCTGTTAT

## SphI

~~~~~

2588 GCAGGCATGC TGGGGATGCG GTGGGCTCTA TGGCTTCTGA GGCGAAAAGA  
 CGTCCGTACG ACCCTACGC CACCCGAGAT ACCGAAGACT CCGCCTTCT

2638 ACCAGTGGCG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAA  
 TGGTCACCGC CATTATGCCA ATAGGTGTCT TAGTCCCCTA TTGCGTCTT

## 8. LITERATUR

- Bassnett S. (1992) Mitochondrial dynamics in differentiating fiber cells of the mammalian lens. *Curr Eye Res* **11**: 1227-1232.
- Bassnett S. (1995) The fate of the Golgi apparatus and the Endoplasmic Reticulum during lens fiber cell differentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**: 1793-1803.
- Bassnett S. und Beebe D.C. (1992) Coincident loss of mitochondria and nuclei during lens fiber cell differentiation. *Dev Dyn* **194**: 85-93.
- Bassnett S. und Mataic D. (1997) Chromatin degradation in differentiating fiber cells of the eye lens. *J Cell Biol* **137**: 37-49.
- Boyle D. und Takemoto L. (1994) Characterization of the alpha-gamma and alpha-beta complex: evidence for an *in vivo* functional role of  $\alpha$ -crystallin as a molecular chaperone. *Exp Eye Res* **58**: 9-15.
- Brady J.P., Garland D., Duglas-Tabor Y., Robison W.G.J., Groome A., Wawrousek E.F. (1997) Targeted disruption of the mouse  $\alpha$ A-crystallin gene induces cataract and cytoplasmic inclusion bodies containing the small heat shock protein  $\alpha$ B-crystallin. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 884-889.
- Brakenhoff R.H., Aarts H.J., Reek F.H., Lubsen N.H., Schoenmakers J.G. (1990) Human  $\gamma$ -crystallin genes. A gene family on its way to extinction. *J Mol Biol* **216**: 519-532.
- Brakenhoff R.H., Aarts H.J., Schuren F., Lubsen N.H., Schoenmakers J.G. (1992) The second human  $\beta$ B2-crystallin gene is a pseudogene. *Exp Eye Res* **54**: 803-806.
- Brauweiler A., Garrus J.E., Reed J.C., Nyborg J.K. (1997) Repression of *bax* gene expression by the HTLV-1 Tax protein: implications for suppression of apoptosis in virally infected cells. *Virology* **231**: 135-140.
- Capetanaki Y., Smith S., Heath J.P. (1989) Overexpression of the *vimentin* gene in transgenic mice inhibits normal lens cell differentiation. *J Cell Biol* **109**: 1653-1664.

- Carper D. (1982) Deficiency of functional messenger RNA for a developmentally regulated  $\beta$ -crystallin polypeptide in a hereditary cataract. *Science* **217**: 463-464.
- Carper D., Smith-Gill S.J., Kinoshita J.H. (1986) Immunocytochemical localization of the 27K  $\beta$ -crystallin polypeptide in the mouse lens during development using a specific monoclonal antibody: implications for cataract formation in the Philly mouse. *Dev Biol* **113**: 104-109.
- Cartier M., Breitman M.L., Tsui L.C. (1992) A frameshift mutation in the  $\gamma$ E-crystallin gene of the *Elo* mouse. *Nat Genet* **2**: 42-45.
- Chambers C. und Russell P. (1991) Deletion mutation in an eye lens  $\beta$ -crystallin. An animal model for inherited cataracts. *J Biol Chem* **266**: 6742-6746.
- Cheng E.H., Kirsch D.G., Clem R.J., Ravi R., Kastan M.B., Bedi A., Ueno K., Hardwick J.M. (1997) Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* **278**: 1966-1968.
- Chepelinsky A.B., Khillan J.S., Mahon K.A., Overbeek P.A., Westphal H., Piatigorsky J. (1987) Crystallin genes: lens specificity of the murine  $\alpha$ A-crystallin gene. *Environ Health Perspect* **75**: 17-24.
- Clark J.M. (1988) Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* **16**: 9677-9686.
- Counis M.F., Chaudun E., Arruti C., Oliver L., Sanwal M., Courtois Y., Torriglia A. (1998) Analysis of nuclear degradation during lens cell differentiation. *Cell Death Differ* **5**: 251-261.
- Crabbe M.J. und Goode D. (1995) Protein folds and functional similarity; the Greek key/immunoglobulin fold. *Comput Chem* **19**: 343-349.
- Dahm R., Gribbon C., Quinlan R.A., Prescott A.R. (1997) Lens cell organelle loss during differentiation versus stress-induced apoptotic changes. *Biochem Soc Trans* **25**: S584.
- Das K.P. und Surewicz W.K. (1995) On the substrate specificity of  $\alpha$ -crystallin as a molecular chaperone. *Biochem J* **311**: 367-370.

- David L.L. und Shearer T.R. (1984) Calcium-activated proteolysis in the lens nucleus during selenite cataractogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **25**: 1275-1283.
- de Jong W.W., Mulders J.W., Voorter C.E., Berbers G.A., Hoekman W.A., Bloemendal H. (1988) Post-translational modifications of eye lens crystallins: crosslinking, phosphorylation and deamidation. *Adv Exp Med Biol* **231**: 95-108.
- den Dunnen J.T., Jongbloed R.J., Geurts v.K.A., Schoenmakers J.G. (1985) Human lens  $\gamma$ -crystallin sequences are located in the p12-qter region of chromosome 2. *Hum Genet* **70**: 217-221.
- den Dunnen J.T., Szpirer J., Levan G., Islam Q., Schoenmakers J.G. (1987) All six rat  $\gamma$ -crystallin genes are located on chromosome 9. *Exp Eye Res* **45**: 747-750.
- den Dunnen J.T., van Neck J.W., Cremers F.P., Lubsen N.H., Schoenmakers J.G. (1989) Nucleotide sequence of the rat  $\gamma$ -crystallin gene region and comparison with an orthologous human region. *Gene* **78**: 201-213.
- Dubin R.A., Gopal-Srivastava R., Wawrousek E.F., Piatigorsky J. (1991) Expression of the murine  $\alpha$ B-crystallin gene in lens and skeletal muscle: identification of a muscle-preferred enhancer. *Mol Cell Biol* **11**: 4340-4349.
- Ehling U.H. (1991) Genetic risk assessment. *Annu Rev Genet* **25**: 255-280.
- Ehling U.H., Charles D.J., Favor J., Graw J., Kratochvilova J., Neuhauser-Klaus A., Pretsch W. (1985) Induction of gene mutations in mice: the multiple endpoint approach. *Mutat Res* **150**: 393-401.
- Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A., Nagata S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**: 43-50.
- Everett C.A., Glenister P.H., Taylor D.M., Lyon M.F., Kratochvilova-Löster J., Favor J. (1994) Mapping of six dominant cataract genes in the mouse. *Genomics* **20**: 429-434.

- Favor J. (1995) Mutagenesis and human genetic disease: dominant mutation frequencies and a characterization of mutational events in mice and humans. *Environ Mol Mutagen* **25** (S26): 81-87.
- Feinberg A.P. und Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**: 6-18.
- Feinberg A.P. und Vogelstein B. (1984) Addendum: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **137**: 266-274.
- Fromm L. und Overbeek P.A. (1996) Regulation of cyclin and cyclin-dependent kinase gene expression during lens differentiation requires the retinoblastoma protein. *Oncogene* **12**: 69-75.
- Fromm L. und Overbeek P.A. (1997) Inhibition of cell death by lens-specific overexpression of Bcl-2 in transgenic mice. *Dev Genet* **20**: 276-287.
- Gao C.Y., Bassnett S., Zelenka P.S. (1995) Cyclin B, p34<sup>cdc2</sup>, and H1-kinase activity in terminally differentiating lens fiber cells. *Dev Biol* **169**: 185-194.
- Gao C.Y., Zakeri Z., Zhu Y., He H., Zelenka P.S. (1997) Expression of cdk5, p35, and cdk5-associated kinase activity in the developing rat lens. *Dev Genet* **20**: 267-275.
- Gill D., Klose R., Munier F.L., McFadden M., Priston M., Billingsley G., Ducrey N., Schorderet D.F., Héon E. (2000) Genetic heterogeneity of the Coppock-like cataract: a mutation in *CRYBB2* on chromosome 22q11.2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**: 159-165.
- Gomez L.E., Liegeois N.J., Zhang P., Engelman J.A., Horner J., Silverman A., Burde R., Roussel M.F., Sherr C.J., Elledge S.J., de Piñho R.A. (1999) Cyclin D- and E-dependent kinases and the p57<sup>KIP2</sup> inhibitor: cooperative interactions *in vivo*. *Mol Cell Biol* **19**: 353-363.
- Goring D.R., Breitman M.L., Tsui L.C. (1992) Temporal regulation of six crystallin transcripts during mouse lens development. *Exp Eye Res* **54**: 785-795.
- Graw J., Bors W., Gopinath P.M., Merkle S., Michel C., Reitmeir P., Schäffer E., Summer K.H., Wulff A. (1990) Characterization of *Cat-2t*, a radiation-induced dominant cataract mutation in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **31**: 1353-1361.

- Graw J., Coban L., Liebstein A., Werner T. (1991) Murine  $\gamma$ E-crystallin is distinct from murine  $\gamma$ 2-crystallin. *Gene* **104**: 265-270.
- Graw J., Jung M., Loster J., Klopp N., Soewarto D., Fella C., Fuchs H., Reis A., Wolf E., Balling R., Hrabé d.A. (1999) Mutation in the  $\beta$ A3/A1-crystallin encoding gene *Cryba1* causes a dominant cataract in the mouse. *Genomics* **62**: 67-73.
- Graw J., Kratochvilova J., Summer K.H. (1984) Genetical and biochemical studies of a dominant cataract mutation in mice. *Exp Eye Res* **41**: 577-579.
- Graw J., Liebstein A., Pietrowski D., Schmitt-John T., Werner T. (1993) Genomic sequences of murine  $\gamma$ B- and  $\gamma$ C-crystallin-encoding genes: promoter analysis and complete evolutionary pattern of mouse, rat and human  $\gamma$ -crystallins. *Gene* **136**: 145-156.
- Graw J., Werner T., Merkle S., Reitmeir P., Schäffer E., Wulff A. (1990) Histological and biochemical characterization of the murine cataract mutant *Nop*. *Exp Eye Res* **50**: 449-456.
- Héon E., Priston M., Schorderet D.F., Billingsley G.D., Girard P.O., Lubsen N., Munier F.L. (1999) The gamma-crystallins and human cataracts: a puzzle made clearer. *Am J Hum Genet* **65**: 1261-1267.
- Harvey K.J., Blomquist J.F., Ucker D.S. (1998) Commitment and effector phases of the physiological cell death pathway elucidated with respect to Bcl-2, Caspase, and Cyclin-dependent kinase activities. *Mol Cell Biol* **18**: 2912-2922.
- He H.Y., Gao C., Vrensen G., Zelenka P.S. (1998) Transient activation of cyclin B/cdc2 during terminal differentiation of lens fiber cells. *Dev Dyn* **211**: 26-34.
- Head M.W., Sedowofia K., Clayton R.M. (1995)  $\beta$ B2-crystallin in the mammalian retina. *Exp Eye Res* **61**: 423-428.
- Hendriks W., Weetink H., Voorter C.E., Sanders J., Bloemendal H., de Jong W.W. (1990) The alternative splicing product  $\alpha$ A<sup>ins</sup>-crystallin is structurally equivalent to  $\alpha$ A and  $\alpha$ B subunits in the rat  $\alpha$ -crystallin aggregate. *Biochim Biophys Acta* **1037**: 58-65.

- Hogg D., Gorin M.B., Heinzmann C., Zollman S., Mohandas T., Klisak I., Sparkes R.S., Breitman M., Tsui L.C., Horwitz J. (1987) Nucleotide sequence for the cDNA of the bovine  $\beta$ B2 crystallin and assignment of the orthologous human locus to chromosome 22. *Curr Eye Res* **6**: 1335-1342.
- Hollander M.C., Zhan Q., Bae I., Fornace A.J.J. (1997) Mammalian GADD34, an apoptosis- and DNA damage-inducible gene. *J Biol Chem* **272**: 13731-13737.
- Hope J.N., Chen H.C., Hejtmancik J.F. (1994) Aggregation of  $\beta$ A3-crystallin is independent of the specific sequence of the domain connecting peptide. *J Biol Chem* **269**: 21141-21145.
- Horwitz J. (1992a)  $\alpha$ -crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 10449-10453.
- Horwitz J., Emmons T., Takemoto L. (1992b) The ability of lens  $\alpha$ -crystallin to protect against heat-induced aggregation is age-dependent. *Curr Eye Res* **11**: 817-822.
- Hrabé d.A. und Balling R. (1998) Large scale ENU screens in the mouse: genetics meets genomics. *Mutat Res* **400**: 25-32.
- Igata E., Inoue T., Ohtani-Fujita N., Sowa Y., Tsujimoto Y., Sakai T. (1999) Molecular cloning and functional analysis of the murine bax gene promoter. *Gene* **238**: 407-415.
- Ishii N., Wanaka A., Ohno K., Matsumoto K., Eguchi Y., Mori T., Tsujimoto Y., Tohyama M. (1996) Localization of *bcl-2*, *bax*, and *bcl-x* mRNAs in the developing inner ear of the mouse. *Brain Res.* **726**: 123-128.
- Ishizaki Y., Jacobson M.D., Raff M.C. (1998) A role for caspases in lens fiber differentiation. *J Cell Biol* **140**: 153-158.
- Jones R.A., Johnson V.L., Hinton R.H., Poirier G.G., Chow S.C., Kass G.E. (1999) Liver poly(ADP-ribose)polymerase is resistant to cleavage by caspases. *Biochem Biophys Res Commun* **256**: 436-441.
- Jones S.E., Jomary C., Grist J., Makwana J., Neal M.J. (1999) Retinal expression of  $\gamma$ -crystallins in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**: 3017-3020.

- Kannabiran C., Rogan P.K., Olmos L., Basti S., Rao G.N., Kaiser-Kupfer M., Hejtmancik J.F. (1998) Autosomal dominant zonular cataract with sutural opacities is associated with a splice mutation in the  $\beta$ A3/A1-crystallin gene. *Mol Vis* **4**: 21.
- Kato J. (1999) Induction of S phase by G<sub>1</sub> regulatory factors. *Front Biosci* **4**: D787-D792.
- Kato K., Shinohara H., Kurobe N., Goto S., Inaguma Y., Ohshima K. (1991) Immunoreactive  $\alpha$ A-crystallin in rat non-lenticular tissues detected with a sensitive immunoassay method. *Biochim Biophys Acta* **1080**: 173-180.
- Kaufman M. H. (1992) *The atlas of mouse development*. Academic Press, London.
- Kitada S., Krajewski S., Miyashita T., Krajewska M., Reed J.C. (1996)  $\gamma$ -radiation induces upregulation of Bax protein and apoptosis in radiosensitive cells *in vivo*. *Oncogene* **12**: 187-192.
- Klopp N., Favor J., Löster J., Lutz R.B., Neuhäuser-Klaus A., Prescott A., Pretsch W., Quinlan R.A., Sandilands A., Vrensen G.F.J.M., Graw J. (1998) Three murine cataract mutants (*Cat2*) are defective in different  $\gamma$ -crystallin genes. *Genomics* **52**: 152-158.
- Korsmeyer S.J., Shutter J.R., Veis D.J., Merry D.E., Oltvai Z.N. (1993) Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* **4**: 327-332.
- Krajewski S., Tanaka S., Takayama S., Schibler M.J., Fenton W., Reed J.C. (1993) Investigation of the subcellular distribution of the Bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* **53**: 4701-4714.
- Kratochvilova J. und Ehling U.H. (1979) Dominant cataract mutations induced by  $\gamma$ -irradiation of male mice. *Mutat Res* **63**: 221-223.
- Kratochvilova J. und Favor J. (1992) Allelism tests of 15 dominant cataract mutations in mice. *Genet Res* **59**: 199-203.
- Kuwabara T. und Imaizumi M. (1974) Denucleation process of the lens. *Invest Ophthalmol* **13**: 973-981.

- Löster J., Pretsch W., Sandulache R., Schmitt-John T., Lyon M.F., Graw J. (1994) Close linkage of the dominant cataract mutations (*Cat-2*) with *Idh-1* and *cryge* on mouse chromosome 1. *Genomics* **23**: 240-242.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Laskey R.A. (1980) The use of intensifying screens for visualisation of radioactive molecules resolved by gel electrophoresis. *Meth Enzymol* **65**: 363-368.
- Lazebnik Y.A., Kaufmann S.H., Desnoyers S., Poirier G.G., Earnshaw W.C. (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**: 346-347.
- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S., Wang X. (1997) Cytochrome C and dATP-dependent formation of Apaf-1/Caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**: 479-489.
- Lindley P.F., Najmudin S., Bateman O., Slingsby C., Myles D.D., Kumaraswamy S., Glover I. (1993) Structure of  $\gamma$ B-crystallin at 150K. *J Chem Soc, Faraday Trans* **89**: 2677-2677.
- Lipman R.D., Cyr D.E., David L.L., Taylor A. (1991) Calpain in cultured bovine lens epithelial cells. *Curr Eye Res* **10**: 11-17.
- Litt M., Carrero-Valenzuela R., LaMorticella D.M., Schultz D.W., Mitchell T.N., Kramer P., Maumenee I.H. (1997) Autosomal dominant cerulean cataract is associated with a chain termination mutation in the human  $\beta$ -crystallin gene *CRYBB2*. *Hum Mol Genet* **6**: 665-668.
- Litt M., Kramer P., LaMorticella D.M., Murphey W., Lovrien E.W., Weleber R.G. (1998) Autosomal dominant congenital cataract associated with a missense mutation in the human alpha crystallin gene *CRYAA*. *Hum Mol Genet* **7**: 471-474.
- Lovicu F.J. und McAvoy J.W. (1992) The age of rats affects the response of lens epithelial explants to fibroblast growth factor. An ultrastructural analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **33**: 2269-2278.
- Lovicu F.J. und McAvoy J.W. (1999) Spatial and temporal expression of *p57<sup>KIP2</sup>* during murine lens development. *Mech Dev* **86**: 165-169.

- Lovicu F.J. und Overbeek P.A. (1998) Overlapping effects of different members of the FGF family on lens fiber differentiation in transgenic mice. *Development* **125**: 3365-3377.
- Mörner C.T. (1893) Untersuchungen der Proteinsubstanzen in den lichtbrechenden Medien des Auges. *Z Physiol Chem* **18**: 61-106.
- Maisel H. (1985) *The ocular lens; structure, function and pathology*. Marcel Dekker, New York, USA.
- Matsuoka S., Edwards M.C., Bai C., Parker S., Zhang P., Baldini A., Harper J.W., Elledge S.J. (1995) p57<sup>kip2</sup>, a structurally distinct member of the p21<sup>cip1</sup> cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* **9**: 650-662.
- McAvoy J.W., Chamberlain C.G., de Iongh R.U., Richardson N.A., Lovicu F.J. (1991) The role of fibroblast growth factor in eye lens development. *Ann N Y Acad Sci* **638**: 256-274.
- McDermott J.B., Cvekl A., Piatigorsky J. (1996) Lens-specific expression of a chicken  $\beta$ A3/A1-crystallin promoter fragment in transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* **221**: 559-564.
- Miyashita T., Harigai M., Hanada M., Reed J.C. (1994) Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res* **54**: 3131-3135.
- Miyashita T. und Reed J.C. (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**: 293-299.
- Murakami K., Jahngen J.H., Lin S.W., Davies K.J., Taylor A. (1990) Lens proteasome shows enhanced rates of degradation of hydroxyl radical modified  $\alpha$ -crystallin. *Free Radic Biol Med* **8**: 217-222.
- Nacken W., Klempt M., Sorg C. (1995) The mouse homologue of the HTLV-I tax responsive element binding protein TAXREB107 is a highly conserved gene which may regulate some basal cellular functions. *Biochim Biophys Acta* **1261**: 432-434.
- Nakaya M., Masuda Y., Mihara S., Aiuchi T., Shibayama-Imazu T., Nakajo S., Nakaya K. (1999) Analysis of caspases that are activated during apoptosis in leukemia U937 cells in response to geranylgeraniol. *Anticancer Res* **19**: 5063-5068.

- Nesterenko M.V., Tilley M., Upton S.J. (1994) A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Meth* **28**: 239-242.
- Oltvai Z.N., Milliman C.L., Korsmeyer S.J. (1993) Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**: 609-619.
- Overbeek P.A., Chepelinsky A.B., Khillan J.S., Piatigorsky J., Westphal H. (1985) Lens-specific expression and developmental regulation of the bacterial chloramphenicol acetyltransferase gene driven by the murine  $\alpha$ A-crystallin promoter in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 7815-7819.
- Padma T., Ayyagari R., Murty J.S., Basti S., Fletcher T., Rao G.N., Kaiser-Kupfer M., Hejtmancik J.F. (1995) Autosomal dominant zonular cataract with sutural opacities localized to chromosome 17q11-12. *Am J Hum Genet* **57**: 840-845.
- Pan H. und Griep A.E. (1995) Temporally distinct patterns of p53-dependent and p53-independent apoptosis during mouse lens development. *Genes Dev* **9**: 2157-2169.
- Pande A., Pande J., Asherie N., Lomakin A., Ogun O., King J.A., Lubsen N.H., Walton D., Benedek G.B. (2000) Molecular basis of a progressive juvenile-onset hereditary cataract. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 1993-1998.
- Pastorino J.G., Chen S.T., Tafani M., Snyder J.W., Farber J.L. (1998) The overexpression of bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* **273**: 7770-7775.
- Pettmann B. und Henderson C.E. (1998) Neuronal cell death. *Neuron* **20**: 633-647.
- Piatigorsky J. (1989) Lens crystallins and their genes: diversity and tissue-specific expression. *FASEB J* **3**: 1933-1940.
- Robinson M.L., Overbeek P.A., Verran D.J., Grizzle W.E., Stockard C.R., Friesel R., Maciag T., Thompson J.A. (1995) Extracellular FGF-1 acts as a lens differentiation factor in transgenic mice. *Development* **121**: 505-514.

- Rogaev E.I., Rogaeva E.A., Korovaitseva G.I., Farrer L.A., Petrin A.N., Keryanov S.A., Turaeva S., Chumakov I., St, Ginter E.K. (1996) Linkage of polymorphic congenital cataract to the  $\gamma$ -crystallin gene locus on human chromosome 2q33-35. *Hum Mol Genet* **5**: 699-703.
- Romeis B. (1989) *Mikroskopische Technik*. Urban & Schwarzenberg, München.
- Russell P. und Chambers C. (1990) Interaction of an altered  $\beta$ -crystallin with other proteins in the Philly mouse lens. *Exp Eye Res* **50**: 683-687.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. Ausgabe. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sandilands A., Prescott A.R., Carter J.M., Hutcheson A.M., Quinlan R.A., Richards J., FitzGerald P.G. (1995) Vimentin and CP49/filensin form distinct networks in the lens which are independently modulated during lens fibre cell differentiation. *J Cell Sci* **108**: 1397-1406.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*:5463-5467.
- Santhiya S.T., Abd-alla S.M., Loster J., Graw J. (1995) Reduced levels of gamma-crystallin transcripts during embryonic development of murine *Cat2<sup>nop</sup>* mutant lenses. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **233**: 795-800.
- Schmidt T., Korner K., Karsunky H., Korsmeyer S., Muller R., Moroy T. (1999) The activity of the murine Bax promoter is regulated by Sp1/3 and E-box binding proteins but not by p53. *Cell Death Differ* **6**: 873-882.
- Selvakumaran M., Lin H.K., Miyashita T., Wang H.G., Krajewski S., Reed J.C., Hoffman B., Liebermann D. (1994) Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF beta 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene* **9**: 1791-1798.
- Shang F., Gong X., McAvoy J.W., Chamberlain C., Nowell T.R.J., Taylor A. (1999) Ubiquitin-dependent pathway is up-regulated in differentiating lens cells. *Exp Eye Res* **68**: 179-192.

- Skow L.C., Donner M.E., Huang S.M., Gardner J.M., Taylor B.A., Beamer W.G., Lalley P.A. (1988) Mapping of mouse  $\gamma$ -crystallin genes on chromosome 1. *Biochem Genet* **26**: 557-570.
- Slingsby C. und Miller L.R. (1983) Purification and crystallization of mammalian lens gamma-crystallins. *Exp Eye Res* **37**: 517-530.
- Smith R.S., Hawes N.L., Chang B., Roderick T.H., Akeson E.C., Heckenlively J.R., Gong X., Wang X., Davisson M.T. (2000) *Lop12*, a mutation in mouse *crygd* causing lens opacity similar to human Coppock cataract. *Genomics* **63**: 314-320.
- Smulders R.H., van Boekel M.A., de Jong W.W. (1998) Mutations and modifications support a 'pitted-flexiball' model for  $\alpha$ -crystallin. *Int J Biol Macromol* **22**: 187-196.
- Stephan D.A., Gillanders E., Vanderveen D., Freas-Lutz D., Wistow G., Baxevanis A.D., Robbins C.M., VanAuken A., Quesenberry M.I., Bailey-Wilson J., Juo S.H., Trent J.M., Smith L., Brownstein M.J. (1999) Progressive juvenile-onset punctate cataracts caused by mutation of the  $\gamma$ D-crystallin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 1008-1012.
- Taylor A. (1993a) Aminopeptidases: structure and function. *FASEB J* **7**: 290-298.
- Taylor A. (1993b) Aminopeptidases: towards a mechanism of action. *Trends Biochem Sci* **18**: 167-171.
- Thornborrow E.C. und Manfredi J.J. (1999) One mechanism for cell type-specific regulation of the Bax promoter by the tumor suppressor p53 is dictated by the p53 response element. *J Biol Chem* **274**: 33747-33756.
- Thylefors B., Negrel A.D., Pararajasegaram R., Dadzie K.Y. (1995) Global data on blindness. *Bull World Health Organ* **73**: 115-121.
- Tse S.S. und Ortwerth B.J. (1981) Activation of proteinases with trypsin-like specificity from bovine and human lenses. *Exp Eye Res* **32**: 605-614.
- van Boekel M.A., de Lange F., de Grip W.J., de Jong W.W. (1999) Eye lens  $\alpha$ A- and  $\alpha$ B-crystallin: complex stability versus chaperone-like activity. *Biochim Biophys Acta* **1434**: 114-123.

- van Rens G.L., van 't H., Leunissen J.A., Bloemendal H. (1991) Sequence analysis of the first intron of the bovine  $\gamma$ <sub>s</sub>-crystallin gene. *Mol Biol Rep* **15**: 93-94.
- Vrensen G.F., Graw J., de Wolf A. (1991) Nuclear breakdown during terminal differentiation of primary lens fibres in mice: a transmission electron microscopic study. *Exp Eye Res* **52**: 647-659.
- Wagner B.J. und Margolis J.W. (1993) Thermal stability and activation of bovine lens multicatalytic proteinase complex (proteasome). *Arch Biochem Biophys* **307**: 146-152.
- Wawrousek E.F., Chepelinsky A.B., McDermott J.B., Piatigorsky J. (1990) Regulation of the murine  $\alpha$ A-crystallin promoter in transgenic mice. *Dev Biol* **137**: 68-76.
- Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C.N., Ibrado A.M., Cai J., Peng T.I., Jones D.P., Wang X. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of Cytochrome C from mitochondria blocked. *Science* **275**: 1129-1132.
- Zarina S., Slingsby C., Jaenicke R., Zaidi Z.H., Driessen H., Srinivasan N. (1994) Three-dimensional model and quaternary structure of the human eye lens protein  $\gamma$ S-crystallin based on  $\beta$ - and  $\gamma$ -crystallin X-ray coordinates and ultracentrifugation. *Protein Sci* **3**: 1840-1846.
- Zhang P., Liegeois N.J., Wong C., Finegold M., Hou H., Thompson J.C., Silverman A., Harper J.W., de Piñho R.A., Elledge S.J. (1997) Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57<sup>kip2</sup> indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* **387**: 151-158.
- Zhang P., Wong C., de Piñho R.A., Harper J.W., Elledge S.J. (1998) Cooperation between the cdk inhibitors p27<sup>kip1</sup> and p57<sup>kip2</sup> in the control of tissue growth and development. *Genes Dev* **12**: 3162-3167.
- Zou H., Henzel W.J., Liu X., Lutschg A., Wang X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* Ced-4, participates in Cytochrome C-dependent activation of Caspase-3. *Cell* **90**: 405-413.