

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde  
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Busse -  
Abteilung für Experimentelle Ophthalmologie  
- Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. S. Thanos -

Untersuchungen zur Entwicklung der Augenlinse bei  
Primaten und Auswirkungen auf den Elastizitätsverlust  
im alternden Auge

INAUGURAL-DISSERTATION

zur  
Erlangung des doctor medicinae dentium  
der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität  
Münster

vorgelegt von  
Bolis, Georgios  
aus Boubala/Griechenland  
2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. med. V. Arolt

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. S. Thanos

**Berichterstatter:** Priv.-Doz. Dr. med. M. Pavlidis

Tag der mündlichen Prüfung: 09.10.2008

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde  
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Busse -  
Abteilung für Experimentelle Ophthalmologie  
- Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. S. Thanos -

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. S. Thanos  
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. M. Pavlidis

## ZUSAMMENFASSUNG

Bolis, Georgios

### Untersuchungen zur Entwicklung der Augenlinse und Auswirkungen auf den Elastizitätsverlust im alternden Auge

Das Ziel dieser Studie war die histologische und immunhistochemische Analyse der Entwicklung der Affenlinse und im adulten Stadium der Vergleich mit der menschlichen Linse im Hinblick auf die spätere Entwicklung von Elastizitätsverlusten am Beispiel der Kataraktbildung im Erwachsenenalter und des sog. Pseudoexfoliationssyndroms (PEX), das mit intraokularen und extraokularen (viszeralen) granulären Ablagerungen einhergeht. Intraokular manifestieren sich im alternden Auge und insbesondere bei PEX-Katarakten, granuläre Veränderungen in der Linse, der Iris und des Kammerwinkels, nicht selten assoziiert mit einem Offenwinkelglaukom. Ein Auge mit PEX gelangt in der Regel zu einer Kataraktoperation, und wenn ein Begleitglaukom vorliegt, zu einer gleichzeitigen Glaukomoperation. Zum Erreichen des Zieles wurden Kryostatschnitte aus fötalen Augen von Affen der Gattung „*Callithrix jacchus*“ sowie aus Augen neugeborener Affen der gleichen Gattung aus adulten humanen und Affenaugen mit immunhistochemischen Methoden gegen neun verschiedene Antigene untersucht und mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet.

Die Ergebnisse zeigen immunhistochemisch eine embryonale Expression von Linsenproteinen in den fötalen Augen im dritten Gestationsmonat, am Tage der Geburt und in adulten Stadien. Die gängigen Proteine der Extrazellulärmatrix (Kollagene, Laminin, Fibronectin) konnten, wenn auch in etwas veränderter Intensität -, in allen Stadien gefunden werden. Weiter wurden überlebensassoziierte Faktoren (BCL-2 und GAP-43) im Linsenkapsel epithel dokumentiert. Sowohl in den Affenaugen aller Stadien als auch in den humanen Schnitten waren beide Faktoren unverändert exprimiert. Das Zytoskeletprotein Vimentin, das eigentlich in glialen Zellen der Retina exprimiert wird, konnte in der Linsenrinde detektiert werden, was auf seine mögliche Beteiligung bei der Stabilität der Linse und insbesondere der Kapsel hinweist. Die Linsenstrukturproteine, die man als Kristalline kennt, werden früh in der fötalen Affenlinse exprimiert und spielen nach gängiger Meinung eine immens wichtige Rolle bei der Stabilitätserhaltung und der optischen Linsentransparenz. Die Ergebnisse zeigen, dass das Proteinmuster in der Linse und in den benachbarten Augenkompartmenten früh in der fötalen Entwicklung angelegt wird. Die Beobachtungen und der Vergleich mit der adulten Linse stützen die Hypothese, dass mit zunehmendem Alter die Elastizität des Kapsel-Epithelkomplexes und der kortikalen Fasern aufgrund von Scherkräften während des akkommodativen Verschleißes zwischen dem weichen Linsenkorax und des sklerosierenden Linsenkerns abnimmt. Dadurch entstehen sehr wahrscheinlich Mikrorisse in der Kapsel, die zur sekundären flüssigkeitsbedingten Eintrübung (Katarakt) und Exfoliation von Proteinen (Katarakt und Glaukom) führen können.

**Tag der mündlichen Prüfung: 09.10.2008**

<b>1.0</b>	<b>Einleitung</b> .....	- 1 -
1.1	Embryonalentwicklung der Linse .....	- 1 -
1.2	Differenzierungsprozesse und Bildung des Linsenepithels, der Linsenkapsel und der Linsenfasern .....	- 2 -
1.3	Funktionsrelevante zelluläre Veränderungen der Linsenkompartimente .	- 5 -
1.4	Anlagebedingte Veränderungen in der Linse am Beispiel des Pseudoexfoliationssyndroms .....	- 8 -
1.5	Alterung der Linse und die Folgen von feinen Entwicklungsstörungen .	- 11 -
1.6	Behandlung der alternden Linse und Kataraktchirurgie .....	- 14 -
1.7	Linsebedingte Risikofaktoren, die zu Komplikationen bei der PEX-Chirurgie führen können .....	- 15 -
1.8	Ziel der vorliegenden Studie .....	- 16 -
<b>2.0</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	- 18 -
2.1	Materialien .....	- 18 -
2.1.1	Chemikalien .....	- 18 -
2.1.2	Geräte .....	- 18 -
2.1.3	Versuchstiere .....	- 19 -
2.1.4	Verwendete primäre Antikörper.....	- 19 -
2.1.5	Verwendete sekundäre Antikörper.....	- 20 -
2.2	Auswahl der Affenaugen .....	- 20 -
2.3	Indirekte Immunfluoreszenz an okulären Kryostatschnitten .....	- 22 -
2.4	Mikroskopie und Auswertung .....	- 23 -
<b>3.0</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	- 25 -
3.1	Immunhistochemie des embryonalen und postnatalen Affenauges .....	- 25 -
3.1.1	Expression von zellulären Überlebensproteinen (BCL-2) .....	- 25 -
3.1.2	Expression des wachstumsassoziierten Proteins GAP-43 .....	- 26 -
3.1.3	Anfärbung von $\alpha$ -Kristallin .....	- 28 -
3.1.4	Expression und Verteilung von $\beta$ - und $\gamma$ -Kristallinen .....	- 31 -
3.2	Expression von Überlebensfaktoren und Kristallinen in der adulten menschlichen Linse im Vergleich zur Affenlinse .....	- 34 -
3.2.1	Expression von BCL-2 .....	- 34 -
3.2.2	Expression von Alpha-Kristallin: .....	- 35 -
3.2.3	Beta- und Gamma-Kristalline .....	- 36 -
3.2.4	Expression von Extrazellulärmatrixmolekülen .....	- 36 -
3.2.5	Vimentin .....	- 37 -
3.2.6	Fibronektin .....	- 39 -
3.3	Tabellarische Zusammenfassung der Proteinexpressionsdaten .....	- 40 -

4.0	<b>Diskussion</b> .....	- 45 -
4.1	Allgemein .....	- 45 -
4.2	Proteinexpression während der Entwicklung der Linse .....	- 45 -
4.3	Differenzierungsprozesse und Bildung des Linsenepithels, der Linsenkapsel und der Linsenfasern .....	- 46 -
4.4	Funktionsrelevante zelluläre Veränderungen in der postnatalen Linse .	- 48 -
4.5	Proteinverteilung in der juvenilen und adulten Linse .....	- 50 -
4.6	Alterung der Linse und die Folgen von feinen Entwicklungsstörungen .	- 52 -
4.7	Ist das PEX-Syndrom auf Entwicklungsstörungen der Linse zurückzuführen? .....	- 53 -
4.8	Theorien zur Pathogenese des PEX-Syndroms .....	- 58 -
5.0	<b>Zusammenfassung</b> .....	- 60 -
6.0	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	- 62 -

## **Danksagung**

## **Lebenslauf**

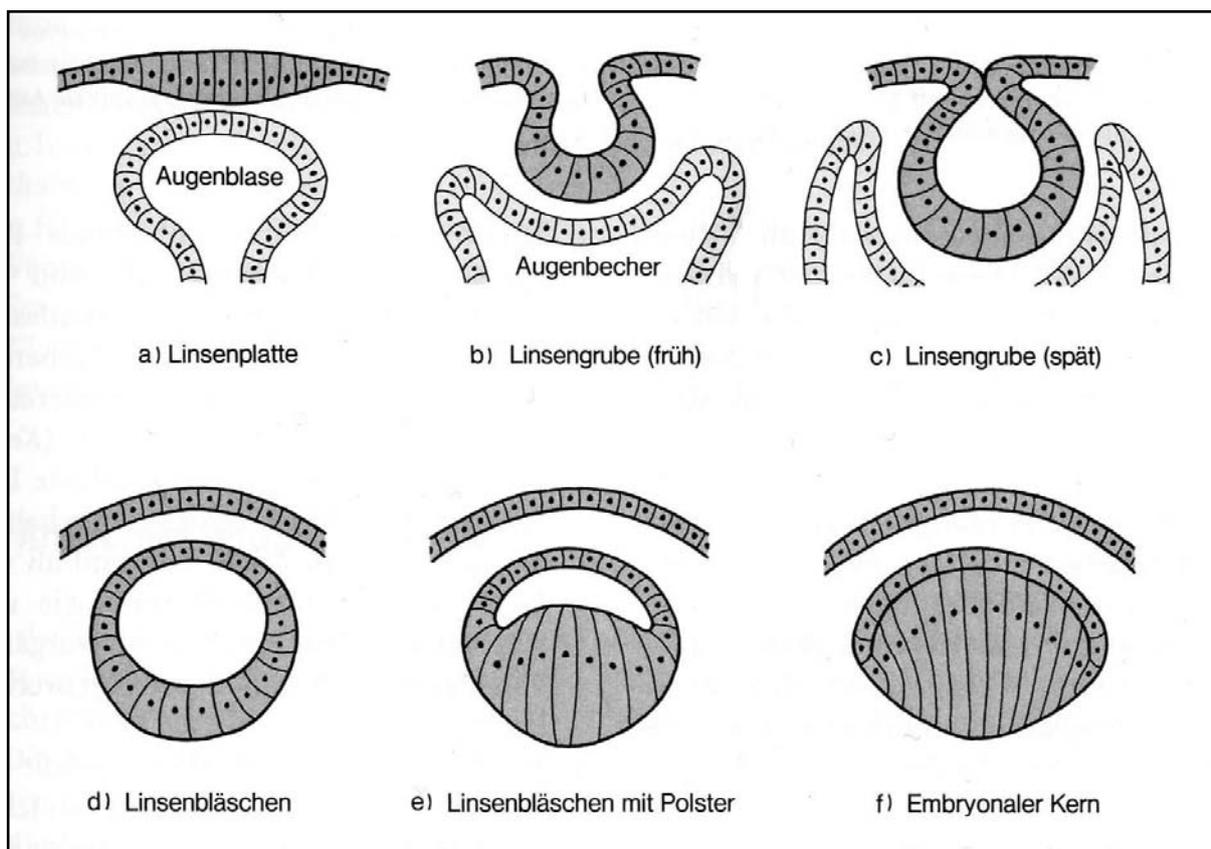
## Abkürzungsverzeichnis und Begriffsdefinition/-Erläuterung

Kürzel/Begriff	Definition
$\alpha$	= Alpha (griechisch)
Abb.	= Abbildung
AH	= Aderhaut
$\beta$	= Beta (griechisch)
BCL-2	= Beta Cell Leukemia-2
bzw.	= beziehungsweise
$\gamma$	= Gamma (griechisch)
ca.	= circa
d. h.	= das heißt
ECCE	= Extrakapsuläre Kataraktextraktion
f.	= folgend
ff.	= fortfolgend
FZ	= Visusangabe: „Fingerzählen“
GI-IOL	= Glaukomoperation und Implantation einer Hinterkammerlinse
GAP	= growth associated protein
HB	= Visusangabe: „Handbewegungen“
IOD	= Intraokularer Druck
IOL	= Intraokularlinse
LSP	= Visusangabe: „Lichtscheinprojektion“
M	= männlich
p.	= page (engl.: Seite/n)
PEX	= Pseudoexfoliationssyndrom
PoT	= Postoperativer Tag
R/L	= Rechts/Links
sog.	= sogenannte(r/s)
W	= weiblich
WBG	= Winkelblockglaukom
WHO	= Weltgesundheitsorganisation

## 1.0 Einleitung

### 1.1 Embryonalentwicklung der Linse

Sehr früh in der Entwicklung des Auges, nämlich im Stadium der Bildung des primären Augenvesikels am 22. Gestationstag kommt es zur induzierenden Bildung der Linse durch zelluläre Interaktionen zwischen dem sich ausstülpenden prosencephalen Neuralrohr und dem darüber liegenden Ektoderm. Es kommt rasch zur morphologischen Verdickung und Differenzierung der prospektiven Linsenplakode (Abbildung 1), die sich später einstülpen wird, um die embryonale Linse zu bilden (Coulombre and Coulombre, 1969; Marschal et al., 1982). Dass der Kontakt zwischen Neuralrohr und Ektoderm für die Linsenentwicklung entscheidend ist, zeigt sich im Ergebnis: Bleibt dieser Keimblätterkontakt aus, so bildet sich eine Aphakie. Dass die Linse ektodermalen Ursprungs ist, zeigt sich in der lebenslang zu beobachtenden Beteiligung der Linse an generalisierten Hauterkrankungen.



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der Entwicklungsstadien der Linse (nach Naumann, 1996: Pathologie des Auges)

Die Linsenplakode oder Linsenanlage ist zunächst am 22. Gestationstag einschichtig, jedoch mikroskopisch erkennbar verdickt gegenüber dem restlichen, nicht induzierten Ektoderm. Durch die grubenförmige Einstülpung der Linsenplakode (Abbildung 1b) formiert sich die nach außen konkave Linsengrube (Abbildung 1c), aus der sich ein Linsenbläschen entsteht (Abbildung 1d-e). In der weiteren Differenzierung stellt sich auf der einen Seite eine regressive Abschnürung von Epithelzellen und auf der anderen Seite werden zwischen Linsenblase und oberflächlichem Epithel erste phagozytotische Zellen beobachtet (Cuadros et al., 1991).

Eine verstärkte Zellteilungsaktivität und Wachstum der Linse zeigt sich vor allem ab der 7. Gestationswoche unter dem Einfluss von lokal produzierten und vor Ort wirkenden Wachstumsfaktoren - wie Insulin „like growth factor“, Fibroblast „growth factor“ - (McAvoy et al., 1991) sowie von Mitgliedern aus der Familie zellulärer Onkogene wie c-fos und c-jun (Rinaudo und Zelenka, 1992), die auch als Transkriptionsfaktoren bekannt sind. Die Hauptteilungszone befindet sich in der prääquatorialen Linsenregion, wobei sich die Epithelzellen der distalen Linsenblase nach vorne strecken und langgestreckte Linsenfasern bilden. Gleichzeitig migrieren die Zellkerne der neugebildeten Zellenfasern nach proximal und finden sich nach Migrationsende in der Fasermittte (Coulombre und Coulombre, 1969). Durch Drehungsexperimente an der proliferierenden Linse wurde nachgewiesen, dass die Elongationsfähigkeit nur den proximalen, der Netzhaut zugewandten Epithelzellen vorenthalten ist. Durch Proliferation und Differenzierung von Linsenfasern sowie durch das allgemeine Wachstum in der Linsenblase nimmt das Volumen des Linsenbläschens zunehmend ab. Die prospektive Linsenkapsel ist bereits in der 3. Embryonalwoche vorhanden (Lerche und Wulle, 1969).

## **1.2 Differenzierungsprozesse und Bildung des Linsenepithels, der Linsenkapsel und der Linsenfasern**

Am Ende der 4. Embryonalwoche ist die solide Auffüllung der Linse beendet und es entsteht der Embryonalkern. Ab diesem Stadium beschränkt sich die Bildung neuer Fasern auf die Teilung von Epithelzellen an der Äquatorialzone. Die Anlagerung neuer Fasern geschieht appositionell, d. h. schichtweise außen an bereits vorhandene Fasern, die dadurch nach zentral verlagert erscheinen. Dabei verlieren die

zentralwärts geschobenen Fasern ihre Zellkerne und tragen damit zur homogenen optischen Transparenz des Linsenkerne bei. Bei diesem Vorgang des Zellkernverlustes handelt es sich um eine inkomplette Zellapoptosis, bei der nicht mehr durch Phagozytose, sondern durch Autophagie alle nichttransparenten Organellen, also auch der Chromatin-haltige Zellkern abgebaut werden zugunsten der optischen Transparenzzunahme (Stupp und Thanos, 2005). Die lebhaftige Zellteilung in der germinativen Äquatorialzone des Linsenepithels bleibt lebenslang erhalten und trägt zu einer stetigen Zunahme der Linsegröße. Auch die einzelnen Faserzellen (Linsenfasern), die durch die hoch geordnete Anordnung der Kristallinproteine transparent bleiben, werden für eine lebenslange Funktion angelegt (Abbildung 2).

In der Abbildung 2 sind aus einer dorsalen Sicht die Abfolgen der frühen Linsenbildung gezeigt. Die Anlagerung des Augenbläschens an die ventrale Wand des Prosencephalons und die Verdickung der Linsenplakode im Oberflächenektoderm sind deutlich (Abbildung 2a). Die mittige und sich über den gesamten Durchmesser des Linsenbläschens erstreckende Vergrößerung der Linsenplakode, und die symmetrisch in der Mitte des Augenbläschens parallel dazu verlaufende Invagination des Vesikels (gelblicher Bereich in Abbildung 2b) sind sichtbar. Eine symmetrische Einstülpung des zentralen Bereichs der Linsenplakode ist der Beginn der Bildung einer zunächst nach außen offenen Linsengrube (Abbildung 2c). Das Linsenepithel ist noch zirkulär teilungsfähig und wird später von der Linsenkapsel umgeben (Abbildung 2d).

Störungen der regulären Linsenentwicklung und Differenzierung gehen mit der Bildung einer angeborenen Katarakt einher. Es handelt sich um eine angeborene Missbildung, die meistens durch Infektionen während der Schwangerschaft auftreten (Röteln, Toxoplasmose, Mumps etc.). Man vermutet aus epidemiologischen Daten der Weltgesundheitsorganisation, dass 200.000 Kinder weltweit an angeborener Katarakt erblindet sind, und dass jedes Jahr ca. 20.000 bis 40.000 Kinder mit doppelseitigen Katarakten geboren werden (Foster et al., 1997).

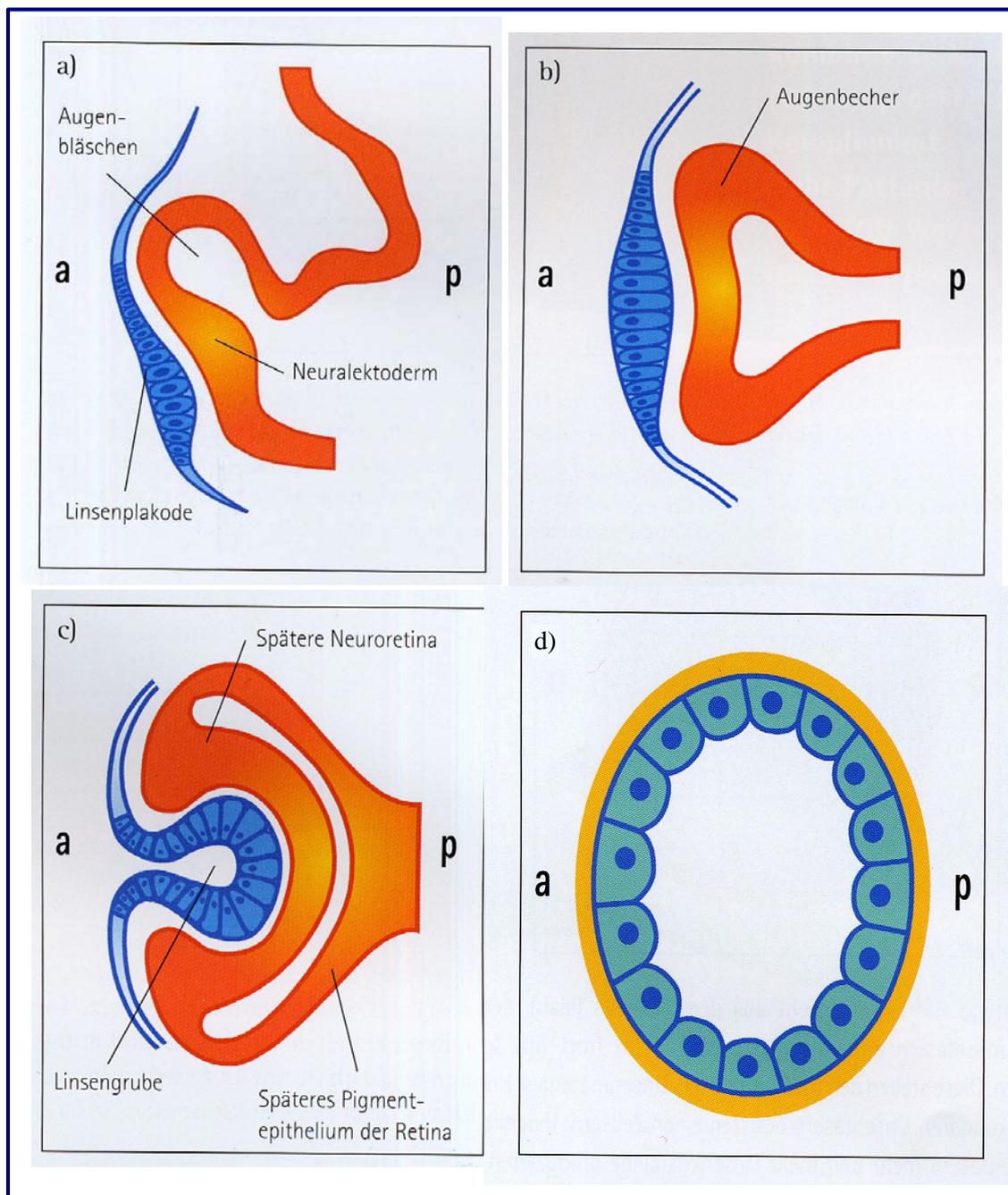


Abb. 2: Dorsale Aufsicht auf die frühe Entwicklung der Linse: A) Bildung der Linsenplakode als zunächst umschriebene Verdickung des Ektoderms über der Ausstülpung des Augenbläschens aus der ventralen Wand des Prosencephalons in der 4. Embryonalwoche. b) Vergrößerung der Linsenplakode und Invagination des Augenbechers. c) Bildung der Linsengrube durch Einstülpung der Linsenplakode. d) Das nun geschlossene Linsenbläschen ist von einem teilungsfähigen Linsenepithel umgeben, das eingekapselt ist (modifiziert nach: Cvecki und Piatigorsky, 1996).

Das vordere Linsenepithel bleibt in Kontakt mit dem Oberflächenektoderm. Später in der Entwicklung wird sich Mesenchym zwischen dem vorderen Linsenepithel und

dem ektodermalen Oberflächenepithel durchschieben, aus dem sich die Hornhaut entwickelt. Die ursprünglichen basalen Anteile des Epithels werden nach außen gedrängt, und die Epithelbasalmembran wird zur Linsen kapsel (Lerche and Wulle, 1969). Das Epithel liegt als einschichtige kubische Zellschicht unter der vorderen Linsen kapsel und zeigt geschlechtsspezifische Dichtenunterschiede mit 5.780,6 Zellen/mm<sup>2</sup> bei Frauen und 5.008,6 Zellen/mm<sup>2</sup> bei Männern in einer altersangeglichenen Population (Guggenmoos-Holzmann et al., 1989). Die einzelnen Epithelzellen sind mit spezialisierten Konakten (*Zonula occludentes* oder *gap junctions*) mit ihren Nachbarzellen verbunden, während ihre apikale Membran über *gap junctions* mit den oberflächlichen Linsenfasern in Kontakt bleibt (Marschall et al., 1982). Die einzelnen Epithelzellen werden zur germinativen Zone des Äquators hin dünner und in der germinativen Zone bleiben sie lebenslang mitotisch aktiv, obwohl mit zunehmendem Alter die Zahl der Mitosen pro Zeiteinheit abnimmt. Im Laufe des Alterns flachen die Epithelzellen ab und ihre Zelldichte nimmt ab mit einer Zellverlustrate, die geschlechtsunabhängig bei ca. 7,8 Zellen/mm<sup>2</sup>/Jahr liegt (Guggenmoos-Holzmann et al., 1989). Ultrastrukturell nimmt im Alter die Zahl von Organellen ab, es treten abnorm veränderte Mitochondrien sowie multilamelläre Einschlüsse und Vakuolisierungen auf, die auf degenerative Erscheinungen hindeuten (Perry et al., 1979).

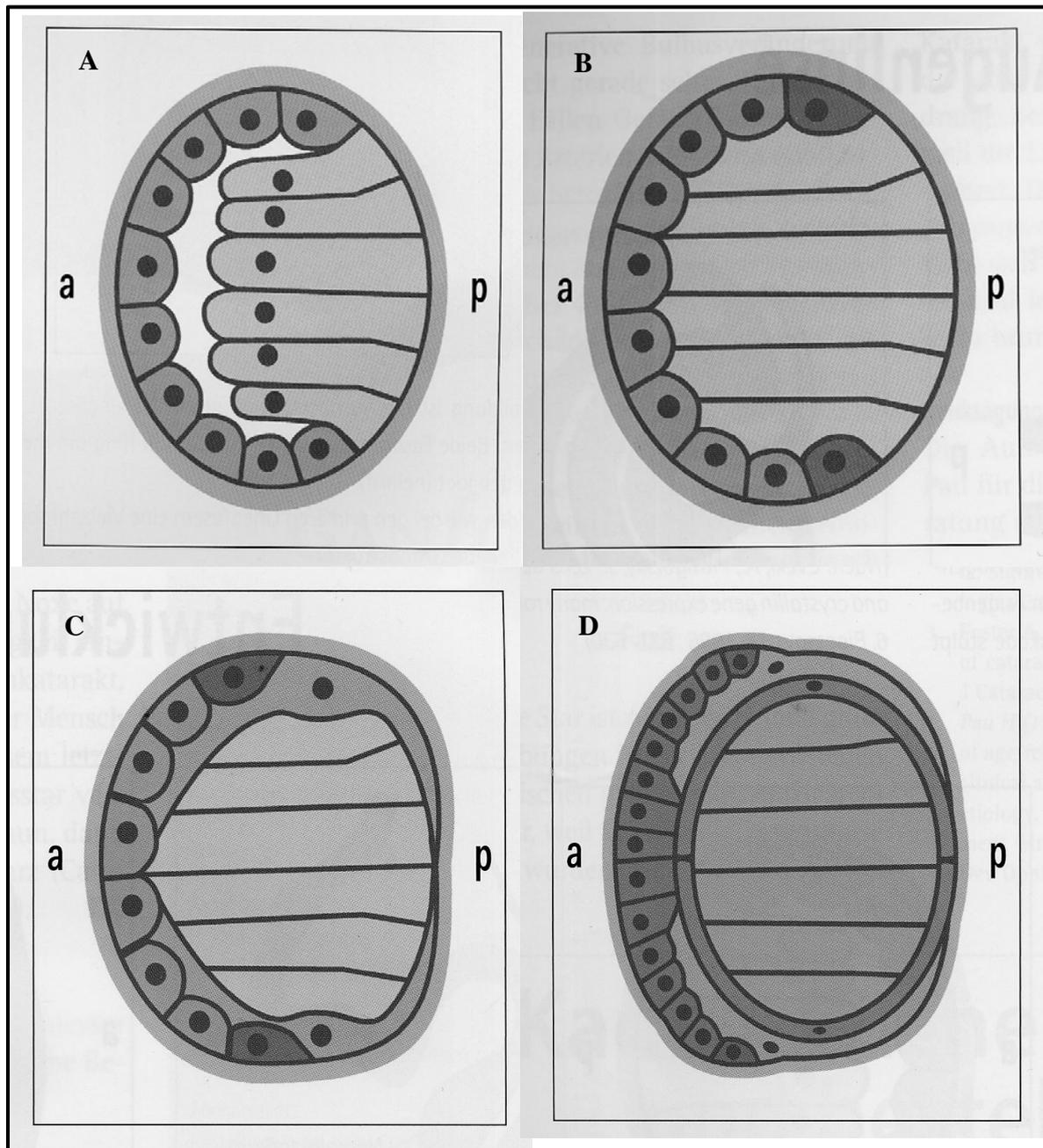
### **1.3 Funktionsrelevante zelluläre Veränderungen der Linsenkompartimente**

Das zunächst uniforme, geschlossene und zellkernhaltige Linsenepithel (Abbildung 2d) zeigt in seinem posterioren Teil eine sehr unterschiedliche Weiterentwicklung als in seinem anterioren Teil. Die Zellen des posterioren Epithels strecken sich nämlich in das Lumen des Linsenbläschens hinein und behalten zunächst ihre Zellkerne (Abbildung 3A). Sobald ihre apikalen Spitzen die Rückwand des anterioren Epithels erreichen, verlieren die posterioren Zellfasern ihre Zellkerne und die weiteren Organellen und werden zu den primären Linsenfasern umgewandelt (Abbildung 3B). Während dessen bleiben die anterioren Epithelzellen einschichtig und behalten ihre Zellkerne (Abbildung 3B). Am äquatorialen Übergang zwischen dem anterioren und posterioren Epithel teilen sich Epithelzellen und bilden sekundäre Linsenfasern, die sich ringförmig um die primären Linsenfasern strecken (Abbildung 3C). Dieser äquatoriale Bereich wird von nun an die Stelle der kontinuierlichen Produktion von Linsen-

fasern, die auch ihre Organellen und Zellkerne verlieren (Abbildung 3D). Die Ausdifferenzierung der sekundären Linsenfaser dauert während des ganzen Lebens an (Abbildung 4A). Da aber der Linsenumfang beim Erwachsenen nicht mehr zunimmt, wird das neue Linsenfasermaterial immer kompakter und der Druck auf den Linsennukleus wird größer.

Die vordere Linsenkapsel grenzt das darunter liegende kubische Linsenepithel und die Linse selbst gegen die hintere Augenkammer ab. Die Kapsel ist eine homogene, elastische Basalmembran und besteht aus Extrazellulärmatrixproteinen in einer Dicke von ca. 17  $\mu\text{m}$  im Zentralbereich und ca. 23  $\mu\text{m}$  im Äquatornahen Bereich. Hinter dem Äquator wird die Kapsel dünner und wird am hinteren Pol mit 4  $\mu\text{m}$  am dünnsten. Die Funktion der Linsenkapsel besteht erstens in der Bildung einer Permeabilitätsbarriere zum extralentalen Raum und zweitens in der Bildung von Insertionsstellen für Zonulafasern, die ihrerseits aufgrund ihrer Elastizität eine lebenslange wichtige Rolle bei der Linse spielen. Zu diesem Zweck der Anheftung von Zonulafasern ist in der Nähe des Äquators eine dünne Zonulalamelle von ca. 0,5 bis 1  $\mu\text{m}$  Dicke oberflächlich aufgelegt. Ultrastrukturell besteht die Linsenkapsel aus Kollagen IV, Fibronektin, Heparansulfat-Proteoglykan, Antactin und Laminin (Mohan and Spiro, 1986; Ohrloff, 1994). Die Linsenkapsel verdickt sich im prääquatorialen Bereich im Laufe des Lebens um ca. 0,08  $\mu\text{m}/\text{Jahr}$ . Es treten im fortgeschrittenen Alter fibrilläre Einschlüsse auf und auf funktioneller Ebene nimmt sowohl die Barrierefunktion als auch die Elastizität der Kapsel ab (Tripathi and Tripathi, 1983).

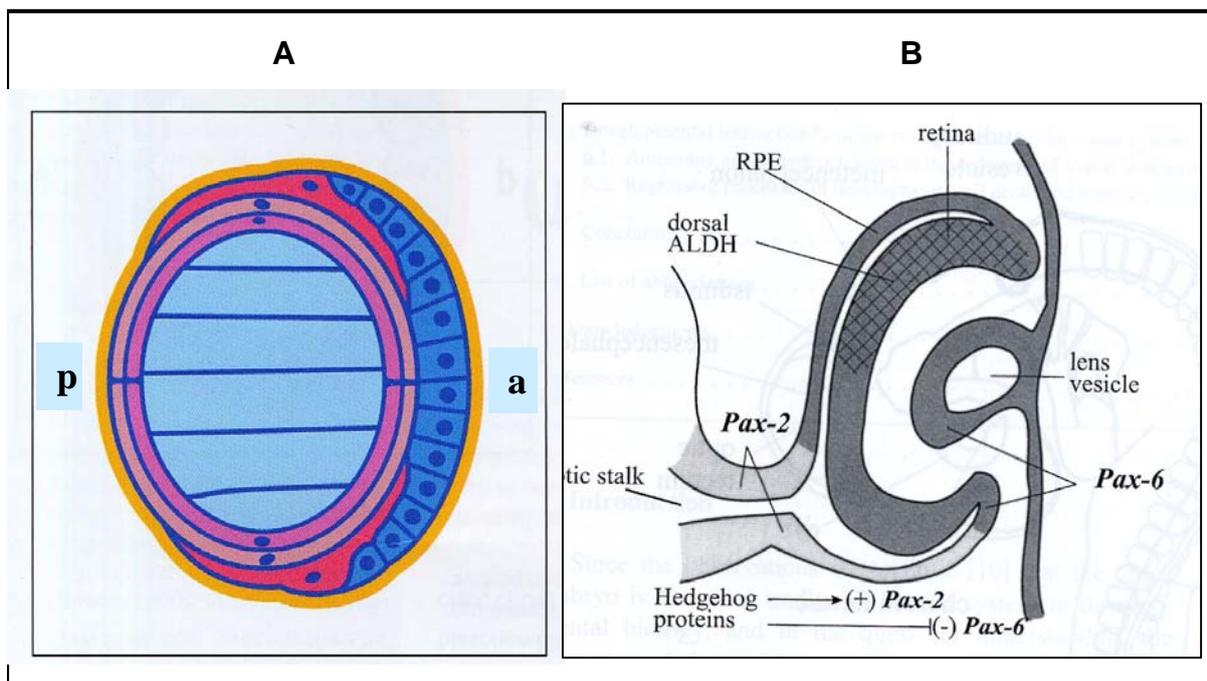
Die Linse als ganzes Organ vervierfacht sich gewichtsmäßig zwischen der Geburt (ca. 65 mg) und dem Alter (ca. 270 mg) (Tripathi and Tripathi, 1983). Die Linsefasern verdichten sich durch die appositionelle Anlagerung neuer Fasern, am Äquator werden zum Kern hin stark komprimiert. Der Linsenkern sklerosiert und trübt konsekutiv ein. Auf biochemischer Ebene verändert sich die Proteinzusammensetzung durch photooxidativ bedingte Aggregation von Proteinen (Bermann, 1994) sowie durch Bildung freier Radikale und gleichzeitiger Abnahme von antioxidativ wirkenden Enzymen (Borkmann and Lerman, 1977). Die biochemischen Veränderungen stellen einen Übergang zwischen der physiologischen Alterung der Linse und der Bildung einer senilen Katarakt dar und stehen wahrscheinlich in ursächlichem Zusammenhang mit der Entwicklung der Katarakt in Verbindung.



**Abb. 3:** Bildung von Linsenfasern und Beginn der Kristallinproduktion in der embryonalen Linse: A) Die posterioren noch zellkernhaltigen Linsenzellen (blau) strecken sich in das Lumen des Linsenbläschens hinein (primäre Linsenfasern). B) Die primären Linsenfasern füllen das Lumen aus und verlieren ihre Zellkern und weitere Zellorganellen (blau). C) Bildung von sekundären Linsenfasern (hellrot am Äquator) aus teilungsfähigen Epithelzellen (rot). D) Ausdifferenzierung der sekundären Linsenfasern (geschlossener hellroter Ring um die primären Fasern (blau)). a: anterior, p: posterior

Das Wachstum der Linse am Äquator findet während des ganzen Lebens statt (Abbildung 4A). Auf molekularer Ebene steht die Entwicklung des Augenbechers unter der Kontrolle der Pax-Gene, einer Familie von Transkriptionsfaktoren mit fundamen-

taler Bedeutung für die Augen- und Linsenentwicklung (Cvecki und Piatigorsky, 1996). Das Pax-6-Gen ist zuständig für die Kontrolle der Entwicklung der Linse und der vorderen Augenabschnitte (Abbildung 4B), während Pax-2 die Entwicklung der Neuroretina und des Sehnervs kontrolliert (Abbildung 4B). Beide Gene stehen unter der übergeordneten Kontrolle des sog. Sonic-Hedgehog-Gens dessen Proteinprodukte einen positiven Einfluss auf das Pax-2 und einen negativen Einfluss auf das Pax-6 ausüben (Mey und Thanos, 2000).



**Abb. 4:** A) Vollständige embryonale Linse mit allen Schichten. B) Schematische Zeichnung des Vertebratenauges und der Linse mit eingezeichneten Genen, die die Differenzierung kontrollieren. Die Differenzierung des vorderen Augenabschnitts und insbesondere des Linsenvesikels wird vom Pax-6-Gen kontrolliert. (Aus: Mey und Thanos, 2000, verändert).

#### 1.4 Anlagebedingte Veränderungen in der Linse am Beispiel des Pseudoexfoliationssyndroms

Die erste Beschreibung des Pseudoexfoliations-(PEX)-Syndroms geht auf Lindberg im Jahre 1917 zurück, der in der skandinavischen Bevölkerung das Syndrom detailliert beschrieb, obwohl möglicherweise Axenfeld (1911) die ersten Beobachtungen gemacht hat. Terminologisch ist es vom echten Exfoliationssyndrom der Linsenkapself bei Glasbläsern und Stahlgießern (Feuerlamelle) abzugrenzen. In der skandinavischen Literatur wird weiterhin der Begriff Exfoliationssyndrom verwendet. PEX wurde

inzwischen auch in Deutschland als relativ häufiges Syndrom mit einer Inzidenz von 3,5 % im Durchschnitt Katarakt-Altersgruppen beschrieben (Naumann et al., 1989) und scheint nicht nur die Strukturen des vorderen Augenabschnitts zu betreffen (Naumann et al., 1998; Schlötzer-Schrehardt et al., 1992a, 1993), sondern auch extraokuläre Strukturen und Viszeralorgane (Streeten et al., 1992). Das PEX-Syndrom wurde in der Zwischenzeit weltweit mit unterschiedlicher Inzidenz beschrieben, wobei an dieser Stelle aus der Fülle von Publikationen nur ein paar Literaturbeispiele erwähnt werden (Ball et al., 1989; Forster et al., 2005; Konstas and Allan, 1989; Kozobolis et al., 2000; Yalaz et al., 1992). Die Bedeutung der Beteiligung der viszeralen Organe ist noch nicht verstanden, weist aber auf die gemeinsame embryonale Herkunft intraokulärer Strukturen und dieser Organe hin. Veränderungen im vorderen Auge bestehen in der Entwicklung einer Rigidität der Pupille, die sich medikamentös schlecht dilatieren lässt und als Risikofaktor für die Operation gilt, schwache Zonulafasern, periphere iridokapsuläre Adhäsionen, oft subluxierte Linsen mit Lentodonesis (Kasimpriz et al., 2004) und starke Tendenz zur Fibrinreaktion (Raitta et al., 1986). Es handelt sich offensichtlich um eine generalisierte Erkrankung des vorderen Augensegments mit potenziell schwerwiegenden Folgen für die Linsentransparenz (Fama et al., 1993) und für die gesamte Funktion des Auges, weil verschiedene Gewebe betroffen sind. Aus histopathologischer Sicht handelt es sich um eine mit altersassoziierte, degenerative Fibrilopathie, bei der ein grauweißes, fibrilläres Material auf der Oberfläche der beteiligten Strukturen des vorderen Augenabschnitts (Ritch and Schlötzer-Schrehardt, 2001).

Das fibrilläre Material wird multifokal produziert und entsteht im vorderen Augenabschnitt entweder aus unpigmentiertem Ziliarkörperepithel oder aus Irispigmentepithel oder aus Linsenepithel oder aus dem Hornhautendothel (Miyake et al., 1989; Inoue et al., 2003), oder aus dem Trabekelwerkendothel (Meyer et al., 1984; Schlötzer-Schrehardt and Naumann, 1994 für Literatur). Außerdem scheint es assoziiert zu sein mit fast allen Zelltypen im Irisstroma (Amari et al., 1994; Asano et al., 1995). Lichtmikroskopisch ist das Material PAS-positiv, Masson-positiv, Gomori-Chromhämoxycilin-positiv, eosinophil und phänotypisch bäumchenartig verzweigtes Material auf allen Strukturen des vorderen Augenabschnitts (vordere Linsenkapsel, Ziliarkörper, Zonulafasern, Trabekelwerk, Hornhaurückfläche usw.) (Dark and Streeten, 1990; Davison, 1993; Knorr et al., 1991). PEX-Fibrillen erscheinen elektronenmikroskopisch gesehen niemals intrazellulär, sondern ausschließlich auf der Oberflä-

che von Zellen. Für eine aktive Sekretion der Fibrillen spricht die Tatsache, dass die produzierenden Zellen hypersekretorisch erscheinen und ein prominentes endoplasmatisches Retikulum und Erhöhung der Mitochondrien aufweisen. Bei den Fibrillen handelt es sich nach elektronenmikroskopischer Betrachtung um abnormes Material der Extrazellulärmatrix, das sich über den Kammerwasserfluss sich im gesamten Vorderkammerabschnitt ausbreitet und ablagert (Morrison et al., 1988). Insgesamt ist aber sowohl die Iris (Brooks and Gillies, 1983) als auch die Vorderkammerflüssigkeit verändert (Bleich et al., 2004; Berlau et al., 2001; Helbig et al., 1994; Ho et al., 2005; Kühle et al., 1994a, b).

Die Pathogenese des PEX bleibt noch unklar, obwohl verschiedene Theorien existieren, die sich auf histopathologische Befunde stützen. Ein entscheidender Grund für die Diversität der Theorien ist die Tatsache, dass zu wenig Material zu Verfügung steht, um proteinchemische Untersuchungen mit der notwendigen Auflösung durchzuführen. Man ging anfänglich davon aus, dass das mit Antikörpern gegen Amyloid anfärbbare PEX-Material tatsächlich Amyloid ist (Meretoja und Tarkkanen, 1975). Diese Annahme konnte sich nicht bestätigen. Die zweite Theorie ging von einer Basalmembrangenese des PEX-Materials aus. Mit immunhistochemischen Methoden konnte tatsächlich nachgewiesen werden, dass Basalmembran-Komponenten wie Laminin, Heparansulfat-Proteoglycan, Entactin/Nidogen im PEX-Material vorhanden sind (Konstas et al., 1990, Schlötzer-Schrehardt et al., 1992). Die dritte Theorie nimmt an, dass elastische Mikrofibrillen der Hauptanteil von PEX sind (Streeten, 1993). Dafür spricht die Tatsache, dass auch extraokulare Organe ähnliche elastisch-fibrilläre Ablagerungen aufweisen. Unabhängig davon, lässt sich das PEX-Syndrom eher als eine komplexe Veränderung aus dem Bereich generalisierter degenerativer Fibrilopathien mit konsekutiven Veränderungen von Basalmembranen und Extrazellulärmatrix beschreiben. Bezüglich des lentikulären Materials nahmen Schlötzer-Schrehardt und Naumann (1994a, b) an, dass das charakteristische Verteilungsmuster des PEX-Materials durch regional verschiedene Mechanismen entsteht: Zum einen wird PEX aktiv durch das prääquatoriale Linsenepithel in der germinativen Zone produziert und zum zweiten findet eine passive Ablagerung des Materials durch Kammerwasser (Yaksel et al., 2001) sowohl auf die Linsenkapsel (zentrale Scheibe) als auch auf die Iris (granuläres Material).

## 1.5 Alterung der Linse und die Folgen von feinen Entwicklungsstörungen

Mit keinem anderen Augenleiden ist die augenärztliche Tätigkeit so eng gekoppelt wie mit der typischen Alterseintrübung der Linse, dem grauen Star. Es ist deshalb erstaunlich, dass die Ursachen dieser fundamentalen Veränderung einfach als „altersbedingt“ vereinfacht und missverstanden wird. Obwohl es auch äußere Faktoren gibt, die eine Katarakt induzieren und/oder verstärken, so trifft es aber im Großen und Ganzen zu, dass die senilen Kataraktformen die Mehrheit ausmachen. Nach den epidemiologischen Daten der WHO geht hervor, dass heute ca. 20 Millionen Menschen weltweit an Katarakt erblindet sind, und dass jedes Jahr weitere 1 bis 2 Millionen hinzukommen. Somit stellen die Katarakte die häufigste Ursache von Erblindungen weltweit dar.

Supranukleäre Katarakte machen etwa 50% aller senilen Linsentrübungen aus, gefolgt von subkapsulären Katarakten und Mischformen, die in der Regel zur Operation gelangen. Der Kern bleibt bei den senilen Kataraktformen länger ungetrübt. Die pathogenetischen Faktoren der Kataraktentwicklung sind weitgehend ungeklärt. Die supranukleäre Lokalisation der meisten Katarakte spricht allerdings für die Beteiligung von molekularen Scherkräften zwischen Linsenrinde und Linsenkern. Letzterer wird ab der 4ten Lebensdekade härter (Kernsklerose) und ist verantwortlich auch für die Entwicklung der Presbyopie, die auch in dieser Dekade einsetzt. Bei einem 45-Jährigen ist z. B. der Linsenkern 3-mal so hart wie beim 20-Jährigen, während bei einem 80-Jährigen er 8-mal so hart ist (Pau, 2006), während die Linsenrinde relativ weich bleibt.

Bei der Akkommodation und insbesondere beim Desakkommodationsvorgang kommt es auch zu erheblichen Scherkräften zwischen der Linsenrinde und dem Linsenkern. Dabei verschieben sich die weicheren Rindenfasern über den immer härter werdenden Linsenkern. Es entstehen scharfe Mikrorupturen und Faserzerreißen der kortikalen Linsenfasern. Demzufolge kann Flüssigkeit in die entstehenden Mikrospalten eindringen und die Ionenverhältnisse vor allem die Kalium- und Natrium-Ionen verändern. Die über längere Zeit klar bleibenden Spalten können langsam eintrüben und werden dann mit Hilfe der biomikroskopischen Untersuchung als supranukleär gelegene „radspeichenartige“ Veränderungen erkannt. In Abhängigkeit vor der Zonula-

fasertraktion am Äquator der Linse dehnen sich die „Radspeichen“ in äquatorialer Richtung aus und gehen durch mehrere kortikale Schichtlager hindurch.

Subkapsuläre Katarakte der Rinde entstehen auf dem Boden anderer Mechanismen und insbesondere durch metabolische Störungen vor allem außerhalb der Linse wie Uveitis, längere und hochdosierte Kortisongabe, übermäßiger Alkoholmissbrauch, ionisierende Strahlen und Medikamente. Die hintere subkapsuläre Katarakt entsteht in der Regel auch durch metabolische Störungen, die außerhalb der Linse ablaufen und sekundär die hintere dünne Linsenkapsel betreffen. Im Gegensatz zum typischen Alterstar gelangt bei Störungen der Ionenpumpe der hinteren Kapsel Flüssigkeit von außen (Glaskörper) in die subkapsuläre Region ein und führt zu Störung des Hydratationszustands und folglich des Ionengleichgewichts mit Eintrübungsfolgen. Die eigentliche senile Katarakt im hohen Alter ist eine Kernkatarakt und entwickelt sich zunächst in den ontogenetisch ältesten Teilen der Linse (Kern). Sie schreitet langsam voran und entwickelt sich im Laufe von Jahren bis Jahrzehnten. Die Prävalenz von Kernsklerose bei Hundertjährigen beträgt nahezu 100% (Pau, 2006).

Es ist zu erwarten, dass die fein auf einander abgestimmten Entwicklungsvorgänge in der Linse die spätere Funktionsweise beeinflussen. Neben der Katarakt werden weitere Veränderungen der alternden Linse auf ihre Funktion zurückgeführt. Die von Lindberg (1917) erstbeschriebene und von Voigt (1925) ersterklärte *Exfoliatio lentis* zum Beispiel wurde zunächst wenig beachtet, so dass epidemiologische Studien erst spät erfolgten. Man ging zunächst davon aus, dass PEX bei Skandinaviern auftritt, um später festzustellen, dass es in allen geographischen und ethnischen Populationen vorkommt. Die Prävalenz des PEX beträgt in der skandinavischen Bevölkerung zwischen ca. 8% und 31% bei den älteren Menschen der 9. Lebensdekade (Tarkkanen, 1984, Lumme und Laatikainen, 1993). In den meisten westeuropäischen Ländern, in den USA und Japan wird die Prävalenz mit 2% bis 18% angegeben (Ball et al., 1989; Okamura et al., 1989). Auf der anderen Seite zeigten standardisierte Verfahren der Erfassung von PEX, dass keine signifikanten Unterschiede unter den verschiedenen geographischen Populationen zu finden sind. Nach dieser Studie ist die Prävalenz in Deutschland 4,7%, in England 4% und in Norwegen 6,3% (Ringvold et al., 1988). Es ist davon auszugehen, dass wegen des schleichenden Beginns das PEX eher unterdiagnostiziert wurde.

Das Offenwinkelglaukom, das sich bei etwa der Hälfte aller PEX-Fälle entwickelt, nimmt deshalb bei PEX hinsichtlich sowohl der Häufigkeit als auch der Schwere von möglichen Komplikationen eine wichtige Rolle bei allen Sekundärglaukome ein. Bezogen auf den Anteil an allen Glaukomen, macht das PEX-Glaukom weltweit ca. 25% aller Glaukome aus. Das PEX-Glaukom hat aufgrund seiner raschen Progredienz, der raschen Papillenveränderungen, dem Auftreten von Druckspitzen in den frühen Morgenstunden (Sowka, 2004; Altintas et al., 2004), d. h. außerhalb der üblichen Untersuchungszeit und demzufolge der schnellen Zunahme von Skotomen eine schlechte Prognose. Zu dieser schlechteren Prognose treten im Vergleich zum Offenwinkelglaukom eine häufige Asymmetrie, stärkere Kammerwinkel-Pigmentierung, höheres Druckniveau und akute Drucksteigerungen bei Mydriasis. Aufgrund dieser raschen Progredienz sollten Augen mit PEX bereits bei okulärer Hypertension antiglaukomatös behandelt werden, bis der Druck unter 17 mm Hg sinkt. Man geht davon aus, dass damit auch die Progression von PEX verlangsamt wird.

Interessanterweise ist PEX assoziiert mit Kataraktentwicklung (Raitta and Setälä, 1986) ohne dass sie pathogenetisch miteinander assoziiert sind. Bei Kataraktpatienten tritt PEX mit einer Häufigkeit von 25% bis 41% auf (Konstas et al., 1995a). Auch die Entwicklung eines Glaukoms tritt beim PEX mit höherer Inzidenz auf sowie die Inzidenz des PEX mit zunehmendem Alter wächst. Insgesamt nimmt die PEX-Häufigkeit mit dem Alter zu und fällt bei Menschen unter dem 60. Lebensjahr kaum auf (weniger als 1%), um zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr auf 15% zu steigen und Spitzenwerte von 48% nach dem 80. Lebensjahr zu erreichen (Lumme und Laatikainen, 1993). Bei jüngeren Patienten tritt PEX nur in Ausnahmefällen auf. Der jüngste Fall war eine 17-jährige Patientin mit kongenitalem Glaukom und Trabekulektomie (Konstas et al., 1995). Wegen der erhöhten Prävalenz im Alter, PEX ist relativ häufig in Augen, die zur Kataraktextraktion gelangen. In histopathologisch untersuchten Augen haben Krause und Tarkkanen (1978) nachgewiesen, dass 33% der extrahierten Linsen ein PEX hatten. Betrachtet man altersunabhängig die Häufigkeit von PEX in kataraktoperierten Augen, so beträgt sie im süddeutschen Raum 3,5% (Naumann et al., 1989). Man geht heute davon aus, dass die Kataraktextraktion und die Implantation einer Hinterkammerlinse einen positiven Effekt auf die Progression von PEX haben. Eine kombinierte Operation wird inzwischen vorgezogen, weil man damit die besten postoperativen Ergebnisse sowohl hinsichtlich des Drucks als auch hin-

sichtlich von postoperativen Komplikationen hat (Wedrich et al., 1992; Wollensack et al., 1992).

Bezüglich der Uni- oder Bilateralität wurde festgestellt, dass 48% bis 76% der Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose ein unilaterales PEX vorliegt (Futa et al., 1992). In der Regel entwickelt sich nach Erstdiagnose eines einseitigen PEX innerhalb von wenigen Jahren ein beidseitiges PEX (zwischen 6 und 16 Jahren). In der Regel haben aber Patienten mit einseitigem PEX bei genauer Betrachtung unter Mydriasis auch schon punktförmige Veränderungen im kontralateralen Auge. Die Unilateralität von PEX-Glaukom über Jahre ist eine wichtige Differentialdiagnose zum Offenwinkelglaukom.

## **1.6 Behandlung der alternden Linse und Kataraktchirurgie**

Als Meilensteine in der Kataraktchirurgie gelten die innovativen Eingriffe von Jacques Daviel im 18. Jahrhundert und die Behandlungen von Albrecht von Graefe im 19. Jahrhundert. Im 20. Jahrhundert implantierte Sir Harold Ridley die ersten Intraokularlinsen und öffnete damit den Weg zum heute häufigsten operativen Eingriff in der Medizin weltweit, mit ca. 600.000 Eingriffen pro Jahr in Deutschland.

Die Kataraktchirurgie dient der Entfernung der getrübbten Linse und der optischen Rehabilitation, die früher mit Starbrille, später mit Kontaktlinsen und seit den 70er Jahren mit phaken Intraokularlinsen bewerkstelligt wird. Die extrakapsuläre Kataraktextraktion (ECCE) besteht darin, dass über einen corneoskleralen Zugang (10 bis 14 Uhr Schnitt) die Linse bei medikamentös erweiterter Pupille erreicht wird und die vordere Linsenkapsel zirkulär eröffnet und entfernt wird. Die getrübbte Linse wird entweder mit leichtem Druck am Limbus exprimiert oder auf einer Kältesonde aufgefroren und aus dem Auge entfernt. Eine intraokulare Kunstlinse (IOL) mit entsprechender dioptrischer Wirkung wird dann in den Kapselsack implantiert. Voraussetzung für die Implantation ist ein intakter Linsensack. Der corneosklerale Schnitt wird mit Fäden zugenäht. Bei dieser Methode kann es unter anderem zu Modifikationen in der Irisstruktur kommen (Brazitikos and Roth, 1991).

Das in den 1980er Jahren eingeführte Verfahren der Phakoemulsifikation (Phako) wird bei den meisten Kataraktformen durchgeführt und basiert auf die Durchführung eines cornealen Minimalschnitts, die Einführung eines Phakoemulsifikators und die

vor Ort Zerkleinerung der Linse mit Ultraschallwellen (Becker et al., 1991; Assia et al., 1991a, b; Böke 1990). Gleichzeitig ist am Phakoemulsifikator eine Saugspülvorrichtung eingebracht, die die Linsenreste absaugt. Der wesentliche Vorteil dieses Verfahrens ist der Minimalschnitt und die seltenere Komplikation von postoperativem Astigmatismus. Auch bei diesem Verfahren wird nach kompletter Linsenabsaugung eine Intraokularlinse in den Linsensack eingepflanzt. Augen mit PEX wurden bis zur Einführung der Phakoemulsifikation mit dem ECCE Verfahren operiert. In der Zwischenzeit werden PEX-Augen je nach Ausrüstung der jeweiligen Einrichtung sowohl mit ECCE als auch mit Phakoemulsifikation operiert (Böke, 1990). Sowohl ECCE als auch Phakoemulsifikation kann mit Glaukomchirurgie kombiniert werden, meistens in Form einer Iridektomie oder Trabekulotomie (Heuring et al., 2001).

Als Risikofaktoren für die Kataraktchirurgie bei Augen ohne PEX gelten Vorschädigungen des Auges, hintere Synechien, Re-Operationen, Verletzungen sowie systemische Erkrankungen, die mit Wundheilungsstörungen einhergehen wie der Diabetes mellitus (Guzek, et al., 1987). Die modernen Verfahren der Kataraktchirurgie gelten aufgrund der seit den 1960er Jahren verwendeten mikrochirurgischen Mikroskope als sehr sicher und weisen eine Komplikationsrate von weniger als 5% auf. Als typische intraoperative Komplikationen gelten sowohl für die ECCE als auch für die Phakoemulsifikation die Linsenkapselruptur mit Glaskörperprolaps, die Versenkung der Intraokularlinse in den Glaskörperraum und Blutungen. Als postoperative Komplikationen sind die Pseudophakieablatio der Netzhaut, die intraokularen Entzündungen, das Maculaödem, intraokulare Blutungen sowie anaerobe Infektionen auf der Intraokularlinse zu erwähnen.

### **1.7 Linsebedingte Risikofaktoren, die zu Komplikationen bei der PEX-Chirurgie führen können**

Es ist damit zu rechnen, dass die Scherkräfte, die beim Akkommodationsvorgang entstehen, auch mit den lentalen Risikofaktoren zusammenhängen. Beide Verfahren der Kataraktchirurgie werden bei PEX angewandt (Assia et al., 1991a, b; Drolsum et al., 1993, 1994). Das PEX selbst galt zu Beginn der Kataraktextraktion als Risikofaktor (Goder, 1988; Freyler und Radax, 1994). Die Risikofaktoren für die normale extrakapsuläre Kataraktchirurgie (ECCE) in Augen ohne PEX bestehen zum einen in der Enge der Pupille durch die man passieren muss, um die getrübbte Linse zu entfernen. Enge Pupillen sind der einzige signifikante Risikofaktor für den Verlust von

Glaskörper (Guzek et al., 1987). Glaskörperverlust tritt bei ca. 4,3% aller nicht PEX-Patienten als intraoperative Komplikation der extrakapsulären Kataraktextraktion auf. Kapselrupturen treten in 5,7% und Zonulafasernbrüche in 5,7% aller Patienten auf. Die Häufigkeit von Glaskörperverlust beträgt bei Pupillen von > 6 mm nur 2,8%. Bei Pupillenweite von < 6 mm steigt die Häufigkeit von Glaskörperverlust auf 5,9% (Guzek et al., 1987; Zettersröhm et al., 1992).

Zonulafasernbrüche treten mit signifikanter Häufigkeit auf, wenn PEX vorliegt, oder in Kombination mit enger Pupille, oder wenn ungeeignete Aspirationsinstrumente verwendet werden. Auf der anderen Seite scheinen Veränderungen wie hohe Myopie, fortgeschrittene Katarakt, Glaukom, fortgeschrittenes Alter des Patienten sowie das Vorliegen von Diabetes mellitus nicht signifikante Risikofaktoren für Glaskörperprolaps, Zonulafaserndefekte oder Kapselrupturen zu sein (Guzek et al., 1987). Andere Autoren berichten jedoch, dass sowohl enge Pupille (Duke-Elder, 1969) als auch hohe Myopie und fortgeschrittene Katarakt (Yang und Kline, 1983) zu den Risikofaktoren für Zonulafasern- oder Kapselrupturen zählen. Das PEX ist assoziiert mit spontaner Linsendislokation und Verlagerung (Tarkkanen, 1962, Bartholomew, 1970) als auch mit Zonulafasernschwäche während der extrakapsulären Chirurgie (Raitta und Setälä, 1986; Tarkkanen, 1986).

Im höheren Alter der Patienten ist PEX signifikant häufiger und das Geschlechterverhältnis beträgt zwischen Männern und Frauen 1:1,6. Entsprechend der Gewebsveränderungen beim PEX steigt die Häufigkeit des intraoperativen Glaskörperverlustes auf 11,1% während er bei Augen ohne PEX lediglich 1,6% beträgt. Glaskörperverlust ist somit 7-mal so häufig bei PEX als bei Augen ohne PEX. Die hintere Kapsel rupturierte bei Augen mit PEX in 4,2% der Fälle, war allerdings nicht statistisch signifikant höher als bei Augen ohne PEX (2,8%) (Naumann et al., 1989).

## **1.8 Ziel der vorliegenden Studie**

Das Ziel dieser Studie war die histologische und immunhistochemische Analyse der Entwicklung der Linse im Hinblick auf spätere Entwicklungsstörungen und insbesondere der Katarakt im subkapsulären Bereich und des sogenannten Pseudoexfoliationssyndroms, das mit intraokularen und extraokularen (viszeralen) granulären Ablagerungen einhergeht.

Dazu wurden neben der menschlichen Linse, die als histologisches Material nach Kataraktoperation zur Verfügung steht, auch Material aus Affen Augen (*C. jacchus*) verwendet (Missler et al., 1992). Im Gegensatz zum menschlichen Material stand auch in embryonalen und frühen postnatalen Stadien zur Verfügung. Affen Augen wurden aus Tierkadavern aus dem Institut für Reproduktionsmedizin des UKM entnommen und bearbeitet. Es wurden sowohl aus menschlichen Augen als auch aus Affen Augen Schnitte bearbeitet, die entlang der Augenachse entstanden sind und die wesentlichen Augenkompimente zeigen (s. Abbildung 5).

Die gängigen Proteine der Extrazellulärmatrix (Kollagene, Laminin, Fibronectin) konnten wenn auch in etwas veränderter Intensität in beiden Gruppen gefunden werden (Ong et al., 2003). Weiter wurden überlebensassoziierte Faktoren (BCL-2 und GAP-43) im Linsenkapsel Epithel untersucht. In beiden Gruppen waren beide Faktoren unverändert exprimiert. Die Ergebnisse stützen die Hypothese, dass mit zunehmendem Alter die Elastizität des Kapsel-Epithelkomplexes aufgrund von Proteinabnormalitäten durch akkommodativen Verschleiß abnimmt. Dadurch entstehen Mikrorisse in der Kapsel und in den subkapsulären Fasern, die zur Eintrübung der Linse und zur Exfoliation von Proteinen (granuläres Material) führen.

## 2.0 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

- BSA (Rinderserumalbumin) Sigma-Aldrich, Seelze
- Essigsäure Roth, Karlsruhe
- Ethanol (absolut) J. T. Baker, Griesheim
- HBSS PAA, Paschin, Österreich
- Gentamytex Dr. Mann Pharma, Berlin
- Glycerin (87%) Roth, Karlsruhe
- Kaliumchlorid Merck, Darmstadt
- Ketamin Ceva, Düsseldorf
- Magermilchpulver Merck, Darmstadt
- B-Mercaptoethanol Sigma-Aldrich, Seelze
- Methanol Sigma-Aldrich, Seelze
- Natriumkarbonat Merck, Darmstadt
- PFA (Paraformaldehyd) Sigma-Aldrich, Seelze
- PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) Sigma-Aldrich, Seelze
- Triton X-100 Sigma-Aldrich, Seelze
- Trypsin-EDTA PAA, Cölbe
- Xylazin CEVA, Düsseldorf

In obiger Liste nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Merk, Sigma-Aldrich und Diagonal bezogen.

#### 2.1.2 Geräte

- ♦ Auswertungseinheit mit Digitalisierhardware Zeiss, Oberkochen
- ♦ Axiovision-Software Zeiss Oberkochen
- ♦ Chirurgische Pinzetten Hermle, Tuttlingen
- ♦ Feine Pinzetten Dumont, Schweiz
- ♦ Knochenzangen Hermle, Tuttlingen
- ♦ Kryostat (2800 Frigocut E) Reichert-Jung, Heidelberg
- ♦ Mikroskop Axiovert 25 Zeiss, Oberkochen
- ♦ Mikroskop Axiovert 35 Zeiss Oberkochen
- ♦ Mikroskop Axiophot Zeiss Oberkochen

- ◆ Mikroskopkamera Zeiss Oberkochen
- ◆ pH-Meter Knick, Omnilab, Münster
- ◆ Präparationsscheren Hermle, Tuttlingen
- ◆ Skalpelle und -halter Hermle, Tuttlingen
- ◆ Vannas-Scheren Hermle, Tuttlingen
- ◆ Wasserbad GFL, Burgwedel

### 2.1.3 Versuchstiere

- ♥ Callithrix jacchus Institut für Reproduktionsmedizin
- ♥ Sprague-Dawley Ratten (*Rattus norvegicus*) Charles River, Sulzfeld

### 2.1.4 Verwendete primäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Firma	Bestellnummer	Spezifität	Host
$\alpha$ -Crystallin, $\alpha$ - $\beta$ -Crystallin	1:100	Sanbio	PS 094	bovine (human)	rabbit
Rat- $\beta$ -Crystallin	1:400	Dr. BSR Lab, Dept. of Biochemistry, Hyderabad, India		rat	rabbit
$\gamma$ -Crystallin	1:100	National Eye Institute Bethesda, Maryland 20892, Dr. Samuel Ziegler		bovine	rabbit
Fibronectin	1:100	Sigma	F 3648	human (cross-reacts with rat, mouse, goat, sheep, grinea pig, bovine, chicken)	rabbit
Integrin $\alpha$ -5- $\beta$ -1	1:100	Chemicon	MAB 1969	human	mouse
BCL-2	1:50	Sigma	B 3170	human	mouse
GAP-43	1:500	Sigma	G 9264	human, monkey, rat, mouse, chicken	mouse
Laminin-1	1:1000	Sigma	L 8271	human, pig, rat	mouse
Vimentin	1:200	Sigma	U 6630	human, pig, chick, rat	mouse

## 2.1.5 Verwendete sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Firma	Bestellnummer	Spezifität	Wirt
Cy-2 konjugiert	1:200	Jackson Immuno Research, West Grove, USA	54198	Ziege	Esel
Cy-3 konjugiert	1:200	Jackson Immuno Research, West Grove, USA	50092	Kaninchen	Ziege
Cy-2 konjugiert	1:200	Chemicon, Limburg		Ziege	Maus
Cy-3 konjugiert	1:300	Sigma, St Louis, MO, USA	T6778	Ziege	Maus
Cy-3 konjugiert	1:100	Jackson Immuno Research, West Grove, USA	56475	Esel	Schaf
Cy-3 konjugiert	1:100	Jackson Immuno Research, West Grove, USA		Esel	Ziege

## 2.2 Auswahl der Affenaugen

Alle in dieser Arbeit verwendeten histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen wurden an Schnitten aus Affenaugen der Spezies *Callithrix jacchus* aus der Ophthalmohistologie durchgeführt. Die Affenaugen stammen aus der Zucht des Instituts für Reproduktionsmedizin und wurden nach der Tötung der Tiere aus den Kadavern entfernt, in die Experimentelle Ophthalmologie gebracht und dort aufgearbeitet.

Weil die Herkunft der Affenspezies relativ unbekannt ist, werden an dieser Stelle zusammenfassende Daten zur Spezies vorgestellt:

### ***Callithrix jacchus***

- Spezies: Callithrix jacchus
- Genus: Callithrix
- Familie: Callithricidae
- Lebensareal: Ostbrasilien
- Soziales Leben: Familiengruppen bis zu 30 Individuen (in Gefangenschaft 12). Nur ein Par pro Gruppe bekommt und erzieht Kinder zur gleichen Zeit.
- Lebensspanne: 7-10 Jahre

- Schwangerschaftsdauer: 140-145 Tage
- Größe: Kopf und Körper: 18-30 cm
- Schwanz: 17-40 cm
- Gewicht: 300-500 g
- Sexuelle Reifung: 1,5 Jahre

Es gibt einen wachsenden Trend diese Affenspezies zu verwenden, weil die Tiere relativ klein sind, nicht zu den Primaten gehören, sich leicht und praktikabel züchten lassen und große Vorteile gegenüber Makaken aufweisen.

Der *Bulbus* wurde in HBSS (Gibco) zunächst weitgehend von umliegendem Bindegewebe freipräpariert. Nach einer Inzision mit dem Skalpell (Klingengröße 11, Aesculap) im Bereich des *Limbus* wurde der *Bulbus* im vorderen Bereich mit einem zirkumferenten Schnitt eröffnet. Auf diese Weise ließen sich die vorderen Bulbusabschnitte und insbesondere die Linse von der Retina trennen.

Der enukleierte Bulbus bzw. das Linsenmaterial wurde in Tissue-Tek (Sakura-Finetek) eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Gefrierschnitte von 12 µm wurden entlang der Sehachse durch das mittlere Drittel des Auges mit dem Kryostaten (2800 Frigocut E, Reichert-Jung) geschnitten und auf gelatinierten Objektträgern (Engelbrecht) abgelegt.

Die Kryostatschnitte wurden auf einem Objektträger (Engelbrecht) aufgebracht und mit dem Mikroskop Axiophot mit Epifluoreszenz (Zeiss) und dem FITC-Filter (Zeiss) analysiert. Die Präparate wurden entsprechend digital analysiert und mit dem Programm Carl Zeiss Vision, Axio Vision Rel 4.5 fotografiert.

Zur Isolierung intraokularer Gewebe und insbesondere der Retina wurden vier radiäre Schnitte in einem Abstand von je 90° gesetzt, so dass eine flächenhafte Ausbreitung der halbkugelförmigen Netzhaut auf einer Nitrozellulosemembran (Sartorius) möglich war. Durch zwei feine Uhrmacherpinzetten (Hermle) wurde vorsichtig die Retina von der Sklera abgetrennt und an der Papille mit einer Kapsulotomieschere (Gills-Welsh) vollständig abgelöst. Die Linse wurde mit der Vorderkapsel nach oben auf die Nitrozellulosemembran (Sartorius) kleeblattförmig ausgebreitet.

Zur besseren Anhaftung an dieser Membran wurde die Retina oder die Linse auf einem trockenen weißen sterilen Filterpapier (Whatman) abgelegt, um - ohne auszutrocknen - überschüssige Flüssigkeit abzusaugen. Residuen des Glaskörpers konnten vorsichtig mit einer feinen Uhrmacherpinzette (Hermle) von der Ganglienzellschicht extrahiert werden. Der Filter mit der aufliegenden Retina oder der Linse wurde in ein Fixiermedium (4%-iges PFA in PBS) überführt und nach ca. zwei Stunden mit Mowiol 4-88 (Hoechst) auf einem Objektträger (Engelbrecht) aufgetragen.

### **2.3 Indirekte Immunfluoreszenz an okulären Kryostatschnitten**

Exprimierte Proteine wurden mit der Methode der indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die Prozeduren für die Gewebeaufbereitung und immunhistochemische Anfärbung wurden in Anlehnung an bereits routinemäßigen Vorgehensweisen im Labor durchgeführt.

Das Prinzip der Immunhistochemie basiert auf einer spezifischen Bindung eines nicht markierten Antikörpers an Membranantigene bzw. anderen Proteinen im Gewebe. Der Zweitantikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und bindet spezifisch an den unmarkierten Erstantikörper. Durch diese Komplexbildung lassen sich Membranantigene und andere Gewebeproteine im Fluoreszenzmikroskop darstellen.

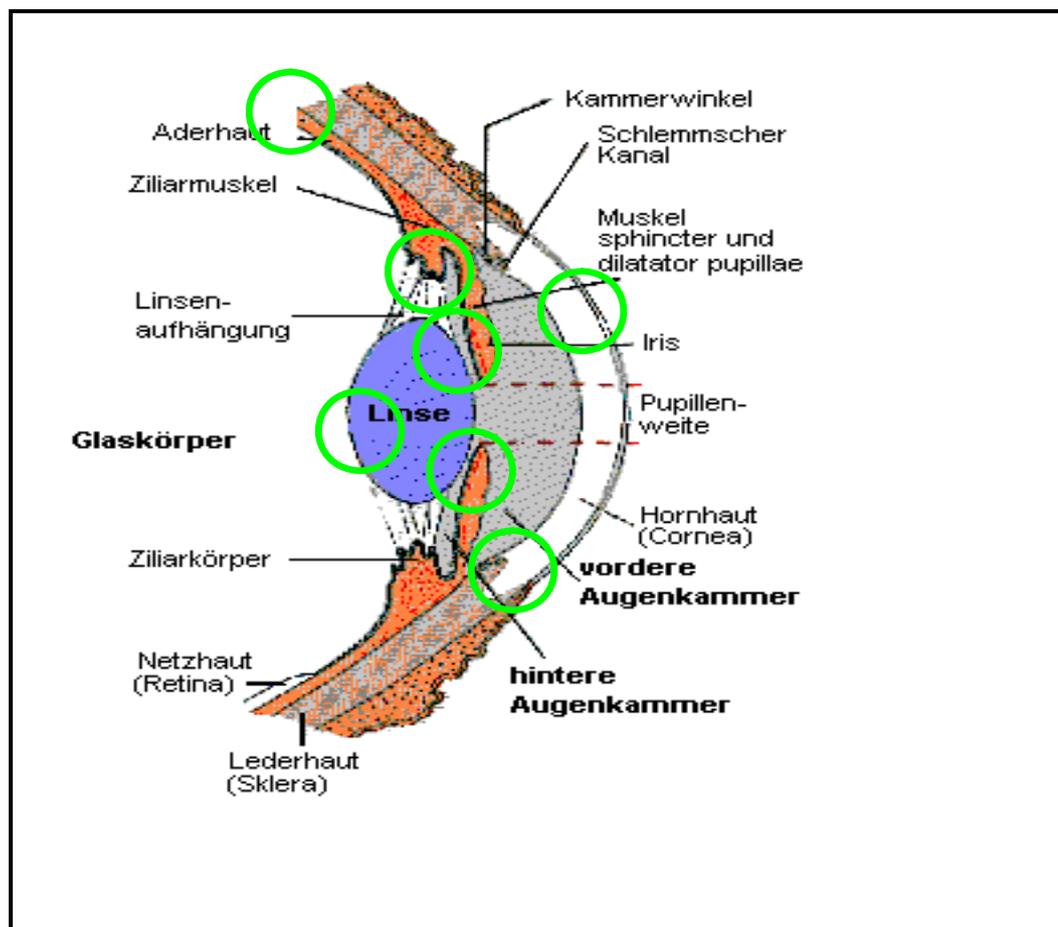
Die Immunhistochemie erfolgte nach einem standardisierten Protokoll.

#### Immunhistochemisches Protokoll:

1. Fixieren der Schnitte in -20 °C kaltem Methanol (Merck) für 10 min
2. Waschen der Schnitte in PBS, pH 7,4 für 3 x 5 min
3. Blocken mit 10% fetalem Kälberserum (FCS, Seromed) für 30 min
4. Entfernung der Blockierlösung
5. Waschen der Schnitte in PBS, pH 7,4 für 3 x 5 min
6. Auftragen des Erstantikörpers in der entsprechenden Verdünnung
7. Inkubation bei 4 °C in einem wasserdampfgesättigten Gefäß für 24 Stunden
8. Waschen der Schnitte in PBS, pH 7,4 für 3 x 5 min
9. Auftragen des Zweitantikörpers in der entsprechenden Verdünnung
10. Inkubation bei Raumtemperatur in einem wasserdampfgesättigten Gefäß bei Dunkelheit
11. Waschen der Schnitte in PBS, pH 7,4 für 3 x 5 min
12. Eindecken der Schnitte in Mowiol (DAPI-Zusatz: 5 µl/ml)

## 2.4 Mikroskopie und Auswertung

Nach der Einbettung konnten die Objektträger (Engelbrecht) unter dem Mikroskop Axiophot (Zeiss) mit Epifluoreszenz analysiert werden. Mit Hilfe drei verschiedener Fluoreszenzfilter (395 bis 440 nm, 450 bis 490 nm, 510 bis 560 nm) ließen sich die Membranantigene bzw. Gewebeproteine, die mit den Antikörpern Komplexbindungen eingegangen waren, in den unterschiedlichen Augenkompartmenten darstellen und mit dem Programm Carl Zeiss Vision, Axio Vision Rel 4.5 fotografieren.



**Abb. 5:** Anatomie des vorderen Augenabschnitts mit der zentralen Lage der Linse, des Zonulaapparats und der benachbarten Regionen im Erwachsenenalter. Die Schnittzeichnung zeigt die Übersicht durch den vorderen Augenabschnitt mit den relevanten Regionen, die mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht wurden. Im Falle der Linse wurde gleichgerichteter Schnitt gelegt, jedoch ohne die benachbarten Regionen. Die besonders gewichteten Augenregionen, die mittels Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert wurden, sind eingekreist (grün).

Die Betrachtung und die Auswertung von Präparaten erfolgte am Axiophot Mikroskop der Firma Zeiss. Im Phasenkontrast konnte zunächst die Qualität der Schnittpräparate voruntersucht werden, bevor sie mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert wurden (Axioskop, oder Axiovert 25 und 35 Mikroskope). Nach der immunhistochemischen Verarbeitung wurden im Fluoreszenzmodus (Cy-2, Cy-3 und DAPI-Filter) die einzelnen eingebetteten Schnitte betrachtet und bei verschiedenen Vergrößerungen fotografiert. Insbesondere wurde zunächst anhand eines tabellarischen Schemas die Lokalisation der positiven Fluoreszenz über das gesamte Auge registriert. Im Vergleich zur jeweiligen negativen Färbungskontrolle (d. h. weglassen des 1. Antikörpers und nur Inkubation mit dem 2. Antikörper).

Auf eine statistische Analyse wurde verzichtet, da alle Augen des gleichen Alters und alle Schnitte für das jeweilige Antigen die gleiche Fluoreszenz zeigten. Als goldener Standard wurde auf jedem Objektträger jeweils eine negative Kontrolle durchgeführt und dokumentiert.

### **3.0 Ergebnisse**

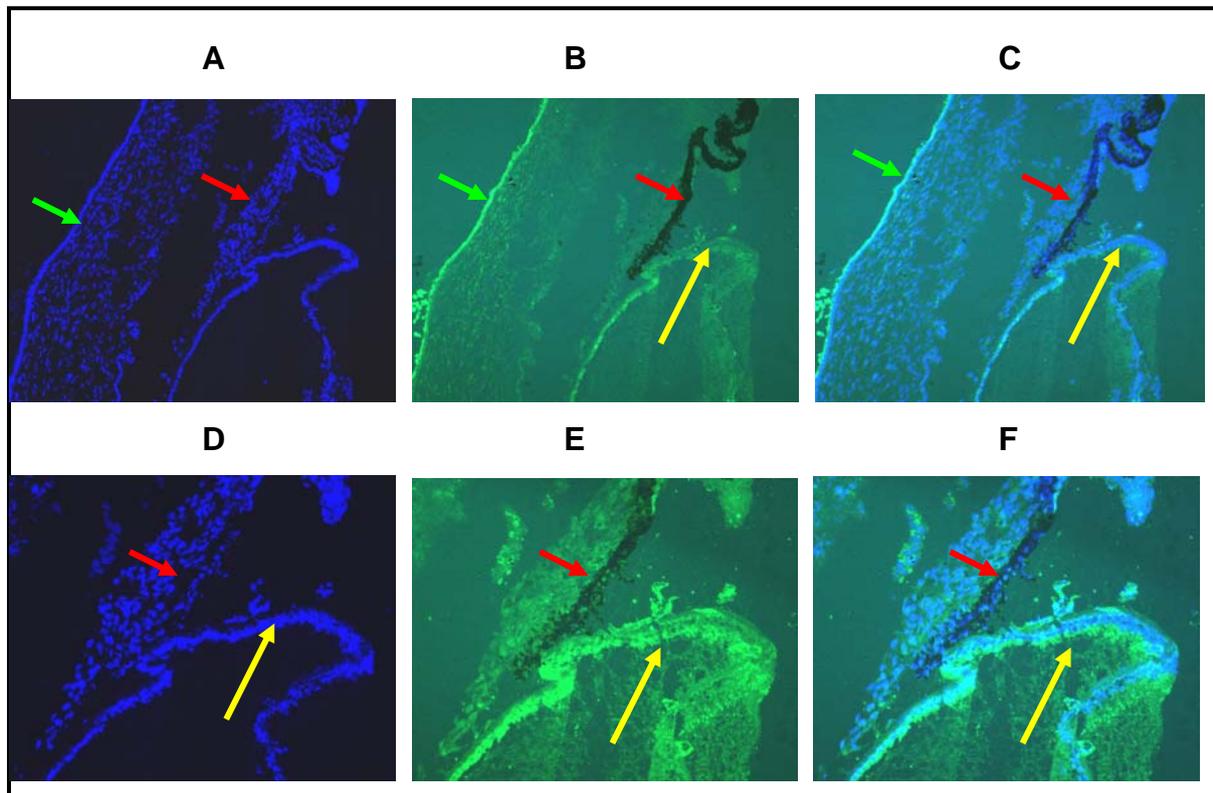
Alle in dieser Arbeit verwendeten histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen wurden an Schnitten aus Affenaugen der Spezies *Callithrix jacchus* aus der Ophthalmohistologie durchgeführt. Diese Affenspezies weist eine Schwangerschaftsdauer von 140-145 Tagen auf. Auf den menschlichen Fötus übertragen entspricht die Entwicklung eines 3-monatigen *Callithrix*-Fötus der Entwicklung eines ca. 5-monatigen humanen Fötus. In dieser Entwicklungsphase sind wesentliche Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse der Linse abgeschlossen und man rechnet mit erfolgreicher Immunfluoreszenz für eine Reihe der verwendeten Antikörper. Die Affenaugen stammen aus der Zucht des Instituts für Reproduktionsmedizin und wurden nach der dort *lege artis* durchgeführten Tötung der Tiere aus den Kadavern entfernt, in die Experimentelle Ophthalmologie gebracht und dort aufgearbeitet. Es gibt einen wachsenden Trend diese Affenspezies zu verwenden, weil die Tiere relativ klein sind, nicht zu den Primaten gehören, sich leicht und praktikabel züchten lassen und große Vorteile gegenüber größeren Affenspezies aufweisen.

### **3.1 Immunhistochemie des embryonalen und postnatalen Affenauges**

#### **3.1.1 Expression von zellulären Überlebensproteinen (BCL-2)**

Das Protein **Beta Cell Leukemia-2 (BCL-2)** ist ein ubiquitär vorkommendes Protein in differenzierenden Zellen, das sehr eng mit dem programmierten Zelltod (Apoptosis) von Zellen assoziiert ist, und dessen Rolle darin besteht Zellen vor Apoptosis zu schützen. BCL-2 wurde inzwischen auch in okulären Geweben gefunden, und insbesondere in der Retina von verschiedenen Organismen. Das Molekül wurde in der Linse noch nicht ausreichend untersucht, es war aber damit zu rechnen, dass Linsen-Epithelzellen BCL-2 exprimieren. Es zeigte sich tatsächlich, dass in embryonalen Affenaugenschnitten verschiedene okuläre Strukturen das Protein exprimieren.

Wie die Abbildung 6 zeigt, ist BCL-2 deutlich in der Linse und im umliegenden Gewebe exprimiert.



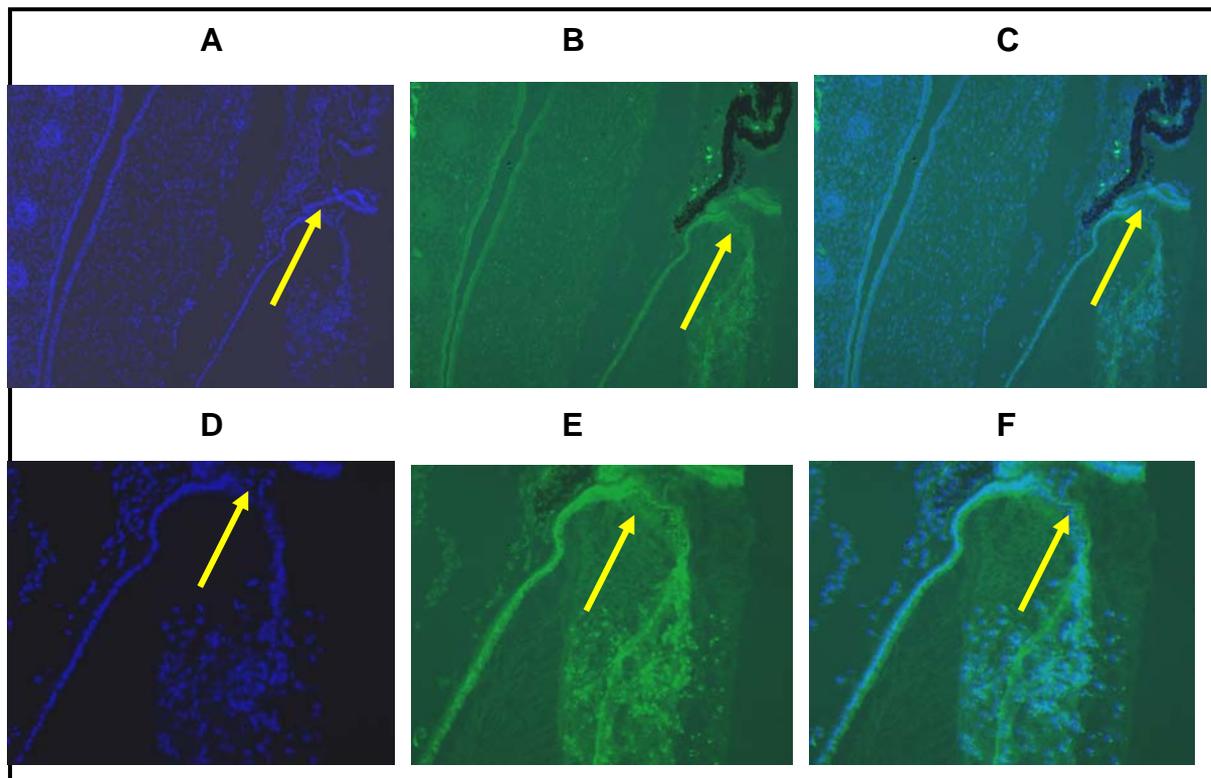
**Abb. 6:** Expression von BCL-2 in der embryonalen Affenlinse und im umgebenden Gewebe: A-C) blaue DAPI-Färbung zur Darstellung der Zellkerne (A), grüne Immunfluoreszenz zur Darstellung von BCL-2 (B) und überlagerte Färbung zur Übersicht der Immunlokalisation. D-F) stärker Vergrößerung der gleichen Region. Gelbe Pfeile zeigen in allen Bildern das BCL-2-positive Linsenepithel. Rote Pfeile zeigen die Iris mit den melaninhaltigen Zellen und grüne Pfeile zeigen das ebenfalls positiv gefärbte Hornhautepithel.

Beim neugeborenen Affengewebe aber auch in der adulten Affenlinse war BCL-2 unverändert im Linsenepithel exprimiert während die Expression in der Iris abnahm.

### 3.1.2 Expression des wachstumsassoziierten Proteins GAP-43

Das **g**rowth **a**ssociated **p**rotein (GAP) mit einem Molekulargewicht von 43 kDalton wurde primär im Nervensystem während der Embryonalentwicklung entdeckt und weitgehend charakterisiert. Es beteiligt an verschiedenen Differenzierungsprozessen und insbesondere am Wachstum von embryonalen Fasern sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem. In der Linse ist GAP-43 erst vor kurzem beschrieben (Stupp and Thanos, 2006) und man assoziiert seine lentale Expression mit der Bildung und Differenzierung von sekundären Linsenfasern, die lebenslang am Linsenäquator entstehen. Es ist deshalb zu erwarten, dass das Molekül insbesonde-

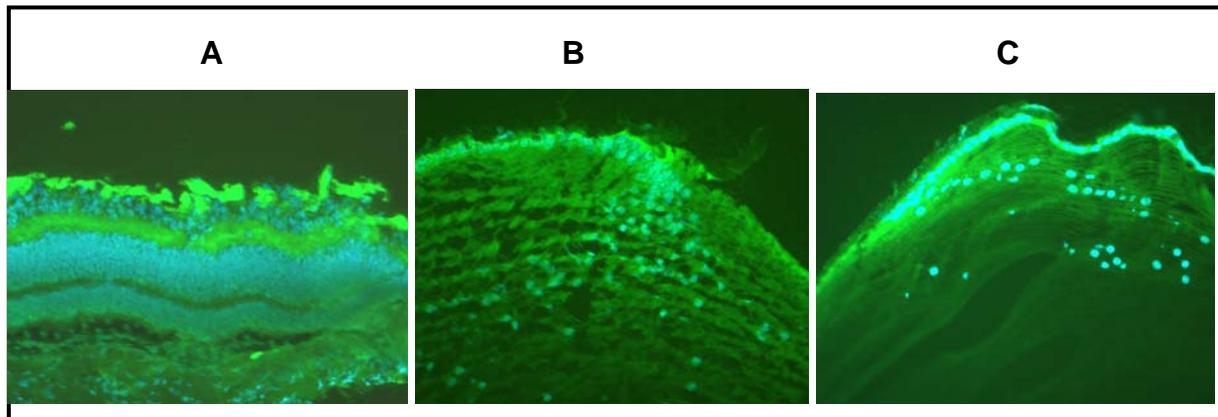
re in der sich teilenden und differenzierenden Äquatorregion exprimiert wird. Die Abbildung 7 zeigt die immunhistologische Lokalisation von GAP-43.



**Abb. 7:** Expression von GAP-43 in der embryonalen Affenlinse und im umgebenden Gewebe: A-C) blaue DAPI-Färbung zur Darstellung der Zellkerne (A), grüne Immunfluoreszenz zur Darstellung von GAP-43. (B) und überlagerte Färbung zur Übersicht der Immunlokalisation. D-F) stärker Vergrößerung der gleichen Region. Gelbe Pfeile zeigen in allen Bildern das positive Linsenepithel. Die Iris erscheint schwarz.

Interessanterweise wurde das GAP-43 in der neugeborenen, in der juvenilen und in der adulten Linse nicht herunterreguliert, und zeigte eine hohe Expression im Linsenepithel und in den neu gebildeten sekundären Linsenfasern. Die Abbildung 8 zeigt diese Lokalisation in der Linse verschiedener Affenstadien. Außer der Linse findet sich GAP-43 in der Retina des Affen, ist im Vergleich zur Linse dort stark exprimiert und ist spezifisch in den Ganglienzellen in der inneren Retina zu finden. Die Rolle von GAP-43 in der Linse ist nicht geklärt, und es ist, dass dieses Phosphoprotein außerhalb des Nervengewebes in dieser hohen Konzentration zu finden ist. Möglicherweise ist es an der Elongation und Migration der sich teilenden Epithelzellen und der postmitotischen sekundären Fasern. Dafür spricht die Beobachtung, dass mit zunehmender Distanz von der Linsenoberfläche die Intensität der Anfärbung ab-

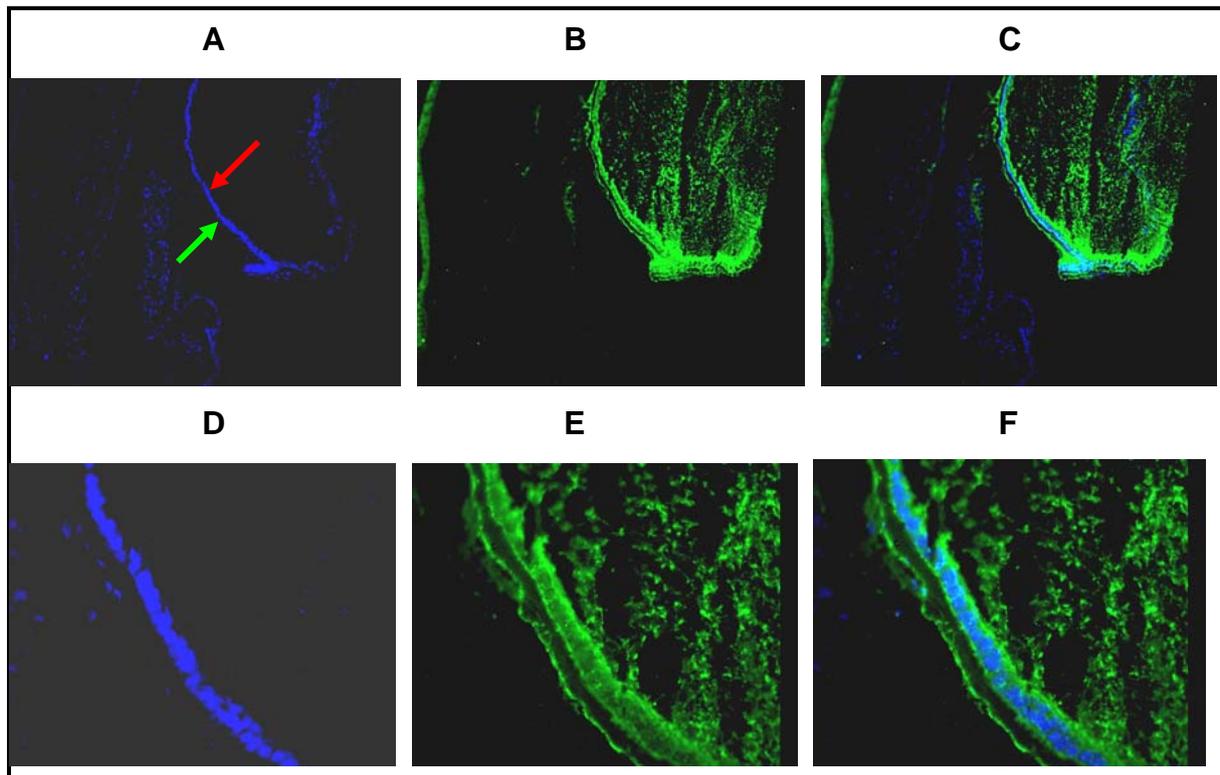
nimmt, und dass nur eine positive Anfärbung von (noch) zellkernhaltigen Fasern zu sehen ist (Abbildung 8C).



**Abb. 8:** A) Expression von GAP-43 in der postnatalen Affenretina (gelber Pfeil zeigt die Ganglienzelleschicht): B) Anfärbung der postnatalen Affenlinse mit deutlicher Fluoreszenz der äquatorialen Epithelzellen (roter Pfeil) sowie der neu gebildeten Sekundärfasern unterhalb des Epithels. C) Gleiche Ansicht einer 4wöchigen Affenlinse mit deutlicher Anfärbung von Epithel (roter Pfeil) und von sekundären Linsenfasern, die noch zellkernhaltig sind (weißer Pfeil). Maßstab: 50  $\mu$ m. Im Verhältnis zur embryonalen Linse ist GA-43 in postnatalen, juvenilen und adulten Stadien stärker exprimiert.

### 3.1.3 Anfärbung von $\alpha$ -Kristallin

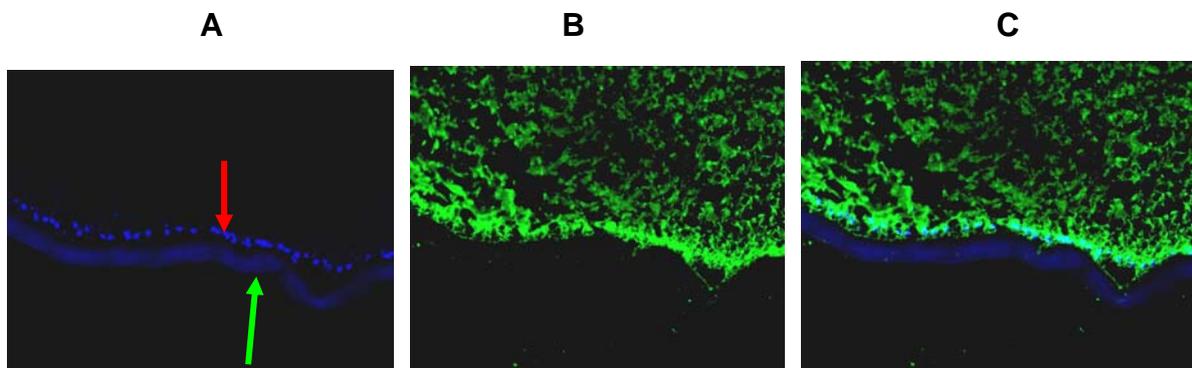
Kristalline sind lösliche Strukturproteine der Linse und machen über 90% des Proteingehalts der Linse aus. Ihre Funktion besteht darin auf der einen Seite durch ihre „Verpackung“ der Linse die optimale optische Transparenz zu geben und auf der anderen Seite die Linse vor phototoxischen Einwirkungen während des ganzen Lebens zu schützen. In Bezug auf diese antioxidierende Wirkung sind sie den sog. Hitzeschockproteinen sehr ähnlich, da sie cytoprotektiv wirken. Ihr Molekulargewicht (MG) ist dem MG von Hitzeschockproteinen vergleichbar. Man unterteilt die Kristalline in drei wesentliche Gruppen, die sich nicht nur in der Molekulargröße, sondern auch in der Funktion unterscheiden. Das  $\alpha$ -Kristallin hat ein MG von ca. 28 bis 30 Kilodalton (KD) und wird als typisches zellprotektives Protein angesehen. Es lagert sich im Zytoskelett von Zellen zwischen anderen Proteinen und schützt sie im Falle von oxidativem Stress vor Aggregation und Abbau. Aus diesem Grund wird das  $\alpha$ -Kristallin häufig mit dem Hitzeschockprotein 27 synonym verwendet. Alpha-Kristallin wurde inzwischen auch außerhalb der Linse beschrieben und hat in anderen Zellen eine ähnliche Funktion.



**Abb. 9:** Expression des  $\alpha$ -Kristallins in der embryonalen Affenlinse: A) DAPI-Anfärbung der Zellkerne des Linsenepithels in der anterioren Linse (roter Pfeil) sowie der als Hintergrund angefärbten anterioren Kapsel (roter Pfeil). B) Anfärbung des  $\alpha$ -Kristallins (grün) zeigt eine deutliche Expression im Epithel und in der Rinde. Die Kapsel bleibt völlig ungefärbt. C) Überlagerte Fluoreszenz von A und B zeigt die Beziehung von Epithel, Kapsel und Lokalisation des  $\alpha$ -Kristallins. D) Stärkere Vergrößerung zeigt das DAPI-positive Linsenepithel. E) Die gleiche Aufnahme mit der epithelialen und corticalen Expression von  $\alpha$ -Kristallin. F) Überlagertes Bild von D und E, um die anatomischen Verhältnisse zu zeigen.

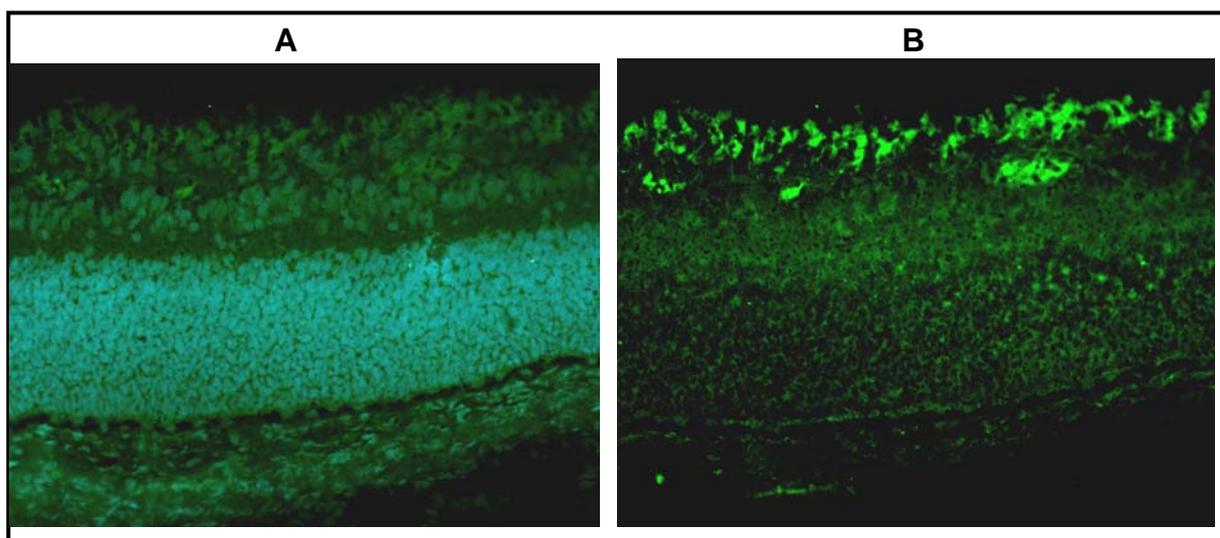
Wie die Abbildung 9 zeigt, ist  $\alpha$ -Kristallin sehr stark in der Linse des Affenembryos exprimiert. Das Protein ist hauptsächlich in der Linsenrinde, im Epithel und im Linsenkern lokalisiert. In der neonatalen und juvenilen Linse des Affen sowie in der adulten humanen Linse zeigt  $\alpha$ -Kristallin ein ähnliches Verteilungsmuster wie in der embryonalen Linse. Aus diesem Grunde werden die späteren Aufnahmen aus der Affenlinse nicht dem Text beigelegt. Die Abbildung 10 zeigt die Expression von Alpha-Kristallin in der humanen Linse. Dieses Kristallin scheint also in Embryonalstadien das endgültige adulte Expressionmuster zu erreichen, so dass in späteren Stadien lediglich quantitative Veränderungen stattfinden, die man allerdings mit immunohistochemischen Methoden nicht nachweisen kann.

Die Tatsache, dass  $\alpha$ -Kristallin sowohl ein zelluläres Protein in den Epithelen als auch ein Bestandteil der corticalen Fasern ist, weist auf seine immense Bedeutung für gesamte Linse hin.



**Abb. 10:** Expression des  $\alpha$ -Kristallins in der adulten menschlichen Linse: A) DAPI-Anfärbung der Zellkerne des Linsenepithels in der anterioren Linse (roter Pfeil) sowie der als Hintergrund angefärbten anterioren Kapsel (roter Pfeil). B) Anfärbung des  $\alpha$ -Kristallins (grün) zeigt eine deutliche Expression im Epithel und in der Rinde. Die Kapsel bleibt völlig ungefärbt. C) Überlagerte Fluoreszenz von A und B zeigt die Beziehung von Epithel, Kapsel und Lokalisation des  $\alpha$ -Kristallins.

Außer der Linse wird Alpha-Kristallin sehr deutlich in der Retina und dort spezifisch in den Ganglienzellen exprimiert. Diese Expression ist spezifisch für das embryonale Auge. In der neonatalen Retina sowie in der juvenilen Retina und in adulten Stadien sowohl der Affen als auch der humanen Retina ist Alpha-Kristallin nicht nachweisbar (Abbildung 11).

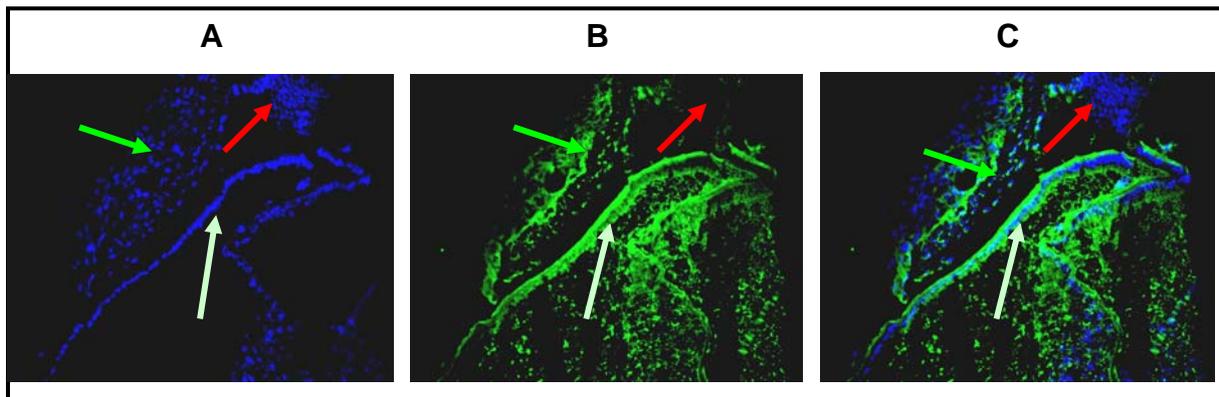


**Abb. 11:** Die transiente Expression von  $\alpha$ -Kristallin in den Ganglienzellen der embryonalen Affenretina: A) Doppelfärbung mit DAPI und Antikörper gegen Alpha-Kristallin, um die Schichtung der Retina darzustellen. B) Die grüne Kristallinfärbung ist nur in den Ganglienzellen (oberste Schicht) lokalisiert.

### 3.1.4 Expression und Verteilung von $\beta$ - und $\gamma$ -Kristallinen

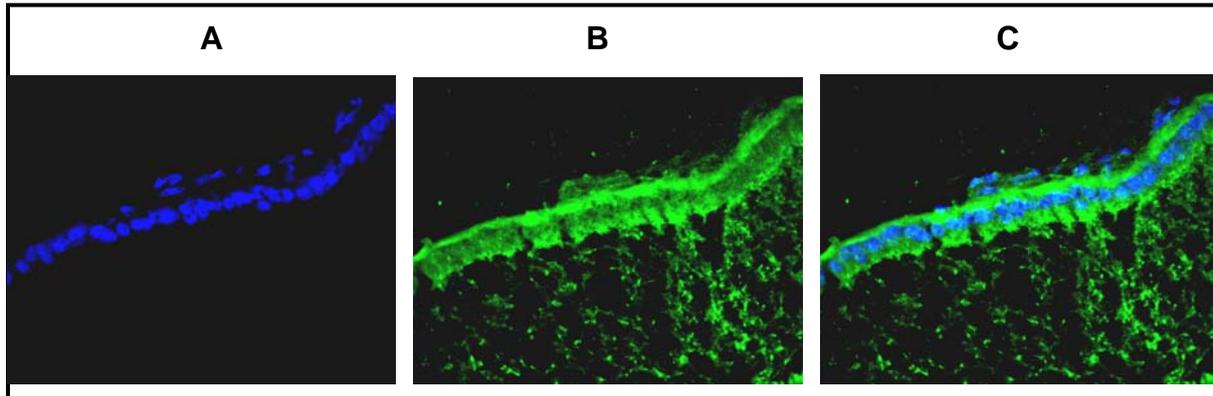
Kristalline der Beta-Familie sind auch lösliche Strukturproteine der Linse. Im Gegensatz zu den  $\alpha$ -Kristallinen ist jedoch ihre Funktion noch nicht im Detail verstanden, obwohl man auch für sie eine antioxidative Funktion angenommen wird. In der molekularen Auftrennung von lentalen Kristallinen bildet  $\beta$ -Kristallin einen Peak bei ca. 25 KD und ist somit dem Hitzeschockprotein HSP25 relativ nah. Man unterteilt die  $\beta$ -Kristalline in mehrere Isoformen, die sich nicht nur in der Molekulargröße, sondern auch möglicherweise in der Funktion unterscheiden. Beta-Kristallin ist wasserlöslich. Es besitzt eine große Homologie zum  $\gamma$ -Kristallin und wird deshalb häufig in einer sog. Beta-Gamma-Superfamilie angesehen.

In der embryonalen Affenlinse findet man  $\beta$ -Kristallin hauptsächlich im Linsencortex und im Linsenepithel. Außerdem findet sich eine starke Anfärbung im Bereich der Iris. Der Ziliarkörper zeigt kein eindeutiges Signal von  $\beta$ -Kristallin (Abbildung 12).



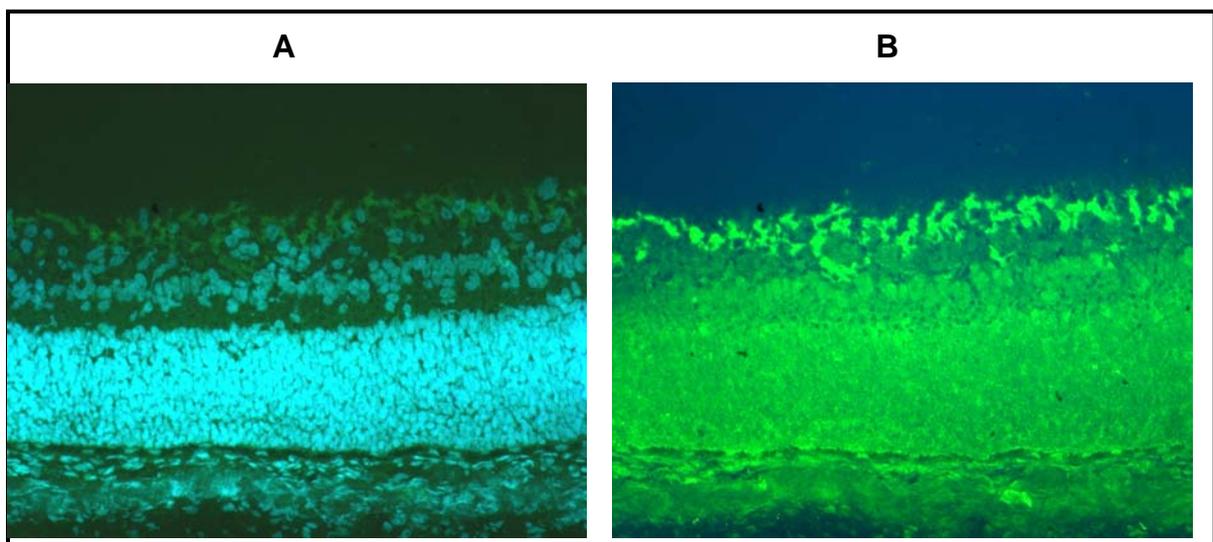
**Abb. 12:** Anfärbung des  $\beta$ -Kristallins in der Linse, Iris und Ziliarkörper: A) DAPI-Markierung aller Zellkerne. Roter Pfeil: Ziliarkörper, grüner Pfeil: Iris und grauer Pfeil: Linsenepithel. B) Darstellung der  $\beta$ -Kristallinverteilung. Während das Linsenepithel, die Iris und das Linseninnere (Fasern) sich anfärben, bleibt der Ziliarkörper ungefärbt. C) Überlagerung der Aufnahmen von A und B.

Das  $\gamma$ -Kristallin zeigt eine sehr ähnliche Verteilung, wie die Abbildung 13 zeigt. Insbesondere ist das  $\gamma$ -Kristallin intrazellulär in den Linsenepithelzellen zu finden und zeigt dort bei stärkerer Mikroskopvergrößerung eine etwas „körnige“ Verteilung. Man findet aber  $\gamma$ -Kristallin auch in den jungen Sekundärfasern des Linsencortex.



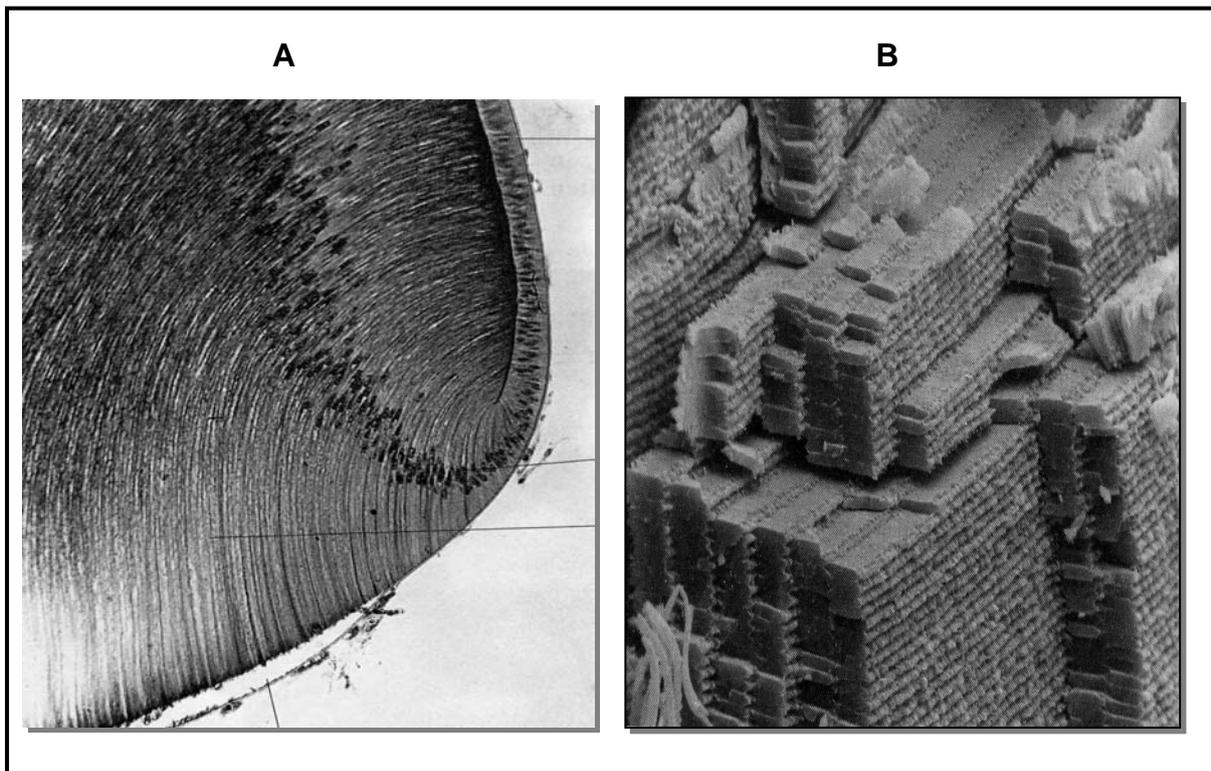
**Abb. 13:** Fluoreszenzaufnahmen zur Verteilung von  $\gamma$ -Kristallin im Linsenepithel und im Cortex: A) DAPI-Färbung. B) Gamma-Kristallinfärbung zeigt die deutliche granuläre Verteilung von Kristallin im Zytoplasma der Epithelzellen. C) Überlagerte Aufnahmen von A und B.

Auch  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kristalline finden sich im Auge außerhalb der Linse wie im Falle von  $\beta$ -Kristallin in der Iris. Gamma-Kristallin findet sich aber auch in der embryonalen Retina, in der es diffus in der äußeren plexiformen Schicht der Photorezeptoren verteilt ist (Abbildung 14). Eine sehr starke Expression findet man aber auch in den Ganglienzellen (Abbildung 14). Beta-Kristallin wurde in der embryonalen Affenretina nicht gefunden.



**Abb.14:** Darstellung von  $\gamma$ -Kristallin in der embryonalen Affenretina: A) DAPI-Anfärbung der Zellkerne in der gesamten Retina. B) Gamma-Kristallinfärbung stellt die Ganglienzellen (oben) sehr deutlich dar. Zusätzlich ist eine diffuse Anfärbung in der Photorezeptorenschicht zu sehen.

Zusammenfassend lässt sich bezüglich der drei Hauptklassen von Kristallinen feststellen, dass sie bereits in der embryonalen Linse, aber auch in weiteren okulären Geweben zu finden sind. Sie sind aber hauptsächlich im Linsenepithel, im Äquator der Linse und im Linsenkortex sehr stark vertreten. Die Abbildung 15B zeigt eine ultramikroskopische Aufnahme, die die Vorstellung der Kristallinverpackung in der Linse wiedergibt.



**Abb. 15:** A) Histologische Übersicht des äquatorialen Bereichs der Linse mit deutlicher Darstellung des Epithels und der sich teilenden und elongierenden Sekundärfasern. B) Die „Verpackung“ von Kristallinen in der Linse ist hochgeordnet (nach Naumann, 1996).

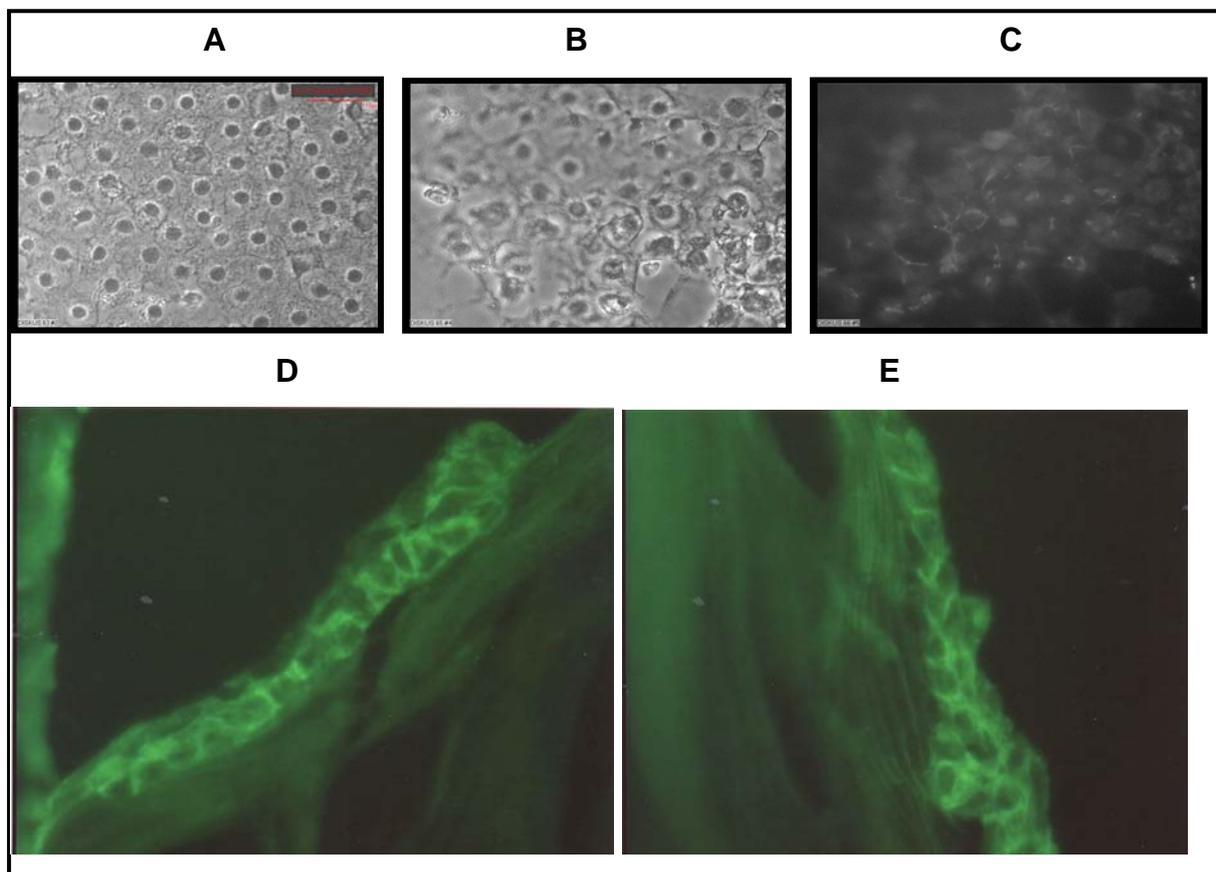
Im Auge des neugeborenen Affen sind die Verteilungen der Kristalline in der Linse den beschriebenen Verteilungen im Embryo sehr ähnlich. Es bestehen jedoch quantitative Veränderungen wie sie in den tabellarischen Zusammenfassungen zu sehen sind. Auch außerhalb der Linse findet man deutliche Verschiebungen von Kristallinexpression. Alpha- und Gamma-Kristalline werden zum Beispiel nur in der embryonalen Retina transient exprimiert und sind später nicht mehr anfärbbar (Tab. 3). Auf der anderen Seite wird im neugeborenen, juvenilen und adulten Affenauge die Expression von  $\alpha$ -Kristallin in der Iris, im Ziliarkörper und vor allem im cornealen Epithel zu. Auch  $\beta$ -Kristallin zeigt eine Verschiebung im Expressionsmuster bei der Reifung der Linse.

## 3.2 Expression von Überlebensfaktoren und Kristallinen in der adulten menschlichen Linse im Vergleich zur Affenlinse

### 3.2.1 Expression von BCL-2

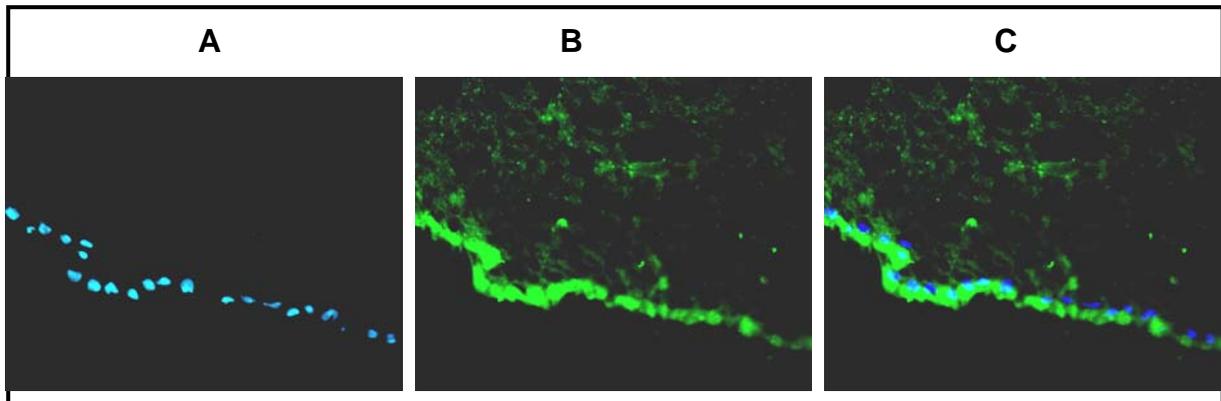
Das ubiquitär vorkommende Protein findet man auch im Epithel von humanen Linsen. Das Molekül wurde in der Linse noch nicht ausreichend untersucht, es war aber damit zu rechnen, dass Linsenepithelzellen BCL-2 exprimieren. Es zeigte sich tatsächlich, dass in humanen Augenschnitten verschiedene okuläre Zellen das Protein exprimieren.

Wie die Abbildung 16 zeigt ist BCL-2 deutlich in den Linsenepithelzellen zu finden. Alle weiteren Linsenteile zeigen keine BCL-2 Expression.



**Abb. 16:** BCL-2 Expression im humanen Linsenepithel: A) Linsenhäutchen-Präparat nach Kataraktoperation und Kapsulorhexis. Man erkennt die polygonalen Epithelzellen in der Phasenkontrastaufnahme. B) Phasenkontrastaufnahme eines Epithels, das für Immunofärbung mit Antikörpern gegen BCL-2 verwendet wurde. C) das gleiche Präparat nach Immunfärbung mit deutlicher Darstellung der BCL-2-positiven Zellen im Epithel. D, E) Histologischer Schnitt durch zwei humane Linsenepithelien mit deutlicher Anfärbung von BCL-2 in allen Epithelzellen. Das Protein ist ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert und die Zellkerne bleiben frei (dunkel).

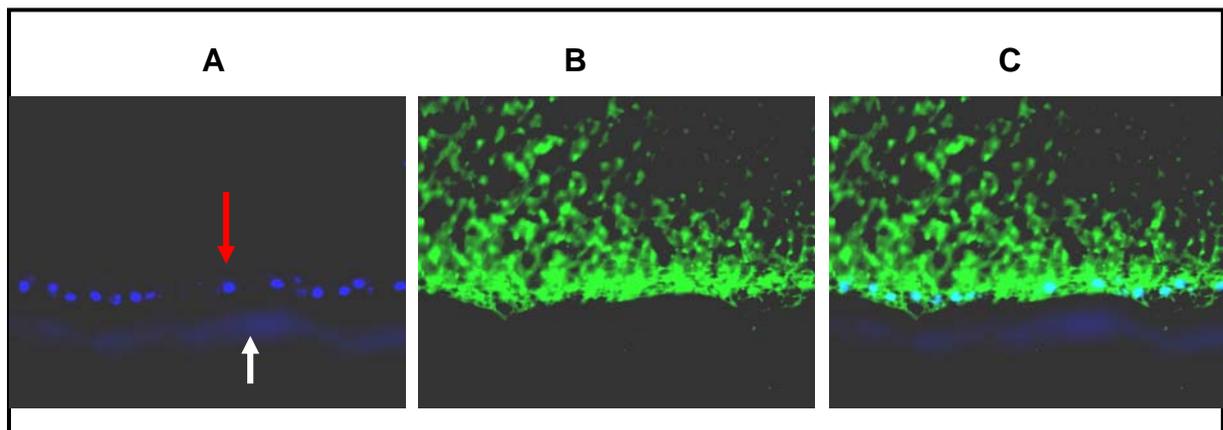
Im Vergleich dazu ist das BCL-2 in der adulten Affenlinse sehr ähnlich exprimiert und zeigt eine strenge Lokalisation im Linsenepithel (Abbildung 17).



**Abb. 17:** BCL-2 Expression im Linsenepithel der adulten Affenlinse: A) DAPI-Färbung der Epithelzellkerne. B) Immunofärbung mit dem Ant-BCL-2 Antikörper. C) Überlagertes Bild von A und B zeigt die fast ausschließliche Lokalisation im Epithel und in wenigen darunter liegenden Sekundärfasern.

### 3.2.2 Expression von Alpha-Kristallin

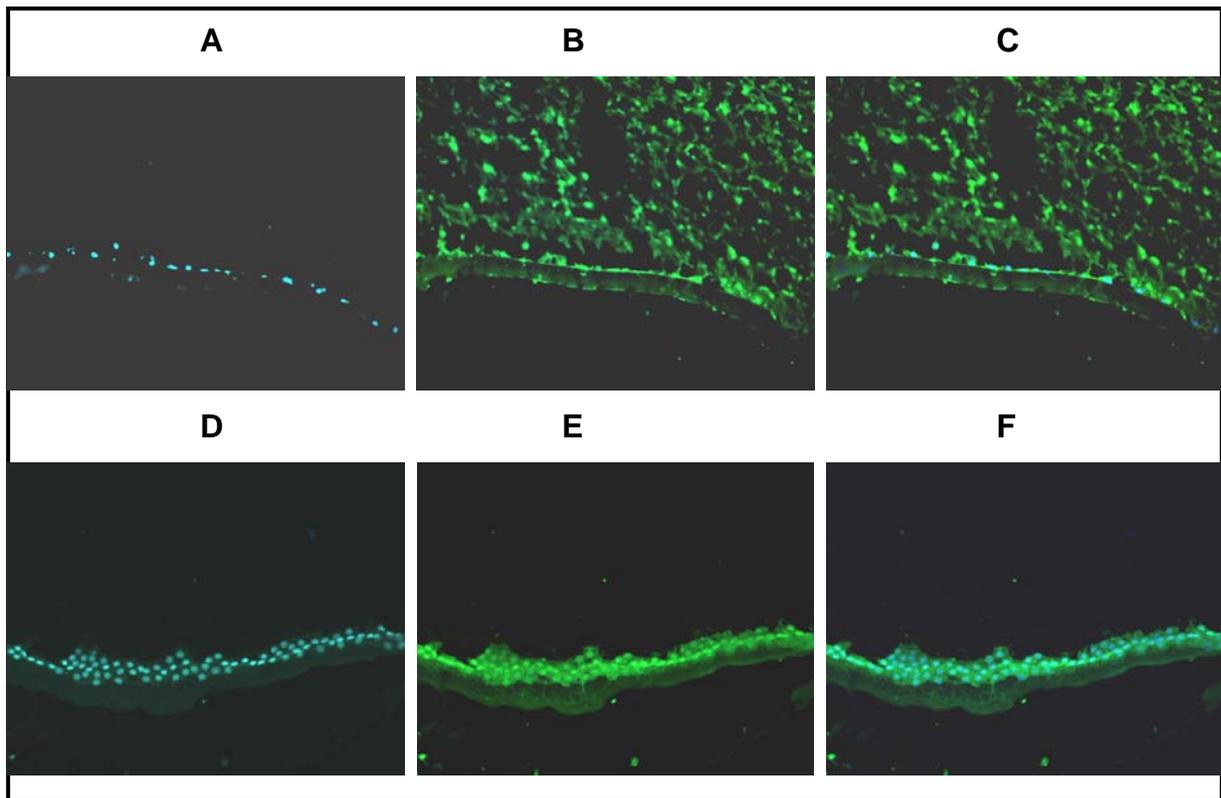
Alpha-Kristallin ist in der adulten menschlichen Linse exprimiert (Abbildung 10). In der erwachsenen Affenlinse zeigt  $\alpha$ -Kristallin eine sehr ähnliche Verteilung und ist vorwiegend im Epithel und im Kortex der Linse lokalisiert (Abbildung 18).



**Abb. 18:** Expression des  $\alpha$ -Kristallins in der adulten Affenlinse: A) DAPI-Anfärbung der Zellkerne des Linsenepithels in der anterioren Linse (roter Pfeil) sowie der als Hintergrund angefarbten anterioren Kapsel (weisser Pfeil). B) Anfärbung des  $\alpha$ -Kristallins (grün) zeigt eine deutliche Expression im Epithel und in der Rinde. Die Kapsel bleibt völlig ungefärbt. C) Überlagerte Fluoreszenz von A und B zeigt die Beziehung von Epithel, Kapsel und Lokalisation des  $\alpha$ -Kristallins.

### 3.2.3 Beta- und Gamma-Kristalline

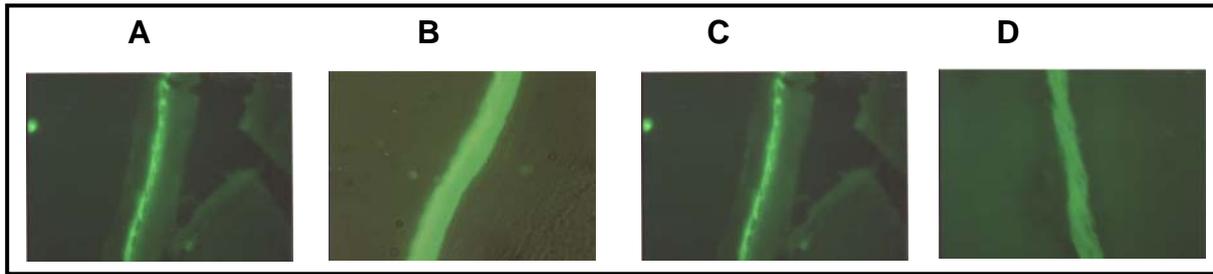
Beide Kristalline sind in der adulten humanen Linse exprimiert und zeigen eine sehr ähnliche Verteilung wie bei der adulten Affenlinse. Die Abbildung 19A-C zeigt die Färbung von  $\beta$ -Kristallin, während die Abbildung 19D-F die Verteilung von  $\gamma$ -Kristallin in der humanen Linse darstellt.



**Abb. 19:** A-C) Anfärbung von  $\beta$ -Kristallin in der adulten humanen Linse zeigt eine epitheliale und kortikale Verteilung. D-F) Anfärbung von  $\gamma$ -Kristallin in der adulten humanen Linse zeigt eine ausschließliche epitheliale Lokalisation und unterscheidet sich wesentlich von der Verteilung des  $\beta$ -Kristallins.

### 3.2.4 Expression von Extrazellulärmatrixmolekülen

Extrazellulärmatrix findet sich hauptsächlich in der Linsenkapsel. Als Beispiele für solche Moleküle wurden Kollagen IV, Kollagen II, Fibronectin und Laminin dargestellt. Es zeigte sich, dass in allen Stadien der Affenentwicklung die Kapsel alle untersuchten Moleküle exprimiert. Als Beispiele für die Dokumentation wurden deshalb humane Kapseln angefärbt, die eine starke Anfärbung für alle untersuchten Moleküle zeigten (Abbildung 20).

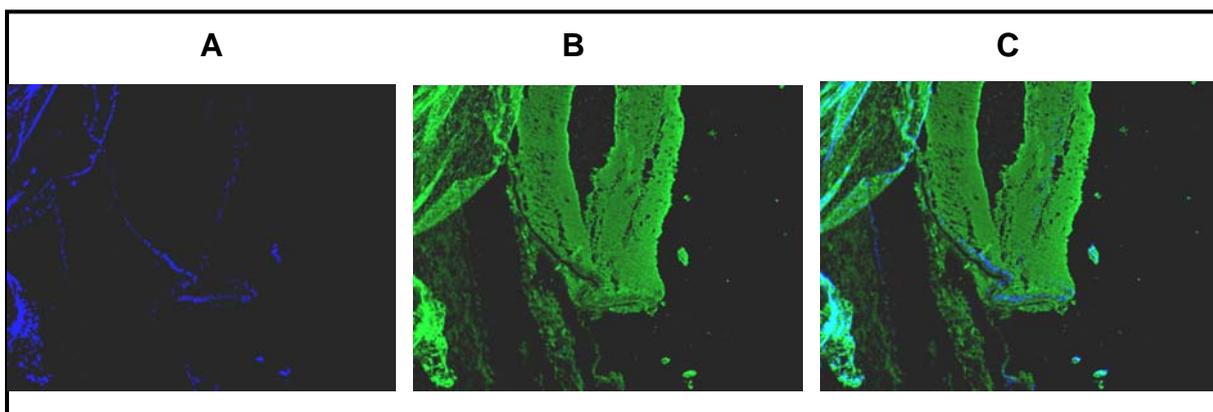


**Abb. 20:** Extrazellulärmatrixmoleküle in der humanen Kapsel: A) Kollagen IV. B) Kollagen II. C) Fibronectin. D) Laminin.

Proteine der Extrazellulärmatrix besitzen zelluläre Rezeptoren, an die sie binden und mit den Zellen kommunizieren. Man kennt eine Reihe solcher Rezeptoren, die mehr oder weniger spezifisch sind. Sie sind dimere membrangebundene Proteine, die aus jeweils einer Alpha- und einer Beta-Kette bestehen. Da es unterschiedliche Alpha- und Beta-Ketten gibt, wird die Spezifität der Bindung durch die Kombination der Monomere miteinander bestimmt. Die Befunde diesbezüglich werden tabellarisch zusammengefasst.

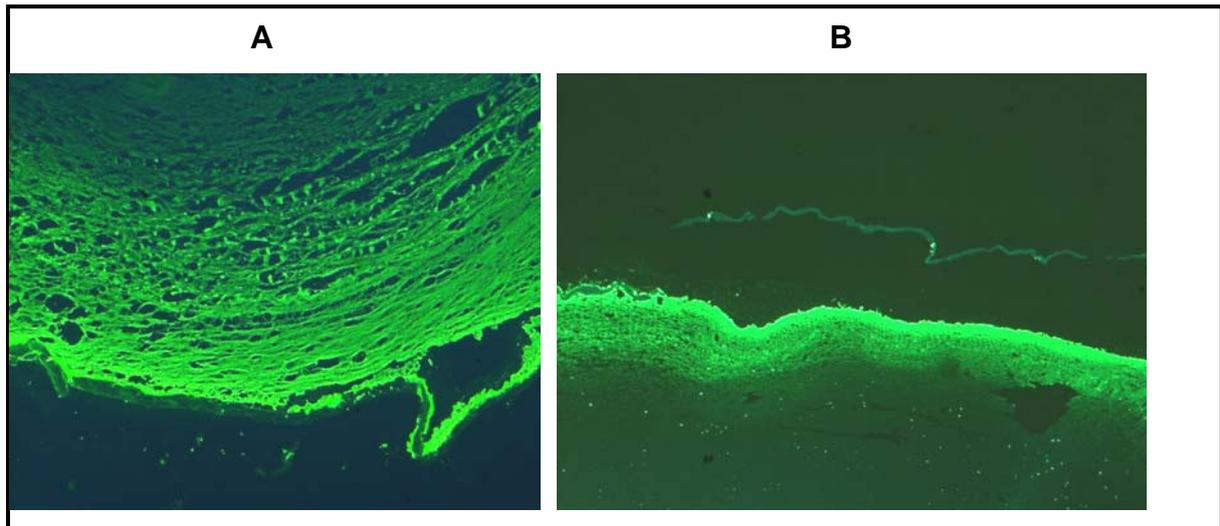
### 3.2.5 Vimentin

Das Zytoskelettprotein Vimentin ist in der embryonalen Affenlinse exprimiert. Wie die Abbildung 21A-C zeigt, ist Vimentin über die gesamte embryonale Linse gleichmäßig verteilt.



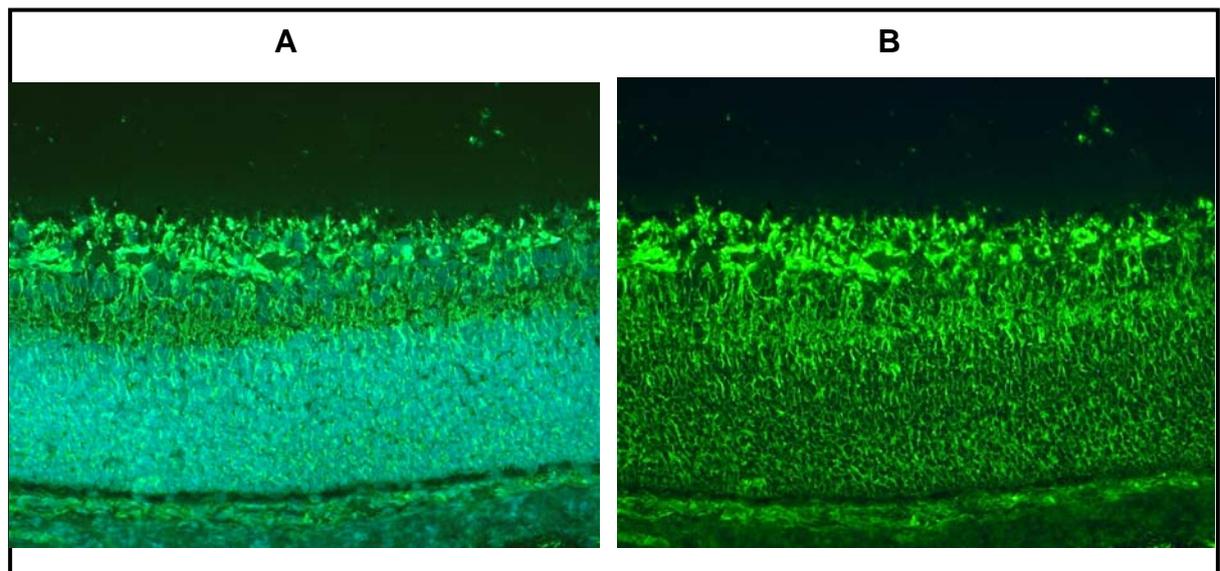
**Abb. 21:** Embryonale Vimentinexpression in der embryonalen Linse: A) DAPI-Zellkernfärbung. B) Vimentinfärbung. C) Überlagertes Bild aus A und B.

In der adulten Linse sowohl des Affen als auch des Menschen ist Vimentin in der peripheren Linse lokalisiert. Mit zunehmender Verlagerung zum Zentrum nimmt die Expression von Vimentin stark ab (Abbildung 22).



**Abb. 22:** Expression von Vimentin in zwei humanen Linsen: A) im äquatorialen Bereich. B) im anterioren Bereich. In allen Linsengebieten ist das Protein nur im Randbereich der Linse exprimiert.

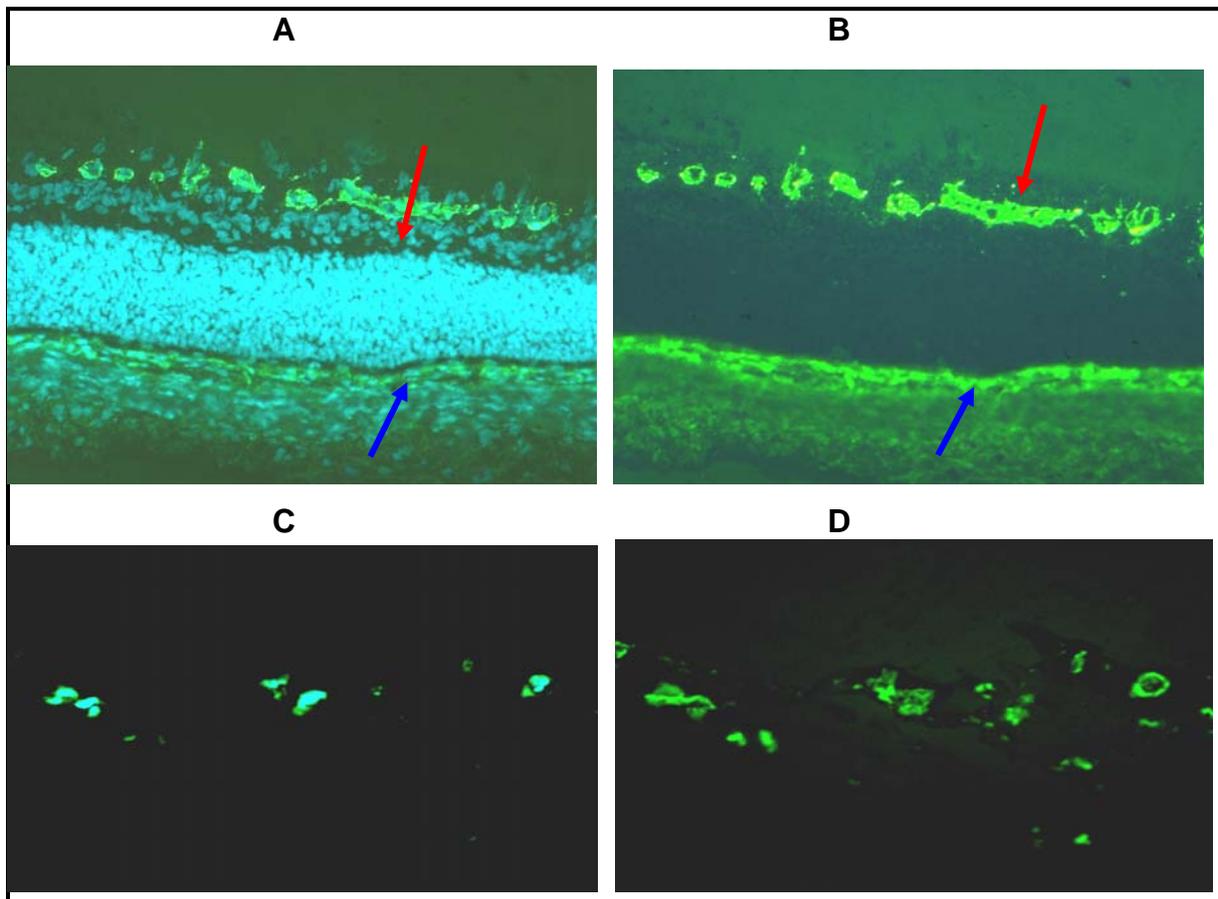
Die Funktion des Vimentins in diesem Bereich der Linse ist nicht klar. Es ist aber anzunehmen, dass das Protein zu einer Stabilisierung des Zytoskeletts von Epithelzellen und jungen Sekundärfasern beiträgt. Für diese Hypothese spricht auch die Tatsache, dass in der Retina sowohl des Affen als auch des Menschen Vimentin in den Müllerzellen exprimiert wird, die für ihre Stützfunktion im retinalen Gewebe verantwortlich sind. Die Abbildung 23 zeigt diese Expression in der Retina, die bezüglich der Farbintensität der lentalen Färbung ähnelt.



**Abb. 23:** Expression von Vimentin in der Retina des Affen: A) Überlagertes Bild aus DAPI- und Vimentinfärbung. B) Lokalisation von Vimentin vorwiegend in den Astrozyten (oben) und in den Müllerschen Stützzellen, die länglich durch die gesamte Retina ziehen.

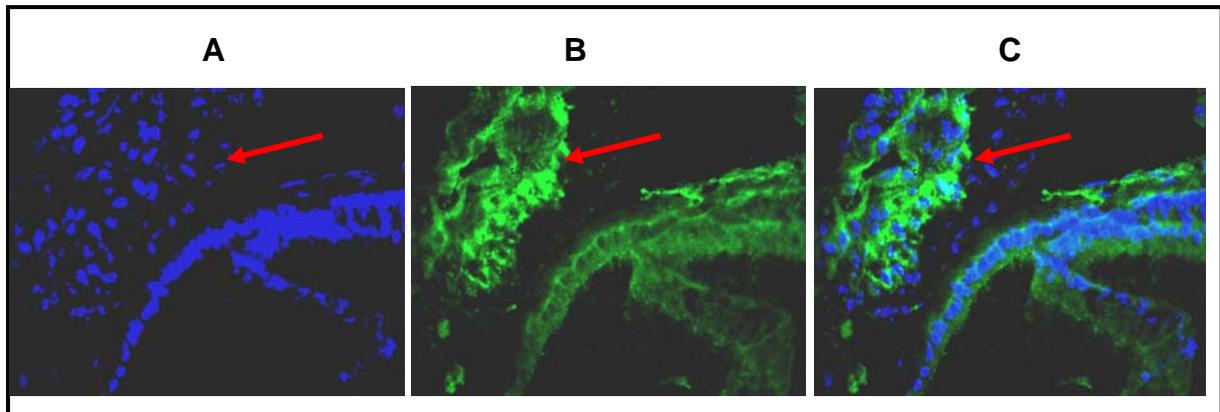
### 3.2.6 Fibronektin

Bei diesem Protein handelt es sich auch um ein zellstabilisierendes Extrazellulärmatrixmolekül, das man vorwiegend in Basalmembranen findet wie z. B. in der Linsenkapsel aller untersuchten Stadien (Abb. 20). Interessanterweise ist Fibronektin sehr spezifisch in Gefäßkapillaren zu finden, wo es vermutlich für die Stabilität der Kapillarwand mitsorgt. In der humanen Linse kommt Fibronektin bis auf die vordere Kapsel nicht vor. Im Affenauge findet man das Protein sowohl im Bereich der retrolentalen Kapillaren in der embryonalen Linse und in den retinalen Gefäßen (Abb. 24). Außerdem findet man eine deutliche Fibronektinexpression in den Gefäßenden Chorioidea (Abb. 24) und im Ziliarkörper. In der adulten Linse findet man kein Fibronektin mehr. Eine ähnliche Lokalisation zeigt der zelluläre Fibronektinrezeptor, der in allen Stadien in Gefäßen der Retina, der Chorioidea und des Ziliarkörpers zu finden ist.



**Abb. 24:** Expression von Fibronektin im embryonalen Affenauge: A) Doppelfärbung mit DAPI und Fibronektin. B) Fibronektinfärbung zeigt eine sehr spezifische Färbung in den präretinalen Gefäßkapillaren (roter Pfeil) und in den chorioidalen Gefäßen (blauer Pfeil). Die restliche Retina bleibt völlig ungefärbt. C) DAPI- und Fibronektinfärbung im retrolentalen Bereich. D) Fibronektinfärbung zeigt die selektive Anfärbung von Gefäßzellen und Kapillaren in diesem Bereich.

Expression des Fibronektinrezeptors: Er ist in den Geweben exprimiert, in denen auch Gefäße zu finden sind und vor allem im Ziliarkörper (Abbildung 25).



**Abb. 25:** Expression des Fibronektinrezeptors vor allem im gefäßreichen Ziliarkörper des embryonalen Affen Auges (roter Pfeil). A) DAPI, B) Rezeptorfärbung (roter Pfeil ist Ziliarkörper).

### 3.3 Tabellarische Zusammenfassung der Proteinexpressionsdaten

Tabelle 1: Proteinexpression im embryonalen Affenauge

Antigen:	Augenteil:							Bemerkung
	Retina	Choro-idea	Ziliar-körper	Lisen-epithel	Linse	Iris	Cor-nea	
$\alpha$ -Kristallin	+++*	-	-	++	+++	-	-	*In retinalen Ganglienzellen
$\beta$ -Kristallin	-	-	(+)	(+)	++*	-	-	*Linsenkortex
$\gamma$ -Kristallin	++*	-	-	(+)	+++*	-	+	*RGC **Cortex
BCL-2	+	-	-	-	-	-	-	RGC
GAP-43	++++	-	(+)	(+)	-	(+)	-	RGC
Fibronektin	++++*	++	++	(+)*	-	+	+**	*Gefäße **diffus
Fibronektin-rezeptor	+*	+*	+*	-	-	+*	-	*Gefäße
Laminin-1	-	-	-	++*	+**	-	-	*kapsel **subkaps
Vimentin	++++	+	++	+	++++	-	-	

Die semiquantitativen Auswertungen aus der Expression von Proteinen im Auge des embryonalen Affen am Ende der embryonalen Differenzierung zeigen eine gewebespezifischen Verteilung. Während Alpha- und Gamma-Kristalline sehr prominent in den retinalen Ganglienzellen und im Linsenepithel zu finden sind, ist Beta-Kristallin

nur im Linsenepithel, im Linsenkortex und im cornealen Epithel exprimiert. Auch BCL-2 und GAP-43 sind eher in der Retina lokalisiert, wobei der Ziliarkörper eine gewisse positive Färbung für GAP-43 zeigt. Die diffuse Verteilung von Fibronectin in der Linse, im Ziliarkörper und in der Chorioidea zeigt, dass dieses Protein dort eine untergeordnete Rolle spielt. Es spielt auch in der Neuroretina eine untergeordnete Rolle denn es wird dort nicht lokalisiert, bis auf die Gefäßwände, die eine deutliche Anfärbung zeigen. Der entsprechende Rezeptor von Fibronectin ist wie erwartet auch in den Gefäßen lokalisiert. Interessanterweise findet man Fibronectin auch in retrolentalen Gefäßzellen der embryonalen Affenlinse, was darauf hinweist, dass dieser Augenbereich in der Embryonalentwicklung vaskularisiert wird. Die Verteilung von Laminin in der Kapsel und im subkapsulären Bereich ist in Übereinstimmung dieses Proteins mit seiner komplexen Funktion in der Extrazellulärmatrix. Das Vimentin wird wie erwartet sehr stark in den retinalen Gliazellen (Müllerzellen und Astrozyten) sowie in der Chorioidea, im Ziliarkörper, im Linsenkortex und im Epithel lokalisiert. Seine Funktion besteht wahrscheinlich darin die Linse zu stabilisieren.

Bei der Geburt sind die wesentlichen Differenzierungsvorgänge abgeschlossen (Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Proteinexpression im neugeborenen Affenauge

Antigen:	Augenteil:							Bemerkung
	Retina	Chorioidea	Ziliarkörper	Linsenepithel	Linse	Iris	Cornea	
$\alpha$ -Kristallin	-	+	+	++*	++++	(+)	++**	*subkaps. **Epithel
$\beta$ -Kristallin	-	-	-	(+)	++	-	+	*Epithel
$\gamma$ -Kristallin	-	-	-	(+)	+++*	-	+**	*Kern **Epithel
BCL-2	-	-	-	++*	++**	-	-	*subkaps. **Fasern
GAP-43	+	-	-	++	++**	-	+***	*RGC **Fasern ***Epithel
Fibronectin	+	+	+++*	-	-	-	-	*Gefäße
Fibronectinrezeptor	+	+	+	-	-	-	+**	*Gefäße **Epithel
Laminin-1	-	-	(+)	++*	-	(+)	++	+Kapsel
Vimentin	+++*	-	+	+++*	+++**	-	+++	*Müller Zellen **subepith. ***Cortex

Die untersuchten Proteine zeigten wie erwartet Verschiebungen in ihrer Expression, die in einer gewebsspezifischen Art und Weise zu sehen sind. Alpha-, Beta- und Gamma-Kristalline sind nicht mehr in den retinalen Ganglienzellen lokalisiert, sondern in der Linse selbst, im Linsenepithel, und interessanterweise im Hornhautepithel. Auch BCL-2 und GAP-43 sind nicht mehr in der Retina lokalisiert, sondern im Linsenepithel in den jungen Sekundärfasern des Äquators und im cornealen Epithel (GAP-43). Fibronectin ist in der Linse nicht mehr exprimiert und bleibt weiterhin in Gefäßen der Retina, der Chorioidea und des Ziliarkörpers beschränkt. Ähnliches gilt für den Fibronectinrezeptor, der zusätzlich im Epithel der Cornea zu finden ist. Die Verteilung von Laminin in der Kapsel und im subkapsulären Bereich ist in Übereinstimmung dieses Proteins mit seiner komplexen Funktion in der Extrazellulärmatrix. Das Vimentin wird wie erwartet sehr stark in den retinalen Gliazellen (Müllerzellen und Astrozyten) sowie im Ziliarkörper, im Linsenkortex und im Epithel lokalisiert. Seine Funktion besteht wahrscheinlich darin die Linse zu stabilisieren.

**Tabelle 3:** Proteinexpression im *juvenilen* Affenauge

Antigen:	Augenteil:							
	Retina	Chorioidea	Ziliarkörper	Linsenepithel	Linse	Iris	Cornea	Bemerkung
$\alpha$ -Kristallin	-	+	+	++*	++++	(+)	++**	*subkaps. **Epithel
$\beta$ -Kristallin	-	-	-	(+)	++	-	+*	*Epithel
$\gamma$ -Kristallin	-	-	-	(+)	+++*	-	+**	*Kern **Epithel
BCL-2	-	-	-	++*	++**	-	-	*subkaps. **Fasern
GAP-43	+*	-	-	++	++**	-	+***	*RGC **Fasern ***Epithel
Fibronectin	+*	+*	++*	-	-	-	-	*Gefäße
Fibronectinrezeptor	+*	+*	+*	-	-	-	+**	*Gefäße **Epithel
Laminin-1	-	-	(+)	++*	-	(+)	++	+Kapsel
Vimentin	+++*	-	+	++**	+++***	-	+++	*Müller Zellen **subepith. ***Cortex

Auf Proteinebene zeigte die juvenile Linse ein sehr ähnliches Muster wie die neonatale Linse (Tabelle 3). Alpha- Beta- und Gamma-Kristalline sind weiterhin hoch exprimiert im Linsenepithel, und interessanterweise mit zunehmender Intensität im Hornhautepithel. Auch BCL-2 und GAP-43 sind im Linsenepithel, in den jungen Sekundärfasern des Äquators und im cornealen Epithel (GAP-43) zu finden. Fibronectin ist weiterhin in den Gefäßen der Retina, der Chorioidea und des Ziliarkörpers zu sehen. Ähnliches gilt für den Fibronectinrezeptor, der zusätzlich im Epithel der Cornea zu finden ist. Die Verteilung von Laminin in der Kapsel und im subkapsulären Bereich ist in Übereinstimmung dieses Proteins mit seiner komplexen Funktion in der Extrazellulärmatrix. Das Vimentin wird unverändert in den retinalen Gliazellen (Müllerzellen und Astrozyten) sowie im Ziliarkörper, im Linsenkortex und im Epithel lokalisiert. Seine Funktion besteht wahrscheinlich darin die Linse zu stabilisieren.

**Tabelle 4:** Expression von Proteinen in der adulten Affenlinse

Antigen:	Linsenteil:				
	Linsenkapsel	Linsenepithel	subkapsulär	Linsenrinde	Linsenkern
$\alpha$ -Kristallin	-	+++	+++	+++	+++
$\beta$ -Kristallin	-	++	++++	++++	++
$\gamma$ -Kristallin	-	+++	++++	++++	++
BCL-2	-	++++	(+)	-	-
GAP-43	-	+++	++	(+)	-
Fibronectin	-	-	-	-	-
Fibronectinrezeptor	-	+	(+)	-	-
Laminin-1	++++	+	-	-	-
Vimentin	(+)	++	++++	++++	+

Die adulte Linse des Affen (Tabelle 4) sowie die humane Linse (Tabelle 5) zeigen ein sehr ähnliches Muster von Proteinverteilung wie die juvenile Linse. Neben den Kristallinen, die sehr stark gefärbt sind, findet man BCL-2 im Linsenepithel und Hornhautepithel. Möglicherweise hat dieses wichtige Überlebensprotein in diesen regenerativen Epithelien eine antiapoptotische Funktion und schützt sie vor toxischen Einwirkungen (Hornhaut) bzw. vor mechanischen Beanspruchungen (Linse). Die selektive Expression von GAP-43 im Linsenepithel und in den jungen Sekundärfasern

spricht dafür, dass dieser Linsenbereich wachstumsfähig über das ganze Leben bleibt, was ja auch morphologisch zu beobachten ist. Auch Fibronectin und sein Rezeptor bleiben sowohl in der Affenlinse als auch in der humanen Linse unverändert exprimiert. Gleiches gilt für das Laminin und das Vimentin. Ihre Lokalisation ist wahrscheinlich an der Stabilisierung der äußeren Linse gekoppelt und könnte teilweise erklären, dass mit zunehmender Nutzung im Rahmen der Akkommodation zu Veränderungen führen kann, die dann zur senilen Katarakt führen. Inwieweit die Katarakt die Folge von Nutzungserscheinungen auf zellulärer und molekularer Ebene ist, bleibt noch zu zeigen.

**Tabelle 5:** Expression von Proteinen in der adulten humanen Linse

Antigen:	Linsenteil:				
	Linsenkapsel	Linsenepithel	subkapsulär	Linsenrinde	Linsenkern
$\alpha$ -Kristallin					
$\beta$ -Kristallin	-	++	++++	++++	++
$\gamma$ -Kristallin	-	+++	++++	++++	++
BCL-2	-	++++	(+)	-	-
GAP-43	-	+++	++	(+)	-
Fibronectin	-	-	-	-	-
Fibronectin-rezeptor	-	+	(+)	-	-
Laminin-1	++++	+	-	-	-
Vimentin	(+)	++	++++	++++	+

Zusammenfassend lässt sich aus der Quantifizierung des Färbemusters in dieser Studie bestätigen, dass über die Aufschlüsselung der zellulären und molekularen Linsendifferenzierung verschiedene Linsenveränderungen wie die Katarakt und das PEX besser verstanden werden könnten. Diese Untersuchung war nicht ausschöpfend, zeigte jedoch, dass jedes Protein eine besondere Lokalisation sowie ein entwicklungspezifisches Muster aufweist, das mit seiner Funktion zusammenhängt. Die Analyse weiterer Proteine und der kodierenden Gene wird notwendig sein, um das Bild der Linsenentwicklung zu komplettieren. Der Vergleich zwischen der Affenlinse in verschiedenen Stadien und der nur in adulten Stadien erhältlichen humanen Linse liefert wertvolle Hinweise auch zur Entwicklung der humanen Linse.

## **4.0 Diskussion**

### **4.1 Allgemein**

Das Ziel dieser Studie war die histologische und immunohistochemische Analyse der Entwicklung der Linse im Hinblick auf spätere Entwicklungsstörungen und insbesondere der Katarakt im subkapsulären Bereich und des sog. Pseudoexfoliations-syndroms, das mit der Bildung von granulären Ablagerungen aus der Linse einhergeht. Dazu wurde neben der menschlichen Linse, die als histologisches Material nach Kataraktoperation zur Verfügung steht, auch Material aus Affenaugen (*C. jacchus*) verwendet (Hearn, 1987). Im Gegensatz zum menschlichen Material stand bei Affen auch Material in embryonalen und frühen postnatalen Stadien zur Verfügung (Hedrichson et al., 2006). Affenaugen wurden aus Tierkadavern aus dem Institut für Reproduktionsmedizin des UKM entnommen und bearbeitet. Es wurden sowohl aus menschlichen Augen als auch aus Affenaugen Schnitte bearbeitet, die entlang der Augenachse entstanden sind und die wesentlichen Augengewebe zeigen.

Es wurden Unterschiede im immunhistochemischen Verhalten von embryonalen, neugeborenen, juvenilen und adulten Affenaugen mit adulten humanen Augen untersucht und miteinander verglichen. Man geht jedoch davon aus, dass die Entwicklung des menschlichen Auges sehr ähnlich verläuft (Mann, 1964). Die gängigen Proteine der Extrazellulärmatrix (Kollagene, Laminin, Fibronectin) konnten - wenn auch in etwas veränderter Intensität - in beiden Gruppen gefunden werden. Weiter wurden überlebensassoziierte Faktoren (BCL-2 und GAP-43) im Linsenkapsel-epithel untersucht. In beiden Gruppen waren beide Faktoren unverändert exprimiert. Die Ergebnisse stützen die Hypothese, dass mit zunehmendem Alter die Elastizität des Kapsel-Epithelkomplexes aufgrund von Proteinabnormalitäten durch akkommodativen Verschleiß abnimmt. Dadurch entstehen Mikrorisse in der Kapsel und in den subkapsulären Fasern, die zur Eintrübung der Linse und zur Exfoliation von Proteinen (granuläres Material) führen.

### **4.2 Proteinexpression während der Entwicklung der Linse**

Unser Verständnis zur Linsenentwicklung ist Voraussetzung für eine profunde Analyse von molekularen und zellulären Mechanismen, die zu bestimmten Altersveränderungen führen. Es ist interessant, dass das anti-apoptotische Molekül BCL-2 nicht in der Embryonallinse zu detektieren ist. Auf der anderen Seite ist es von Bedeutung,

dass BCL-2 wohl in der Retina des dreimonatigen Embryos zu finden ist, wohl als Zeichen dafür, dass apoptotische Vorgänge in der Retina zeitlich anders verlaufen als in der Linse. Insbesondere ist dabei zu betonen, dass die BCL-2 Expression in den retinalen Ganglienzellen mit der Differenzierung und Reifung dieser Zellen und ihrer Verbindungen im Gehirn einhergeht. Dafür spricht auch die sehr starke Expression von GAP-43 in den Ganglienzellen und weniger im lentikulären Epithel der Embryonallinse. Der primäre Augenvesikel bildet sich am 22. Gestationstag und es kommt zur induzierenden Bildung der Linse durch zelluläre Interaktionen zwischen dem sich ausstülpenden prosencephalen Neuralrohr und dem darüber liegenden Ektoderm. Es kommt rasch zur morphologischen Verdickung und Differenzierung der prospektiven Linsenplakode, die sich später einstülpen wird, um die embryonale Linse zu bilden (Coulombre and Coulombre, 1969; Marschal et al., 1982). Dass der Kontakt zwischen Neuralrohr und Ektoderm für die Linsenentwicklung entscheidend ist, zeigt sich im Ergebnis: Bleibt dieser Keimblätterkontakt aus, so bildet sich eine Aphakie. Dass die Linse ektodermalen Ursprungs ist, zeigt sich in der lebenslang zu beobachtenden Beteiligung der Linse an generalisierten Hauterkrankungen. Die Linsenplakode oder Linsenanlage ist zunächst am 22. Gestationstag einschichtig, jedoch mikroskopisch erkennbar verdickt gegenüber dem restlichen, nicht induzierten Ektoderm. Durch die grubenförmige Einstülpung der Linsenplakode formiert sich die nach außen konkave Linsengrube, aus der sich ein Linsenbläschen entsteht. In der weiteren Differenzierung stellt sich auf der einen Seite eine regressive Abschnürung von Epithelzellen und auf der anderen Seite werden zwischen Linsenblase und oberflächlichem Epithel erste phagozytotische Zellen beobachtet (Cuadros et al., 1991). Interessanterweise findet man in der Embryonallinse eine verstärkte Expression von Kristallinen und von Proteinen der Extrazellulärmatrix wie Laminin und Fibronectin. Ihre unterschiedliche zelluläre Lokalisation zeigt allerdings, dass sowohl die verschiedenen Kristalline als auch die Extrazellulärmatrix-Proteine unterschiedliche Funktionen während der Differenzierung haben.

#### **4.3 Differenzierungsprozesse und Bildung des Linsenepithels, der Linsenkapsel und der Linsenfasern**

Die solide Auffüllung der Linse ist am Ende der 4ten Embryonalwoche beendet und es entsteht der Embryonalkern. Ab diesem Stadium beschränkt sich die Bildung neuer Fasern auf die Teilung von Epithelzellen an der Äquatorialzone. Die Anlagerung

neuer Fasern geschieht appositionell, d. h. schichtweise außen an bereits vorhandene Fasern, die dadurch nach zentral verlagert erscheinen. Dabei verlieren die zentralwärts geschobenen Fasern ihre Zellkerne und tragen damit zur homogenen optischen Transparenz des Linsenkerns bei. Bei diesem Vorgang des Zellkernverlustes handelt es sich um eine inkomplette Zellapoptosis, bei der nicht mehr durch Phagozytose, sondern durch Autophagie alle nichttransparenten Organellen, also auch der chromatinhaltige Zellkern abgebaut werden zugunsten der optischen Transparenzzunahme (Stupp und Thanos, 2005). Die lebhafte Zellteilung in der germinativen Äquatorialzone des Linsenepithels bleibt lebenslang erhalten und trägt zu einer stetigen Zunahme der Linsegröße. Auch die einzelnen Faserzellen (Linsenfasern), die durch die hoch geordnete Anordnung der Kristallinproteine transparent bleiben werden für eine lebenslange Funktion angelegt.

Am Ende der embryonalen Differenzierung werden die untersuchten Proteine in einer gewebsspezifischen Art und Weise exprimiert. Während  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Kristalline sehr prominent in den retinalen Ganglienzellen und im Linsenepithel zu finden sind, ist  $\beta$ -Kristallin nur im Linsenepithel, im Linsenkorax und im cornealen Epithel exprimiert. Auch BCL-2 und GAP-43 sind eher in der Retina lokalisiert, wobei der Ziliarkörper eine gewisse positive Färbung für GAP-43 zeigt. Die diffuse Verteilung von Fibronectin in der Linse, im Ziliarkörper und in der Chorioidea zeigt, dass dieses Protein dort eine untergeordnete Rolle spielt. Es spielt auch in der Neuroretina eine untergeordnete Rolle denn es wird dort nicht lokalisiert, bis auf die Gefäßwände, die eine deutliche Anfärbung zeigen. Der entsprechende Rezeptor von Fibronectin ist wie erwartet auch in den Gefäßen lokalisiert. Interessanterweise findet man Fibronectin auch in retrolentalen Gefäßzellen der embryonalen Affenlinse, was darauf hinweist, dass dieser Augenbereich in der Embryonalentwicklung vaskularisiert wird (Gariano et al., 1994). Die Verteilung von Laminin in der Kapsel und im subkapsulären Bereich ist in Übereinstimmung dieses Proteins mit seiner komplexen Funktion in der Extrazellulärmatrix. Das Vimentin (Bozanic et al., 2006; Kivela and Unsitalo, 1991; Sandilands et al., 1995) wird - wie erwartet - sehr stark in den retinalen Gliazellen (Müllerzellen und Astrozyten) (Distler, 1996) sowie in der Chorioidea, im Ziliarkörper, im Linsenkorax und im Epithel lokalisiert. Seine Funktion besteht wahrscheinlich darin die Linse zu stabilisieren. Allerdings tragen weitere Proteine zur Stabilisierung der Linse bei, wie z. B. Zytokeratine (Kasper and Viehbehn, 1992), die in dieser Studie nicht untersucht wurden.

Störungen der regulären Linsenentwicklung und Differenzierung gehen mit der Bildung einer angeborenen Katarakt einher. Es handelt sich um eine angeborene Missbildung, die meistens durch Infektionen während der Schwangerschaft auftreten (Röteln, Toxoplasmose, Mumps, etc.). Man vermutet aus epidemiologischen Daten der Weltgesundheitsorganisation, dass 200.000 Kinder weltweit an angeborener Katarakt erblindet sind, und dass jedes Jahr ca. 20.000 bis 40.000 Kinder mit doppelseitigen Katarakten geboren werden (Foster et al., 1997). Das vordere Linsenepithel bleibt in Kontakt mit dem Oberflächenektoderm. Später in der Entwicklung wird sich Mesenchym zwischen dem vorderen Linsenepithel und dem ektodermalen Oberflächenepithel durchschieben, aus dem sich die Hornhaut entwickelt. Die ursprünglichen basalen Anteile des Epithels werden nach außen gedrängt, und die Epithelbasalmembran wird zur Linsenkapsel (Lerche and Wulle, 1969). Das Epithel liegt als einschichtige kubische Zellschicht unter der vorderen Linsenkapsel und zeigt geschlechtsspezifische Dichtenunterschiede mit 5.780,6 Zellen/mm<sup>2</sup> bei Frauen und 5.008,6 Zellen/mm<sup>2</sup> bei Männern in einer altersangeglichenen Population (Guggenmoos-Holzmann et al., 1989). Die einzelnen Epithelzellen sind mit spezialisierten Kontakten (*Zonula occludentes* oder *gap junctions*) mit ihren Nachbarzellen verbunden, während ihre apikale Membran über „*gap junctions*“ mit den oberflächlichen Linsenfaseren in Kontakt bleibt (Marschall et al., 1982). Die einzelnen Epithelzellen werden zur germinativen Zone des Äquators hin dünner und in der germinativen Zone bleiben sie lebenslang mitotisch aktiv, obwohl mit zunehmendem Alter die Zahl der Mitosen pro Zeiteinheit abnimmt. Im Laufe des Alters flachen die Epithelzellen ab und ihre Zelldichte nimmt ab mit einer Zellverlustrate, die geschlechtsunabhängig bei ca. 7,8 Zellen/mm<sup>2</sup>/Jahr liegt (Guggenmoos-Holzmann et al., 1989). Ultrastrukturell nimmt im Alter die Zahl von Organellen ab, es treten abnorm veränderte Mitochondrien sowie multilamelläre Einschlüsse und Vakuolisierungen auf, die auf degenerative Erscheinungen hindeuten (Perry et al., 1979). Welche der nachgewiesenen Proteine an der Linsentrübung beteiligt sind, kann aus der vorliegenden Arbeit nicht abgeleitet werden.

#### **4.4 Funktionsrelevante zelluläre Veränderungen in der postnatalen Linse**

Die Untersuchung der neugeborenen Linse des Affen sollte einen Vergleich sowohl zur adulten als auch zu der embryonalen Linse liefern. Dieser Vergleich war sinnvoll,

da die Weiterentwicklung der Linse mit lokalen Unterschieden versehen ist. Das Linsenepithel zeigt zum Beispiel in seinem posterioren Teil eine sehr unterschiedliche Weiterentwicklung als in seinem anterioren Teil. Die Zellen des posterioren Epithels strecken sich nämlich in das Lumen des Linsenbläschens hinein und behalten zunächst ihre Zellkerne. Sobald ihre apikalen Spitzen die Rückwand des anterioren Epithels erreichen, verlieren die posterioren Zellfasern ihre Zellkerne und die weiteren Organellen und werden zu den primären Linsenfasern umgewandelt. Während dessen bleiben die anterioren Epithelzellen einschichtig und behalten ihre Zellkerne. Am äquatorialen Übergang zwischen dem anterioren und posterioren Epithel teilen sich Epithelzellen und bilden sekundäre Linsenfasern, die sich ringförmig um die primären Linsenfasern strecken. Dieser äquatoriale Bereich wird von nun an die Stelle der kontinuierlichen Produktion von Linsenfasern, die auch ihre Organellen und Zellkerne verlieren. Die Ausdifferenzierung der sekundären Linsenfasern dauert während des ganzen Lebens an. Da aber der Linsenumfang beim Erwachsenen nicht mehr zunimmt, wird das neue Linsenfasermaterial immer kompakter und der Druck auf den Linsennukleus wird größer.

Die vordere Linsenkapsel grenzt das darunter liegende kubische Linsenepithel und die Linse selbst gegen die hintere Augenkammer ab. Die Kapsel ist eine homogene, elastische Basalmembran und besteht aus Extrazellulärmatrixproteinen in einer Dicke von ca. 17  $\mu\text{m}$  im Zentralbereich und ca. 23  $\mu\text{m}$  im äquatornahen Bereich. Hinter dem Äquator wird die Kapsel dünner und wird am hinteren Pol mit 4  $\mu\text{m}$  am dünnsten. Die Funktion der Linsenkapsel besteht erstens in der Bildung einer Permeabilitätsbarriere zum extralentalen Raum und zweitens in der Bildung von Insertionsstellen für Zonulafasern, die ihrerseits aufgrund ihrer Elastizität eine lebenslange wichtige Rolle bei der Linse spielen. Zu diesem Zweck der Anheftung von Zonulafasern ist in der Nähe des Äquators eine dünne Zonulalamelle von ca. 0,5 bis 1  $\mu\text{m}$  Dicke oberflächlich aufgelegt. Ultrastrukturell besteht die Linsenkapsel aus Kollagen IV, Fibronektin, Heparansulfat-Proteoglykan, Antactin und Laminin (Mohan and Spiro, 1986; Ohrloff, 1994). Die Linsenkapsel verdickt sich im prääquatorialen Bereich im Laufe des Lebens um ca. 0,08  $\mu\text{m}/\text{Jahr}$ . Es treten im fortgeschrittenen Alter fibrilläre Einschlüsse auf, und auf funktioneller Ebene nimmt sowohl die Barrierefunktion als auch die Elastizität der Kapsel ab (Tripathi and Tripathi, 1983).

Die untersuchten Proteine zeigten - wie erwartet - Verschiebungen in ihrer Expression, die in einer gewebsspezifischen Art und Weise zu sehen sind. Alpha- Beta- und Gamma-Kristalline sind nicht mehr in den retinalen Ganglienzellen lokalisiert, sondern in der Linse selbst, im Linsenepithel, und interessanterweise im Hornhautepithel. Auch BCL-2 und GAP-43 sind nicht mehr in der Retina lokalisiert, sondern im Linsenepithel in den jungen Sekundärfasern des Äquators und im cornealen Epithel (GAP-43). Fibronectin ist in der Linse nicht mehr exprimiert und bleibt weiterhin in Gefäßen der Retina, der Chorioidea und des Ziliarkörpers beschränkt. Ähnliches gilt für den Fibronectinrezeptor, der zusätzlich im Epithel der Cornea zu finden ist. Die Verteilung von Laminin in der Kapsel und im subkapsulären Bereich ist in Übereinstimmung dieses Proteins mit seiner komplexen Funktion in der Extrazellulärmatrix. Das Vimentin wird - wie erwartet - sehr stark in den retinalen Gliazellen (Müllerzellen und Astrozyten) sowie im Ziliarkörper, im Linsenkortex und im Epithel lokalisiert. Seine Funktion besteht wahrscheinlich darin die Linse zu stabilisieren.

#### **4.5 Proteinverteilung in der juvenilen und adulten Linse**

Das Wachstum der Linse hört mit der Geburt nicht auf. Die Linse als ganzes Organ vervierfacht sich gewichtsmäßig zwischen der Geburt (ca. 65 mg) und dem Alter (ca. 270 mg) (Tripathi and Tripathi, 1983). Die Linsefasern verdichten sich durch die appositionelle Anlagerung neuer Fasern am Äquator werden zum Kern hin stark komprimiert. Der Linsenkern sklerosiert und trübt konsekutiv ein. Auf biochemischer Ebene verändert sich die Proteinzusammensetzung durch photooxidativ bedingte Aggregation von Proteinen (Bermann, 1994) sowie durch Bildung freier Radikale und gleichzeitiger Abnahme von antioxidativ wirkenden Enzymen (Borkmann and Lerman, 1977). Die biochemischen Veränderungen stellen einen Übergang zwischen der physiologischen Alterung der Linse und der Bildung einer senilen Katarakt dar und stehen wahrscheinlich in ursächlichem Zusammenhang mit der Entwicklung der Katarakt in Verbindung.

Das Wachstum der Linse am Äquator findet während des ganzen Lebens statt. Auf molekularer Ebene steht die Entwicklung des Augenbechers unter der Kontrolle der Pax-Gene, einer Familie von Transkriptionsfaktoren mit fundamentaler Bedeutung für die Augen- und Linsenentwicklung (Cvecki und Piatigorsky, 1996). Das Pax-6 Gen ist zuständig für die Kontrolle der Entwicklung der Linse und der vorderen Augenab-

schnitte, während Pax-2 die Entwicklung der Neuroretina und des Sehnervs kontrolliert. Beide Gene stehen unter der übergeordneten Kontrolle des sog. Sonic-Hedgehog Gens dessen Proteinprodukte einen positiven Einfluss auf das Pax-2 und einen negativen Einfluss auf das Pax-6 ausüben (Mey und Thanos, 2000).

Auf Proteinebene zeigte die juvenile Linse ein sehr ähnliches Muster wie die neonatale Linse (Tab. 3). Alpha-, Beta- und Gamma-Kristalline sind weiterhin hoch exprimiert im Linsenepithel, und interessanterweise mit zunehmender Intensität im Hornhautepithel. Auch BCL-2 und GAP-43 sind im Linsenepithel, in den jungen Sekundärfasern des Äquators und im cornealen Epithel (GAP-43) zu finden. Fibronectin ist weiterhin in den Gefäßen der Retina, der Chorioidea und des Ziliarkörpers zu sehen. Ähnliches gilt für den Fibronectinrezeptor, der zusätzlich im Epithel der Cornea zu finden ist. Die Verteilung von Laminin in der Kapsel und im subkapsulären Bereich ist in Übereinstimmung dieses Proteins mit seiner komplexen Funktion in der Extrazellulärmatrix. Das Vimentin wird unverändert in den retinalen Gliazellen (Müllerzellen und Astrozyten) sowie im Ziliarkörper, im Linsenkortex und im Epithel lokalisiert. Seine Funktion besteht wahrscheinlich darin die Linse zu stabilisieren.

Die adulte Linse des Affen sowie die humane Linse zeigen ein sehr ähnliches Muster von Proteinverteilung wie die juvenile Linse. Neben den Kristallinen, die sehr stark gefärbt sind, findet man BCL-2 im Linsenepithel und Hornhautepithel. Möglicherweise hat dieses wichtige Überlebensprotein in diesen regenerativen Epithelien eine antiapoptotische Funktion und schützt sie vor toxischen Einwirkungen (Hornhaut) bzw. vor mechanischen Beanspruchungen (Linse). Die selektive Expression von GAP-43 im Linsenepithel und in den jungen Sekundärfasern spricht dafür, dass dieser Linsenbereich wachstumsfähig über das ganze Leben bleibt, was ja auch morphologisch zu beobachten ist. Auch Fibronectin und sein Rezeptor bleiben sowohl in der Affenlinse als auch in der humanen Linse unverändert exprimiert. Gleiches gilt für das Laminin und das Vimentin. Ihre Lokalisation ist wahrscheinlich an der Stabilisierung der äußeren Linse gekoppelt und könnte teilweise erklären, dass mit zunehmender Nutzung im Rahmen der Akkommodation zu Veränderungen führen kann, die dann zur senilen Katarakt führen. Inwieweit die Katarakt die Folge von Nutzungserscheinungen auf zellulärer und molekularer Ebene ist, bleibt noch zu zeigen, und bedarf weiterer Untersuchungen wie z. B. in vitro (Liu et al 1996; Stupp und Thanos, 2005).

#### **4.6 Alterung der Linse und die Folgen von feinen Entwicklungsstörungen**

Mit keinem anderen Augenleiden ist die augenärztliche Tätigkeit so eng gekoppelt wie mit der typischen Alterseintrübung der Linse, dem grauen Star. Es ist deshalb erstaunlich, dass die Ursachen dieser fundamentalen Veränderung einfach als „altersbedingt“ vereinfacht und missverstanden wird. Obwohl es auch äußere Faktoren gibt, die eine Katarakt induzieren und/oder verstärken, so trifft es aber im Großen und Ganzen zu, dass die senilen Kataraktformen die Mehrheit ausmachen. Nach den epidemiologischen Daten der WHO geht hervor, dass heute ca. 20 Millionen Menschen weltweit an Katarakt erblindet sind, und dass jedes Jahr weitere 1 bis 2 Millionen hinzukommen. Somit stellen die Katarakte die häufigste Ursache von Erblindungen weltweit.

Supranukleäre Katarakte machen etwa 50% aller senilen Linsentrübungen aus, gefolgt von subkapsulären Katarakten und Mischformen, die in der Regel zur Operation gelangen. Der Kern bleibt bei den senilen Kataraktformen länger ungetrübt. Die pathogenetischen Faktoren der Kataraktentwicklung sind weitgehend ungeklärt. Die supranukleäre Lokalisation der meisten Katarakte spricht allerdings für die Beteiligung von molekularen Scherkräften zwischen Linsenrinde und Linsenkern. Letzterer wird ab der 4. Lebensdekade härter (Kernsklerose) und ist verantwortlich auch für die Entwicklung der Presbyopie, die auch in dieser Dekade einsetzt. Bei einem 45-Jährigen ist z. B. der Linsenkern 3-mal so hart wie beim 20-Jährigen, während bei einem 80-Jährigen er 8-mal so hart ist (Pau, 2006), während die Linsenrinde relativ weich bleibt.

Bei der Akkommodation und insbesondere beim Desakkommodationsvorgang kommt es auch zu erheblichen Scherkräften zwischen der Linsenrinde und dem Linsenkern. Dabei verschieben sich die weicheren Rindenfasern über den immer härter werden den Linsenkern. Es entstehen scharfe Mikrorupturen und Faserzerreißen der kortikalen Linsenfasern. Demzufolge kann Flüssigkeit in die entstehenden Mikrospalten eindringen und die Ionenverhältnisse vor allem die Kalium- und Natrium-Ionen verändert. Die über längere Zeit klar bleibenden Spalten können langsam eintrüben und werden dann mit Hilfe der biomikroskopischen Untersuchung als supranukleär gelegene „radspeichenartige“ Veränderungen erkannt. In Abhängigkeit von der Zonulafa-

senstraktion am Äquator der Linse dehnen sich die „Radspeichen“ in äquatorialer Richtung aus und gehen durch mehrere kortikale Schichtlagen hindurch.

Subkapsuläre Katarakte der Rinde entstehen auf dem Boden anderer Mechanismen und insbesondere durch metabolische Störungen vor allem außerhalb der Linse wie Uveitis, längere und hochdosierte Kortisongabe, übermäßiger Alkoholmissbrauch, ionisierende Strahlen und Medikamente. Die hintere subkapsuläre Katarakt entsteht in der Regel auch durch metabolische Störungen, die außerhalb der Linse ablaufen und sekundär die hintere dünne Linsenkapsel betreffen. Im Gegensatz zum typischen Alterstar gelangt bei Störungen der Ionenpumpe der hinteren Kapsel Flüssigkeit von außen (Glaskörper) in die subkapsuläre Region ein und führt zu Störung des Hydratationszustands und folglich des Ionengleichgewichts mit Eintrübungsfolgen. Die eigentliche senile Katarakt im hohen Alter ist eine Kernkatarakt und entwickelt sich zunächst in den ontogenetisch ältesten Teilen der Linse (Kern). Sie schreitet langsam voran und entwickelt sich im Laufe von Jahren bis Jahrzehnten. Die Prävalenz von Kernsklerose bei Hundertjährigen beträgt nahezu 100% (Pau, 2006).

#### **4.7 Ist das PEX-Syndrom auf Entwicklungsstörungen der Linse zurückzuführen?**

Es ist zu erwarten, dass die fein auf einander abgestimmten Entwicklungsvorgänge in der Linse die spätere Funktionsweise beeinflussen. Neben der Katarakt werden weitere Veränderungen der alternden Linse auf ihre Funktion zurückgeführt. Die von Lindberg (1917) erstbeschriebene und von Voigt (1925) ersterklärte *Exfoliatio lentis* zum Beispiel wurde zunächst wenig beachtet, so dass epidemiologische Studien erst spät erfolgten. Man ging zunächst davon aus, dass PEX bei Skandinaviern auftritt, um später festzustellen, dass es in allen geographischen und ethnischen Populationen vorkommt. Die Prävalenz des PEX beträgt in der skandinavischen Bevölkerung zwischen ca. 8% und 31% bei den älteren Menschen der 9ten Lebensdekade (Tarkkanen, 1984, Lumme und Laatikainen, 1993). In den meisten westeuropäischen Ländern, in den USA und Japan wird die Prävalenz mit 2% bis 18% angegeben (Ball et al. 1989; Okamura et al., 1989). Auf der anderen Seite zeigten standardisierte Verfahren der Erfassung von PEX, dass keine signifikanten Unterschiede unter den verschiedenen geographischen Populationen zu finden sind. Nach dieser Studie ist die Prävalenz in Deutschland 4,7%, in England 4% und in Norwegen 6,3% (Ringvold et

al., 1988). Es ist davon auszugehen, dass wegen des schleichenden Beginns das PEX eher unterdiagnostiziert wurde.

Das Offenwinkelglaukom, das sich bei etwa der Hälfte aller PEX-Fälle entwickelt, nimmt deshalb bei PEX hinsichtlich sowohl der Häufigkeit als auch der Schwere von möglichen Komplikationen eine wichtige Rolle bei allen Sekundärglaukome ein. Bezogen auf den Anteil an allen Glaukomen, macht das PEX-Glaukom weltweit ca. 25% aller Glaukome aus. Das PEX-Glaukom hat aufgrund seiner raschen Progredienz, der raschen Papillenveränderungen, dem Auftreten von Druckspitzen in den frühen Morgenstunden (Sowka, 2004; Altintas et al., 2004), d. h. außerhalb der üblichen Untersuchungszeit und demzufolge der schnellen Zunahme von Skotomen eine schlechte Prognose. Zu dieser schlechteren Prognose treten im Vergleich zum Offenwinkelglaukom eine häufige Asymmetrie, stärkere Kammerwinkelpigmentierung, höheres Druckniveau und akute Drucksteigerungen bei Mydriasis. Aufgrund dieser raschen Progredienz sollten Augen mit PEX bereits bei okulärer Hypertension antiglaukomatös behandelt werden bis der Druck unter 17 mm Hg sinkt. Man geht davon aus, dass damit auch die Progression von PEX verlangsamt wird.

Ein Beispiel für entwicklungsbedingte Veränderungen in der Linse ist das sog. PEX dessen erste Beschreibung auf Lindberg im Jahre 1917 zurückgeht. Möglicherweise hatte aber Axenfeld (1911) die ersten Beobachtungen gemacht. Terminologisch ist es vom echten Exfoliationssyndrom der Linsenkapsel bei Glasbläsern und Stahlgießern (Feuerlamelle) abzugrenzen. In der skandinavischen Literatur wird weiterhin der Begriff Exfoliationssyndrom verwendet. PEX wurde inzwischen auch in Deutschland als relativ häufiges Syndrom mit einer Inzidenz von 3,5 % im Durchschnitt Katarakt-Altersgruppen beschrieben (Naumann et al., 1989) und scheint nicht nur die Strukturen des vorderen Augenabschnitts zu betreffen (Naumann et al., 1998; Schlötzer-Schrehardt et al., 1992a, 1993), sondern auch extraokuläre Strukturen und Viszeraleorgane (Streeten et al., 1992). Das PEX-Syndrom wurde in der Zwischenzeit weltweit mit unterschiedlicher Inzidenz beschrieben, wobei an dieser Stelle aus der Fülle von Publikationen nur ein paar Literaturbeispiele erwähnt werden (Ball et al., 1989; Forster et al., 2005; Konstas and Allan, 1989; Kozobolis et al., 2000; Yalaz et al., 1992). Die Bedeutung der Beteiligung der viszeralen Organe ist noch nicht verstanden, weist auf die gemeinsame embryonale Herkunft intraokulärer Strukturen und dieser Organe. Veränderungen im vorderen Auge bestehen in der Entwicklung einer

Rigidität der Pupille, die sich medikamentös schlecht dilatieren lässt und als Risikofaktor für die Operation gilt, schwache Zonulafasern, periphere iridokapsuläre Adhäsionen, oft subluxierte Linsen mit Lentodonesis (Kasimpris et al., 2004) und starke Tendenz zur Fibrinreaktion (Raitta et al., 1986). Es handelt sich um offensichtlich eine generalisierte Erkrankung des vorderen Augensegments mit potentiell schwerwiegenden Folgen für die Linsentransparenz (Fama et al., 1993) und für die gesamte Funktion des Auges, weil verschiedene Gewebe betroffen sind. Aus histopathologischer Sicht handelt es sich um eine mit altersassoziierte, degenerative Fibrilopathie, bei der ein grauweißes, fibrilläres Material auf der Oberfläche der beteiligten Strukturen des vorderen Augenabschnitts (Ritch and Schlötzer-Schrehardt, 2001).

Das fibrilläre Material wird multifokal produziert und entsteht im vorderen Augenabschnitt entweder aus unpigmentiertem Ziliarkörperepithel oder aus Irispigmentepithel oder aus Linsenepithel oder aus dem Hornhautendothel (Miyake et al., 1989; Inoue et al., 2003), oder aus dem Trabekelwerkendothel (Meyer et al., 1984; Schlötzer-Schrehardt and Naumann, 1994). Außerdem scheint es assoziiert zu sein mit fast allen Zelltypen im Irisstroma (Amari et al., 1994; Asano et al., 1995). Lichtmikroskopisch ist das Material PAS-positiv, Masson-positiv, Gomori-Chromhämoxycilin-positiv, eosinophil und phänotypisch bäumchenartig verzweigtes Material auf allen Strukturen des vorderen Augenabschnitts (vordere Linsenkapsel, Ziliarkörper, Zonulafasern, Trabekelwerk, Hornhaurückfläche usw.) (Dark and Streeten, 1990; Davison, 1993; Knorr et al., 1991). PEX-Fibrillen erscheinen elektronenmikroskopisch gesehen niemals intrazellulär, sondern ausschließlich auf der Oberfläche von Zellen. Für eine aktive Sekretion der Fibrillen spricht die Tatsache, dass die produzierenden Zellen hypersekretorisch erscheinen und ein prominentes endoplasmatisches Retikulum und Erhöhung der Mitochondrien aufweisen. Bei den Fibrillen handelt es sich nach elektronenmikroskopischer Betrachtung um abnormes Material der Extrazellulärmatrix, das sich über den Kammerwasserfluss sich im gesamten Vorderkammerabschnitt ausbreitet und ablagert (Morrison et al., 1988). Insgesamt ist aber auch die Iris (Brooks and Gillies, 1983) und die Vorderkammerflüssigkeit verändert (Bleich et al., 2004; Berlau et al., 2001; Helbig et al., 1994; Ho et al., 2005; Kühle et al., 1994a, b).

Die Pathogenese des PEX bleibt noch unklar, obwohl verschiedene Theorien existieren, die sich auf histopathologische Befunde stützen. Ein entscheidender Grund für

die Diversität der Theorien ist die Tatsache, dass zu wenig Material zur Verfügung steht, um proteinchemische Untersuchungen mit der notwendigen Auflösung durchzuführen. Man ging anfänglich davon aus, dass das mit Antikörpern gegen Amyloid anfärbbare PEX-Material tatsächlich Amyloid ist (Meretoja und Tarkkanen, 1975). Diese Annahme konnte sich nicht bestätigen. Die zweite Theorie ging von einer Basalmembrangenese des PEX-Materials. Mit immunhistochemischen Methoden konnte tatsächlich nachgewiesen werden, dass Basalmembran-Komponenten - wie Laminin, Heparansulfat-Proteoglycan, Entactin/Nidogen im PEX-Material - vorhanden sind (Konstas et al., 1990, Schlötzer-Schrehardt et al., 1992). Die dritte Theorie nimmt an, dass elastische Mikrofibrillen der Hauptanteil von PEX sind (Streeten, 1993). Dafür spricht die Tatsache, dass auch extraokulare Organe ähnliche elastisch-fibrilläre Ablagerungen aufweisen. Unabhängig davon, lässt sich das PEX-Syndrom eher als eine komplexe Veränderung aus dem Bereich generalisierter degenerativer Fibrilopathien mit konsekutiven Veränderungen von Basalmembranen und Extrazellulärmatrix beschreiben. Bezüglich des lentikulären Materials nahmen Schlötzer-Schrehardt und Naumann (1994a, b) an, dass das charakteristische Verteilungsmuster des PEX-Materials durch regional verschiedene Mechanismen entsteht: Zum einen wird PEX aktiv durch das prääquatoriale Linsenepithel in der germinativen Zone produziert und zum zweiten findet eine passive Ablagerung des Materials durch Kammerwasser (Yaksel et al., 2001) sowohl auf die Linsenkapsel (zentrale Scheibe) als auch auf die Iris (granuläres Material).

Interessanterweise ist PEX assoziiert mit Kataraktentwicklung (Raitta and Setälä, 1986), ohne dass sie pathogenetisch miteinander assoziiert sind. Bei Kataraktpatienten tritt PEX mit einer Häufigkeit von 25% bis 41% auf (Konstas et al., 1995a). Auch die Entwicklung eines Glaukoms tritt beim PEX mit höherer Inzidenz auf sowie die Inzidenz des PEX mit zunehmendem Alter wächst. Insgesamt nimmt die PEX-Häufigkeit mit dem Alter zu und beträgt bei Menschen unter dem 60. Lebensjahr kaum auf (weniger als 1%), um zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr auf 15% zu steigen und Spitzenwerte von 48% über dem 80. Lebensjahr zu erreichen (Lumme und Laatikainen, 1993). Bei jüngeren Patienten tritt PEX nur in Ausnahmefällen auf. Der jüngste Fall war eine 17-jährige Patientin mit kongenitalem Glaukom und Trabekulektomie (Konstas et al., 1995). Wegen der erhöhten Prävalenz im Alter, PEX ist relativ häufig in Augen, die zur Kataraktextraktion gelangen. In histopathologisch untersuchten Augen haben Krause und Tarkkanen (1978) nachgewiesen, dass 33%

der extrahierten Linsen ein PEX hatten. Betrachtet man altersunabhängig die Häufigkeit von PEX in kataraktoperierten Augen, so beträgt sie im süddeutschen Raum 3,5% (Naumann et al., 1989). Man geht heute davon aus, dass die Kataraktextraktion und die Implantation einer Hinterkammerlinse hat einen positiven Effekt auf die Progression von PEX. Eine kombinierte Operation wird inzwischen vorgezogen, weil man damit die besten postoperativen Ergebnisse sowohl hinsichtlich des Drucks als auch hinsichtlich von postoperativen Komplikationen hat (Wedrich et al., 1992; Wolensack et al., 1992).

Aus der Entwicklungsgeschichte der Linse könnte man bestimmte Aspekte der späteren PEX-Entwicklung ableiten. Sehr früh in der Entwicklung des Auges, nämlich im Stadium der Bildung des primären Augenvesikels am 22. Gestationstag kommt es zur induzierenden Bildung der Linse durch zelluläre Interaktionen zwischen dem sich ausstülpenden prosencephalen Neuralrohr und dem darüber liegenden Ektoderm. Es kommt rasch zur morphologischen Verdickung und Differenzierung der prospektiven Linsenplakode, die sich später einstülpen wird, um die embryonale Linse zu bilden. Dass der Kontakt zwischen Neuralrohr und Ektoderm für die Linsenentwicklung entscheidend ist, zeigt sich im Ergebnis: bleibt dieser Keimblätterkontakt aus, so bildet sich eine Aphakie. Dass die Linse ektodermalen Ursprungs ist, zeigt sich in der lebenslang zu beobachtenden Beteiligung der Linse an generalisierten Hauterkrankungen. Diese Assoziation könnte auch die Befunde erklären, dass fibrilläres Material auch außerhalb der Linse zu finden ist.

Am Ende der 4ten Embryonalwoche ist die solide Auffüllung der Linse beendet und es entsteht der Embryonalkern. Ab diesem Stadium beschränkt sich die Bildung neuer Fasern auf die Teilung von Epithelzellen an der Äquatorialzone. Die Anlagerung neuer Fasern geschieht appositionell, d. h. schichtweise außen an bereits vorhandene Fasern, die dadurch nach zentral verlagert erscheinen. Dabei verlieren die zentralwärts geschobenen Fasern ihre Zellkerne und tragen damit zur homogenen optischen Transparenz des Linsenkerne bei. Bei diesem Vorgang des Zellkernverlustes handelt es sich um eine inkomplette Zellapoptosis, bei der nicht mehr durch Phagozytose, sondern durch Autophagie alle nichttransparenten Organellen, also auch der chromatinhaltige Zellkern abgebaut werden zugunsten der optischen Transparenzzunahme (Stupp und Thanos, 2005). Die lebhafteste Zellteilung in der germinativen Äquatorialzone des Linsenepithels bleibt lebenslang erhalten und trägt zu einer steti-

gen Zunahme der Linsegröße bei. Auch die einzelnen Faserzellen (Linsenfasern), die durch der hoch geordneten Anordnung der Kristallinproteine transparent bleiben, werden für eine lebenslange Funktion angelegt.

#### **4.8 Theorien zur Pathogenese des PEX-Syndroms**

Die vorliegende Studie zeigt, dass bestimmte Extrazellulärmatrixproteine in der Linse zu finden sind, die vorwiegend in der Kapsel lokalisiert sind. Sowohl Vimentin als auch Laminin und Fibronektin könnten bei der Pathogenese des PEX und der senilen Katarakt eine Rolle spielen. Hinzu kommen die Kollagene, die ebenfalls in der Kapsel zu finden sind. Die Beteiligung einzelner Proteine bleibt noch unklar, obwohl verschiedene Theorien existieren, die sich auf histopathologische Befunde stützen. Ein entscheidender Grund für die Diversität der Theorien ist die Tatsache, dass zu wenig Material zu Verfügung steht, um proteinchemische Untersuchungen mit der notwendigen Auflösung durchzuführen. Man ging in der ersten Theorie anfänglich davon aus, dass das mit Antikörpern gegen Amyloid anfärbbare PEX-Material tatsächlich Amyloid ist (Meretoja und Tarkkanen, 1975). Diese Annahme konnte sich nicht bestätigen. Die zweite Theorie ging von einer Basalmembranogenese des PEX-Materials aus. Mit immunhistochemischen Methoden konnte tatsächlich nachgewiesen werden, dass Basalmembran-Komponenten wie Laminin, Heparansulfat-Proteoglycan, Entactin/Nidogen im PEX-Material vorhanden ist (Konstas et al., 1990, Schlötzer-Schrehardt et al., 1992). Die dritte Theorie nimmt an, dass elastische Mikrofibrillen der Hauptanteil von PEX sind (Streeten, 1993). Dafür spricht die Tatsache, dass auch extraokulare Organe ähnliche elastisch-fibrilläre Ablagerungen aufweisen. Unabhängig davon, lässt sich das PEX-Syndrom eher als eine komplexe Veränderung aus dem Bereich generalisierter degenerativer Fibrilopathien mit konsekutiven Veränderungen von Basalmembranen und Extrazellulärmatrix beschreiben. Bezüglich des lentikulären Materials nahmen Schlötzer-Schrehardt und Naumann (1995b) an, dass das charakteristische Verteilungsmuster des PEX-Materials durch regional verschiedene Mechanismen entsteht: Zum einen wird PEX aktiv durch das prääquatoriale Linsenepithel in der germinativen Zone produziert und zum zweiten findet eine passive Ablagerung des Materials durch Kammerwasser sowohl auf die Linsenkapsel (zentrale Scheibe) als auch auf die Iris statt (granuläres Material).

Interessanterweise ist das PEX-Syndrom assoziiert mit Kataraktentwicklung (Hiller et al., 1982; Raitta et al., 1986), ohne dass sie pathogenetisch miteinander assoziiert sind. Bei Kataraktpatienten tritt PEX mit einer Häufigkeit von 25 bis 41% auf (Konstas et al., 1995b). Auch die Entwicklung eines Glaukoms tritt beim PEX mit höherer Inzidenz auf sowie die Inzidenz des PEX mit zunehmendem Alter wächst. Insgesamt nimmt die PEX-Häufigkeit mit dem Alter zu und beträgt bei Menschen unter dem 60. Lebensjahr kaum auf (weniger als 1%), um zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr auf 15% zu steigen und Spitzenwerte von 48% über dem 80. Lebensjahr zu erreichen (Lumme und Laatikainen, 1993). Bei jüngeren Patienten tritt PEX nur in Ausnahmefällen auf. Der jüngste Fall war eine 17-jährige Patientin mit kongenitalem Glaukom und Trabekulektomie (Konstas et al., 1995a). Wegen der erhöhten Prävalenz im Alter, PEX ist relativ häufig in Augen, die zur Kataraktextraktion gelangen. In histopathologisch untersuchten Augen haben Krause und Tarkkanen (1978) nachgewiesen, dass 33% der extrahierten Linsen ein PEX hatten. Betrachtet man altersunabhängig die Häufigkeit von PEX in kataraktoperierten Augen, so beträgt sie im süddeutschen Raum 3,5% (Naumann et al., 1989). Man geht heute davon aus, dass die Kataraktextraktion und die Implantation einer Hinterkammerlinse einen positiven Effekt auf die Progression von PEX haben. Eine kombinierte Operation wird inzwischen vorgezogen, weil man damit die besten postoperativen Ergebnisse sowohl hinsichtlich des Drucks als auch hinsichtlich von postoperativen Komplikationen hat.

Zusammenfassend lässt sich aus dieser Studie bestätigen, dass über die Aufschlüsselung der zellulären und molekularen Linsendifferenzierung verschiedene Linsenveränderungen - wie die Katarakt und das PEX - besser verstanden werden könnten. Diese Untersuchung war nicht ausschöpfend, zeigte jedoch dass jedes Protein eine besondere Lokalisation sowie ein entwicklungspezifisches Muster aufweist, das mit seiner Funktion zusammenhängt.

## 5.0 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Studie war die histologische und immunhistochemische Analyse der Entwicklung der Affenlinse und im adulten Stadium der Vergleich mit der menschlichen Linse im Hinblick auf die spätere Entwicklung von Elastizitätsverlusten am Beispiel der Kataraktbildung im Erwachsenenalter und des sogenannten Pseudoexfoliationssyndroms (PEX), das mit intraokularen und extraokularen (viszeralen) granulären Ablagerungen einhergeht. Intraokular manifestieren sich im alternden Auge und insbesondere beim PEX Katarakte, granuläre Veränderungen in der Linse, der Iris und des Kammerwinkels, nicht selten assoziiert mit einem Offenwinkelglaukom. Ein Auge mit PEX gelangt in der Regel zu einer Kataraktoperation, und wenn ein Begleitglaukom vorliegt, zu einer gleichzeitigen Glaukomoperation. Zum Erreichen des Zieles wurden Kryostatschnitte aus fötalen Augen von Affen der Gattung „*Callithrix jacchus*“ sowie aus Augen neugeborener Affen der gleichen Gattung aus adulten humanen und Affenaugen mit immunhistochemischen Methoden gegen neun verschiedene Antigene untersucht und mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet.

Die Ergebnisse zeigen immunhistochemisch eine embryonale Expression von Linsenproteinen in den fötalen Augen im dritten Gestationsmonat, am Tage der Geburt und in adulten Stadien. Die gängigen Proteine der Extrazellulärmatrix (Kollagene, Laminin, Fibronectin) konnten, wenn auch in etwas veränderter Intensität -, in allen Stadien gefunden werden. Weiter wurden überlebensassoziierte Faktoren (BCL-2 und GAP-43) im Linsenkapselepitel dokumentiert. Sowohl in den Affenaugen aller Stadien als auch in den humanen Schnitten waren beide Faktoren unverändert exprimiert. Das Zytoskeletprotein Vimentin, das eigentlich in glialen Zellen der Retina exprimiert wird, konnte in der Linsenrinde detektiert werden, was auf seine mögliche Beteiligung bei der Stabilität der Linse und insbesondere der Kapsel hinweist. Die Linsenstrukturproteine, die man als Kristalline kennt, werden früh in der fötalen Affenlinse exprimiert und spielen nach gängiger Meinung eine immens wichtige Rolle bei der Stabilitäts-erhaltung und der optischen Linsentransparenz.

Die Ergebnisse zeigen, dass das Proteinmuster in der Linse und in den benachbarten Augenkompartmenten früh in der fötalen Entwicklung angelegt wird. Die Beobachtungen und der Vergleich mit der adulten Linse stützen die Hypothese, dass mit zunehmendem Alter die Elastizität des Kapsel-Epitelkomplexes und der kortikalen

Fasern aufgrund von Scherkräften während des akkommodativen Verschleißes zwischen dem weichen Linsenkortex und des sklerosierenden Linsenkerns abnimmt. Dadurch entstehen sehr wahrscheinlich Mikrorisse in der Kapsel, die zur sekundären flüssigkeitsbedingten Eintrübung (Katarakt) und Exfoliation von Proteinen (Katarakt und Glaukom) führen können.

## 6.0 Literaturverzeichnis

1. **Altintas O, Yuksel N, Karabas VL, Qaglar Y (2004):**  
Diurnal intraocular pressure variation in pseudoexfoliation syndrome.  
Eur J Ophthalmology 14: 495-500.
2. **Amari F, Nagata S, Umihira J, Nohara M, Usuda N, Segawa K (1994):**  
Lectin electron microscopic histochemistry of the pseudoexfoliative material in the skin.  
IOVS 35: 3962-3966.
3. **Asano N, Schlötzer-Schrehardt U, Naumann GOH (1995):**  
A histopathologic study of iris changes in pseudoexfoliation syndrome.  
Ophthalmology 102: 1279-1290.
4. **Assia EI, Apple DJ, Morgan RC, Legler UFC, Brown SJ (1991a):**  
The relationship between the stretching capability of the anterior capsule and zonules.  
IOVS 32: 2835-2839.
5. **Assia EI, Hoggatt JP, Apple DJ (1991b):**  
Experimental nucleus extraction through a capsulorhexis in an eye with pseudoexfoliation syndrome.  
Am J Ophthalmology 111: 645-647.
6. **Axenfeld KT (1911):**  
Über besondere Formen von Irisatrophie, besonders die hyaline Degeneration des Pupillarsaums und die pupilläre Pigmentatrophie des Iris-hinterblattes.  
Ber Ophthalmology Ges 274-275.
7. **Ball SF, Graham S, Thompson H (1989):**  
The racial prevalence and biomicroscopic signs of exfoliative syndrome in the glaucoma population of southern Louisiana.  
Glaucoma 11: 169-175.
8. **Bartholomew RS (1970):**  
Lens displacement associated with pseudocapsular exfoliation.  
Br J Ophthalmology 54: 744-750.
9. **Berlau J, Lorenz P, Beck R, Makovitzky J, Schlotzer-Schrehardt U, Thiesen HJ, Guthoff R (2001):**  
Analysis of aqueous humour proteins of eyes with and without pseudoexfoliation syndrome.  
Graefes Arch Clin Exp Ophthalmology 239:743-746.
10. **Bleich S, Roedl J, Von Ahsen N, Schlotzer-Schrehardt U, Reulbach U, Beck G, Kruse FE, Naumann GO, Kornhuber J, Junemann AG (2004):**  
Elevated homocysteine levels in aqueous humor of patients with pseudoexfoliation glaucoma.  
Am J Ophthalmology 138: 162-164.
11. **Bermann ER (1994):**  
Biochemistry of cataracts. In: Garner A and Klintworth GK (eds): Patho-

- biology of ocular disease. A dynamic approach (p. 533-590).  
New York: Marcel Dekker.
12. **Becker HU, Pham DT, Wollensak J (1991):**  
Kapselhäutchen: Ein Risikofaktor für die Kataraktoperation?  
Fortschr Ophthalmol 88: 271-273.
  13. **Borkmann RF, Lerman S (1977):**  
Evidence for a free radical mechanism in aging and UV irradiated ocular lenses.  
Exp Eye Res 25: 303-309.
  14. **Blöke W (1990):**  
Phakoemulsifikation. Warum?  
Klein Mbl Augenheilkunde 197: 100-105.
  15. **Bozanic D, Bocina I, Saraga-Babic M (2006):**  
Involvement of cytoskeletal proteins and growth factor receptors during development of the human eye.  
Anat Embryol (Berl) 211(5): 367-77.
  16. **Brazitikos PD, Roth A (1991):**  
Iris modifications following extracapsular cataract extraction with posterior chamber lens implantation.  
J Cataract Refract Surg 17: 269-280.
  17. **Brooks AMV, Gillies WE (1983):**  
Fluorescein angiography and fluorophotometry of the iris in pseudoexfoliation of the lens capsule.  
Brit J Ophthalmology 67: 249-254.
  18. **Busisc M, Kastelan S (2005):**  
Pseudoexfoliation syndrome and cataract surgery by phacoemulsification.  
Coll Antropolo 29 (Suppl. 1): 163-166.
  19. **Chitkara DK, Smerdon DL (1997):**  
Risk factors, complications and results in extracapsular cataract extraction.  
J Cataract Refr Surg 23: 570-574.
  20. **Conway RM, Schlotzer-Schrehardt U, Kuchle M, Naumann GO (2004):**  
Pseudoexfoliation syndrome: pathological manifestations of relevance to intraocular surgery.  
Clin Experiment Ophthalmology 32: 199-210.
  21. **Coulombre, LL, Coulombre AJ (1969):**  
Lens development, IV. Size, shape, and orientation.  
Invest Ophthalmology 8(3): 251-257.
  22. **Cuadros, MA, Martin, C, Rios A, et al. (1991):**  
Macrophages of hemangioplasmic lineage invade the lens vesicle-ectoderm interspace during closure and detachment of the early embryonic lens.  
Cell Tiss Res 266: 177 ff.
  23. **Cvecki A, Piatigorsky J (1996):**  
Lens development and crystalline gene expression: many roles for Pax-

6.  
Bioessays 18: 621-630.
24. **Dark AJ, Streeten BW (1990):**  
Precapsular film on the aging human lens: precursor of pseudoexfoliation?  
Brit J Ophthalmology 74: 717-722.
25. **Davison JA (1993):**  
Capsule contraction syndrome.  
J Cataract Refract Surg 19: 582-589.
26. **Distler, C, Kirby MA (1996):**  
Transience of astrocytes in the newborn macaque monkey retina.  
Eur J Neurosci 8: 847-851.
27. **Dosso AA, Bonvin ER, Leuenberger PM (1997):**  
Exfoliation syndrome and pseudoexfoliation.  
J Cataract Refr Surg 23: 122-125.
28. **Drolsum L, Haaskjold E, Davanger M (1993):**  
Pseudoexfoliation syndrome and extracapsular cataract extraction.  
Acta Ophthalmol 71: 765-770.
29. **Drolsum L, Haaskjold (1994):**  
The influence of age on characteristics of cataract patients.  
Acta Ophthalmol 72: 622-626.
30. **Drolsum L, Hakksjold E, Sandvig K (1998):**  
Phacoemulsification in eyes with pseudoexfoliation.  
J Cataract Refr Surg 24(6): 787-792.
31. **Duke-Elder S (1969) ed.:**  
System of ophthalmology, Vol XI: Diseases of the Les and vitreous, Glaucoma and Hypotony.  
St. Louis, CV Mosby Co. p. 297-299.
32. **Famà F, Castagna I, Salmeri G (1993):**  
Influence of pseudoexfoliation syndrome on human lens transparency.  
Ann Ophthalmology 25: 440-441.
33. **Fine IH, Hoffman RS (1997):** Phacoemulsification in the presence of pseudoexfoliation: challenges and options.  
J Cataract Refr Surg 23: 160-165.
34. **Forster PJ, Seah SK (2005):**  
The prevalence of pseudoexfoliation syndrome in Chinese people: the Tanjong Pagar Survey.  
Br J Ophthalmology 89: 239-240.
35. **Foster A, Gilbert C, Rahl J (1997):**  
Epidemiology of cataract in childhood: A global perspective.  
J Cataract Refract Surg 23: 601-604.
36. **Freyler H, Radax U (1994):**  
Pseudoexfoliationssyndrom - ein Risikofaktor der modernen Kataraktchirurgie?  
Klin Monatsbl Augenheilkd 205: 275-279.

37. **Futa R, Shmizu T, Furuyoshi N (1992):**  
Clinical features of capsular glaucoma in comparison with primary open-angle glaucoma in Japan.  
*Acta Ophthalmol* 70: 214-219.
38. **Gariano RF, Iruela-Arispe ML, Hendrickson AE (1994):**  
Vascular development in primate retina: comparison of lamellar plexus formation in monkey and human.  
*Invest Ophthalmology Vis Sci* 35: 3442-3455.
39. **Goder GJ (1988):**  
Our experiences in planned extracapsular cataract extraction in the exfoliation syndrome.  
*Acta Ophthalmol* 66: 126-128.
40. **Grodum K, Heijl A, Bengtsson B (2005):**  
Risk of glaucoma in ocular hypertension with and without pseudoexfoliation.  
*Ophthalmology* 112: 386-390.
41. **Guggenmoos-Holzmann J, Engel B, Henke V, Naumann GOH (1989):**  
Cell density in human lens epithelium in women higher than in men.  
*Invest Ophthalmology Vis Sci* 30: 330-332.
42. **Guzek JP, Holm M, Cotter JB, Cameron JA, Rademacher WJ, Wissinger DH, Tonjum AM, Sleeper LA (1987):**  
Risk factors for intraoperative complications in 1000 extracapsular cataract cases.  
*Ophthalmology* 94: 461-466.
43. **Hearn JF (1987):**  
Marmosets and tamarins. In: Poole TB, editor. *The UFAW handbook of the care and management of laboratory animals*. London, Longman scientific and Technical, p. 568-581.
44. **Hendrickson A, Troilo D, Possin D, Springer A (2006):**  
Development of the Neural Retina and the Vasculature in the marmoset *Callithrix jacchus*.  
*J Comp Neurol* 497: 270-286.
45. **Helbig H, Schlötzer-Schrehardt U, Noske W, Kellner U, Foerster MH, Naumann GOH (1994):**  
Anterior-chamber hypoxia and iris vasculopathy in pseudoexfoliation syndrome.  
*German J Ophthalmology* 3: 148-153.
46. **Heuring AH, Hutz WW, Eckhardt HB (2001):**  
Combined phacoemulsification and goniotriphination in primary open-angle glaucoma and pseudoexfoliation glaucoma - a retrospective analysis.  
*Klin Monatsbl Augenheilkunde* 218: 535-541.
47. **Hiller R, Sperduto RD, Krueger DE (1982):**  
Pseudoexfoliation, intraocular pressure, and senile lens changes in a population-based survey.  
*Arch Ophthalmology* 100: 1080-1082.

48. **Ho SL, Dogar GF, Wang J, Crean J, Wu QD, Oliver N, Weitz S, Murray A, Clearly PE, O'Brien C (2005):**  
Elevated aqueous humour tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and connective tissue growth factor in pseudoexfoliation syndrome.  
Br J Ophthalmology 89: 169-173.
49. **Hohn S, Spraul CW, Buchwald HJ, Lang GK (2004):**  
Spontaneous dislocation of intraocular lens with capsule as a late complication of cataract surgery in patients with pseudoexfoliation syndrome - five case reports.  
Klin Monatsbl Augenheilkd 221: 273-276.
50. **Inoue K, Okugawa K, Oshita T, Amano S (2003):**  
Morphological study of corneal endothelium and corneal thickness in pseudoexfoliation syndrome.  
Jpn J Ophthalmology 47: 235-239.
51. **Kasper M, Viebahn C (1992):**  
Cytokeratin expression and early lens development.  
Anat Embryol (Berl) 186(3): 285-290.
52. **Katsimpris JM, Petropulos IK, Apostolakis K, Feretis D (2004):**  
Comparing phacoemulsification and extracapsular cataract extraction in Eyes with Pseudoexfoliation syndrome, small pupil, and phacodonesis.  
Klin Monatsbl Augenheilkunde 221: 328-333.
53. **Kirkpatrick JNP, Harrad RA (1992):**  
Complicated extracapsular cataract surgery in pseudoexfoliation syndrome: a case report.  
Brit J Ophthalmology 76: 692-693.
54. **Kivela T, Uusitalo M (1998):**  
Structure, development and function of cytoskeletal elements in non-neuronal cells of the human eye.  
Prog Retin Eye Res 17(3): 385-428.
55. **Knorr HLJ, Jünemann A, Händel A, Naumann GOH (1991):**  
Morphometrische und qualitative Veränderungen des Hornhautendothels beim Pseudoexfoliationssyndrom.  
Fortschr Ophthalmology 88: 786-789.
56. **Konstas AGP, Allan D (1989):**  
Pseudoexfoliation glaucoma in Greece.  
Eye 3: 747-753.
57. **Konstas AGP, Marschall GE, Lee WR (1990):**  
Immunogold localization of laminin in normal and exfoliative iris.  
Br J Ophthalmology 74: 450-457.
58. **Konstas AGP, Dimitrakoulis N, Bufidis T, Benos A, (1995):**  
Clinical features of exfoliation syndrome in Greek cataract patients.  
Klin Monatsbl Augenheilkunde 206, Suppl. 2: 5.
59. **Kozobolis VP, Detorakis ET, Tsilimbaris M, Siganos DS, Vlachonikolis IG, Pallikaris IG (2000):**  
Crete, Greece glaucoma study.  
J Glaucoma 9: 143-149.

60. **Krause U, Tarkkanen A (1978):**  
Cataract and pseudoexfoliation. A clinicopathological study.  
Acta Ophthalmol (Copenh.) 56: 329- 335.
61. **Küchle M, Ho TS, Nguyen NX, Hannappel E, Nauman GOH (1994a):**  
Protein quantification and electrophoresis in aqueous humor of pseudo-  
exfoliation eyes.  
IOVS 35: 748-752.
62. **Küchle M, Nguyen NX, Hannappel E, Beck W, Ho ST, Naumann GOH (1994b):**  
Tyndallometrie mit dem Laser-flare-cell-Meter und biochemische Prote-  
inbestimmung im Kammerwasser bei Augen mit Pseudoexfoliations-  
syndrom.  
Ophthalmologie 91: 578-584.
63. **Küchle M, Schönherr U, Dieckmann U, "Erlanger Augenblätter-  
Gruppe" (1989):**  
Risikofaktoren für Kapselruptur und Glaskörperverlust bei extrakapsulä-  
rer Kataraktextraktion.  
Fortschr Ophthalmology 86: 417-421.
64. **Lerche W, Wulle KG (1969):**  
Electron microscopic studies on the development of the human lens.  
Ophthalmologica 158: 296-309.
65. **Lim MC, Doe EA, Vroman DT, Rosa RH Jr, Parrish RK 2nd (2001):**  
Late onset lens particle glaucoma as a consequence of spontaneous  
dislocation of an intraocular lens in pseudoexfoliation syndrome.  
Am J Ophthalmology 132: 261-263.
66. **Lindberg JG (1917):**  
Kliniska undersökningar över depigmentering av pupillaranden odr ge-  
nomlysbarhet av iris vid fall av alderstarr samt i normala ögon hos  
gamla personer.  
Inaug Diss Helsingfors.
67. **Liu CS, Wormstone IM, Duncan G, Marcantonio JM, Webb SF, Da-  
vies PD (1996):**  
A study of human lens cell growth in vitro. A model for posterior capsule  
opacification.  
Invest Ophthalmol Vis Sci 37(5): 906-914.
68. **Lumme P, Laatikainen L (1993):**  
Exfoliation Syndrome and cataract Extraction. Am. J Ophthalmol. 116:  
51-55; and: The anatomy and development of the human lens and  
zonules.  
Trans Ophthalmol Soc UK 102: 423-440.
69. **Mann I (1964):**  
The development of the human eye.  
3<sup>rd</sup> edition, New York: Grune and Stratton.
70. **McAvoy JW, Chamberlain CG, de Longh RU, Richardson NA, Lovicu  
FJ (1991):**  
The role of fibroblast growth factor in the eye lens development.  
Ann NY Acad Sci 638: 256-274.

71. **Menkhaus S, Motschmann M, Kuchenbecker J, Behrens-Baumann W (2000):**  
Pseudoexfoliation (PEX) syndrome and intraoperative complications in cataract surgery.  
Klin Monatsbl Augenheilkunde 216: 388-392.
72. **Merkur A, Damji KF, Mintsioulis G, Hodge WG (2001):**  
Intraocular pressure decrease after phacoemulsification in patients with pseudoexfoliation syndrome.  
J Cataract Refract Surg 27: 528-532.
73. **Meyer E, Haim T, Zonis S, Gidoni O, Gitay H, Levanon D, Nir I (1984):**  
Pseudoexfoliation: Epidemiology, clinical and scanning electron microscopy study.  
Ophthalmologica 188: 141-147.
74. **Missler, M, Wolff AJR, Rothe H, Heger W, Merker HJ, Treiber A, Scheid R, Crook GA (1992):**  
Developmental Biology of the common marmoset-proposal for a post-natal staging.  
J Med Primatol 21: 285-298.
75. **Miyake K, Matsuda M, Inaba M (1989):**  
Corneal endothelial changes in pseudoexfoliation syndrome.  
Am J Ophthalmol 108: 49-52.
76. **Moreno J, Duch S, Lajara J (1993):**  
Pseudoexfoliation syndrome: Clinical factors related to capsular rupture in cataract surgery.  
Acta Ophthalmol 71: 181-184.
77. **Mohann PS, Spiro RG (1986):**  
Macromolecular organization of basement membranes. Characterization and comparison of glomerular basement membrane and lens capsule components by immunochemical and lectin affinity procedures.  
J Biol Chem 261: 4328-4336.
78. **Meretoja J, Tarkkanen A (1975):**  
Pseudoexfoliation syndrome in familial systemic amyloidosis with lattice corneal dystrophy.  
Ophthalmic Res 9: 80-91.
79. **Morisson JC, Green WR (1988):** Light microscopy of the exfoliation syndrome.  
Acta Ophthalmol 66: Suppl. 184: 5-27.
80. **Nagashima RJ (2004):**  
Decreased incidence of capsule complications and vitreous loss during in eyes with pseudoexfoliation syndrome.  
J Cataract Refr Surg 30(1): 127-131.
81. **Naumann GOH, Kühle M, Schönherr U, „Erlanger Augenblätter-Gruppe“ (1989):**  
Pseudoexfoliationssyndrom als Risikofaktor für Glaskörperverlust bei der extrakapsulären Kataraktextraktion.  
Fortschr Ophthalmology 86: 543-545.

82. **Naumann GOH, Schlötzer-Schrehardt U, Küchle M (1998):**  
Pseudoexfoliation syndrome for the comprehensive ophthalmologist. Intraocular and systemic manifestations. *Ophthalmology* 105: 951-968.
83. **Ohrloff C (1994):**  
Die Bedeutung der intakten Hinterkapsel für den Glaskörper. Komplikationen nach hinterer Kapsulotomie. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 205: 181-186.
84. **Ong MD, Payne DM, Garner MH (2003):**  
Differential protein expression in lens epithelial whole-mounts and lens epithelial cell cultures. *Exp Eye Res* 77(1): 35-49.
85. **Orhan M, Karadeniz S, Erdener U, Ircec M (1995):**  
Complications of extracapsular cataract extraction in patients with pseudoexfoliation syndrome. *Eur J Implant Ref Surg* 7: 2-5.
86. **Ota I, Miyake S, Miyake K (1996):**  
Dislocation of the lens nucleus into the vitreous cavity after standard hydrodissection. *Am J Ophthalmology* 121: 706-708.
87. **Okamura R, Futa R, Shimizu T (1988):**  
Klinische und morphologische Untersuchungen über das Kapselhäutchenglaukom in Japan. *Fortschr Ophthalmology* 85: 607-610.
88. **Pau H (2006):**  
Cortical and subcapsular cataracts: Significance of physical forces. *Ophthalmologica* 220: 1-5.
89. **Perry MM, Tassin J, Courtois YA (1979):**  
A comparison of human lens epithelial cells in situ and in vitro in relation to aging: an ultrastructural study. *Exp Eye Res* 28: 327-341.
90. **Raitta C, Setälä K (1986):**  
Intraocular lens implantation I exfoliation syndrome and capsular glaucoma. *Acta Ophthalmol* 64: 130-133.
91. **Repo LP, Naukkarinen A, Paljärvi L, Teräsvirta ME (1996):**  
Pseudoexfoliation syndrome with poorly dilating pupil: a light and electron microscopic study of the sphincter area. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmology* 234: 171-176.
92. **Repo LP, Teräsvirta ME, Tuovinen EJ (1990):**  
Generalized peripheral iris translucence in the pseudoexfoliation syndrome. *Ophthalmology* 97: 1027-1029.
93. **Ringvold A, Husby G (1973):**  
Pseudoexfoliation material-an amyloid-like substance. *Exp Eye Res* 17: 289-299.

94. **Rinaudo JA, Zelenka PS (1992):**  
Expression of c-fos and c-jun mRNA in the chicken lens: relationship to cell proliferation, quiescence, and differentiation.  
Exp Eye Res 199: 147-153.
95. **Ritch R, Schlötzer-Schrehardt U (2001):**  
Exfoliation syndrome.  
Surv Ophthalmology 45(4): 265-315.
96. **Ritch R, Schlötzer-Schrehardt U, Konstas AGP (2003):**  
Why is glaucoma associated with exfoliation syndrome?  
Progr Ret Eye Res 22: 253-275.
97. **Saari KM, Seppälä HS, Guillén-Monterrubio O, Hartikainen J, Nevalainen TJ (1995):**  
Phospholipase A2 content of aqueous humour in cataract patients.  
Acta Ophthalmology Scand 73: 145-147.
98. **Saatci OA, Ferliel ST, Ferliel M, Kaynak S, Ergin MH (1999):** Pseudoexfoliation and glaucoma in eyes with retinal vein occlusion. Int Ophthalmology 23: 75-78.
99. **Sandilands A, Prescott AR, Carter JM, Hutcheson AM, Quinlan RA, Richards J, FitzGerald PG (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.
100. **Schönherr U, Kuchle M, Händel A, Lang GK, Naumann GOH (1990):**  
Pseudoexfoliationssyndrom mit und ohne Glaukom als ernstzunehmender Risikofaktor bei der extrakapsulären Kataraktextraktion.  
Fortschr Ophthalmology 87: 588-590.
101. **Schlötzer-Schrehardt U, Naumann GOH (2004):** Pseudodexfoliationsglaukom. In: Schlote T, Rohrbach JM. Sekundärglaukome, Shattauer, Stuttgart, p. 177-190.
102. **Schlötzer-Schrehardt U, Naumann GOH (1994):**  
A histopathologic study of zonular instability in pseudoexfoliation syndrome.  
Am J Ophthalmology 118: 730-743
103. **Schlötzer-Schrehardt UM, Dörfler S, Naumann GOH (1993):**  
Corneal endothelial involvement in pseudoexfoliation syndrome.  
Arch Ophthalmology 111: 666-674.
104. **Schlötzer-Schrehardt U, Zenkel M, Kuchle M, Sakai LY, Naumann GOH (2001):**  
Role of transforming growth factor-beta1 and its latent form binding protein in pseudoexfoliation syndrome.  
Exp Eye Res 73: 765-780.
105. **Schlötzer-Schrehardt U, Naumann GOH (1994):**  
A histopathologic study of zonular instability in pseudoexfoliation syndrome.  
Am J Ophthalmology 118: 730-743

106. **Schlötzer-Schrehardt U, Dörfler S, and Naumann GOH (1992a):**  
Immunohistochemical localization of basement membrane components in pseudoexfoliation material of the lens capsule.  
Curr Eye Res 11: 343-355.
107. **Serguhn S, Spiegel D (1999):**  
Comparison of postoperative recovery after trabeculectomy for pseudoexfoliation glaucoma and chronic primary open angle glaucoma.  
Klin Monatsbl Augenheilkunde 215: 281-286.
108. **Shingleton BJ, Gamell LS, O'Donoghue MW, Baylus SL, King R (1999):**  
Long-term changes in intraocular pressure after clear corneal phacoemulsification: normal patients versus glaucoma suspect and glaucoma patients.  
J Cataract Refr Surg 25: 885-890.
109. **Singleton BJ, Heltzer J, O'Donogue MW (2003):**  
Outcomes of phacoemulsification in patients with and without pseudoexfoliation syndrome.  
J Cataract Refr Surg 29(6): 1080-1086.
110. **Skuta GL, Parrish II RK, Hodapp E, Forster RK, Rockwood EJ (1987):**  
Zonular dialysis during extracapsular cataract extraction in pseudoexfoliation syndrome.  
Arch Ophthalmology 105: 632-634.
111. **Sowka J (2004):**  
Pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliative glaucoma.  
Optometry 75: 245-250.
112. **Sood GC, Sofat BK, Mehrotra SK, Chandel RD (1973):**  
Capsular exfoliation syndrome.  
Brit J Ophthalmology 57: 120-124.
113. **Streeten BW, Li ZY, Wallace RN, Eagle RC, Keshgegian AA (1992):**  
Pseudoexfoliative Fibrilopathy in visceral organs of a patient with pseudoexfoliation syndrome.  
Arch Ophthalmology 110: 1757-1762.
114. **Streeten BW (1993):**  
Aberrant synthesis and aggregation of elastic tissue components in pseudoexfoliation fibrilopathy: a unifying concept.  
New Trends Ophthalmology 8: 187-196.
115. **Stupp T, Thanos S (2005):**  
Can lenticular factors improve the posttrauma fate of neurons?  
Progr Ret Eye Res 24: 241-257.
116. **Sveinsson Ö (1992):**  
Fibrilopathy in a pseudophakic eye.  
Acta Ophthalmol 70: 806-813
117. **Tanihara H, Negi A, Akimoto M, Terauchi H, Okudaira A, Kozaki J, Takeuchi A, Nagata M (1993):**  
Surgical effects of trabeculotomy ab externo on adult eyes with primary

- open angle glaucoma and pseudoexfoliation syndrome.  
Arch Ophthalmology 111: 1653-1661.
118. **Tarkkanen AHA (1986):**  
Exfoliation syndrome.  
Trans Ophthalmol Soc UK 105: 233-236.
  119. **Tarkkanen A (1962):**  
Pseudoexfoliation of the lens capsule: a clinical study of 418 patients with special reference to glaucoma, cataract and changes in the vitreous.  
Acta Ophthalmol 71 (Suppl) 1-98.
  120. **Tripathi RC, Tripathi BJ (1983):**  
Lens morphology, aging and cataract.  
J Gerontol 38: 258-270.
  121. **Vogt A (1925):**  
Ein neues Spaltlampenbild des Pupillengebietes: hellblauer Pupillensaumfilz mit Häutchenbildung auf der Linsenvorderkapsel.  
Klin Monatsbl Augenheilkunde 75: 1-12.
  122. **Von der Lippe I, Küchle M, Naumann GOH (1993):**  
Pseudoexfoliation syndrome as a risk factor for acute ciliary block angle closure glaucoma. Acta Ophthalmol 71: 277-279.
  123. **Wedrich A, Menapace R, Radax U, Papapanos P, Amon M (1992):**  
Combined small-incision cataract surgery and trabeculectomy - technique and results.  
Int Ophthalmology 16: 409-414.
  124. **Wollensak J, Becker HU, Seiler T (1992):**  
Pseudoexfoliation syndrome and glaucoma.  
German J Ophthalmology 1: 32-34.
  125. **Yang HK, Kline OR (1983):**  
Posterior chamber Lens Implant Surgery.  
New York, Raven Press, 21 ff.
  126. **Yüksel N, Karabas VL, Arslan A, Demirci A, Caglar Y (2001):**  
Ocular hemodynamics in pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliation glaucoma.  
Ophthalmology 108: 1043-1049.
  127. **Yalaz M, Othman I, Nas K, Eroglu A, Homurlu D, Cikintas Z, Ashouri A (1992):**  
The frequency of pseudoexfoliation syndrome in the eastern Mediterranean area of Turkey.  
Acta Ophthalmol 70: 209-213.
  128. **Zetterström, Olivestedt G, Lundvall A (1992):**  
Exfoliation syndrome and extracapsular cataract extraction with implantation of posterior chamber lens.  
Acta Ophthalmol 70: 85-90.

## Danksagung

Besonders danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. Solon Thanos für die Überlassung des Themas, die wertvollen Hinweise und die Möglichkeit, die Arbeit an seinem Institut unter optimalen Bedingungen durchführen zu können.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Ophthalmologie für die Vorbereitung und Herstellung der Histologie-Präparate, die zur Auswertung kamen.

Den Mitarbeitern des Instituts für Reproduktionsmedizin sei gedankt, dass sie dem Institut für Experimentelle Ophthalmologie die Gewebe zur Verfügung gestellt haben.

## Lebenslauf

Name: Bolis

Vorname: Georgios

Adresse: Heinrich-Reinköster-Str. 10  
59065 Hamm

Geburtsort: Boubala-Larissas / Griechenland

Familienstand: geschieden

Schulbildung: 1955-61: Grundschule in Boubala-Larissas  
1961-66: Gymnasium und Lyzeum in Ellassona  
1966-67: Erlernen der Italienischen Sprache  
im Instituto Italiano in Perugia / Italien

Studium: 1967-68: Tiermedizin Universität von Messina / Italien  
1968-74: Wechsel zur med. Fakultät in Thessaloniki,  
Diplomabschluss Zahnmedizin

Wehrdienst: 1975-1977

Studium (Fortsetzung) 1997-2002: Zahnmedizin im WWU Münster

Berufstätigkeit: 1978-81: Assistenzarzt bei Herrn Dr. Schwarzenstein  
in Hamm

1982 bis heute: Niedergelassener Zahnarzt in eigener  
Praxis in Hamm

Januar 2004 bis Dezember 2007:  
Freier Mitarbeiter und Doktorand im  
Institut für Experimentelle Ophthalmologie  
der WWU Münster

Hamm, 14. April 2008