

Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Aus dem Institut für Klinische Physiologie
Geschäftsführender Direktor:
Prof. Dr. med. Michael Fromm

**Proteinbiochemischer Nachweis der Expressierung
von Myosin und Myosin-Light-Chain-Kinase in
Trabekelwerkzellen des Auges**

Inaugural–Dissertation
zur Erlangung der
Medizinischen Doktorwürde
der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Sebastian Schlott
Kassel
2003

Referent: Prof. Dr. med. Michael Wiederholt

Korreferent: Prof. Dr. med. Hans Georg Baumgarten

Gedruckt mit Genehmigung der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 03. September 2004

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Geschichte der Glaukomforschung	1
1.2	Definition des Glaukoms	1
1.3	Einteilung der Glaukomerkrankungen	2
1.4	Epidemiologie des Glaukoms	3
1.5	Histologischer Aufbau des Kammerwinkels	3
1.6	Physiologie des Kammerwassers	4
1.7	Befunde beim Primären Offenwinkelglaukom (POWG)	4
1.8	Bedeutung des erhöhten Augeninnendruckes beim POWG	4
1.9	Pathophysiologie des erhöhten Augeninnendruckes	5
1.10	Senkung des Augeninnendruckes als Therapie beim POWG	6
1.11	Bedeutung des Trabekelwerks in der Glaukomtherapie	6
1.12	Ziel der Arbeit	7
2	MATERIAL UND METHODEN	8
2.1	Molekularbiologische Untersuchungen	8
2.1.1	Zellmaterialien	8
2.1.2	Gewebepräparation	8
2.1.2.1	Präparation humanen Gewebes	8
2.1.2.2	Präparation bovinen Gewebes	8
2.1.3	Zellkultivierung	10
2.1.4	Zellstimulation	10
2.1.5	Zelllysierung	10
2.1.5.1	Lysierung kultivierter Zellen	11
2.1.5.2	Lysierung nativer Gewebe	11
2.1.6	Proteinquantifizierung	11
2.1.7	Immunopräzipitation (IP)	12
2.1.8	Gelelektrophorese	13

2.1.9	Western-Blotting	14
2.1.10	Immunologische Proteinmarkierung	15
2.1.11	Membranstripping	17
2.1.12	Kopräzipitation	17
2.1.13	Auswertung	17
2.1.14	Verwendete Lösungen	18
2.1.15	Bezugsquellen von Chemikalien und Antikörpern	19
2.2	Funktionelle Untersuchungen: Kontraktilität	21
2.2.1	Herkunft und Präparation der Gewebematerialien	21
2.2.2	Messvorrichtung	22
2.2.2.1	Kraft-Längen-Messer	22
2.2.2.2	Perfusionssystem	23
2.2.3	Durchführung der Messung	24
2.2.4	Statistische Auswertung und Darstellung der Messdaten	24
2.2.5	Auswertung	25
2.2.6	Verwendete Lösungen	25
2.2.7	Verwendete Pharmaka	25
3	ERGEBNISSE	26
3.1	Ergebnisse molekularbiologischer Experimente	26
3.1.1	Gewebsuntersuchungen zum Nachweis von glattmuskulärem Myosin	26
3.1.1.1	Kultiviertes humanes Trabekelwerk (k-HTM)	26
3.1.1.2	Kultiviertes bovines Trabekelwerk (k-BTM)	27
3.1.1.3	Natives bovines Trabekelwerk (n-BTM)	28
3.1.2	Gewebsuntersuchungen zum Nachweis von Myosin-Light-Chain- Kinase	28
3.1.2.1	Kultiviertes humanes Trabekelwerk	28
3.1.2.2	Natives humanes Trabekelwerk (n-HTM)	29
3.1.2.3	Kultiviertes bovines Trabekelwerk	30
3.1.2.4	Natives bovines Trabekelwerk	32
3.1.2.5	Nativer boviner Ziliarmuskel (n-BZM)	33
3.1.3	Kopräzipitation von Myosin-Light-Chain-Kinase und Myosin	34
3.1.3.1	Experimente mit kultiviertem humanen Trabekelwerk	34
3.1.3.2	Experimente mit nativem bovinen Trabekelwerk	35

3.1.4	Nachweis von Phosphoserinen der Myosin-Light-Chain-Kinase	36
3.1.4.1	Kultiviertes humanes Trabekelwerk	36
3.1.4.2	Natives humanes Trabekelwerk	37
3.1.4.3	Natives bovines Trabekelwerk	38
3.1.5	Versuche zum Nachweis von ROCK _{1/2} in humanem Trabekelwerk	39
3.2	Ergebnisse der Kontraktionsexperimente	40
3.2.1	Kontraktionshemmung von TM und ZM durch MLCK-Inhibitor ML-7	40
3.2.2	Hemmung ET ₁ -induzierter Kontraktionen in TM durch ML-7	41
4	DISKUSSION	44
4.1	Arbeitshypothese	44
4.2	Kontraktionsregulation in glatter Muskulatur	44
4.2.1	Kalziumunabhängiger Kontraktionsmechanismen im Trabekelwerk	44
4.2.2	Übersicht verschiedener Regulationsmechanismen der Kontraktion	46
4.2.3	Kontraktionsregulation durch Ca ²⁺ -Sensitivierung	47
4.2.3.1	Signaltransduktion über Rho-A	47
4.2.3.2	Signaltransduktion über die Proteinkinase C (PKC)	48
4.3	Das glattmuskuläre Kontraktionssystem des Trabekelwerks	49
4.3.1	Bisherige Befunde zur Unterstützung der Hypothese glattmuskelartiger Kontraktionssysteme in TM	49
4.3.2	Andere Ansätze zur Erklärung der Rolle des Trabekelwerks für den Kammerwasserabfluss	50
4.3.2.1	Veränderung von Zytoskelettstrukturen des Trabekelwerks	51
4.3.2.2	Die Rolle des Myocilin/TIGR-Protein bei der Regulation des Kammerwasserabflusses	52
4.4	Unterstützung der Hypothese glattmuskelartiger Kontraktionssysteme im Trabekelwerk durch neue Forschungsergebnisse dieser Arbeit	54
4.4.1	Das Glattmuskelmyosin	54
4.4.1.1	Molekularbiologischer Myosin-Nachweis im Trabekelwerk	55
4.4.2	Die Myosin-Light-Chain-Kinase (MLCK)	55
4.4.2.1	Molekularbiologischer Nachweis von MLCK im Trabekelwerk	55
4.4.3	Gebundenes Vorliegen von Myosin und Myosin-Light-Chain-Kinase	56

4.4.3.1	Molekularbiologischer Nachweis des gebundenen Vorliegens von Myosin und MLCK im Trabekelwerk	56
4.4.4	Phosphoserine der Myosin-Light-Chain-Kinase	56
4.4.4.1	Molekularbiologischer Nachweis von Phosphoserinen der MLCK in Trabekelwerk	57
4.4.5	Die Bedeutung von Endothelin am Trabekelwerk	57
4.4.6	Hemmung ET ₁ - und Cabachol-induzierter Kontraktion durch MLCK-Inhibitor ML-7 im TM	59
4.5	Kontraktionsregulation durch Ca²⁺-Sensitivierung im Trabekelwerk	60
4.5.1	Die Proteinkinase C (PKC)	60
4.5.2	Das Rho-A-Protein	62
4.5.3	Die Rho-Kinase (ROCK)	63
4.5.3.1	Inhibition der ROCK	63
4.5.3.2	Versuch des molekularbiologischen Nachweises der ROCK im Trabekelwerk	64
4.5.4	Die Myosin-Light-Chain-Phosphatase (MLCP)	64
4.5.5	Myosin-Light-Chain-Kinase als Gegenspieler der MLCP	65
4.6	Proteinnachweise in bovinem TM zur Bestätigung der Aussagen verschiedener Kontraktionsexperimente	66
4.7	Inhibitionsmöglichkeiten der durch Ca²⁺-Sensitivierung geregelten TM-Kontraktion zur Therapie des Glaukoms	67
4.8	Zukünftige Experimente	69
5	ZUSAMMENFASSUNG	71
6	LITERATURVERZEICHNIS	73
7	ANHANG	82
7.1	Abkürzungsverzeichnis	82
7.2	Danksagung	83
7.3	Veröffentlichung von Teilen der Arbeit	84
7.4	Lebenslauf	85