

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse molekularbiologischer Experimente

3.1.1 Gewebsuntersuchungen zum Nachweis von glattmuskulärem Myosin

3.1.1.1 Kultiviertes humanes Trabekelwerk (k-HTM)

k-HTM wurde auf das Vorliegen glattmuskulären Myosins mittels Westernblotanalysen untersucht.

Repräsentativ für mehrere Gesamtlysate von 4 verschiedenen HTM-Kulturen zeigt Abb. 4 eine deutliche Bande bei ca. 250 kDa. Diese tritt im 2. Antibody-only-Test (vergl. Kap. 2.1.10) nicht auf, was die Spezifität des Signals bestätigt.

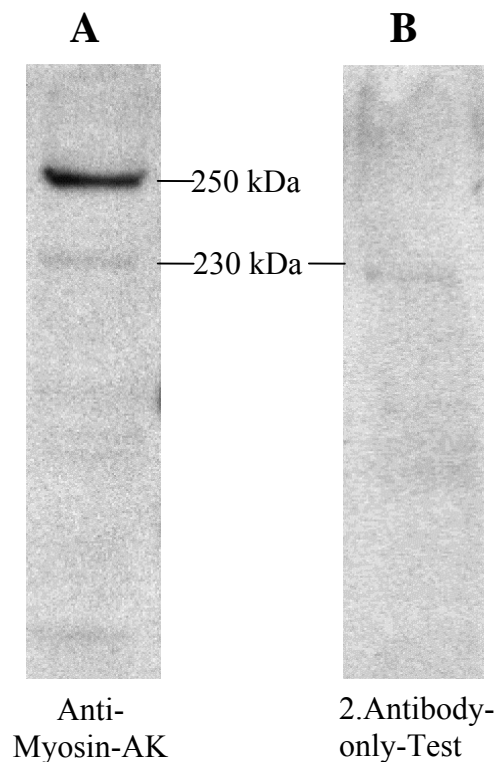


Abb. 4:

A Signalbande aus Gesamtlysate kultivierten, humanen Trabekelwerks bei ca. 250 kDa angefärbt mit AK gegen Myosin.

B Im 2. Antibody-only-Test zu A tritt das Signal bei 250 kDa nicht auf.

Gemäß den Produktinformationen der verwendeten Antikörper ist ein Signal für Myosin bei ca. 205 kDa statt bei 250 kDa erwartet worden. Demzufolge wurden Wiederholungsexperimente durchgeführt mit dem Ziel, Signalbanden auch bei ca. 205 kDa nachzuweisen. Dabei wurde der zuerst verwendete Lysepuffer gegen einen anderen ausgetauscht. Die Absicht dabei war, Leichtketten des Myosins, die zuvor eventuell nicht abgespalten worden waren und dadurch möglicherweise das Signal bei ca. 250 kDa verursacht hatten, abzulösen. Das Ergebnis änderte sich jedoch nicht.

3.1.1.2 Kultiviertes bovines Trabekelwerk (k-BTM)

Mehrere Gesamtlysate aus k-BTM wurden auf Myosin untersucht.

Repräsentativ für alle Gesamtlysate zeigt Abb. 5 Signale, die wie bei k-HTM (s.o.) in Höhe von ca. 250 kDa liegen. Weit unterhalb im Bereich von ca. 60 bis 70 kDa tritt eine unspezifische Bande auf.

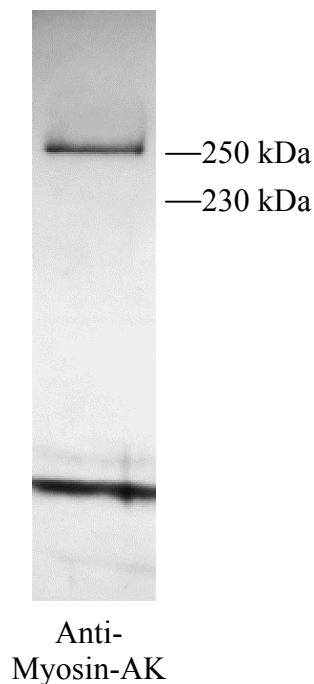


Abb. 5:

Signal bei 250 kDa aus Gesamtlysat kultivierten, bovines Trabekelwerks nach Markierung mit Antikörpern gegen Myosin. Unspezifische Bande unterhalb von 70 kDa.

3.1.1.3 Natives bovines Trabekelwerk (n-BTM)

Es wurden mehrere Gesamtlysate aus n-BTM von 3 verschiedenen Tieren auf Myosin untersucht.

Repräsentativ für alle untersuchten Gesamtlysate zeigt Abb. 6 ein deutliches Signal bei ca. 250 kDa.

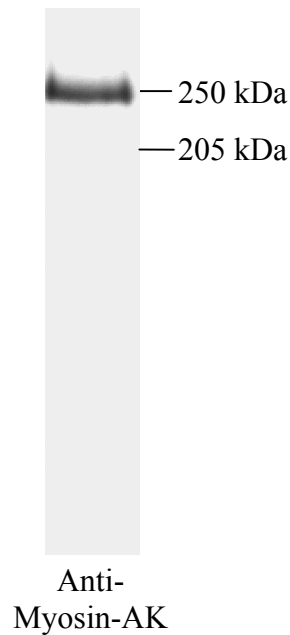


Abb. 6:

Signal bei ca. 250 kDa aus Gesamtlysate nativen, bovines Trabekelwerks nach Markierung mit Antikörpern gegen Myosin.

3.1.2 Gewebsuntersuchungen zum Nachweis von Myosin-Light-Chain- Kinase

3.1.2.1 Kultiviertes humanes Trabekelwerk

Mehrere Gesamtlysate aus insgesamt neun unterschiedlichen HTM-Kulturen wurden auf das Vorliegen von Myosin-Light-Chain-Kinase (MLCK) untersucht. Spezifische Signalbanden wurden dem Molekulargewicht der MLCK entsprechend bei ca. 160 kDa erwartet.

Abb. 7 zeigt repräsentative Ergebnisse für alle untersuchten Lysate: Bei ca. 160 kDa treten deutliche Banden hervor. Im 2.Antibody-only-Test treten im Bereich von 160 kDa keine

Banden auf, die Spezifität der detektierten Signale wird dadurch bestätigt. Undeutliche Signale weit unterhalb von 135 kDa belegen, dass alle Banden auf den mit Anti-MLCK-Antikörpern gefärbten Membranen in diesem Bereich unspezifisch sind.

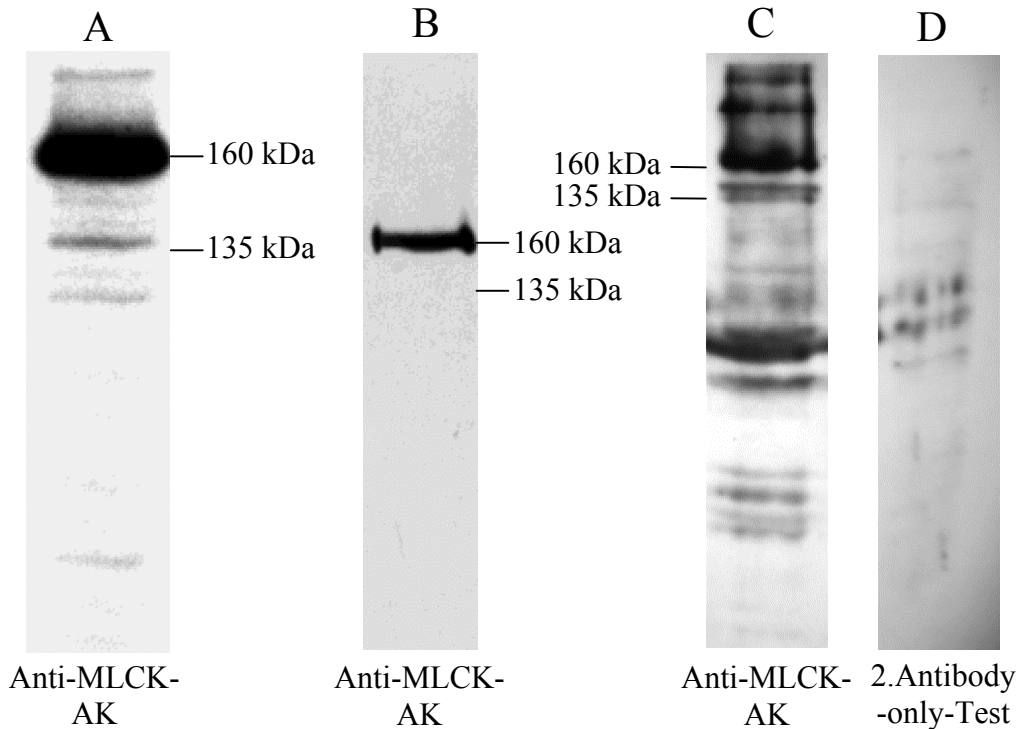


Abb. 7:

A, B und **C** zeigen Banden in Gesamtlysaten von drei verschiedenen Kulturen humanen Trabekelwerks bei 160 kDa nach Färbung mit Antikörpern gegen MLCK.

D zeigt das Ergebnis des 2. Antibody-only-Tests zu C. Die Bande in C bei 160 kDa tritt in D nicht auf. Weit unterhalb von 135 kDa sind jedoch Banden zu erkennen.

3.1.2.2 Natives humanes Trabekelwerk (n-HTM)

Es wurden 3 Gesamtlysate nativen, humanen Trabekelwerks aus 3 enukleierten Augen verschiedener Individuen auf Myosin untersucht. Repräsentativ für alle drei Gesamtlysate zeigt Abb. 3.1.2.2 Signale bei ca. 150 kDa und ca. 160 kDa. Die Banden bei ca. 150 kDa wurden

mittels Antikörpern gegen Myosin detektiert, nachdem die zuvor auf Phosphoserin der MLCK untersuchte Membran einem Membranstrip unterzogen worden war.

Der 2. Antibody-only-Test (s. Abb. 8) zeigt keine Signale im Bereich von 150 kDa oder 160 kDa, erfüllt also negativ aus und bestätigt die Spezifität der detektierten Banden.

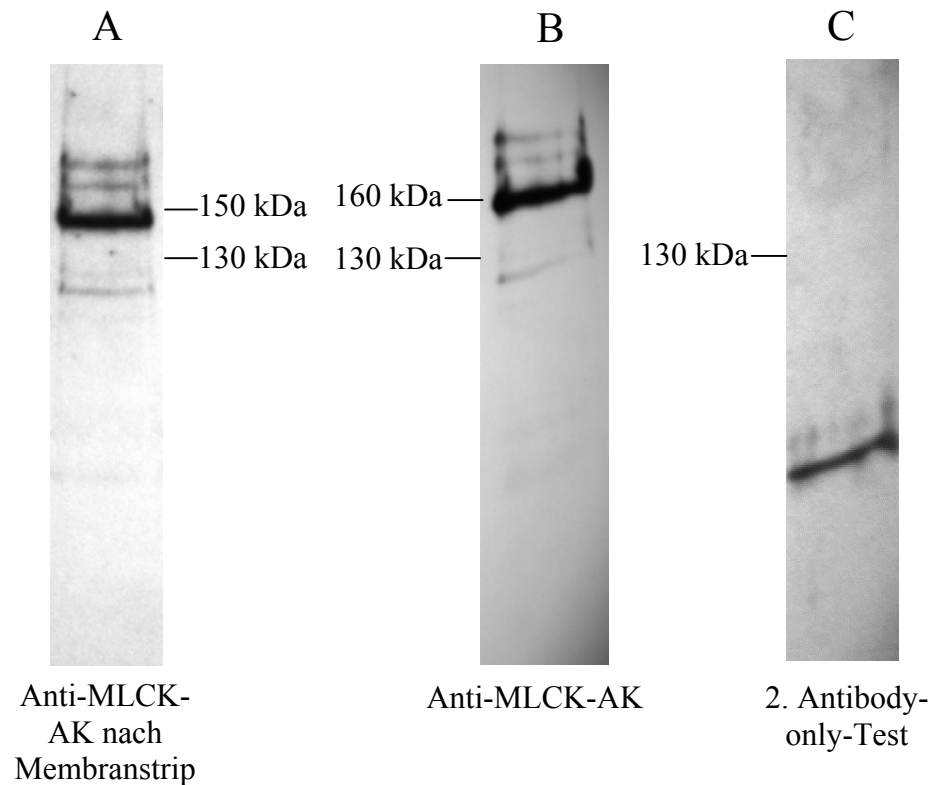


Abb. 8

A zeigt eine Bande aus einem Gesamtlysat humanen, nativen Trabekelwerks bei ca. 150 kDa. Nach Membranstrip einer zuvor auf Phosphoserin (1C8) markierten Membran erfolgte die Färbung mit Antikörpern gegen MLCK.

B zeigt ein Signal aus Gesamtlysat nativen, bovines Trabekelwerks bei ca. 160 kDa nach Färbung mit Antikörpern gegen MLCK.

C zeigt den negativ ausfallenden 2. Antibody-only-Test zu B.

3.1.2.3 Kultiviertes bovines Trabekelwerk

Es wurden mehrere Proben von zwei verschiedenen BTM-Kulturen auf das Vorliegen von MLCK untersucht. Spezifische Signale konnten nicht detektiert werden. Dies repräsentiert Abb. 9 für alle untersuchten Proben. Zum Vergleich sind Banden bei ca. 160 kDa aus Gesamtlysaten anderer TM-Typen, die als Positiv-Kontrolle im gleichen Experiment dienten,

samtlysaten anderer TM-Typen, die als Positiv-Kontrolle im gleichen Experiment dienten, gezeigt.

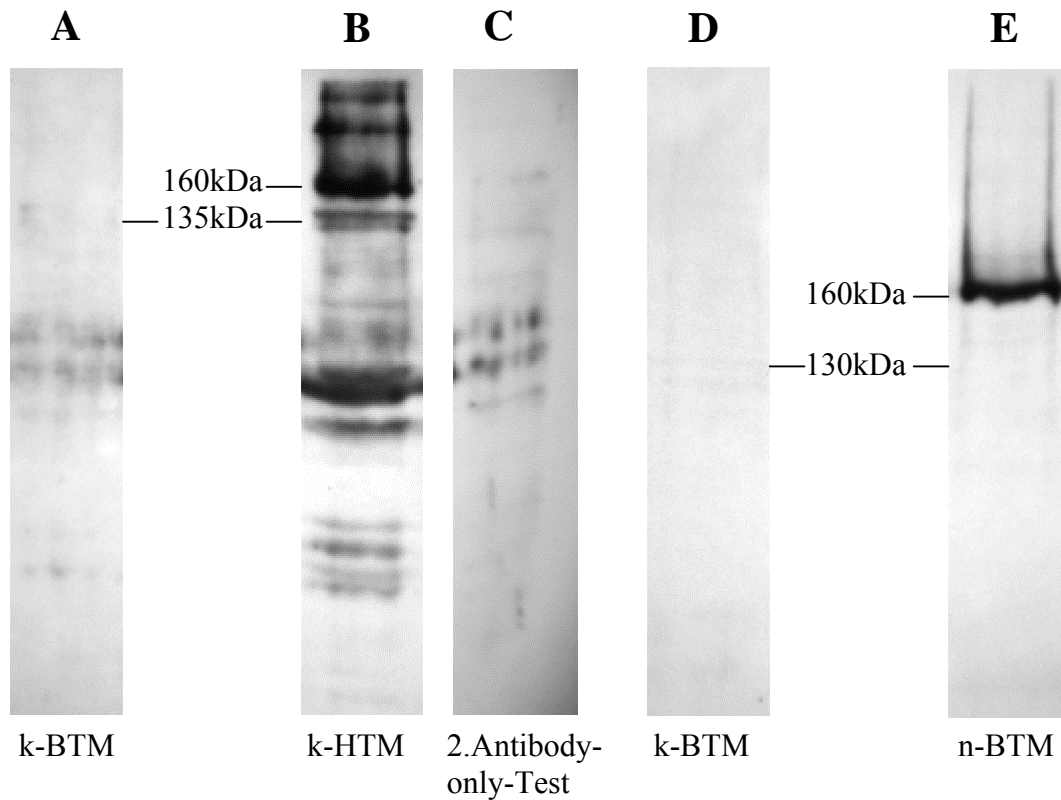


Abb. 9:

A Kultiviertes, bovines Trabekelwerk weist nach Markierung mit Antikörpern gegen MLCK keine spezifischen Signale auf.

B Als Positiv-Kontrolle auf der selben Membran wie A: Spezifisches Signal bei ca. 160 kDa aus kultiviertem, humanen Trabekelwerk.

C Der 2. Antibody-only-Test zu A und B zeigt keine Banden bei 160 kDa. Unterhalb von 135 kDa sind Signale zu erkennen.

D Kultiviertes, bovines Trabekelwerk weist keine spezifischen Signale auf.

E Als Positiv-Kontrolle auf der selben Membran wie D: Spezifisches Signal bei ca. 160 kDa aus nativem, bovinen Trabekelwerk.

3.1.2.4 Natives bovines Trabekelwerk

Es wurde natives, bovines Trabekelwerk auf das Vorliegen von MLCK untersucht. Die für alle Resultate repräsentative Abb. 10 zeigt deutliche Signale bei ca. 160 kDa aus Experimenten mit vorgeschalteter IP und ohne IP. Das Ergebnis wurde an jeweils mehreren Gesamtlisatproben aus 6 Gewebeproben von verschiedenen Rindern bestätigt.

Die Ausgangslysate wiesen unterschiedliche Proteinkonzentrationen auf, Rückschlüsse auf die Konzentration aus einem Intensitätsvergleich der detektierten Signale sind daher nicht zulässig.

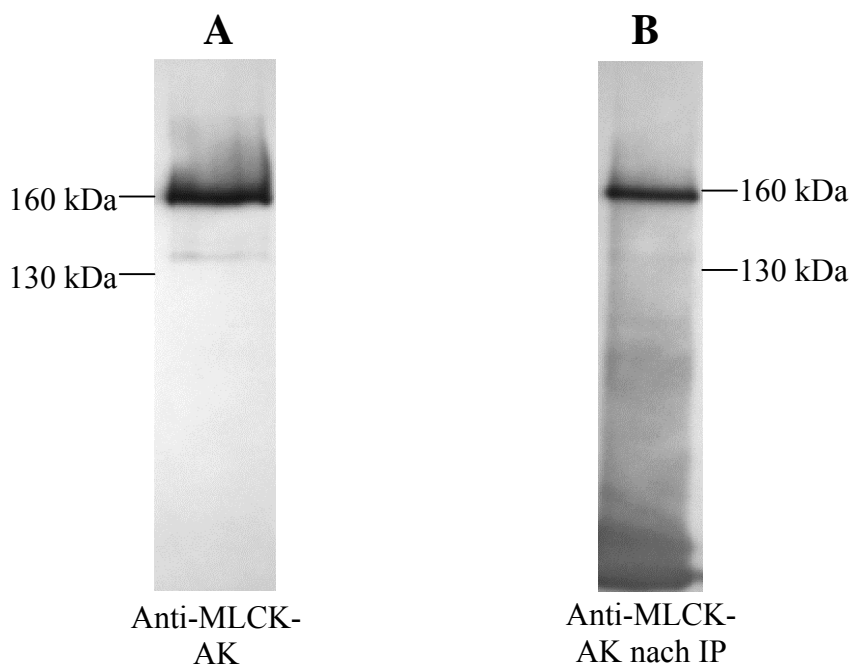


Abb. 10:

A zeigt eine Bande bei 160 kDa aus Gesamtlisat nativen bovines Trabekelwerks nach Färbung mit Antikörpern gegen MLCK.

B zeigt eine Bande bei 160 kDa aus Gesamtlisat nativen bovines Trabekelwerks nach Färbung mit Antikörpern gegen MLCK und Immunopräzipitation ebenfalls mit AK gegen MLCK.

3.1.2.5 Nativer boviner Ziliarmuskel (n-BZM)

In einem Nebenexperiment wurde ein Gesamtlysate aus nativem Ziliarmuskel eines Rinderauges auf das Vorliegen von MLCK untersucht. Abb. 3.1.2.5 zeigt ein Signal bei ca. 160 kDa aus n-BZM und daneben zum Vergleich ein Signal ebenfalls bei ca. 160 kDa aus n-BTM. Beide Gesamtlysate wiesen gleiche Proteinkonzentrationen auf, Rückschlüsse aus Intensitätsunterschieden der Banden sind hier also zulässig.

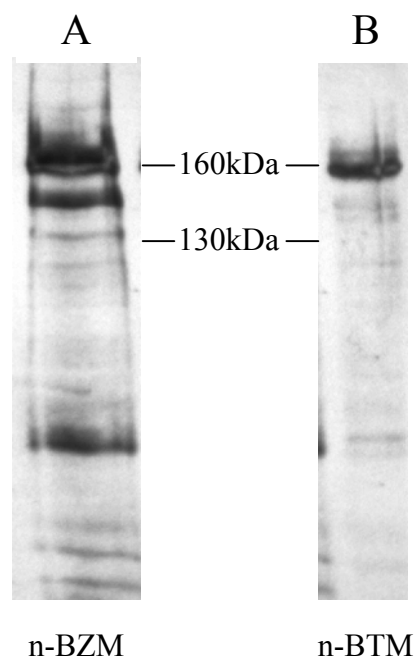


Abb. 3.1.2.5:

A Signal bei ca. 160 kDa aus Gesamtlysate nativen, bovines Ziliarmuskelgewebes nach Färbung mit Antikörpern gegen MLCK und Membranstrip der zuvor auf Phosphoserine untersuchten Membran.

B Zum Vergleich: Signal bei ca. 160 kDa aus Gesamtlysate nativen, bovines Trabekelwerks auf der selben Membran ebenfalls nach Membranstrip. Die Proteinkonzentrationen der Gesamtlysate von A und B waren gleich.

3.1.3 Kopräzipitation von Myosin-Light-Chain-Kinase und Myosin

3.1.3.1 Experimente mit kultiviertem humanen Trabekelwerk

Zum Nachweis der direkten Interaktion von Myosin und dessen Leichtkettenkinase MLCK wurde ein Experiment mit dem Ziel durchgeführt, diese beiden Proteine miteinander zu kopräzipitieren (s. dazu Kap. 2.1.12).

Es wurden zwei Gesamtlysate einer HTM-Kultur untersucht. Abb. 11 zeigt für beide Gesamtlysate deutliche Signale bei ca. 110 kDa.

Ein 2. Antibody-only-Test sprach für die Spezifität der Signale, während er für die unterhalb von 90 kDa auftretende Banden zeigte, dass diese unspezifisch sind.

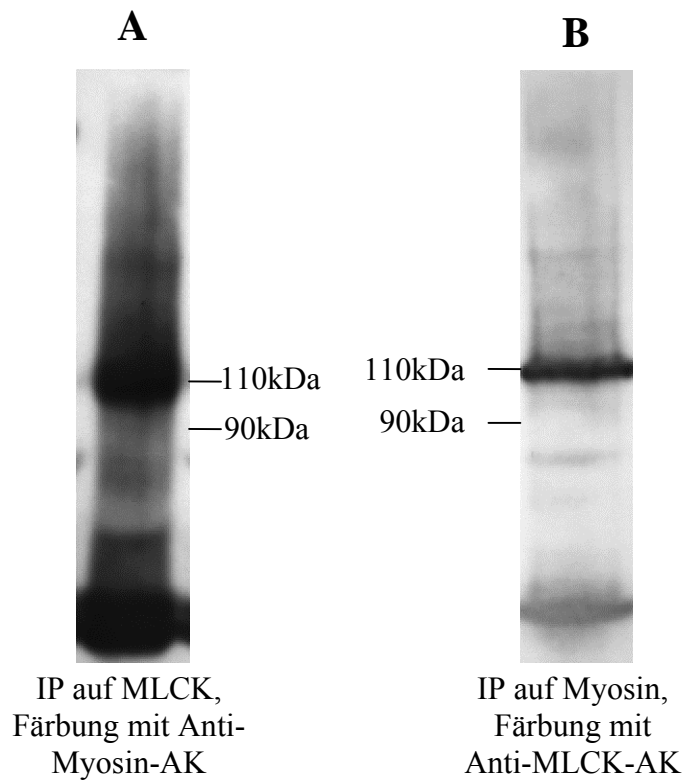


Abb. 11:

A Signal bei ca. 110 kDa aus Gesamtlysat kultivierten, humanen Trabekelwerks nach IP mit Antikörpern gegen MLCK und Färbung mit Antikörpern gegen Myosin.

B Signal bei ca. 110 kDa aus Gesamtlysat kultivierten humanen Trabekelwerks nach IP mit Antikörpern gegen Myosin und Färbung mit Antikörpern gegen MLCK.

3.1.3.2 Experimente mit nativem bovinen Trabekelwerk

Nach gleicher Methode wie k-HTM (s. o.) wurde auch n-BTM untersucht. Auch hier zeigt die Abb. 12 Signale bei ca. 110 kDa für beide Gesamtlysate.

Ein 2. Antibody-only-Test sprach dafür, dass die Banden bei 110 kDa spezifisch, die unterhalb von 90 kDa jedoch unspezifisch sind.

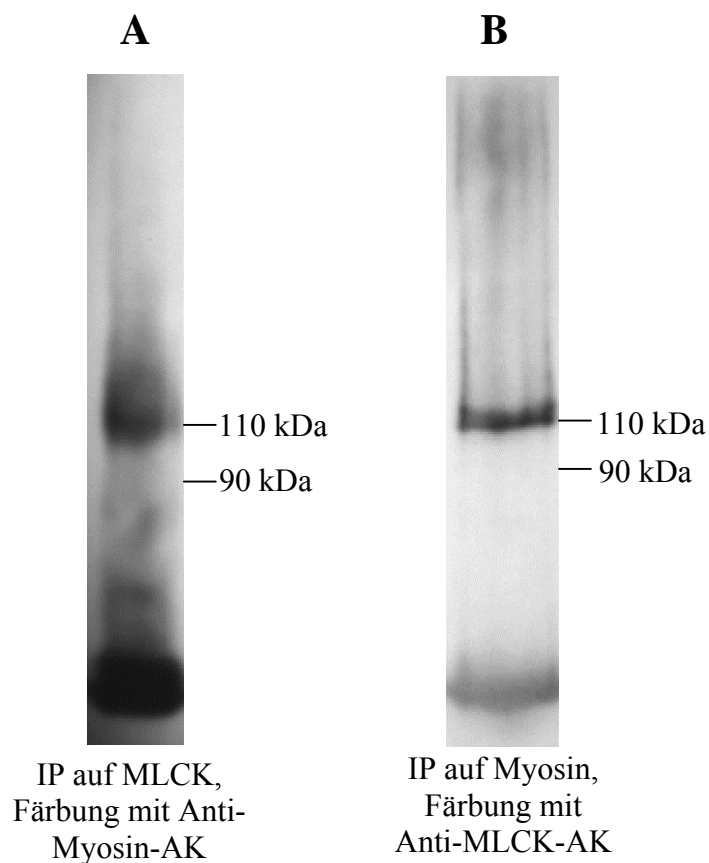


Abb. 12:

A zeigt ein Signal bei ca. 110 kDa aus Gesamtlysate nativen, bovinen Trabekelwerks nach IP auf MLCK und Färbung mit Antikörpern gegen Myosin.

B zeigt ein Signal bei ca. 110 kDa aus Gesamtlysate nativen, bovinen Trabekelwerks nach IP auf Myosin und Färbung mit Antikörpern gegen MLCK.

3.1.4 Nachweis von Phosphoserinen der Myosin-Light-Chain-Kinase

3.1.4.1 Kultiviertes humanes Trabekelwerk

Kulturen humanen Trabekelwerks wurden auf das Vorhandensein von Phosphoserinen der MLCK untersucht. Dies geschah mit Antikörpern des Klonen 1C8 gegen Phosphoserine. Signalbanden wurden wie bei MLCK in Höhe von ca. 160 kDa erwartet.

Abb. 13 zeigt Signale bei ca. 160 kDa. Sie sind repräsentativ für Untersuchungsergebnisse mehrerer Gesamtlysatsproben von 3 verschiedenen HTM-Kulturen.

Auf der abgebildeten Membran treten weitere Banden bei ca. 200 kDa auf. Da in diesem Experiment kein 2. Antibody-only-Test mitlief, kann nicht sicher belegt werden, dass letztere unspezifisch sind.

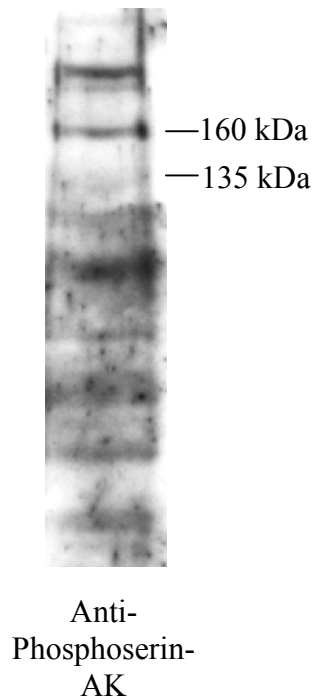


Abb. 13:

Die Abb. zeigt ein Signal bei ca. 160 kDa aus Gesamtlysat kultivierten humanen Trabekelwerks nach Färbung mit Antikörpern gegen Phosphoserin. Bei ca. 200 kDa sind weitere Banden zu erkennen, deren Spezifität fraglich ist.

3.1.4.2 Natives humanes Trabekelwerk

Die Untersuchung mehrerer n-HTM-Gesamtlysate aus Gewebe von zwei enukleierten Augen zum Nachweis von Phosphoserinen ergab folgende Ergebnisse: Abb. 14 zeigt deutliche Banden bei ca. 150 kDa. Der 2. Antibody-only-Test weist nach, dass alle Banden im Bereich unter 135 kDa als unspezifisch einzustufen sind. Im Bereich von 150 kDa zeigt er keine Signale, was die Spezifität der 150 kDa-Banden bestätigt.

Die abgebildete Membran wurde nach Detektion der obigen Ergebnisse einem Membranstrip unterzogen und anschließend mit Antikörpern gegen MLCK markiert. Wiederum ließ sich ein Signal bei ca. 160 kDa detektieren (s. Abb.), das im Muster dem ersten ähnelte.

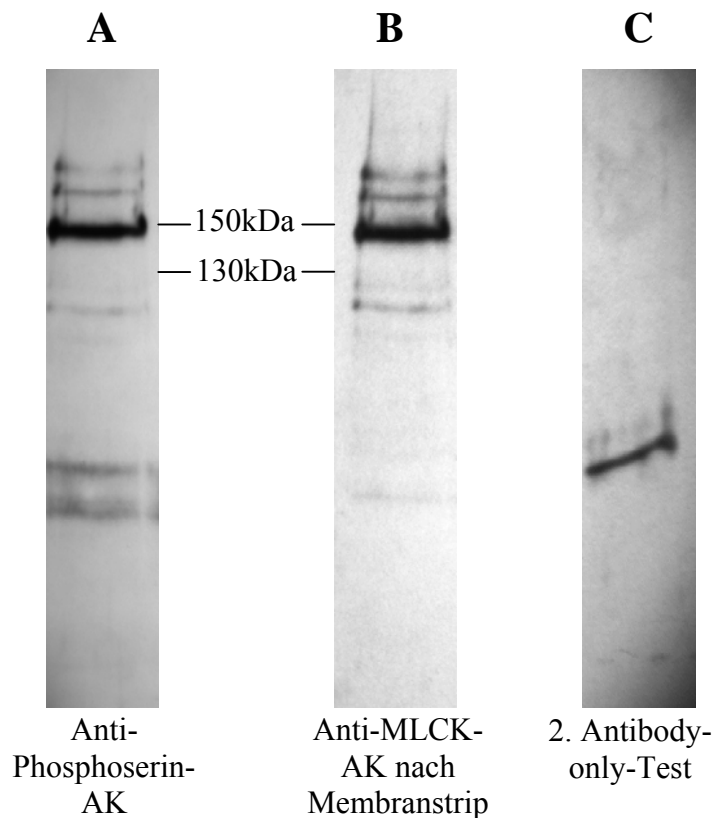


Abb. 14:

A zeigt ein deutliches Signal bei ca. 150 kDa aus Gesamtlysat von nativem, humanen Trabekelwerk.

B zeigt zum Vergleich die Membran von A nach Membranstrip und neuer Markierung mit Antikörpern gegen MLCK.

C Der 2. Antibody-only-Test zeigt Signale unterhalb von 135 kDa und weist im Bereich von 150 kDa keine Signale auf.

3.1.4.3 Natives bovines Trabekelwerk

Gesamtlysate nativen, bovines Trabekelwerks wurden zum Nachweis von Phosphoserinen untersucht. Abb. 15 zeigt deutliche Signale bei ca. 160 kDa. Das Ergebnis konnte für Gewebeproben aus 5 verschiedenen Tieren bestätigt werden.

Wie in n-HTM wurde auch hier ein Membranstrip mit anschließender Markierung mit Antikörpern gegen MLCK durchgeführt. Die Abbildung zeigt die dabei aufgetretene Bande, die ebenfalls bei ca. 160 kDa liegt.

Eine Kontrolle durch den 2. Antibody-only-Test fiel jeweils negativ aus.

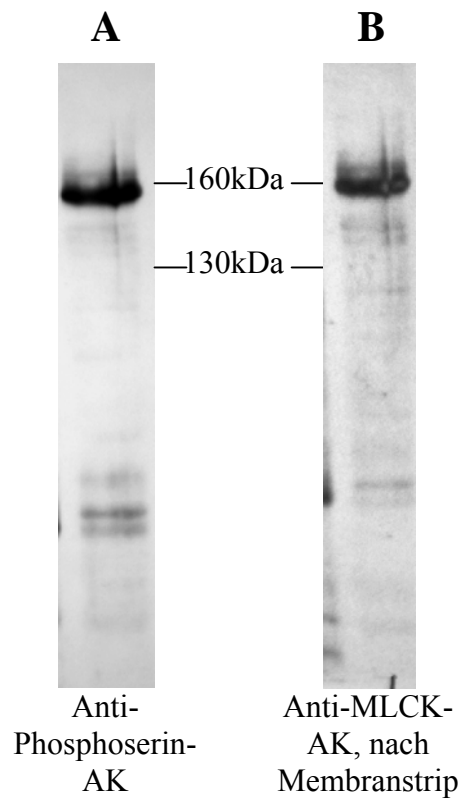


Abb. 15:

A Bande bei ca. 160 kDa aus Gesamtlysate nativen, bovines Trabekelwerks.

B Zum Vergleich: Bande bei ca. 160 kDa auf der gleichen Membran nach Membranstrip und Markierung mit Antikörpern gegen MLCK.

3.1.5 Versuche zum Nachweis von ROCK_{1/2} in humanem Trabekelwerk

Mehrere Experimente wurden durchgeführt, die Rho-Kinasesubtypen 1 und 2 (ROCK₁ und ROCK₂) im Gesamtlysat von k-HTM nachzuweisen. Dem Molekulargewicht der ROCK entsprechend wurden Signalbanden bei ca. 160 kDa erwartet.

Abb. 16 ist repräsentativ für die Ergebnisse aller Versuche: Eine Signalbande bei ca. 160 kDa tritt nicht auf. Die deutliche Bande bei ca. 200 kDa erscheint auch bei Einsatz des Blockpeptids und ist folglich als unspezifisch einzustufen.

Auch die mehrfache Variation der Antikörperkonzentrationen und die Durchführung von Immunopräzipitationen erbrachten kein spezifisches Signal.

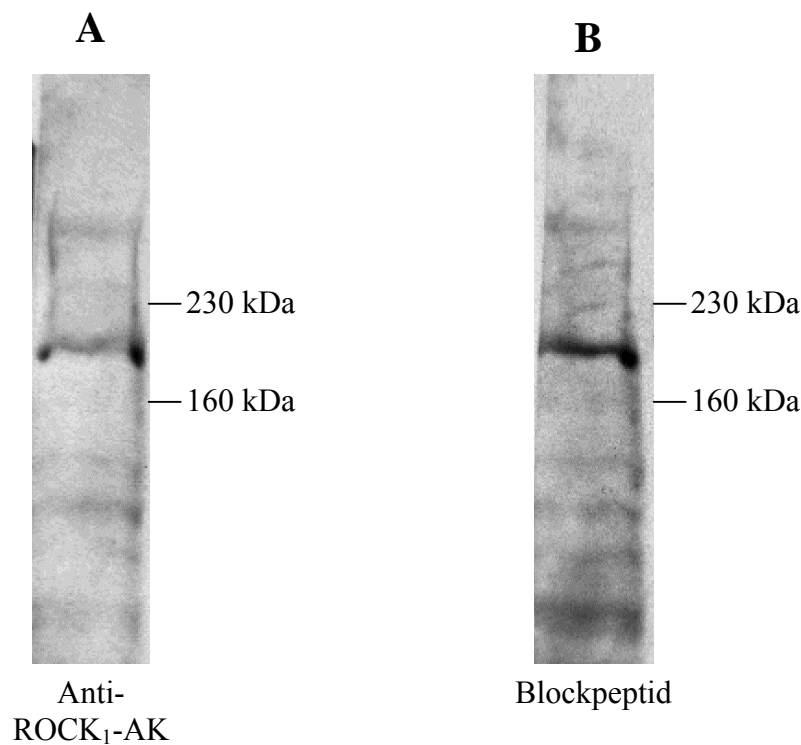


Abb. 16:

A Gesamtlysat kultivierten, humanen Trabekelwerks weist kein Signal bei 160 kDa auf, eine Bande erscheint bei ca. 200 kDa.

B zeigt die Kontrolle mit Blockpeptid, welches die Bande in A nicht unterdrücken kann.

3.2 Ergebnisse der Kontraktionsexperimente

3.2.1 Kontraktionshemmung von TM und ZM durch MLCK-Inhibitor ML-7

Das Parasympathomimetikum Carbachol induzierte eine Zunahme der Kontraktionskraft boviner TM-Streifen, die als stabiles Plateau erhalten blieb und bei Zugabe des MLCK-Inhibitors ML-7 zur Badlösung signifikant abnahm. Abb. 17 repräsentiert den durch 10^{-6} mol/l Carbachol induzierten Kontraktionsverlauf bei Zugabe von ML-7 einer Konzentration von 5×10^{-6} mol/l. Das Balkendiagramm in Abb. 18 stellt eine statistische Auswertung mit Signifikanz dar (5×10^{-6} mol/l ML-7: $74,96 \pm 7,09$ vs. 100%, n=5, $p < 0,05$ (*)).

Bei gleicher Versuchsanordnung und Verwendung von ZM-Streifen hatte die Zugabe von ML-7 einer Konzentration von 10^{-6} mol/l keinen signifikanten Effekt. Das Balkendiagramm in Abb. 19 zeigt dies (10^{-6} mol/l ML-7, n=6, $p > 0,05$ (nicht signifikant)).

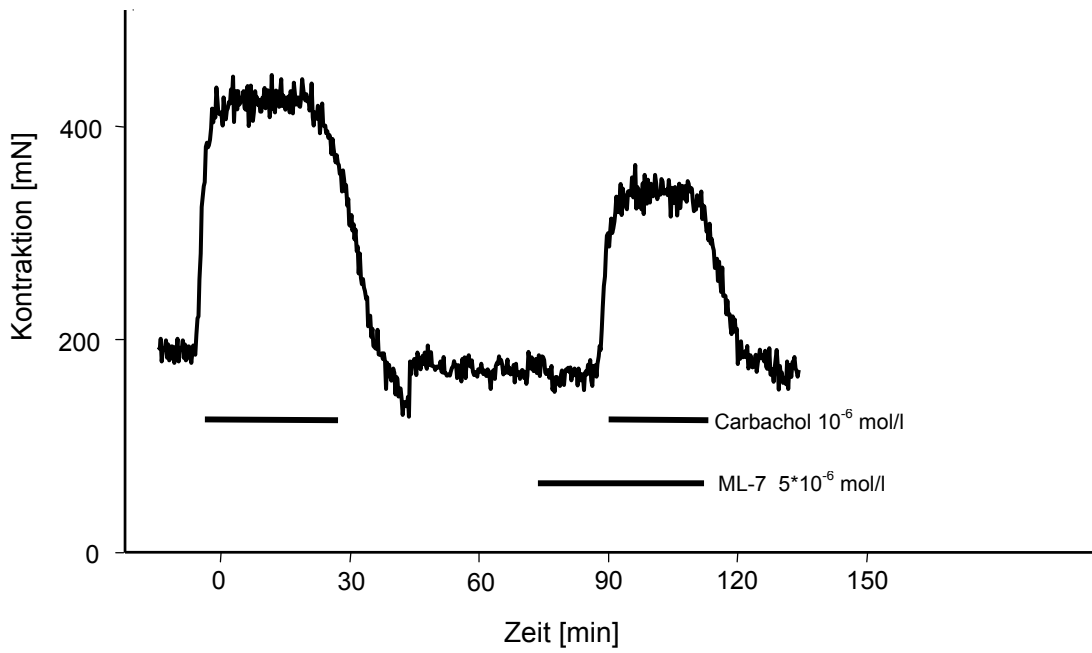


Abb. 17:

In der Kurve ist die Veränderung Carbachol-induzierter Kontraktionskraft über die Zeit aufgetragen. Ab der Zugabe von ML-7 zeigt die Kontraktion eine signifikante Abnahme.

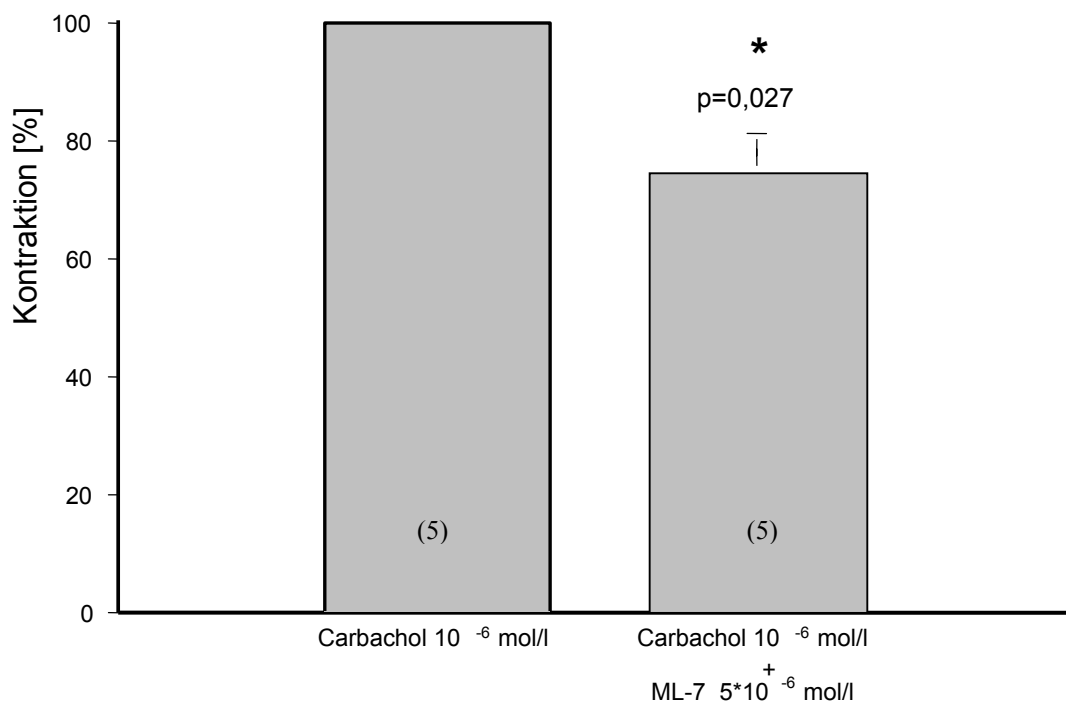


Abb. 18:

Das Balkendiagramm fasst die Mittelwerte der Kontraktionseffekte zusammen. ML-7 bewirkte eine signifikante Hemmung Carbachol-induzierter Kontraktion.

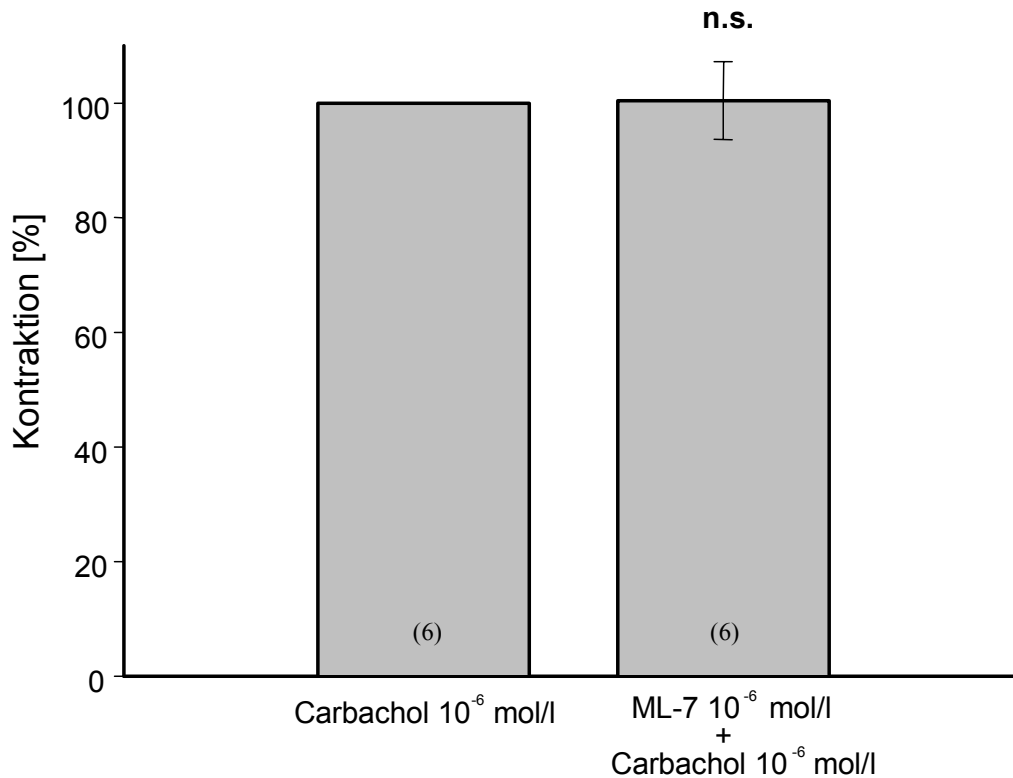


Abb. 19:

Das Balkendiagramm zeigt keine signifikante Änderung der Carbachol-induzierten Kontraktion von Ziliarmuskelgewebe nach Zugabe von ML-7.

3.2.3 Hemmung ET₁-induzierter Kontraktionen in TM durch ML-7

Unter der gleichen Versuchsanordnung wie oben induzierte ET₁ in einer Konzentration von 10⁻⁸ mol/l eine Kontraktionskraft der TM-Streifen, die ca. 69% der oben beschriebenen durch Carbachol erreichte. Durch Zugabe von ML-7 einer Konzentration von 10⁻⁶ mol/l ließ sich die ET₁-induzierte Kontraktion hemmen. Das Balkendiagramm in Abb. 20 zeigt sowohl den signifikanten Unterschied zwischen der ET₁- und der Carbachol-induzierten Kontraktion (10⁻⁸ mol/l ET₁: 69,18% ± 10,47 vs. 100%, n=7, p<0,05 (*)), als auch die signifikante Änderung der ET₁-induzierten Kontraktion bei Zugabe von ML-7 (10⁻⁶ mol/l ML-7: 35,69% ± 4,63 vs. 69,18% ± 10,47, n=7, p<0,05 (*)).

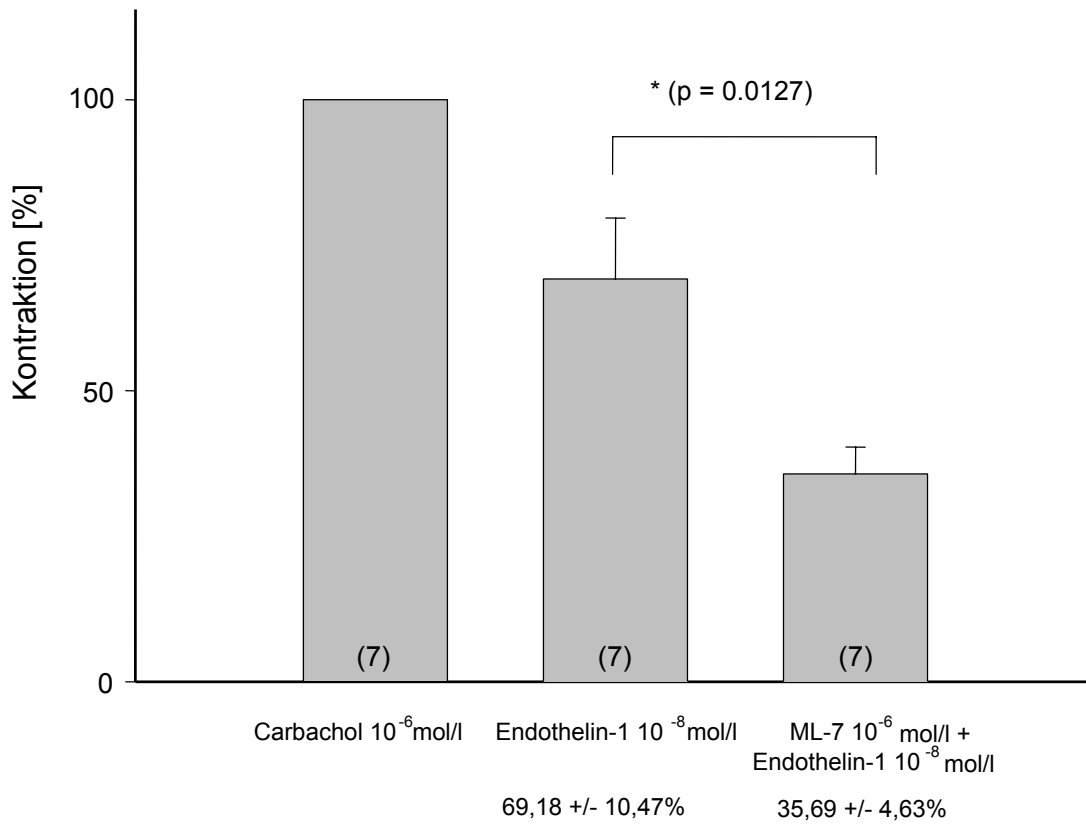


Abb. 20:

Das Balkendiagramm fasst die Mittelwerte der Kontraktionseffekte verschiedener Substanzen auf einzelne Trabekelwerksstreifen (ihre genaue Anzahl entspricht den Werten in Klammern) zusammen. Die Effekte von Endothelin-1 und ML-7 sind ins Verhältnis zur Carbachol-induzierten Kontraktion gesetzt. ML-7 bewirkte eine signifikante Abnahme der Endothelin-1-induzierten Kontraktionskraft.