

2 Material und Methoden

2.1 Kontraktionsmessungen

2.1.1 Präparation der Gewebe

Für die Kontraktionsmessungen wurde Gewebe aus Rinderaugen von einem nahen Schlachthof verwendet. Die getöteten Tiere waren zwischen zwei und vier Jahre alt. Sofort nach dem Tod wurden die Augen in eisgekühlter Ringerlösung ins Labor transportiert. Insgesamt vergingen bis zur Messung drei bis vier Stunden.

Die Präparation wurde wie bereits beschrieben durchgeführt (Lepple-Wienhues et al., 1991a). Zunächst wurde periorbitales Muskel- und Fettgewebe mit der Schere resiziert. Die Augen wurden dann ca. 10 mm hinter dem Limbus geöffnet und die hintere Hälfte verworfen. Von der vorderen Hälfte wurden mit Hilfe von Schere und Pinzette vorsichtig Glaskörper und Linse entfernt. Auf einer festen Unterlage wurde der vordere Augenabschnitt mit dem Skalpell in vier gleich große Sektoren geteilt. Die Iris des Rinderauges ist schlitzförmig. Nur die zwei gegenüberliegenden Viertel an den Seiten des Schlitzes wurden weiterverwendet, da hier der Ziliarmuskel stärker ausgeprägt ist.

Die Präparation erfolgte unter mikroskopischer Sicht, die Sektoren wurden mit Nadeln fixiert, die Kornea wies dabei nach unten. Den anatomischen Aufbau und die Schnittführung zur Präparation von Ziliarmuskel und Trabekelwerk veranschaulicht die Abbildung 2.1..

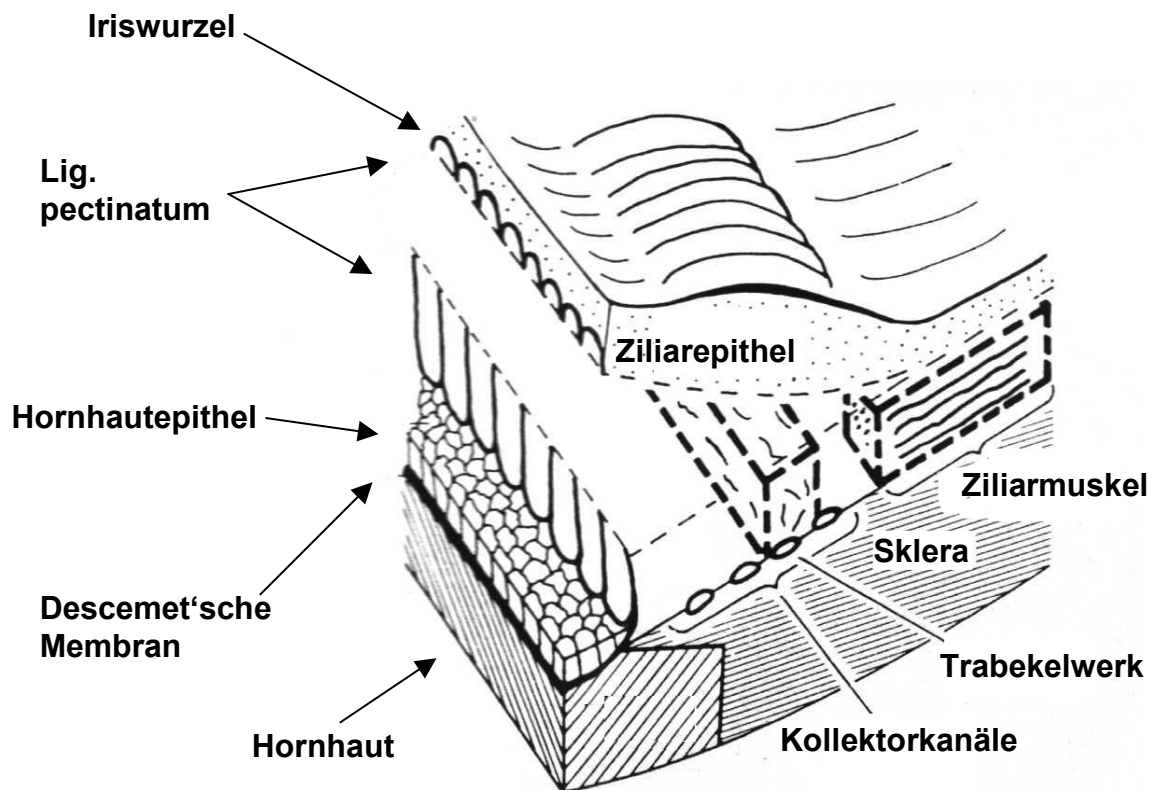


Abb. 2.1.: Präparation von Ziliarmuskel und Trabekelwerk.
 Der Trabekelwerksstreifen wurde parallel zum Hornhautrand aus der Mitte des Trabekelwerks „ausgestanzt“. Die Ziliarmuskelstreifen wurden senkrecht dazu präpariert. Aus: (Lepple-Wienhues et al., 1991a)

Zunächst war bei den zwei Sektoren nur ein Teil der Kornea sichtbar, da der Rest noch von der Iris verdeckt wurde. Das Epithel der Iris geht an der Iriswurzel in das Ziliarkörperepithel über. Trabekelwerks- und Ziliarmuskelgewebe liegen unter dem Ziliarkörperepithel. Beim Rinderauge ist die Iriswurzel am korneoskleralen Übergang durch das Ligamentum pectinatum fixiert. Um die Strukturen freizulegen, wurde als erstes das Ligamentum durchtrennt. Die Iris wurde dazu ohne Zug angehoben und zurückgezogen bis das Ligamentum zu sehen war. Durch horizontale Schnitte mit dem Skalpell wurde dann das Ziliarkörperepithel vom Trabekelwerksgewebe getrennt. Letzteres hat eine weißliche, baumwollartige Struktur und ließ sich so leicht gegen das Epithel abgrenzen. Es wurde solange nach hinten präpariert, bis die

blauschwarze Struktur des Ziliarmuskels zu sehen war. Dieser wurde durch Fortführen der horizontalen Schnitte in eine untere und eine obere Fraktion getrennt. Die obere blieb mit dem Ziliarkörperepithel und der Iris verbunden und wurde verworfen.

Der Ziliarmuskel und das Trabekelwerk waren jetzt sichtbar. Die beiden Gewebe hoben sich sowohl durch ihre Farbe, als auch durch ihren Faserverlauf voneinander ab. So verliefen die Fasern des Trabekelwerks parallel zum Rand der Kornea, die des Ziliarmuskels senkrecht dazu.

Die Ziliarmuskelstreifen wurden als erstes präpariert. Dazu wurde, dicht hinter der Grenze zum Trabekelwerk, ein senkrecht zur Faser verlaufender Schnitt ins Ziliarmuskelgewebe gesetzt, es lag jetzt locker auf der Sklera auf. Ohne Zug und ohne das Gewebe zu verschieben wurde dann ein ca. 5 mm breiter Streifen entlang des Faserverlaufs herausgeschnitten. Der entstandene Ziliarmuskelstreifen musste eine Mindestlänge von 3 - 4 mm haben, um später für die Kontraktionsmessungen geeignet zu sein.

Die Trabekelwerkstreifen wurden durch zwei parallele Schnitte aus der Mitte des Trabekelwerksgewebes ausgestanzt. Die beiden Schnitte wurden auch hier in Verlaufsrichtung der Fasern geführt. Der erste Schnitt lag etwa 0,5 mm vor dem Ansatz des Ziliarmuskels, der zweite 0,5 - 1 mm weiter in Richtung Ligamentum pectinatum. Dadurch entstand ein 0,5 - 1 mm breiter und, je nach Größe des korneoskleralen Segments, 8 - 12 mm langer Streifen. Er wurde vorsichtig von der Sklera abpräpariert und dann in zwei bis drei Stücke von 4 mm Länge geschnitten.

Die fertigen Streifen wurden bis zum Beginn der Versuche in 4°C kalter, HEPES-gepufferter Ringerlösung aufbewahrt, mit der sie schon während der Präparation ständig benetzt wurden, um ein Austrocknen zu verhindern.

2.1.2 Messapparatur

Die Messapparatur bestand aus einem System zur Perfusion und einem zur Tonusmessung. Ein Computer steuerte die Anlage und zeichnete die Messergebnisse auf (Lepple-Wienhues et al., 1991a). Mit dem Perfusionssystem konnten die Gewebestreifen in einer Kammer verschiedenen austauschbaren Lösungen ausgesetzt werden. Zur Tonusmessung wurden die Gewebestreifen

zwischen zwei Nadeln des force-length-transducers gespannt und von oben in das Lösungsbad in der Kammer gesenkt.

Durch acht parallel betriebene Einheiten konnten acht Messungen simultan durchgeführt werden.

2.1.2.1 Perfusion

Die Gewebestreifen wurden mit ca. 6 ml/min. ohne größere Strömungsturbulenzen umspült. Beim Umschalten auf eine andere Lösung war das Kammervolumen von ca. 2 ml innerhalb einer Minute zu 95 % ausgetauscht. Die Kammern und Schläuche waren doppelwandig aufgebaut. Die Umhüllung wurde mit konstant 36°C warmem Wasser durchspült, um so die Temperatur der Perfusionslösung im Inneren konstant zu halten.

Die Zufuhr der verschiedenen Lösungen erfolgte über einen Verteiler, an dem acht Schläuche zu den acht verschiedenen Kammern angeschlossen waren. Die Schläuche liefen über eine Rollerpumpe, sodass alle acht Kammern gleichmäßig mit der jeweils gleichen Lösung inkubiert wurden.

2.1.2.2 Force-length-transducer

Die isometrische Kontraktionsmessung wurde mit dem sogenannten force-length-transducer durchgeführt (siehe Abbildung 2.2.). Dieser ist ein umgebautes Drehspulinstrument, mit dem es möglich ist, Kräfte von 0,5 bis 2000 μN zu messen. Von den zwei Nadeln, zwischen denen die Gewebestreifen gespannt waren, war die eine fixiert, die andere mit dem langen Hebel des Drehspulinstruments verbunden. Der kurze Hebel befand sich in einer Lichtschranke und bewirkte eine positionsabhängige Verschattung einer Photodiode. Eine zweite Diode diente zur Subtraktion von störenden Lichtveränderungen in der Umgebung. Außerdem war die Apparatur in einem schwarzen Kasten gegen einfallendes Licht geschützt. Kontraktion bzw. Relaxation des Streifens führte zu einer Auslenkung des Hebels, welche durch die Verschattung der Photodiode registriert wurde. Dieser Auslenkung wirkte eine über einen Regelkreis bestimmte Spannung entgegen. So wurde die Länge des Gewebestreifens konstant gehalten. Bei Kontraktion wurde die

Stromstärke also erhöht, bei Relaxation reduziert. Die Länge des Gewebestreifens konnte vorgewählt werden, indem die Nullposition im Regelsystem verändert wurde. Der Computer zeichnete die Stromstärke über einen Analog-Digital-Wandler sechsmal in der Minute für jeden der acht Kanäle getrennt auf. Die Stromstärke war in μN geeicht, die isometrische Kontraktion konnte so direkt abgelesen werden. Die durchschnittlich erreichten Werte lagen für TM zwischen 50 und 500 μN und für die gleich langen, aber dickeren ZM zwischen 200 und 800 μN . Die Längenänderung lag dabei unter 10 μm .

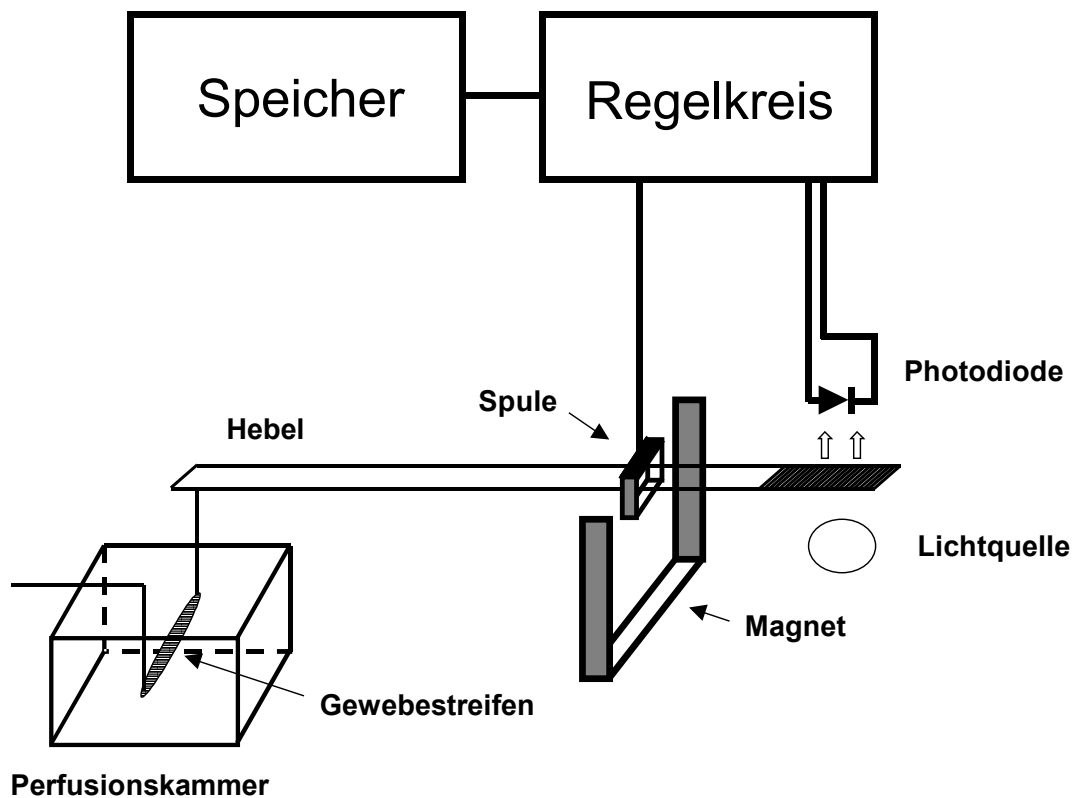


Abb. 2.2.: Die Messapparatur

Die Gewebestreifen tauchten an zwei Nadeln fixiert in die Perfusionslösung. Die Gewebespannung wurde über den Hebel auf das Drehspulinstrument übertragen. Über den Regelkreis wurde der Spulenstrom so reguliert, dass die Verschattung der Photodiode konstant blieb. Die Stromstärke korrelierte somit mit der Gewebespannung und konnte über einen Analog-Digital-Wandler mit einem Computer gespeichert werden.

2.1.2.3 Durchführung

Zu Beginn der Versuche wurden die Kammern mit 36°C warmer Ringerlösung gespült. Die Kammern standen auf höhenverstellbaren Ständen, ca. 5 cm unterhalb der Nadeln. Die Gewebestreifen wurden mit Histoacrykleber® (Braun, Deutschland) an den Nadeln des force-length-transducers fixiert. Sobald ein Gewebestreifen festgeklebt war wurde die Kammer hochgefahren, bis der Streifen vollständig von der Ringerlösung umspült wurde. Durch eine Justierschraube wurde der Abstand der Nadeln solange verändert bis auf die Streifen eine Vorspannung von ca. 100 μN wirkte.

Die Gewebestreifen wurden dann für 60 – 90 min. unter Kontrollbedingungen in Ringerlösung belassen. Nur Gewebestreifen mit einem stabilen Basistonus wurden in die Versuche mit den verschiedenen Testlösungen einbezogen.

Zu Beginn jedes Versuchs wurde für 20 min. Carbachol in der Konzentration 10^{-6}M appliziert, um eine Kontraktion der Gewebestreifen auszulösen. Der Carbachol Effekt wurde auf 100% gesetzt, alle anderen Messungen prozentual darauf bezogen.

20 min. nach der maximalen Kontraktion wurden die verschiedenen Antagonisten appliziert. Die Gewebe wurden zunächst für 20 min. mit den Antagonisten präinkubiert, bevor erneut eine Kontraktion mit Carbachol 10^{-6}M ausgelöst wurde.

2.1.3 Statistik

Durch die große Anzahl geschlachteter Tiere war es unwahrscheinlich, dass zwei Augen vom gleichen Tier stammten.

Wenn in Abbildungen Ergebnisse aus mehreren Versuchen zusammengefasst wurden, wurden die Mittelwerte mit Fehlerbalken angegeben. Durch die oben beschriebene Referenzkontraktion mit Carbachol konnten die Ergebnisse von präparationstechnisch bedingten Streuungen durch unterschiedliche Gewebedurchmesser bereinigt werden. Die Fehlerbalken (SEM = Standard Error of Mean) um die Mittelwerte zeigen den Bereich an, in dem der tatsächliche Mittelwert mit einer Wahrscheinlichkeit von 68 % liegt.

Zur statistischen Auswertung wurde der gepaarte Student t-Test herangezogen, wenn Vergleichsdaten aus derselben Versuchseinheit zueinander in Bezug gesetzt

wurden, z.B. um die Signifikanz von Kontraktionsunterschieden zu unterschiedlichen Versuchszeitpunkten zu bestimmen. Da sich die Gewebe prinzipiell sowohl kontrahieren als auch relaxieren konnten, wurden die Ergebnisse zweiseitig ausgewertet. Die Ergebnisse gelten bei p-Werten von weniger als 0,05 als signifikant (*). Werte kleiner 0,01 werden durch zwei Sterne (**), Werte kleiner 0,001 mit drei Sternen (***) gekennzeichnet.

2.1.4 Lösungen

Alle Chemikalien wurden von Sigma, Deutschland bezogen. Die Grundlage aller Lösungen bildete eine modifizierte Ringerlösung mit folgenden Ionenkonzentrationen (in mM): Na^+ 151 ; K^+ 5; Ca^{2+} 1,7; Mg^{2+} 0,9; Cl^- 131; SO_4^{2-} 0,9; H_2PO_4^- 1; HCO_3^- 28. Alle Lösungen enthielten 5 mM Glucose. Um den pH-Wert konstant bei 7,4 zu halten, wurden sie mit einem Gemisch von 5 % CO_2 und 95 % O_2 begast.

Zur Befeuchtung während der Präparation und zur Aufbewahrung der Gewebestreifen diente eine bicarbonatfreie mit HEPES (2-[4 (2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure) gepufferte Lösung, die unbegast auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt wurde.

2.1.5 Medikamente

Den Lösungen wurden folgende Medikamente bezogen von Sigma, Deutschland zugesetzt.

- Carbachol
- Methoctramin
- Chloroimperialin

2.2 Molekularbiologie

2.2.1 Zellkulturen

Die Zellkulturen von bovinem Trabekelmaschenwerk (bTM) wurden wie beschrieben hergestellt (Coroneo et al., 1991; Lepple-Wienhues et al., 1992). Humanes Ziliarmuskelgewebe (hZM) und humanes Trabekelmaschenwerksgewebe (hTM) wurde aus Spenderaugen oder aus E nukleationsaugen (aus der Augenklinik des Universitätsklinikums Benjamin Franklin) mit malignem Melanom der Aderhaut gewonnen. Eine Glaukomerkrankung der Spender wurde durch ein Studium der Krankenakten ausgeschlossen. Die humanen Gewebe wurden nach der Methode von Flügel et al. isoliert (Flügel et al., 1991).

Die Augen wurden am Äquator aufgeschnitten und nur der vordere Abschnitt weiterverwertet. Die Zonulafasern wurden mit einer feinen Schere zerschnitten und die Linse entfernt. Für die Isolation des Ziliarmuskels wurde der Ziliarkörper mit einer Pinzette gefasst und vorsichtig von der Sklera abgezogen. Das entstandene Präparat mit Ziliarkörper, Ziliarmuskel und Iris wurde in ein steriles Petrischälchen gelegt, der Muskel wies dabei nach oben. Gegen das dunkle Epithel war er gut als blasse zirkuläre Struktur abgrenzbar und konnte unter dem Mikroskop präpariert werden. Nur die äußeren Anteile wurden mit der Schere abgeschnitten und zur Kultivierung verwendet. Die Präparation des Trabekelwerks begann mit der Sondierung des Schlemm'schen Kanals mit einem feinen Draht von 0,5 mm Durchmesser. Danach konnte das darüberliegende Trabekelwerk vorsichtig herausgeschnitten und unter Abdeckplättchen in Petrischälchen mit 35 mm Durchmesser gelegt werden. Als Kulturmedium wurde Dulbecco's Modification of Eagle's minimal essential Medium (DMEM) mit zusätzlich 20 % Fetal Calf Serum (FCS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin verwendet. Die Zellkulturen wurden unter konstanten Bedingungen mit einem Gemisch aus 95 % Luft und 5 % CO₂ bei 37 °C belüftet. Alle 4 Tage wurde das Nährmedium erneuert. Sobald die Zellen Konfluenz erreicht hatten, wurden sie nach der Trypsin-EGTA-Methode passagiert. Die Zellen wurden dabei aus ihrem Zellverband isoliert, dann auf mehrere neue Petrischälchen aufgeteilt und von neuem im Brutschrank kultiviert. Die Zellen wurden nach der 3. – 7. Passage für die Versuche verwendet. Vor der Weiterverarbeitung wurden Konfluenz und

Einschichtigkeit der Kulturen geprüft. Die Zellen wurden an der Universität Erlangen von Prof. Elke Lütjen-Drecoll mikroskopisch und immunhistochemisch untersucht und zeigten die für Trabekelwerk bzw. Ziliarmuskel typischen Charakteristika (Flügel et al., 1992).

2.2.2 Herstellung der Zelllysate

Um intrazelluläre Proteine nachzuweisen, wurden diese zunächst durch spezielle Lysepuffer in wässrige Lösung gebracht. Nach Aufbrechen der Zellstruktur wurden die unterschiedlichen Proteinfractionen durch Zentrifugation voneinander getrennt. Dem Lysepuffer war ein Protease-Inhibitor zugesetzt, der die zelleigenen Proteasen hemmt und verhindert, dass Proteine während der Aufbereitung abgebaut werden. Aus dem gleichen Grund erfolgten alle anderen Arbeitsschritte bei konstant 4°C (Kühlen der Lösungen und Arbeitsgeräte).

2.2.2.1 Membranlysat aus kultiviertem Gewebe

Mit einer Wasserstrahlpumpe wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Schälchen dann vorsichtig 3 mal mit eiskaltem Phosphat Buffered Saline (PBS) gespült. Nach dem letzten Spüldurchgang wurden die Schälchen nach dem Absaugen schräg aufrecht gestellt, damit sich restliche Flüssigkeit sammeln und mit einem Papierstreifen aufgenommen werden konnte. Dadurch wurde eine Verdünnung des Lysepuffers vermieden. In jedes Schälchen wurden 300 µl Lysepuffer für Membranpräparation (siehe Kap. 2.2.10.) gegeben, dann die Zellen mit einem speziellen Zellscraper (Costar, Corning inc., USA) von der Unterlage getrennt. Das so erhaltene Zelllysate wurde in Eppendorfgefäße überführt und für 30 min. bei 4°C auf einer Wippe (Rocky®, Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau, Deutschland) belassen.

Es folgten zwei Zentrifugationsschritte (siehe Abbildung 2.3.). Der erste (Hermle Z233MK, Denville Scientific, USA) bei 2000 rpm (rounds per minute, 380 g), für 5 min. diente der Klärung des Homogenisats von Zelltrümmern, Mitochondrien und Zellkernen. Das entstehende Pellet (P1) wurde verworfen, der Überstand (S1) ein zweites Mal zentrifugiert. Bei dieser Zentrifugation (Beckmann Avanti J25) mit 20500

rpm (50000 g) für 30 min. wurden die löslichen Membranbestandteile und Lysosomen von den restlichen Zellbestandteilen getrennt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand (S2) vorsichtig abpipettiert. Die im S2 enthaltenen zytosolischen Bestandteile wurden gesondert untersucht. Das zurückbleibende Pellet (P2) mit den Membranbestandteilen wurde in Lysepuffer resuspendiert. Je nach Größe des Pellets und abhängig von der Anzahl der durchzuführenden Versuche schwankte die Menge des Lysepuffers zwischen 30 und 100 μ l.

Für die Proteinquantifizierung wurden ca. 5 μ l entnommen. Der Rest des Lysats wurde für die Immunopräzipitation verwendet oder mit Lämmli-Puffer (LAE) im Verhältnis 1:5 versetzt und für 5 min. bei 95°C erhitzt. Die Proben konnten dann sofort auf das SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, oder bei – 80°C eingefroren werden.

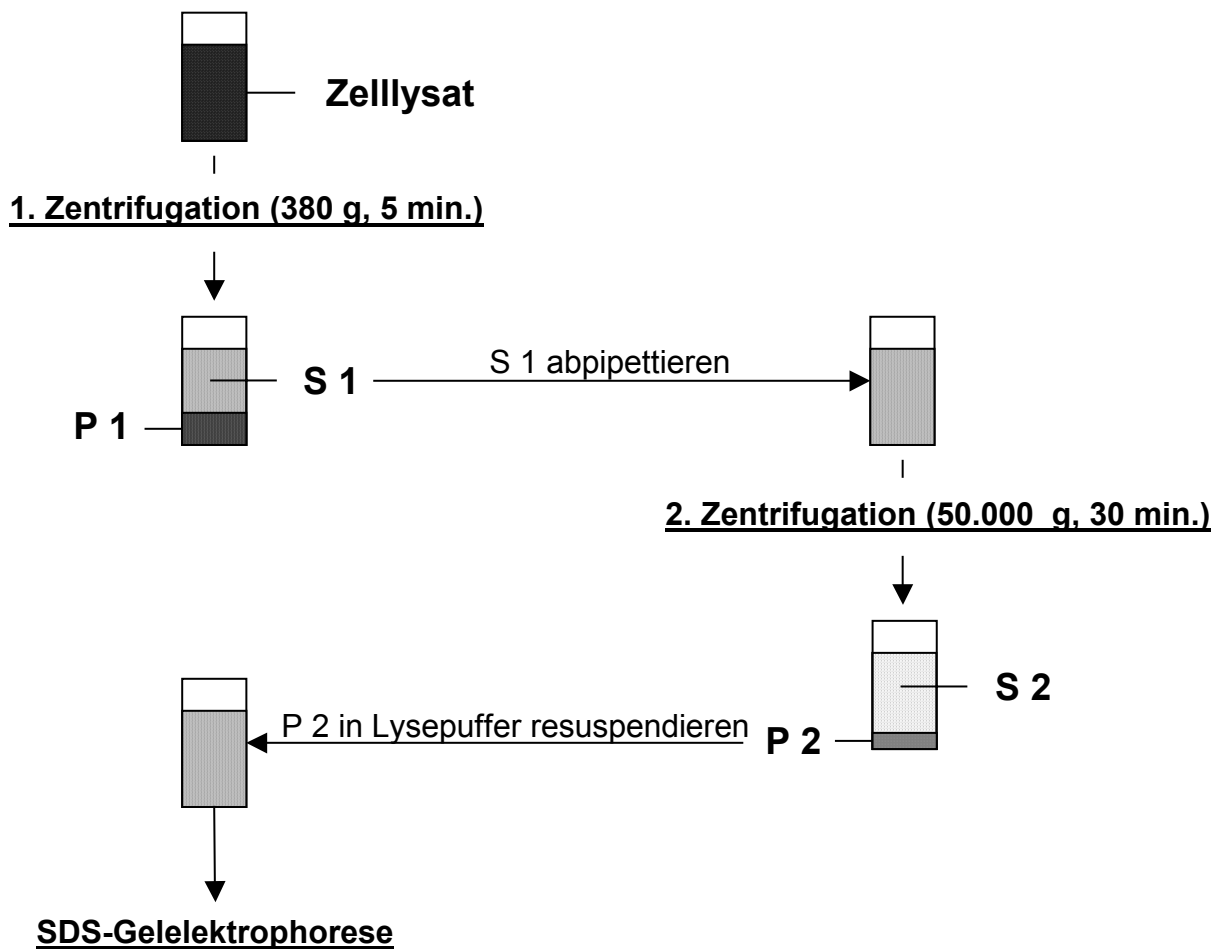


Abb. 2.3.: Differentialzentrifugation zur Isolation der Membranproteine aus einem Gesamtzellysat
 Nach der 1. Zentrifugation enthält das Pellet Mitochondrien, Zellkerne und Zelltrümmer. Nach der 2. Zentrifugation wird das Pellet (P2) mit den löslichen Membranbestandteilen in Lysepuffer resuspendiert.

2.2.2.2 Membranlysat aus nativem bovinen Trabekelwerk

Zunächst wurde das Trabekelwerk wie im Kapitel 2.1.1 beschrieben präpariert. Da im Gegensatz zur Zellkultur eine wesentlich festere Verbindung zwischen den einzelnen Zellen bestand, bedurfte es zusätzlicher Arbeitsschritte um diese Verbindungen zu lösen.

Mit dem Homogenisator (Polytron, Kinematic AG, Schweiz) wurde das Gewebe in 1ml Membranlysepuffer zerkleinert. Anschließend wurden durch wiederholtes

Einfrieren und Auftauen der Proben interzelluläre Verbindungen aufgebrochen. Dazu wurden die Proben in flüssigem Stickstoff gefroren und danach bei 42 °C aufgetaut. Wie bei der Verwertung der Zellkulturen wurden die Proben zuletzt für 30 min. im Lysepuffer belassen und anschließend wie oben beschrieben zentrifugiert.

2.2.2.3 Gesamtzelllysat aus kultiviertem Gewebe

Hierbei wurden zytosolische Proteine der Untersuchung zugeführt. Es wurde der Lysepuffer für Gesamtllysate (siehe Kap. 2.2.10.) verwendet. Die Zentrifugation (Hermle Z233MK) für 30 min. bei 14000 rpm (18620 g) isolierte die Zelltrümmer, Mitochondrien und Zellkerne im Pellet. Anders als bei dem Membranlysat wurde der Überstand aber nicht ein weiteres Mal zentrifugiert, sondern direkt wie oben beschrieben weiterverwertet. So standen hier auch wesentlich größere Proben mit ca. 300 µl zu Verfügung.

2.2.3 Proteinquantifizierung

Die Proteinquantifizierung diente dazu, die bei der SDS-Gelelektrophorese aufgetragenen Proteine zu aliquotieren und so gleiche Proteinmengen innerhalb einer Vergleichsgruppe zu gewährleisten.

Die Bestimmung erfolgte mittels des BCA-Tests (Pierce, USA) der nach dem Prinzip der Biuret-Reaktion funktioniert. In alkalischer Lösung bilden sich Protein-Cu²⁺-Komplexe. Die Cu²⁺-Ionen werden dann zu Cu⁺ reduziert und bilden mit Bicinchonininsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex.

Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Absorption des Farbkomplexes bei 562 nm gemessen (Shimadzu CS 9301 PC, Shimadzu, Japan). Als Proteinstandard diente bovines Serumalbumin (BSA, Pierce, USA) mit 0,2, 0,8 und 1,2 mg/ml. Zuletzt wurden die Proben mit Lysepuffer so verdünnt, dass in jeder die gleiche Proteinkonzentration vorlag.

2.2.4 Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation ist eine Methode zur Isolation von Antigenen aus dem Zelllysate mittels im Überschuss eingesetzter spezifischer Antikörper (AK). Auch der Nachweis kleiner Konzentrationen eines Proteins ist so möglich und störende Signale anderer Proteine können dadurch reduziert werden.

Die Herstellung des Zelllysates wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die AK wurden an Sepharose-beads gebunden. Diese etwa salzkorngroßen Zuckerstrukturen waren an ihrer Oberfläche mit dem Protein A von *Staphylococcus aureus* beladen (Sigma, Deutschland). Protein A bindet an die Fc-Teile der Immunglobuline A, M und G. Die beads waren in Ethanol suspendiert, welches zunächst durch dreimaliges Spülen mit Lysepuffer entfernt wurde. Eine Spatelspitze der beads wurde in 1 ml Lysepuffer suspendiert und dann in Portionen zu 200 µl auf acht Eppendorfröhrchen aliquotiert (siehe Abbildung 2.4.). Vier der Röhrchen wurden mit je 25 µl AK, die anderen mit je 250 µl Lysat bestückt. Von diesem Zeitpunkt an wurde streng bei 4°C gearbeitet, um zu verhindern, dass sich die Bindung zwischen Protein A und AK vorzeitig löst. Bei der anschließenden 60-minütigen Inkubation auf dem Rotor wurde einerseits der AK mit Hilfe des Protein A an den Sepharose-beads gebunden, andererseits banden Zellbestandteile im Lysat unspezifisch an die beads. Durch die anschließende Zentrifugation (Hermle Z233MK) für 20 min. bei 14 000 rpm (18620 g) entstand ein Pellet (P1) mit den an beads gebundenen AK und ein gereinigtes Lysat (S2) (siehe Abbildung 2.4.). Der Überstand (S1) aus Lysepuffer und ungebundenem AK, sowie das Pellet (P2) mit den beads und unspezifisch gebundenen Zellbestandteilen wurden verworfen. Die beads mit den AK (P1) wurden über Nacht mit dem gereinigten Lysat (S2) auf dem Rotor bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die vier Röhrchen für 2 min. bei 14 000 rpm (siehe oben) zentrifugiert. Das entstandene Pellet (P3) enthielt die beads mit den AK und den spezifisch daran gebundenen Proteinen. Der Überstand (S3) enthielt alle nicht gebundenen Proteine und wurde mit LAE versetzt und eingefroren, um später als Erfolgskontrolle für die spezifische AK-Protein-Bindung zu dienen.

Das Pellet (P3) wurde jetzt 6 mal mit jeweils 500 µl Lysepuffer gewaschen, um überschüssigen AK und ungebundenes Protein zu entfernen. Zwischen den einzelnen Waschschritten wurde für 2 min. bei 2000 rpm (380 g) zentrifugiert (Hermle

Z233MK) und der Überstand abpipettiert und verworfen. Die Röhren wurden dabei sehr vorsichtig gehandhabt, damit es nicht zu einer mechanischen Zerstörung der AK-Protein-A-Bindung kam. Nach dem letzten Waschschrift wurde LAE-Puffer zugegeben, die Probe für 5 min. bei 95°C gekocht und dann für 2 min. mit 14000 rpm (Hermle Z233MK) bei Raumtemperatur zentrifugiert. Mit einer 100 µl Hammlton-Pipette, mit der die beads nicht aufgenommen werden, wurde der Überstand mit den darin enthaltenen AK und dem gesuchten Protein auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

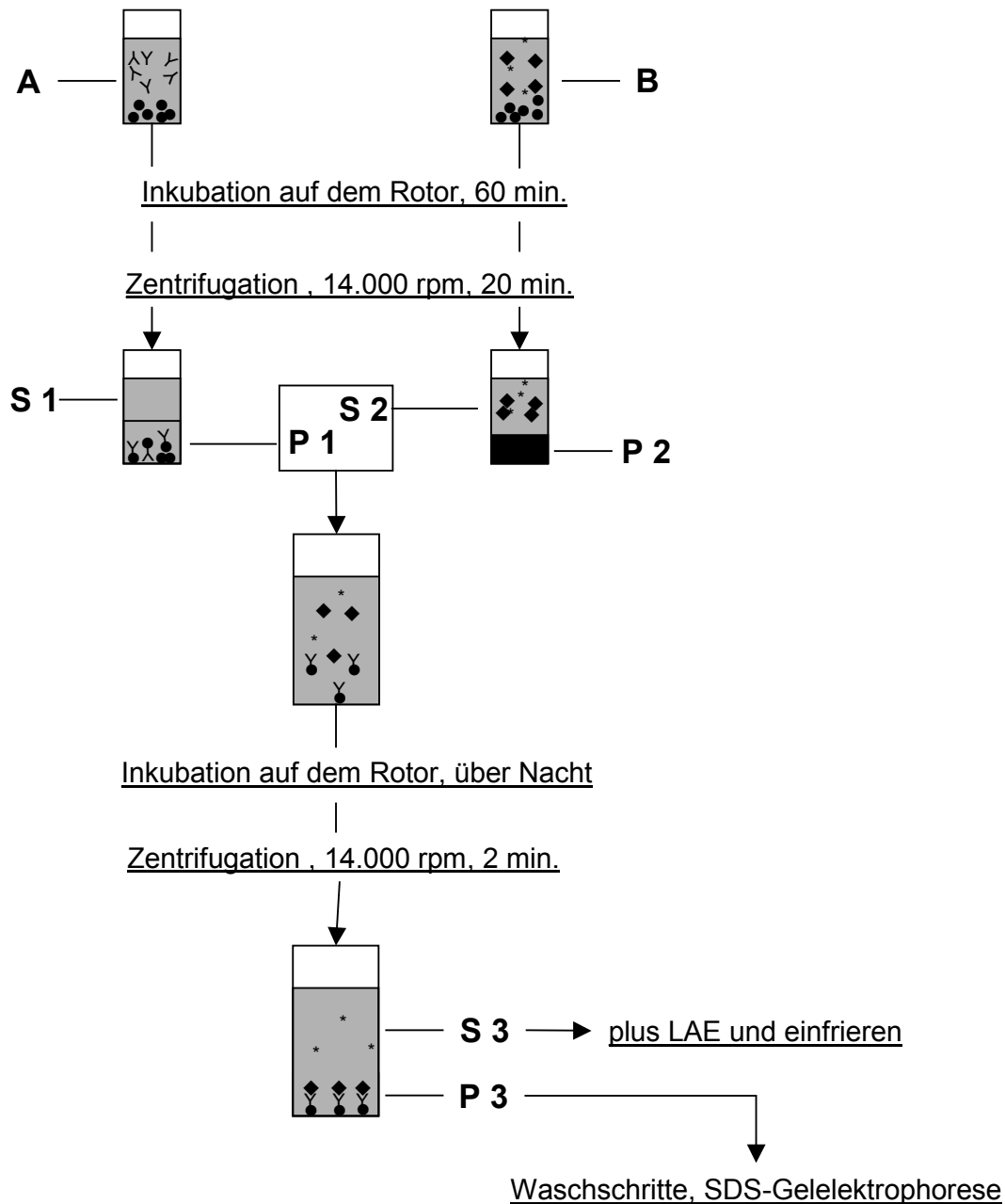


Abb. 2.4.: Immunopräzipitation

8 Eppendorfröhrchen sind mit der gleichen Menge an Sepharose-beads gefüllt. In 4 der Röhrchen werden zusätzlich 25 µl AK (A), in die anderen 4 jeweils 250 µl Zelllysate gegeben (B). Der „gereinigte“ Überstand (S2) wird zusammen mit den AK an den beads (P1) über Nacht inkubiert. P3 mit den Proteinen, die vom spezifischen AK an die beads gebunden wurden, wird auf das SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

(●) = Sepharose-beads, (Y) = Antikörper, (♦) = gesuchtes Protein, (*) = andere Proteine und Zellbestandteile

2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit dieser Methode werden Proteine anhand ihres Molekulargewichts und ihrer Ladung aufgetrennt. Die Proteine wandern in einem elektrischen Feld durch eine Gitterstruktur aus einem Polyacrylamid-Gel. Sie befinden sich in einer Lösung, die das stark negativ geladene Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) enthält. Dieses bildet mit den Proteinen einen Komplex und fixiert so deren denaturierten Zustand. Dadurch haben alle Proteine ähnliche hydrodynamische Eigenschaften, sind negativ geladen und können keine Bindungen untereinander eingehen. Sie wandern im elektrischen Feld zur Anode. Kleine, niedermolekulare Proteine wandern schneller durch die Gitterstruktur als große, hochmolekulare. Zur späteren Bestimmung des Molekulargewichts werden Marker (Sigma, Deutschland) eingesetzt, die verschiedene, angefärbte Proteine mit definierter Größe enthalten.

Die Auftrennung der im Lysat enthaltenen Proteine erfolgte mit einem 8,5%igen Polyacrylamid-Gel (Trenngel) in einer Mini-Protein-Elektrophoresekammer (Bio-Rad, Life-Science Group, USA). Diesem Trenngel war ein sogenanntes Sammelgel vorgeschaltet, in welches Taschen für die Proben eingelassen waren. Im Sammelgel richteten sich die Protein-SDS-Komplexe entsprechend ihrer Ladung aus. Die mit LAE versetzten Proben wurden unmittelbar vor dem Auftragen für 5 min. bei 95°C gekocht, um die Proteine vollständig zu denaturieren und eventuell vorhandene Proteasen zu hemmen. Die Proben von Ziliarmuskel und Trabekelwerk wurden mehrmals paarweise auf das Gel aufgetragen. Zwischen jedem Paar wurde eine Tasche freigelassen und später mit Marker (siehe oben) beladen. Jede Probe hatte ein Volumen von 40 – 80 µl entsprechend 15 – 30 µg Protein. So konnten später mehrere Antikörper an den einzelnen Paaren getestet und die Proben direkt miteinander verglichen werden. Mit einer Spannung von 100 V wurden die Proteine in das Sammelgel transferiert. Die Auftrennung im Trenngel erfolgte bei 150 V. Die Elektrophorese wurde beendet sobald der angefärbte Marker aus dem Gel in die Pufferlösung übertrat.

2.2.6 Western-Blot

Diese Methode dient zum elektrischen Transfer der Proteine aus dem SDS Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Polyscreen NEM, Life Science Products, USA). Die Membran weist eine hohe Proteinbindungskapazität auf, außerdem ist sie widerstandsfähiger als das Gel und damit besser für die Inkubations- und Waschschriffe geeignet.

Die Membran wurde zunächst für mindestens 15 min. in 100 %igem Ethanol auf der Wippe inkubiert und anschließend parallel mit den Gelen aus der Gelelektrophorese 15 min. in Transferpuffer äquibriert. Der elektrische Proteintransfer fand bei 4°C in der Mini-Protein-Elektrophoresekammer (s.o.) mit einer Spannung von 100 V für 60 min. statt. Die Blot-Membran wurde anschließend für den immunologischen Proteinnachweis weiterverwendet.

2.2.7 Immunologischer Proteinnachweis

Beim immunologischen Proteinnachweis werden die nach ihrem unterschiedlichen Molekulargewicht aufgetrennten Proteine auf der Membran mit einem Antikörper (AK) inkubiert. Er bindet mit seiner Bindungsstelle an das passende Epitop auf dem gesuchten Protein und macht dieses als sogenannte Bande sichtbar. Ein zusätzlich eingesetztes Blockpeptid dient als Kontrolle um unspezifisch angefarbte Proteine von spezifisch angefarbten zu unterscheiden. Dieses Peptid gleicht dem Epitop, gegen welches die spezifische Bindungsstelle des AK auf dem gesuchten Antigen gerichtet ist. Die Bindungsstelle ist durch das Blockpeptid besetzt, der AK kann das gesuchte Protein nicht binden und die Bande wird nicht angefarbt. Bleibt die Bande trotz des Einsatzes des Blockpeptids angefarbt, so liegt hier eine von der spezifischen Bindungsstelle unabhängige und damit unspezifische Bindung zwischen AK und Protein vor.

Vor der eigentlichen Reaktion der Blot-Membran mit dem AK musste sie zuerst 60 min. auf der Wippe mit einem speziellen Blockpuffer, hier 5 %iges bovines Rinderalbumin (BSA) (Merck, Deutschland), in PBS/Tween blockiert werden. Dadurch konnten an der sehr reaktionsfreudigen Oberfläche der Membran unspezifische Bindungen der AK verhindert werden. Die Membran wurde jetzt mit

einer Schere entlang der blauen Markerbanden geteilt. Ein Membranabschnitt mit je einer Probe Ziliarmuskel und Trabekelwerk wurde über Nacht bei 4°C und auf der Wippe mit dem 1. AK inkubiert. Dieser war spezifisch gegen das zu suchende Protein gerichtet. Der AK gegen m2 war in der Konzentrationen 1:1000 in 1%igem BSA in PBS/Tween, versetzt mit 0,025 % Natriumazid (Sigma, Deutschland) gelöst. Die AK gegen Phosphoserin, bzw. Phosphothreonin waren in der Konzentration 1:2000 in 2 %igem BSA gelöst.

Ein entsprechender Membranteil wurde ebenfalls über Nacht mit AK und zusätzlichem Blockpeptid im Verhältnis 1:7 inkubiert. Diese Lösung wurde mindestens 60 min. früher vorbereitet und dann bei Raumtemperatur auf der Wippe belassen, damit AK und Blockpeptid aneinander binden konnten. Am nächsten Morgen wurde die Membran zunächst dreimal 10 min. in PBS/Tween auf der Wippe bei Raumtemperatur gewaschen, um nicht gebundenen 1. AK zu entfernen. Dann wurde die Membran für 60 min. bei Raumtemperatur mit einem 2. AK inkubiert, der gegen den Fc-Teil des 1. AK gerichtet war. Der 2. AK war in einer Konzentration von 1:20.000 für m2, bzw. 1:10.000 für die Phosphoserin und -threonin AK, in PBS/Tween gelöst. Danach wurde wie oben beschrieben überschüssiger AK abgewaschen. Der 2. AK hatte an seinem Fc-Teil den fluoreszierenden Farbstoff Peroxydase gebunden. Durch 2-minütige Inkubation der Membran im Zweikomponentenreagenz ECL (Amersham Life Science, England) wurde dieser Farbstoff aktiviert und durch diese Chemilumineszenz ein Röntgenfilm (Kodak X Omat) belichtet. Die Filme wurden dafür zwischen 15 sec und 10 min. lang mit den ECL behandelten Membranen belichtet und in einem Kodak RP X-OMAT Processor Model M6B entwickelt. Unter der Verwendung des LAS-1000-Image-Analysers (Fujifilm, Berlin) und der Software Aida 2.0 (Raytest, Berlin) wurden die Filme digitalisiert. Jetzt waren die durch den spezifischen 1. AK markierten Proteine als Banden sichtbar. Die Membranen konnten im Kühlschrank gelagert und nach Membranstripping für eine weitere immunologische Reaktion verwendet werden.

2.2.8 Membranstripping

Eine Membran kann 2 – 3 mal hintereinander mit verschiedenen AK inkubiert werden. Dazu müssen zunächst die alten AK und anderen Reagenzien durch das

sogenannte Membranstripping entfernt werden. Bei jedem Stripping gehen aber auch Proteine verloren, sodass das Signal nach jedem dieser Vorgänge insgesamt schwächer wird.

Vor dem eigentlichen Stripping musste die Membran für 15 min. auf der Wippe mit 100 %igem Ethanol inkubiert werden. Im 57°C warmen Wasserbad wurde sie dann für 35 min. in mercaptoethanolhaltigem Strip-Puffer inkubiert. Anschließend wurden die Membranen in drei Waschschrritten insgesamt 5 min. in PBS/Tween gespült. Die nächsten Schritte wurden entsprechend des oben geschilderten Ablaufs des immunologischen Proteinnachweises durchgeführt.

2.2.9 Auswertung

Die Ergebnisse der Kontraktionsmessungen wurden mindestens 8 mal bestätigt. Die Abbildungen zeigen repräsentative Einzelmessungen sowie die als Balkendiagramme zusammengefasste Summe der Daten (siehe Kap.2.1.3.).

Die proteinbiochemischen Untersuchungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mindestens 3 mal durchgeführt. Auch hier zeigen die Abbildungen repräsentative Ergebnisse.

2.2.10 Lösungen

Lysepuffer (Membran)

In mM: 20 Tris, 2 EDTA, 1 Phenylmethylsulfonyl Florid, 0,5 EGTA

Es wurde ein pH-Wert von 7,5 mit rauchender HCL eingestellt.

Als Proteaseinhibitoren wurde Aprotinin (Sigma, Deutschland), 0,1 mg/ml, und zusätzlich 1 Tablette Complete® Protease inhibitor cocktail (Boehringer, Deutschland) 10 ml Lysepuffer zugesetzt.

Lysepuffer (Gesamtlysat)

In mM: 20 Tris, 137 NaCl

In %: 1 NP 40 Stocklösung, 10 Glycerol

Es wurde ein pH-Wert von 7,5 mit rauchender HCL eingestellt.

Als Proteaseinhibitoren wurde Aprotinin (Sigma, Deutschland), 0,1 mg/ml, und zusätzlich 1 Tablette Complete® Protease inhibitor cocktail (Boehringer, Deutschland) 10 ml Lysepuffer zugesetzt.

Elektrophoresepuffer

14,4 g Glycin, 3,04 g Tris, 10 ml 10% SDS ad 1000 ml mit Aqua bidest

Transferpuffer

14,4 g Glycin, 3,04 g Tris, 100 ml Methanol ad 1000 ml mit Aqua bidest

Strip-Puffer

100 ml 10% SDS, 15,45 ml 2 M Tris pH 6,8 ad 500 ml mit Aqua bidest

Unmittelbar vor dem Strippen wurde zu 50 ml Strip-Puffer 350 µl Mercaptoethanol zugegeben.

PBS/Tween

1 PBS-Tablette (Gibco, USA), 500 µl Polyoxyethylenesorbitolmonolaurate (Tween 20) ad 500 mit Aqua bidest

Trenngel

(in ml): 5,66 Acrylamid (Serva, Deutschland), 3,75 Tris 2 M pH 8,8, 10,14 Aqua bidest, 0,2 10% SDS, 0,2 10% Amoniumpersulfat (APS), 0,01 Tetramethyldiamin (TEMED, Gibco, USA)

Sammelgel

(in ml): 7,84 Sammelgel-stammlösung (17 Acrylamid; 6,25 Tris 2 M pH 6,8; 74,25 Aqua bidest); 0,08 10% SDS; 0,08 APS; 0,008 TEMED.

2.2.11 Antikörper

Antikörper und Kontroll-Antigen, m2

(Alomone Labs, Israel)

Polyklonaler im Hasen angezüchteter AK gegen die Aminosäuren 225-256 aus der intrazellulären Schleife i3 des humanen m2 muscarinergen Acetylcholin-Rezeptors und die Gluthadion-S-Transferase (GST)³ von Schistosoma japonicum.

Antikörper 1C8 Phosphoserin

(Biomol, Deutschland)

monoklonaler AK, in der Maus angezüchtet

Antikörper 1E11 Phosphothreonin

(Biomol, Deutschland)

monoklonaler AK, in der Maus angezüchtet

Peroxidase-konjugierter 2. Antikörper

(Dionova, Jackson Immuno Research Laboratories inc., USA)

1. In der Ziege gegen Hasenserum angezüchtet.
2. In der Ziege gegen Mäuseserum angezüchtet.