

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der molekularbiologischen Versuche

3.1.1 Nachweis des muscarinergen Rezeptors m2

3.1.1.1 Nachweis im Membranlysat von Ziliarmuskel und Trabekelwerk aus humanen Zellkulturen

Die Abbildung 3.1. zeigt ein repräsentatives Ergebnis der Western-Blot-Untersuchungen an Membranlysat von kultivierten humanen Ziliarmuskelzellen (hZM) und Trabekelmaschenwerksgewebe (hTM). Sowohl in der hZM -, als auch in der hTM - Präparation ist eine Bande auf Höhe des 56 kDa Markers sichtbar. Die Bande konnte mittels Immunfärbung als m2 Rezeptor identifiziert werden und ließ sich durch das spezifische Blockpeptid unterdrücken. Die Abbildung zeigt außerdem mehrere höhere, bzw. niedrigere Banden, die sich nicht durch das Blockpeptid unterdrücken ließen.

Mit der Immunopräzipitation (IP) anti-m2 AK ließ sich die Bande bei 56 kDa deutlich anreichern (siehe Abb. 3.2.A). Beim immunologischen Proteinnachweis wurde das Signal nach Vorinkubation des AK mit dem Blockpeptid deutlich reduziert.

Als Kontrolle für die gelungene Immunopräzipitation wurde der Überstand mittels Western-Blot und immunologischem Proteinnachweis untersucht (siehe Kap. 2.2.4.). Die Abbildung 3.2.B zeigt eine Bande bei 56 kDa.

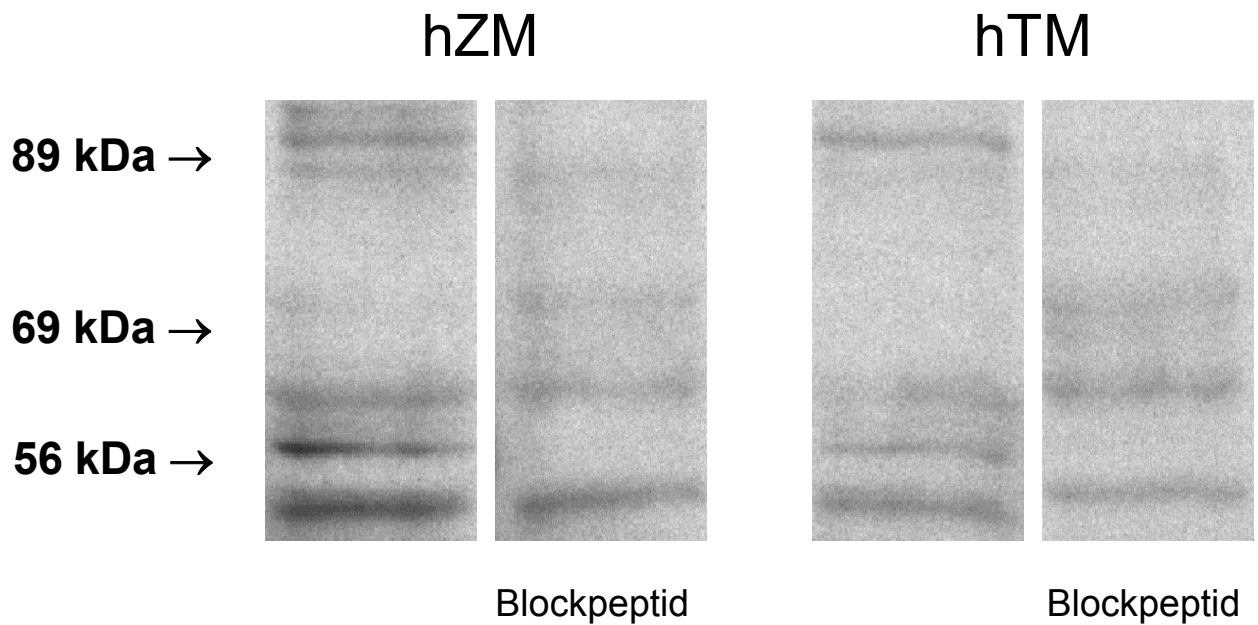


Abb. 3.1.: Nachweis des m2 Rezeptors in Membranlysat von humanem Ziliarmuskel (hZM) und Trabekelmaschenwerk (hTM)
Sowohl bei hZM als auch bei hTM ist eine Bande bei 56 kDa sichtbar, die bei Präinkubation des AK mit dem spezifischen Blockpeptid verschwindet.

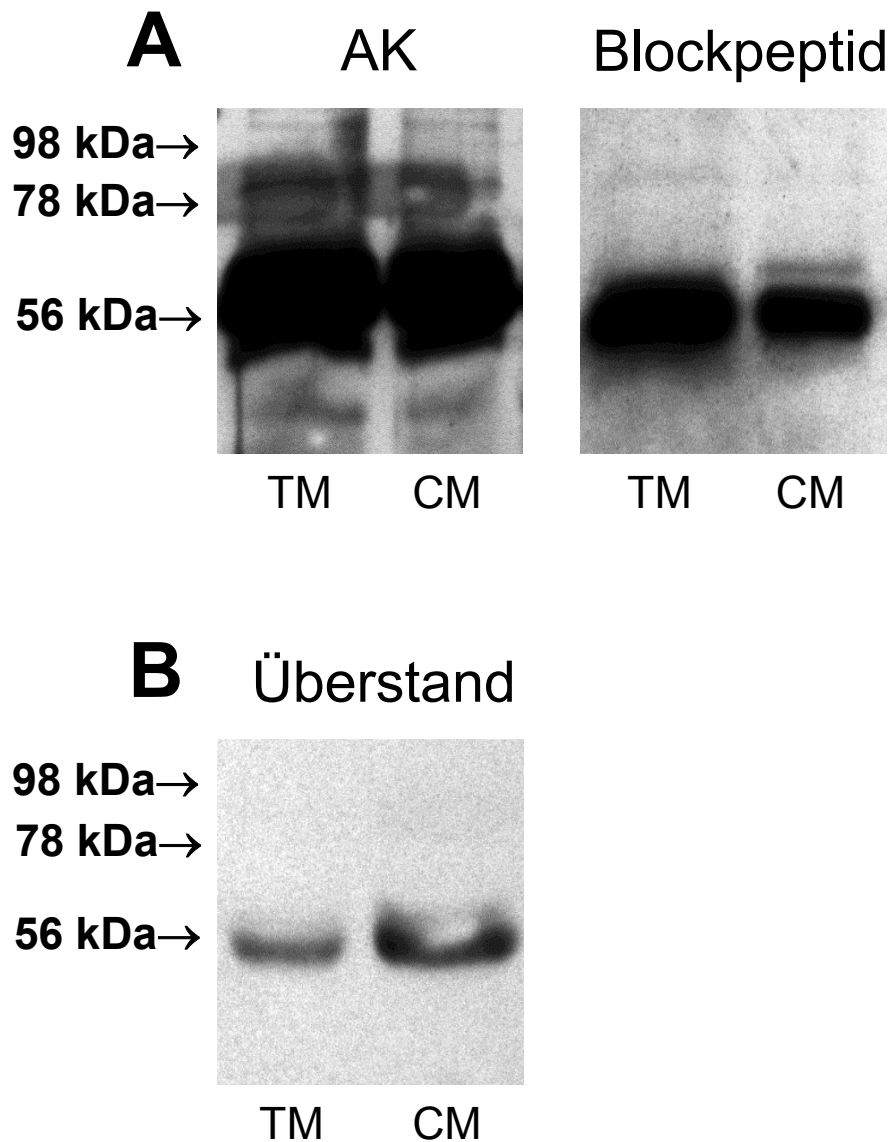


Abb. 3.2.: **A: Immunopräzipitation mit dem AK gegen m2**
B: Kontrolle der Immunopräzipitation
 Die Bande bei 56 kDa ist durch die IP deutlich angereichert. Die Präinkubation des AK mit Blockpeptid reduziert das Signal der Bande. Auch im Überstand der IP (siehe Kap.2.2.4.) ist der m2 Rezeptor nachweisbar.

3.1.1.2 Keine Expression des m2 Rezeptorproteins im Zytosol von Ziliarmuskel und Trabekelwerk aus humanen Zellkulturen

Die Abbildung 3.3. zeigt, dass der m2 Rezeptor nicht im Zytosol (Überstand S2, siehe Kap. 2.2.2.1.) nachzuweisen ist. Zwar sind mehrere Banden zu erkennen, doch keine von ihnen auf Höhe des 56 kDa Markers.

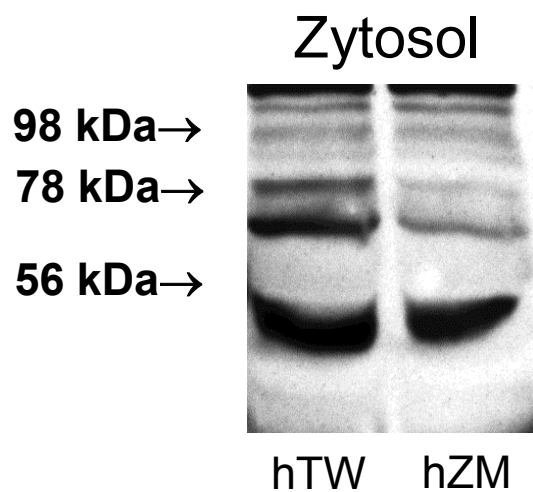


Abb. 3.3.: **Kein Nachweis des m2 Rezeptors im Zytosol**
Auf Höhe des 56 kDa Markers ist keine Bande zu erkennen.

3.1.1.3 Nachweis im Membranlysat von Ziliarmuskel und Trabekelwerk aus bovinen Zellkulturen und Nativgewebe

Das für funktionelle Untersuchung verwendete bovine Nativgewebe wurde zunächst auf die Existenz des m2 Rezeptorproteins untersucht.

Wie die Abbildung 3.4. zeigt, sind im Membranlysat aus nativem bovinem Ziliarmuskel (bZM) und bovinem Trabekelmaschenwerk (bTM) Banden bei 56 kDa sichtbar. Diese ließen sich mit dem Blockpeptid spezifizieren. Auch in Zellkulturen von bovinen Trabekelwerkzellen ist der Rezeptor nachweisbar (Abb. 2.4.B). Die Spezifität der Bande wurde unter Einsatz des Blockpeptids bestätigt.

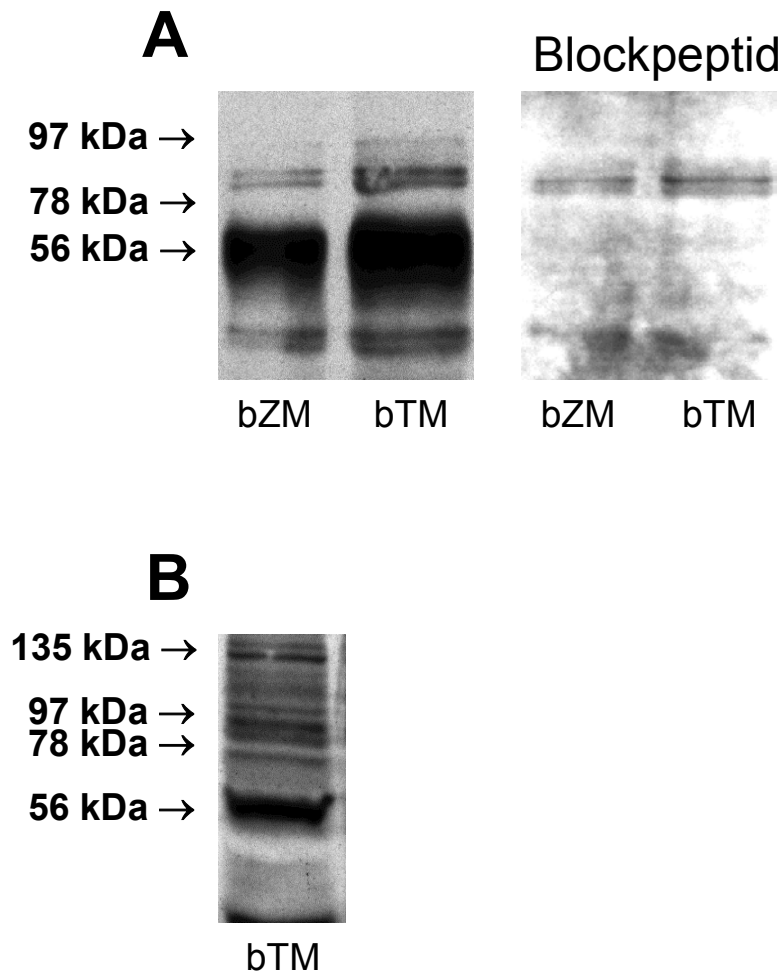


Abb. 3.4.: **A: Nachweis des m2 Rezeptors im Membranlysat von Ziliarmuskel (bZM) und Trabekelwerk (bTM) aus bovinem Nativgewebe**
B: Nachweis des m2 Rezeptors im Membranlysat von Trabekelwerk aus bovinen Zellkulturen
 Sowohl im nativen, als auch im kultivierten Gewebe ist eine Bande bei 56 kDa erkennbar. Unter Einsatz des Blockpeptids verschwindet diese Bande.

3.1.2 Nachweis der phosphorylierten Aminosäuren Serin und Threonin in der Rezeptorbande bei 56 kDa

Zunächst wurden Western-Blots von Gesamtlysaten von humanem ZM und TM mit den AK-Klonen P-Ser 1C8 gegen phosphoryliertes Serin und P-Thr 1E11 gegen phosphoryliertes Threonin inkubiert. Die Abbildung 3.5.A zeigt mehrere Banden, u.a.

bei 56 kDa. Die IP mit dem AK gegen m2 und anschließender Anfärbung mit den beiden AK-Klonen bestätigte, dass das m2 Rezeptorprotein phosphoriliertes Serin und Threonin enthält (Abb. 3.5.B).

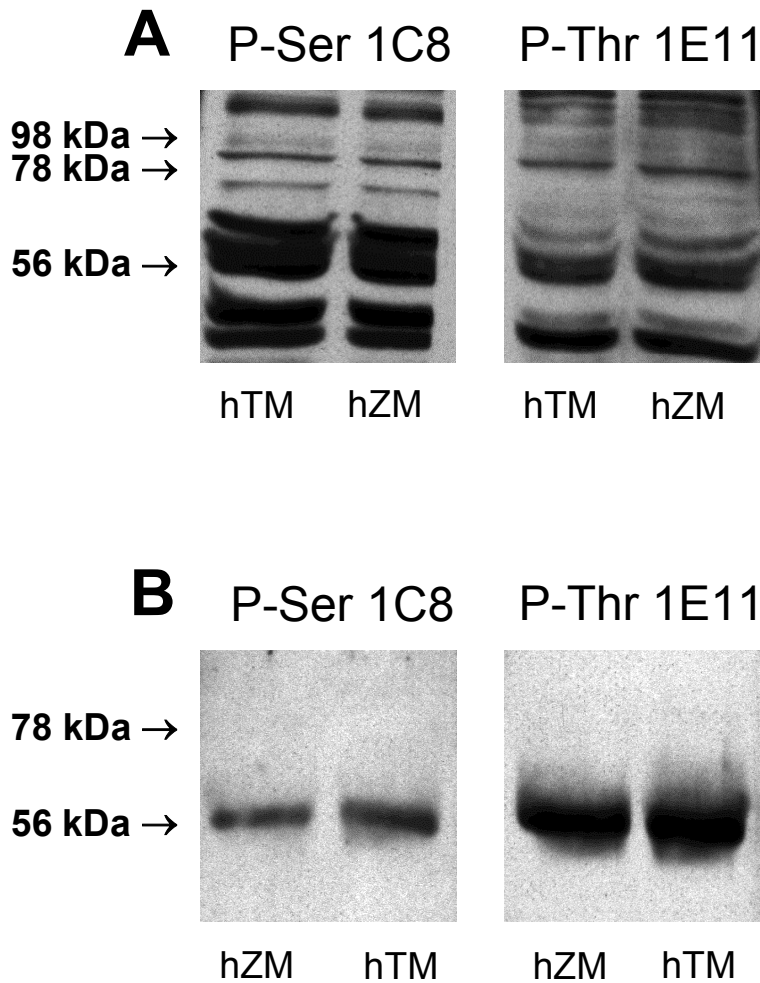


Abb. 3.5.: **A:** Nachweis phosphorlierter Proteine im Gesamtyolat von humanem Ziliarmuskel (hZM) und Trabekelwerk (hTM)

B: Immunopräzipitation mit dem AK gegen den m2 Rezeptor

Im Zytosol sind mehrere Banden sichtbar, die sich mit den AK-Klonen gegen phosphoriliertes Serin und Threonin (P-Ser 1C8 und P-Thr 1E11) immunologisch anfärben lassen. Die durch die IP aus dem Membranlysat isolierten m2 Rezeptoren enthalten phosphoriliertes Serin und Threonin.

3.2 Ergebnisse der Kontraktionsversuche

3.2.1 Wirkung von 3- α -Chloroimperialin

Die Applikation von 3- α -Chloroimperialin, einem steroidal Alkaloid, in der Konzentration 10^{-6} M hatte weder beim Trabekelwerk ($96,5 \pm 8,4$ vs. 100%, $n=7$), noch beim Ziliarmuskel ($104,3 \pm 5,6$ vs. 100%, $n=7$) Einfluss auf die durch Carbachol induzierte Kontraktion (siehe Abb. 3.6.).

3.2.2 Wirkung von Methoctramin

Methoctramin konnte nur in den Trabekelwerksstreifen die Kontraktion antagonisieren. In den Ziliarmuskelpräparationen hatte es keinen Effekt. Die Abbildung 3.7. zeigt die Kontraktionskurve bei einer Methoctramin-Konzentration von 10^{-6} M. Das Balkendiagramm in Abbildung 3.8. zeigt, dass die Änderungen der Kontraktion im TM nach Applikation von Methoctramin für 10^{-7} M, 10^{-6} M und 5×10^{-6} M als signifikant einzustufen sind (10^{-7} M: $85,5 \pm 4,3$ vs. 100%, $n=7$, $p < 0,015$ (*); 10^{-6} M: $69,1 \pm 3,8$ vs. 100%, $n=6$, $p < 0,001$ (***) ; 5×10^{-6} M: $64,8 \pm 1,5$ vs. 100%, $n=5$, $p < 0,001$ (***)). Für die Anwendung auf ZM waren die Veränderungen nach der Applikation des Antagonisten nicht signifikant (10^{-7} M: $98,9 \pm 3,8$, $n=7$; 5×10^{-6} M: $101,3 \pm 5,3$, $n=5$)

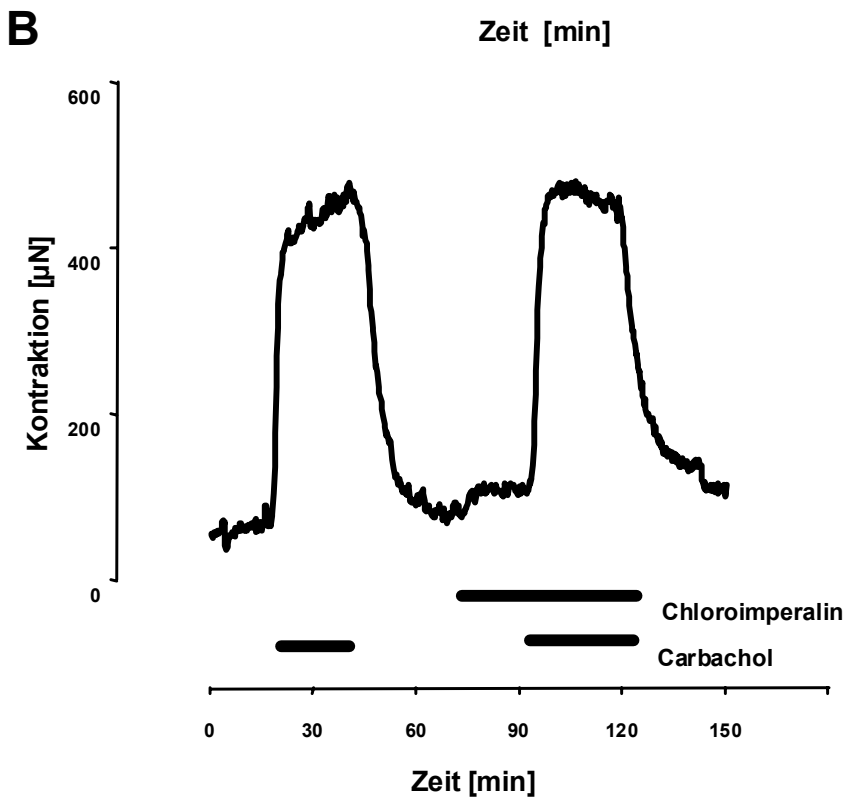
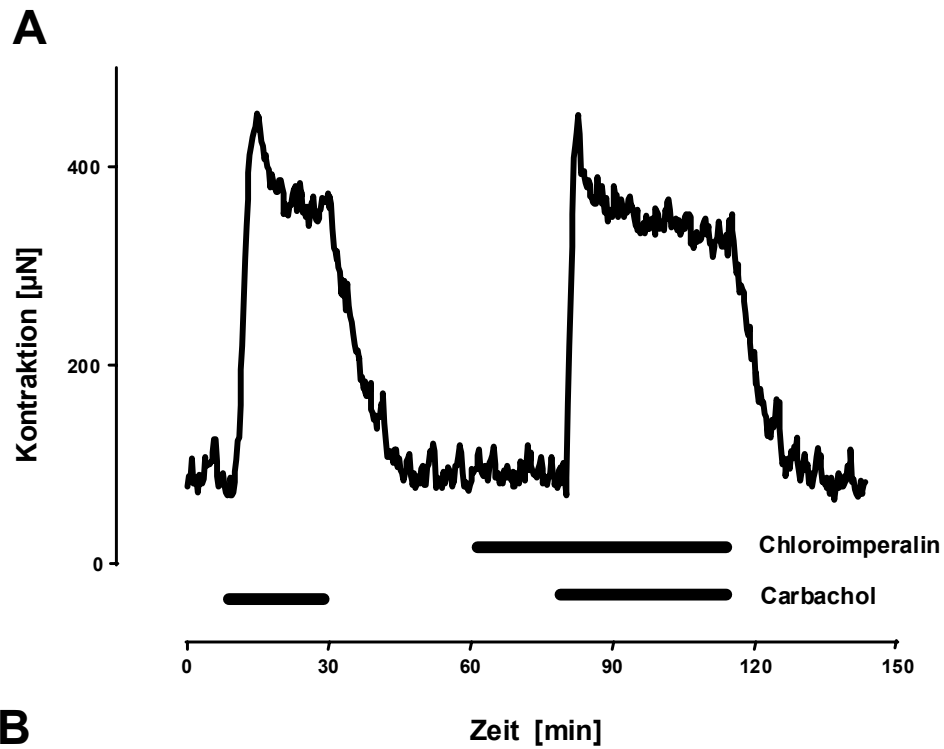


Abb. 3.6.: **A:** Wirkung von 3- α -Chloroimperialin auf Trabekelwerksstreifen
B: Wirkung von 3- α -Chloroimperialin auf Ziliarmuskelstreifen
 3- α -Chloroimperialin in der Konzentration 10^{-6}M hatte weder bei TM, noch bei ZM einen Effekt.

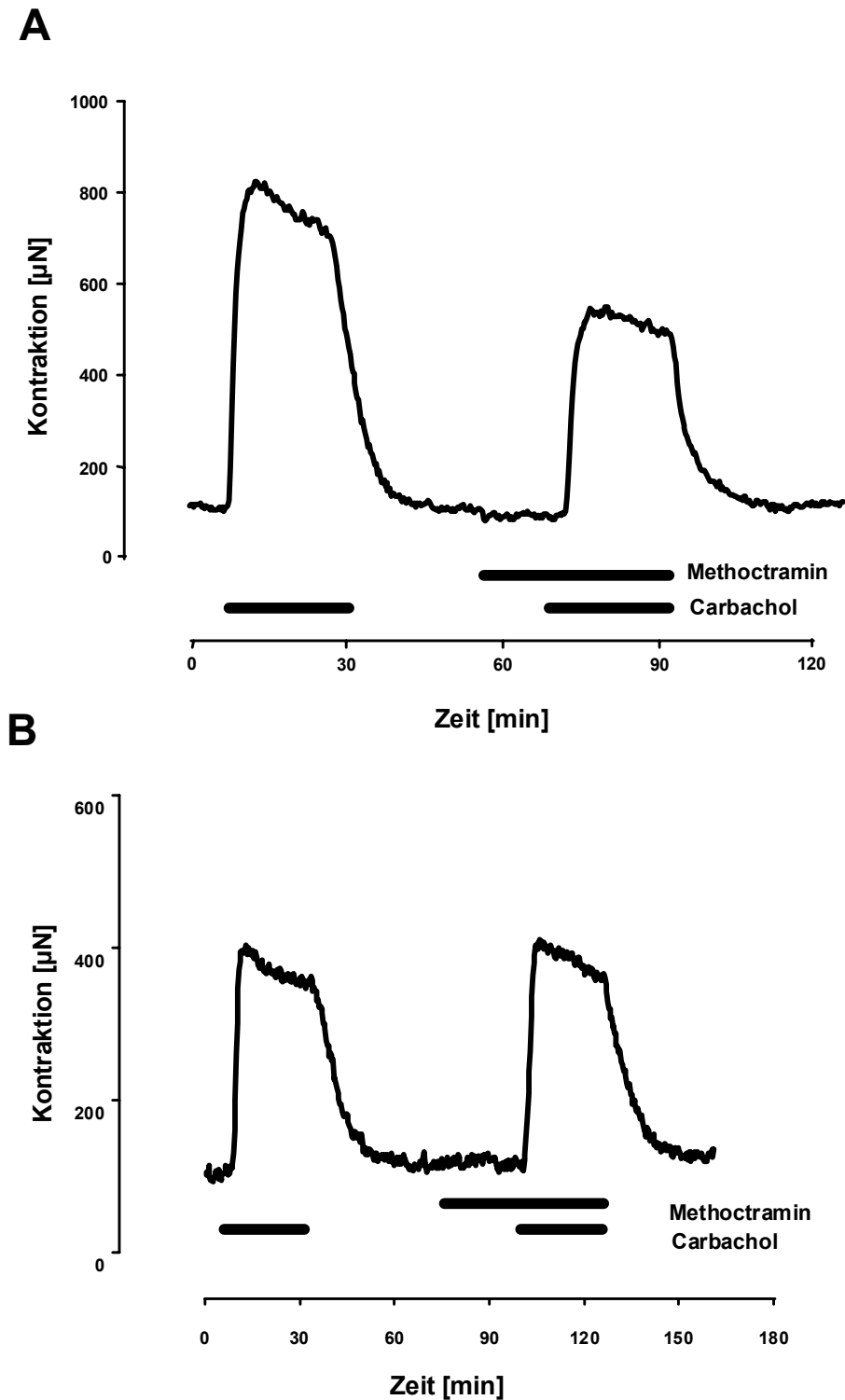


Abb. 3.7.: **A:** Wirkung von Methoctramin auf Trabekelwerksstreifen
B: Wirkung von Methoctramin auf Ziliarmuskelstreifen
 Am TM antagonisiert Methoctramin in der Konzentration $10^{-6}M$ die Wirkung von Carbachol und reduziert so die Kontraktionskraft um ca. 30%. Am ZM zeigt es in der Konzentration $5 \times 10^{-6}M$ keinen Effekt.

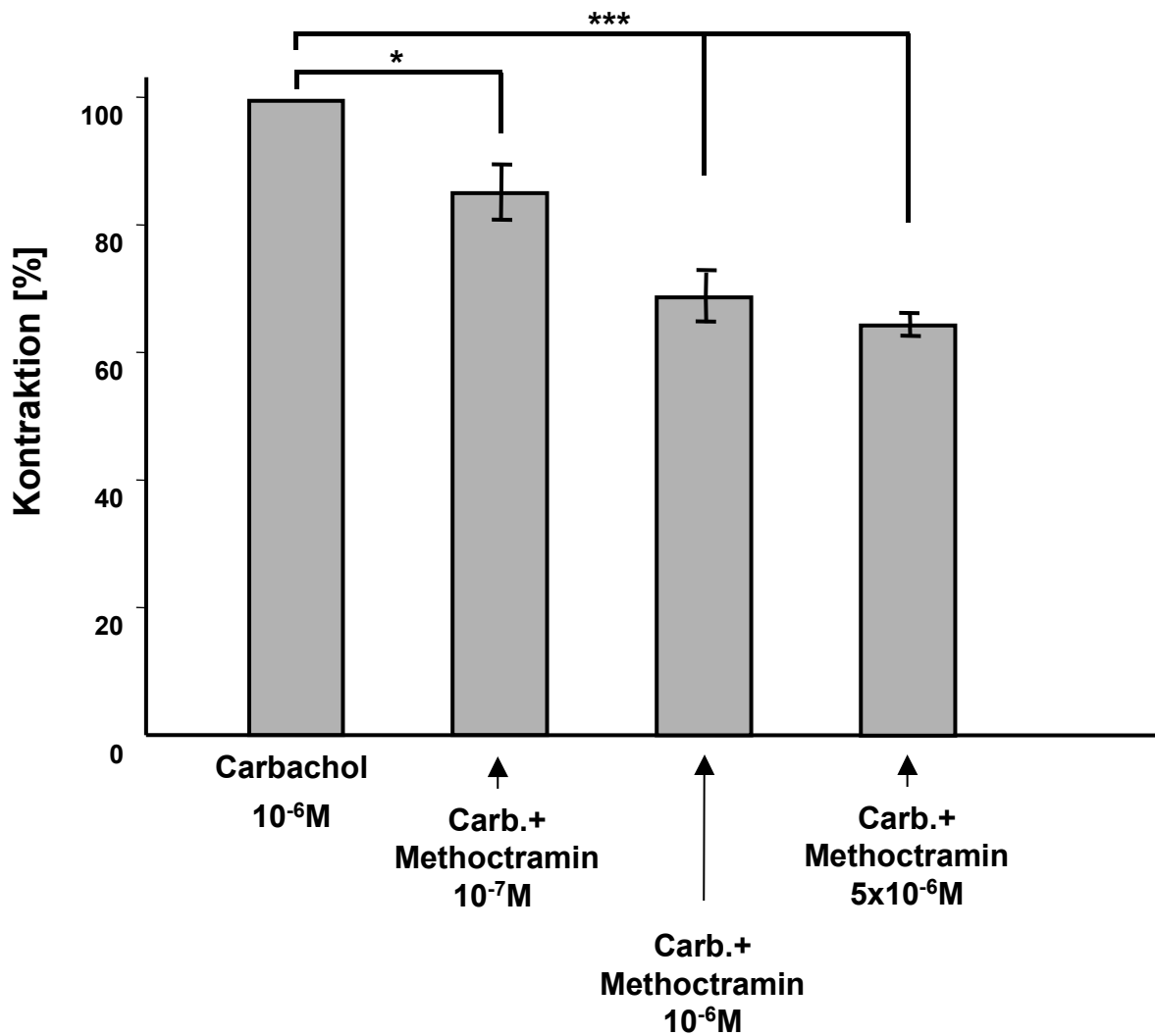


Abb. 3.8.: Methoctramin in Konzentrationen von 10^{-7}M , 10^{-6}M und $5 \times 10^{-6}\text{M}$ antagonisiert die Wirkung von Carbachol im Trabekelwerk dosisabhängig

10^{-7}M : $85,5 \pm 4,3$ vs. 100%, $n=7$, $p < 0,015$ (*);

10^{-6}M : $69,1 \pm 3,8$ vs. 100%, $n=6$, $p < 0,001$ (***);

$5 \times 10^{-6}\text{M}$: $64,8 \pm 1,5$ vs. 100%, $n=5$, $p < 0,001$ (***)

3.2.3 Wirkung von Methoctramin bei gleichzeitiger Antagonisierung von M₁ und M₃ Rezeptoren

Um sicherzustellen, dass die Effekte von Methoctramin am Trabekelwerk nicht unspezifisch von einer antagonistischer Wirkung auf M₁ bzw. der M₃ Rezeptoren zurückzuführen sind, wurden M₁ bzw. M₃ Rezeptor vor Gabe von Methoctramin mit Pirenzipin (10⁻⁶M) bzw. 4-DAMP (10⁻⁸M) blockiert. Aus Vorversuchen ist bekannt, dass auch diese Substanzen zu einer Relaxation des Trabekelwerks führen (Wiederholt et al., 1995). Die Abbildung 3.9. zeigt, dass die Muskelspannung nach der durch Pirenzipin bzw. 4-DAMP ausgelösten Relaxation zusätzlich durch Zugabe von Methoctramin signifikant reduziert werden konnte (Pirenzipin 10⁻⁶M: 45,3±5,7% vs. 100%, plus Methoctramin 10⁻⁶M 25±2,3%, n=7, p<0,05 (*); 4-DAMP 10⁻⁸M: 53±7,3% vs. 100%, plus Methoctramin 10⁻⁶M 20±7,7%, n=5, p<0,01 (**)).

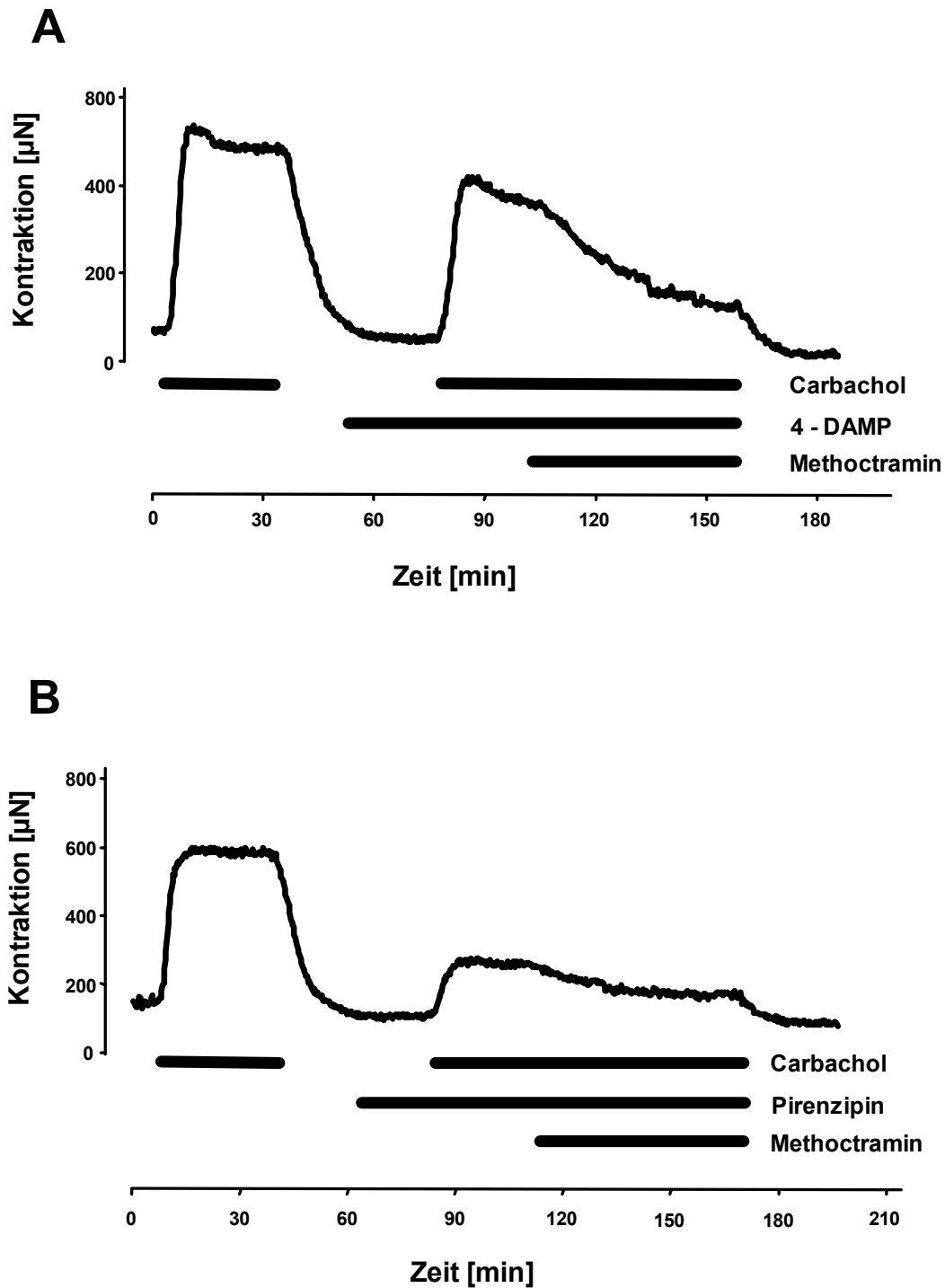


Abb. 3.9.: **A:** Wirkung von Methoctramin $10^{-6}M$ am Trabekelwerk bei gleichzeitiger Antagonisierung des m3 Rezeptors durch 4-DAMP $10^{-8}M$
B: Wirkung von Methoctramin $10^{-6}M$ am Trabekelwerk bei gleichzeitiger Antagonisierung des m1 Rezeptors durch Pirenzepin $10^{-6}M$
 Sowohl nach Antagonisierung der m1, wie auch des m3 Rezeptors lässt sich das Trabekelwerk mit Methoctramin zusätzlich relaxieren.

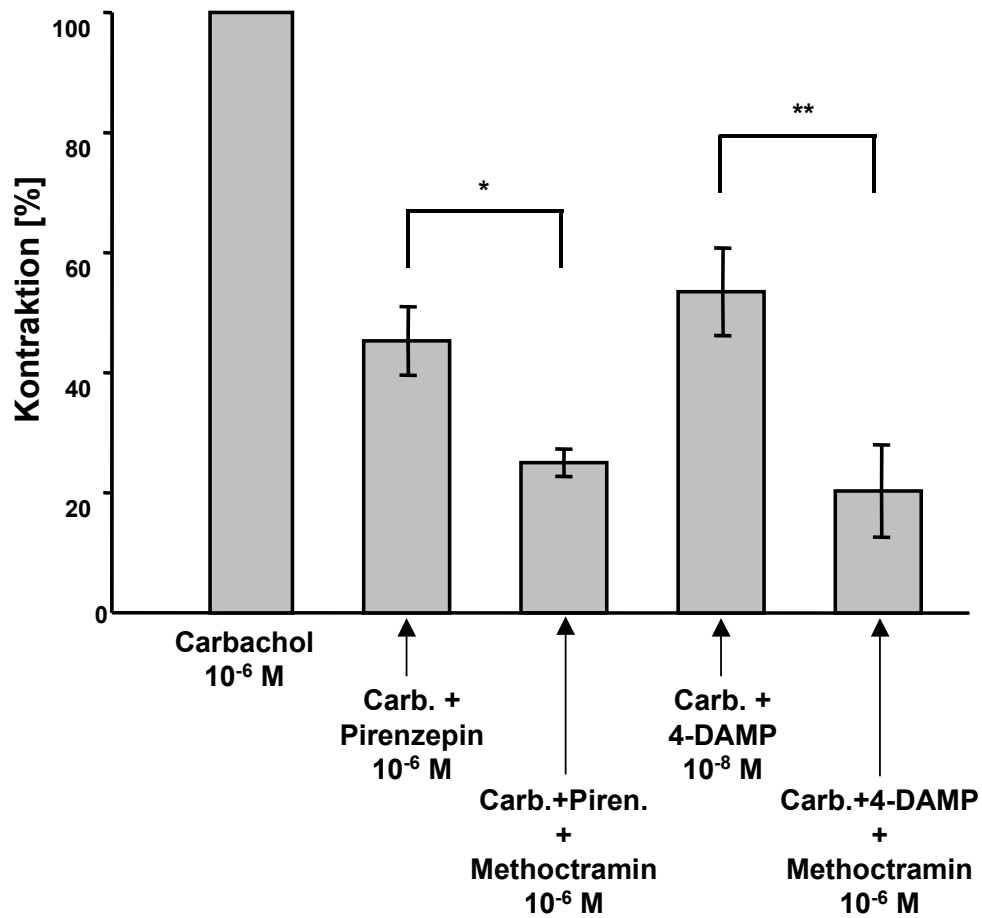


Abb. 3.10.: Balkendiagramm zu den Versuchen aus Abb. 3.9.
 Pirenzipin 10^{-6} M: $45,3 \pm 5,7\%$ vs. 100%, plus Methoctramin 10^{-6} M $25 \pm 2,3\%$, $n=7$, $p < 0,05$ (*); 4-DAMP 10^{-8} M: $53,5 \pm 7,3\%$ vs 100%, plus Methoctramin 10^{-6} M $20,3 \pm 7,7\%$, $n=5$, $p < 0,01$ (**).