

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Untersuchungen

2.1.1 Zellmaterialien

Für die molekularbiologischen Experimente wurden Zellen des Trabekelmaschenwerkes (TM) aus dem Kammerwinkel des Auges und Zellen des Ziliarkörpers (ZM) benötigt. Von beiden Zellarten wurden sowohl humane als auch bovine Kulturen und Nativgewebe untersucht.

Die humanen Gewebe stammten von Spenderaugen oder enukleierten Augen nach malignem Aderhautmelanom (Augenklinik, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin). Den Krankenakten zufolge lag bei den Spendern keine Glaukomerkrankung vor (Thieme et al., 1999). Bovine Gewebe aus 2 bis 4 Jahre alten Tieren wurden frisch von einem nahe gelegenen Schlachthof bezogen.

2.1.2 Gewebepräparation

2.1.2.1 Präparation humanen Gewebes

Möglichst unmittelbar nach Eintreffen der auf Eis gelagerten Augen wurden diese nach einheitlicher Methode präpariert (Flügel et al., 1991): Unter mikroskopischer Sicht wurden die Augen äquatorial eröffnet. In der vorderen Hälfte wurde nach Durchtrennung der Zonulafasern mit einer feinen Schere die Linse entfernt.

Mit der chirurgischen Pinzette konnte der Ziliarkörper zusammen mit der Iris von der Sklera abgezogen werden, im sterilen Petrischälchen ließ sich der Ziliarmuskel (ZM) von Ziliarkörper und Iris als blasse Struktur unterscheiden und konnte freipräpariert werden. Zur Kultivierung fanden nur nach außen liegende Gewebeanteile Verwendung.

Das TM wurde zunächst mittels eines feinen ca. 0,5 mm starken Drahtes als Sonde durch den Schlemm-Kanal markiert und dann entlang diesem in dünnen Streifen herausgetrennt.

2.1.2.2 Präparation bovinen Gewebes

Die in eisgekühlter Ringerlösung gelagerten Rinderaugen wurden nur wenige Stunden nach Schlachtung in folgender Weise präpariert (Lepple-Wienhues et al., 1991a): Ein kreisrunder Schnitt ca. 10 mm hinter dem Limbus corneae zerlegte die Augen in zwei Teile. Nach Entfer-

nung von Linse und Glaskörperresten wurde die vordere Augenhälfte in gleiche Sektoren geviertelt. Die corneale Seite untenliegend konnte nun die Iris am mit Nadeln fixierten Augensektor zurückgeklappt und vorsichtig unter mikroskopischer Sicht vom deutlich abgrenzbaren TM getrennt werden. Durch horizontale Schnitte war es möglich, die Iriswurzel zusammen mit dem Ziliarepithel auch vom ZM abzutrennen, so dass TM und ZM allein auf der Sklera übrig blieben.

Durch zwei zirkuläre Schnitte in die Mitte des Trabekelwerks hinein, parallel zur Ansatzlinie des Ligamentum pectinatum an der Sklera, ließen sich ca. 0,5 mm breite reine TM-Streifen herausstanzen und von der Sklera ablösen.

Durch die stärkere Pigmentierung unterscheidbar, konnte der ZM sauber vom TM getrennt und in radiären, dem Muskelfaserverlauf entsprechenden Streifen von der Sklera gelöst werden (s. Abb. 2).

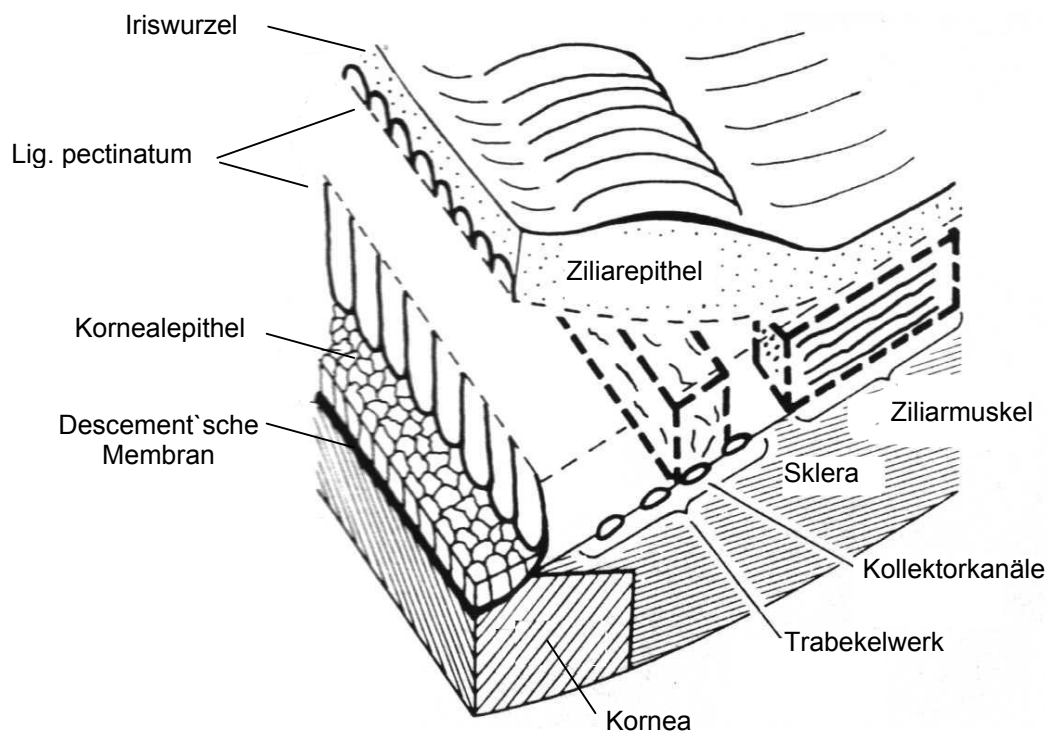


Abb. 2 : Schema des Kammerwinkels mit Illustration der Schnittführung zur Präparation sauber isolierter TM- und ZM-Streifen. (Aus: Lepple-Wienhues et al., 1991a).

2.1.3 Zellkultivierung

Die Zellkultivierung erfolgte nach folgender Methode (Coroneo et al., 1991):

Die sauber herausgetrennten Gewebeproben wurden in Petrischälchen von 35 mm Durchmesser gebracht und mit Deckgläsern versehen. In einem Kulturmedium aus Dulbecco's Modification of Eagle's minimal essential Medium (DMEM) ergänzt mit 20% fetalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin wurde das Gewebe bei 37°C in einem Gasgemisch von 95% Luft und 5% Kohlendioxid unter gleichmäßigen sterilen Bedingungen inkubiert. Eine Erneuerung des Kulturmediums erfolgte zweimal wöchentlich. Erreichten die Kulturen die mikroskopisch beurteilbare Konfluenz eines dichten Zellrasens, so wurden sie für 35 min. bei 37°C in 0,1% Trypsin in Kulturmedium gehalten (Trypsin-EGTA-Methode). Zellverbände lösten sich dabei voneinander und vom Schälchenboden. Das dabei beteiligte EGTA hatte die Funktion, Kalzium- und Magnesiumionen durch Chelatierung zu eliminieren, da das proteolytische Enzym Trypsin nur ohne Beteiligung dieser Ionen wirkt. Anschließend erfolgte die so genannte Passage der Zellen, d.h. die Verteilung auf weitere Petrischälchen. Nach der 5. bis 8. Passage waren die Zellen für die Experimente verwendbar, die Kultur sollte dabei mäßig konfluent und einschichtig vorliegen.

Da es bei humanem anders als bei bovinem Gewebe besonders schwierig ist, TM und ZM sauber voneinander zu trennen, wurden die verwendeten Zellkulturen an der Universität Erlangen von Prof. Elke Lütchen-Drecoll mikroskopisch und immunhistochemisch speziell untersucht und zeigten dabei die für Trabekelwerk bzw. Ziliarmuskel typischen Charakteristika (Flügel et al., 1991).

2.1.4 Zellstimulation

In einigen Experimenten sollten Zellproteine in einem bestimmten funktionell-physiologischen Zustand (z.B. phosphoryliert) untersucht werden. Dazu wurden die vom Nährmedium mittels Absaugung befreiten Kulturen für eine bestimmte Dauer bei 37°C mit entsprechenden Stimulationssubstanzen, wie beispielsweise Endothelin, inkubiert und unmittelbar anschließend dem Experiment zugeführt.

2.1.5 Zelllysisierung

Die Petrischälchen wurden auf Eis gelagert und mit Hilfe eines an die Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Saugschlauches von Kulturmedium bzw. Stimulationslösung befreit. Eine dreifache Spülung mit eisgekühlter Phosphat-Buffered-Saline-Lösung (PBS) (s. Kap. 2.1.14)

entfernte Reste des Kulturmediums. Bei Stimulationsexperimenten unterbrach die Kühlung gleichzeitig die Stimulation. Anschließend wurde mit Filterpapierstreifen zurückbleibende PBS-Lösung aus den schräg gestellten Schälchen abgenommen.

2.1.5.1 Lysierung kultivierter Zellen

Hier wurden die Petrischälchen mit 300 µl Lysepuffer (s. Kap. 2.1.14) versehen und die am Boden haftenden Zellen mit einem sterilen Zellscraper (Costar, Corning inc., USA) abgelöst und die entstandene Zellsuspension in Eppendorfgefäße pipettiert. Während einer Dauer von 30 min. auf einer Wippvorrichtung (ROCKY[®], Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau, Deutschland) brach der Lysepuffer die Zellstruktur und zerlegte Proteine je nach seiner Art in bestimmte Fraktionen. Zugesezte Protease- und Phosphataseinhibitoren hinderten zelleigene Enzyme daran, Proteine zu denaturieren. Durch Zentrifugation (Zentrifuge: Hermle Z233MK, Denville Scientific, USA) für 5 min. bei 14000 U/min. (18620g) wurden feste Zellbestandteile von dem leichteren Proteingemisch, welches immer noch als Gesamtlusat bezeichnet wurde, getrennt. Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten wegen der Gefahr der Proteindenaturierung bei 4°C, es wurde also auf Eis gearbeitet, Lösungen und Arbeitsgeräte wurden entsprechend gekühlt.

2.1.5.2 Lysierung nativer Gewebe

Die in Ringerlösung oder PBS-Lösung gelagerten Gewebstreifen wurden in ein Eppendorfgefäß zusammen mit unterschiedlichen Mengen Lysepuffer (s. Kap. 2.1.14) mit einem Homogenisator (Polytron, Kinematic AG, Schweiz) zerkleinert.

Bei einigen Versuchen wurde das Gewebe anschließend zur wirkungsvolleren Proteinfractionierung durch Eintauchen der Küvette in flüssigen Stickstoff schockgefroren und gleich darauf auf 37°C erwärmt. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt. Eine weitere Zentrifugation wie oben beschrieben, befreite das Lusat abschließend von seinen festen Bestandteilen. Auch hier erfolgten alle Schritte bei 4°C.

2.1.6 Proteinquantifizierung

Die Proteinquantifizierung der Gesamtlusatproben dient dazu, für alle Proben eine gleiche Proteinkonzentration zu gewährleisten. Dies ist erforderlich, um im anschließenden elektrophoretischen Trennverfahren mehrere gleiche Proteinmengen nebeneinander auftrennen

und die nach immunologischem Proteinnachweis entstehenden Signalbanden unterschiedlicher Proben miteinander vergleichen zu können.

Mittels des BCA-Tests (Pierce, USA) nach dem Prinzip der Biuret-Reaktion wurde zunächst die Ausgangsproteinkonzentration der Proben ermittelt: In die Messküvetten einer speziellen 24er-Photometer-Well-Plate (Munk, Deutschland) wurden gleiche Mengen der Gesamtlysatsproben pipettiert, ebenso 3 standardisierte Proteinlösungen bovines Serumalbumins (BSA, Pierce) von 0,2, 0,8 und 1,2 µg/µl Protein. Allen Wells wurde ein zuvor angemischtes Zweikomponentenreagenz (Pierce, USA) hinzugefügt. Cu²⁺-Ionen (in alkalischer Lösung entstandener Protein-Cu²⁺-Komplexe) wurden nun zu Cu⁺ reduziert und bildeten mit Bicinchonininsäure (BCA) bei 37°C binnen 30 min. violette Farbkomplexe, deren Extinktion bei 562 nm Wellenlänge mit dem computergesteuerten Photometer (Shimadzu CS 9301 PC, Shimadzu, Japan) gemessen werden konnte. Durch Vergleich mit den Standards wurde die Proteinkonzentration in den einzelnen Proben errechnet. Eine entsprechende Verdünnung mit Lysepuffer stellte eine einheitliche Proteinkonzentration in allen Proben her.

2.1.7 Immunopräzipitation (IP)

Durch die Immunopräzipitation wird das gesuchte Protein, mit Hilfe zugesetzter Antikörper, spezifisch im Sinne einer Vorselektion aus dem Gesamtlysate herausisoliert. Es sind somit erstens selbst geringste Konzentrationen des gesuchten Proteins nachweisbar, zweitens lassen sich reinere, von Störsignalen freiere Nachweissignale erzielen.

Sepharose-A-beads (Sigma, Deutschland) wurden, durch dreimaliges Spülen mit Lysepuffer vom Ethanol befreit. Diese gerade sichtbaren, unlöslichen, kugelförmigen Zuckerstrukturen einer Dichte >1 sind mit Protein A aus *Staphylococcus aureus* Stämmen ummantelt. Protein-A ist in der Lage, die Fc-Enden von Antikörpern des IgA-, IgM- und IgG-Typs zu binden. Die Gesamtlysatsproben von je 250 µl, und für jede Probe 25 µl spezifische Antikörper gegen das gesuchte Protein wurden getrennt voneinander mit ca. 30 µg Sepharose-Beads über eine Stunde bei 4°C auf einem Rotor inkubiert. Die Sepharose-Beads banden dabei Antikörper, bzw. im Gesamtlysate Zellmembran- und Zellorganellreste. Alle weiteren Schritte hatten streng bei 4°C zu erfolgen, um entstandene Bindungen nicht vorzeitig zu lösen. Durch Zentrifugation bei 14000 U/min. (18620g) für 20 min. bildeten die schwereren Sepharose-Beads ein Pellet. Im Falle der Antikörper wurde der Überstand verworfen, im Falle des Lysates hingegen wurde der von Zellbestandteilen gereinigte Überstand abpipettiert und zur erneuten Inku-

bation über Nacht auf dem Rotor den an die Sepharose Beads gebundenen Antikörpern zugegeben. Die Antikörper banden nun die gesuchten Proteine, der entstehende Komplex ließ sich am nächsten Tag gebunden an die schwereren Sepharose-Beads bei 14000 U/min. (18620g) für 2 min. zu einem Pellet herunter zentrifugieren. Der Überstand aus unspezifischen Proteinen wurde mit Lämmli-Puffer (s.Kap. 2.1.14) versetzt, bei 95°C aufgeköcht und zur eventuellen späteren Erfolgskontrolle der IP bei -80°C eingefroren. Lämmli hatte die Funktion, die Proteine in ihre Primärstruktur zu bringen und in diesem Zustand stabil zu halten. In 6 vorsichtigen Waschschritten mit je 500 µl Lysepuffer und jeweils anschließender zweiminütiger Zentrifugation bei 2000 U/min. (380g) wurden überschüssige Antikörper und nicht gebundene Proteine im Pellet entfernt, da diese sonst zu starker Verunreinigung der späteren Nachweissignale geführt hätten. Durch Erhitzung der Proben für 5 min auf 95°C und mit Zusatz von Lämmli-Puffer, konnten sich die Antigen-Antikörperkomplexe von den Sepharose-Beads ablösen. Nach einem letzten zweiminütigen Abzentrifugieren der freien Sepharose-Beads bei 14000 U/min. (18620g) wurde der Überstand mit einer für Sepharose-Beads undurchlässigen Hamilton-Pipette abgenommen und direkt weiterverarbeitet.

2.1.8 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese hat die Aufgabe, die einzelnen Proteine, die im Gesamtlysat bzw. im Immunopräzipitat vermischt vorliegen, aufzutrennen. Dazu wird das Proteingemisch auf ein Gel aufgetragen und diesem ein elektrisches Feld angelegt. Entsprechend dem Molekulargewicht der Einzelproteine wandern diese unterschiedlich weit durch das Gel, so dass einzelne Banden entstehen.

Zunächst wurde ein 7,5%iges Polyacrylamid-Trenngel (s. Kap. 2.1.14) angerührt und in eine spezielle Gießvorrichtung (Biorad, Life Science Group, USA) gegossen. Diesem wurde ein ähnlich zusammengesetztes Sammelgel (s. Kap. 2.1.14) direkt vorgeschaltet, welches vertiefte Hohlräume (Taschen) zum Auftragen der Proteine enthielt und die erste Strecke der Proteinwanderung vor Eintritt in das Trenngel darstellte. Die Gele wurden senkrecht in einer Mini-Protean-Elektrophoresekammer (Biorad, Life Science Group, USA) aufgestellt und waren von Sodiumdodecylphosphat-Lösung (SDS) enthaltendem Elektrophoresepuffer (s. Kap. 2.1.14) umgeben. Dieses negativ geladene Detergenz fixierte die Proteine in ihrem denaturierten Zustand, indem es Komplexe mit ihnen bildete. Es gewährleistete weiterhin, dass die Proteine negativ geladen vorlagen und vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften aufwiesen und verhinderte Wechselwirkungen zwischen den Proteinen. Das Gel stellte eine Brücke zwischen

zwei elektrisch voneinander getrennten Flüssigkeitsräumen der Elektrophoresekammer dar. Nach Anbringung von Spannungspolen in jedem der Räume lag das Gel in einem elektrischen Feld. Zum Auftragen in die Taschen des Sammelgels wurde Immunopräzipitat (s. Kap. 2.1.7) bzw. frisch zubereitetes oder zuvor bei -80°C aufbewahrtes Gesamtlysat (s. Kap. 2.1.6) verwendet. In beiden Fällen mussten die Proben mit Lämmli (s. Kap. 2.1.14) versetzt sein, welches zum erleichterten Arbeiten mit den Proteinen einen Farbstoff (Bromphenolblau) enthielt. Außerdem mussten sie vor dem Auftragen für 5 min. auf 95°C erhitzt worden sein, um Proteine vollständig zu denaturieren und eventuell auftretende Proteasen zu inhibieren. Je nach Proteingehalt der Proben wurden pro Tasche 10 bis 70 μl aufgetragen. Zwischen den probenbeladenen Taschen wurden andere mit je 5 μl standardisiertem Markerproteingemisch (Sigma) bestückt. Dieses enthielt gefärbte Proteine definierter Molekülgrößen, so dass nach seiner Auftrennung eine Molekulargewichtsskala entstand. An dieser konnte die Molekülgröße der zu untersuchenden Proteine nach deren Auftrennung abgelesen werden. Durch Anlage eines elektrischen Feldes von 100 Volt für die erste Wanderungsstrecke durch das Sammelgel und später 150 V für die Strecke im Trenngel wanderten die Proteine aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode. Die enge Gitternetzstruktur der Polyacrylgelmatrix stellte dabei einen Wanderungswiderstand proportional zum Molekulargewicht des Proteins dar. Je nach Größe hatten die Proteine also unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten und lagen nach Abschalten des elektrischen Feldes (sobald die kleinsten Proteine - an der Farbstofffront erkennbar - das Gel durchlaufen hatten) entsprechend in einzelnen, hier noch nicht sichtbaren Banden aufgetrennt vor.

Durch Veränderung des Polyacrylamid-Anteils der Gelzusammensetzung (Prozentigkeit des Gels) konnte die Dichte der Matrix und damit ihre Durchlässigkeit variiert und optimal an die Größe des gesuchten Proteins angepasst werden.

2.1.9 Western-Blotting

Da die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine für die Anwendung weiterer Untersuchungsmaßnahmen im Gel zu instabil vorliegen und das Gel für die weitere Behandlung zu wenig widerstandsfähig ist, müssen sie mittels eines elektrischen Feldes auf eine spezielle reißfeste Nitrozellulosemembran transferiert werden, was als Western-Blotting bezeichnet wird.

Das Gel wurde unmittelbar nach der Elektrophorese 15 min. lang in Transferpuffer (s. Kap. 2.1.14) äquilibriert, das gleiche geschah mit einer zuvor für 15 min. auf der Wippe (Rocky[®], Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau, Deutschland) in 96% Ethanol geschwenkten Nitrozellu-

losemembran (Polyscreen, NENTM, Life Science Products, USA). Anschließend wurde diese luftblasenfrei und durch Transferpuffer befeuchtet direkt auf das Gel aufgelegt. Durch ebenfalls mit Transferpuffer angefeuchtete Filterpapierlagen und spezielle Kissen wurden Gel und Membran nach den Außenseiten hin abgedeckt und in einer leichten Druck ausübenden Halterung in die Transferkammer (Mini-Protean-Elektrophoresekammer, s. Kap. 2.1.8) gebracht, die mit Transferpuffer aufgefüllt wurde. Transferpuffer enthielt ähnliche Substanzen wie Elektrophoresepuffer und bewirkte daher ebenfalls, dass die Proteine negativ geladen und denaturiert vorlagen. Zusätzlich enthielt er Methanol, welches die Lösung der Proteine aus dem Gel vermittelte. Durch Anlage einer Spannung von 100 V verließen die Proteine binnen einer Stunde aufgrund ihrer negativen Ladungen das Gel in Richtung Anode und blieben auf der Nitrozellulosemembran, die eine besonders hohe Proteinaffinität besaß, haften. Ein Eisblock hielt die Kammer während des gesamten Transfers bei 4°C.

2.1.10 Immunologische Proteinmarkierung

Die auf der Blottingmembran befindlichen Proteinbanden lassen sich in diesem Schritt mit spezifischen Antikörpern (Suchantikörper) gegen das gesuchte Protein markieren und mit weiteren Antikörpern mit angekoppelten Farbstoffen (Färbeantikörper) sichtbar machen.

Anschließend an das Western-Blotting wurde die Blotmembran zunächst für 60 min. auf der Wippe in 5%igem BSA in PBS-Tween-Lösung (s. Kap. 2.1.14) blockiert. Auf diese Weise wurden nichtbesetzte Proteinbindungsstellen der hoch proteinaffinen Nitrozellulosemembran abgesättigt und vor Bindung anderer, unspezifischer Proteine und Antikörper, die später zu Verunreinigungen und Artefakten geführt hätten, bewahrt. Nun wurde die Blotmembran über Nacht auf der Wippe bei 4°C mit spezifisch gegen das gesuchte Protein gerichteten, monoklonalen Suchantikörpern (s. Kap.2.1.15) inkubiert. Diese lagen dabei im Verhältnis 1:2000 bis 1:10000 verdünnt in 1%igem BSA in PBS-Tween-Lösung vor. Die richtige Antikörperkonzentration zur optimalen Detektion gesuchter Proteine, wurde durch entsprechende Verdünnungsreihen ermittelt. Sollten mehrere Proteinproben einer Membran auf unterschiedliche Proteine untersucht werden, so wurde die Membran entsprechend dem Verlauf der Proteinauftrennstrecken (*lanes*) unter den Taschen mit einer Schere sauber auseinander geschnitten und mit verschiedenen Antikörpertypen inkubiert.

Bei Versuchen mit polyklonalen Suchantikörpern wurde für eine Testmembran den Antikörpern eine Stunde zuvor ein Blockpeptid (s. Kap. 2.1.15) im 4- bis 5-fachen Überschuss hinzugegeben, welches genau der antikörperspezifischen Antigenstruktur entsprach und die Anti-

körper an ihren Antigenbindungsstellen besetzte. Spezifisch durch die Suchantikörper markierte Banden durften also auf dieser Membran nicht auftreten. So war es möglich, durch Vergleich zu prüfen, ob angefärbte Banden tatsächlich spezifisch oder durch die späteren Färbeantikörper unspezifisch markiert worden sind.

Am nächsten Tag wurden nicht gebundene überschüssige Suchantikörper durch Waschen (3x, je 10 min.) der Membranabschnitte auf der Wippe mit PBS-Tween-Lösung bei Raumtemperatur entfernt. Für 60 min. wurden die Membranen nun wiederum auf der Wippe bei Raumtemperatur mit Färbeantikörpern (s.Kap. 2.1.15) inkubiert. Die Antikörper lagen dabei im Verhältnis 1:10000 bis 1:40000 mit PBS-Tween-Lösung verdünnt vor. Sie mussten so gewählt werden, dass sie sich gegen die Suchantikörper, d.h. gegen deren Tierspezies richteten. Nach der Inkubation wurden wiederum überschüssige Antikörper mit PBS-Tween-Lösung abgewaschen. Eine exakt zweiminütige Inkubation jeder Membran in einem zuvor gemischten Zweikomponenten-Chemilumineszenz-Reagenz (ECL) (Amersham Life Science, England) regte den an die FC-Teile der Färbeantikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff Peroxidase zur Abstrahlung seines Spektrums im Röntgenstrahlenbereich an. In der Dunkelkammer wurde die Chemilumineszenz der markierten Proteine bei unterschiedlichen Expositionszeiten zwischen 20 sec. und über 30 min. auf hochempfindlichen Röntgenfilmen (Scientific Imaging Film X-OMAT LS und AR, Kodak, Rochester, USA) in 1:1 Größenverhältnissen festgehalten. Die Entwicklung der Filme erfolgte in wenigen Minuten mit einem Vollautomat (Kodak RP X-OMAT, Processor Model M6B). Auf den Filmen waren nun die Abbildungen der antikörpermarkierten Proteinbanden als Verdunkelungen sichtbar. Durch Auflegen des Films auf die Membranen konnten die farbig hervortretenden Markerbanden, die sich auf dem Film nur schwach abbildeten, mit einem Folienstift exakt übertragen werden. Unter Verwendung einer digitalen Densitriekamera (LAS-1000-Image-Analyzer, Fujifilm, Berlin) und geeigneter Software (AIDA 2.0, Raytest, Berlin) wurden die Röntgenfilmsignale für eine höherwertige und computerkompatible Darstellbarkeit der Versuchsdaten digitalisiert.

Häufig wurde eine „lane“ als Kontroll-lane verwendet und bei der Markierung mit Suchantikörpern ausgespart (2. Antibody-only-Test). Ähnlich wie bei Verwendung von Blockpeptiden war es dadurch möglich festzustellen, ob Banden unspezifisch von Färbeantikörpern markiert wurden. Wies die Kontroll-lane also gleiche Signale wie andere mit Suchantikörpern inkubierte „lanes“ auf, so sprach dies für unspezifisch durch Färbeantikörper markierte Banden und damit für ein unspezifisches Signal.

2.1.11 Membranstripping

Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, bereits mit Such- und Färbeantikörpern markierte und mit ECL-Reagenz entwickelte Membranen (s. Kap. 2.1.10) durch ein spezielles Waschverfahren von Antikörpern und anderen Substanzen zu reinigen (Strip). Anschließend können die Proteine der Membran eventuell mit Abwandlungen wie z.B. Zufügung eines anderen Antikörpers oder zusätzlichen Blockpeptides erneut markiert und untersucht werden. Da bei jedem Waschschrift auch Proteine von der Membran verloren gehen, kann ein Membranstrip nur etwa zwei- bis dreimal wiederholt werden, wobei die Signale dabei zunehmend schwächer werden.

Die Membran wurde für 15 min. auf der Wippe in 96%igem Ethanol durchtränkt, dann für 35 min. im 57°C warmen Wasserbad in Mercaptoethanol-Strippuffer (s. Kap. 2.1.14) inkubiert und anschließend, entsprechend dem oben beschriebenen Ablauf (s. Kap. 2.1.10), beginnend mit dem Blockieren in 5%igem BSA, weiterbehandelt.

2.1.12 Kopräzipitation

Die Kopräzipitation wird eingesetzt, wenn nachgewiesen werden soll, dass zwei Proteine, ihrer funktionellen Interaktion entsprechend aneinander gebunden, vorliegen.

Dies zu zeigen, wurde zunächst eine IP, bei der Antikörper gegen eines der zusammenhängenden gesuchten Proteine verwendet wurde, wie unter 2.1.7 beschrieben, durchgeführt. Im anschließenden unter 2.1.10 beschriebenen Immunoblottingverfahren wurde das Immunopräzipitat mit Antikörpern gegen das andere Protein markiert. Beide Schritte wurden noch einmal wiederholt, wobei die Antikörper der IP nun im Immunoblot und die des Immunoblots nun in der IP verwendet wurden. Signale, die in beiden Versuchsdurchgängen nachweisbar waren, gaben Hinweise auf funktionelle Interaktion dieser Proteine.

2.1.13 Auswertung

Alle proteinbiochemischen Untersuchungen wurden mehrmals wiederholt, die Anzahl ist im Ergebnisteil jeweils angegeben. Jeweils ein repräsentatives Experiment ist in der Abbildung dargestellt.

2.1.14 Verwendete Lösungen

Phosphate-Buffered-Saline (PBS):

1 Tablette Phosphate-Buffered-Saline (PBS) (Gibco, USA) ad 500 ml mit Aqua bidest.

Lysepuffer (für kultivierte Zellen und Nativgewebe):

In mM: 20 Tris; 137 NaCl

In %: 1 NP 40 Stocklösung; 10 Glycerol

Mit HCl wurde ein pH-Wert von 7,5 eingestellt.

Proteaseinhibitoren auf 10 ml Lysepuffer: 1 mg Aprotinin (Sigma, Deutschland); 1 Tablette Complete[®] Protease Inhibitor Cocktail (Boehringer, Deutschland).

Lysepuffer (alternativ):

nach: (Hayashi et al., 1996)

In mM : 150 Natriumchlorid, 1 Natriumorthovanadat, 0,05 Natriumfluorid, 50 Tris

In % : 1 Triton-X-100, 0,5 Natriumdeoxycholat, 0,1 Natriumdodecylsulfat SDS

in µg/ml: 0,3 EDTA

Es wurde ein pH-Wert von 7,6 mit rauchender HCl eingestellt.

Proteaseinhibitoren in µg/ml: 16 Benzamidine-HCl; 10 Phenanthroline; 10 Leupeptin; 10 Pepstatin; 174 Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 1 Aprotinin.

Lämmli:

Probenpuffer für Proteine

In mM : 500 Dithiothreitol , 300 Tris Puffer pH 6,8

In % : 50 Glycerol, 10 Sodium Dodecylphosphat Solution (SDS), 0,001 Bromphenolblau (BPB).

Sammelgel:

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

Trenngel:

in ml: 5,66 Acrylamid (Serva); 3,75 Tris 2 mol/l pH 8,8; 10,14 Aqua dest; 0,2 10% Natrium Dodecylphosphate Solution (SDS); 0,2 10% Ammoniumpersulfat (APS); 0,01 Tetramethylendiamin (TEMED, Gibco).

Elektrophorese-Puffer:

14,4 g Glycin, 3,04 g Tris; 10 ml 10% Natrium Dodecylphosphat Solution ad 1000 ml mit Aqua bidest.

Transfer-Puffer:

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

bovines Serum Albumin (BSA):

5%ig: 5 g Bovines Serum Albumin (BSA, Merck); Natriumazid auf 0,025 % (Sigma); ad 100 ml mit PBS/Tween-Lösung (s.u.)

2%ig: 2 g BSA; sonst identisch zu 5%igem BSA.

PBS/Tween-Lösung:

1 Tablette Phosphate Buffered Saline (PBS) (Gibco, USA); 500 µl Polyoxyethylenesorbitolmonolaurate (Tween 20) ad 500ml mit Aqua bidest.

Strip-Puffer:

100 ml 10% Natrium Dodecylphosphate Solution (SDS); 15,45 ml 2 mol/l Tris pH 6,8 ; ad 500 ml mit Aqua bidest.

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

2.1.15 Bezugsquellen von Chemikalien und Antikörpern

Chemikalien:

Verwendete Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Gibco BRL Life Technologies Ltd. (Scotland), Calbiochem Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Mallinckrodt Baker (Deventer, Holland), Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA), Pierce (Illinois, USA), Roche (Mannheim) und Sigma (Saint Louis, Missouri, USA).

Antikörper:

Folgende Antikörpertypen wurden verwendet:

Antikörper gegen ROCK-1 (K-1):

Polyklonale Antikörper der Ziege

Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA

Antikörper gegen ROCK-2 (N-19):

Polyklonale Antikörper der Ziege

Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA

Blockpeptid passend zu AK gegen ROCK-1 und -2:

Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA

Antikörper gegen Myosin-Light-Chain-Kinase:

Clone K 36

Monoklonale Antikörper der Maus

Sigma, Saint Louis, Missouri, USA

Antikörper gegen Myosin (Smooth):

Clone HSM-V

Monoklonale Antikörper der Maus

Sigma, Saint Louis, Missouri, USA

Peroxidase- konjugierte Färbeantikörper:

Je nach Typ des Suchantikörpers Ziege-Anti-Maus-Typ oder Esel-Anti-Ziege-Typ

Dianova, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., USA.

2.2 Funktionelle Untersuchungen: Kontraktilität

Die funktionelle Kontraktionsmessung dient zur Untersuchung des isometrischen Kontraktionsverhaltens isolierter Gewebstreifen bei Applikation verschiedener Pharmaka.

2.2.1 Herkunft und Präparation der Gewebsmaterialien

Die funktionellen Kontraktionsmessungen erfolgten ausschließlich an bovinen Geweben des TM und des ZM. Die Rinderaugen wurden von einem Schlachthof frisch bezogen und eisgekühlt ins Labor transportiert. Sofort anschließend begann die Präparation nach folgender Methode (Lepple-Wienhues et al., 1991a):

Mit einer Schere wurde das Auge von periorbitalem Fettgewebe und äußeren Augenmuskeln befreit und durch einen Schnitt 10 mm hinter dem Limbus corneae in zwei Hälften geteilt, von denen die hintere Hälfte mit anhaftendem Glaskörper verworfen wurde. Auf schnittfester Unterlage konnte die vordere Hälfte mit einem Skalpell in gleichgroße Sektoren geviertelt werden, nachdem vorsichtig mit Schere und Pinzette Glaskörperreste und Linse entfernt wurden. Die seitlich der schlitzförmigen Rinderpupille einander gegenüber gelegenen Sektoren wurden, die Kornea nach unten weisend, mit Nadeln auf einer Platte fixiert und unter mikroskopischer Sicht weiterpräpariert. Mit feiner Pinzette wurde die Iris vorsichtig angehoben, bis an ihrem korneoskleralen Übergang das Ligamentum pectinatum sichtbar wurde. Dieses wurde durchtrennt. Die Iris und das an sie anschließende Ziliarkörperepithel konnten durch feine Horizontalschnitte abpräpariert werden, bis das grauweißliche, wollartige TM und die davon unterscheidbare blauschwarze untere Schicht des ZM freilagen. Die obere Ziliarmuskelschicht wurde dabei mit dem Ziliarepithel entfernt und verworfen. Durch Längsschnitte in den ZM entsprechend seiner Faserrichtung ließ sich dieser in feine Gewebstreifen von ca. 4 mm Länge und 0,5 bis 2 mm Breite zerteilen.

Durch zwei vertikale Schnitte parallel zum Ansatz des Ligamentum pectinatum in die Mitte des Trabekelwerks ca. 0,5 und 1,5 mm vor den Ziliarmuskelansatz wurden dessen einstrahlende Fasern sauber vom TM abgetrennt und ein ca. 12 mm langer Streifen des letzteren ausgestanzt. Nach vorsichtiger Lösung des Streifens von der Sklera wurde er in Streifen gleicher Größe wie beim ZM zerteilt (s.a. Abb. 2).

Alle Streifen wurden in Petrischälchen in HEPES-gepufferter Ringerlösung (s. Kap. 2.2.6) mit 5 mmol/l Glucose auf Eis gelagert.

2.2.2 Messvorrichtung

Die Messvorrichtung zur Messung von Gewebskontraktionen bei Applikation verschiedener Pharmaka und Stimulantien bestand aus einem Perfusionssystem und einem Kraft-Längen-Messer (Force-Length-Transducer) (Lepple-Wienhues et al., 1991a), die durch einen gemeinsamen Computer gesteuert werden konnten. Es waren 8 Messkammern für ebenso viele Gewebestreifen vorhanden, sie arbeiteten synchron koordiniert durch den Computer, jedoch unabhängig voneinander.

2.2.2.1 Kraft-Längen-Messer

Mit Hilfe des Kraft-Längen-Messers war es möglich, isometrische Kontraktionen von 0,5 bis 2000 μN Kraft zu messen. Dazu wurde jeder Gewebestreifen mit Hilfe eines Gewebeklebers (Histoacryl, B. Braun Melsungen AG, Deutschland) zwischen zwei Nadeln eingespannt. Eine war fixiert, die andere war mit dem langen Hebel einer feinen Drehspule verbunden. Der kürzere Hebel stellte die Lichtschranke zwischen einer Lichtquelle und einer Photodiode dar und verschattete die Photodiode je nach seiner Position in unterschiedlichem Maße. Um Störeffekte einfallenden Umgebungslichtes zu verhindern, war die Messapparatur in einem schwarzen Kasten untergebracht. Eine zweite Photodiode sorgte zusätzlich für Subtraktion von Umgebungslicht. Kontraktion oder Relaxation des Gewebestreifens führte zur Auslenkung des Hebels, welche von der Photodiode registriert wurde. Über die elektromagnetische Drehspule ließ sich der Auslenkung mit Hilfe eines Regelkreises eine entsprechende Kraft entgegenrichten, so dass die Länge des Gewebestreifens konstant gehalten wurde. Außerdem konnte die Länge des Gewebestreifens durch Veränderung der Nullposition am Regelsystem vorgewählt werden. Über einen Analog-Digital-Wandler (BMC Systeme GmbH, Deutschland) wurden die zur Konstanthaltung benötigten in μN geeichten Stromstärkenänderungen 6 mal pro Minute vom Computer (Schneider CPC 6128, Türkheim, Deutschland) aufgezeichnet, so dass die Kontraktionskraft der Gewebestreifen auf einem Monitor direkt abgelesen werden konnte. Das System ist in der Lage, Längenänderungen von weniger als 10 μm zu registrieren.

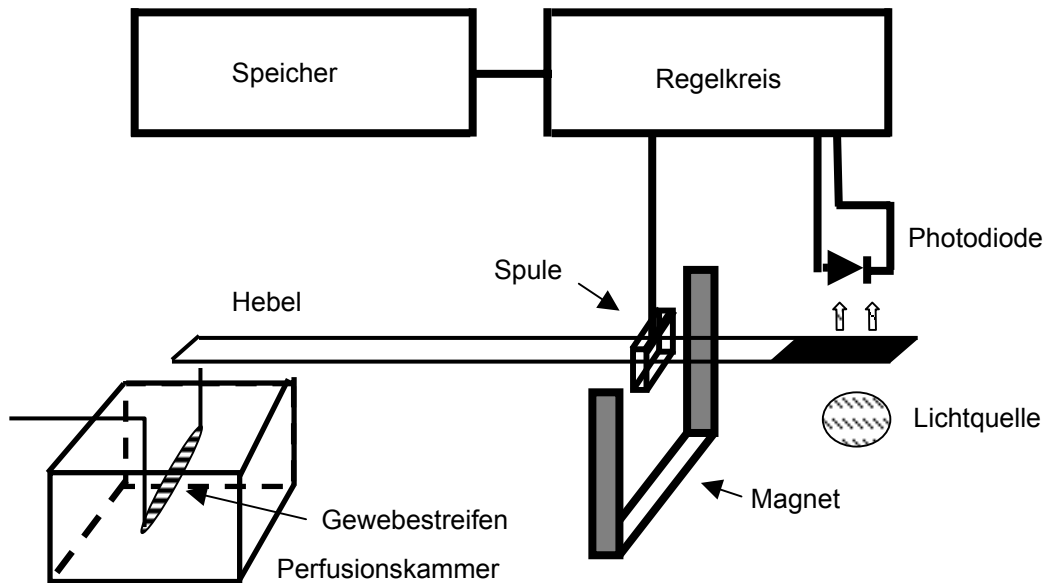


Abb. 3: Schema des Aufbaus eines Kraft-Längen-Messers der Messapparatur zur Kontraktionsmessung. Abgewandelt nach: (Lepple-Wienhues et al., 1991a).

2.2.2.2 Perfusionssystem

Die oben erwähnten zwischen zwei Nadeln eingespannten Gewebstreifen waren jeweils in eine von 8 Perfusionskammern von je 2 ml Volumen eingetaucht. Jede Kammer wurde mit Hilfe eines eigenen Schlauchs mit 6 ml/min Perfusionslösung (s. Kap. 2.2.6) aus jeweils der Kammer zugeordneten Behältern turbulenzarm durchströmt. Die Schläuche aller Kammern liefen über eine gemeinsame Rollerpumpe (Ismatec, Zürich, Schweiz), so dass die Perfusion der einzelnen Kammern zwar mit unterschiedlichen Lösungen, jedoch zeitsynchron gesteuert erfolgen konnte. Schläuche und Kammer waren ummantelt, in der Ummantelung sorgte fließendes, vorgewärmtes Wasser durch Wärmeaustausch für ein gleichmäßiges Temperaturniveau von 36°C in allen Kammern und Schläuchen. Zwischengeschaltet zwischen Rollerpumpe und Lösungsbehälter waren vom Computer gesteuerte, elektromagnetische Ventile. Bei einem Perfusionstrom von 6 ml/min./Kammer war das Kammervolumen von 2 ml bei Umschalten auf eine andere Perfusionslösung nach 1 min. zu ca. 95% ausgetauscht.

2.2.3 Durchführung der Messung

Zunächst wurden die Kammern mit 36°C warmer Ringerlösung (s. Kap. 2.2.6) vorgespült. Nach Fixierung der Gewebestreifen mit Gewebekleber auf den Nadeln wurden die Streifen durch höhenverstellbare Versuchstische in die Perfusionskammer eingetaucht und für ca. 60 min mit Ringerlösung umspült. Der Nadelabstand war mit einer Justierschraube so einstellbar, dass eine Vorspannung des Gewebes von ca. 100 µN vorlag. Für die weiteren Messungen wurden nur Streifen verwendet, die über die erste Kontrollzeit von 60 min in Ringerlösung einen stabilen Basistonus aufwiesen. Anschließend wurde über 20 min. das Parasympathomimetikum Carbachol (s. Kap. 2.2.7) in einer Konzentration von 10^{-6} mol/l zugesetzt, der resultierende Kontraktionseffekt wurde als 100 %, alle Kontraktionsänderungen durch nachfolgende Substanzen zu dieser Vorkontraktion ins Verhältnis gesetzt. Die Vorkontraktion belegte außerdem die Unversehrtheit und Kontraktionsfähigkeit der Gewebeproben und ergab wieder einen stabilen Tonus. War dieser erreicht, konnten verschiedene Antagonisten (s. Kap. 2.2.7) wiederum über ca. 20 min. bis zum Erreichen eines stabilen Tonus appliziert werden. Überdies war es möglich, Carbachol auszuwaschen und anschließend Kontraktionseffekte anderer Substanzen im Vergleich zu Carbachol an den selben Gewebeproben zu untersuchen.

2.2.4 Statistische Auswertung und Darstellung der Messdaten

Durch eine relativ hohe Anzahl im Schlachthof verarbeiteter Tiere war es unwahrscheinlich, zwei Augen vom gleichen Rind zu erhalten.

Um vergleichbare Messergebnisse zu erhalten, wurden, wie oben erwähnt, nach Vorkontraktion durch Carbachol alle Werte relativ zu dieser Referenzkontraktion ermittelt. Somit wirkten sich z.B. präparationstechnische Streuungen der Gewebsdurchmesser nicht verfälschend auf die Ergebnisse aus.

Die graphische Darstellung der Messdaten enthält Fehlerbalken (SEM = Standard Error of Mean) um die Mittelwerte, welche den Bereich anzeigen, in dem der tatsächliche Mittelwert mit einer Wahrscheinlichkeit von 68 % liegt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach dem gepaarten Student t-Test, da Daten derselben Versuchseinheit vergleichend in Beziehung gesetzt wurden. Es wurde eine zweiseitige Auswertung gewählt, da das Kontraktionsverhalten prinzipiell sowohl in Richtung Kontraktion als auch in Richtung Relaxation vom Bezugswert abweichen konnte. Alle Ergebnisse gelten als signifikant bei p-Werten $< 0,05$. P-Werte $< 0,01$ wurden mit (**), kleiner 0,001 mit (***) gekennzeichnet.

2.2.5 Auswertung

Alle Abbildungen zeigen die Ergebnisse repräsentativer Einzelversuche. In Balkendiagrammen ist die Summe der Daten aus einem Versuchsdurchlauf mit mehreren gleichartig und synchron behandelten Gewebstreifen zusammengefasst.

Alle Ergebnisse der Kontraktionsmessungen wurden der jeweils im Ergebnisteil angegebene n-Zahl entsprechend häufig bestätigt.

2.2.6 Verwendete Lösungen

HEPES-gepufferte Ringerlösung:

Ringerlösung (s. u.); mit 2-[4 (2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure gepuffert; bicarbonatfrei; unbegast; eingestellt auf einen pH-Wert von 7,4 .

Ringerlösung:

in mmol/l : 151 Na⁺; 5 K⁺; 1,7 Ca²⁺; 0,9 Mg²⁺; 131 Cl⁻; 0,9 SO₄²⁻; 1 H₂PO₄⁻; 28 HCO₃⁻;

zusätzlich: 5 mmol/l Glucose

Zur Gewährleistung eines konstanten pH-Wertes von 7,4 wurde die Lösung mit 5 % CO₂ und 95 % O₂ begast.

Alle Lösungen wurden von der Firma Sigma (Deutschland) bezogen.

2.2.7 Verwendete Pharmaka

Folgende Pharmaka wurden den obigen Lösungen in verschiedenen Versuchen zugesetzt:

Carbachol (Sigma, Deutschland).

ML-7 (Sigma, Deutschland).