

Aus der Universitäts-Augenklinik Tübingen
Abteilung Augenheilkunde I
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K. U. Bartz-Schmidt

Histologische und funktionelle Charakterisierung adrenerger
und muskarinerger Rezeptoren an bovinem, kornealem
Epithel und Endothel

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Jörg Mielke

aus
Freudenstadt

2006

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter: Professor Dr. J. M. Rohrbach
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. A. Fritsche

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1. Adrenerge Rezeptoren am Hornhautepithel	9
1.1.1. Alpha 1-Rezeptoren	9
1.1.2. Alpha 2-Rezeptoren	10
1.1.3. Beta –Rezeptoren	10
1.2. Adrenerge Rezeptoren am Hornhautendothel	11
1.2.1. Alpha-Rezeptoren	11
1.2.2. Beta-Rezeptoren	12
1.3. Muskarinerge Rezeptoren am Hornhautepithel	12
1.3.1. M1-M5	12
1.4. Muskarinerge Rezeptoren am Hornhautendothel	13
1.4.1. M1-M5	13
1.5. Proteinkinasen A und C	14
1.6. Fragestellung	15
2. Material und Methodik	16
2.1. Immunhistochemischer Nachweis der Rezeptoren	16
2.2. Immunhistochemischer Nachweis der Proteinkinase A	18
2.3. Funktioneller Nachweis der Aktivierung der Proteinkinase A nach Stimulation kornealer Adrenozeptoren	18
2.4. Funktioneller Nachweis der Aktivierung der Proteinkinase C nach Stimulation kornealer Adreno- und muskarinerger Cholinozeptoren	20
3. Ergebnisse	22
3.1. Alpha 1-Rezeptoren an bovinem Epithel und Endothel	22
3.2. Alpha 2A-Rezeptoren an bovinem Epithel und Endothel	22
3.3. Alpha 2C-Rezeptoren an bovinem Epithel und Endothel	23
3.4. Beta 1-Rezeptoren an bovinem Epithel und Endothel	23
3.5. Beta 2-Rezeptoren an bovinem Epithel und Endothel	24
3.6. M1-Rezeptoren an bovinem Epithel und Endothel	25
3.7. M2-Rezeptoren an bovinem Epithel und Endothel	25
3.8. M3-Rezeptoren an bovinem Epithel und Endothel	25

3.9.	M4-Rezeptoren an bovinem Epithel und Endothel	26
3.10.	M5-Rezeptoren an bovinem Epithel und Endothel	26
3.11.	PKA an bovinem Epithel und Endothel	26
3.12.	Zusammenfassung der immunhistochemischen Rezeptor- und PKA-Färbungen	27
3.13.	Selektive Stimulation der Alpha 2-Rezeptoren an Epithel und Endothel	28
3.14.	Nicht-selektive Stimulation der Beta Rezeptoren an Epithel und Endothel	29
3.15.	Selektive Stimulation der Beta 1-Rezeptoren an Epithel und Endothel	31
3.16.	Selektive Stimulation der Beta 2-Rezeptoren an Epithel und Endothel	32
3.17.	Selektive Stimulation von Alpha 1-Rezeptoren an Epithel und Endothel	32
3.18.	Nicht-selektive Stimulation von muskarinergen Cholinorezeptoren an Epithel und Endothel	33
4.	Diskussion	35
5.	Zusammenfassung	39
6.	Literaturverzeichnis	40
7.	Lebenslauf	45

1. Einleitung

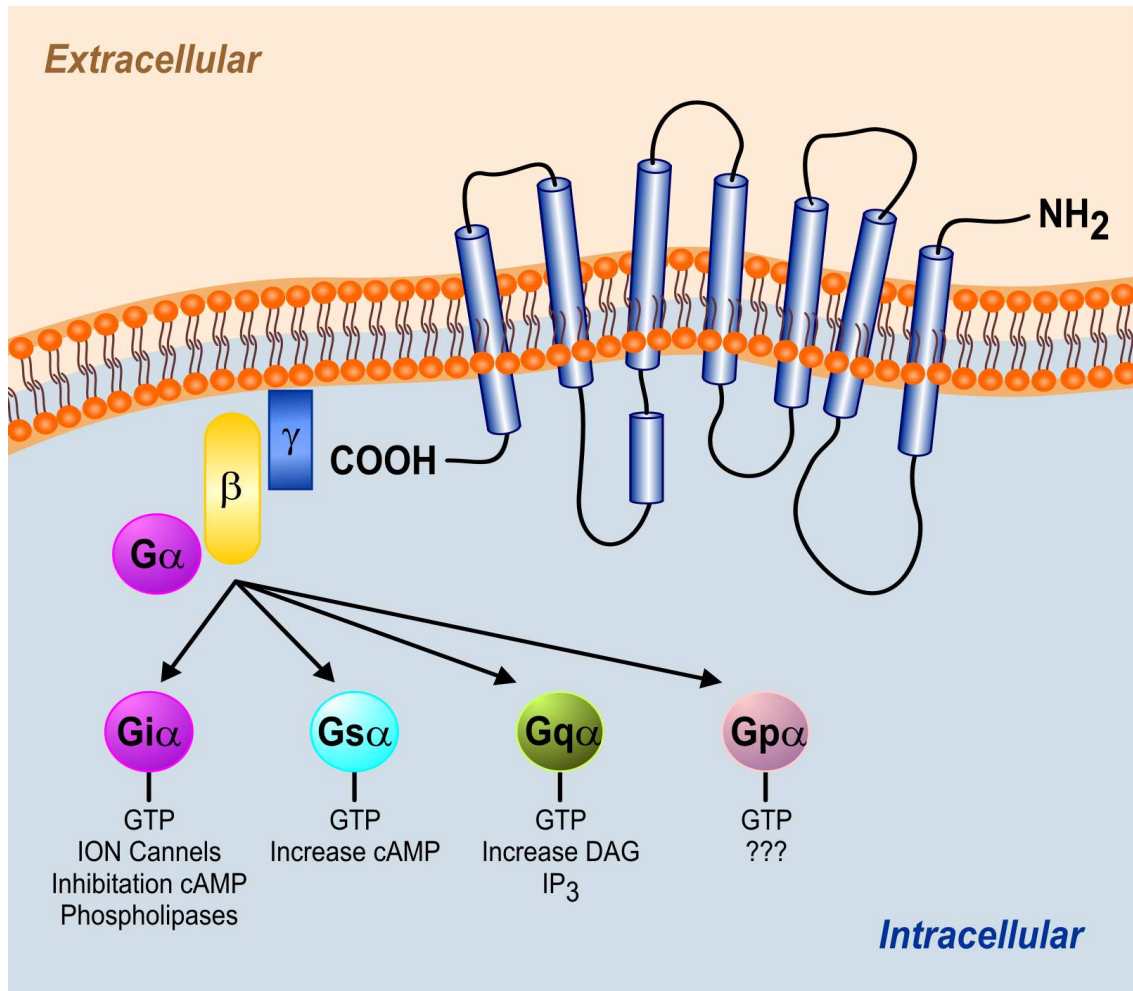
Das vegetative oder autonome Nervensystem besteht aus zwei Hauptteilen: dem parasympathischen Nervensystem und dem sympathischen Nervensystem. Diese beiden Anteile lassen sich anatomisch, physiologisch, pharmakologisch und molekularbiologisch unterscheiden. Das vegetative Nervensystem wird zudem in einen zentralen und einen peripheren Anteil unterteilt. Die zentralen Anteile liegen im Rückenmark und im Hirnstamm.

Sympathische präganglionäre Nervenfasern verlassen das Rückenmark in Höhe der Segmente Th1 bis L3. Fasern des parasympathischen Nervensystems folgen dem N. oculomotorius, dem N. facialis, dem N. glossopharyngeus und dem N. vagus. Die Organe des kleinen Beckens werden von den Nn. sacrales versorgt, die dem Sakralmark entspringen. Am Zielorgan entfaltet sich durch die sympathische bzw. parasympathische Innervation eine jeweils unterschiedliche Wirkung. Je nach dem funktionellen Bedürfnis kann durch die Steigerung oder Hemmung des einen oder des anderen Systems das Erfolgsorgan in der einen oder anderen Richtung beeinflusst werden. Die Überträgersubstanz des postganglionären Neurons des sympathischen Nervensystems ist Noradrenalin, beim parasympathischen Nervensystem handelt es sich um Acetylcholin (Kuschinsky et al., 1993). Die adrenergen und muskarinergen Rezeptoren der Plasmamembran werden von Adrenalin (Epinephrin) respektive Acetylcholin physiologischerweise stimuliert. Man unterscheidet aufgrund der relativen Wirksamkeit von Agonisten (Hormonen) und Antagonisten (Inhibitoren) verschiedene Typen von adrenergen oder muskarinergen Rezeptoren.

Bei den Rezeptoren handelt es sich um Transmembranproteine, die Signale von extrazellulär nach intrazellulär vermitteln. Beim Alpha 1-Rezeptor handelt es sich um einen Gq-Protein gekoppelten Rezeptor, der intrazellulär die Phospholipase C aktiviert und somit zu einem Anstieg von IP3 (Inositoltriphosphat) und DAG (Diacylglycerol) führt (Graham et al., 1996). Beim Alpha 2-Rezeptor handelt es sich um einen Gi-Protein gekoppelten Rezeptor,

der intrazellulär negativ mit der Adenylatzyklase gekoppelt ist. Dies führt zu einer Reduktion des intrazellulären cAMP. Der Beta 1- und der Beta 2-Rezeptor sind jeweils über das Gs-Protein gekoppelt. Dies führt zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP. Es wurden bislang fünf verschiedene muskarinerge Rezeptoren nachgewiesen. Sie gehören ebenfalls zu der großen Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Fredriksson et. al, 2003). Charakteristisch sind auch hier die sieben transmembranären Domänen mit jeweils drei intrazellulären und extrazellulären Schleifen sowie einem extrazellulären N-terminalen und einem intrazellulären C-terminalen Ende (Abbildung 1). In der Familie der muskarinergen Rezeptoren sind der M1-, M3- und der M5-Rezeptor mit dem Gq-Protein verknüpft. Intrazellulär wird die Phospholipase C aktiviert. Dies führt wiederum zur Aktivierung der Proteinkinase C und des Inositoltriphosphates mit einer konsekutiven Freisetzung des intrazellulären Kalziums. Der M2- und M4-Rezeptor sind an das Gi-Protein gekoppelt. Seine Stimulation führt daher zu einer Hemmung der Adenylatzyklase. Keiner der hier besprochenen Rezeptoren ist an das Gp-Protein gekoppelt (Abbildung 1).

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Membranrezeptors und die Aktivierung der verschiedenen intrazellulären Signalkaskaden in Abhängigkeit vom jeweiligen G-Protein.



Die Hornhaut des Säugetiers wird sympathisch vom Ganglion cervicale superior innerviert. Es handelt sich hierbei um efferente Nervenfasern. Die Signalkette umfasst drei Neurone: vom Hypothalamus verläuft der Signalweg zum Centrum ciliospinale des Rückenmarks auf Höhe C8 bis Th2. Von hier verlassen die Fasern des zweiten Neurons das Rückenmark nahe der Lungenspitze und steigen über den Grenzstrang zum Ganglion cervicale superius nahe der Bifurkation der Karotiden auf. Die Nervenfasern des dritten Neurons ziehen mit der A. carotis aufwärts und treten durch den Sinus cavernosus in die Orbita ein, wo sie entlang von Ästen des N. trigeminus und

des N. abducens weiterziehen (Collins und Augustin, 1991). Verglichen mit der Ratte und dem Affen, scheint die Anzahl der Nervenfasern beim Kaninchen und der Katze am höchsten zu sein (Marfurt et al., 1989). Die parasymphatische Innervation der Hornhaut ließ sich dagegen lange Zeit nicht eindeutig nachweisen und konnte nur indirekt am limbalen Gefäßnetz von Ratten gezeigt werden (Marfurt et al., 1998). Inwiefern eine zentrale sympathische oder parasymphatische Regulation der Kornea existiert ist unklar. Am Epithel und am Endothel der Hornhaut konnten jedoch Rezeptoren nachgewiesen werden, die entweder dem adrenergen oder dem muskarinergen System zuzuordnen sind. Die Rezeptoren der Hornhaut sind teilweise sequenziert und kloniert. Rezeptoren, Agonisten (first messenger), Antagonisten, intrazelluläre second und third messenger sind in Tabelle 1 abgebildet.

Tabelle 1: Übersicht der Rezeptoren, ihrer Agonisten, Antagonisten, second und third messenger (Proteinkinasen)

Rezeptor	Agonist	Antagonist	Wirkung auf den second messenger	Wirkung auf die jeweilige Proteinkinase
Alpha 1	Noradrenalin unspez. Phenylephrin spez.	Prazosin	DAG ↑, IP3 ↑	PKC ↑
Alpha 2	Noradrenalin unspez. Brimonidin spez.	Yohimbin	cAMP ↓	PKA =
Beta 1	Isoprenalin unspez.	Timolol unspez. Atenolol spez.	cAMP ↑	PKA ↑
Beta 2	Isoprenalin unspez. Salbutamol spez.	Timolol unspez. ICI 118.551 spez.	cAMP ↑	PKA ↑
M1	Acetylcholin unspez. Talsaclidine spez.	Atropin unspez. Pirenzepin spez.	DAG ↑, IP3 ↑	PKC ↑

M2	Acetylcholin unspez. Arecaidin spez.	Atropin unspez. Methoctramin spez.	cAMP ↓	PKA =
M3	Acetylcholin unspez. Cerimelin spez.	Atropin unspez. Dorifenacin spez.	DAG ↑, IP3 ↑	PKC ↑
M4	Acetylcholin unspez. Clozapin spez. (blockiert M1-3 und M5)	Atropin unspez. PD 102807 spez.	cAMP ↓	PKA =
M5	Acetylcholin unspez. McN-A-343 spez. (auch M1 und M4)	Atropin unspez.	DAG ↑, IP3 ↑	PKC ↑

1.1. Adrenerge Rezeptoren am Hornhautepithel

1.1.1. Alpha 1-Rezeptoren

Alle Alpha 1-Rezeptoren wirken intrazellulär über einen G-Protein gekoppelten Mechanismus auf die Phospholipase C. Ihre Aktivierung führt zu einem Anstieg der beiden second messenger Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG). Der Anstieg von DAG führt wiederum zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (Harrison et al., 1991, Berridge und Irvine, 1989). Durch pharmakologische und molekulare Untersuchungen konnten die drei Untertypen (Alpha 1A, Alpha 1B und Alpha 1D) nachgewiesen werden (Minneman und Esbenshade, 1994, Hieble et al., 1995). Alpha 1-Adrenorezeptoren wurden erstmals auf humanen Epithelzellen durch den radioaktiv markierten Alpha 1-Antagonisten Prazosin nachgewiesen. Gleichzeitig konnte die Verbindung zum intrazellulären Inositoltriphosphat (IP3) aufgezeigt werden (Walkenbach et al., 1991). Am kornealen Epithel der Ratte konnte histologisch der Alpha 1B-Rezeptor nachgewiesen werden (Grayson et al., 1998). Der histologische Nachweis an humanem kornealem Epithel durch polyklonale Antikörper erfolgte

durch Grüb et al. (Grüb et al., 2005). Die physiologische Rolle der Alpha 1-Rezeptoren für die Hornhaut ist unklar. Angenommen werden Funktionen im Bereich der Hornhauttransparenz und Zellteilung (Walkenbach et al., 1991).

1.1.2. Alpha 2-Rezeptoren

Alle Alpha 2-Rezeptoren wirken intrazellulär über einen G-Protein gekoppelten Mechanismus negativ auf das Adenylat-Zyklase System. Die Stimulation des Rezeptors führt zur einer Verminderung der cAMP Konzentration. Daher wird keine Stimulation der Proteinkinase A-Aktivität vermutet (Abbildung 1 und Tabelle 1). Durch funktionelle Untersuchungen in der Ussing-Kammer an der Hornhaut des Frosches konnte eine Reduktion des Kurzschlussstromes und eine Minderung des Chloridionenfluxes vom Stroma zum Tränenfilm gezeigt werden. Dies deutet darauf hin, dass der Alpha 2-Rezeptor negativ mit dem Adenylat-Zyklase-System gekoppelt ist (Chu und Candia, 1988). Pharmakologische Untersuchungen ergaben, dass auch bei den Alpha 2-Rezeptoren verschiedenen Subtypen existieren. Auf der Grundlage des Bindungsverhaltens radioaktiv markierter Substanzen, der Analyse der Aminosäuresequenz und chromosomale Untersuchungen konnten drei Subtypen unterschieden werden: Alpha 2A, Alpha 2B und Alpha 2C (MacKinnon et al., 1994). Die histologische Untersuchung an humanem kornealem Epithel durch polyklonale Antikörper erfolgte durch Grüb et al. Dabei konnte keine Akkumulation von Alpha 2-Rezeptoren am Epithel nachgewiesen werden, am Endothel dagegen zeigte sich eine Akkumulation (Grüb et al., 2005).

1.1.3. Beta-Rezeptoren

Alle Beta-Rezeptoren sind intrazellulär über das Gs-Protein mit der Adenylatzyklase gekoppelt (Brodde und Michel, 1999). Die Adenylat-Zyklase kann durch Stimulation der Beta-Rezeptoren mit Isoproterenol aktiviert werden. Dies führt zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP, dem second messenger (Reinach et al., 1992). Die Aktivierung der Beta-Rezeptoren führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase A. Von den Beta-Rezeptoren existieren 4

Untergruppen, die pharmakologisch unterscheidbar sind (Lands et al., 1967, Arch et al., 1995, Bond und Clarke, 1988). Beta 3-Rezeptoren finden sich nur in Fettzellen. Beim Beta 4-Rezeptor handelt es sich um eine kardiale Variante des Beta 1-Rezeptors. An kornealen Epithelien sind die Beta-Rezeptoren mehrfach untersucht worden, jedoch nicht hinsichtlich aller bekannten Untergruppen. Ein funktioneller Hinweis von Beta-Rezeptoren ergab die Blockade der Bindungsaktivität von radioaktiv markiertem Dihydroalprenolol durch Propranolol an intakten, kultivierten kornealen Epithelzellen von Kaninchen (Colley und Cavanagh, 1982). Die Applikation von Adrenalin auf die Kaninchenhornhaut führt zur Reduzierung der Beta-Rezeptoren (Neufeld et al., 1978). An kultivierten und frischen Zellen der bovinen Kornea wurde durch Bindungsstudien überwiegend der Beta 2-Rezeptor nachgewiesen (Walkenbach et al., 1984). Histologisch konnten Beta 1- und Beta 2-Rezeptoren an humanem Epithel angefärbt werden (Grüb et al., 2005). Funktionelle Studien mit der Ussing-Kammer zeigten ebenfalls eine Regulation des Natriumstromes vom Kammerwasser zur Tränenflüssigkeit, die an humanem kornealem Gewebe überwiegend durch den Beta 2-Rezeptor gesteuert wird (Wiederholt et al., 1983).

1.2. Adrenerge Rezeptoren am Hornhautendothel

1.2.1. Alpha-Rezeptoren

Durch Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem Prazosin konnten an kultivierten Endothelzelllinien des Kaninchens, der Kuh und des Menschen Alpha 1–Adrenozeptoren nachgewiesen werden (Walkenbach et al., 1992). Die intrazelluläre Chloridkonzentration scheint dagegen über den Alpha 2–Rezeptor und den Cl/HCO₃-Austauscher geregelt zu werden (Yasukura et al., 1995). Histologisch konnte an humanem kornealem Endothel eine Akkumulation des Alpha 1- und Alpha 2A-Antikörpers nachgewiesen werden, nicht dagegen des Alpha 2C-Antikörpers (Grüb et al., 2005)

1.2.2. Beta-Rezeptoren

An homogenisierten Präparaten des bovinen kornealen Endothels konnte die spezifische Bindung von radioaktiven Substanzen an Beta-Rezeptoren nachgewiesen werden (Walkenbach et al., 1985). Ebenso erfolgte der Nachweis, dass diese Rezeptoren funktionell mit dem Adenylat-Zyklase-System verbunden sind (Walkenbach und LeGrand, 1982). Es wurde überwiegend der Beta 2-Rezeptor vermutet. Histologisch konnte an humanem kornealem Endothel Beta 1- und Beta 2-Rezeptoren nachgewiesen werden (Grüb et al., 2005).

1.3. Muskarinerge Rezeptoren am Hornhautepithel

1.3.1. M1-M5

Am kornealen Epithel des Kaninchens wurden muskarinerge Rezeptoren und deren Verbindung mit cGMP nachgewiesen (Colley und Cavanagh 1982a, 1982b). Dieser Nachweis gelang auch an intaktem humanem kornealem Epithel (Walkenbach und Ye, 1991). Nur die mRNA des M2-Rezeptor und die cDNA des M4-Rezeptors konnte beim Kaninchen nachgewiesen werden (Sheperd und Rae, 1998). Die mRNA des M3-Rezeptors konnte in humanen Epithelzellen nachgewiesen werden (Gupta et al., 1994). Transformierte Zellkulturen des kornealen Epithels des Kaninchens zeigten eine Beeinflussung der Inositoltriphosphatkonzentration über den M3-Rezeptor (Zhang et al., 1995). Hinsichtlich der Untergruppen konnten am bovinen kornealen Epithel pharmakologisch und funktionell der M1- und der M2-Rezeptor nachgewiesen werden (Socci et al., 1996). Histologisch gelang an humanem Epithel der Nachweis der Rezeptoren M2, M4 und M5 (Grüb et al., 2005).

1.4. Muskarinerge Rezeptoren am Hornhautendothel

1.4.1. M1-M5

Muskarinerge Rezeptoren konnten an Kaninchenendothelien histologisch nachgewiesen werden (Lind und Cavanagh, 1993). Auch der Nachweis ihrer Expression an humanen endothelialen Zellkulturen war möglich (Walkenbach et al., 1993). Funktionell wurde an bovinen kornealen Endothelzellen die Verbindung der muskarinergen Acetylcholinrezeptoren mit cGMP aufgezeigt (Walkenbach und Ye, 1990). Hinsichtlich der Untergruppen konnte mRNA des M3-Rezeptors intrazellulär dargestellt werden (Gupta et al., 1994). Histologische Untersuchungen hinsichtlich der Untergruppen zeigten an humanen kornealen Endothelzellen das Vorhandensein der Rezeptoren M2, M4 und M5 (Grüb et al., 2005).

Für den Nachweis der adrenergen und muskarinergen Rezeptoren an kornealem Epithel und Endothel ergeben sich daher nachfolgende Tabellen (Tabelle 2 und 3).

Tabelle 2: Nachweis adrenerger und muskarinergere Rezeptoren an kornealen Epithelzellen

	Ratte	Kaninchen	Kuh	Mensch
Alpha 1				+
Alpha 1B	+			
Alpha 2A				
Alpha 2C				
Beta 1				+
Beta 2			+	+
M1			+	
M2			+	+
M3		+		+
M4				+
M5				+

Tabelle 3: Nachweis adrenerger und muskarinergere Rezeptoren an kornealen Endothelzellen

	Ratte	Kaninchen	Kuh	Mensch
Alpha 1		+	+	+
Alpha 1B				
Alpha 2A				+
Alpha 2C				
Beta 1				+
Beta 2			+	+
M1				
M2				+
M3				+
M4				+
M5				+

1.5. Proteinkinase A und C

Bei der Proteinkinase A (PKA) handelt es sich um ein intrazelluläres Enzym, eine Serin-Threonin Kinase. Die Proteinkinase wird durch cAMP aktiviert, wodurch intrazelluläre Proteine phosphoryliert werden. Im Verlauf der Informationsübertragung von extrazellulär nach intrazellulär handelt es sich bei der Proteinkinase A um den third messenger.

Die Proteinkinase C (PKC) übt die gleiche Funktion wie die Proteinkinase A aus, sie phosphoryliert Serin und Threoninreste. Im Vergleich zur Proteinkinase A wird sie jedoch nicht durch cAMP sondern durch Diacylglycerin aktiviert. Über beide Wege werden viele intrazelluläre Mechanismen gesteuert (Stryer, 1988). Die Untereinheiten der Proteinkinase C an der Kornea wurden ausführlich histologisch untersucht (El-Wardani et al., 2005)

Die Funktion der Proteinkinase A und C wurde an der Hornhaut im Zusammenhang mit der Kollagensynthese und der Kollagendegradation untersucht, besonders im Zusammenhang mit Wundheilungsprozessen. Hierbei scheint vor allen Dingen die PKC eine wichtige Rolle zu spielen. Immunhistochemisch wurden an kornealen Endothelien der Ratte auch die PKC-Untereinheiten untersucht (Nagano et al., 2002, Graham et al., 2000).

Untersuchungen über die Regulation der Proteinkinasen durch adrenerge oder muskarinerge Rezeptorstimulation liegen nicht vor.

1.6. Fragestellung

Vor dem Hintergrund des bislang nur partiell erfolgten Nachweises adrenerger und muskarinerger Rezeptoren am Hornhautepithel und –endothel verschiedener Spezies sollte eine differenzierte Untersuchung des bovinen, kornealen Epithels und Endothels erfolgen, um folgende Fragen zu beantworten: Welche Untergruppen der adrenergen und muskarinerger Rezeptoren lassen sich an den beiden Gewebsschichten nachweisen und zeigt ihre Stimulation oder Blockade eine funktionelle Auswirkung auf die intrazelluläre Signalkaskade, speziell auf die Proteinkinasen A und C. Zur Beantwortung dieser Fragen erfolgten zunächst immunhistochemische Untersuchungen der fraglichen Rezeptoren an bovinen kornealen Epithelien und Endothelien. Das Vorhandensein der PKA sollte ebenfalls über immunhistochemische Färbungen erfolgen. Zum Nachweis einer funktionellen Verbindung zwischen den Rezeptoren und den beiden Proteinkinasen wurden Zellhomogenisate des kornealen Epithels oder Endothels spezifisch durch Agonisten oder Antagonisten oder eine Kombination stimuliert. Anschließend wurde die PK-Aktivität über die Lichtemission einer Luciferasereaktion bestimmt.

2. Material und Methodik

2.1. Immunhistochemischer Nachweis der Rezeptoren

Da für die morphologischen und weiteren funktionellen Untersuchungen große Mengen an Material notwendig sind, die mit humanem Spendergewebe nicht zu erbringen gewesen wären, wurden diese Untersuchungen mit bovinem Gewebe durchgeführt. Alle verwendeten Gewebe wurden vom Schlachthof Rottenburg (Rottenburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Es erfolgte zunächst der immunhistochemische Nachweis mittels polyklonaler Antikörper gegen Alpha 1, Alpha 2A, Alpha 2C, Beta 1 und Beta 2- Adrenozeptoren sowie gegen die bekannten muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren (M1-M5) (Tabelle 4). Hierfür wurde innerhalb einer Stunde post-mortem die Hornhaut eines Auges als Ganzes trepaniert und in 4,5%iges Formalin überführt. Am Folgetag erfolgte die Paraffinisierung und Anfertigung histologischer Schnitte im Ophthalmopathologischen Labor der Universitätsaugenklinik Tübingen. Die Schnitte wurden daraufhin für 24 Stunden bei 4°C mit den in ChemMate-Antibody-Diluent (Dako, Glostrup, Dänemark) verdünnten primären Antikörpern inkubiert (Tabelle 4). Nach Spülung mit PBS (phosphate-buffered saline) erfolgte die Darstellung der Rezeptorbindung mittels alkalischer Phosphatase (ChemMate-Detection-Kit, Dako, Glostrup, Denmark).

Tabelle 4: Polyklonale Antikörper gegen Adreno- und muskarinerge Cholinozeptoren

Rezeptor	Immunogenität	Verdünnung	Reaktivität	Kreuz-Reaktivität	Hersteller
Alpha 1-Adrenozeptor (339-349)	Synthetisches Peptid	1:1000	Spezifisch für die 3. intrazelluläre Schleife des α_1 -Rezeptors	<0,01%	Acris, Hiddenhausen, Deutschland
Alpha 2A-Adrenozeptor (218-235)	Synthetisches Peptid	1:1000	Spezifisch für die 3. intrazelluläre Schleife des α_{2A} -Rezeptors	<0,01%	Acris, Hiddenhausen, Deutschland
Alpha 2C-Adrenozeptor	Synthetisches Peptid	1:1000	Spezifisch für das N terminale Ende des α_{2C} -Rezeptors	<0,01%	Acris, Hiddenhausen, Deutschland
Beta 1-Adrenozeptor (394-408)	Synthetisches Peptid	1:500	Spezifisch für die 3. intrazelluläre Schleife des β_1 -Rezeptors	<0,01%	Acris, Hiddenhausen, Deutschland
Beta 2-Adrenozeptor	Synthetisches Peptid	1:500	Spezifisch für das C terminale Ende des β_2 -Rezeptors	<0,01%	Biotrend, Köln, Deutschland
M ₁ Acetylcholin-Rezeptor (451-460)	Synthetisches Peptid	1:100	Spezifisch für das C terminale Ende des M ₁ -Rezeptors	<0,01%	Biotrend, Köln, Deutschland
M ₂ Acetylcholin-Rezeptor (457-466)	Synthetisches Peptid	1:100	Spezifisch für das C terminale Ende des M ₂ -Rezeptors	<0,01%	Biotrend, Köln, Deutschland
M ₃ Acetylcholin-Rezeptor (580-589)	Synthetisches Peptid	1:100	Spezifisch für das C terminale Ende des M ₃ -Rezeptors	<0,01%	Biotrend, Köln, Deutschland
M ₄ Acetylcholin-Rezeptor (469-487)	Synthetisches Peptid	1:100	Spezifisch für das C terminale Ende des M ₄ -Rezeptors	<0,01%	Biotrend, Köln, Deutschland
M ₅ Acetylcholin-Rezeptor (519-531)	Synthetisches Peptid	1:100	Spezifisch für das C terminale Ende des M ₅ -Rezeptors	<0,01%	Biotrend, Köln, Deutschland

2.2. Immunhistochemischer Nachweis der Proteinkinase A

Darüberhinaus erfolgte der immunhistochemische Nachweis der Proteinkinase A in kornealen Epithel- und Endothelzellen mittels polyklonaler Antikörper (Anti-PKA catalytic subunit alpha beta pThr197, Acris, Hiddenhausen, Deutschland). Hierfür wurde innerhalb einer Stunde post-mortem die Hornhaut eines Auges als Ganzes trepaniert und in 4,5%igem Formalin fixiert. Die Herstellung der immunhistochemischen Präparate erfolgte wie oben geschildert. Für jede Serie wurden Negativkontrollen erstellt, bei welchen auf die abschließende Zugabe des Antikörpers verzichtet wurde.

2.3. Funktioneller Nachweis der Aktivierung der Proteinkinase A nach Stimulation kornealer Adrenozeptoren

Für den funktionellen Nachweis der Aktivierung der Proteinkinase A durch Stimulation kornealer Adreno- und muskarinerges Cholinozeptoren wurden insgesamt 10 bovine Hornhäute trepaniert und bei Raumtemperatur fünfzehn Minuten in vorbereiteten Lösungen adrenerger und muskarinerges Agonisten und Antagonisten inkubiert (Tabelle 5). Wurden Antagonisten verwendet, so erfolgte zunächst die Inkubation mit dem Antagonisten und nach fünfzehn Minuten mit dem jeweiligen Agonisten. Aufgrund der höheren Spezifität beta-adrenerger Antagonisten wurden diesen der Vorzug gegenüber spezifischen beta-adrenergen Agonisten gegeben.

Tabelle 5: Lösungen adrenerger und muskarinerges Agonisten und Antagonisten zum Nachweis der Aktivierung der Proteinkinase A

Rezeptor-nachweis	Agonist [Konzentration]	Spezifität	Hersteller	Antagonist [Konzentration]	Spezifität	Hersteller
Alpha 2-Adrenozeptor	Brimonidine [10 ⁻⁴ mg/ml]	Alpha 2-spezifisch	Pharm-Allergan, Ettlingen	-	-	-
Alpha 2-Adrenozeptor	Brimonidine [10 ⁻⁶ mg/ml]	Alpha 2-spezifisch	Pharm-Allergan, Ettlingen	-	-	-
Alpha 2-Adrenozeptor	Brimonidine [10 ⁻⁸ mg/ml]	Alpha 2-spezifisch	Pharm-Allergan, Ettlingen	-	-	-
Beta 1/2-Adrenozeptor	Isoprenalin [10 ⁻⁴ mg/ml]	Beta-unspezifisch	Biotrend, Köln	-	-	-

Beta 1/2-Adrenozeptor	Isoprenalin [10 ⁻⁵ mg/ml]	Beta-unspezifisch	Biotrend, Köln	-	-	-
Beta 1/2-Adrenozeptor	Isoprenalin [10 ⁻⁶ mg/ml]	Beta-unspezifisch	Biotrend, Köln	-	-	-
Beta 1/2-Adrenozeptor	Isoprenalin [10 ⁻⁷ mg/ml]	Beta-unspezifisch	Biotrend, Köln	-	-	-
Beta 1/2-Adrenozeptor	Isoprenalin [10 ⁻⁸ mg/ml]	Beta-unspezifisch	Biotrend, Köln	-	-	-
Beta 1-Adrenozeptor	Isoprenalin [10 ⁻⁶ mg/ml]	Beta-unspezifisch	Biotrend, Köln	ICI-118,551 [10 ⁻⁴ mg/ml]	Beta 2-spezifisch	Biotrend, Köln
Beta 2-Adrenozeptor	Isoprenalin [10 ⁻⁶ mg/ml]	Beta-unspezifisch	Biotrend, Köln	Atenolol [10 ⁻⁴ mg/ml]	Beta 1-spezifisch	Biotrend, Köln

Nach fünfzehn Minuten wurde die Inkubation durch Frieren mit Flüssigstickstoff abgebrochen. Es folgte die Präparation von Epithel und Endothel, stromales Gewebe wurde verworfen. Die erhaltenen Epithel- und Endothelproben wurden gewogen, gewichtsäquivalent mit 5%iger TCA (Trichloressigsäure) verdünnt und bei 4°C homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 1500 g für zehn Minuten wurde der Überstand abpipettiert, die verbliebene TCA mit Äther gebunden und dieser bei 70°C über fünf Minuten verdampft. Bis zur Bestimmung wurden die Proben mit 0,5 ml Phosphatpuffer bei -80°C eingefroren.

Zur quantitativen Bestimmung der Aktivität der Proteinkinase A diente ein kommerziell erhältlicher HTS Proteinkinase Assay (PKlight, Cambrex, Rockwell, USA), der den kinaseabhängigen Umsatz von ATP in einem Bereich von 0 bis 20 µM ATP mit einer Genauigkeit von 0,0001 µM misst. Der Test nutzt die ATPase-Aktivität der Proteinkinase, durch die ein Substrat phosphoryliert und ATP in ADP umgewandelt wird und bestimmt den Verbrauch von ATP durch Messung der Biolumineszenz des verbliebenen ATP. Hierzu wird nach Beendigung der intrinsischen Kinaseaktivität Luziferin, Sauerstoff sowie das Enzym Luziferase zugegeben, wodurch neben Oxyluziferin, AMP, PP₁ und CO₂ auch Licht mit einer Wellenlänge von 565 nm entsteht, das mittels eines Luminometers gemessen werden kann. Aus der Biolumineszenz lässt sich auf den Verbrauch von ATP durch die Proteinkinase zurückschließen. Dieser Zusammenhang ist für den Bereich von 0 bis 20 µM ATP linear. Die gemessene Biolumineszenz, und damit die Konzentration des verbliebenen ATP, sind umgekehrt proportional zur Aktivität der Proteinkinase.

Nach Vorbereitung der testspezifischen Reagenzien wurde eine 96-Lochplatte mit jeweils 30 μl der Proben bestückt. Um die ATPase-Reaktion zu starten, wurden im Anschluss 10 μM (16,5235 ng/ml) ATP zugegeben und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 μl der testspezifischen Kinase-Stop-Solution beendet. Die Proben wurden mit 20 μl der testeigenen Lösung an Luziferin/Luziferase erneut für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss die Biolumineszenz bei 565 nm in einem Luminometer bestimmt. Die Auswertung und Darstellung der Daten erfolgte ausgehend von den ermittelten Standardkurven mit Excel (Microsoft, USA).

2.4. Funktioneller Nachweis der Aktivierung der Proteinkinase C nach Stimulation kornealer Adreno- und muskarinerges Cholinozeptoren

Der funktionelle Nachweis der Aktivierung der Proteinkinase C nach Stimulation kornealer Adreno- und muskarinerges Cholinozeptoren erfolgte analog dem Nachweis der Aktivierung der Proteinkinase A mittels des HTS Proteinkinase Assay (PKlight, Cambrex, Rockwell, USA), der in einem Bereich von 0 bis 20 μM ATP mit einer Genauigkeit von 0,0001 μM misst. Hierfür wurden abermals 8 bovine Hornhäute innerhalb einer Stunde post-mortem als Ganzes trepaniert und für fünfzehn Minuten bei Raumtemperatur in vorbereiteten Lösungen adrenerger und muskarinerges Agonisten inkubiert (Tabelle 6). Die Durchführung des Tests erfolgte wie oben beschrieben.

Tabelle 6: Lösungen adrenerger und muskarinerges Agonisten und Antagonisten zum Nachweis der Aktivierung der Proteinkinase C

Rezeptor-nachweis	Agonist [Konzentration]	Spezifität	Hersteller
Alpha 1-Adrenozeptor	Cirazolin [10 ⁻⁴ mg/ml]	Alpha 1-spezifisch	Biotrend, Köln
Alpha 1-Adrenozeptor	Cirazolin [10 ⁻⁸ mg/ml]	Alpha 1-spezifisch	Biotrend, Köln
M ₁ -M ₅ Acetylcholin-Rezeptor	Acetylcholin [10 ⁻⁵ mg/ml]	M-unspezifisch	Novartis Pharma, Nürnberg
M ₁ -M ₅ Acetylcholin-Rezeptor	Acetylcholin [10 ⁻⁴ mg/ml]	M-unspezifisch	Novartis Pharma, Nürnberg
M ₁ -M ₅ Acetylcholin-Rezeptor	Acetylcholin [10 ⁻⁵ mg/ml]	M-unspezifisch	Novartis Pharma, Nürnberg
M ₁ -M ₅ Acetylcholin-Rezeptor	Acetylcholin [10 ⁻⁶ mg/ml]	M-unspezifisch	Novartis Pharma, Nürnberg
M ₁ -M ₅ Acetylcholin-Rezeptor	Acetylcholin [10 ⁻⁷ mg/ml]	M-unspezifisch	Novartis Pharma, Nürnberg
M ₁ -M ₅ Acetylcholin-Rezeptor	Acetylcholin [10 ⁻⁸ mg/ml]	M-unspezifisch	Novartis Pharma, Nürnberg

3. Ergebnisse

3.1. Alpha 1-Rezeptoren an bovinem Epithel und Endothel

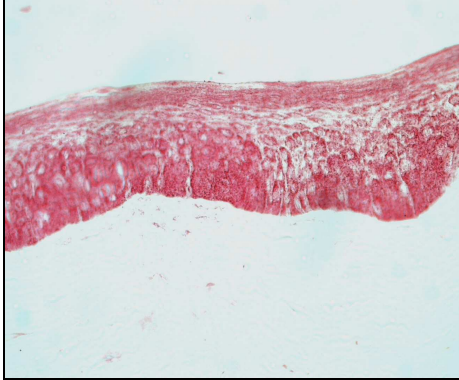


Abbildung 2: positiver Rezeptornachweis am Epithel



Abbildung 3: positiver Rezeptornachweis am Endothel

3.2. Alpha 2A-Rezeptoren an bovinem Epithel und Endothel

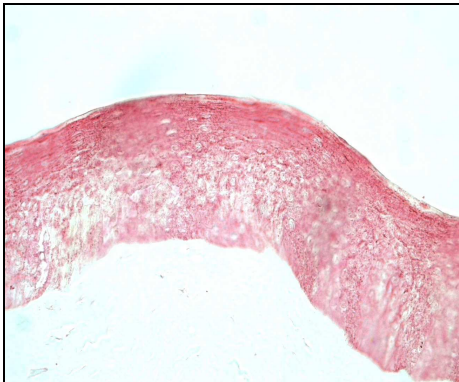


Abbildung 4: positiver Rezeptornachweis am Epithel

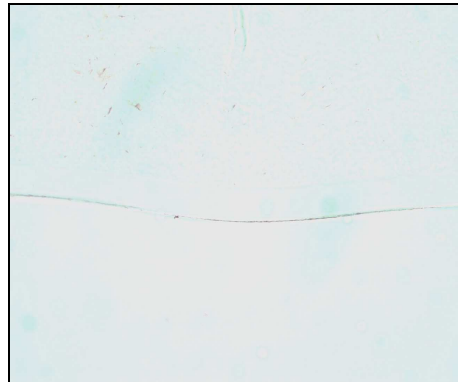


Abbildung 5: positiver Rezeptornachweis am Endothel

3.3. Alpha 2C-Rezeptoren an bovinem Epithel und Endothel

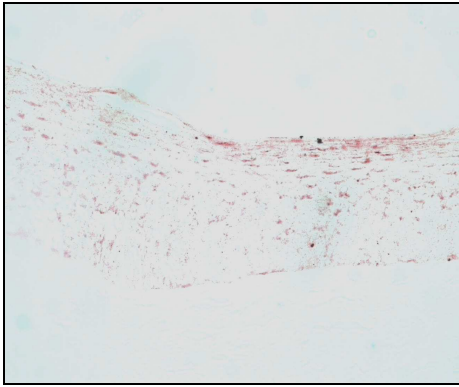


Abbildung 6: negativer Rezeptornachweis am Epithel

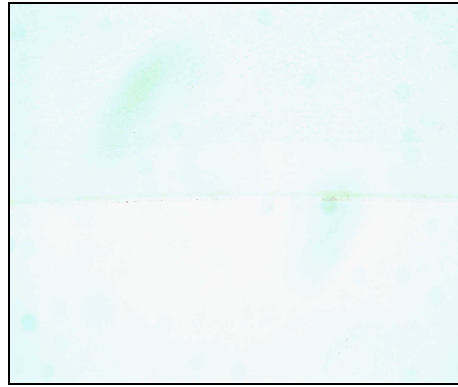


Abbildung 7: negativer Rezeptornachweis am Endothel

3.4. Beta 1-Rezeptoren an bovinem Epithel und Endothel

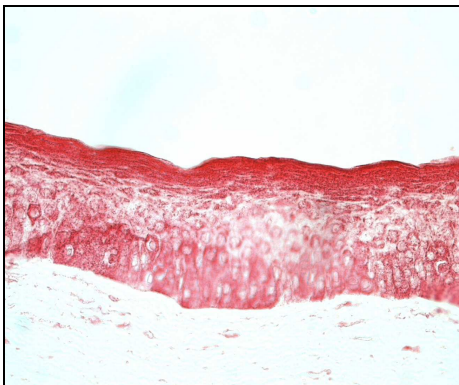


Abbildung 8: positiver Rezeptornachweis am Epithel

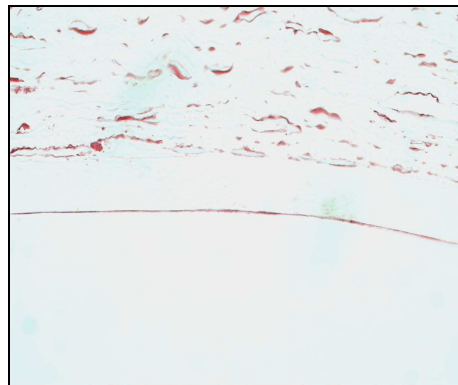


Abbildung 9: positiver Rezeptornachweis am Endothel

3.5. Beta 2-Rezeptoren an bovinem Epithel und Endothel

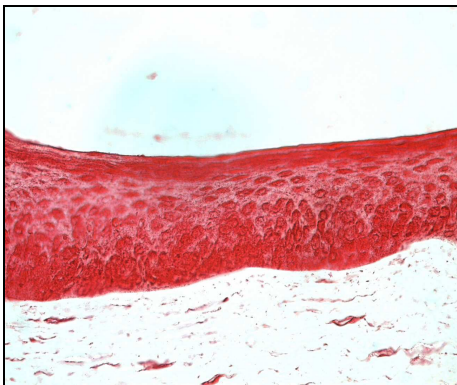


Abbildung 10: positiver Rezeptornachweis am Epithel

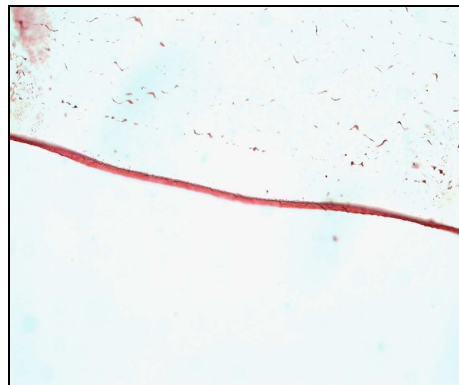


Abbildung 11: positiver Rezeptornachweis am Endothel

3.6. M1-Rezeptoren an bovinem Epithel und Endothel

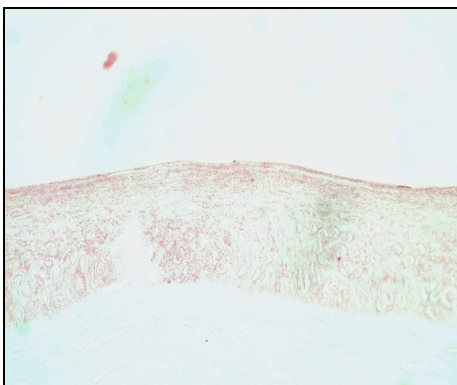


Abbildung 12: negativer Rezeptornachweis am Epithel

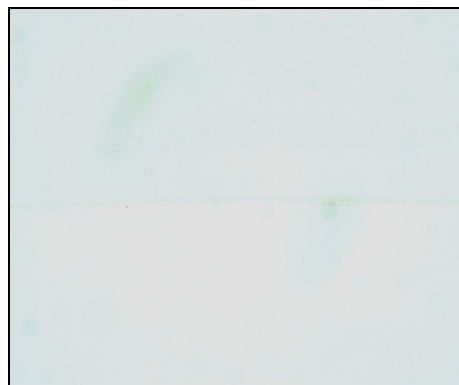


Abbildung 13: negativer Rezeptornachweis am Endothel

3.7. M2-Rezeptoren an bovinem Epithel und Endothel

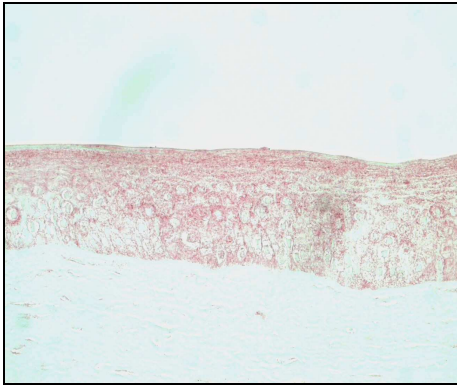


Abbildung 14: negativer Rezeptornachweis am Epithel

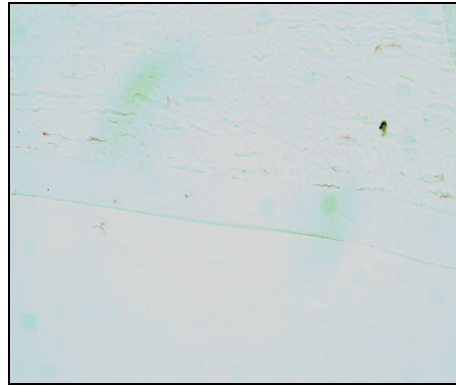


Abbildung 15: negativer Rezeptornachweis am Endothel

3.8. M3-Rezeptoren an bovinem Epithel und Endothel

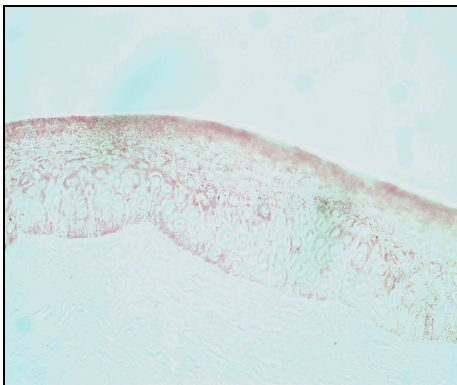


Abbildung 16: negativer Rezeptornachweis am Epithel



Abbildung 17: negativer Rezeptornachweis am Endothel

3.9. M4-Rezeptoren an bovinem Epithel und Endothel

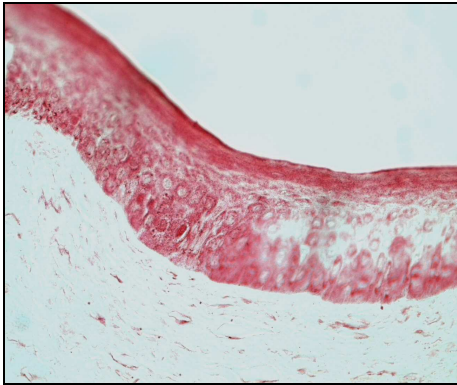


Abbildung 18: positiver Rezeptornachweis am Epithel

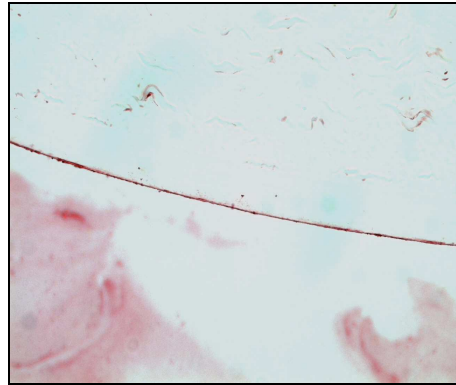


Abbildung 19: positiver Rezeptornachweis am Endothel

3.10. M5-Rezeptoren an bovinem Epithel und Endothel

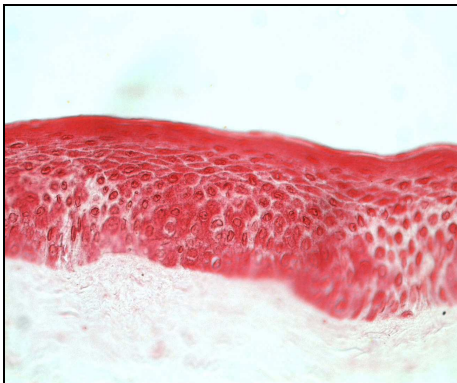


Abbildung 20: positiver Rezeptornachweis am Epithel

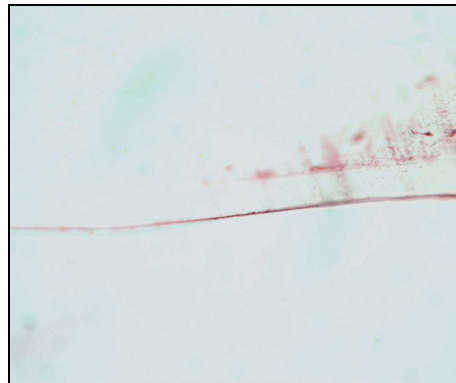


Abbildung 21: positiver Rezeptornachweis am Endothel

3.11. PKA an bovinem Epithel und Endothel

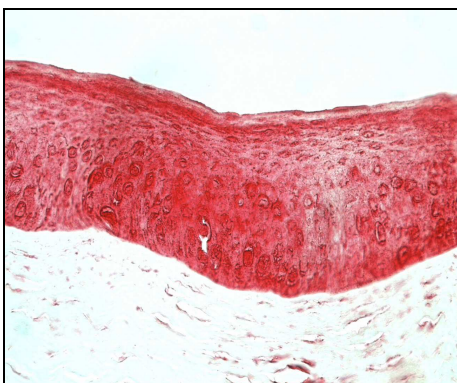


Abbildung 22: positiver PKA-Nachweis am Epithel

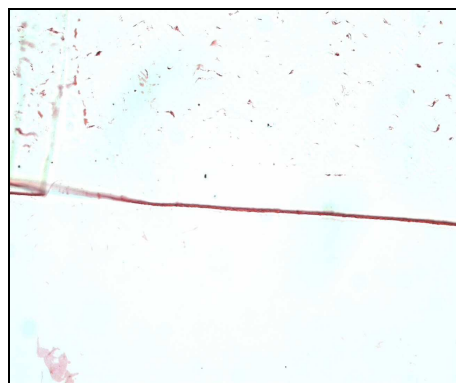


Abbildung 23: positiver PKA-Nachweis am Endothel

3.12. Zusammenfassung der immunhistochemischen Rezeptor- und PKA-Färbungen

In Ergänzung zu den aus der Literatur bekannten, oben aufgelisteten, Rezeptornachweisen, können folgende Tabellen aufgestellt werden (Tabelle 7 und 8)

Tabelle 7: Nachweis adrenerger und muskarinergere Rezeptoren an bovinem kornealen Epithel

	Ratte	Kaninchen	Kuh	Mensch
Alpha 1			•	+
Alpha 1B	+			
Alpha 2A			•	
Alpha 2C				
Beta 1			•	+
Beta 2			•+	+
M1			+	
M2			+	+
M3		+		+
M4			•	+
M5			•	+
PKA			•	

Mit „•“ gekennzeichneten Felder bezeichnen die vorliegenden Ergebnisse

Tabelle 8: Nachweis adrenerger und muskarinerger Rezeptoren am bovinen kornealen Endothel

	Ratte	Kaninchen	Kuh	Mensch
Alpha 1		+	•+	+
Alpha 1B				
Alpha 2A			•	+
Alpha 2C				
Beta 1			•	+
Beta 2			•+	+
M1				
M2				+
M3				+
M4			•	+
M5			•	+
PKA			•	

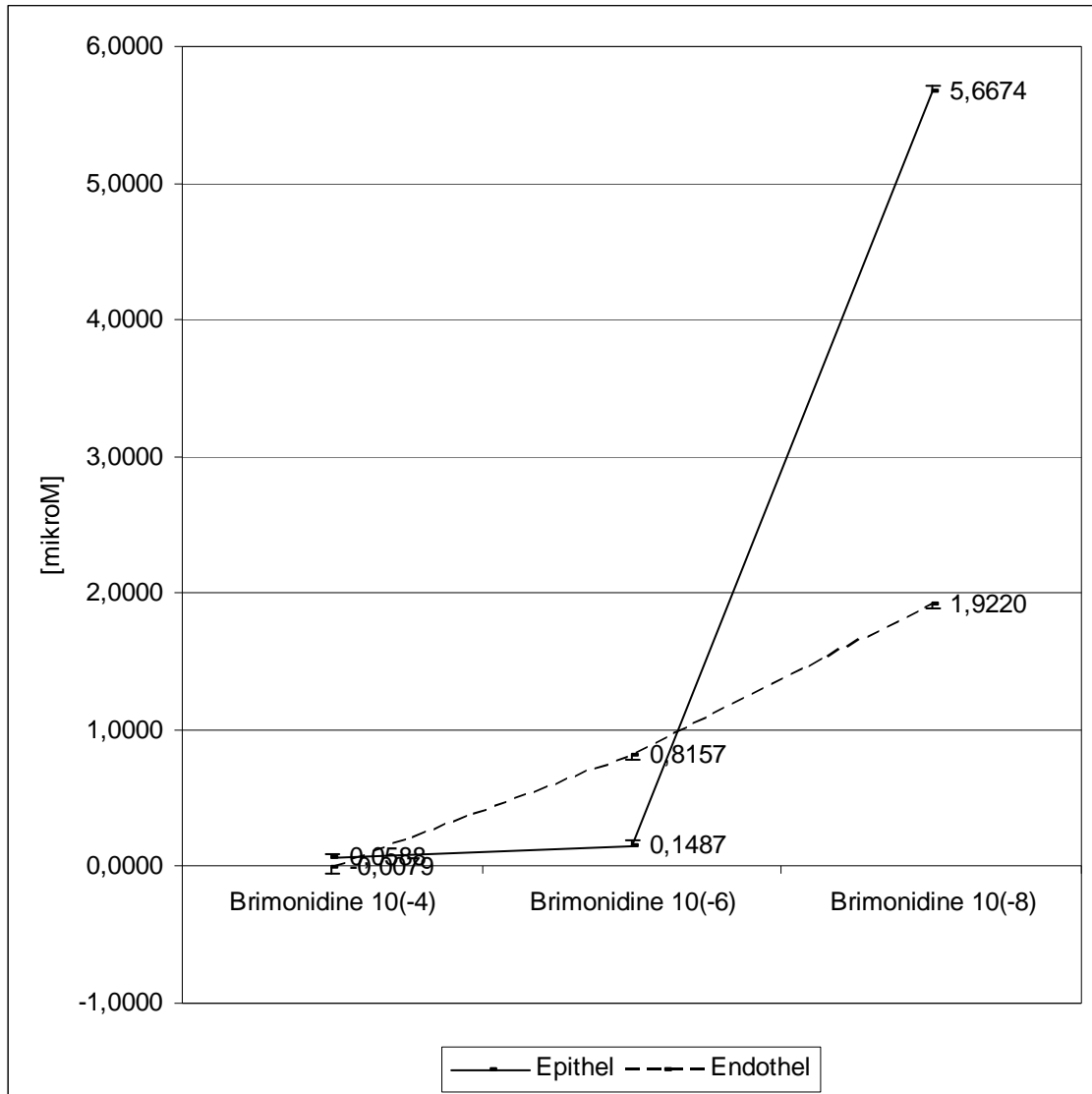
Mit „•“ gekennzeichneten Felder bezeichnen die vorliegenden Ergebnisse

3.13. Selektive Stimulation der Alpha 2-Rezeptoren am Epithel und Endothel

Die selektive Stimulation von Alpha 2-Adrenozeptoren kornealer Epithel- und Endothelzellen führte zu einer dosisabhängigen Aktivierung der Proteinkinase A (Abbildung 24).

Am kornealen Epithel führte die Aktivierung der Proteinkinase A durch Stimulation mit 10^{-4} mg/ml und 10^{-6} mg/ml des selektiven Alpha 2-Adrenozeptor-Agonisten Brimonidine zum fast vollständigen Aufbrauchen der zugesetzten 10 μ M ATP, wohingegen bei Stimulation mit 10^{-8} mg/ml Brimonidine noch 5,6674 μ M ATP verblieben. Nach fünfzehnminütiger Inkubation mit 10^{-4} mg/ml Brimonidine zeigte sich auch am kornealen Endothel ein fast vollständiger Verbrauch des zugeführten ATP, wohingegen nach Inkubation mit 10^{-6} mg/ml Brimonidine noch 0,8157 μ M ATP und nach Inkubation mit 10^{-8} mg/ml Brimonidine noch 1,9220 μ M ATP in der Probe nachzuweisen waren.

Abbildung 24: Verbliebenes ATP nach dosisabhängiger Aktivierung der Proteinkinase A kornealer Epithel- und Endothelzellen durch selektive Alpha 2-Adrenozeptor-Stimulation

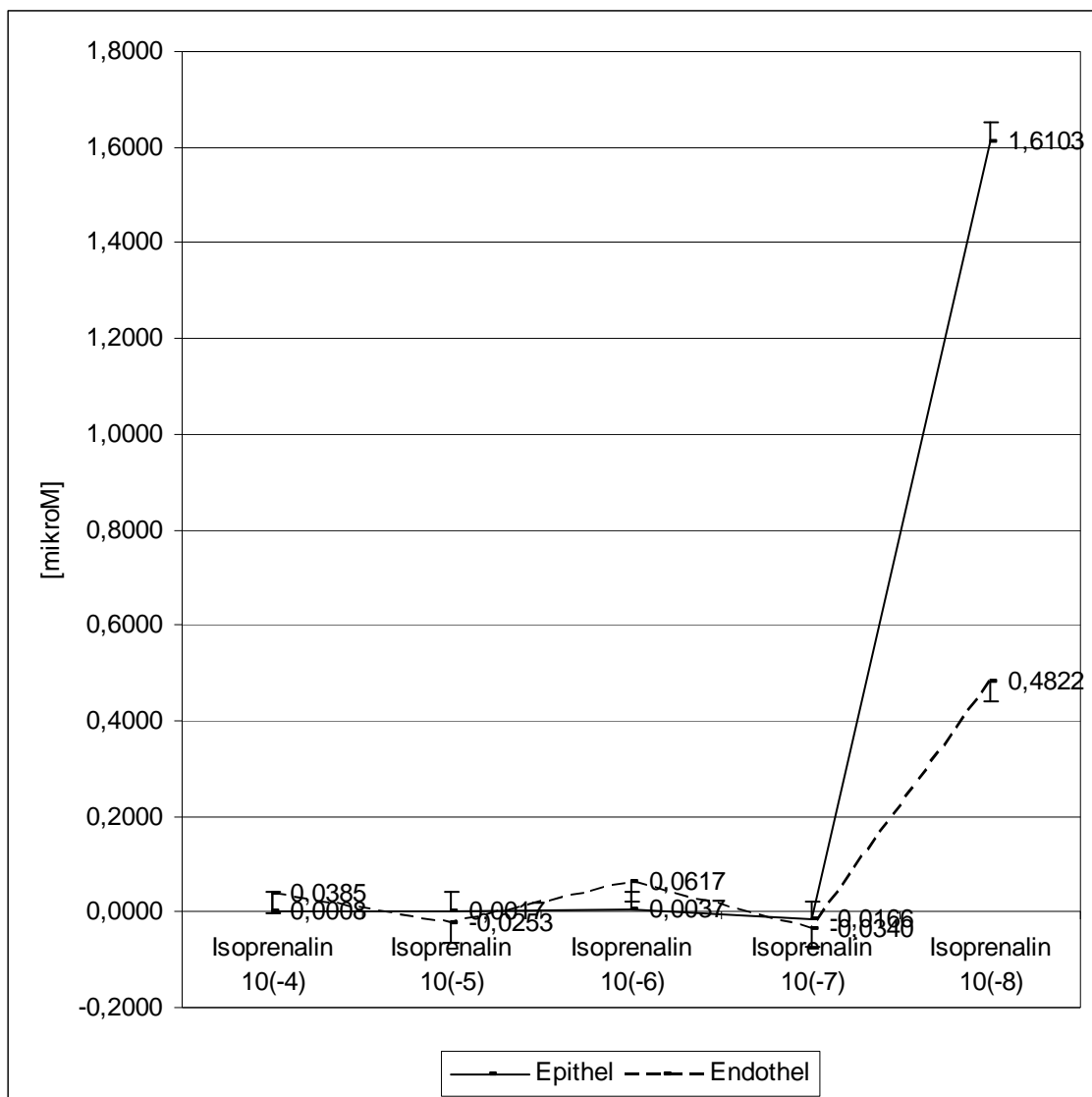


3.14. Nicht-selektive Stimulation der Beta-Rezeptoren am Epithel und Endothel

Die unspezifische Stimulation von Beta-Adrenozeptoren kornealer Epithel- und Endothelzellen zeigte eine dosisabhängige Aktivierung der Proteinkinase A (Abbildung 25). Während nach Inkubation mit 10^{-4} mg/ml, 10^{-5} mg/ml, 10^{-6} mg/ml und 10^{-7} mg/ml Isoprenalin, einem starken, nicht-selektiven Beta-

Adrenozeptor-Agonisten, sowohl an Epithel als auch an Endothel die zugeführten 10 μM ATP nahezu vollständig aufgebraucht wurden, ließen sich nach Inkubation mit 10^{-8} mg/ml Isoprenalin noch 1,6103 μM ATP in kornealen Epithel- und 0,4822 μM ATP in kornealen Endothelzellen nachweisen.

Abbildung 25: Verbliebenes ATP nach dosisabhängiger Aktivierung der Proteinkinase A kornealer Epithel- und Endothelzellen durch nicht-selektive Beta-Adrenozeptor-Stimulation

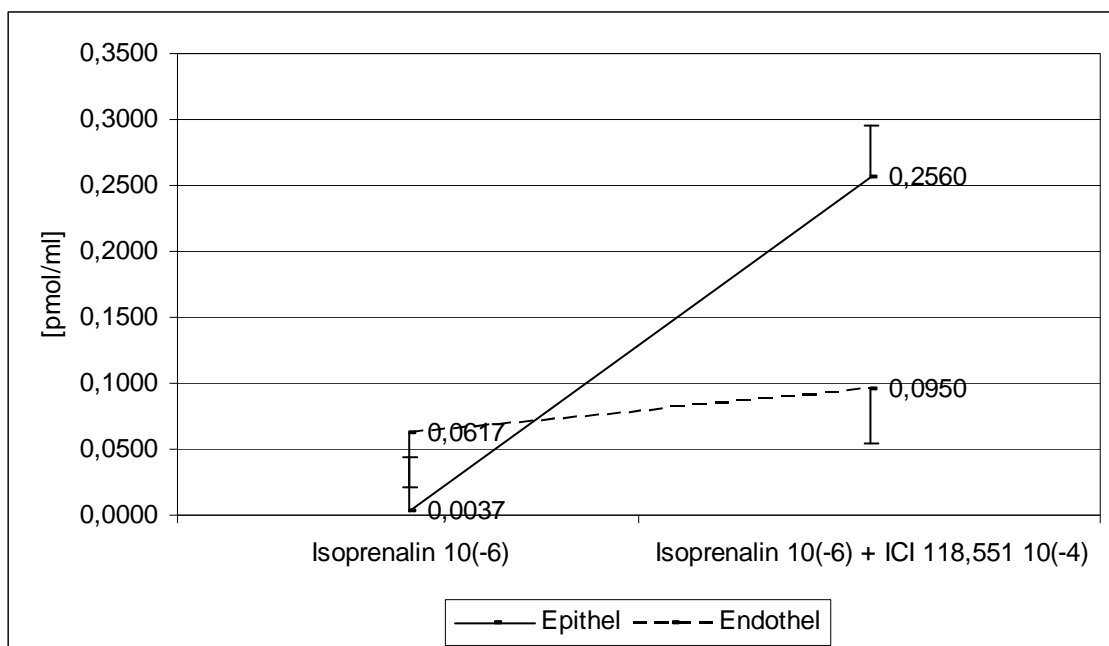


Die Aktivierung der Proteinkinase A durch unspezifische beta-adrenerge Stimulation ist das Ergebnis der Stimulation von β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren, wie

sich durch die selektive Blockade der β -Subtypen kornealer Epithel- und Endothelzellen zeigte (Abbildung 26 und 27).

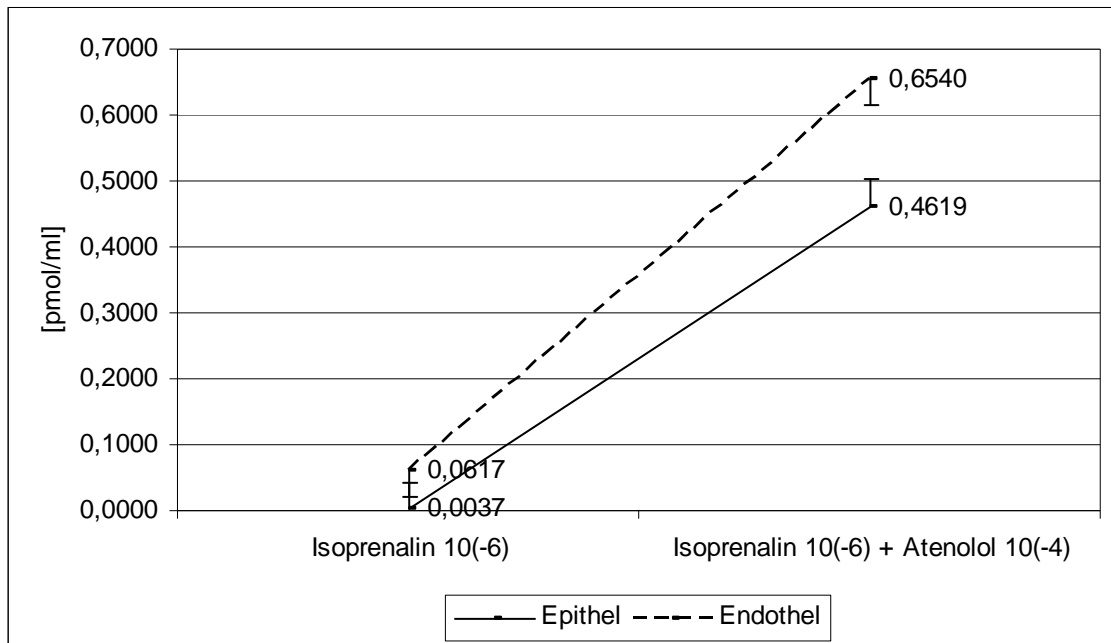
3.15. Selektive Stimulation der Beta 1-Rezeptoren am Epithel und Endothel

Abbildung 26: Verbliebenes ATP nach Aktivierung der Proteinkinase A kornealer Epithel- und Endothelzellen durch nicht-selektive β -Adrenozeptor-Stimulation und β_2 -Adrenozeptor-Blockade



3.16. Selektive Stimulation der Beta 2-Rezeptoren am Epithel und Endothel

Abbildung 27: Verbliebenes ATP nach Aktivierung der Proteinkinase A kornealer Epithel- und Endothelzellen durch nicht-selektive Beta-Adrenozeptor-Stimulation und Beta 1-Adrenozeptor-Blockade



Sowohl an Hornhautepithel als auch an Hornhautendothel führte die Stimulation von Alpha 2-, Beta 1- und Beta 2-Adrenozeptoren zu einer dosisabhängigen Aktivierung der Proteinkinase A.

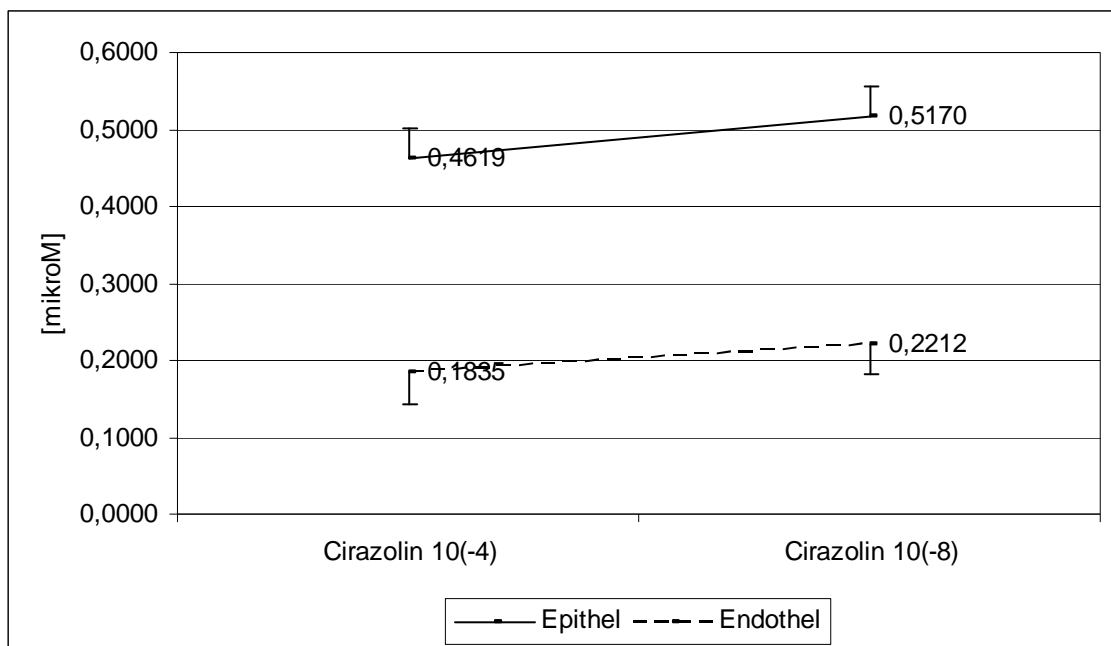
3.17. Selektive Stimulation von Alpha 1-Rezeptoren am Epithel und Endothel

Die selektive Stimulation von Alpha 1-Adrenozeptoren kornealer Epithel- und Endothelzellen führte zu einer dosisabhängigen Aktivierung der Proteinkinase C (Abbildung 28).

An kornealen Epithelzellen führte die fünfzehnminütige Inkubation mit 10^{-4} mg/ml Cirazolin, einem selektiven Alpha 1-Adrenozeptor-Agonisten, zu einer Reduktion der zugeführten $10 \mu\text{M}$ ATP auf $0,4619 \mu\text{M}$, nach Inkubation mit 10^{-8}

mg/ml Cirazolin verblieben noch 0,5170 μM ATP. Am Hornhautendothel führte die Aktivierung der Proteinkinase C mit 10^{-4} mg/ml Cirazolin zu einer Verminderung des ATP auf 0,1835 μM ATP, die Aktivierung mit 10^{-8} mg/ml Cirazolin zu Verminderung auf 0,0,2212 μM ATP

Abbildung 28: Verbliebenes ATP nach dosisabhängiger Aktivierung der Proteinkinase C kornealer Epithel- und Endothelzellen durch selektive Alpha 1-Adrenozeptor-Stimulation



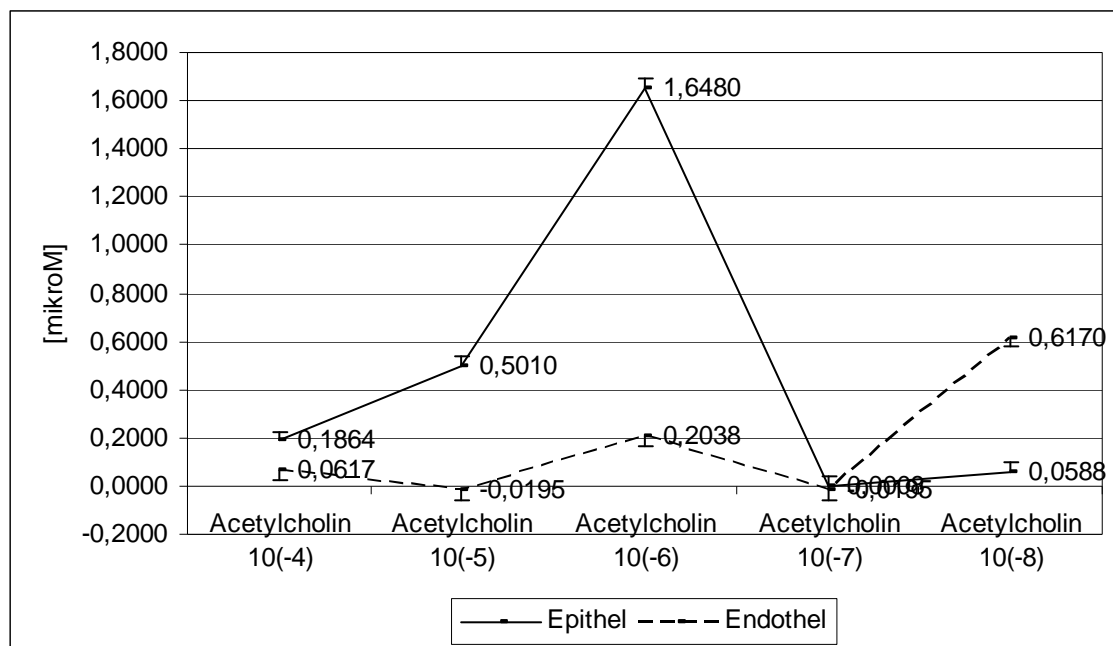
3.18. Nicht-selektive Stimulation von muskarinergen Cholinorezeptoren am Epithel und Endothel

Die nicht-selektive Stimulation von muskarinergen Cholinozeptoren kornealer Epithel- und Endothelzellen führte zu einer dosisabhängigen Aktivierung der Proteinkinase C (Abbildung 29).

Die Stimulation muskarinergere Acetylcholinrezeptoren des Hornhautendothels mit 10^{-4} mg/ml Acetylcholin führte zu einer Verminderung des zugeführten 10 μM ATP auf 0,0617 μM ATP, mit 10^{-8} mg/ml Acetylcholin auf 0,6170 μM ATP. An kornealem Epithel führte die Inkubation mit 10^{-4} mg/ml Acetylcholin zu einer Verminderung auf 0,1064 μM ATP, mit 10^{-6} mg/ml Acetylcholin auf 1,6480 μM

ATP. Dass der ATP-Verbrauch bei weiterer Verdünnung des Agonisten auf 10^{-7} mg/ml und 10^{-8} mg/ml Acetylcholin wieder anstieg, ist am ehesten als messbedingter Fehler anzusehen.

Abbildung 29: Verbliebenes ATP nach dosisabhängiger Aktivierung der Proteinkinase C kornealer Epithel- und Endothelzellen durch Stimulation muskarinerger Cholinozeptoren



Sowohl an Hornhautepithel als auch an Hornhautendothel führte die Stimulation von Alpha 1-Adrenozeptoren und muskarinerger Cholinozeptoren zu einer dosisabhängigen Aktivierung der Proteinkinase C.

4. Diskussion

Durch die vorliegende Arbeit wurden erstmals histologisch die adrenergen Rezeptoren Alpha 1, Alpha 2A, Beta 1 und Beta 2 an bovinem kornealem Epithel und Alpha 1, Alpha 2A, Beta 1 und Beta 2 an bovinem kornealem Endothel nachgewiesen. Am bovinen Epithel stimmen die Ergebnisse bezüglich der Rezeptoren Alpha 1, Beta 1 und Beta 2 mit den Nachweisen an humanem Epithel durch unsere Arbeitsgruppe überein. Die Untersuchungen an humanem Gewebe waren dabei methodisch identisch zu den hier dargestellten Untersuchungen durchgeführt worden (Grüb et al., 2005). Zuvor wurden auch von anderen Arbeitsgruppen der Alpha 1-, Beta 1- und Beta 2-Rezeptor an humanem Epithel nachgewiesen, der Beta 2-Rezeptor auch an bovinem Epithel (Walkenbach et al., 1991, Walkenbach et al., 1984). Abweichend von diesen Ergebnissen gelang erstmals der Nachweis des Alpha 2A-Rezeptors an bovinem kornealem Epithel. Dieser Nachweis sollte noch durch weiterführende Studien erhärtet werden, da alle Subtypen der Alpha 2 Gruppe, verglichen mit dem Alpha 1-Rezeptor, insgesamt viel weniger exprimiert werden und in verschiedenen humanen und animalen Geweben deutliche Expressionsunterschiede bestehen (Berkowitz et al., 1994).

Am Endothel konnte sowohl an humanem wie auch an bovinem Gewebe der Alpha 1-, Alpha 2A, Beta 1- und Beta 2-Rezeptor nachgewiesen werden (Grüb et al., 2005). Nicht nachweisbar war der Alpha 2C-Rezeptor sowohl an humanem als auch an bovinem Gewebe. Vermutlich besteht eine Dominanz der Beta 2-Rezeptoren über die Beta 1-Rezeptoren (Walkenbach et al., 1984).

Bei den muskarinergen Rezeptoren wurden erstmals histologisch an bovinem kornealem Epithel und Endothel die Rezeptoren M4 und M5 nachgewiesen, nicht nachweisbar waren die Rezeptoren M1 bis M3. An humanen kornealen Geweben gelang der Nachweis von M2, M4 und M5 (Grüb et al., 2005). Socci et al. wiesen dagegen an bovinem kornealem Epithel durch die reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion den M2-Rezeptor nach (Socci et al., 1996). Allerdings erfolgte durch Socci kein histologischer Nachweis durch Antikörper. Darüberhinaus wurden M4 und M5 nicht funktionell untersucht und

es gelang nur der mRNA-Nachweis für den M2-Rezeptor. Der M4 Rezeptor wurde aus cDNA vom Kaninchen nachgewiesen (Shepard und Rae, 1998).

Es ist bekannt, dass die zur Verfügung stehenden Liganden eine eher niedrige Selektivität aufweisen, sodass eine pharmakologische Differenzierung der muskarinergen Rezeptoren teilweise schwierig ist (Matsui et al., 2004). An okularen Geweben konnte der M5-Rezeptor nachgewiesen werden (Gil et al. 1997).

Die Proteinkinase A wurde an bovinem kornealen Epithel und Endothel mit der vorliegenden Studie erstmals histologisch nachgewiesen. Die Proteinkinase A von humanen kardialen Zellen reagiert als third messenger nach Stimulation des Beta 1-Rezeptors und des Beta 2-Rezeptors. Die Rezeptoren sind über ein Gs-Protein mit der intrazellulären Signaltransduktionskaskade verbunden (Walsh und Van Patten, 1994). In kardialen Zellen der Maus sind die Beta 2-Rezeptoren offensichtlich über Gs und Gi-Proteine gekoppelt (Xiao et al., 1999). Für bovine Zellen liegen keine vergleichbaren Studien vor. Lediglich für die Regulation des HCO₃-Transportes der bovinen endothelialen Zelllinie CBCESs werden verschiedene Signaltransduktionskaskaden wie PKA und PKC postuliert (Zhang et al., 2002). Wir konnten an bovinem Epithel und Endothel eine funktionelle Verbindung zwischen der Stimulation des Beta 1, Beta 2, Alpha 2-Rezeptor nachweisen. Die Betarezeptoren sind positiv mit der Adenylatzyklaseaktivität über ein stimulatorisches G-Protein verbunden. Es gibt zusätzlich Hinweise, daß die Betarezeptoren über stimulatorische G-Proteine an spannungsabhängige Ca²⁺ - Kanäle gekoppelt sind (Bylund et al., 1994). Über die Stimulation der second messenger Phospholipase C, Inositoltriphosphat und Diacylglycerol werden spannungsabhängige Ca²⁺ - Kanäle und die third messenger Proteinkinase C, die Phospholipase A und C aktiviert sowie Arachidonsäure und CAMP freigesetzt (Berridge und Irvine, 1989). Der Alpha 2-Rezeptor ist an verschiedene G-Proteine gekoppelt, darunter Gi/G0. Alle Untergruppen sind negativ mit der Adenylatzyklase gekoppelt und üben so einen inhibitorischen Effekt auf die cAMP Konzentration aus. Der Alpha 2-Rezeptor ist, soweit bekannt, negativ mit der PKA gekoppelt.

Bei einer Stimulation wäre eine verminderte PKA-Aktivität zu erwarten. Die hier durchgeführten Versuche ergaben jedoch sowohl an bovinem Epithel als auch am Endothel eine positive Kopplung mit der PKA. Als Gründe für den Anstieg der PKA-Aktivität gibt es vier Ursachen: Neben der Kopplung an das Gi-Protein werden für die humanen Alpha 2-Rezeptoren alternative intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden diskutiert. Es können nicht alle intrazelluläre Wirkungen nach Stimulation der Alpha 2-Rezeptoren durch die Hemmung der cAMP Aktivität erklärt werden. Es wird daher eine Kopplung an Gs und Gq/11 vermutet (Aantaa et al., 1995). Zweitens, an Beta-Rezeptoren wurde ein „Gs/Gi-switching“ nachgewiesen. Nach Stimulation der PKA kann es am Rezeptor zu einem Wechsel des G-Proteins. Ein ähnlicher „switching“-Mechanismus könnte auch bei der Stimulation des Alpha 2-Rezeptors in der hier durchgeführten Studie vorliegen (Martin et al., 2004). Drittens, durch eine hohe Konzentration der stimulierenden Hormone, könnte es zu einer Stimulation anderer Rezeptoren im Sinne einer Kreuzreaktivität gekommen sein. Letztlich ist aus verschiedenen experimentellen Ansätzen bekannt, dass Konservierungsstoffe, wie sie im von uns eingesetzten Brimonidine enthalten sind, einen hemmenden Einfluß auf die Rezeptor-G-Protein Bindung nehmen können oder rezeptorunabhängig G-Proteine aktivieren (Odagaki et al., 2000).

Die Isoformen der Proteinkinase C wurden an bovinem und humanem kornealen Epithel und Endothel durch unsere Arbeitsgruppe histologisch untersucht. An humanem kornealem Epithel und Endothel wurden die Isoformen alpha, delta, epsilon und zeta nachweisen. (El-Wardani et al., 2005). Die Isoformen an bovinem kornealen Epithel und Endothel entsprachen den am humanen Gewebe gefundenen Isoformen (El-Wardani, persönliche Mitteilung). An kultivierten kornealen Endothelzellen der Ratte konnten die Isoformen alpha, delta, epsilon, iota, eta, gamma und theta nachgewiesen werden. Wobei hinsichtlich der Zellproliferation PKC alpha und epsilon funktionell dominierten (Graham et al., 2000). Alle Untergruppen des Alpha 1-Rezeptors von humanen kardialen Zellen sind über die Phospholipase C und D mit der Proteinkinase C verbunden (Clerk und Sugden, 1997). Die drei Alpha 1-Rezeptorsubtypen sind

beim Menschen kloniert worden (Lomasney et al., 1991, Perez et al., 1991, Hirasawa et al., 1993). Alle Alpha 1-Rezeptorsubtypen sind intensiv untersucht worden. In Fibroblasten konnten die Subtypen jeweils stabil exprimiert werden. Hinsichtlich der Kopplung an die PKC ergab sich der stärkste Effekt für die Stimulation des Alpha 1A-Rezeptors vor dem Alpha 1B- und dem Alpha 1D-Rezeptor (Taguchi et al., 1998). Für die spezifische Stimulation des Alpha 1-Rezeptors mit Cirazolin konnte auch für das bovine korneale Epithel und Endothel eine dosisabhängige Aktivität der PKC nachgewiesen werden.

Die muskarinergen Rezeptoren sind sowohl mit der Proteinkinase A als auch mit der Proteinkinase C verbunden. Der M2- und der M4-Rezeptor sind bevorzugt mit dem Gi/o-Protein gekoppelt und führen über die Hemmung der Adenylatzyklase zu einer Reduktion von cAMP und steigern dadurch nicht die PKA-Aktivität. Der M1-, M3- und M5-Rezeptor ist bevorzugt an das Gq/11-Protein gekoppelt. Seine Stimulation führt zu einer Aktivierung der Phospholipase C und der Bildung von Diacylglycerol und Inositolphosphat, welches wiederum die PKC aktiviert (Kirstein und Insel, 2004). In der vorliegenden Arbeit konnten an bovinem Epithel und Endothel der M4- und der M5-Rezeptor nachgewiesen werden. Basierend auf diesen Ergebnissen konnte erstmals die Aktivierung der Proteinkinase C nach Stimulation muskarinergere Rezeptoren (M5) des kornealen Epithels und Endothels nachgewiesen werden. Aus der vorliegenden Arbeit kann somit auch für korneale Epithel- und Endothelzellen der klassische Signalweg auf muskarinerge Stimulation beschrieben werden: Stimulation muskarinergere M5-Rezeptoren führt zu einer Umwandlung von Phosphatidylinositolbiphosphat in Inositoltriphosphat mit konsekutiver Aktivierung der Proteinkinase C.

Funktionell konnte die Aktivität der Proteinkinase C am bovinem Epithel und Endothel durch die selektive Stimulation der Alpha 1-Rezeptoren und der unspezifischen Stimulation der muskarinergen Rezeptoren nachgewiesen werden.

5. Zusammenfassung

Fragestellung: Das Vorhandensein von adrenergen und muskarinergen Rezeptoren und deren Funktion in der Regulation kornealer Prozesse am Epithel und Endothel ist lückenhaft. Es stellt sich daher die Frage nach dem Nachweis der Rezeptoruntergruppen an den beiden Gewebsschichten und nach den funktionellen Auswirkungen auf die intrazelluläre Signalkaskade, speziell auf die Proteinkinasen A und C, nach ihrer Stimulation oder Blockade.

Material und Methoden: Zur Beantwortung dieser Fragen erfolgten zunächst immunhistochemische Untersuchungen der fraglichen Rezeptoren an bovinen kornealen Epithel- und Endothelzellen. Das Vorhandensein der PKA sollte ebenfalls über immunhistochemische Färbungen erfolgen. Zum Nachweis einer funktionellen Verbindung zwischen den Rezeptoren und den beiden Proteinkinasen wurden Zellhomogenisate des kornealen Epithels oder Endothels spezifisch durch Agonisten oder Antagonisten oder einer Kombination stimuliert. Anschließend wurde die PK-Aktivität über die Lichtemission einer Luciferasereaktion bestimmt.

Ergebnisse: Die adrenergen Rezeptoren Alpha 1, Alpha 2A, Beta 1 und Beta 2 sind am bovinem kornealen Epithel und Endothel nachweisbar. Die muskarinergen Rezeptoren M4 und M5 sind am bovinem kornealen Epithel und Endothel nachweisbar. Die Proteinkinase A ist am bovinem kornealen Epithel und Endothel nachweisbar. Die Proteinkinase A ist am bovinen Epithel und Endothel funktionell mit dem Beta 1-, Beta 2-, und Alpha 2-Rezeptor verbunden. Die Proteinkinase C ist am bovinen Epithel und Endothel funktionell mit dem Alpha 1- und dem M5-Rezeptor verbunden.

Schlussfolgerung: An bovinem kornealem Epithel und Endothel konnten adrenerge und muskarinerge Rezeptoren nachgewiesen werden. Ihre selektive Stimulation beeinflusst konzentrationsabhängig die Aktivität der intrazellulären Signaltransduktionskaskade.

6. Literaturverzeichnis

Aantaa, R., Marjamaki, A., Scheinin, M. (1995) Molecular pharmacology of alpha 2-adrenoceptor subtypes. *Ann Med* 27, 439-449

Arch, J.R., Ainsworth, A.T., Cawthorne, M.A., Piercy, V., Sennitt, M.V., Thody, V.E., Wilson, C., Wilson, S. (1984) Atypical beta-adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs. *Nature* 309, 163-165

Berkowitz, D.E., Price, D.T., Page, S.O., Schwinn, D.A. (1994) Localization of messenger RNA for three distinct Alpha 2-adrenergic receptor subtypes in human tissues: Evidence for species heterogeneity and implications for human pharmacology. *Anesthesiology* 81, 1235-1244

Berridge, M.J., Irvine, R.F. (1989) Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341, 197-205

Bond, R.A., Clarke, D.E. (1988) Agonist and antagonist characterization of a putative adrenoceptor with distinct pharmacological properties from the alpha- and beta-subtypes. *Br J Pharmacol* 95, 723-734

Brodde, O.-E., Michel, M.C. (1999) Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev* 51, 651-690

Bylund, D.B., Eikenberg, D.C., Hieble, J.P., Langer, S.Z., Lefkowitz, R.J., Minneman, K.P., Molinoff, P.B., Ruffolo, R.R., Trendelenburg, U. (1994) International union of pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev* 46, 121-136

Chu, T.C., Candia, O.A. (1988) Role of alpha 1- and alpha 2-adrenergic receptors in Cl⁻ transport across frog corneal epithelium. *Am J Physiol* 255, 724-730

Colley, A.M., Cavanagh, H.D. (1982) Binding of [3H]dihydroalprenolol and [3H]quinuclidinyl benzilate to intact cells of cultured corneal epithelium. *Metab Pediatr Syst Ophthalmol* 6, 75-86

Colley, A.M., Cavanagh, H.D. (1982a) Binding of 3H-dihydroalprenolol and 3H-quinuclidinyl benzilate to intact cells of cultured corneal epithelium. *Metab Pediatr Syst Ophthalmol* 6, 75-86

Colley, A.M., Cavanagh, H.D. (1982b) Cholinergic, adrenergic and PGE1 effects on cyclic nucleotides and growth in cultured corneal epithelium. *Metab Pediatr Syst Ophthalmol* 6, 63-74

Collins, J.F., Augustin, A.J. (1991) *Augenheilkunde*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York

El-Wardani, M., Grüb, M., Wallenfels-Thilo, B., Mielke, J., Bartz-Schmidt, K.U., Rohrbach, J.M. (2005) Protein kinase C isoforms in human corneal epithelium and endothelium. Zur Publikation eingereicht.

Fredriksson, R., Gloriam, D.E., Hoglund, P.J., Lagerstrom, M.C., Schioth, H.B. (2003) There exist at least 30 human G-protein-coupled receptors with long Ser/Thr-rich N-termini. *Biochem Biophys Res Commun* 301, 725-734

Gil, D.W., Krauss, H.A., Bogardus, A.M., WoldeMussie, E. (1997) Muscarinic receptor subtypes in human iris-ciliary body measured by immunoprecipitation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 1434-1442

Graham, M.A., Rawe, I., Dartt, D.A., Joyce, N.C. (2000) Protein kinase C regulation of corneal endothelial cell proliferation and cell cycle. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 4124-4132

Graham, R.M., Perez, D.M., Hwa, J., Piascik, M.T. (1996) Alpha 1-adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function, and signalling. *Circulation Research* 78, 737-749

Grayson, T.H., Ellis, J.M., Chen, S., Graham, R.M., Brown, R.D., Hill, C.E. (1998) Immunohistochemical localisation of Alpha 1B-adrenergic receptors in the rat iris. *Cell Tissue Res* 293, 435-444

Grüb, M., Wallenfels-Thilo, B., Denk, P.O., Mielke, J., Reinthal, E., Rohrbach J. M., Bartz-Schmidt, K.U., (2005) Monoamine receptors in human corneal epithelium and endothelium. *Acta Ophthalmol Scand* doi: 10.1111/j.1600-0420.2005.00551.x

Gupta, N., Drance, S.M., McAllister, R., Prasad, S., Rootman, J., Cynader, M.S. (1994) Localization of M3 muscarinic receptor subtype and mRNA in the human eye. *Ophthalmic Res* 26, 207-213

Harrison, J.K., Pearson, W.R., Lynch, K.R. (1991) Molecular characterization of alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors. *Trends Pharmacol Sci* 12, 62-67

Hieble, J.P., Bylund, D.B., Clarke, D.E., Eikenburg, D.C., Langer, S.Z., Lefkowitz, R.J., Minneman, K.P., Ruffolo, R.R.Jr. (1995) International union of pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol Rev* 47, 267-270

Hirasawa, A., Shibata, K., Horie, K., Takei, Y., Obika, K., Tanaka, T., Muramoto, N., Takagaki, K., Yano, J., Tsujimoto, G. (1995) Cloning, functional expression and tissue distribution of human alpha 1C-adrenoceptor splice variants. *FEBS Lett* 363, 256-260

Kaufmann, H.E., Barron, B.A., McDonald, M.B., Waltman, S.R. (1988) *The Cornea*. Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London, Melbourne

- Kuschinsky, G., Lüllmann, H., Mohr, K. (1993) Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Kirstein, S.L, Insel, P.A. (2004) Autonomic nervous system pharmacogenomics: a progress report. *Pharmacol Rev* 56, 31-52
- Lands, A.M., Arnold, A., McAuliff, J.P., Luduena, F.P., Brown, T.G.Jr. (1967) Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* 214, 597-598
- Lind, G.H., Cavanagh, H.D. (1993) Nuclear acetylcholine receptors in corneal cells from rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34, 2943-2952
- Lomasney, J.W., Cotecchia, S., Lorenz, W., Leung, W.Y., Schwinn, D.A., Yang-Feng, T.L., Brownstein, M., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. (1991) Molecular cloning and expression of the cDNA for the alpha 1A-adrenergic receptor. The gene for which is located on human chromosome 5. *J. Biol Chem* 193, 264-275
- Mackinnon, A.C., Spedding, M., Brown, C.M. (1994) Alpha 2-adrenoceptors: more subtypes but fewer functional differences. *Trends Pharmacol Sci* 15, 119-123
- Marfurt, C.F., Jones, M.A., Thrasher, K. (1998) Parasympathetic innervation of the rat cornea. *Exp Eye Res* 66, 437-448
- Marfurt, C.F., Kingsley, R.E., Echtenkamp, S.E. (1989) Sensory and sympathetic innervation of the mammalian cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30, 461-472
- Martin, N.P., Whalen, E.J., Zamah, M.A., Pierce, K.L., Lefkowitz, R.J. (2004) PKA-mediated phosphorylation of the beta1-adrenergic receptor promotes Gs/Gi switching. *Cell Signal* 16, 1397-1403
- Matsui, M., Yamada, S., Oki, T., Manabe, T., Taketo, M.M., Ehlert, F.J. (2004) Functional analysis of muscarinic acetylcholine receptors using knockout mice. *Life Sciences* 75, 2971-2981
- Minneman, K.P., Esbenshade, T.A. (1994) Alpha 1-adrenergic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 34, 117-133
- Nagano, T., Hao, J.L., Nakamura, M., Nishida, T. (2002) Role of protein kinase C signaling in collagen degradation by rabbit corneal fibroblastst cultured in three-dimensional collagen gels. *Cornea* 21, 584-588
- Neufeld, A.H., Zawistowski, K.A., Page, E.D., Bromberg, B.B. (1978) Influences on the density of beta-adrenergic receptors in the cornea and iris-ciliary body of the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci*17, 1069-1075

- Odagaki, Y., Nishi, N., Koyama, T. (2000) Functional coupling of GABA-B receptors with G proteins that are sensitive to N-ethylmaleimide treatment, suramin, and benzalkonium chloride in rat cerebral cortical membranes. *J Neural Transm* 107, 1101-1116
- Perez, D.M., Piascik, M.T., Graham, R.M. (1991) Solution-phase library screening for the identification of rare clones: isolation of an alpha 1D-adrenergic receptor cDNA. *Mol Pharmacol* 40, 876-883
- Reinach, P.C., Socci, R.R., Keith, C., Scanlon, M. (1992) Adrenergic receptor-mediated increase of intracellular Ca²⁺ concentration in isolated bovine corneal epithelial cells. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol* 102, 709-714.
- Shepard, A.R., Rae, J.L. (1998) Ion transporters and receptors in cDNA libraries from lens and cornea epithelia. *Curr Eye Res*, 17, 708-719
- Socci, R.R., Tachado, S.D., Aronstam, R.S., Reinach, P.S. (1996) Characterisation of the muscarinic receptor subtypes in the bovine corneal epithelial cells. *J Ocul Pharmacol Ther* 12, 259-269
- Stryer, L. (1988) *Biochemie*. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, New York
- Taguchi, K., Yang, M., Goepel, M., Michel, M.C. (1998) Comparison of human alpha 1-adrenoceptor subtype coupling to protein kinase C activation and related signalling pathways. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 357, 100-110
- Walkenbach, R.J., Chao, W.-T.H., Bylund, D.B., Gibbs, S.R. (1985) Characterization of beta-adrenergic receptors in fresh and primary cultured bovine corneal endothelium. *Exp Eye Res* 40, 15-21
- Walkenbach, R.J., Gibbs, S.R., Bylund, D.B., Chao, W.T. (1984) Characteristics of beta-adrenergic receptors in bovine corneal epithelium: comparison of fresh tissue and cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun* 121, 664-672
- Walkenbach, R.J., Guo-Sui, Y., Reinach, P.S. (1992) Alpha 1 – adrenoceptors in the corneal endothelium. *Exp Eye Res* 55, 443-450
- Walkenbach, R.J., LeGrand, R.D. (1982) Adenylate cyclase activity in bovine and human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 22, 120-124
- Walkenbach, R.J., Ye, G.S. (1990) Muscarinic receptors and their regulation of cyclic GMP in corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31, 702-707
- Walkenbach, R.J., Ye, G.-S. (1991) Muscarinic cholinceptor regulation of cyclic guanosine monophosphate in human corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32, 610-615

Walkenbach, R.J., Ye, G.S., Boney, F., Dueker, D.K. (1993) Muscarinic cholinceptors in native and cultured human corneal endothelium. *Curr Eye Res* 12, 155-162

Walkenbach, R.J., Ye, G.-S., Reinach, P.S., Boney, F. (1991) Alpha 1 – adrenoceptors in human corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32, 3067-3072

Walsh, D.A., Van Patten, S.M. (1994) Multiple pathway signals transduction by the cAMP-dependent protein kinase. *FASEB-J* 8, 1227-1236

Wiederholt, M., Schmidt, D.K., Eggebrecht, R., Zimmermann, J., Fischer, F.H. (1983) Adrenergic regulation of sodium and chloride transport in the isolated cornea of rabbit and man. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 220, 240-244

Zhang, Y., Araki-Sasaki, K., Handa, H., Akhtar, R.A. (1995) Effect of carbachol on phospholipase C-mediated phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis, and its modulation by isoproterenol in rabbit corneal epithelial cells. *Curr Eye Res* 14, 563-571

Xiao, R.P., Avdonin, P., Zhou, Y.Y., Cheng, H., Akhter, S.A., Eschenhagen, T., Lefkowitz, R.J., Koch, W.J., Lakatta, E.G. (1999) Coupling of beta2-adrenoceptor to Gi proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. *Circ Res* 84, 43-52.

Zhang, Y., Xie, Q., Sun, X.C., Bonanno, J.A. (2002) Enhancement of HCO₃⁻ permeability across the apical membrane of bovine corneal endothelium by multiple signalling pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 1146-1153

7. Lebenslauf

- 18.08.1968 Geboren in Freudenstadt / Schwarzwald
- 1974-1978 Grundschule Calw
- 1978-1987 Hermann Hesse Gymnasium Calw
Allgemeine Hochschulreife
- 1987-1989 Zivildienst Fachklinik Hohenrodt für Suchtkranke
- 1990-1991 Otto Friedrich Universität Bamberg
Romanistik / Slavistik
- 1991-1992 Landesklinik Nordschwarzwald
Pflegehelfer in der Psychiatrie
- 1992-1994 Johannes Gutenberg Universität Mainz
Humanmedizin / Ärztliche Vorprüfung
- 1994-1999 Eberhard Karls Universität Tübingen
1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 1995
 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 1998
 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 1999
- Praktisches Jahr im Krankenhaus Sindelfingen
Wahlfach: Augenheilkunde an der Universität Tübingen
- 1999-2004 Facharztausbildung im Fach Augenheilkunde an der Universität
Tübingen. Facharztprüfung September 2004
- seit 2004 Oberarzt